



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

These En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat

Spécialité: BIOLOGIE ANIMALE

Intitulé

Toxicité d'un Hydrazine carboxylate (Bifenazate) et d'un Oxadiazine (Indoxacarbe) observée chez un modèle cellulaire d'eau douce: *Paramecium sp.*

Presentée par: M^{me}. SBARTAI IBTISSEM

Membre de Jury:

DJEBAR Med Réda (Pr)	Président	Universié de Annaba
BERREBBAH Houria (Pr)	Directeur de thèse	Universié de Annaba
BENSOLTANE Samira (Pr)	Examinatrice	Universié de Annaba
TADJINE Aicha (MCA)	Examinatrice	Universié El-Tarf
HAMDI PASHA Youssef (Pr)	Examineur	Universié de Constantine
LAHOUEL Mesbah (Pr)	Examineur	Universié de Jijel

Année universitaire : 2012-2013

*Nous ne sommes pas assez savants
ni vous, ni moi, pour tout analyser
Nous allons jeter, dans cette étrange "caverne"
un simple regard de profane, un regard candide,
le regard de quelqu'un qui ne prétend pas
savoir pourquoi quand on lui explique comment!*

René Barjavel

"La faim du tigre, 1966"

A la mémoire de mon très cher père

Remerciements

*Ce travail a été effectué au laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Annaba, dirigé par le **Professeur DJEBAR Med Reda** ; que je remercie vivement pour m' avoir ouvert les portes de son laboratoire et d' avoir accepter de présider ce jury.*

*Je tiens tout particulièrement à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude à Madame **BERREBBAH Houria**, Professeur à l'Université de Annaba, qui m'a fait l'honneur d'assurer mon encadrement et qui a su faire preuve de patience, d'indulgence et de compréhension tout au long de ces années me permettant ainsi de mener à bien cette étude.*

*Mes remerciements au **Professeur Bensoltane Samira** de l'Université d'Annaba pour l'immense privilège qu'elle me fait en faisant parti de mon jury.*

*Mes plus vifs remerciements au **Docteur Tadjine Aicha** Maitre de Conférence à l'Université d'El-Tarf, pour l'immense privilège qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail.*

*Ma plus profonde gratitude au **Professeur Hamdi Pacha** de l'Université de Constantine, pour l'attention qu'il portera à mon travail en acceptant de faire parti de mon jury.*

*Je remercie vivement le **Professeur Lahouel Mosbah** de l'université de Jijel pour avoir accepter d'examiner mon travail et faire parti de mon jury.*

*Mes plus vifs remerciements au **Docteur Tadjine Aicha** Maitre de conférences à l'Université d'El-TARF, pour l'immense privilège qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail.*

Un grand merci pour tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

Dédicace

A mon père,

A sa mémoire,

A son amour incomparable

A sa présence indispensable

Mais hélas aujourd'hui

C'est un jour sans lui

A ma mère, ma plus grande supportrice, pour son amour, son réconfort et ses prières.

A Hana, ma sœur, mon amie, ma confidente, pour tout l'amour et l'aide qu'elle me porte et cela depuis toujours même si parfois j'abuse....

A mon époux Mehdi pour m'avoir soutenu dans les moments les plus difficile et de m'avoir aider à continuer et d'aller vers l'avant.

A mon bébé Chahine, mon rayon de soleil.

A mes soeurs et frères, neveux et nièces,

A ma belle famille.

Un grand Merci à Dieu pour m'avoir donner tant de patience pour pouvoir continuer malgré les obstacles et les embûches.

A tous les membres du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire

A mes amis

A tous je dis

Mille Merci.....

المخلص:

ان الهدف الرئيسى من بحثنا يثمتثل فى دراسة اثر اثنان من المبيدات: bifenazate (مبيد القراد) و Indoxacarbe (مبيد الحشرات) على كائن من فصيلة الهدبيات : *Paramecium sp.*

النتائج المتحصل عليها تبين ان النمو الخلوى للبرامسيوم حساس لهدان الملوثان و ذلك عند التركيزات المرتفعة. التسمم قد قدر بحساب التركيز المثبط (IC 50) و بحساب الاستجابة فى المئة و الذى يقدر استجابة الهدبيات لهده الجزئيات و يؤكد بالتالى تطور منحنى النمو. و بالمثل، فان حساب زمن التضاعف و عدد النقسام الخلوى اظهر التأثير المثبط لهده المبيدات.

على صعيد آخر، اظهرنا أيضا تعطل الأيضات الرئيسية مثل: الغلوسيدات، البروتينات و الدهنيات.

ان التغيرات فى العلامات الحيوية و المتمثلة فى Catalase ، Glutathion S- Transférase و ascorbate -peroxydase أظهرت تقلبات تعتمد على الجرعة و ذلك للجزئيات التنتان. نفس الشىء بالنسبة للتغيرات فى MDA GSH .

أخيرا، فان رصد الأيض التنفسى أظهر تثبيط فى استهلاك الأوكسجين مما يدل على تأثير ضار لهده المنتجات.

لقد أمكننا تقييم المخاطر من فهم أفضل للتفاعلات التى قد توجد بين الجزئيات المختبرة و الكائن المستخدم و ذلك مع مختلف الوسائط(ماء، هواء، تربة).

كلمات البحث: تسمم، bifenazate، Indoxacarbe، IC50، الأيضات، زمن التضاعف، العلامات الحيوية، الأيض التنفسى، تقييم المخاطر.

Résumé:

Le principal objectif de notre travail est d'étudier l'effet de deux pesticides : le bifenazate (acaricide) et l'Indoxacarbe (insecticide) sur un protiste cilié d'eau douce : *Paramecium sp.*

Les résultats obtenus montrent que la croissance des paramécies est sensible aux deux xénobiotiques et ce pour les plus fortes concentrations. La toxicité a été évaluée par la détermination de l'IC 50 et par le calcul du pourcentage de réponse qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis de ces molécules et confirme ainsi l'évolution de la courbe de croissance. De même le calcul du temps de dédoublement ainsi que le nombre de division cellulaire a révélé un effet inhibiteur des deux xénobiotiques.

Sur un autre plan, nous avons également mis en évidence la perturbation des principaux métabolites à savoir : les glucides, protéines et lipides.

L'évolution des bio- marqueurs dont la Catalase, la Glutathion S- Transférase et l'ascorbate -peroxydase a montré des fluctuations dose- dépendantes pour les deux molécules. Il en est de même concernant l'évolution de la GSH et de MDA.

Enfin, le suivi du métabolisme respiratoire a mis en évidence une inhibition de la consommation d'oxygène traduisant ainsi un effet délétère de ces produits.

L'évaluation du risque a permis de mieux comprendre les interactions qui pouvaient exister entre les xénobiotiques testés et l'organisme utilisé ainsi qu'avec les différents milieux (sol, eau, air)

Mots clés : Toxicité, Bifenazate, Indoxacarbe, CI 50, métabolites, temps de dédoublement, Biomarqueurs, métabolisme respiratoire, évaluation du risque.

Abstract

The main objective of our works to study the effect of tow pesticides bifenazate (miticide) and indoxacarbe (insecticide) on a freshwater protest ciliate: *Paramecium sp.*

The results obtained show that the growth of *Paramecium* is sensitive to both xenobiotics and for the highest concentrations. Toxicity was evaluated by determining the IC 50 and by calculating the percentage response, which evaluates the response of protist toward these molecules and confirms the evolution of the growth curve. Similarly the calculation of the doubling time and the number of cell division showed an inhibitory effect of the two xenobiotics.

On another level, we also demonstrated the disruption of the main metabolites namely carbohydrates, proteins and lipids.

The development of biomarkers that catalase, glutathione S-transferase and ascorbate peroxidase showed dose-dependent changes for both molecules. It is also about the evolution of GSH and MDA.

Finally, monitoring of respiratory metabolism showed an inhibition of oxygen consumption reflecting a deleterious effect of these products.

Risk assessment has enabled a better understanding of the interactions that might exist between the xenobiotics tested and used the body as well as various media (soil, water, air)

Keywords: Toxicity, bifenazate Indoxacarb, CI 50, split time, Metabolites, Biomarkers, respiratory metabolism, Risk assessment.

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
----	-------	------

1	Paramètres physico-chimiques du Bifenazate	13
2	Effets du Bifenazate sur les oiseaux	14
3	Effets du Bifenazate sur les organismes aquatiques	15
4	Paramètres physico-chimiques de l'Indoxacarbe	17
5	Effets de l'indoxacarbe sur les oiseaux	18
6	Effets de l'Indoxacarbe sur les organismes aquatiques	19
7	Détermination de la CI ₅₀ pour le Bifenazate	58
8	Détermination du tg et du D/D après 24h d'exposition	59
9	Détermination du tg et du D/D après 120h d'exposition	60
10	Variation du taux de protéines totales	61
11	Variation du taux de Lipides totales	62
12	Variation du taux de Glucides	63
13	Détermination de la CI ₅₀ pour l'Indoxacarbe	76
14	Détermination du tg et du D/D après 24h d'exposition	76
15	Détermination du tg et du D/D après 120h d'exposition	77
16	Variation du taux de protéines totales	78
17	Variation du taux de lipides	79
18	Variation du taux de glucide	79
19	Tableau interactif des interactions liant les divers éléments du modèle conceptuel	95
20	Résultats du Biotest	98
21	Valeurs de l'indice de risque	99

Liste des figures

N°	Titre	Page
-----------	--------------	-------------

1	Formule plane du Bifenazate	12
2	Formule plane de l'Indoxacarbe	16
3	Les différents niveaux de la défense antioxydante	23
4	Structure d'une paramécie sous microscope	30
5	Protocole du test de cytotoxicité chez les paramécies	40
6	Protocole de dosage des macromolécules biochimiques	44
7	Schéma de l'électrode à oxygène	50
8	Schéma de la démarche générale d'une évaluation des risques selon le logiciel TS	52
9	Effet du Bifenazate sur la croissance cellulaire	55
10	Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations du Bifenazate	57
11	Variations du taux de MDA en présence de Bifenazate	64
12	Effet du Bifenazate sur le taux de GSH	65
13	Effet du Bifenazate sur l'activité GST	67
14	Effet du Bifenazate sur l'activité catalase	68
15	Effet du Bifenazate sur l'activité APX	69
16	Effet du Bifenazate sur le métabolisme respiratoire	70
17	Effet de l'Indoxacarbe sur la croissance cellulaire	73
18	Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations d'Indoxacarbe.	75
19	Variations du taux de MDA en présence d'Indoxacarbe	80
20	Effet de l'indoxacarbe sur le taux de GSH	82
21	Effet de l'Indoxacarbe sur l'activité GST	83
22	Effet de l'Indoxacarbe sur l'activité catalase	84
23	Effet de l'Indoxacarbe sur l'activité APX	85
24	Effet de l'Indoxacarbe sur le métabolisme respiratoire	86

25	Sommaire des éléments du modèle conceptuel	92
26	Modèle conceptuel	93
27	Relation dose/réponse du Bifenazate calculée à partir du biotest	97
28	Relation dose/réponse de l'Indoxacarbe calculée à partir du biotest	98
29	Hypothèse représentant la stratégie adoptée par les paramécies face à un stress chimique	114

Liste des symboles

DO : Densité optique.

μM : micromole

nmole	: nanomole
λ	: longueur d'onde.
nm	: nanomètre
T	: Temps
CI₅₀	: Concentration inhibitrice de 50% de la population
CI₁₆	: Concentration inhibitrice de 16% de la population
CI₈₄	: Concentration inhibitrice de 84% de la population
GST	: Glutathion S- transférase
CAT	: Catalase
APX	: Ascorbate –peroxydases
GSH	: Glutathion
ROL	: Radicaux oxygénés libres
H₂O₂	: peroxyde d'hydrogène
ppm	: partie par million

Table des matières

Résumé (Arabe)

Résumé (Français)

Abstract

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des symboles	

Chapitre I : Introduction

1. Généralités	5
2. Les différents types de pollution	6
2.1. La pollution atmosphérique	7
2.2. La pollution du sol	7
2.3. La pollution de l'eau	8
3. La pollution par les pesticides	9
3.1. L'impact des pesticides sur la biodiversité	10
3.2. Les effets des pesticides sur la faune et la flore	10
4. Mécanismes d'action et propriétés physico-chimiques des pesticides utilisés	11
4.1. Le Bifenazate	12
4.2. L'Indoxacarbe	16
5. Principales manifestations de la toxicité des xénobiotiques à l'échelle cellulaire.....	20
5.1. Stress chimique	20
5.2. Source et formation des dérivés ROS	24
6. Réponse cellulaire à la toxicité des xénobiotiques	25
6.1. Les Biomarqueurs	25
a/ La superfamille des glutathion peroxydases	26
b/ La superfamille des glutathion S-transférases.....	26
c/ La Catalase (CAT)	27
d/ Les superoxyde- dismutases	27
e/ Les peroxydases	27

f/ Le Glutathion	28
7. Rappel sur la Paramécie	29
7.1 Organisation générale de la paramécie	29
7.2 Classification	32
8. Problématique et Objectif du travail	32

Chapitre II : Matériel & Méthodes

1. Matériel biologique	37
2. Matériel chimique	37
3. Mode de traitement	37
4. Méthodes	37
4.1. Culture des paramécies	37
4.2. Paramètres mesurés	39
A. Tests de cytotoxicité	39
A.1. Cinétique de croissance cellulaire	39
A.2. Calcul du pourcentage de réponse	41
A.3. Détermination de la concentration inhibitrice (CI 50)	41
A.4. Détermination du temps de dédoublement cellulaire	42
A.5. Analyse statistique	42
B. Paramètres Biochimiques	43
B.1. Principe de dosage des principaux métabolites	43
B.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	45
B.3. Technique de dosage du glutathion (GSH).....	46
1. Principe de la méthode	46
2. Protocole expérimental	46
B.4. Technique de mesure de l'activité GST	47
1. Principe de la méthode	47
2. Protocole expérimental	48
B.5. Dosage de l'activité Ascorbate - peroxydases (APX).....	49
B.6. Dosage de l'activité Catalase (CAT)	49

B.7. Analyse statistique	49
C. Etude polarographique	50
D. Evaluation du Risque	51

Chapitre III : Résultats et Discussion

Partie A: Le Bifenazate

1. Les tests de cytotoxicités:

1.1. Effet du Bifenazate sur la croissance cellulaire.....	55
1.2. Calcul du pourcentage de réponse	57
1.3. Calcul de la CI 50.....	58
1.4. Détermination du temps de dédoublement cellulaire tg	59

2. Evolution des paramètres biochimiques

2.1. Effet du Bifenazate sur les principaux métabolites.....	60
2.1.1. Effet du Bifenazate sur le taux des protéines totales.....	60
2.1.2. Effet du Bifenazate sur la variation du taux des lipides.....	61
2.1.3. Effet du Bifenazate sur la variation du taux des glucides.....	62
2.2. Effets du Bifenazate sur l'évolution des biomarqueurs	64
a Effet sur le taux de MDA	64
b. Effet sur le taux de GSH	65
c. Effet du Bifenazate sur l'activité GST	66
d. Effet du Bifenazate sur l'activité Catalase	68
e. Effet du Bifenazate sur l'activité APX.....	69

3. Etude polarographique

Partie B: L'Indoxacarbe

1. Les tests de cytotoxicité.....

1.1. Effet de l'Indoxacarbe sur la croissance cellulaire.....	74
---	----

1.2. Calcul du pourcentage de réponse	76
1.3. Calcul de la CI 50.....	76
14 Détermination du temps de dédoublement.....	77
2. Evolution des paramètres biochimiques.....	78
2.1. Effet de l'Indoxacarbe sur les principaux métabolites.....	78
2.1.1. Effet de l'Indoxacarbe sur le taux des protéines totales.....	78
2.1.2. Effet de l' Indoxacarbe sur la variation du taux des lipides.....	79
2.1.3. Effet de l' Indoxacarbe sur la variation du tau x des glucides.....	80
2.2. Effets de l'Indoxacarbe sur l'évolution des biomarqueurs	81
a Effet sur le taux de MDA	81
b. Effet de l'Indoxacarbe sur le taux de GSH	82
c. Effet de l'Indoxacarbe sur l'activité GST	83
d. Effet de l'Indoxacarbe sur l'activité Catalase	84
e. Effet de l' Indoxacarbe sur l' activité APX.....	86
3. Etude polarographique	87
 Partie C: Evaluation du risque	
1. Modèle conceptuel.....	91
2. Biotest.....	96
2.1. Estimation du risque à partir du Biotest.....	96
2.2. Calcul de l'indice de risque.....	99
 Chapitre VI : Discussion générale et conclusion102	
Perspectives.....	115
Références bibliographiques.....	117

Annexes

1. Généralités :

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 de toutes sortes. Le constat aujourd'hui est dramatique. Des régions entières ont été dévastées et nombre de cours d'eau, lacs et nappes souterraines sont aujourd'hui pollués de par le monde, une pollution que la nature a du mal à résorber

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

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

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

D'après Jamet (1983), notre environnement physique est assimilable au niveau de ces trois compartiments : l'air, le sol et l'eau. En raison des échanges permanents qui existent entre ces compartiments, un pesticide introduit dans l'un d'entre eux, peut contaminer les deux autres, comme le sol reçoit la plupart des traitements, il joue un rôle déterminant dans la dispersion des pesticides en particulier par le phénomène de lessivage.

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

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

2. Les différents types de pollution :

Fort utilisé de nos jours, le terme de pollution recouvre bien des acceptations et qualifie une multitude d'actions qui, d'une façon ou d'une autre dégradent le milieu naturel.

La classification des pollutions n'est pas une entreprise aisée car on peut la réaliser à partir de nombreux critères, mais aucun n'est entièrement satisfaisant (une même substance peut présenter diverses modalités d'action) (Ramade, 2005).

On peut donc grouper les polluants selon:

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

2.1. La pollution atmosphérique :

L'air est pollué lorsque la présence d'une substance étrangère ou une variation importante dans la proportion de ses constituants est susceptible de provoquer un effet nuisible ou de créer une gêne.

Les principales causes naturelles de la pollution de l'atmosphère sont: le transport éolien des particules du sol et du pollen, les incendies de forêt et les émissions volcaniques (Ramade, 1995 ; Nriagu, 1989).

Le rejet intempestif de substances diverses dans l'atmosphère constitue sans aucun doute la plus évidente des dégradations de l'environnement par l'homme. Ainsi la pollution de l'air et l'éventualité d'un réchauffement climatique font partie des grands problèmes environnementaux actuels (Ramade, 1995).

2.2. La pollution du sol :

A l'opposé de la pollution atmosphérique, qui, en dépit de son ubiquité, sévit avec le maximum d'intensité dans les zones urbaines et industrielles, la pollution des sols affecte, elle, de façon plus particulière, les zones rurales. Elle résulte de nombreuses causes, en particulier des retombées de polluants atmosphériques, provenant d'industries chimiques et métallurgiques, de l'usage des combustibles fossiles et, de plus en plus fréquemment, d'incinérateurs de déchets urbains et surtout de l'usage systématique des engrais et des pesticides en agriculture (Ramade, 2005).

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

2.3. La pollution de l'eau :

La crise de l'eau sévit, elle, déjà depuis longtemps car la contamination des eaux continentales et océaniques exerce ses méfaits de façon sans cesse accrue, depuis parfois plus d'un siècle à une échelle globale. Elle affecte aussi bien les pays industrialisés et les mers qui les entourent que bien des régions du Tiers-monde où, outre la pollution chronique des eaux continentales, la production agricole voit son expansion limitée par le manque d'eau dans celles à climat aride (Falkenmark et al.,1991; Postel, 2001).

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

Des agents polluants, comme les plastiques, les métaux et certains **pesticides**, ne sont pas ou peu biodégradables : le processus d'auto-épuration est alors inopérant et ces substances s'accumulent dans l'écosystème, intoxiquant les espèces vivantes qui les ingèrent. Certaines de ces substances, de surcroît, comme les métaux lourds ou les pesticides, s'accumulent dans les organismes, se concentrant dans certains tissus ou organes à des doses parfois bien supérieures à celles mesurées dans l'eau, un phénomène appelé " bio-accumulation ". Cette accumulation, qui s'amplifie à chacun des maillons de la chaîne alimentaire, peut prendre parfois une ampleur inquiétante (Ramade, 1995).

La contamination du littoral de l'océan pacifique en Californie par l'usine de la société Montrose Chemicals illustra de façon spectaculaire l'ampleur de la pollution des eaux par les pesticides que peuvent provoquer des effluents d'origine industrielle. Cette entreprise qui synthétisait au début des années 1970 les deux tiers de la production mondiale de DDT contamina les sédiments marins de la baie de Los Angeles sur une surface estimée à 10 000 Km² (Ramade, 2005).

Malgré la réduction drastique des rejets d'effluents pollués à partir de 1972, on détectait encore quelques années plus tard quelque 11 ppm de DDT dans le muscle de soles (*Microstomus pacificus*).

3. La pollution par les pesticides:

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

Malheureusement, tous les pesticides (on en dénombre aujourd'hui plus de 900 molécules de bases, associées en de nombreuses préparations ou mélanges) épandus ne remplissent pas leur emploi. Une grande partie d'entre eux est dispersée dans l'atmosphère, soit lors de leur application, soit par évaporation ou par envol à partir des plantes ou des sols sur lesquels ils ont été répandus. Disséminés par le vent et parfois loin de leur lieu d'épandage, ils retombent avec les pluies directement sur les plans d'eau et sur les sols d'où ils sont ensuite drainés jusque dans les milieux aquatiques par les eaux de pluie (ruissellement et infiltration). Les pesticides sont ainsi aujourd'hui à l'origine d'une pollution diffuse qui contamine toutes les eaux continentales : cours d'eau, eaux souterraines et zones littorales.

Westlake et Gunther en 1966 (Ramade, 2005) soulignaient que les eaux souterraines et les rivières sont dorénavant exposées en permanence au déversement des déchets industriels provenant de la fabrication des pesticides. En outre, le stockage de masses énormes de tels résidus et les pollutions accidentelles provoqueront par le jeu des infiltrations une contamination des nappes phréatiques voire des aquifères profonds.

Par exemple à la fin des années 1990, les aquifères renfermaient en France en moyenne une trentaine de pesticides et jusqu'à 50 molécules de pesticides dans certaines nappes phréatiques (IFEN, 1999). On détectait dans les eaux de surface quelque 80 substances pesticides, des herbicides (altrazine et simazine) et le lindane venant en tête avant leur interdiction.

3.1. L'impact des pesticides sur la biodiversité:

Plusieurs phénomènes peuvent en effet accroître l'impact des pesticides sur la faune et la flore. Parmi ceux-ci, retenons notamment:

- la dispersion des produits lors du traitement,
- la non sélectivité des pesticides
- la toxicité de la molécule active et de ses produits de dégradation,
- la rémanence de la molécule et sa capacité d'accumulation dans la chaîne alimentaire,
- la forme et la préparation du pesticide : l'incorporation des pesticides dans l'enrobage des semences ou leur présentation sous forme d'appâts solides (granules, carottes imbibés, etc.) accroissent les risques d'exposition de la faune à ces produits (par ingestion notamment).

3.2. Les effets des pesticides sur la faune et la flore:

Par suite de leur ubiquité et l'importance quantitative des tonnages dispersés, les pesticides soulèvent des problèmes particulièrement fréquents et répandus de contamination des eaux. Bien qu'en règle générale, les problèmes écotoxicologiques liés à ce type de pollution soient du domaine des effets à long terme, leur toxicité aigue pour la flore et la faune aquatique, généralement très importante, est parfois la cause de mortalités massives (Ramade, 2005).

Exemple: Pour le Téléostéens d'eau douce, la CL 50 après 48H d'exposition à des composés comme: l'Endosulfan, l'Endrine ou la Dieldrine est inférieure à 5 ppb.

4. Mécanismes d'action et propriétés physico-chimiques des pesticides utilisés :

Il est de plus en plus courant aujourd'hui, de classer les insecticides organiques chimiques en 3 catégories (Regnault-Roger, 2005) :

*La 1^{ère} génération d'insecticides organiques de synthèse est antérieure à 1940.

*La 2^{ème} génération est celle des molécules qui sont arrivées sur le marché au moment de la seconde guerre mondiale; les hydrocarbures poly aromatiques.

*La 3^{ème} génération est arrivée sur le marché à partir du dernier quart du vingtième siècle. Certains classent dans cette catégorie tous les composés apparus sur le marché à partir des années 70 (Firn, 2003).

Plus de 90 % des insecticides de synthèse sont des organophosphorés, des carbamates et des pyréthrinoïdes avec des sites d'action localisés dans le système nerveux. Parmi les cibles moléculaires, les trois plus importantes sont: le canal sodium "voltage-dépendant" (C_{svd}), l'acétylcholinestérase (AChE) et le récepteur de l'acide gamma aminobutyrique (GABA_r). (Haubruge et Amichot, 1998).

4.1. Le Bifenazate :

- Activité biologique principale : **acaricide**
- Famille chimique : **Hydrazine carboxylate** (Agritox^R, 2007)
- Nom chimique : 1methylethyl 2-(4-methoxy[1,1'-biphenyl]-3-yl) hydrazine carboxylate
- Mode d'action: inhibiteur neuronal
- Formule plane : (Van Leeuwen et al, 2006)

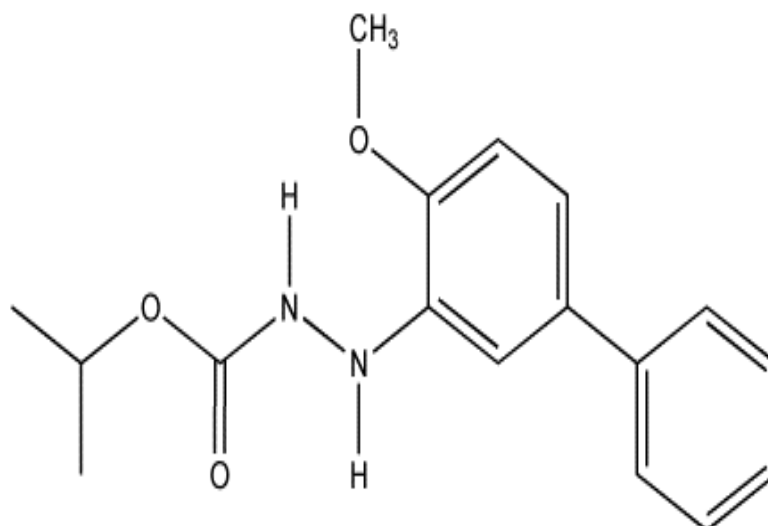


Fig. (1): Formule plane du Bifenazate

Il s'agit d'un hydrazine carboxylate découvert en 1990 par **Uniroyal Chemical** et commercialisé par Crompton Corporation (Dekeyser et McDonald, 1994; Dekeyser et al., 1996; Grosscurt et Avella, 2005).

C'est un acaricide sélectif qui permet de contrôler une variété d'acariens parasites des plantes ornementales de serre, les pommes, les poires, les agrumes et le coton.

Des études au laboratoire ont montré que le bifénazate n'affecte pas les acariens prédateurs (Kim et Seo, 2001; Kim et Yoo, 2002), et montre une toxicité limitée au bénéfice des insectes recommandé (Grosscurt et Avella, 2005).

Le Bifenazate est neurotoxique (Dekeyser, 2005). Des études préliminaires sur son mode d'action indiquent que, aux concentrations élevées le bifénazate agirait sur les récepteurs post-synaptique GABA du système nerveux des insectes (Dekeyser, 2005; Grosscurt et Avella, 2005).

***Paramètres physico-chimiques:**

Les paramètres physico-chimiques du Bifenazate son représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau (1): Paramètres physico-chimiques (Agritox^R 2007).

Nom officiel	Bifenazate
Famille	Hydrazine carboxylate
Formule brute	C17 H20 N2 O3
Poids moléculaire	300.36 g/l
Solubilité dans l'eau	2.06 mg/l à 20 °C et au pH de 7 2.07 mg/l à 20 °C et au pH de 5
Solubilité dans les solvants organiques	acetone : 210.7 g/l à 20 °C acetate ethyl : 113 g/l à 20 °C
Métabolites	<ul style="list-style-type: none"> • bifénazate-diazène • 4-méthoxy-biphényl • bifénazate-diazène • 4-méthoxy-biphényl

***Ecotoxicité:**

Le tableau (2) représente les doses létales du Bifenazate chez certaines espèces de oiseaux.

Tableau (2): Effets du Bifenazate sur les oiseaux (Agritox^R 2007).

Espèce	OISEAUX ET VERTÉBRÉS TERRESTRES		
	T. A . Orale	T. Alimentaire	T. Reproduction
<i>Colinus virginianus</i>	DL50 1036mg/Kg p.c	x	x
<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	x	CL50 : 686 mg/kg aliment (5 j d'exposition)	x
<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	x	x	20mg/Kg aliment (26 semaines d'exposition)

- p. c: Poids corporels
- T. A: Toxicité aigue

Le tableau (3) représente la toxicité du Bifenazate et de certains de ses métabolites sur les quelques organismes aquatiques (faune et flore).

Tableau (3): Effets du Bifenazate sur les organismes aquatiques (Agritox 2007)

Espèce	ORGANISMES AQUATIQUES	
	T. A	T. Chronique
<i>Lepomis macrochirus</i>	CL50 : 0.58 mg/l - Durée d'exposition : 96 heures.	x
<i>Oncorhynchus mykiss (ex Salmo gairdneri)</i>	x	0.017 mg/l - Durée d'exposition : 87 jours .
<i>Oncorhynchus mykiss (ex Salmo gairdneri)</i>	Pour le métabolite : bifénazate-diazène: - CL50 : 0.044 mg/l - Durée d'exposition : 96 heures	
<i>Daphnia magna</i>	- CE50 : 0.50 mg/l Durée d'exposition : 48heures	CSEO : 0.15 mg/l - Durée d'exposition : 21 jours
<i>Daphnia magna</i>	Pour le métabolite : bifénazate-diazène- CE50 : 0.051 mg/l - Durée d'exposition : 48heures .	
<i>Skeletonema costatum(algue)</i>	x	CEb50 : 0.30 mg/l - Durée d'exposition : 96 heures (sur la croissance)

***Classement Toxicologique :**

Selon l'union européenne: (Agritox^R, 2007) le Bifenazate est classé comme suit:

Xi N R43 R50/53 S36/37 S60 S61

(Xi):Irritant dangereux pour l'environnement
R43: peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau
R50/53: très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique
S36/37: porter un vêtement de protection et des gants appropriés
S60: éliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux
S61: éviter le rejet dans l'environnement.

4.2. L'Indoxacarbe :

- Activité biologique principale : **insecticide**
- Famille chimique : **oxadiazine** (Silver et Soderlund, 2006)
- Nom chimique : (S) -methyl7-chloro-2,5-dihydro -2 – [[(methoxycarbonyl) [4-(trifluoromethoxy) phenyl]amino] carbonyl] indeno [1,2-e] [1,3,4] oxadiazine-4a(3H)- carboxylate
- Mode d'action: neurotoxique
- Formule plane : Silver et Soderlund, 2006

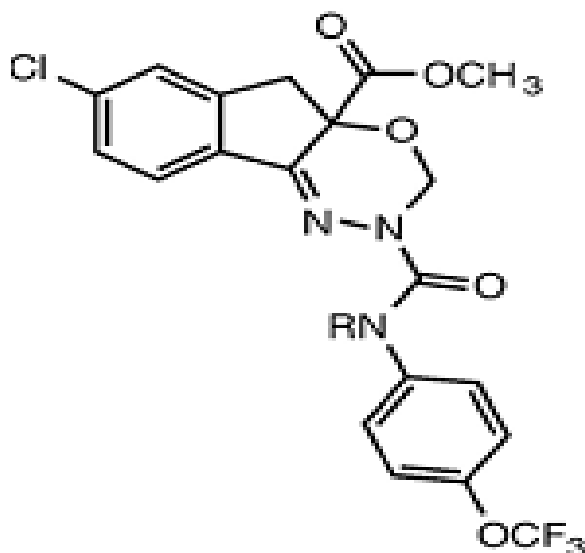


Fig. (2) : Formule plane de l'Indoxacarbe

L' Indoxacarbe est un nouvel insecticide à large spectre, efficace contre les insectes. Il montre une faible toxicité pour les mammifères et ne manifeste pas de résistance lorsqu' il est croisée avec des carbamates, des pyréthroides, spinosad , cyclodienes , benzoylureas ou organo-phosphates (Zhao et al.,2002; Wing et al.,2004).

L' Indoxacarbe est le premier insecticide bloquant les canaux Na⁺ de la classe des oxadiazine qui a été commercialisé. Sa toxicité sélective contre les insectes est due en partie au fait qu'il s'agit d'un pro- insecticide, bio -activé chez les insectes par les estérases et amylases (Wing et al., 1998; Mc Cann et al., 2001; Sugiyama et al., 2001).

L'indoxacarbe est un modulateur des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine au niveau des neurones des mammifères (Zhao et al., 1999; Narahashi, 2001), son activité biologique est essentiellement due à l'inhibition des canaux Na⁺ d'une manière similaire à celle des Pyrazolines .

***Paramètres physico-chimiques:**

Les paramètres physico-chimiques de l'Indoxacarbe son représentés dans le tableau (4)

Tableau (4): Paramètres physico-chimiques de l'Indoxacarbe (Agritox^R 2007).

Nom officiel	Indoxacarbe
Famille	Oxadiazine
Formule brute	C ₂₂ H ₁₇ Cl F ₃ N ₃ O ₇
Poids moléculaire	527.84 g/l
Solubilité dans l'eau	15 mg/l à 25 °C
Solubilité dans les solvants organiques	acetate ethyl : 160 g/l acetone : >250 g/l

***Ecotoxicité:**

Le tableau (5) représente les doses létales de l'Indoxacarbe chez certaines espèces de oiseaux.

Tableau (5): Effets de l'indoxacarbe sur les oiseaux (Agritox^R 2007)

Espèce	OISEAUX ET VERTÉBRÉS TERRESTRES		
	T. A . Orale	T. Alimentaire	T. Reproduction
<i>Colinus virginianus</i>	DL50 : 98 mg/kg p.c.	CL50 : 808 mg/kg aliment - Exposition : 5j	CSEO (NOEC) : 144 mg/kg aliment -Exposition: 21 semaines
<i>Anas platyrhynchos</i>	x	CL50 : >5620 mg/kg aliment -Exposition : 5 j	CSEO (NOEC) : 720 mg/kg aliment -Exposition : 21 semaines

- p. c: Poids corporels
- T. A: Toxicité aigue

Le tableau (6) représente la toxicité de l'Indoxacarbe et de certains de ses métabolites sur quelques organismes aquatiques (faune et flore).

Tableau (6): Effets de l'Indoxacarbe sur les organismes aquatiques (Agritox 2007)

Espèce	ORGANISMES AQUATIQUES	
	T. A	T. Chronique
<i>Lepomis macrochirus</i>	CL50 (CM) : 0.90 mg/l - Durée d'exposition : 96 heures	x
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (<i>ex Salmo gairdneri</i>)	CL50 (CM) : 0.65 mg/l - Durée d'exposition : 96 heures	CSEO (CM) : 0.15 mg/l - Durée d'exposition : 90 jours
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (<i>ex Salmo gairdneri</i>)	métabolite : dérivé démethoxycarbonylé de la substance (IN-JT333): CL50 (CM) : 0.029 mg/l - Durée d'exposition : 96 heures - Exposition dynamique	
<i>Daphnia magna</i>	CE50 (CM) : 0.60 mg/l - Durée d'exposition : 48 heures - Exposition statique	x
<i>Daphnia magna</i>	Métabolite dérivé démethoxycarbonylé de la substance (IN-JT333): CE50 (CM) : >0.029 mg/l - Durée d'exposition : 48 heures - Exposition semi- statique	
<i>Lemna gibba</i>	Sur la croissance: CE50 : 0.0843 mg/l - Durée d'exposition : 14 jours - Exposition statique	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (ex. <i>Selenastrum capricornutum</i>)	Métabolite : dérivé démethoxycarbonylé de la substance (IN-JT333)CEb50 : >0.017 mg/l - Durée d'exposition : 96 heures - Exposition statique	

***Classement toxicologique:**

L'indoxacarbe est classé (décision de la Commission des Toxiques le 19/03/0 comme suit : (Xn R22 R43 R50 2)

(Xn) :Nocif

R22: nocif en cas d'ingestion

R43: peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau

R50: très toxique pour les organismes aquatiques

5. Principales manifestations de la toxicité des xénobiotiques à l'échelle cellulaire:**5.1. Stress chimique:**

Pour définir le stress oxydant, il faut avant tout définir ce que sont les radicaux libres. **Un radical libre** est une espèce chimique contenant un électron célibataire non apparié au niveau de son orbitale électronique périphérique, cet état confère à la molécule une grande instabilité et une réactivité vis-à-vis d'autres molécules.

Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par transfert de l'électron libre sur une autre molécule. La probabilité entre ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre (Kohen et Nyska , 2002 ; Klein et Ackerman, 2003).

Le stress oxydant cellulaire est classiquement défini comme étant l'altération de la balance redox intracellulaire en faveur des conditions oxydantes. Les agents et stimuli endogènes ou exogènes à l'organisme induisant la production de substances pro-oxydantes hautement cytotoxiques sont nombreux, citons par exemple : le métabolisme cellulaire (respiration oxydative mitochondriale, dégradation de composés étrangers par le système du cytochrome P450) ; l'action d'enzymes (xanthine oxydase, lipoxygénases (LO), NADPH oxydase, etc.); l'exposition excessive à des facteurs environnementaux (xénobiotiques, sels métalliques, irradiation ionisante, pathogènes, etc.).

Il existe différentes catégories de ROL:

-les espèces réactives de l'oxygène (ROS) issues de la réduction incomplète de l'oxygène, les radicaux hydroxyles (OH); l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sont moins réactifs mais néanmoins toxiques car produisant des radicaux OH \cdot en réagissant avec des ions métalliques ; l'oxygène singulet (1O_2), (Martin, 2003; Barata et al, 2005)

-les espèces réactives de l'azote : peroxydinitrite ($ONOO^-$), N_2O_3 , NO, etc., (Manduzio et al. 2005)

-les radicaux libres et hydroperoxydes organiques,

-les composés électrophiles (produits du métabolisme des xénobiotiques, agents alkylants utilisés en thérapie anticancéreuse, etc.). (Martin, 2003)

L'accumulation excessive des substances pro-oxydantes représente une attaque potentiellement toxique. Celles-ci exercent des effets délétères incluant la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines qui induisent des dysfonctionnements membranaires, l'oxydation de l'ADN et des autres composants cellulaires. Ces phénomènes induisent à leur tour la production de substances toxiques secondaires contribuant à l'aggravation des effets précités. Enfin, l'exposition aux agents du stress oxydant induit potentiellement de nombreuses atteintes tissulaires aiguës ou chroniques, des pathologies inflammatoires, la carcinogenèse et le vieillissement (Martin, 2003).

En plus de la synthèse d'ATP, la chaîne respiratoire mitochondriale est une source puissante des ROS et de ce fait elle est impliquée dans la genèse de la plupart des pathologies humaines et animales. Il est estimé que dans les conditions normales 1 – 4 % de l'oxygène consommé est incomplètement réduit en superoxyde. Dans la mitochondrie, il existe neuf sites responsables de cette production

qui sont ubiquitaires dans les mitochondries des mammifères, mais l'expression et la capacité de production diffèrent selon les tissus. Bien que ces sites aient été montrés comme producteurs de ROS en quantité appréciable, l'évolution des concepts a permis de confirmer l'importance des complexes I et II dans la production de ROS (Morin et al., 2004 ; Andreyev et al., 2005).

La cellule possède au moins trois niveaux de défense contre les espèces réactives de l'oxygène (fig3) :

***La première ligne de défense** antioxydante est assurée par des systèmes de piègeurs non -enzymatiques très réactifs. Les trois systèmes redox les plus importants trouvés communément dans les cellules sont le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH/NADP⁺), la thioredoxine (TRX_{red}/TRX_{ox}), et enfin le GSH qui est le thiol cellulaire prédominant dont les changements de concentrations [GSH]/[GSSG] reflètent directement les altérations redox intracellulaires (Martin, 2003).

***La seconde ligne de défense** agit en synergie avec les agents antioxydants non enzymatiques. Elle est constituée d'enzymes de détoxification telles la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase qui limitent la propagation des espèces réactives de l'oxygène et, par conséquent, les dommages provoqués par leurs interactions avec les macromolécules cellulaires. Cependant, pour pallier à leur spécificité de substrats limitée, l'action de ces enzymes est secondée par l'activité de certaines isoformes des glutathion peroxydases (GPX) et glutathion S-transférases (GST) capables de réduire les peroxydes en composés moins toxiques, (Martin, 2003).

*Une troisième ligne de défense doit être signalée mais ne sera pas discutée ici. Les produits finaux des enzymes de détoxication peuvent être conjugués en GSH et évacués par des transporteurs membranaires appelés protéines de multi-résistance aux drogues (Martin, 2003).

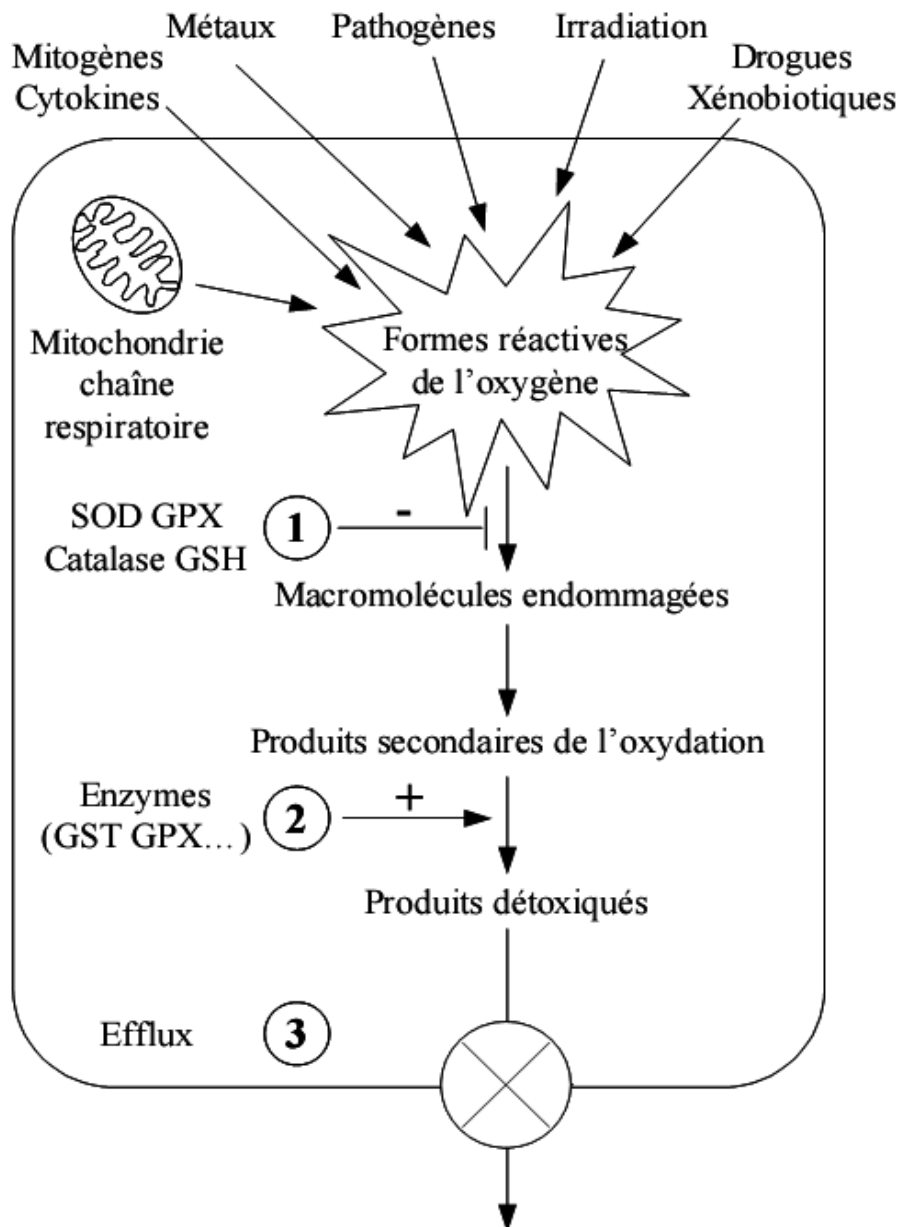


Fig. (3) : les différents niveaux de la défense antioxydante (Hayes et McLellan, 1999).

5.2. Source et formation des dérivés ROS:

L'environnement dont lequel nous vivons mais aussi notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation de la production des ROS dans notre organisme (Castronovo, 2003).

Les médicaments par exemple, substances étrangères, sont capable d'induire un état du stress oxydatif sévère. Aux niveaux hépatiques, les médicaments sont soumis aux réactions de détoxification qui diminuent rapidement leurs réactivités. Deux types de réactions biochimiques sont utilisés :

La première phase de la détoxification est assurée par les enzymes de la famille des cytochromes oxydases P450 et implique notamment des réactions d'oxydation, la deuxième phase consiste à la conjugaison des substrats oxydés avec des molécules comme l'acide gluconique ou les groupements sulfates (Castronovo., 2003).

D'autres sources exogènes peuvent induire un stress oxydant tel que : les rayonnements électromagnétiques, certains métaux de transition, les fumées de combustions (de cigarette, de bois, de matériaux de construction), les produits chimiques (antiseptiques, médicaments, pesticide). Signalons également qu'un stress intellectuel ou thermique, agents infectieux ainsi qu'un exercice physique intense mal géré peut générer un stress oxydant (Castronovo, 2003, Favier, 2003).

Il existe également des sources endogènes, au niveau cellulaire, potentielles des radicaux libres que ce soit au niveau des mitochondries, des membranes, du réticulum endoplasmique ou tout simplement du cytosol. De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production des radicaux libres oxygénés. Les sources cellulaires des ROS sont enzymatiques et non enzymatique (Servais, 2004).

6. Réponse cellulaire à la toxicité des xénobiotiques:

6.1. Les Biomarqueurs :

Les biomarqueurs sont des variations biochimiques, physiologiques, histologiques ou morphologiques, mesurés chez des organismes exposés à des conditions de stress liés à la présence de substances chimiques dans l'environnement (Huggett et al., 1992). C'est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al., 1997).

L'utilisation des biomarqueurs en milieu naturel permet l'évaluation intégrée dans le temps et l'espace des polluants bio- disponibles, en termes de présence mais aussi d'effets sur les populations animales, végétales ou microbiennes.

Parmi ces bio- marqueurs, on peut citer le système glutathion qui est assuré par le glutathion lui-même en présence de plusieurs enzymes qui constituent les éléments essentiels de ce système dont la plus importante est la glutathion S-transférase (GST) qui intervient dans les réactions de conjugaison des électrophiles (Huggett et al. , 1992; Lagadic et al., 1997; Kammenga et al., 2000).

a/ La superfamille des glutathion peroxydases:

Les GPX catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques en eau et en alcool, respectivement, aux dépens de l'oxydation du GSH réduit, c'est-à-dire avec production concomitante de GSSG (Hayes et McLellan, 1999). Il existe deux types de glutathion peroxydases, ceux qui sont dépendantes du sélénium et ceux qui sont indépendantes du sélénium.

b/ La superfamille des glutathion S-transférases:

Les Glutathion S-Transférase (GST) forment une superfamille d'enzymes multifonctionnelles pour la plupart cytosoliques, que l'on trouve dans la plupart des organismes animaux comme végétaux (Pascal et Scalla, 1999). Les GST existent sous forme d'homo- ou hétérodimères avec une masse moléculaire d'environ 25 KDa.

Les GST catalysent la réaction de conjugaison (attaque nucléophile) du tripeptide glutathion (GSH) sur des substrats électrophiles endogènes ou exogènes (Pascal et Scalla, 1999 ; Plaisance et Gronwald, 1999 ; Reade et Cobb, 1999).

Elles protègent les membranes car la détoxification des hydroperoxydes de lipides peut être réalisée *in situ* par les GST microsomales alors que leur détoxification par les GST cytosoliques requiert la libération préalable des hydroperoxydes d'acides gras de la membrane par la phospholipase A2.

Les GST complètent l'action des GPX dans la seconde ligne de défense enzymatique antioxydante.

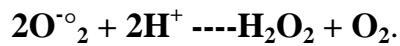
c/ La Catalase (CAT) :

La catalase (CAT) est une enzyme cytosolique inductible dont la fonction est de protéger les systèmes biologiques contre les espèces réactives de l'oxygène (Roméo et al., 2000). Il s'agit d'une hémoprotéine tétramérique qui, avec un atome de fer par sous unité, a une masse d'environ 240 KDa. Ces enzymes agissent en synergie avec les SODs puisque leur rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante:



Très ubiquitaire, sa localisation peroxysomale fait de la catalase une enzyme antioxydante complémentaire de la SeGPX contre la peroxydation induite par le peroxyde d'hydrogène (Cossu et al., 1997).

d/ Les superoxyde-dismutases, SODs, sont responsables de la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 selon la réaction suivante:



Ces enzymes existent sous différentes isoformes, dont la structure d'ensemble est très bien conservée au cours de l'évolution: le repliement tridimensionnel forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, dans lequel se glisse l'anion superoxyde.

e/ Les peroxydases, POX, permettent, comme les catalases, la réduction de H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, à la différence des catalases, les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités. Deux types principaux de « molécules antioxydantes » sont utilisés comme substrat par les peroxydases : l'acide ascorbique (Asc) et le glutathion (GSH). Ces deux molécules participent au cycle « ascorbate / glutathion » dont la première étape consiste en une réduction du peroxyde d'hydrogène en H_2O , couplée à une oxydation de l'ascorbate en monodéhydroascorbate (MDHA) ; cette étape est catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX) (Noctor et Foyer, 1998 ; Foyer et Noctor, 2000). Pour permettre la poursuite de cette réaction, l'ascorbate oxydé doit être à nouveau réduit. Pour cela, deux voies (directe et indirecte) de régénération de l'ascorbate coexistent : La réduction directe du MDHA par la monodéhydro – ascorbate réductase (MDHAR) via l'oxydation d'une molécule de NAD(P)H. Cependant, le MDHA est une molécule relativement instable qui a tendance à se dismuter spontanément en déhydroascorbate (DHA) et ascorbate. La seconde voie de régénération de l'ascorbate consiste donc en une réduction du DHA par la déhydroascorbate réductase (DHAR), couplée à une oxydation du GSH. Enfin, le glutathion oxydé, produit au cours de cette dernière réaction, est régénéré en GSH grâce la glutathion réductase (GR).

f. Le Glutathion

Pour ce qui est des mécanismes non -enzymatiques, la recherche s'est orientée vers de nombreux composés intervenant habituellement en tant que ligand intracellulaire des métaux ou participant à l'exclusion et la détoxification de ceux-ci comme les groupements thiols (glutathion réduit) et phytochélatines. En effet, le GSH et les autres thiols protègent contre les oxy-radicaux et les métaux pro-oxydants (Cu, Fe) (Rijstenbil et al.1994).

C'est un tri peptide ubiquitaire qui joue un rôle central dans les processus de défense antioxydant intracellulaire (Arrigo, 1999; Sies, 1999). Le GSH forme des acides mercapturiques, qui sont très solubles, souvent plus que les composés simplement polarisés par la phase I. Il est constitué de trois acides aminés : Glutamine, Cystéine et Glycine.

Dans les conditions physiologiques, le glutathion réduit (GSH), résistant à l'oxydation spontanée, est maintenu en équilibre dans le cytosol avec sa forme oxydée disulfure (GSSG). De plus, la liaison carbone- azote entre les résidus glutamate et cystéine N- terminaux lui confère une grande stabilité.

Pour maintenir l'équilibre redox cellulaire, le GSSG est réduit en GSH par la GSSG réductase aux dépens du NADPH, formant ainsi un cycle redox. Dans des conditions sévères de stress oxydant, la capacité de la cellule à réduire le GSSG en GSH peut être dépassée induisant alors son accumulation dans le cytosol.

Remarque : Outre le GSH il existe d'autres antioxydants non enzymatiques, leur pouvoir antioxydant réside dans leur capacité à piéger les radicaux libres par réduction : la vitamine E, la vitamine C, le β - carotène et l'acide lipoïque.

7. Rappel sur la Paramécie :

La paramécie est un micro-organisme unicellulaire du groupe des protozoaires, qui vit dans les eaux douces stagnantes, une seule espèce vit en eau salée, elle se cultive facilement en laboratoire.

7.1 Organisation générale de la paramécie :

C'est une cellule unique fusiforme, quatre fois plus longue que large, enflée dans sa partie moyenne. Les deux extrémités d'une Paramécie sont morphologiquement distinctes, l'extrémité antérieure est émoussée, arrondie alors que l'extrémité postérieure à la forme d'un cône.

Le corps est uniformément recouvert de cils, la Paramécie est un **Cilié holotriche**. Au cours de leurs déplacements, dont la vitesse est de l'ordre de 1 à 3 millimètres, les battements des cils assurent le transport des particules alimentaires jusqu'au cytopharynx (la bouche) situé au fond d'une sorte d'entonnoir. Ce sont des prédateurs qui se nourrissent d'autres micro-organismes, principalement des bactéries (Beaumont et Cassier, 1998).

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

Le matériel génétique est reparti en deux noyaux différents : un de grande taille, le **macronucléus**, qui est indispensable à la survie de la cellule et assure toutes ses fonctions végétatives, et un de petite taille, le **micronucleus**, qui intervient que dans une forme particulière de reproduction, la conjugaison (Génoscope, 2007) (Fig.4)

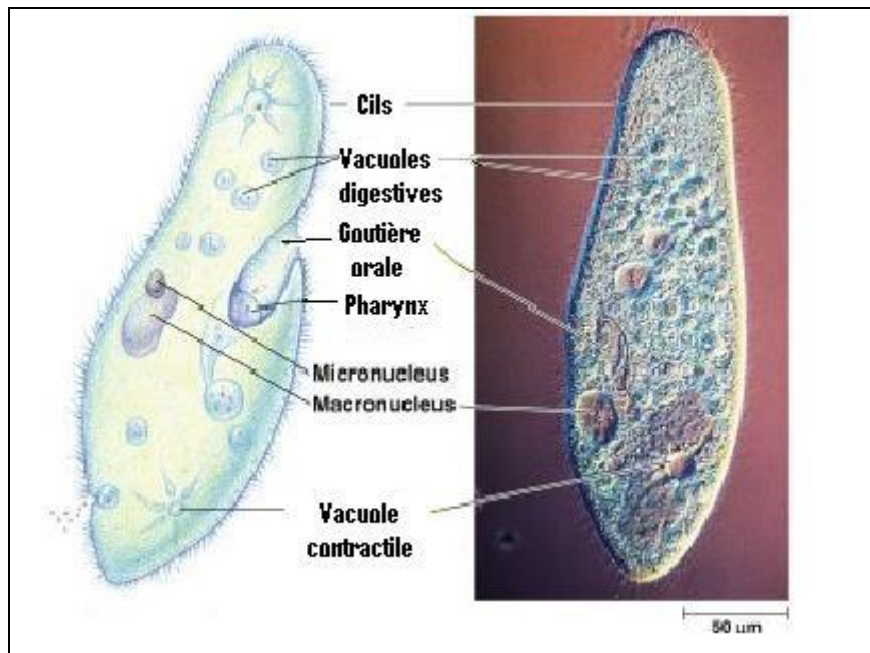


Fig. (4) : Structure d'une paramécie sous microscope (Génoscope, 2007).

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

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

Vacuole digestive: cavité de la paramécie responsable de la digestion.

Petit noyau: un des organites centraux moins importants de la paramécie.

Gouttière orale: canal de la paramécie responsable d'aspirer les nutriments.

Pharynx: cavité du pharynx.

Ectoplasme: partie superficielle vitreuse de la paramécie.

Endoplasme: partie centrale de paramécie.

Gros noyau: organite central le plus important de la paramécie.

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

Trichocyste: racine du cil vibratile de la paramécie.

La reproduction est généralement asexuée (durée 6 heures), mais en condition défavorables (culture appauvrie en oxygène et enrichie en déchets de toutes sortes...etc.) elle cède la place à la reproduction sexuée (Perrier et al., 1997) avec échange de matériel génétique (par le biais des micronucleus) entre deux cellules : c'est la conjugaison (Beaumont et Cassier, 1998).

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

7.2 Classification :

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

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

Paramecium caudatum, est l'espèce la plus connue, de plus elle est largement utilisée comme matériel de recherche (Beaumont et Cassier, 1998).

8. Problématique et Objectif du travail :

En toxicologie, l'utilisation de modèles cellulaires (Marano- Lebaron et Izard, 1970; Berrebbah, 1990; Radix et al., 2000; Rouabhi et al. 2006) permet de comprendre les mécanismes d'actions des toxiques, à différents niveaux d'organisation de la cellule. Ils permettent ainsi de préciser les interactions entre une molécule à tester et les cellules cibles, de suivre le devenir des xénobiotiques, et de mettre en évidence les entités moléculaires et les voies biochimiques perturbées, modifiées ou induites par ces éléments afin d'expliquer soit leur toxicité, soit leur tolérance par la cellule.

C'est dans ce cadre là que notre expérimentation s'est déroulée .Notre choix s'est porté sur un protiste cilié d'eau douce (*Paramecium sp*) pour plusieurs raisons :

- La paramécie constitue un excellent modèle biologique pour la modélisation des tests de cytotoxicité.
- Leur facilité à être cultivés en laboratoires, leur multiplication rapide (cycle de vie court) ainsi que leur moindre coût (Beal et Anderson, 1993 ; Kamola, 1995).
- Leur mobilité grâce à des cils possédant la même structure que ceux des cellules épithéliales respiratoires des mammifères (Gräf et al. , 1999), de plus. Il a été révélé que les battements ciliaires chez les mammifères étaient parfaitement comparables à ceux de la paramécie, *Tetrahymena*...etc.
- Leur utilisation comme modèles biologiques dans de nombreuses études toxicologiques :Kamola (1995) ; Bernal (1996), Rouabhi(2006).
- Leur utilisation dans le cadre de la lutte contre la pollution des milieux aquatiques puisqu'ils sont considérés comme des bio – indicateurs (Madoni, 2000 ; Dias et al. , 2003; Nola et al. 2003).

Ainsi l'objectif des essais entrepris sur des protozoaires d'eau douce était de réaliser une exposition à court et à long terme chez les paramécies, à différentes doses de deux pesticides appartenant à la famille des Oxadiazines (Indoxacarbe) et des Hydrazines carboxylate,(Bifenazate) de façon à permettre l'étude de leurs effets. Cette étude a pour mission de vérifier ces hypothèses et de mettre en évidence d'autres effets en s'appuyant sur différents examens.

Ce travail comporte deux grands chapitres:

- Le 1^{er} chapitre est consacré à une étude bibliographique concernant la pollution et ces sources, les molécules ainsi que le modèle cellulaire utilisés.
- Le 2^{ème} chapitre est consacré à l'étude expérimentale qui comporte 2 parties traitant chacune un xénobiotique séparément afin de pouvoir par la suite les comparer et tirer des conclusions quant à leur toxicité.

Ces expérimentations comportent 4 grands axes:

1. **Tests de cytotoxicité** : le but est de suivre la croissance cellulaire, la mobilité et la morphologie des paramécies suite à une exposition à court et à long terme aux pesticides. La toxicité est évaluée par la mesure de la CI 50 et par le pourcentage de réponse ainsi que le nombre de dédoublement cellulaire. Dans cette partie on tentera d'expliquer le changement de comportement de nos protistes ciliés face à un stress chimique.
2. **Paramètres biochimiques** : Nous avons tenté de mieux comprendre l'action des deux xénobiotiques au niveau cellulaire. Il s'agit en premier lieu d'un dosage des **principaux métabolites** (protéines, lipides et glucides) qui constituent la membrane plasmique afin de mettre en évidence d'une part l'altération de celle-ci et d'autre part le déclenchement du processus de détoxification mis en jeu par ce système

(Nzengue, 2008). En second lieu nous nous sommes intéressés à la **réponse cellulaire au stress** par la mesure des activités de certaines enzymes impliquées dans le système antioxydants comme la Catalase, l'Ascorbate – peroxydase et la Glutathion-S Transférase. Aussi, nous avons effectué le dosage de la **GSH** qui est la forme biologiquement active du glutathion nécessaire au fonctionnement de la réponse antioxydante ainsi que son intervention à un second niveau dans la défense antiradicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la GST (Barillet, 2007). Enfin le dosage du malonaldéhyde (MDA) afin de mettre en évidence une éventuelle peroxydation lipidique suivie d'une perte de la perméabilité membranaire ainsi qu'une inactivation des enzymes membranaire (Pampanin et al, 2005)

3. **Etude polarographique:** son utilisation a permis de mesurer la quantité d'oxygène consommée par nos micro- organismes en présence ou non de polluant. Cette partie nous permettra de mieux comprendre le mécanisme d'action de nos pesticides suite à l'apparition de perturbations du métabolisme respiratoire.

4. **Evaluation du Risque:**

L'objectif de l'évaluation du risque d'une substance chimique est de déterminer les concentrations sans effets à long terme pour l'environnement. Cette évaluation comprends deux volets indépendants: le volet "**exposition**" sert à prévoir quels sont les compartiments des écosystèmes potentiellement touchés par le produit (terrestre, aquatique, aérien) ainsi que les concentrations de la substance qui peuvent être retrouvées dans ces compartiments. Le volet "**concentration – effet**" sert à déterminer le danger de la substance aux concentrations environnementales pour les organismes qui vivent dans les compartiments exposés (Ducrot, 2005).

Notre travail a été effectué au laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Annaba.

1-Matériel biologique :

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est un micro-organisme unicellulaire d'eau douce: *Paramecium sp* .

2- Matériel chimique :

Les xénobiotiques utilisés dans notre étude sont deux produits phytosanitaires de synthèse appartenant à deux différentes familles, il s'agit de:

- **Bifenazate** (acaricide) qui est le nom commun du: 1methylethyl 2-(4-methoxy[1,1'-biphenyl]-3-yl)hydrazine carboxylate.

-**Indoxacarbe** (insecticide) dont le nom chimique est le: (S)-methyl7-chloro-2,5-dihydro-2-[[[(methoxycarbonyl) [4 (trifluoromethoxy) phenyl) amino]carbonyl] indeno [1,2-e][1,3,4] oxadiazine-4a(3H)-carboxylate

3. Mode de traitement :

Les xénobiotiques ont été testés sur des aliquotes de 50ml de la culture, quatre concentrations ont été choisies: 10, 20, 40 et 80µM (les tests sont répétés trois fois et les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne +/- l'ecartype).

4- Méthodes :

4.1. Culture des paramécies :

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

Nous avons effectué une culture mixte dont la technique est la suivante :

- Faire macérer ou infuser du foin dans un récipient contenant 1 litre d'eau de pluie.
- Abandonner l'infusion dans un lieu tiède (15 à 20°C), sombre et bien aéré.
- Filtrer, quelques jours plus tard apparaissent les premiers flagellés, ces organismes se nourrissent aux dépens du voile bactérien.

Nous avons procédé à la purification de la culture selon la méthode de Wichterman 1953, en suivant les étapes ci-dessous:

- **Préparation du milieu de repiquage:**
 - Faire sécher des feuilles de laitue dans un four,
 - Broyer les feuilles séchées à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre. Cette poudre peut être conservée indéfiniment dans un récipient hermétiquement clos.
 - Rajouter 1,5 g de cette poudre à 1 litre d'eau distillée, et porter à ébullition pendant 5 min.
 - Filtrer le liquide chaud et le répartir dans des flacons de 250 ml avant de le passer à l'autoclave.
 - Laisser reposer au moins une nuit avant l'ensemencement.
- **L'ensemencement:** il se fait au fur et à mesure des besoins, le milieu est dilué (2 parts de milieu de culture mère pour une part d'eau distillée). L'adjonction de CO_3Ca en excès permet de maintenir le pH autour de 7,2 (Beaumont et Cassier, 1998).
- Récupérer une seule cellule de paramécie à l'aide d'un stéréo-microscope et l'ajouter au milieu de culture.
- Laisser 48h, le temps de la multiplication des paramécies.

4.2 .Paramètres mesurés :

A. Tests de cytotoxicité:

A.1. Cinétique de croissance cellulaire :

Le paramètre physiologique étudié est la cinétique de croissance des paramécies qui s'effectue par la mesure de la densité optique DO à la longueur d'onde $\lambda = 600 \text{ nm}$ en fonction du temps (Lavergne, 1986 ; Sauvart et al., 1999).

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

T₀ : observation microscopique + lecture de la densité optique (600nm)

T₁ : après 24 H : observation microscopique + DO

T₂ : après 48 H : observation microscopique + DO

T₃ : après 72 H : observation microscopique + DO

T₄ : après 96 H : observation microscopique + DO

T₅ : après 120 H : observation microscopique + DO

*l'observation microscopique est réalisée sous un microscope photonique (Olympus) au grossissement x 10.

La figure (5) illustre le protocole suivi pour les tests de cytotoxicité.

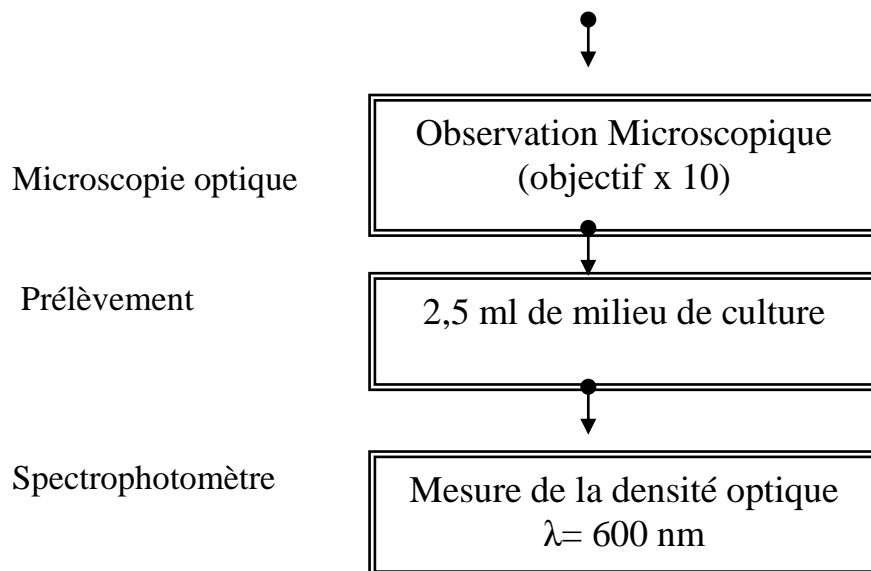
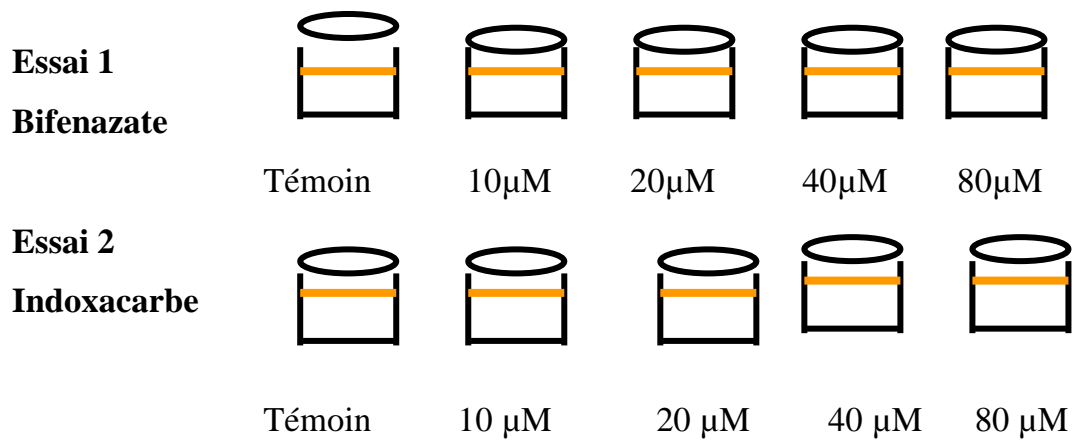


Fig. (5): Protocole d'essai de cytotoxicité chez les paramécies

A.2. Calcul du pourcentage de réponse :

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

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

Où :

N_C : nombre des cellules témoins

N_E : nombre final des cellules traitées

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

A.3. Détermination de la concentration inhibitrice (CI 50):

On détermine la concentration qui, dans des conditions standard, inhibe 50% de l'accroissement d'une population de paramécies (Bonnet, 2003). Les taux d'inhibition sont corrigés par la formule d'Abbott (1925) qui permet de connaître la toxicité réelle du xénobiotique. Les différents taux subissent une transformation angulaire d'après les tables établies par Bliss.

Pour caractériser la toxicité, on détermine la concentration inhibitrice 50% (CI 50). Les taux de normalité corrigés obtenus sont transformés probits et permettent d'établir une droite de régression en fonction des logarithmes décimaux des doses utilisées. Le test C^2 permet un bon ajustement de la droite. Depuis la courbe, on détermine toutes les doses remarquables (CI 50), selon les procédés mathématiques de Finney (1971).

La formule d'Abbott est la suivante :

$$\frac{X - Y}{X} \times 100$$

X = nombre de vivants des témoins

Y = nombre de vivants des traitées

A.4. Détermination du temps de dédoublement cellulaire t_g :

Le temps de dédoublement cellulaire est calculé selon la formule suivante (Bougis, 1974) :

$$t_g = \text{Log } 2 / K_n$$

Où : K_n qui est le coefficient instantané de croissance

Nous avons aussi calculé le nombre de division par jour dit **Doubling / Day (D/D)** et qui équivaut :

$$K_n / \log 2.$$

A.5. Analyse statistique:

Le test statistique réalisé dans cette partie est l'ANOVA, il s'agit de l'analyse de variance à deux facteurs contrôlés et ce en fonction du temps et des concentrations.

L'ANOVA permet d'effectuer des tests de comparaisons multiples afin d'expliquer les différences entre les moyennes.

Les résultats sont interprétés comme suit (Dagnelie, 1975):

Si $P = 0,05 \rightarrow RHO \rightarrow$ il existe des différences significatives *

Si $P = 0,01 \rightarrow RHO \rightarrow$ il existe des différences hautement significatives**

Si $P = 0,001 \rightarrow RHO \rightarrow$ il existe des différences très hautement significatives ***

B. Paramètres Biochimiques:

B.1. Principe de dosage des principaux métabolites:

Le dosage des lipides, protéines et glucides pour les deux traitements ainsi que pour les témoins est réalisé selon le protocole expérimental de Shibko et al 1966 (figure 6):

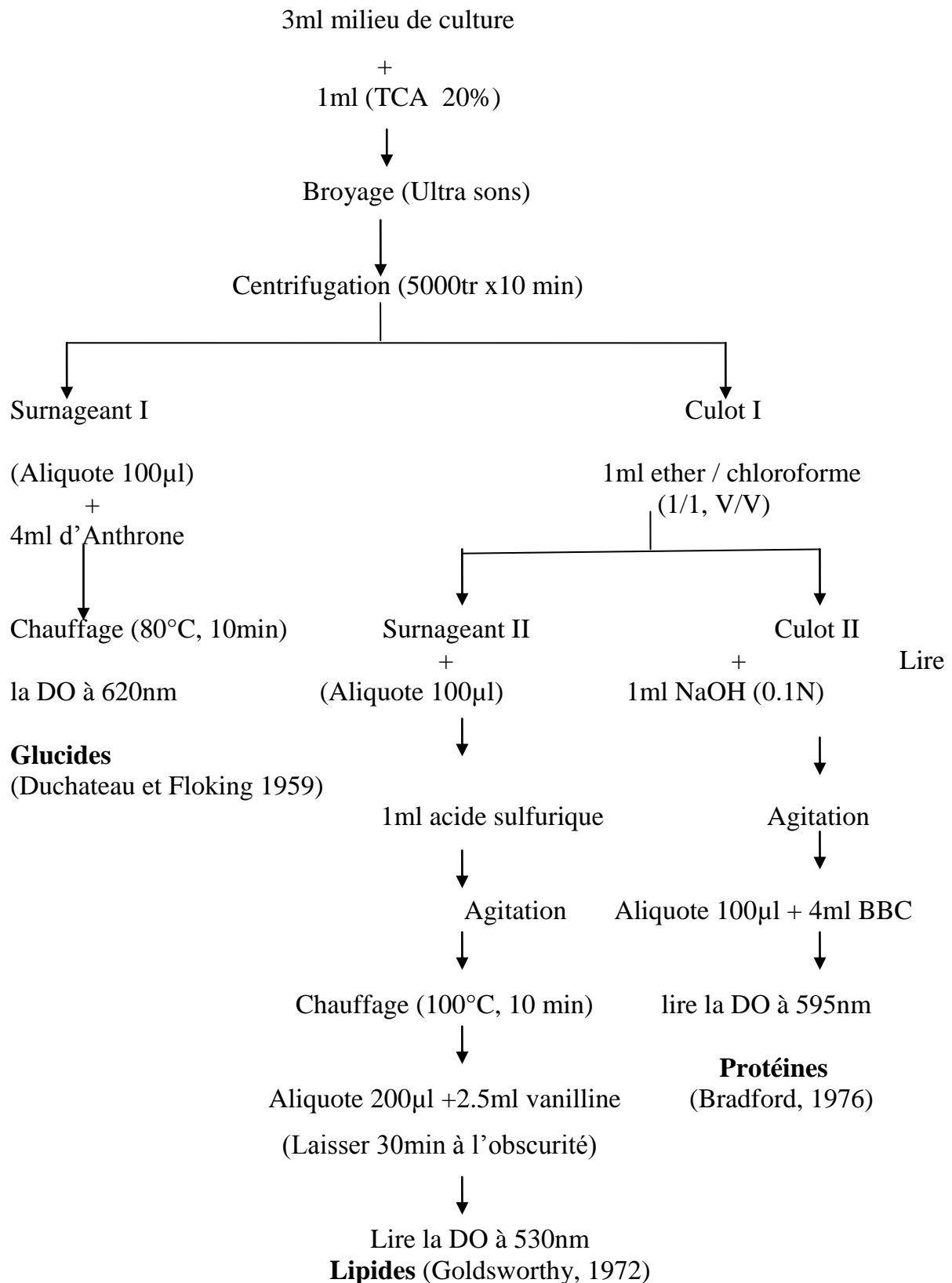


Fig. (6): Protocole de dosage des macromolécules biochimiques (Shibko et al., 1966)

Pour cette partie nous avons effectué une analyse de variance à un seul critère de classification (ANOVA 1) qui est la concentration.

B.2.Dosage du malondialdéhyde (MDA) :

Ce dosage est réalisé selon la méthode de Draper et Hadley (1990), il est basé sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité est mesurée à une longueur d'onde de 532nm.

-Un échantillon de paramécies est broyé à l'ultrason dans 1ml de tampon Tris-Hcl (50mM, pH 7,5) puis centrifugé pendant 10min à 10000 tours/min.

-On fait chauffer au bain marie (100° pendant 15min) 500 µl du surnageant additionnés de 2,5 ml de TCA ; après refroidissement dans de la glace, une centrifugation est effectuée à 10000 tours/min pendant 10 min.

-Une fraction de 2ml du surnageant est alors prélevée à laquelle on rajoute 1ml de TBA. On rajoute 1,5 ml de butanol après un second chauffage (100°, 15 min) et refroidissement. Une dernière centrifugation (10000 tours/min) est réalisée.

Le taux de l'MDA est réalisé selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta DO}{156} \times \frac{Vt}{Vs} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM /mgP)

Δ DO : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat

156: coefficient d'extinction molaire du TBA

Vt: volume total dans la cuve : 1ml (volume total du butanol récupéré renfermant les complexes TBA/MDA)

Vs: Volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0,5 ml

Mg de P : quantité de protéines

B.3. Technique de dosage du glutathion (GSH):

1. Principe de la méthode :

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

2. Protocole expérimental :

- Mettre 3ml de milieu de cultures individuellement (témoins et traités) en présence de 1ml d'EDTA à 0,02M.
- Broyer les échantillons aux ultrasons (Sonifer B-30) pendant 35 secondes dans un bac contenant des glaçons.
- Prélever 0,8ml de l'homogénat auquel y ajouter 0,2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25%.
- Passer au vortex et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifuger à la vitesse de 1000tours/min pendant 5minutes.
- Ajouter au mélange : 1ml de tampon Tris-EDTA (0,02M d'EDTA pH = 9,6), 0,025ml de DTNB et 0,5ml du surnageant.
- Laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément.
- Mesurer les absorbances à 412 nm (Spectrophotomètre JENWAY 6105, U.V. et Visible).

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

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg}} (\mu\text{M} / \text{mg})$$

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

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

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

0,8 : Le volume de l'homogénat.

0,5 : Le volume du surnageant.

B.4. Technique de mesure de l'activité GST (Glutathion S- transférase):

1. Principe de la méthode :

La mesure de l'activité de la GST consiste à fournir à l'enzyme un substrat (en général du chlorodinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction catalysée par la conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule, qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 340 nm. Il est possible de quantifier cette absorption au moyen d'un spectrophotomètre toutes les minutes, pendant 5 minutes. La valeur de la DO mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formée, elle-même liée à l'intensité de l'activité GST (Habig et al. , 1974).

2. Protocole expérimental :

- Mettre 1ml de milieux de culture (témoins et traités) en présence de 2 ml de tampon phosphate de sodium (0,1M, pH = 6).
- Broyer les échantillons aux ultrasons (Sonifer B-30) pendant 35 secondes dans un bac contenant des glaçons.
- Centrifuger l'homogénat à 14000tours/min pendant 30 minutes.
- Prélever 0.2ml du surnageant auquel on ajoute 1,2ml du mélange : CDNB (1mM), GSH (5mM), Tampon phosphate de sodium (0,1M, pH = 7).
- Mesurer les DO à 340 nm toutes les minutes pendant 5 minutes (Spectrophotomètre JENWAY 6105, U.V. et Visible).

La concentration de la GST est obtenue après application de la formule suivante :

$$GST = \frac{A \times V}{e \times d \times v \times mg} (\mu M / mn / mg)$$

A : Absorbance.

V : Volume totale de la cuve = 1400 μ l.

e : Coefficient d'extinction moléculaire du CDNB= 9,6m/M.cm.

d : Epaisseur de la cuve = 1cm.

v : Volume du surnageant = 200 μ l.

B.5. Mesure de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX) :

La mesure spectrophotométrique de l'activité ascorbate-peroxydase est réalisée suivant le protocole adopté par Nakano et Azada (1987). Le volume réactionnel final de 3ml contient : 100 μ l d'extrait enzymatique, 50 μ l d'H₂O₂ à 0,3% et 2850 μ l de tampon phosphate NaK-Ascorbate (50mM NaK, 0,5mM ascorbate, pH= 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La lecture est effectuée à 290nm (spectrophotomètre GeneSys 8) pendant 1min et ce pour un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon = 2800M^{-1}.cm^{-1}$. l'activité APX est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

B.6. Etude de l'activité Catalase (CAT) :

La mesure spectrophotométrique de l'activité catalase (CAT) est réalisée suivant la méthode de Cakmak et Horst (2003). Pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 μ l de l'extrait enzymatique brut, 50 μ l de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0,3% et 2850 μ l de tampon phosphate (50mM, pH= 7,2). La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes (spectrophotomètre JENNWAY) pour une longueur d'onde de 240 nm et un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon = 39400 M^{-1}.cm^{-1}.L$. L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

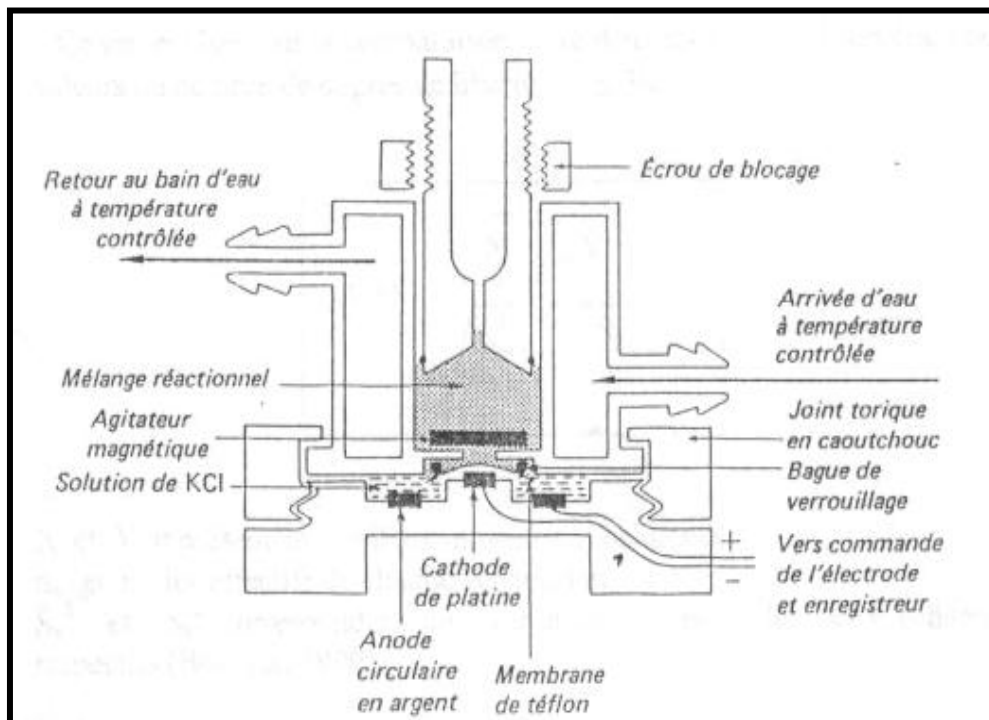
B.7. Analyse statistique:

L'analyse de variance à deux critères de classification (Temps et concentrations) a été choisie pour exprimer les différences entre les moyennes.

C. Etude polarographique :

L'appareil utilisé est une électrode à oxygène, de type HANSATECH qui permet la mesure de la production ou de la consommation d'oxygène (figure 7). Cet appareil est composé d'une jaquette thermostatée contenant la suspension cellulaire, et deux électrodes, une cathode (-) de platine et une anode (+) d'argent, reliées par un pont contenant du chlorure de potassium (KCl). Les deux jaquettes sont séparées par une membrane semi-perméable, permettant la diffusion de l'oxygène dissous du milieu de culture (suspension cellulaire) vers les électrodes. Le courant généré est proportionnel à la quantité d'oxygène dissous en fonction du temps (Djebar et Djebar, 2000). L'appareil est relié à un micro-ordinateur qui permet de visualiser les différents spectres.

Une étude statistique a été réalisée, il s'agit de l'analyse de variance à deux critères de classification et ce en fonction du temps et des concentrations.



**Fig. (7) : Schéma de l'électrode à oxygène
(Djebar et Djebar , 2000)**

D. Evaluation du Risque:

Le logiciel utilisé a été développé afin de permettre la réalisation d'analyse professionnelle des risques écotoxicologiques. Il possède les outils et les fonctionnalités requises pour évaluer des situations diverses impliquant des substances toxiques dans l'environnement, que ce soit en milieu terrestre ou aquatique. Toutes les étapes de l'analyse, de la saisie des données de caractérisation à l'évaluation finale des risques, sont prises en charge par ce logiciel de manière cohérente et intégrée.

L'évaluation des risques écotoxicologiques par l'approche conventionnelle de modélisations mathématiques comporte des sources d'incertitude importante, liées notamment à la biodisponibilité réelle des contaminants, aux limites des caractérisations réalisées, ainsi qu'à la disponibilité, la validité et la représentativité des valeurs de références pour les divers combinaisons de récepteurs et de contaminants. C'est pourquoi ce logiciel combine à la fois les modélisations mathématiques et l'utilisation de biotest pour permettre la réalisation d'évaluations de risques aussi crédibles et bien fondées que possible.

Concrètement, une session de travail comporte essentiellement quatre grandes phases :

1. la saisie des données relatives au cas à l'étude
2. la définition du modèle conceptuel de l'écosystème
3. la modélisation des données
4. l'interprétation des résultats

Dans notre étude, nous avons pu réaliser :

-un **modèle conceptuel** de l'écosystème à partir de nos deux xénobiotiques ainsi que l'organisme étudié,

- un **biotest** où nous avons calculer la ECx, NOEC, LOEC ainsi que l'indice de risque (IR)

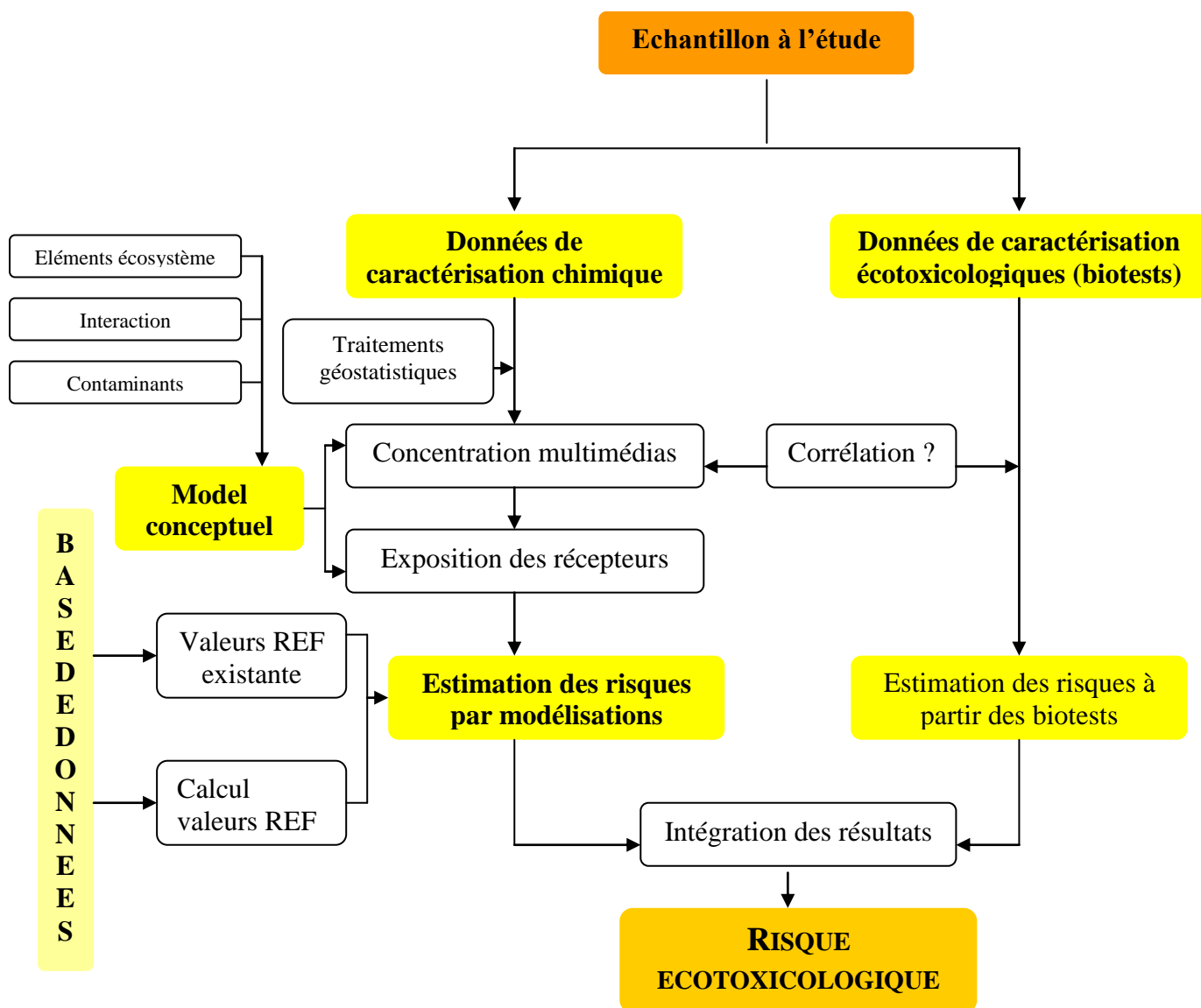


Fig. (8): Schéma de la démarche générale d'une évaluation des risques selon le logiciel TS

1. Les tests de cytotoxicité:

1.1. Effet du Bifenazate sur la croissance cellulaire:

La figure (9) illustre l'effet du Bifenazate sur l'évolution de la croissance des paramécies. Toutes les mesures ont été effectuées pendant la phase exponentielle de croissance.

Ainsi, nous constatons que pour les témoins, la croissance semble diminuer progressivement jusqu'à 72 h où la DO est de 0.135 nm pour atteindre à la fin du traitement 0.180nm.

Cependant, pour les traitées à toutes les concentrations, la croissance semble être affectée et ce dès la mise en contact avec le xénobiotique. En effet, si la DO chez les témoins est de 0.319 nm au temps T_0 , chez les traitées, elle affiche respectivement 0.27 jusqu'à 0.20nm et ce pour toutes les concentrations testées (10, 20, 40 et 80 μ M).

A partir de 24h, nous constatons une diminution progressive de la DO qui sera plus prononcée et très hautement significative ($p < 0.001$) pour les plus fortes concentrations à savoir 40 et 80 μ M.

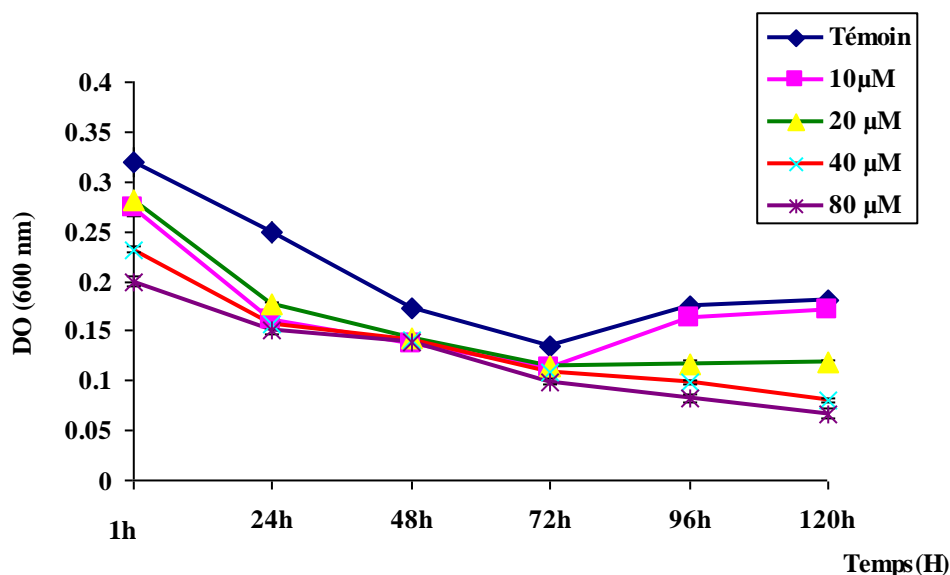


Fig. (9): Effet du Bifenazate sur la croissance cellulaire

Aux faibles concentrations, on constate que le Bifenazate a peu d'effet sur la croissance cellulaire, ceci pourrait être dû soit à l'adsorption du xénobiotique sur la membrane cellulaire et à la présence de cuticule chez les paramécies, qui les rendent résistantes mais qui reste néanmoins perméable (Beaumont et Cassier, 1998), soit à l'influx du pesticide à l'intérieur des cellules induisant ainsi un mécanisme de détoxification (Haubruge et Amichot, 1998).

Ces résultats sont en accord avec ceux de Ujwala Garad et al. (2007) qui montrent que le monocrotophos (MCP) employé à des doses de 1 et 10 ppm n'a pas d'effet sur la densité de la population des paramécies après 24h d'exposition, mais au delà de ces concentrations une diminution significative est observée.

Pour celles traitées à 20, 40 et 80 μM , une inhibition dose- dépendante de la croissance cellulaire est observée pratiquement dès le 1^{er} jour du traitement. Nos résultats vont dans le même sens que ceux rapporté par Liebig et al, (2008) qui ont étudié l'effet du Parathion- methyl et le Prometryne sur la croissance des flagellés (*Cryptomonas* sp.) et des ciliés prédateurs (*Urotricha furcata*).

En parallèle, l'observation microscopique montre qu'en fonction du temps et des concentrations croissantes, les cellules se déforment et la mobilité est perturbée. Ces résultats viennent appuyer les travaux de Rouabhi et al. (2006) qui ont rapporté l'effet du Diflubenzuron et du Flucycloxuron sur la forme et la trajectoire des paramécies.

Aussi, Bernal et Ruvalcaba.(1996) ont mis en évidence une réduction du mouvement en tourbillon crée par le battement des cils (BSB) chez les paramécies en présence de concentrations élevée de plomb, car il est connu que la paramécie avance en tournant autour de son axe longitudinal, selon un mouvement hélicoïdal. Elle peut changer brusquement de direction et faire marche arrière (Cudmore et al. 1977). Les cils, par leurs battements, apportent à la cellule un échantillon de ce qui se trouve au devant d'elle et assurent ainsi le transport des particules alimentaires jusqu'au cytopharynx (Beaumont et cassier, 1998), une diminution de la mobilité conduirait donc à la mort du microorganisme.

1.2. Calcul du pourcentage de réponse (PR):

Le pourcentage de réponse (Wong et al., 1999) est un paramètre permettant d'évaluer l'effet du pesticide aux différentes concentrations et confirme les résultats obtenus concernant la cinétique de croissance du microorganisme étudié.

La figure (10) montre que le pourcentage de réponse des paramécies est dose – dépendant et proportionnel aux concentrations croissantes: il est de : 5,55% à 10 μ M et de 62,77 % à 80 μ M où plus de la moitié de la population est inhibée par cette dose.

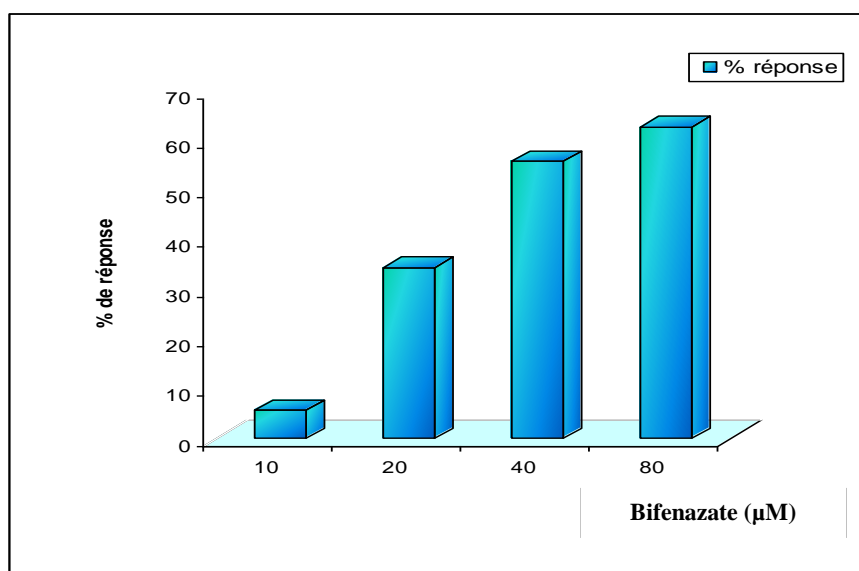


Fig. (10) : Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations du Bifenazate

Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Redouen-salah (2004) qui a rapporté l'effet inhibiteur de rejets métalliques sur une algue unicellulaire (*Tetraselmis suecica*) et où le pourcentage de réponse est dose – dépendant. De plus, nos résultats rejoignent ceux de Sbartai (2005) qui confirme cet effet dose –dépendant chez des paramécies traitées au Cadmium. Sbartai et al. (2009) rapportent de mêmes résultats.

1.3. La concentration inhibitrice CI₅₀:

Pour caractériser la toxicité, on détermine la concentration inhibitrice 50% (CI₅₀). Les taux de normalité corrigés obtenus sont transformés en probits et permettent d'établir une droite de régression en fonction des logarithmes décimaux des doses utilisées. Depuis la courbe, on peut déterminer toutes les doses remarquables, ainsi que le Slope.

Nous avons déterminé la CI₅₀ à différents temps représentés dans le tableau (7).

Tableau (7) : Détermination de la CI₅₀

Exposition	Bifenazate	
	CI₅₀ (μM)	Slope
72 h	261.8	0.058
96 h	57.22	0.295
120 h	40.90	0.477

On remarque que la concentration inhibitrice diminue avec la durée d'exposition, elle est de 261.8μM à 72h et atteint les 40.90μM à 120h.

Ces résultats corroborent ceux de Rao et al. (2006) qui confirment la diminution de la CI₅₀ en fonction du temps chez *Paramecium caudatum* traités par des organophosphorés où elle est de 500mg/l à 10min et de 300mg/l à 2h. Les mêmes résultats ont été rapportés par Bonnet et al. (2005) chez *Tetrahymena pyriformis* exposés à des concentrations croissantes d'un hydrocarbure l'antracène.

1.4. Détermination du temps de dédoublement cellulaire tg:

Les tableaux (8) et (9) regroupent les valeurs obtenues après calcul du temps de génération (tg) ainsi que le nombre de division (D/D) et ce à court et à long terme.

Tableau (8): Détermination du tg et du D/D après 24h d'exposition

Concentrations	Bifenazate	
	Tg (H)	D/D
Témoin	0.83	0.36
10µM	0.39	0.76
20µM	0.45	0.66
40µM	0.48	0.62
80µM	0.73	0.41

Dans le tableau (8), on constate que le temps de génération augmente en fonction des concentrations, il est de 0.39h à 10µM et atteint 0.73h à 80µM, cependant le nombre de génération est inversement proportionnelle aux concentrations croissantes de bifénazate.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Rao et al. (2006) qui ont rapporté l'effet inhibiteur de l'acéphate (organophosphoré) à des concentrations élevées sur la croissance de *Paramecium caudatum* ainsi que sur le temps de génération et du D/D.

Tableau (9) : Détermination du tg et du D/D après 120h d'exposition

Concentrations	Bifenazate	
	Tg (H)	D/D
Témoin	6.02	0.0069
10µM	7.52	0.005
20µM	4.12	0.010
40µM	3.257	0.012
80µM	3.13	0.0132

Après 120 h d'exposition (Tableau 9), on remarque que le Tg diminue en fonction des concentrations croissantes de Bifenazate, il est de 7.52 h à 10µM et atteint 3.13h à 80µM. En parallèle, le nombre de division augmente (tableau 9). Ce résultat confirme cet effet dose- dépendant du xénobiotique ainsi qu'un possible effet carcinogène de ce dernier. Ces travaux pourraient conforter ceux de Guelfi et al (2003) qui ont mis en évidence un effet stimulant de la multiplication du cadmium sur des champignons filamenteux (*Aspergillus nidulans*), laissant suggérer ainsi un effet carcinogène du xénobiotique

2. Evolution des paramètres biochimiques:

2.1. Effet du Bifenazate sur les principaux métabolites:

2.1.1. Effet du Bifenazate sur le taux des protéines totales:

Les variations du taux de protéines totales obtenues après 24H d'exposition sont représentées dans le tableau (10). On constate que le taux de protéines chez les traités tend à augmenter de manière dose -dépendante et très hautement significative ($p < 0.001$) par rapport au témoin, il est de 0,57µg / ml à 10 µM et atteint la valeur de 0,92 µg/ml à 40 µM. Cependant ce taux diminue à la plus forte concentration 80µM.

Tableau (10): Variation du taux de protéines totales

Concentrations (μM)	Taux de Protéines totales ($\mu\text{g/ml}$)
Témoin	0.568 \pm 0.008
10 μM	0.577 \pm 0.013
20 μM	0.655 \pm 0.005
40 μM	0.927 \pm 0.024
80 μM	0.296 \pm 0.013

Les protistes sont capables de synthétiser une multitude de protéines et d'enzymes spécifiques à la détoxification leur permettant de maintenir à un niveau suffisamment bas les concentrations intracellulaires de polluant. De nombreuses études confirment le rôle des protéines du stress chez les microorganismes (Piccini et al, 1994 ; Masaya et al , 2002 ; Redouan- Salah , 2004).

Nos résultats vont dans le sens de ces travaux, puisque l'évolution du taux de protéines totales met en évidence une augmentation croissante et dose -dépendante de ces derniers en présence de bifenazate suggérant un probable processus de métabolisation du xénobiotique.

2.1.2. Effet du Bifenazate sur la variation du taux de lipides:

Le tableau (11) représente les variations du taux de lipide obtenus après 24H de traitement en fonction des concentrations croissantes de Bifenazate.

On remarque que le taux de lipides ne subit pas de variation importante à 10 et 20 μM par rapport aux cellules témoins. Cependant ce taux diminue à la concentration de 40 μM de manière très hautement significative ($p < 0.001$) où il est de 3.23 $\mu\text{g/mg}$, et il atteint une valeur de 1.09 $\mu\text{g/mg}$ à 80 μM .

Tableau (11) : Variation du taux de Lipides totales

Concentrations (μM)	Taux de lipides ($\mu\text{g/ml}$)
Témoin	4.99 \pm 0.045
10 μM	5.14 \pm 0.0503
20 μM	5.29 \pm 0.015
40 μM	3.236 \pm 0.040
80 μM	1.09 \pm 0.021

L'évolution du taux de lipides suggère une altération de la membrane cellulaire sachant que cette dernière est composée de 50% de lipides (phospholipides) et que le pesticide agit sur les protistes dès la mise en contact. Ce résultat a été confirmé par celui de Grara (2011) qui a rapporté la diminution du taux de lipide en fonction des concentrations croissantes de cadmium. Selon Aourousseau (2002), les radicaux oxygénés libres sont toxiques via la dégradation des lipides dont la β oxydation, comme le suggèrent les travaux de Padjama et Rao, (1994) qui ont mis en évidence une diminution des taux de lipides dans les tissus de *Bellamyia dissimilis* exposés à des pesticides, la forte solubilité du xénobiotique est à l'origine de cette atteinte des lipides.

2.1.3. Effet du Bifenazate sur la variation du taux de glucides:

Le tableau (12) englobe les résultats obtenus quant aux variations du taux des glucides totaux des paramécies traitées par les différentes concentrations du bifenazate après 24H d'exposition.

On remarque que le taux de glucides est quasi stable pour les concentrations de 10 et 20 μM par rapport aux témoins. Aux plus fortes concentrations 40 et 80 μM ce taux diminue de manière dose –dépendante et très hautement significative ($p < 0.001$).

Tableau (12): Variation du taux de Glucides

Concentrations (μM)	Taux de Glucides ($\mu\text{g/ml}$)
Témoin	130.29 \pm 1.66
10 μM	137.98 \pm 0.857
20 μM	145.67 \pm 0.494
40 μM	138.56 \pm 1.25
80 μM	122.6 \pm 0.857

Chez les cellules Eucaryotes la membrane plasmique est constituée par un assemblage de lipides et de protéines maintenues par des interactions non covalentes. Des chaînes polysaccharidiques sont liées de manière covalente à la plupart des protéines exposées à la surface de la cellule et à certaines des molécules lipidiques de la monocouche lipidique externe (Alberts et al., 1986). De plus, les hydrates de carbone sont une source primaire et immédiates d'énergie, dans les conditions de stress, les réserves de glucides sont épuisées pour satisfaire les demandes énergétiques. Ces résultats rejoignent ceux d 'El-Wakil et Radwan, (1991) qui suggèrent que l'épuisement du contenu de glycogène dans le tissu de l'escargot d'eau douce *Bellamya dissimillis*, exposé à différents pesticides serait la conséquence de l'utilisation directe du glycogène pour la génération d'énergie, cette demande est due à l'induction de l'hypoxie provoquée par ces pesticides. Ceci pourrait être extrapolé aux protistes d'où cette diminution du taux de glucides aux plus fortes concentrations de xénobiotiques observés dans notre travail.

2.2. Effets du Bifenazate sur l'évolution des biomarqueurs:

a. Effet du Bifenazate sur le taux du malondialdéhyde (MDA):

La figure (11) illustre les variations du taux de la MDA en présence de concentrations croissantes de Bifenazate. On constate que le taux de MDA tend à augmenter d'une manière dose- dépendante et très hautement significatives

($p=0,000$). En effet le taux de MDA est de $9.66\mu\text{M}/\text{mgP}$ à $10\mu\text{M}$ et atteint jusqu'à environ $15.65\mu\text{M}/\text{mgP}$ à $80\mu\text{M}$ de bifénazate à 24 h.

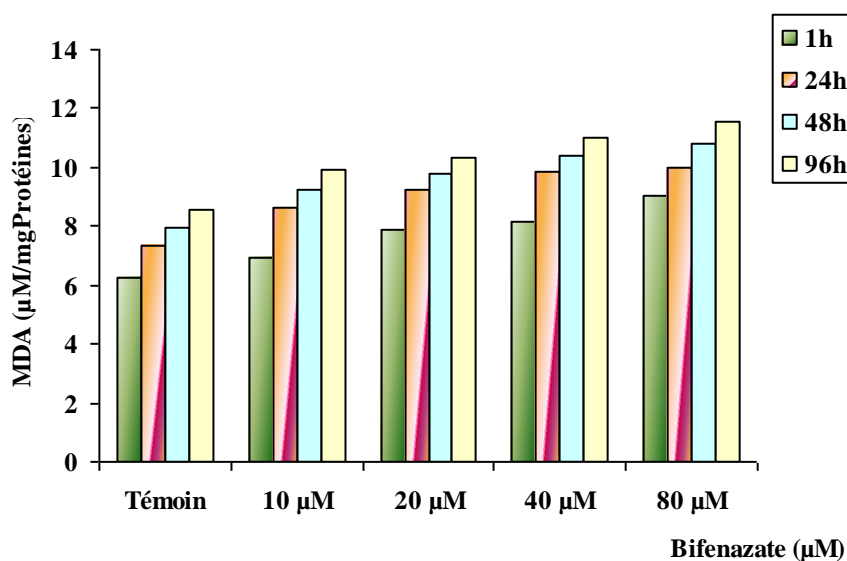


Fig. (11): Variations du taux de MDA en présence de Bifenazate

Le malondialdéhyde est le principal aldéhyde actif de la peroxydation de l'acide gras polyinsaturé des membranes. Cette peroxydation est suivie d'un changement structural des membranes biologiques (Bebiano et al, 2005) ou d'autres contenant des lipides (Al-Mutairi et al. 2007). Il s'ensuit une perte de la perméabilité et du potentiel membranaire, une inactivation des récepteurs et des enzymes de la membrane (Pampanin et al., 2005).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Salama et al. (2005) qui ont mis en évidence une peroxydation lipidique chez les rats traités par différents pesticides. Ce phénomène est observé chez les végétaux, comme le stipulent Singh et al. (2004) qui ont rapporté dans leurs travaux l'augmentation du taux de MDA dans les racines et les feuilles de tomates après exposition à certains métaux lourds. De même résultats ont été rapporté par Grara (2011) et Chaoui (1997).

Nos résultats abondent dans le même sens de ces travaux et confirme l'augmentation du taux MDA aux plus fortes concentrations de Bifenazate, confirmant ainsi une peroxydation lipidique potentielle due au xénobiotique étudié.

b. Effet sur le taux de GSH:

Les résultats obtenus sont résumés dans la figure (12) qui représente la variation du taux de GSH en fonction des différentes concentrations de Bifenazate dans un intervalle de temps (1h –96h).

Après 1h d'exposition seulement, le taux de GSH chez les cellules traitées à la concentration 40 μ M est 2 fois plus élevé que chez les cellules témoins. Cependant et après 24h de traitement, l'induction de la GSH est plus apparente par rapport au témoin avec un pic observé à 40 μ M où il est environ 3 fois le témoin.

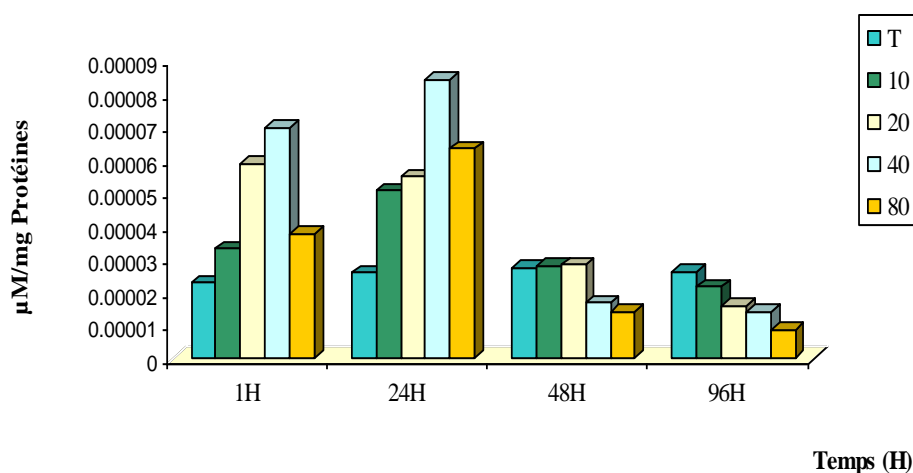


Fig. (12): Effet du Bifenazate sur le taux de GSH

Ces fortes teneurs de GSH enregistrées en présence de Bifenazate impliquent le déclenchement du système de détoxification. Selon Yu(1994) ; Chan et Decker(1994) ; Packer et al. (1995) et Ha et al. (1998) la capture directe des radicaux oxygénés libres (ROL), causée par ce xénobiotique est assurée par des composés piègeurs de radicaux ou par des systèmes enzymatiques situés au voisinage du lieu de production initial. Ces radicaux peuvent être piégés par le glutathion, certains dipeptides, les protéines riches en groupes thiols (-SH), les acides aminés, les acides gras insaturés non estérifiés et les phospholipides.

Enfin, l'activité de la GSH décroît à partir de 48h pour les fortes concentrations (40 et 80 μ M) et ce de manière très hautement significative ($0.001 < p < 0.01$). Il semble que les systèmes en question sont dépassés et les enzymes sont complètement inhibées. Ceci est en parfait accord avec les travaux de Chaoui et al., (1997) et Cho et Park, (2000). Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Regoli et Principato, (1995); Doyotte et al., (1997); Cossu et al., (1997, 2000) qui ont rapporté une réduction du GSH chez des bivalves en corrélation avec la présence dans le milieu de PCB et de HAP.

D'après Hayes et McLellan, (1999), le glutathion joue un rôle important dans les mécanismes de détoxification de la cellule et constitue la première ligne de défense antioxydante. Sbartai et al (2008), Grara et al (2009) confirment ce rôle de la GSH dans le système de détoxification.

Tous ces travaux viennent appuyer nos résultats et confirment l'induction de la GSH aux plus fortes concentrations de Bifenazate suggérant ainsi le déclenchement des systèmes de défense causés par le xénobiotique étudié.

c. Effet du Bifenazate sur l'activité GST:

Les données obtenues après dosage de l'activité spécifique GST exprimées en μ moles/min/mg de protéines mesurée au niveau des cellules de paramécies sont regroupées dans la figure (13).

D'après la figure (13), on remarque que la GST augmente en fonction des concentrations croissantes ainsi que du temps et de manière non significative ($p > 0.05$) et atteint son maximum à 48h où cette dernière double par rapport au témoin à la concentration de 80 μ M. Cependant une diminution de la GST est observée à la fin du traitement et ce pour toutes les concentrations.

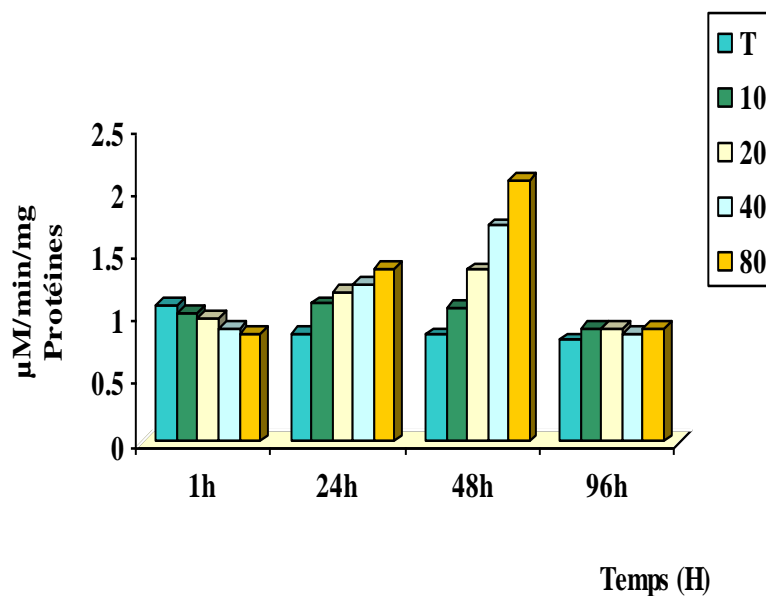


Fig. (13): Effet du Bifenazate sur l'activité GST

Nos résultats corroborent ceux de Sbartai et al, (2008) qui ont rapporté une diminution de la GST après 7 jours de traitement par le Cadmium chez des racines de tomates (*Lycopersicon esculentum*). De même une induction de la GST a été signalée chez les moules exposés aux métaux lourds (canesi et al, 1999) et aussi chez les mollusques bivalves *Mytella guyanensis* collectées dans des sites contaminés par des métaux lourds (Torres et al, 2002). Radwan et al,(1992) ont également mis en évidence une induction de la GST après exposition du gastéropode *Theba pisana* aux carbamates.

Nos résultats vont dans le même sens que tous ces travaux et confirme le rôle de la GST qui constitue une seconde ligne de défense efficace de nombreuses substances hautement toxiques issues des interactions des espèces réactives de l'oxygène avec les macromolécules cellulaires en défendant la cellule des effets délétères du stress oxydant (Martin, 2003).

d. Effet du Bifenazate sur l'activité Catalase (CAT):

Les résultats obtenus de l'activité Catalase en fonction du temps et des différentes concentrations de Bifenazate sont représentés sur la figure (14).

Le suivi de l'activité catalase révèle que cette dernière augmente dès la première heure du traitement par rapport au témoin, ceci est en parfait accord avec Wenning et al., 1988 qui considère la CAT comme une enzyme présentant une réponse claire et rapide de la contamination par les xénobiotiques.

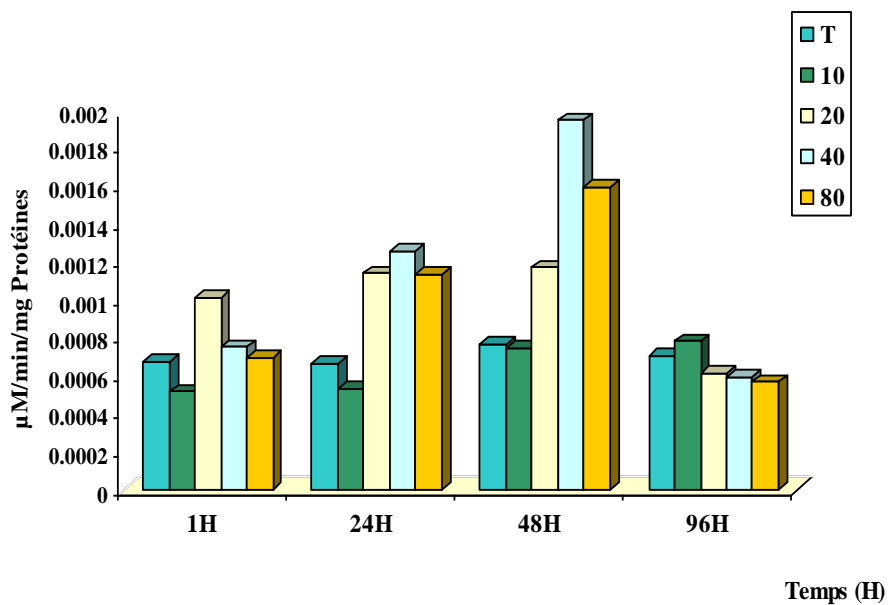


Fig. (14): Effet du Bifenazate sur l'activité catalase

Cependant, un pic est observé à 48h pour les concentrations 40 et 80 μM où ce taux est respectivement de 0,0019 et 0,0015 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg P}$. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux de Tripathi et al., (2006), qui rapportent une induction de la catalase chez des algues (*Scenedesmus sp.*) exposées à des concentrations de cuivre à court et à long terme (6 h - 7j).

A la fin du traitement (96h), on remarque une forte diminution de l'activité catalase et ce de manière non significative ($p > 0.05$) pour toutes les concentrations. Cette observation corrobore celle de Luna et al. (1994) qui ont suggéré que le niveau accru de ROS résultant de l'exposition des feuilles d'avoine à des concentrations élevées de Cu^{+2} inhibait les activités de la CAT et APX. De mêmes résultats ont été rapportés par Mediouni et al, (2009), Grara et al, (2009), Stephensen et al. (2000).

Tous ces travaux confortent nos résultats confirmant ainsi l'induction de la catalase dès les premières heures de traitement par le bifénazate chez les protistes étudiés.

e. Effet du Bifénazate sur l'activité Ascorbate –peroxydases (APX):

La figure (15) illustre l'évolution de l'activité Ascorbate -peroxydase. On remarque que l'activité APX augmente en fonction du temps et des concentrations de manière non significative ($p > 0.05$) avec un pic à 48h où elle est environ 4 fois le témoin à la concentration de $80\mu\text{M}$. Cependant, l'activité APX diminue à la fin du traitement pour toutes les concentrations où elle est presque équivalente à celle du témoin.

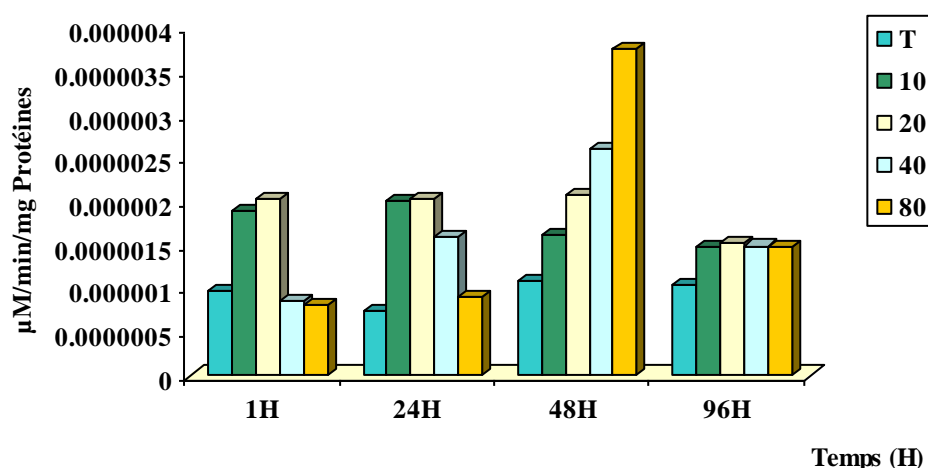


Fig. (15): Effet du Bifénazate sur l'activité APX

L'augmentation de l'activité APX engendrée par le Bifenazate met en évidence son rôle dans l'élimination de l'eau oxygénée (H_2O_2) formée suite à l'accumulation du xénobiotique dans la cellule. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Kampfenkel et al., 1995 , Wecky et Clijsters, (1996) , Patra et Panda,(1998) ; Prasad et al. (1999) ; Rucinska et al. (1999); Gallego et al. (2002) et Mediouni et al. (2009).

De même, Khaldi et al (2009) ont mis en évidence l'augmentation de l'activité APX chez des lichens (*Ramalina farinacea*) traitées par des engrais (NPKs).

Il faut savoir que les deux activités CAT et APX sont des éliminateurs d' H_2O_2 , et les variations de leurs activités respectives sont directement liées à leur rôle dans l'élimination de l' H_2O_2 (Ammar et al. 2008 ; Dixit et al. 2001).

3. Etude polarographique :

La figure (16) illustre l'effet du xénobiotique sur le métabolisme respiratoire durant 5 jours (96 h) de traitement .

La figure (16) montre que la densité des paramécies enregistrée à 24h est trois fois plus élevée que celle obtenue à 1h et ce pour les concentrations 10 et 20 μ M.

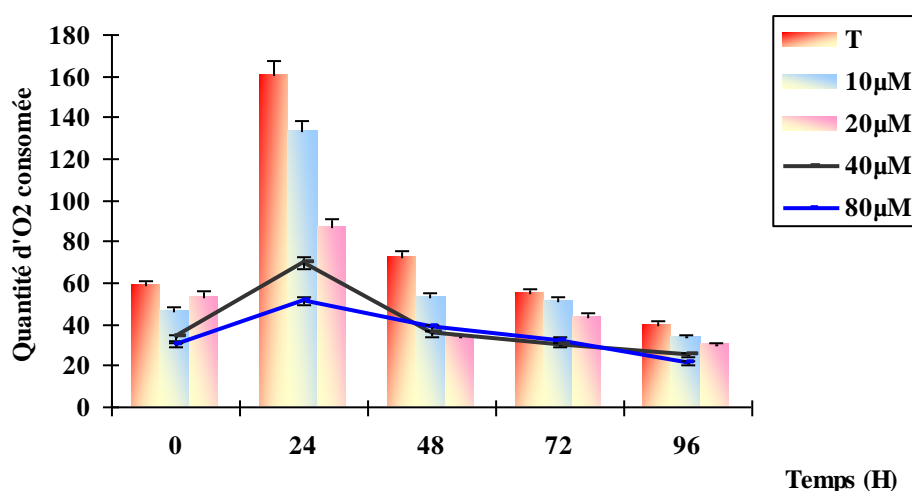


Fig. (16): Effet du Bifenazate sur le métabolisme respiratoire

Il est important de signaler que les variations les plus importantes sont notées à 24h. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que les cellules traitées ont tendance à s'adapter aux concentrations utilisées, ce qui donne des activités respiratoires des paramécies traitées beaucoup plus proches de celles des cellules témoins.

La perturbation de l'activité respiratoire obtenue montre que les faibles concentrations de Bifenazate sont génératrices de stress oxydatif à l'origine de libération de ROS qui sont connus comme éléments perturbateurs du métabolisme respiratoire (Kiss et al ,2003 ; Kuciel et Mazurkiewicz, 2004). Ces ROS sont rapidement neutralisés par le système de défense /détoxification qui utilisent des molécules d'O₂ pour leur activité, il en est ainsi des mono-oxygenases et des oxydases (Lagadic et al , 1997 ; Bounias, 1999) .

Concernant les concentrations 40 et 80µM, on constate que les variations enregistrées à 24h représentent le double de celles obtenues à 1h. Au-delà de 48h l'activité respiratoire est très faible et témoigne de l'effet inhibiteur du Bifenazate.

Aussi après 24h et après déclenchement du système de défense des paramécies, les variations initialement enregistrées à 24h se réduisent fortement aux temps supérieurs et ce de manière très hautement significatives ($p < 0.001$).

Conclusion 1:

Au terme de cette première série de résultats, il ressort que le protiste cilié utilisé dans notre travail est parfaitement adapté aux études toxicologiques. La culture en masse de ce micro-organisme nous a permis d'évaluer aisément la toxicité du Bifenazate via le suivi de la courbe de croissance, le pourcentage de réponse, la CI 50, le temps de dédoublement et le nombre de division cellulaire.

Il s'avère que le bifenazate est toxique aux fortes concentrations, causant ainsi une inhibition de la croissance cellulaire, un changement du comportement des paramécies, une diminution du temps de dédoublement ainsi qu'une augmentation du nombre de division qui laisse suggérer un éventuel effet carcinogène à long terme.

D'un autre côté, l'évolution des différents paramètres biochimiques ont mis en évidence le déclenchement des systèmes de détoxification (GSH, GST, CAT et APX), une éventuelle peroxydation lipidique via l'augmentation du taux de MDA et la diminution des lipides totales ainsi qu'une inhibition du métabolisme respiratoire.

Tous ces résultats convergent vers un comportement de ce modèle cellulaire très proche de celui d'organismes supérieurs. Ceci conforte nos travaux et confirme leur intérêt en tant que modèles biologiques pour les bio-essais.

1. Les tests de cytotoxicité:

1.1. Effet de l'Indoxacarbe sur la croissance cellulaire:

Dans la figure (17), la croissance des cellules témoins semble diminuer jusqu'au 4^{ème} jour, pour croître par la suite.

Pour les cellules traitées avec 10 μM on remarque un état similaire à celui des témoins. Quant aux cellules traitées avec 20, 40 et 80 μM , une inhibition progressive et très hautement significative ($p < 0.001$) de la croissance est observée pratiquement dès le 1^{er} jour du traitement. Ceci est dû à la présence de paroi chez les paramécies qui constitue une barrière ne laissant passer que de très faibles concentrations de pesticides; ce qui explique d'ailleurs que l'effet toxique n'est décelable qu'à partir de 40 μM . C'est d'ailleurs la principale similitude entre les insectes et ces micro-organismes (Rouabhi et al, 2006).

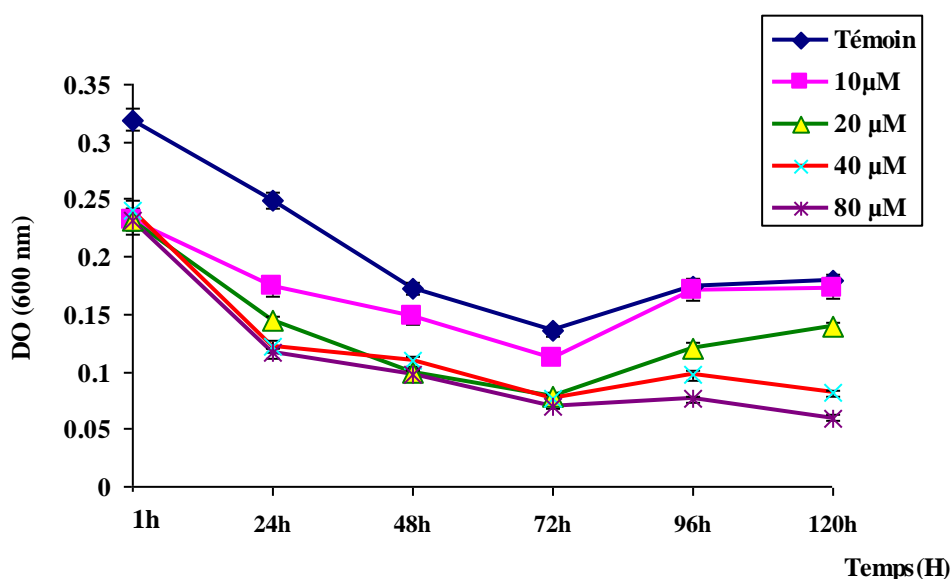


Fig. (17): Effet de l'Indoxacarbe sur la croissance cellulaire

La culture en masse de ces micro-organismes nous permet d'évaluer aisément la toxicité du xénobiotique via le suivi de la courbe de croissance comme l'ont suggérés les travaux de Lavergne (1985), Berrebbah (1990), Noboru Takiguchi et al. (2002), ainsi qu'ceux de Gonzalez et al. (2006).

Squiban et al., (1987) ont comparé les effets de la delthamétrine sur différents types de cellules en culture : *Dunaliella biculata* et *Chlamydomonas CW 15* (algues unicellulaire flagellées) et des cellules animales en culture (fibroblastes de lihnée L129). Leurs résultats ont mis en évidence une inhibition de la croissance aussi bien chez les protistes que chez les cellules animales en culture

De son côté Lavergne (1985) a testé la toxicité d'une molécule à but thérapeutique en l'occurrence : le Diazepam sur des protistes ciliés (*Tetrahymena*) et a confirmé l'effet de cette molécule sur la multiplication cellulaire chez les mammifères. D'autre part, nos résultats corroborent ceux de Druez et al. (1989) qui ont testé l'effet du Gossypol sur la morphologie, la mobilité et le métabolisme de *Dunaliella bioculata* (protiste flagellé) considéré comme un modèle cellulaire proche des spermatozoïdes humains.

De même Trielli et al, (2007) ont rapporté l'effet inhibiteur des organophosphorés et organochlorés sur la croissance ainsi que sur la stabilité des membranes lysosomales d'un protistes aquatique *Euplotes crassus*. Ces résultats convergent dans le même sens que ceux de Rao et al. (2008) qui ont rapporté l'effet toxique du fenthion (en fonction des concentrations croissantes) sur la croissance de *Paramecium caudatum*.

En parallèle, l'observation microscopique révèle un changement dans le comportement des paramécies qui se traduit par une diminution de la mobilité par rapport aux cellules témoins et ce en fonction du temps et des concentrations croissantes.

Rao et al. (2007) ont rapporté q'une diminution de la mobilité ainsi q'un changement du comportement de *Paramecium caudatum* ont été observés sous l'influence de concentrations élevées de monocrotophos (MCP). Ce changement de comportement pourrait être dû à une réduction de l'énergie promue par la réduction des taux d'ingestion. Le mouvement des cils est alimenté par des molécules d'ATP. Chez les Ciliés, comme la paramécie, le battement des cils serait inefficace s'il n'était pas coordonné. Cette coordination est faite mécaniquement par un appareil complexe de fibrilles interciliaires qui relie les cils entre eux et contribue à rendre la pellicule plus rigide.

1.2. Calcul du pourcentage de Réponse:

Pareil que pour le Bifenazate le pourcentage de réponse des paramécies traités à l'Indoxacarbe est dose – dépendant et proportionnel aux concentrations croissantes de ce dernier: il est respectivement de :4,44% à 10 μ M et atteint 66,66% à 80 μ M où plus de la moitié de la population est inhibée par cette dose (figure 18). Ce résultat rejoint celui de Redouen-Salah, (2004).

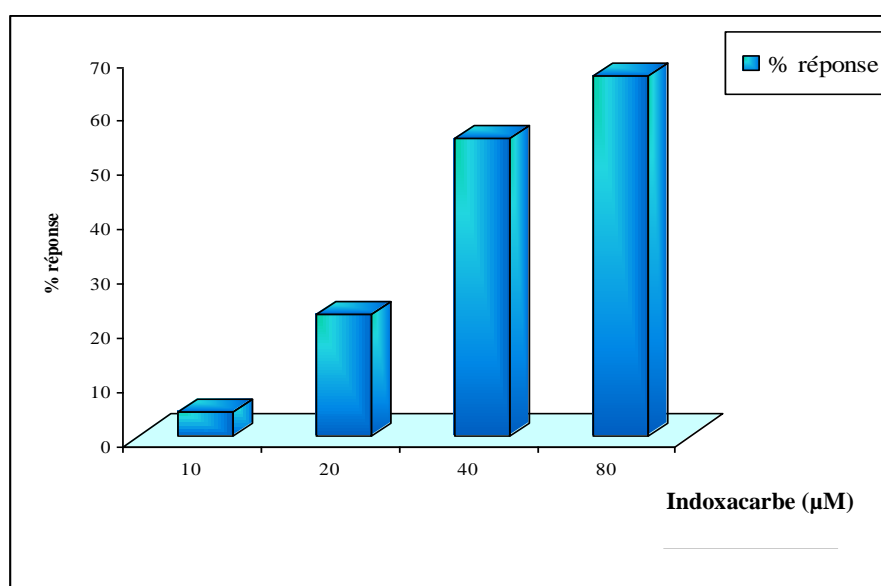


Fig. (18) : Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations d'Indoxacarbe.

1.3. La concentration inhibitrice CI50:

Pour caractériser la toxicité, on détermine la concentration inhibitrice 50% (CI₅₀). On remarque que la concentration inhibitrice diminue en fonction de la durée d'exposition (tableau 13).

Rao et al, (2006) confirment la diminution de la CI50 en fonction du temps chez *Paramecium caudatum* traités par des organophosphorés.

Tableau (13) : Détermination de la CI 50

Exposition	Indoxacarbe	
	CI ₅₀ (μM)	Slope
72 h	83.67	0.271
96 h	52.81	0.426
120 h	44.83	0.243

1.4. Détermination du temps de dédoublement cellulaire tg:

Les tableaux (14) et (15) regroupent les valeurs obtenues après calcul du temps de génération (tg) ainsi que le nombre de division (D/D) et ce à court et à long terme.

Tableau (14): Détermination du tg et du D/D après 24h d'exposition

Concentrations	Indoxacarbe	
	Tg (H)	D/D
Témoin	0.83	0.36
10μM	0.75	0.40
20μM	0.44	0.68
40μM	0.31	0.97
80μM	0.30	1

Dans le tableau (14), on constate que le temps de génération diminue en fonction des concentrations, il est de 0.75h à 10μM et atteint 0.30h à 80μM, cependant le nombre de génération est inversement proportionnelle aux concentrations croissantes d'indoxacarbe.

De même et après 120 h d'exposition, le Tg diminue de manière dose – dépendante et le nombre de division augmente (tableau 15).

Ce résultat confirme cet effet dose- dépendant du xénobiotique ainsi qu'un éventuel effet carcinogène de ce dernier et ce dès les premières heures d'exposition des paramécies. Ces travaux pourraient conforter ceux de Guelfi et al, (2003) qui ont mis en évidence un effet carcinogène du Cadmium chez *Aspergillus nidulans*.

Tableau (15) : Détermination du tg et du D/D après 120h d'exposition

Concentrations	Indoxacarbe	
	Tg (H)	D/D
Témoin	6.02	0.0069
10µM	12.04	0.0035
20µM	7.48	0.0055
40µM	3.12	0.0133
80µM	2.57	0.0162

2. Evolution des paramètres Biochimiques:

2.1. Effet de l'Indoxacarbe sur les principaux métabolites:

2.1.1. Effet de l'Indoxacarbe sur le taux des protéines totales:

Les variations du taux de protéines totales obtenues sont représentées dans le tableau (16). On constate que le taux de protéines augmente en fonction des concentrations et de manière très hautement significative ($p < 0.001$) par rapport au témoin pour diminuer par la suite à 80 µM.

Nos résultats vont dans le même sens que les travaux de Piccini et al, (1994) ; Masaya et al, (2002), puisque le dosage des protéines totales a confirmé une augmentation croissante et dose -dépendante de ces derniers en présence d'indoxacarbe et confirment ainsi le rôle des protéines du stress chez les microorganismes.

Tableau (16): Variation du taux de protéines totales

Concentrations (μM)	Taux de Protéines totales ($\mu\text{g/ml}$)
Témoin	0.568 \pm 0.008
10 μM	0.569 \pm 0.014
20 μM	0.59 \pm 0.016
40 μM	1.24 \pm 0.052
80 μM	0.698 \pm 0.014

2.1.2. Effet de l'Indoxacarbe sur la variation du taux des lipides:

Le tableau (17) représente les variations du taux des lipides obtenus en fonction des différentes concentrations de l'insecticide après 24H d'exposition. On constate une diminution très hautement significatives ($p < 0.001$) du taux de lipides par rapport au témoin et ce jusqu'à 40 μm où il est de 1.11 $\mu\text{g/mg}$ et atteint une valeur de 1.48 $\mu\text{g/mg}$ à la concentration de 80 μM .

Cette perturbation suggère une altération de la membrane cellulaire sachant que cette dernière est composée de plus 50% de lipides (phospholipides) et que l'indoxacarbe commence son action dès le contact avec les paramécies.

Tableau (17): Variation du taux de lipides

Concentrations (μM)	Taux de lipides ($\mu\text{g/ml}$)
Témoin	4.99 \pm 0.045
10 μM	3.24 \pm 0.020
20 μM	1.5 \pm 0.085
40 μM	1.11 \pm 0.096
80 μM	1.48 \pm 0.020

2.1.3. Effet de l'Indoxacarbe sur la variation du taux des glucides:

Le tableau (18) englobe les résultats obtenus quant aux variations du taux des glucides totaux des paramécies traitées par les différentes concentrations d'Indoxacarbe.

Tableau (18): Variation du taux de glucides

Concentrations (μM)	Taux de Glucides ($\mu\text{g/ml}$)
Témoin	130.29 ± 1.66
10 μM	130.35 ± 1.62
20 μM	132 ± 2.29
40 μM	134.13 ± 1.17
80 μM	147.21 ± 0.7

On constate que le taux des glucides augmente en fonction des concentrations croissantes d'Indoxacarbe de manière très hautement significatives ($p < 0.001$), il passe de $130.35 \mu\text{g/mg}$ pour la concentration de 10 μM et atteint $147.21 \mu\text{g/mg}$ pour 80 μM , alors que chez le témoin il est de $130.29 \mu\text{g/mg}$.

Chez les cellules Eucaryotes la membrane plasmique est constituée par un assemblage de lipides et de protéines maintenues par des interactions non covalentes. Des chaînes polysaccharidiques sont liées de manière covalente à la plupart des protéines exposées à la surface de la cellule et à certaines des molécules lipidiques de la monocouche lipidique externe (Alberts et al., 1986).

2.2. Effets de l'Indoxacarbe sur l'évolution des biomarqueurs:

a. Effet sur le taux du malondialdéhyde (MDA):

La figure (19) illustre les variations du taux de MDA en présence de concentrations croissantes d'Indoxacarbe. On constate que le taux de MDA tend à augmenter d'une manière dose- dépendante et très hautement significatives ($p=0,000$).

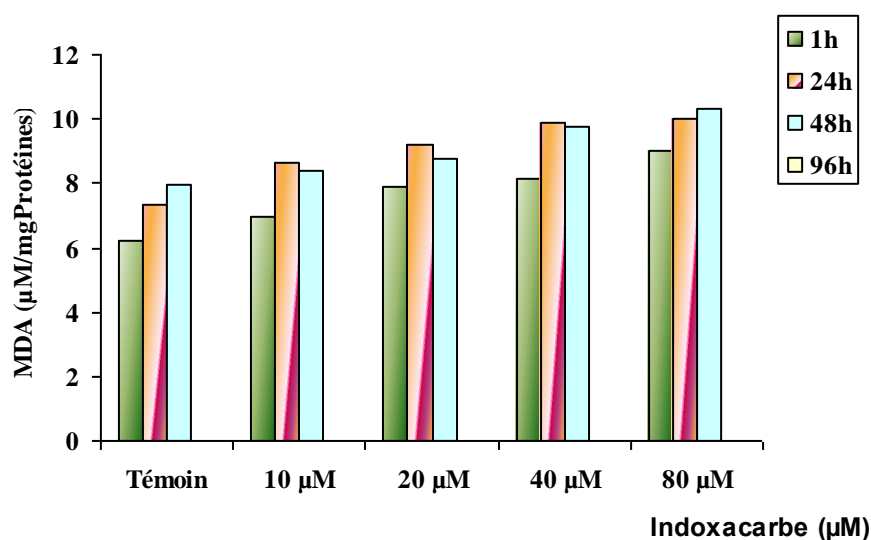


Fig. (19) : Variations du taux de MDA en présence d'Indoxacarbe

Le malondialdéhyde est le principal aldéhyde actif de la peroxydation de l'acide gras polyinsaturé des membranes. Cette peroxydation est suivie d'un changement structural des membranes biologiques (Bebianno et al, 2005) ou d'autres contenant des lipides (Al-Mutairi et al., 2007). Il s'ensuit une perte de la perméabilité, une inactivation des récepteurs et des enzymes de la membrane (Pampanin et al., 2005).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Salama et al.,(2005) qui ont étudié les effets toxiques de certains pesticides sur la peroxydation lipidique chez les rats. De même Singh et al., (2004) ont rapporté dans leurs travaux l'augmentation du taux de l'MDA dans les racines et les feuilles de tomates après exposition a certains métaux

lourds. Chaoui et al. (1997) confirment ces résultats et ont rapporté l'augmentation de MDA chez *Phaseolus vulgaris* L traité au cadmium.

b. Effet de l'Indoxacarbe sur le taux de GSH:

Les résultats obtenus sont résumés dans la figure (20) qui représente la variation du taux de GSH en fonction des différentes concentrations de l'insecticide dans un intervalle de temps (1h – 96h).

Après 1h d'exposition, on observe une légère induction de la GSH en fonction des différentes concentrations où il est de $4,3 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{M}/\text{mgP}$ chez les cellules traitées à la concentration de 40 μM alors qu'il est d'une valeur de $2,7 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{M}/\text{mgP}$ chez les cellules témoins.

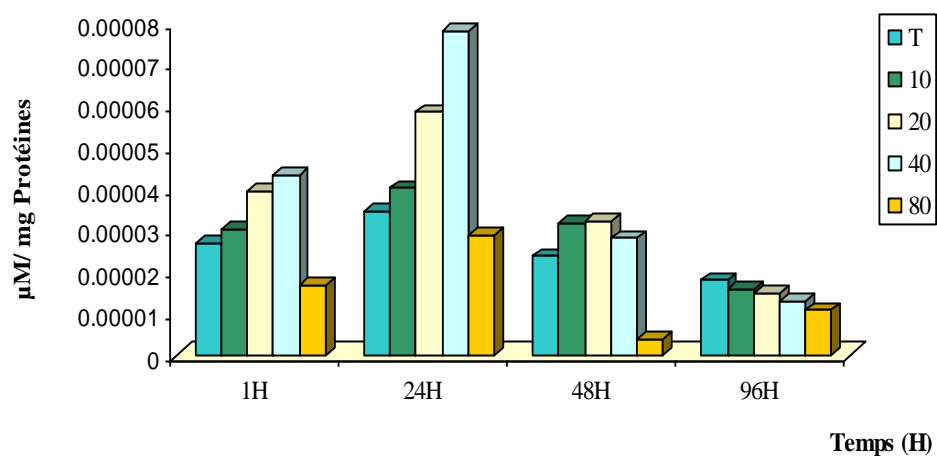


Fig. (20) : Effet de l'indoxacarbe sur le taux de GSH

A 24h de traitement, on remarque une forte induction du taux de la GSH chez les cellules traitées par rapport au témoin où ce taux atteint son maximum à la concentration 40 μM (environ 3 fois le témoin), alors que pour la plus forte dose 80 μM il est très faible. Ceci implique le déclenchement du système de détoxification afin

d'éliminer les radicaux oxygénés libres générés par l'action de l'indoxacarbe et qui vont être piégés par le glutathion (Ha et al, 1998).

Finalement, la GSH décroît à partir de 48h en fonction du temps et des concentrations et de manière hautement significatives ($0.05 > p > 0.01$). Ceci est en parfait accord avec les travaux de Sbartai et al., (2008) qui ont rapporté l'induction de la GSH dès les premières heures de traitement par le cadmium chez les racines de tomates, et l'inhibition de celle-ci après 7 jours de traitement. De mêmes résultats ont été rapportés par Grara et al, (2009) qui ont travaillé sur l'effet des poussières métalliques sur des escargots pulmonés *Helix aspersa*.

Il semble donc que pour les fortes doses et après 24h de traitement, les systèmes en question sont dépassés et les enzymes sont complètement inhibées, ceci est en parfait accord avec les travaux de Chaoui et al., (1997) et Cho et Park, (2000).

Tous ces travaux abondent dans le même sens que nos résultats, confirmant ainsi le rôle de la GSH dans la défense de l'organisme via l'induction de cette dernière aux fortes concentrations d'Indoxacarbe et ce dès les premières heures du traitement.

c. Effet de l'Indoxacarbe sur l'activité GST:

Les données obtenues après dosage de l'activité spécifique GST exprimées en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines mesurée au niveau des cellules de paramécies sont regroupées dans la figure (21).

D'après la figure ci-dessous, on remarque que la GST augmente en fonction des concentrations croissante et de manière significatives ($p=0.05$) ainsi que du temps pour atteindre un pic à 48h où cette dernière double par rapport au témoin.

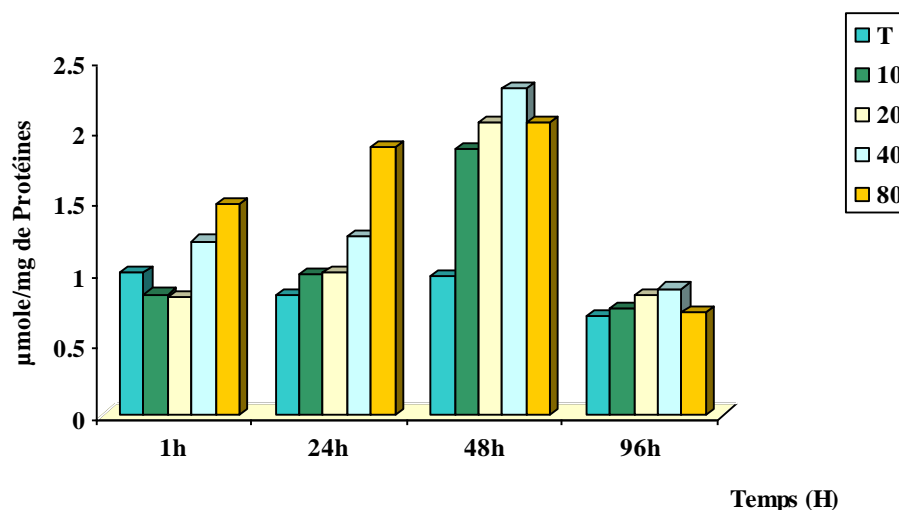


Fig. (21). Effet de l'Indoxacarbe sur l'activité GST

La GST constitue une seconde ligne de défense efficace contre de nombreuses substances hautement toxiques issues des interactions des espèces réactives de l'oxygène avec les macromolécules cellulaires. Ces enzymes défendent la cellule des effets délétères du stress oxydant (Martin, 2003). Ceci est en accord avec plusieurs travaux concernant le rôle de la GST dans la détoxification (Sbartai et al, (2008); Grara et al, (2009) .Cependant une diminution de l'activité GST est observée à la fin du traitement où elle est remplacée par d'autres systèmes (Grara et al, 2009).

Tous ces travaux nous confortent dans nos résultats et confirment l'induction de la GST chez les cellules traitées par l'indoxacarbe.

d. Effet de l'Indoxacarbe sur l'activité Catalase:

Les résultats obtenus de l'activité Catalase en fonction du temps et des différentes concentrations sont représentés sur la figure (22).

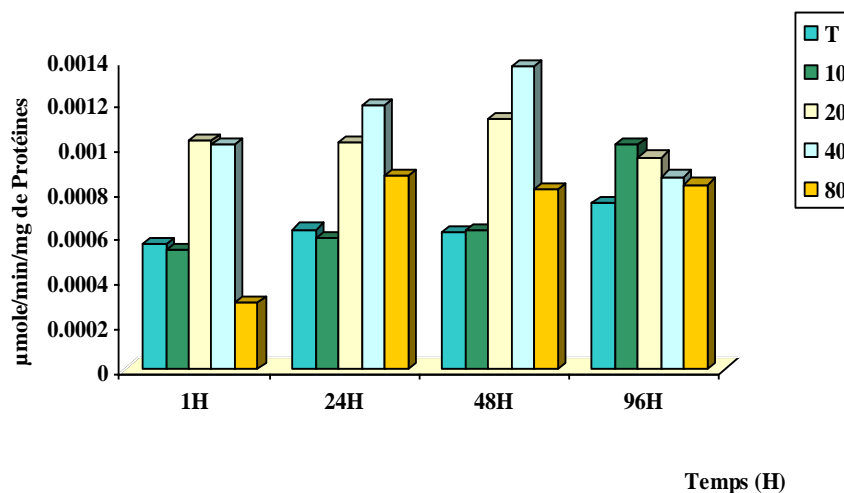


Fig. (22): Effet de l'Indoxacarbe sur l'activité catalase

Le suivi de l'activité catalase révèle que cette dernière augmente dès la première heure du traitement par rapport au témoin et ce pour les concentrations (20 et 40 μM).

Parallèlement un pic est observé à 48h pour la concentration de 40 μM . Cependant, on remarque une diminution de la Catalase à 96h en fonction des concentrations croissantes et de manière très hautement significatives ($p \approx 0.001$).

L' H_2O_2 est l'une des espèces réactives à l'oxygène les plus toxiques qui doit être éliminée par l'activité CAT et APX (Tripathi et al, 2006). Nos résultats vont dans le même sens que Barata et al, (2005), qui ont rapporté une induction de la Catalase chez des individus de *Daphnia magna* exposés au Paraquat. De mêmes résultats ont été rapportés par Khaldi et al, (2009) où ils mentionnent l'augmentation de l'activité Catalase chez les lichens en fonction de concentrations croissantes d'engrais (NPKs).

e. Effet de l'Indoxacarbe l'activité Ascorbate –peroxydases (APX):

La figure (23) illustre les résultats obtenus après dosage de l'activité Ascorbate - peroxydase.

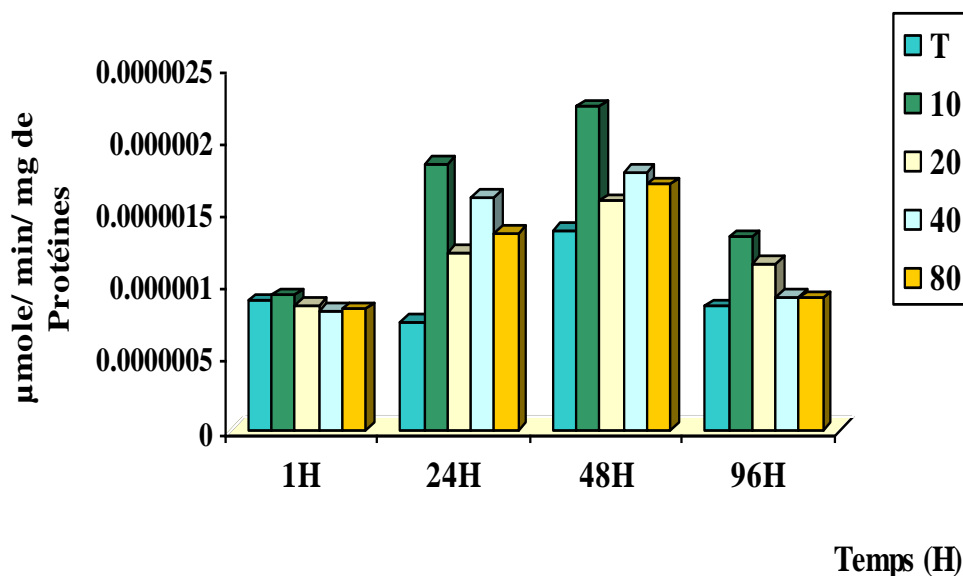


Fig. (23): Effet de l'Indoxacarbe sur l'activité APX

On remarque que l'activité APX augmente de manière hautement significatives ($p \approx 0.01$) en fonction du temps et des concentrations et atteint son maximum à 48h à la concentration de 20 μM où elle est environ 3 fois le témoin. Cependant, l'activité APX diminue à la fin du traitement et ce pour toutes les concentrations.

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Prasad et al. (1999) ; Rucinska et al. (1999) et Gallego et al. (2002), Sbartai et al. (2008), Khaldi et al. (2009) et Mediouni et al. (2009) qui rapportent l'induction de l'activité APX chez différentes espèces et son rôle dans l'élimination de l' H_2O_2 généré par le stress oxydatif engendré par l'action de différents xénobiotiques.

3. Etude polarographique:

La figure (24) illustre l'effet du xénobiotique sur le métabolisme respiratoire durant 5 jours (96 h) de traitement.

On remarque que la quantité d'O₂ consommée diminue par rapport au témoin à partir de 24h en fonction du temps et des concentrations.

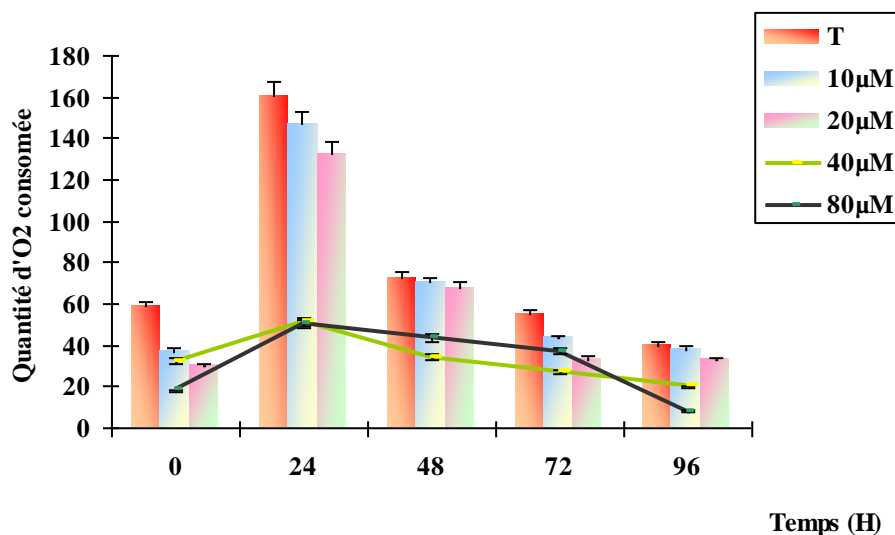


Fig. (24). Effet de l'Indoxacarbe sur le métabolisme respiratoire

La figure (24) montre que la densité des paramécies enregistrée à 24h est trois fois plus élevée que celle obtenue à 1h. Ceci est dû à une multiplication des microorganismes.

On constate en parallèle que le traitement aux plus faibles concentrations provoque une réduction légère de l'activité respiratoire, celle-ci est d'environ 20% à la concentration de 10µM et de 25% à 20µM (1h).

Cependant, il est important de signaler que les variations les plus importantes sont notées à 24h. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que les cellules traitées ont tendance à s'adapter aux concentrations utilisées, ce qui donne des activités respiratoires des paramécies traitées beaucoup plus proches de celles des cellules témoins.

Concernant les fortes concentrations, on constate que les variations enregistrées à 24h représentent le double de celles obtenues à 1h avec un effet beaucoup plus réducteur à 80µM où les paramécies consomment à peine 7,95 nmole. Après 48, 72 et 96h, l'activité respiratoire des paramécies est très faible et témoigne de l'effet inhibiteur de ces concentrations et ce manière très hautement significatives ($p < 0.001$).

Les mitochondries contribuent largement dans le stress oxydatif, en particulier dans la mort cellulaire par apoptose (Rico et al, 2009) qui est à l'origine de libération de ROS qui sont connus comme éléments perturbateurs du métabolisme respiratoire (Kiss et al ,2003 ; Kuciel et Mazurkiewicz, 2004). Ces ROS sont rapidement neutralisés par le système de défense /détoxification qui utilisent des molécules d'O₂ pour leur activité, il en est ainsi des mono-oxygenases et des oxydases (Lagadic et al , 1997 ; Bounias, 1999) .

Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Bensoltane et al. (2005) qui ont rapportés la stimulation de la respiration chez des paramécies traitées par des NH₄ NO³ , d'autre part la consommation excessive d'oxygène pourrait expliquer le phénomène d'eutrophisation des milieux aquatiques suite à une pollution par des produits chimiques . Cette eutrophisation des lacs est à l'origine de la mort par asphyxie des poissons d'eau douce (Gangbazo et al, 1995).

Tous ces travaux viennent appuyer nos résultats concernant la consommation d'oxygène par des paramécies traitées par un insecticide l'Indoxacarbe.

Conclusion 2

Au terme de cette deuxième série de résultats, il s'avère que l'indoxacarbe est beaucoup plus toxique que le Bifenazate et ce dès la concentration de 20 μ M.

Les tests de cytotoxicité ont révélé l'effet inhibiteur du xénobiotique sur la croissance des paramécies ainsi qu'une augmentation du temps de dédoublement et du nombre de division laissant suggérer un effet carcinogène et ce dès les premières heures d'exposition à l'insecticide.

L'évolution des paramètres biochimiques et enzymatiques confirme cette toxicité de l'indoxacarbe où on remarque l'induction des systèmes de détoxification à partir de 20 μ M et une inhibition de ces derniers à la plus forte concentration 80 μ M.

De même la perturbation du métabolisme respiratoire met en évidence cet effet inhibiteur de l'indoxacarbe.

En conclusion, nos résultats tendent à prouver que notre molécule est très toxique sur d'autres organismes non cibles.

1. Modèle conceptuel :

Le modèle conceptuel de l'écosystème représente l'ensemble des éléments biotiques et abiotiques définissant l'écosystème à l'étude. Ce modèle inclut à la fois des éléments du modèle (sol de surface, organisme aquatique, eau souterraines, ...) et les interactions liant ces éléments entre eux. Dans notre logiciel, le modèle conceptuel inclut à la fois la représentation graphique des divers éléments de l'écosystème et toutes les valeurs de variables définissant les éléments et les interactions. Il inclut aussi les concentrations de tous les contaminants dans chaque média environnemental.

Pour notre étude, nous avons introduit dans la base de données du logiciel toutes les caractéristiques concernant les deux contaminants (bifenazate et indoxacarbe) ainsi que certains éléments de l'écosystème qui sont considérés comme partie intégrante de notre modèle conceptuels (figure 25).

Les résultats obtenus représentés dans la figure (26) illustrent les interactions qui existent entre les différents compartiments des écosystèmes ainsi que la bioamplification des contaminants dans les chaînes trophiques.

Suite à l'application (par pulvérisation) des biocides sur une végétation herbacée (tomate, vigne, ..), une partie de ces molécules va être accumulée dans les tissus des plantes et la plus grande partie va être lessivée par l'eau d'irrigation ou l'eau de pluie vers la surface du sol ou les contaminants vont subir des dégradations si les conditions biotiques et abiotiques sont réunies sinon ils continuent leur cheminement par infiltration vers les sous-surfaces du sol et par conséquent les eaux souterraines. A ce niveau les deux polluants peuvent subir à la fois une dilution et une dégradation suivie d'une résurgence vers les eaux de surfaces (lac/étang). Une fois que ces biocides (molécule actif ou métabolite) atteignent la surface de l'eau, ils vont subir une seconde dilution et/ou dégradation pour aboutir soit à une sédimentation (sédiments) soit ingérée par différents organismes aquatiques d'eau douce ou par contact direct avec les micro-organismes aquatiques dont la paramécie. Cependant, le dépôt atmosphérique n'est pas négligeable avec une dispersion aboutissant à une fixation foliaire.

Afin de faciliter la définition du modèle conceptuel, ce logiciel offre un outil complémentaire à l'interface principale de définition du modèle. Il s'agit d'un tableau interactif des interactions (tableau 19), indiquant sous une forme ordonnée, les interactions liant les divers éléments du modèle conceptuel.

2. Le Biotest :

Le logiciel permet d'inclure dans l'évaluation des risques des résultats de biotests réalisés à partir d'échantillons contaminés. Ces résultats peuvent être utilisés pour calculer les indices de risques qualitatifs ou quantitatifs (selon le type de réponse toxicologique obtenue par les biotests). Il propose une méthode inédite de calcul d'indice de risque à partir des résultats de biotests. Il existe diverses fonctions relatives aux biotests à savoir :

- Saisie des résultats de biotests
- Recherche de corrélation entre les résultats de biotests et les concentrations mesurées
- Calculer une ECx, c'est-à-dire le niveau de dilution correspondant à un niveau d'effet donné.

Dans notre travail, nous avons entrepris une description d'un biotest (voir annexe) ou nous avons résumé l'essentiel de notre expérimentation ainsi que nos objectifs suivi par une saisie des résultats de biotests dans une interface de saisie pour permettre l'utilisation des résultats des biotests dans le but d'estimer les risques.

2.1. Estimation du risque à partir du Biotest

Les données obtenues après l'analyse écotoxicologique d'un échantillon peuvent être multiples. Un échantillon contaminé et dont les effets toxiques sont mesurés par le biotest produira une relation de type dose/réponse tel que schématisée dans la figure (27) pour le bifenazate et la figure (28) pour l'indoxacarbe.

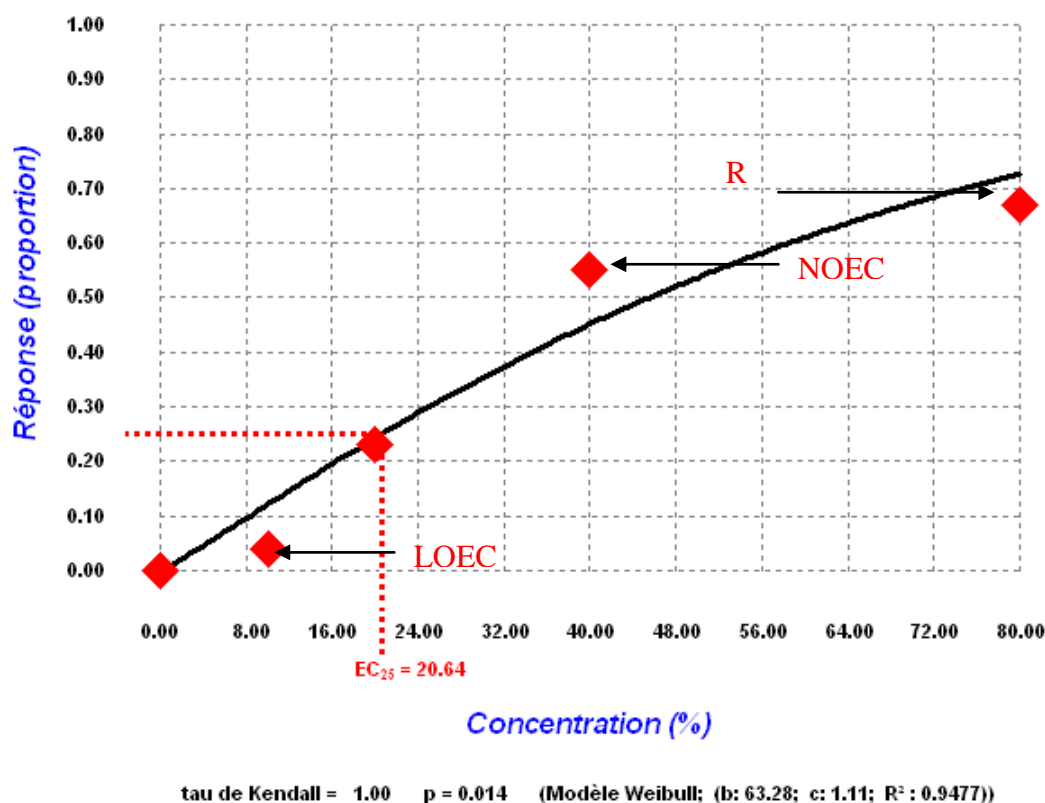


Fig. (27) : Relation dose/réponse du Bifenazate calculée à partir du biotest

Une concentration (**C**) correspondant à un seuil de toxicité, qui peut être estimé par plusieurs variables de mesure :

- **EC_x** : concentration effective produisant un pourcentage d'effet x
- **NOEC** : concentration testée la plus élevée ne produisant aucun effet toxique statistiquement significatif sur les organismes cibles.
- **LOEC** : concentration testée la plus faible produisant un effet toxique statistiquement significatif sur les organismes cibles.

Une réponse toxique (**R**) produite par un échantillon non dilué. Cette réponse s'exprime en termes de pourcentage d'effet.

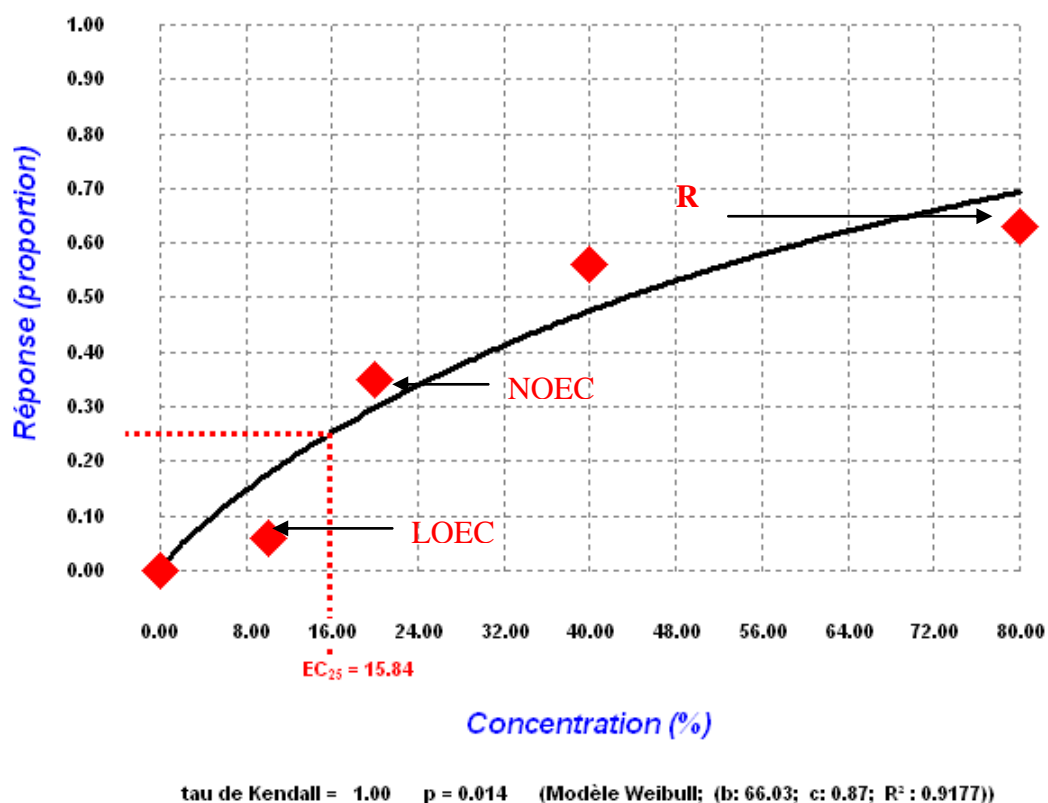


Fig. (28) : Relation dose/réponse de l’Indoxacarbe calculée à partir du biotest

Les valeurs obtenues à partir des graphiques par projection pour les deux contaminants sont représentées dans le tableau (20):

Tableau (20): Résultats du Biotest

	R (%)	NOEC	EC25 (%)	LOEC
Bifenazate	80	10	20,64	40
Indoxacarbe	80	10	15,84	20

2.2. Calcul de l'indice de risque

L'indice de risque permet d'estimer l'ampleur du risque pour un organisme donné exposé à une contamination. Cette valeur est théoriquement le rapport de la concentration en contaminant (s) auquel cet organisme est exposé sur la concentration en contaminant (s) tolérée par cet organisme, ou correspondant à un niveau d'effet considéré acceptable.

$$\text{IR} = C_{\text{exp}} / C_{\text{seuil}}$$

Où :

IR : indice de risque

C_{exp} : concentration du toxique à laquelle l'organisme est exposé

C_{seuil} : concentration «seuil » correspondant au niveau de protection voulu pour cette organisme.

Afin d'intégrer les résultats du biotest, les indices de risque sont classés dans quatre catégories comme suit :

- IR < 1 : absence de risque dans l'échantillon
- IR ≈ 1 : possibilité de risque (valeur faiblement supérieur à celle tolérée)
- IR > 1 : présence de risque (valeur supérieure à celle tolérée par l'organisme)
- IR >> 1 : présence de risque (valeur très supérieur à celle tolérée).

Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau (21) : valeurs de l'indice de risque

	(IR) Bifenazate	(IR) Indoxacarbe
10µM	0,48	0,63
20µM	0,96	1,26
40µM	1,93	2,52
80µM	3,87	5,05

D'après nos résultats, il s'avère que l'indoxacarbe présente une toxicité plus élevée que son IR est supérieur à 1 à partir de la concentration 20 μ M alors que pour le bifenazate l'IR est supérieur à 1 pour la concentration 40 μ M.

Conclusion 3:

Les indices de risques ayant été calculés sur la base d'un niveau d'effet (LOEC ou ECx), les conclusions énoncées sur **la présence de risques** reflètent vraisemblablement un **risque réel** pour les récepteurs écologiques du milieu à l'étude.

L'évaluation des risques écotoxicologiques à partir des résultats de **Biotests** comporte des limites d'interprétation liées au Biotest réalisé, au nombre restreint d'échantillons disponibles, aux types d'effets considérés et à divers autres facteurs. Un **potentiel risque significatif** a été estimé pour les récepteurs suivants :

- **Micro-organismes aquatiques** (1 échantillon sur 1 - Niveau de confiance : élevé)

Cette évaluation du risque nous a permis de comprendre la notion de réponse biologique en écotoxicologie et le calcul des valeurs seuils, ce qui justifie les concepts et outils utilisés au cours de cette étude.

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

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

Parmi ces microorganismes, les paramécies occupent une place de choix. Les paramécies ont été utilisées dans le passé pour l'évaluation rapide de la toxicité des pesticides (Kamola, 1992; Juchelka et Snell, 1995; Rouabhi et al., 2006; Rao et al., 2007). Ce sont des protistes, ubiquitaires dans l'environnement aquatique, caractérisés par un cycle de vie court, une multiplication rapide (Beal et Anderson, 1993) et dont le comportement normal dans la nature pourrait être affecté en présence de polluants, ce qui nous a conduit à les utiliser comme modèles alternatif pour l'étude de l'impact des xénobiotiques ainsi que l'évaluation des risques pour la santé (Sauvant et al. , 1999).

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

Quels sont les effets des deux xénobiotiques utilisés sur les paramètres cytotoxiques?

Pour atteindre leurs cibles moléculaires, les acaricides pénètrent à l'intérieur de l'organisme en traversant soit la cuticule, soit les parois du tube digestif (pour les acariens). Cette pénétration a lieu à une vitesse qui, pour un même toxique, varie d'une espèce à l'autre. Si la cinétique de pénétration est suffisamment lente, le produit

pourra être dégradé par les systèmes de détoxication et aura peu d'effet (Haubruge et Amichot, 1998).

Dans notre travail, une inhibition de la croissance ainsi qu'un changement comportemental ont été observés chez les paramécies traitées par le Bifenazate et l'indoxacarbe et ce de manière dose- dépendante. Rao et al (2006) expliquent le phénomène d'inhibition des paramécies, exposées à l'acephate, par la rupture des membranes des vacuoles contractiles ce qui provoque le mélange de leur contenu avec le protoplasme, ainsi le volume cellulaire est augmenté dans un premier temps, il s'ensuit une désintégration du protoplasme et de l'ensemble des membranes internes. Par la suite, la membrane externe est également touchée. L'observation microscopique montre une altération de la forme des cellules, par le développement de boursoflures irrégulières sur la membrane cellulaire, ce qui conduit à la lyse cellulaire. Cette dernière est due à des dommages des organelles internes de la cellule ainsi que la rupture de la membrane externe. De plus Rao et al (2008) ont montré que l'exposition de *Paramecium caudatum* au fenthion conduit à une série de modifications comportementales et morphologiques tel que la forme ainsi qu'une importante désorganisation du contenu cytosolaire, parallèlement à une fragmentation et une désintégration du macronoyau.

Quant aux modifications du comportement locomoteur, nous avons mis en évidence dans notre travail un changement de la trajectoire des paramécies. Il a été démontré que *Paramecium tetraurelia* exposées à la toxine pertussis modifient leur mouvement rotatoire qui s'amplifie du fait de l'augmentation de l'angle de rotation. Dans le cas d'une exposition à la deltaméthrine, les travaux de Rao et al. 2006 ont mis en évidence l'apparition du phénomène du "Backward swimming" (nage vers l'arrière) caractéristique principale de la toxicité chez les protistes ciliés. Ce phénomène a également été mis en évidence dans notre travail en présence des deux xénobiotiques testés (Bifenazate et Indoxacarbe).

D'autre part, «l'exocytose du trichocyste» est un symptôme prédominant chez les paramécies, lorsqu'ils sont traités avec des concentrations sub-létales de mercure et de chrome. Habituellement, un seul ou quelques trichocystes sont déchargés spontanément, suite à une légère stimulation de la cellule (Haacek et al. 1990). En revanche dans des conditions extrêmes une exocytose rapide des trichocystes peut avoir lieu (environ 10). Condition sinequanone à ce phénomène, l'assemblage correct des composants de la surface de la cellule, c'est-à-dire trichocystes et sub-plasmaleme. L'activation concomitante de la libération et de l'afflux des ions Ca^{+2} réduit de manière significative le contenu en ATP (Klauke et al. 2000). Le mouvement ciliaire est totalement arrêté après exocytose.

Le pourcentage de réponse (Wong et al., 1999) et la CI50 confirment l'évolution des courbes de croissance des cellules traitées par les deux xénobiotiques étudiés dans notre travail, ainsi il semble clair que ces deux pesticides sont inhibiteurs des paramécies avec une toxicité plus élevée pour l'indoxacarbe.

Le résultat obtenu quant au temps de dédoublement et le nombre de division des cellules vient confirmer cette hypothèse puisque nous avons remarqué que l'indoxacarbe avait un effet dose-dépendant ainsi qu'un probable effet carcinogène et ce dès les premières heures d'exposition des paramécies contrairement au bifenazate dont l'effet apparaît après 120h d'exposition. Il semble que le bourgeonnement est un phénomène commun et courant lors de l'apoptose (Friedl et Wolf, 2003), chez des paramécies exposées à des xénobiotiques cancérogènes et à d'autres composés (Rao et al. 2008). La faible toxicité du Bifenazate aux faibles concentrations est due au fait que c'est l'un des rares acaricides qui ne contient pas de métaux lourds ou d'halogènes (Van Leeuwen et al., 2006). Le Bifenazate est un acaricide sélectif indiqué comme étant neurotoxique. Toutefois, cette information n'a pas encore été démontrée (Dekeyser, 2005; Grosscurt et Avella, 2005).

Il est donc indéniable que l'un des premiers buts que nous nous sommes fixés semble atteint, non seulement le Bifenazate et l'indoxacarbe sont des xénobiotiques toxiques pour la paramécie, mais en plus ce modèle cellulaire est un excellent outil pour l'évaluation de la toxicité potentielle in vitro.

Puisque la cuticule constitue une barrière contre tout type de stress, nous nous sommes posés la question suivante :

Quels sont les effets des différents xénobiotiques utilisés sur les métabolites cellulaires?

Chez les cellules Eucaryotes, la membrane plasmique est constituée par un assemblage de lipides et de protéines maintenues par des interactions non covalentes. Des chaînes polysaccharidiques sont liées de manière covalente à la plupart des protéines exposées à la surface de la cellule et à certaines des molécules lipidiques de la monocouche lipidique externe (Alberts et al., 1986). C'est ainsi que des perturbations des teneurs en glucides, lipides et protéines sont constatés en présence des molécules que nous avons testées. Ces perturbations suggèrent une altération du métabolisme basal d'un côté et d'un autre côté, les xénobiotiques agissent dès le premier contact avec les micro-organismes. Partant du principe que tout type de stress chimique provoque une libération de radicaux libres dans l'organisme (Aurousseau, 2002), une altération des composants cellulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement. Tous les composants cellulaires peuvent être touchés : lipides, protéines et donc les membranes dans leur ensemble, glucides et ADN (Halliwell et Chirico, 1993 ; Jaeschke, 1995 ; Meneghini, 1997).

D'autre part, et comme le suggèrent Huang et Fwu (1993) et Schelling et al (1995), les effets typiques d'une attaque radicalaire se manifestent à l'échelle cellulaire par une peroxydation des lipides et des protéines. Sachant qu'au niveau de la membrane les trois éléments sont liés par des liaisons covalentes, il est aisé de suggérer que la perturbation du taux de glucides et des lipides mise en évidence dans notre travail pourrait être une conséquence d'une désorganisation au niveau des sites de fixation de ces derniers. Cependant l'augmentation croissante et dose - dépendante du taux des protéines totales s'expliquerait par le fait que la présence de xénobiotique à l'intérieur de la cellule stimule la synthèse protéique dont les enzymes et rend compte de la capacité de ces micro-organismes à la métabolisation / détoxification. Ceci est du au fait qu'au moment du contact avec l'insecticide, ce dernier pénètre

dans l'organisme et atteint, plus ou moins rapidement, au niveau cellulaire, les protéines et les enzymes cibles dont il entrave le fonctionnement normal.

Quels sont les mécanismes de détoxification mis au point par les micro-organismes ?

Lorsque les micro-organismes sont soumis à des changements de leur environnement, ils sont stressés. Ce stress peut être intense, et provoque la mort de ces micro-organismes sans que ces derniers n'aient pu réagir particulièrement lorsque leurs enzymes de détoxifications sont déplétées. Il peut aussi être moins intense, permettant alors aux micro-organismes de déployer une batterie de réponses, à travers l'activation de leurs mécanismes de détoxification, afin de lutter, de survivre et dans certains cas, de s'acclimater à ce nouveau paramètre (Lagadic et *al.*, 1997). Les biomarqueurs sont des variations biochimiques, physiologiques, histologiques ou morphologiques, mesurées chez des êtres vivants exposés à des conditions de stress liés à la présence de substances chimiques dans l'environnement (Huggett et *al.*, 1992).

Les biomarqueurs représentent la réponse biologique initiale des microorganismes face à des perturbations ou contaminations du milieu dans lequel ils vivent (Stegeman et *al.*, 1992). Parmi ces biomarqueurs, on peut citer le système glutathion qui est assuré par le glutathion lui-même en présence de plusieurs enzymes qui constituent les éléments essentiels de ce système dont la plus importante est la glutathion S-transférase (GST) qui intervient dans les réactions de conjugaison des électrophiles (Kammenga et *al.*, 2000). Le glutathion est le thiol cellulaire le plus abondant impliqué dans le métabolisme, dans les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes y compris les ROS (Dickinson et Forman, 2002). En interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD, outre son rôle essentiel d'agent réducteur, il intervient également à un second niveau dans la défense anti-radicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion -S- transférase (Barillet, 2007).

Dans notre travail, les fortes teneurs en GSH enregistrées en présence des deux xénobiotiques après 24h, impliquent le déclenchement du système de détoxification. D'un autre côté, et selon Ha et al. (1998) la capture directe des radicaux oxygénés libres (ROL), causée par ces xénobiotiques est assurée par des composés piègeurs de radicaux ou par des systèmes enzymatiques situés au voisinage du lieu de production initiale.

L'attaque radicalaire des membranes provoque des modifications de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (Lawton et Donaldson, 1991). La lipoperoxydation membranaire est une réaction en chaîne qui se déroule en 3 étapes: (1) l'initiation qui correspond à l'attaque d'un acide gras polyinsaturé par un radical libre, (2) la propagation, c'est-à-dire la peroxydation des phospholipides voisins et (3) la réaction cesse lorsqu'une molécule piège les radicaux libres (Coeurdassier, 2001). Cette réaction conduit à la formation de produits cytotoxiques et mutagènes de dégradation des acides gras comme les hydroperoxydes ou le malondialdéhyde (Alpha Jalloh et al, 2009). Le taux de malondialdéhyde (MDA) est souvent utilisé comme un indicateur de la peroxydation lipidique des membranes chez les plantes (Singh et al.2004).

L'augmentation du taux de MDA constaté dans notre travail pourrait être due à la génération de radicaux d'oxygène libre toxiques (Chaoui et al.1997). De plus Ouariti et al. (1997) ont rapporté une diminution significative des acides gras polyinsaturés chez des plantes de tomates après exposition de 17 jours au Cd et au Chrome. Ils ont noté une diminution de l'acide linoléique (18 :2) et de l'acide linoléique (18 :3) et une augmentation de l'acide palmitique (16 :0). Ainsi l'augmentation du taux MDA pourrait être due à la peroxydation des acides linoléique et linoléique.

La mesure du stress oxydatif est généralement réalisée par le suivi des modifications des niveaux d'activité des enzymes (CAT, SOD, etc) et du taux des molécules (GSH, MDA) impliqués dans la défense antioxydante (Torres et al, 2008).

Les systèmes enzymatiques intervenant selon ce mécanisme présentent un fonctionnement en chaîne. Les enzymes impliquées sont la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme cupro- dépendante qui élimine le radical super - oxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène, la glutathion peroxydase (GPX) et la Catalase (CAT), qui éliminent le peroxyde d'hydrogène, la glutathion réductase (GR), qui régénère le glutathion réduit, et la glucose-6-phosphatase (G6-P) qui fournit les liaisons riches en énergie nécessaires au fonctionnement de la chaîne de réactions (Amstad et al., 1991). Ces systèmes sont susceptibles d'usure par l'afflux massif de radicaux libres (Huang et Fwu, 1993).

Parmi les enzymes impliquées dans le système de détoxification, la GST constitue une seconde ligne de défense efficace de nombreuses substances hautement toxiques issues des interactions des espèces réactives de l'oxygène avec les macromolécules cellulaires. Ces enzymes défendent la cellule des effets délétères du stress oxydant (Martin, 2003). Les recherches concernant la métabolisation des pesticides par ces enzymes sont compliquées. En effet, les molécules conjuguées ne sont pas faciles à détecter et à analyser. De plus, l'activité des GST est souvent couplée à d'autres mécanismes de détoxification (Haubourg et amichot, 1998). L'activité GST enregistrée tout au long de notre travail pourrait s'expliquer par le fait qu'aux faibles concentrations, il y a déclenchement des systèmes de détoxification qui pour la plus part sont formés d'enzymes. Ceci permet ainsi à la cellule de tolérer puis de s'adapter aux xénobiotiques se traduisant ainsi par une augmentation de ces enzymes. Cependant, aux fortes concentrations, les systèmes en question sont dépassés et les enzymes sont complètement inhibées (Cho et Park, 2000).

D'un autre côté, nous avons mis en évidence dans notre travail une augmentation de l'activité CAT chez les paramécies traitées par le Bifenazate et l'Indoxacarbe et ce dès les premières heures du traitement, ceci est dû au fait que la CAT est considérée comme une enzyme présentant une réponse claire et rapide de la contamination par les xénobiotiques (Wenning et al., 1988). En effet, l'activité Catalase consiste en une

transformation du peroxyde d'oxygène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire (O₂). Or la production de H₂O₂ est induite par la présence de composés exogènes à l'organisme comme notamment nos pesticides (Brown et al, 2004), ce dérivé réactif de l'oxygène peut entraîner l'oxydation des macromolécules (ADN, Lipides et protéines) (Vlahogianni et al, 2007). La catalase joue un rôle dans la protection de l'organisme contre les dommages du stress oxydant et constitue avec la SOD la première ligne de défense (Ribera et al, 2001). Elle est considérée comme l'un des biomarqueurs les plus sensibles du stress oxydatif, particulièrement vis-à-vis des polluants chimiques dans le milieu aquatique (Regoli et al, 2003). La diminution de l'activité CAT à la fin du traitement pourrait s'expliquer par le niveau accru de ROS résultant de l'exposition des paramécies à des concentrations élevées des deux xénobiotiques.

Aussi, les peroxydases qui sont des hémoprotéines avec un groupement prosthétique héminique sont des oxydo- réductases glycoprotéiques qui catalysent l'oxydation de nombreux composés organiques et inorganiques par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Bergneyer, 1974 ; Farago, 1994). L'activité APX, enzyme très importante dans le système de défense, induit une réponse aux différents traitements chez la paramécie. L'APX protège la cellule contre les dommages oxydatives causés par le H₂O₂ toxique. Dans notre travail, l'augmentation de l'activité APX engendrée par les xénobiotiques testés conforte donc notre hypothèse. Celle-ci réduit le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en eau en utilisant l'ascorbate comme donneur d'électron. Il est recyclé en ascorbate par le biais du GSH comme donneur d'électrons et le Glutathion oxydé (GSSG) est converti en GSH par la NADPH qui dépend de la glutathion réductase. Ainsi la stimulation de cette enzyme traduit bien la mise en place chez les cellules d'un état de tolérance (Asada et Takahashi, 1987; Sbartai, 2008).

Nous savons que les systèmes enzymatiques de détoxification utilisent des molécules d'O₂ pour leur activité, il en est ainsi des mono-oxygenases et des oxydases (Lagadic et al., 1997 ; Bounias, 1999) ceci nous amène à nous poser la question suivante :

Quels sont les effets de ces deux xénobiotiques sur le métabolisme respiratoire?

Sachant que les microorganismes en présence de xénobiotiques, toxines ou composés peroxydés par exemple, ont la capacité de développer un processus de détoxification et que ce processus est d'ordre biochimique (Piccini et al., 1994 ; Masaya et al., 2002). L'hypothèse la plus plausible avancée, est la formation de « **radicaux libres** ». Une première origine des phénomènes radicalaires est la formation initiale de l'anion superoxyde, le plus courant des radicaux oxygénés libres (ROL).

Ainsi nous avons mis en évidence dans notre travail une perturbation du métabolisme respiratoire des micro-organismes traités par les différentes concentrations du xénobiotique étudiées par rapport aux cellules témoins. Au moment de l'élimination du xénobiotique, les électrons produits lors de la détoxification de l'organisme par les mono-oxygénases à cytochromes P450 (Anzenbacher , 2001), vont réagir avec l'oxygène (Guengerich , 1991). L'oxygène peut également réagir avec les électrons qui échappent à la chaîne respiratoire (Cadenas et al., 1977). La combinaison directe de l'oxygène apporté aux cellules avec ces électrons implique la formation d'un anion superoxyde qui est à l'origine des phénomènes radicalaires.

La perturbation de l'activité respiratoire observée dans notre travail montre que les faibles concentrations de Bifenazate et d'Indoxacarbe sont génératrices de stress oxydatif à l'origine de libération de ROS qui sont connus comme éléments perturbateurs du métabolisme respiratoire (Kiss et al ,2003 ; Kuciel et Mazurkiewicz, 2004, Rico et al, 2009). Le rôle majeur de la production endogène de ROS est la régulation de l'activité. En effet, les radicaux peuvent interagir directement avec les molécules contenant des groupements sulfhydryl, et donc le changement de leur conformation. Ce type de régulation peut en particulier affecter les molécules impliquées dans les mécanismes de transduction, comme la protéine kinase C (Dalton et al., 1999).

Parallèlement, les fortes concentrations des deux pesticides provoquent une forte réduction de l'activité respiratoire des cellules étroitement lié à la diminution importante du nombre de paramécies, d'où une forte libération de ROS capable d'interférer avec les composantes de la chaîne respiratoire provoquant ainsi un dysfonctionnement de celle-ci voir son arrêt total aboutissant aux premières phases de l'apoptose. (Benyahia et al , 2004).

Au terme de cette série de résultats, il s'avère que le Bifenazate est moins toxique que l'Indoxacarbe car la toxicité de ce dernier se manifeste dès les faibles doses (20 μ M) alors que pour le Bifenazate elle n'apparaît qu'à partir de 40 μ M et ce pratiquement pour tous les paramètres étudiés dans notre travail. D'un autre côté et d'après les résultats obtenus il semblerait que le Bifenazate affecte le métabolisme respiratoire ce qui conforte l'hypothèse de Van Leeuwen et al., (2006) qui stipulent que ce dernier agirait par le biais d'un autre mode d'action probablement en rapport avec la mitochondrie même s'ils n'ont pas été en mesure de démontrer *in vitro* l'inhibition des complexes I/II et III/IV.

En dernier lieu, nous avons complété notre étude par une évaluation du risque qui vient conforter nos résultats confirmant d'une part la toxicité plus élevée de l'Indoxacarbe par rapport au Bifenazate et ce par la détermination de LOEC, NOEC et le IR et d'une autre part l'intégration de ces xénobiotiques dans les différents écosystèmes.

En conclusion, et après avoir examiné toutes les données expérimentales obtenues tout au long de notre étude, il s'avère que le protiste cilié utilisé dans notre travail constitue un matériel de choix pour les études en toxicologie, et occupe une position privilégiée dans les écosystèmes aquatiques car il est l'un des éléments de base des réseaux trophiques d'où la nécessité d'une profonde étude de l'impact des polluants sur notre environnement.

Nos résultats nous ont permis de conclure que les xénobiotiques testés sont cytotoxiques. Cette toxicité se manifeste par la perte de linéarité de la trajectoire et de la mobilité suivie d'une inhibition de la croissance cellulaire ainsi qu'une diminution du temps de dédoublement et une augmentation du nombre de division laissant suggérer un possible effet carcinogène.

Au niveau intracellulaire, nous avons mis en évidence une perturbation des macromolécules (lipides, glucides, protéines), une augmentation du taux de GHS et des enzymes impliquées dans la détoxification (GST, CAT, APX) ainsi qu'une éventuelle peroxydation lipidique via l'augmentation du taux de MDA.

D'un autre côté, nos résultats ont mis en évidence une perturbation du métabolisme respiratoire confirmant ainsi l'effet de ces molécules sur la chaîne respiratoire mitochondriale citée dans la bibliographie.

La dernière partie qui consiste en une évaluation du risque, nous a permis de mieux comprendre les interactions qui pouvaient exister entre les xénobiotiques testés et l'organisme utilisé ainsi qu'avec les différents écosystèmes (sol, eau, air).

L'ensemble des résultats obtenus dans notre travail comparé à ceux rapportés dans la littérature nous permettent de suggérer l'hypothèse suivante :

La présence des deux xénobiotiques conduirait à (Fig. 29):

- Une altération de la forme des cellules, par le développement de boursoufflures irrégulières sur la membrane cellulaire, ce qui conduit à la lyse cellulaire.
- Une série de modifications comportementales ainsi qu'une importante désorganisation du contenu cytosolaire (rupture des membranes des vacuoles contractiles provoquant le mélange de leur contenu avec le protoplasme), parallèlement à une fragmentation et une désintégration du macronoyau.
- Modifications du comportement locomoteur et changement de la trajectoire des paramécies avec apparition du phénomène du "Backward swimming" (nage vers l'arrière).
- Attaque des lipides membranaires (peroxydation des lipides "MDA") générant des ROS (H_2O_2). La stimulation de la synthèse des protéines est traduite par l'induction de plusieurs systèmes de détoxifications : (APX, CAT, GST et GSH) ; ces derniers se chargeraient du captage des ROS et leurs inactivation. Ajouté à cela et toujours dans cette optique, les ROS générés pourraient agir sur les organites subcellulaires tels que les mitochondries en inhibant la respiration. Cette inhibition serait la conséquence d'un découplage de la phosphorylation oxydative chez les mitochondries.

Références bibliographiques

A

Abbott W.B. ; 1925 . A methode for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. , 18 pp 265 – 267

Agritox^R, 2007. Banque de données- Département de phytopharmacie et d'écotoxicologie de l'I.N.R.A.

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

Al-Mutairi D.A., Craik J.D., Batinic-Haberle I., Benov L.T., 2007. Induction of oxydativ cell damage by photo-treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. Free radical research, 41, 89-96.

Alpha Jalloh M., Chen J., Zhen F., Zhang G., 2009. Effect of different N fertilizer forms on antioxydant capacity and grain yield of rice growing under Cd stress. Journal of Hazardous materials, 162, 1081-1085.

Ammar W.B., Nouari I., Zarrouk M., Ghorbel M.H., Jemal F., 2008. Antioxydative response to cadmium in roots and leaves of tomato plants. Biologia Plantarum, 52 (4) 727-731

Amstad P., Peskin A., Shah G., Mirault M.E., Moret R., Zbinden I. and Cerutti P. ; 1991. The balance between Cu-Znsuperoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. Biochemistry, 30, 9305-9313.

Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A., 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry, 70 (2): 200-214.

Anzenbacher P., 2001. Cytochromes P450 and metabolism of scenobiotics - ReviewCMLS. Cell. Mol. Life Sci., 58: 737-747.

Arrigo A.P.; 1999. Gene expression and the thiol redox state. Free Rad. Biol. Med. 27: 936-944.

Asada K. et Takahashi M. ,1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis.In: Kyle, D.J., Osmond, C.J., Arntzen, C.J(Eds), Photo inhibition: topics in Photosynthesis. Elsevier, Amsterdam, p.227.

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

B

Barata C., Navarro J.C., Arun S., Porte C., Varo I., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140 175–186.

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

Beal D.L. ; Anderson R.V. ; 1993. Response of Zooplankton to rotenone in a small pond. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51 : 551-556.

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

Bebianno M.J., Company R., Serafim A., Cosson R.P., Fiala-Medoni A., 2005. Antioxydant systems and lipid peroxydation in *Bathy-modiolusazoricus* from Mid-Atlantic ridge hydrothermal vent fields. *Aqua. Toxicol*, 75, 354-373.

Bensoltane S., Khaldi F., Djebbar H. and Djebbar M.R., 2005. Toxicity of the ammonium nitrate $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ on the respiratory metabolism of three biological models: *Paramecium*, Mosses and lichens . *Comm .Appl .Biol, Sci, Ghent University*, 70/4.

Benyahia S., Benayache S., Benayache F., Quintana J., Lopez M., Leon F., Hernandez J.C., Estévez F. and Bermejo J. , 2004 . Isolation from *Eucalyptus occidentalis* and identification of a new Kaempferol derivative that induces apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Journal of Natural Products*, Vol, 67 , Nbr 4.

Bergmeyer, U., 1974. Methods of enzymatic analysis Ed. Verlag. Chimie GmbH Weinheim. Vol 1, 494 – 495 et 684 – 690.

Bernal J. , Ruvalacaba . S. ,1995. Pharmacological prevention of acute lead poisoning in *Paramecium*. *Toxicology* 108 ,165-173.

Berrebah H. , 1990. Etude du contrôle de la mobilité flagellaire et ciliaire par le Calcium. Effet du Lindane, insecticide organochloré. Thèse de Doctorat de l'université Denis Diderot. Paris VII : 144.

Bonnet J.L., Guiraud P., Dusser M., Kadri M., Lafosse J., Steiman R., Bohatier J., 2005. Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and selected micromycetes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60 :87 –100.

Bounias M.; 1999. Traité de Toxicologie Générale, Edition Springer, pp: 58-583.

Bradford M.; 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72:248-54. [développement initial de la méthode au bleu de Coomassie].

Brown P.J., Long S.M., Spurgeon D.J., Svendsen C., Hankard P.K., 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphère*, 57, 1675-1681.

C

Cadenas E., Boveris A., Ragan C.I. and Stoppani A.O.M.; 1977. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinolcytochrome c reduction from beef heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 180, 248-257.

Cakmak, I., et Horst, W.J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant* 83: 463-468.

Calvet R.; 1983. Absorption of organic chemicals in soils. *Environmental Health Perspectives*. 85: 145-177.

Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M., Gallo G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, 46 67-76.

Castronovo V., 2003: Alimentation et cancer. *Rev Med Leig*, 58: 231-239.

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

Chaoui A., Mazoudi S., Ghorbal M.H., Ferjani E.E.L. , 1997. Cadmium and Zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Science* 127,139-147.

Cho, U.H., Park, J.O., 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science* 156: 1-9.

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

Coeurdassier M., 2001. Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helmix aspersa*) et aquatiques (*Lymnia stagnolis* et *lymnia palustris*) comme

indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques. Thèse de doctorat , Université de franche comté, France, 281p.

Cossu C., Doyotte A., Babut M., Exinger A., Vasseur P.,2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45: 106-121.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, H.C., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38: 122-131.

Cudmore Larison, David & Charles, Newton Abbot; 1977. The Center of Life, A Natural History of the Cell.

D

Dagnelie Pierre. , 1975. Théorie et Méthodes statistiques , Application agronomiques. Les méthodes de l'inférence statistique, Volume II. Les presses agronomiques de Gembloux.

Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 67-101.

Dekeyser, M.A., McDonald, P.T., 1994. Insecticidal phenylhydrazine derivatives, US Patent US 5367093.

Dekeyser, M.A., McDonald, P.T., Angle Jr., G.W., Moore, R.C., 1996.D2341-a novel agent to control spider mites. In Proceeding of the Brighton Crop Protection Conference— Pests and Diseases, BCPC,Farnham, Surrey, UK, pp. 487–492.

Dekeyser, M., 2005. Acaricide mode of action. *Pest Manage. Sci.* 61, 103–110.

Dias N. ; Mortara R.A. ; Lima N. ; 2003 . Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100. *Toxicology in vitro* : 1- 9.

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

Dixit V., Pandey V., Shyam R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad).- *J.exp. Bot.* 52 , 1101-1109.

Djebar M.R et Djebar H., 2000. Bioénergétique ,les mitochondries végétales. Revue des sciences et technologies. Synthèse: publication de l'université de Annaba. Edition Végator: p103

Doyotte A, Cossu C, Jacquin M-C, Babut M, Vasseur P., 1997: Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquat. Toxicol. 39: 93-110.

Draper H.H. et Hadley M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Meth. Enzymol, 186, 241-431.

Druez D., Marano F., Calvayrac R., Volochine B. and Soufir J.C.; 1989. Effect of gossypol on the morphology, mobility and metabolism of a flagellated protist, *Dunaliella bioculata*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 21(2): 367-374.

Dubey R.C et Dwividi R.C. ; 1988 . Effect of heavy metals on growth and survival of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, Biology and fertility of soils.n°6, pp311-314.

Duchateau G. et Florkin M.; 1959. Cent manipulations biochimiques simples. Edition Masson.

Ducrot, 2005. Thèse de doctorat: Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques:perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques, Université de Metz.

E

El-Wakil H.B., Radwan M.A., 1991: Biochemical studies on the terrestrial snail *Eobania vermiculata* (Muller) treated with some pesticides. J.Environ.sci.Health, B26, 479-489.

F

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

Farago, E.M., 1994. Plant and Chemical Elements : Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity Ed. VCH. 32-231.

Favier, A., 2003: Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Review. L'actualité chimique , novembre, pp 108-115

Faurie C. et Ferra A. ; Medori P. ; Devaux J. ; 1999 : Ecologie : Approche scientifique et pratique. 4^{ème}Ed., Lavoisier TEC & DOC, pp: 298-300.

Finney D.J. , 1971 : Probits analysis, 3rd ed. , Cambridge University Press, London.

Firn R.; 2003: Strategies for the control of Pest and Diseases. M. 730 Lecture 4, University of York.

Foyer, C.H., Noctor, G., 2000: Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. New Phytologist 146: 359-388.

Friedl P, Wolf K. , 2003 : Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms, Nat. Rev. Cancer 3 : 362–374.

G

Gallego S.M., Benavides M., Tomaro M.,2002: Involvement of antioxidant defense system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. Plant Growth Regul 36: 267-273.

Gangbazo S, pesand AR, Barnett G, Charuest JP and Clins D, 1995: Water contamination by ammonium nitrogen following the spreading of hog manure and mineral fertilizers . Journal of enviromental quality, 24 (3): 420-425.

Gaujous D., 1995:La pollution des milieux aquatiques : aide mémoire. 2^{ème} édition. Edition TEC et DOC :59-62-125-140.

Génoscope; 2007: Centre National de Séquençage. France.

Goldsworthy G.J.; Mordue W. and Guthkelch J.; 1972. Studies on insect adipokinetic hormones. Gen. Comp.Endocrinol. 18: 545-551.

Gonzalez- Martin A., Diaz S., S Borniquel S., Gallego A., Gutiérrez J.C. ,2006. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban waste water treatment plants. Research in Microbiology 157.108–118

Gräf F. and Stahr K.; 1999. A Soil and Terrain Map of SW-Niger (NiSOTER). In: Atlas of Benin and Niger.

Grara N, 2011. Thèse de doctorat. Evaluation de la toxicité du Cadmium et des rejets métalliques industriels chez un gastéropode pulmoné: *Helix aspersa*. Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 120p

Grara N., Berrebbah H., Rouabhi R., Djebbar M.R. , 2009. Impact of pollution by industrial metallic dust on bio- accumulator organism *Helix aspersa*. *Global veterinaria* 3(4): 276-280.

Grosscurt, A.C., Avella, L., 2005. Bifenazate, a new acaricide for use on ornamentals in Europe and Africa. Proceeding of the BCPC ,International Congress—Crop Science and Technology, pp. 49–56.

Guelfi A.; Azevedo Ricardo A.; Lea Peter J. and Silvia M.G. Molina; 2003. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by Cadmium: an antioxydant enzyme approach. *J.Gen. Appl . Microbiol.*, 49, 63-73.

Guengerich F.P.; 1991. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. Minireview. *J. Biol Chem.*, 266, 10019-10022.

H

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

Haacke-Bell B. , Hohenberger-Bregger R., Plattner H., 1990. Trichocysts of *Paramecium*: Secretory organelles in search of their function, *Eur. J. Protistol.* 25: 289–305.

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

Halliwell B., Chirico S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(suppl), 715S-725S.

Haubruge E., Amichot M. (1998). Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2 (3), 161–174

Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* Oct; 31(4):273–300

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

Huggett R.J., Kimerie P.M., Mehrle JR & Bergman H.L., EDS.; 1992. Biomaekers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Fla., Lewis Publishers, pp: 347.

I

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

J

Jaeschke H.; 1995. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 209, 104-111.

Jamet P.; 1983. Le Comportement des Produits Agro pharmaceutiques dans le Sol. Phytatrie-Phytopharmacie. 28: 87-122.

Juchelka C.M., Snell T.W., 1995. Rapid toxicity assessment using ingestion rate of Cladocerans and Ciliates. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 28: 508-512.

K

Kammenga J.E., Dallinger R., Donker M.H., Kohler H.R., Simonsen V., Triebkorn R. and Weeks J.M.; 2000. Biomarkers in terrestrial for ecotoxicological soil risk assesment. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Vol 164. G. W. Ware Edition. 175 Fifth Ave/New York/NY 10010, Springer-Verlag. 93-147.

Kamola Z., 1992. Toxicity of Fastac 10 EC, a pyrethroid insecticide to Paramecium primaurelia and Tubifex sp. Folia Biol (Krakow). 40(3-4): 109-112.

Kamola Z., 1995. Notes on the Use of Invertebrates,espacially Ciliates, in Studies on Pollution and Toxicity.Folia biologica(Krakow), vol 43, No 1-2.

Kampfenkel K., Van Montagu M., Inze D., 1995. Effects on iron excess on Nicotiana plumbaginifolia plants. Plant Physiol. 107 (1995) 725-735.

Khaldi F., Djebbar H., Rouabhi R. and Djebbar M.R., 2009. Cellular response of a pollution bioindicator model (Ramalina farinacea) following treatment with fertilizer. American- Eurasian Journal of toxicologic sciences 1 (2): 69-73.

Kim S.S., Seo S.G., 2001. Relative toxicity of some acaricides to the Predatory mite, Amblysei us womersleyi and the two spotted spider mite, Tetranychus urticae (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). Appl. Entomol. Zool. 36, 509–514.

Kim, S.S., Yoo, S.S., 2002. Comparativetoxicity of some acaricides to the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* and the twospotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biocontrol* 47, 563–573

Kiss S.A., Varga I.S., Galbacs Z., Maria T.H. and Csikkel -Szolnoki A. , 2003. Effect of age an magnesium supply on the free radical and antioxydant content of plants. *Acta Biologica Szegediensis*, Vol.47 (1-4), pp, 127-130.

Klauke N., Blanchard M.P., Plattner H., 2000. Polyamine triggering of exocytosis in paramecium involves an extracellular Ca^{+2} /(polyvalent cation)-sensing receptor, subplasmalemmal Ca- store mobilization and store- operated Ca^{+2} -Influx via unspecific cation channels, *J. Membr. Biol.* 5:141–156.

Klein, J.A. and Ackerman, S.L., 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 111 : 785- 793.

Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reaction, and methods for their quantification. *Toxicol pthol*, 30: 620-650.

Kuciel R. and Mazurkiewicz A. , 2004. Formation and Detoxification of reactive oxygen species.*Biochemistry and Molecular Biology Education*, Vol.323, pp, 183-186.

L

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

Lavergne M.; 1985. Etude des effets du Diapézan et du Médazépan sur un protiste cilié.M&moire de D.E.A. de l'université de Paris VII, pp : 46.

Lawton L.J.et Donaldson W.E., 1991. Lead- induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxydation. *Biol .Trace Elem. Res*, **28**, 93-97.

Liebig M. , Schmidt G. , Bontje D. , Kooi B.W. , Streck G., Traunspurger W. Knacker T., 2008 . Direct and indirect effects of pollutants on algae and algivorous ciliates in an aquatic indoor microcosm. *Aquatic Toxicology* 88 , 102–110.

Luna, C.M., Gonzalez, C.A., Trippi, V.S., 1994. Oxidative damage caused by excess copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35, 11–15.

M

Madoni P.; 2000. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environnement pollution*, 109(1) : 53-59.

Manduzio H.; Rocher B., Durand F., Galap C., Leboulenger F. 2005. The point about oxidative stress in molluscs. ISJ 2: 91-104.

Marano- Lebaron F. and Izard, C. ; 1970. Effets de l'acroléine sur les cellules végétales. Société de Botanique Française. Pp.327-332.

Martin Florent. 2003. Thèse d'état en Immunologie: VANIN-1, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. centre d'immunologie de Marseille - Luminy, INSERM U136 - CNRS UMR6102 - Université de la Méditerranée.

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

McCann S.F, Annis G.D., Shapiro R., Piotrowski D.W., Lahm G.P., Long J.K., 2001. The discovery of indoxacarb: oxadiazines as a new class of pyrolozoline-type-Insecticides. Pest Management Sci.

Mediouni C., Ben Ammar W., Houlné G., Chabouté M.E., Jemal F., 2009. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxydative reponse in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. Plant Growth Regul, 57 89-99.

Meister, A., 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. J Biol Chem **263**: 17205–17208

Meneghini R.; 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. Free Radic. Biol. Med., 23, 783-792.

Morin, D., Zini, R., Tillement, S.P., Burdeau, A., 2004. Prevention of cell damage in ischemic-reperfusion: mitochondrial respiratory chain as a pharmacological target. Letters in drugs & Discovery, 1: 279-284.

N

Nakano Y. Azada K., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiol. 28, 131-140.

Narahashi T. ; 2001. Recent progress in the mechanism of action of insecticides: pyrethroids, fipronil and indoxacarb. J Pesticide Sci ;26:277–85.

Noboru Takiguchi., Takahisa Tajima, Kosei Asayama, Tsukasa Ikeda, Akio Kuroda, Junichi Kato and Hisao Ohtake, 2002. Behavioral Responses of the

Ciliated Protozoan *Paramecium caudatum* to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Its Analogues. Journal of bioscience and bioengineering ,Vol. 93, No. 4, 416~20.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathion: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology 49, 249-279.

Nola M., Njiné T., Foto S.M. , Kemka N. , Zébazé S.H. , Nguedji J.B.T. & Bouetou T.B., 2003 . Utilisation des protozoaires ciliés (*Paramecium africanum*, *Colpidium uncinatum*, *Neobursaridium gigas*) pour l'épuration bactériologique des eaux polluées en microcosme. TROPICULTURA, 21, 2, 73-78.

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

P

Packer L., Witt E.H. and Tritschler H.J.; 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radic. Biol. Med., 19, 227-250.

Padjama M.B., Rao; 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen and protein content in tissues of the freshwater snail, *Bellamya dissimilis* (Muller), bull. environ. contam. toxicol, 53, 142-148.

Pampanin D.M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C., 2005. Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Venice Lagon (Italy). Mar. Pollut, 50, 1548-1557.

Pascal, S., Scalla R., 1999. Purification and characterization of a safener-induced glutathione *S*-transferase from wheat (*Triticum aestivum*). Physiol Plant 106: 17-27

Patra J., Panda B.B., 1998. A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedling of barley, *Hordeum vulgare* L. Environ.Pollut.101, 99-105.

Perez-Rama M., Abalde A.J., Herrero L.C. and Torres E.; 2001. Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (KYLIN) BUTCH. Environmental Toxicology and Chemistry, 20(9): 2061-2066.

Perrier R. ; Auffrer Van Der Kemp T. ; Zouszain F. ; 1997 . Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques. Edition Doin, pp : 272-280.

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

Plaisance, K.L., Gronwald, J.W., 1999. Enhanced catalytic constant for glutathione S-transferase (atrazine) activity in an atrazine-resistant *Abutilon theophrasti* biotype. *Pest Biochem Physiol* **63**: 34-49.

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

Prasad K.V.S.K., Saradhi P.P., Sharmila P., 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environ.Exp. Bot.* 42: 1-10.

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

R

Radwan M.A., El-Wakil H.B., Osman K.A., 1992. Toxicity and biochemical impact of certain oxime carbamate pesticides against terrestrial snail, *Theba pisana* (Muller). *Journal Environ.Sci. Health*, B27 (6), 759-773.

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

Ramade F., 1995 . *Eléments d'écologie, écologie appliquée.* 5^{ème} édition. Ediscience International, pp:183-231.

Rao V.J., Arepalli S.K. , Gunda V.G. , Bharat Kumaret J., 2008. Assessment of cytoskeletal damage in *Paramecium caudatum*: An early warning system for apoptotic studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 91: 75–80.

Rao V.J., Gunda V.G., Srikanth K., Arepalli S.K., 2007. Acute toxicity bioassay using *Paramecium caudatum*, a key member to study the effects of monocrotophos on swimming behaviour, morphology and reproduction. *Toxicol. Environ.* 89(1) DOI-10 1080102772240601010071.

Rao V.J., Srikanth K., Arepalli S.K., Gunda V.G., 2006. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86 (2006) 131–137.

Reade, J.P.H., Belfield J. L., Cobb A.H. 1999. Rapid tests for herbicide resistance in black-grass based on elevated glutathione S-transferase activity and abundance. Brighton crop protection conference: weeds. Proceedings of an international conference, Brighton, UK, 15-18 November, **1**: 185-190

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

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

Regoli F. and Principato G. 1995. Glutathione, glutathione- dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: Implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31: 143-164.

Regoli F., Winston G.W., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi I., 2003. Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European *Anguilla anguilla*. *Environ Toxicol Chem*, 22, 2120- 2129.

Ribera D., Narbonne J.F., Arnaud C., Saint-Denis M., 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biol.Biochem*, 33, 1123 -1130.

Rico D., Martin-Gonzalez A., Diaz S., de Lucas P., Gutiérrez J.C. , 2009. Heavy metals generate reactive oxygen species in terrestrial and aquatic ciliated protozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149 ,90–96

Rijstenbil, J.W., Sandee, A., Vandrie, J., Wijnholds, J.A., 1994. Interaction of toxic trace metals and mechanisms of detoxification in Planktonic diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana*. *FEMS Microbial. Rev.*14:387-396.

Rodier J. et al. ; 1996. Analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer., 8 édition. Edition Dunod : 723-729-1321-1324

Roméo, M., Bebbani, N., Gnassia Berelli, M., Lafaurie, M., Givard, J.P., 2000. Cadmium and copper display different response towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.* 48: 185-194.

Rouabhi R., Berrebbah H., Djebbar M.R., 2006. Toxicity evaluation of Flucycloxuron and diflubenzuron on the cellular model, paramecium sp. *Afr.J. Biotechnol.* 5(1): 45-48.

Rucinska R., Waplak S., Gwozoz E.A., 1999. Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 187-194.

S

Salama A.K, Osman K. A., Saber N.A., Soliman S.A., 2005. Oxidative stress induced by different pesticides in the land snails, *Helix aspersa*. Pakistan journal of biological science, 8(1), 92-96.

Samworth M. et Morgan M., 2000 . Article on pond life : Paramecium. MISCAP Article : Paramecium, Text by MIKE SAMWORTH, images by MIKE MORGAN. Dec.95 Updated by the MISCAP Editor April 2000.

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

Sbartai I , Berrebbah H., Rouabhi R., Sbartai H., Djebbar M.R., 2009. Behavior of *Paramecium* sp, Treated with Bifenazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. American-Eurasian Journal of toxicologic sciences 1 (1): 13-18.

Sbartai H., Rouabhi R., Sbartai I., Berrebbah H., Djebbar M.R., 2008. Induction of anti-oxidative enzymes by cadmium stress in tomato (*Lycopersicon esculentum*). African Journal of Plant Science Vol. 2: 8 :72 – 76.

Sbartai, 2008: Thèse de Doctorat : Etude des effets du Cadmium sur la Tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) : essai in vivo et in vitro Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 86 p.

Sbartai I, 2005: Thèse de Magistère : Modifications physiologiques et biochimiques observées chez un modèle cellulaire : *Paramecium* sp soumis à un traitement au cadmium. Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 86 p.

Servais, S., 2004. Altération mitochondriale et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: Effets de l'age et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse doctorat, Université Claude bernard- Lyon 1, France, pp. 19-35.

Schelling G.T., Roeder R.A., Garber M.J. and Pumfrey N.M.; 1995. Bioavailability and interaction of vitamin A and vitamin E in ruminants. J. Nutr., 125, 1799S-1803S.

Sies H.; 1999. Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic. Biol. Med. 27: 916-921.

Silver K.S. and Soderlund D.M., 2006: Differential sensitivity of rat voltage-sensitive sodium channel isoforms to pyrazoline-type insecticide; Toxicology and Applied Pharmacology 214 (2006) 209–217.

Singh S., Sinha S., Saxena R., Pandey K., Bhatt K., 2004. Translocation of metals and its effects in the tomato plants grown on various amendments of tannery waste: evidence for involvement of antioxidants. *Chemosphere* 57, 91-99.

Shibko S., Pangborn J. and Tappel L.A. ; 1966. Studies on the release of lysosomal enzymes from kidney lysosomes. *J. Cell. Biol.*, 25, 479-483.

Squiban-Baeza A., Marano F, Ronot X., Adolphe M., and Puiseux-Dao S., 1987. Effects of Deltamethrin and its commercial formulation DECIS on different cell types in vitro: cytotoxicity, cellular binding and intracellular localization. *Pest. Biochem. Physiol.*28:103-113.

Stegeman J.J., Brouwer M., Diguiulio R.T., Frlin L., Fowler B.A., Sanders B.M. and Van Veld P.A.; 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.* Lewis Publishers, pp: 235-335.

Stephensen E., Svavarsson J., Sturve J., Ericson G., Adolfsson-Erici M., Forlin L., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol*, 48, 431-442..

Sugiyama S., Tsurubuchi Y., Karasawa A., Nagata K., Kono Y., Shono T. ,2001. Insecticidal activity and cuticular penetration of indoxacarb and its N-decarbomethoxylated metabolite in organophosphorus insecticide-resistant and susceptible strains of the housefly, *Musca domestica* (L.). *J Pesticide Sci* ;26: 117–20.

Swaroop S., Gilroy A.B., Uemura K., 1966. Statistical methods in Malaria eradication. World Health Organisation , Geneva.

T

Torres M.A. , Barros M.P., Campos S.C.G. , Pinto E. , Rajamani S., Colepicolo P., Sayre R. T., 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 1–15

Torres M.A., Testa C.P., Gaspari C., Masutti M.B., Panitz C.M.N., Curi-Pedrosa R., Almeida E.A., Mascio P.D., Filho D.W., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull* 44, 923-932.

Trielli F., Amaroli A., Sifredi F., Marchi B., Falugi C., Delmonte Corrado M.U., 2007. Effects of xenobiotic compounds on the cell activities of *Euplotes crassus*, a single-cell eukaryotic test organism for the study of the pollution of marine sediments. *Aquatic Toxicology* 83:272–283

Tripathi B.N., Metha S.K., Amar A., Gaur J.P., 2006. Oxidative stress in (*Scenedesmus sp.*) during short- and long-term exposure to Cu^{+2} and Zn^{+2} . *Chemosphere* 62, 538–544.

U

Ujwala Garad, Shanti N. Desai and Prakash V. Desai. ,2007. Toxic effects of monocrotophos on *Paramecium caudatum*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (19), pp. 2245-2250.

V

Van Leeuwen T., Tirry L. , Nauen R., 2006. Complete maternal inheritance of bifentazate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and its implications in mode of action considerations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 ,869–877.

Vlahogianni T. , Dassenkis M., Scoullou M.J., Valavanidis A. , 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 54, 1361-1371.

W

Weckx, J., et Clijsters H. 1996. Oxidative damage and defense mechanism in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiol. Plant.* 96, 506-512.

Weeckbeker G. and Cory J.G.; 1988 . Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted *Mopuse leukameia* L1210 Cells in vitro, 40, 257-264.

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

Wichterman N.R.; 1953. *The Biology of Paramecium. Blakiseon (Pa), 527 p.*

Wenning R.J., Di Giulio R.T., Gallaghe E.P., 1988. Oxidant mediated biochemical effects of paraquat on the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. *Aquat. Toxicol.* 12: 157-170.

Wing K.D., Schnee M.E., Sacher M., Connair M., 1998. A novel oxadiazine insecticide is bioactivated in lepidopteran larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* 1998;37:91–103.

Wing K.D., Andalaro J.T., McCann S.F., Salgado V.L., 2004. Indoxacarb and The sodium channel blocker insecticides: chemistry, physiology and biology in insects. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS ,editors. *Comprehensive molecular insect science*. Oxford: Elsevier;. 31–53.

Wong C.K. ; Cheung ; Ming-Ho Yo.; 1999. Toxicological assesment of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunalliella tertiolecta*. *Environmental pollution*, 105 : 175-183.

Y

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

Z

Zhao X, Nagata K, Marszalec W, Yeh JZ, Narahashi T., 1999. Effects of the oxadiazine insecticide indoxacarb, DPX-MP062, on neuronal nicotinic acetylcholine receptors in mammalian neurons. *Neurotoxicology* ; 20: 561–70.

Zhao JZ, Li YX, Collins HL, Gusukuma-Minuto L, Mau RF, Thompson GD, et al. 2002. Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *J Econ Entomol* ; 95: 430–6.

Statistiques

Croissance cellulaire:

Indoxacarbe:

ANOVA à deux facteurs contrôlés : CROIS en fonction de temps; [c]

Analyse de variance pour CROIS

Source	DL	SC	CM	F	P
temps	5	0,2023000	0,0404600	467,45	0,000
[c]	4	0,1003282	0,0250820	289,78	0,000
Interaction	20	0,0236010	0,0011801	13,63	0,000
Erreur	60	0,0051933	0,0000866		
Total	89	0,3314225			

Enregistrement du fichier sous : C:\Documents and Settings\Sbartai\Bureau\minitab\P8C.MPJ

Bifenazate

ANOVA à deux facteurs contrôlés : CROI en fonction de T; [C]

Analyse de variance pour CROI

Source	DL	SC	CM	F	P
T	5	0,2129168	0,0425834	542,31	0,000
[C]	4	0,0658304	0,0164576	209,59	0,000
Interaction	20	0,0272859	0,0013643	17,37	0,000
Erreur	60	0,0047113	0,0000785		
Total	89	0,3107444			

Paramètres biochimiques:

Les métabolites:

Indoxacarbe:

Protéine

ANOVA à un facteur contrôlé : C1; C2

Analyse de variance

Source	DL	SC	CM	F	P
Facteur	1	38.53	38.53	34.79	0.000
Erreur	28	31.01	1.11		
Total	29	69.54			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcarType	
C1	15	0.733	0.269	(-----*-----)
C2	15	3.000	1.464	(-----*-----)

Ecart-type groupé = 1.052

-----+-----+-----+-----
1.0 2.0 3.0

Lipides

ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	4	32.08697	8.02174	2063.91	0.000
Erreur	10	0.03887	0.00389		
Total	14	32.12584			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcarType		
1	3	4.9900	0.0458		(*
2	3	3.2467	0.0208		(*)
3	3	1.5067	0.0850	(*	
4	3	1.1133	0.0961	*)	
5	3	1.4833	0.0208	*)	

Ecart-type groupé = 0.0623

1.2 2.4 3.6 4.8

Glucides

ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	4	606.92	151.73	60.53	0.000
Erreur	10	25.07	2.51		
Total	14	631.98			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcarType		
1	3	130.29	1.66	(--*--)	
2	3	130.33	1.63	(--*--)	
3	3	132.00	2.29	(--*--)	
4	3	134.13	1.18	(---*--)	
5	3	147.20	0.70		(--*--)

Ecart-type groupé = 1.58

132.0 138.0 144.0

Bifenazate:

Protéines :

ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	4	0.610589	0.152647	726.20	0.000
Erreur	10	0.002102	0.000210		
Total	14	0.612691			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcarType		
1	3	0.56700	0.00819		(*)
2	3	0.57733	0.01358		(*)
3	3	0.65567	0.00577		(*)
4	3	0.92700	0.02443		(*)
5	3	0.29667	0.01301	(*)	

Ecart-type groupé = 0.01450

0.40 0.60 0.80

Lipides

ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	4	38.90087	9.72522	6990.52	0.000
Erreur	10	0.01391	0.00139		
Total	14	38.91478			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcarType	
1	3	4.9900	0.0458	(*
2	3	5.1467	0.0503	(*
3	3	5.2967	0.0153	*)
4	3	1.0987	0.0210	
5	3	3.2360	0.0406	*

Ecart-type groupé = 0.0373

1.2 2.4 3.6 4.8

Glucide:

ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	4	922.892	230.723	239.62	0.000
Erreur	10	9.629	0.963		
Total	14	932.521			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcarType	
1	3	130.293	1.662	(-*-)
2	3	137.987	0.857	(-*-)
3	3	145.673	0.494	(-*-)
4	3	122.600	0.582	(-*-)
5	3	137.987	0.857	(-*-)

Ecart-type groupé = 0.981

126.0 133.0 140.0

Les enzymes:

Indoxacarbe:

ANOVA à deux facteurs contrôlés : APX en fonction de [C]; TPS

Analyse de variance pour APX8

Source	DL	SC	CM	F	P
[C]	4	0,0000000	0,0000000	5,04	0,013
TPS	3	0,0000000	0,0000000	18,54	0,000
Erreur	12	0,0000000	0,0000000		
Total	19	0,0000000			

ANOVA à deux facteurs contrôlés : CAT en fonction de [C]; TPS

Analyse de variance pour CAT8

Source	DL	SC	CM	F	P
[C]	4	0,0000008	0,0000002	5,91	0,007
TPS	3	0,0000001	0,0000000	1,53	0,257
Erreur	12	0,0000004	0,0000000		
Total	19	0,0000013			

ANOVA à deux facteurs contrôlés : GST en fonction de [C]; TPS

Analyse de variance pour GST8

Source	DL	SC	CM	F	P
[C]	4	1,0658	0,2664	3,20	0,053
TPS	3	3,0824	1,0275	12,32	0,001
Erreur	12	1,0004	0,0834		
Total	19	5,1485			

ANOVA à deux facteurs contrôlés : GSH en fonction de [C]; TPS

Analyse de variance pour GSH8

Source	DL	SC	CM	F	P
[C]	4	0,0000000	0,0000000	4,27	0,022
TPS	3	0,0000000	0,0000000	11,05	0,001
Erreur	12	0,0000000	0,0000000		
Total	19	0,0000000			

ANOVA à deux facteurs contrôlés : MDA C3 en fonction de C1; C2,

Analyse de variance pour C3

Source	DL	SC	CM	F	P
C1	3	10,8677	3,6226	139,42	0,000
C2	4	16,4409	4,1102	158,19	0,000
Erreur	12	0,3118	0,0260		
Total	19	27,6204			

Bifenazate:

ANOVA à deux facteurs contrôlés : APX en fonction de [C]; TPS

Analyse de variance pour APX9

Source	DL	SC	CM	F	P
[C]	4	0,0000000	0,0000000	1,32	0,319
TPS	3	0,0000000	0,0000000	2,13	0,149
Erreur	12	0,0000000	0,0000000		
Total	19	0,0000000			

ANOVA à deux facteurs contrôlés : GST en fonction de [C]; TPS

Analyse de variance pour GST9

Source	DL	SC	CM	F	P
[C]	4	0,3847	0,0962	1,45	0,278
TPS	3	0,8557	0,2852	4,29	0,028
Erreur	12	0,7972	0,0664		
Total	19	2,0376			

ANOVA à deux facteurs contrôlés : CAT en fonction de [C]; TPS

Analyse de variance pour CAT9

Source	DL	SC	CM	F	P
[C]	4	0,0000006	0,0000002	2,04	0,152
TPS	3	0,0000011	0,0000004	4,53	0,024
Erreur	12	0,0000010	0,0000001		
Total	19	0,0000027			

ANOVA à deux facteurs contrôlés : GSH en fonction de [C]; TPS

Analyse de variance pour GSH9

Source	DL	SC	CM	F	P
[C]	4	0,0000000	0,0000000	1,15	0,381
TPS	3	0,0000000	0,0000000	7,43	0,005
Erreur	12	0,0000000	0,0000000		
Total	19	0,0000000			

ANOVA à deux facteurs contrôlés : MDA C3 en fonction de C1; C2,

Analyse de variance pour C3

Source	DL	SC	CM	F	P
C1	3	17,2395	5,7465	107,64	0,000
C2	4	17,9946	4,4987	84,27	0,000
Erreur	12	0,6406	0,0534		
Total	19	35,8747			

La respiration:

Indoxacarbe:

ANOVA à deux facteurs contrôlés : respiration en fonction de T; C

Analyse de variance pour resp

Source	DL	SC	CM	F	P
T	4	21169	5292	13,42	0,000
C	4	8502	2125	5,39	0,006
Erreur	16	6310	394		
Total	24	35981			

Bifenazate:

ANOVA à deux facteurs contrôlés : respiration en fonction de TEMPS;

Analyse de variance pour P9

Source	DL	SC	CM	F	P
TEMPS	4	17085	4271	17,33	0,000
C	4	5732	1433	5,81	0,004
Erreur	16	3944	246		
Total	24	26761			