



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR 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 DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité: Toxicologie

Intitulé

**Impact d'un mimétique œstrogène (MOS)
sur un organisme bio indicateur de
pollution : *R. saharica*.**

Présenté par: Mme. BENOSMANE Sana

Membres de Jury:

BERREBBAH Houria	Pr	Présidente	Université Badji Mokhtar Annaba
DJEBAR Med Réda	Pr	Directeur de thèse	Université Badji Mokhtar Annaba
DJAHOUDI Abdel Ghani	Pr	Examineur	Université Badji Mokhtar Annaba
ZAIDI Nadjoua	M.C.A	Examineur	Université De Skikda
KACHI Slimane	M.C.A	Examineur	Université De Guelma

Année universitaire: 2014/2015

Remerciements

Mes profonds remerciements vont tout d'abord à mon directeur de thèse le professeur DJEBAR M. Réda, directeur du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université d'Annaba, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire mais surtout pour sa disponibilité, sa confiance, sa gentillesse et son soutien scientifique tout au long de mon travail.

Je tiens à remercier aussi vivement et intensément Madame le professeur BERREBBAH Houria, non seulement pour avoir accepté de présider ce jury mais aussi pour son grand cœur, sa disponibilité et son aide, psychologique et scientifique.

Ils m'ont tous les deux fourni un encadrement scientifique exceptionnel, m'ont aidé de leurs précieux conseils et de leurs remarques pertinentes. Ils m'ont énormément apporté et m'ont permis de progresser, je les remercie vraiment pour tout.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Merci au Pr DJAHOUDI Abdel Ghani qui a accepté d'examiner ce travail. Je remercie également le Dr ZAIDI Nedjouda et le Dr KACHI Slimane qui ont accepté de prendre sur leur temps et de se déplacer pour examiner ce travail.

Je remercie tous les enseignants qui m'ont suivi tout le long de mon cursus universitaire et qui m'ont permis d'acquérir une formation scientifique de base pendant notre formation de licence, master et doctorat.

Lors de cette thèse, j'ai passé presque autant de temps dans ce laboratoire, ce qui m'a permis de connaître autant de bonnes personnes que je souhaiterais garder pour toujours. Un grand merci à Amel, Lynda, Zinou, Amira, Fateh, Ouissem, Hadjer, Rym, Manel, Marwa ainsi que tout membre de l'équipe du laboratoire de toxicologie cellulaire dont je suis très reconnaissante aussi bien pour leur soutien, leur disponibilité, leur bonne humeur, les

moments de folie, l'ambiance que pour l'esprit de famille qui règne au sein de notre laboratoire.

Un immense merci à Amel ma meilleure amie, grâce à qui, tout problème à sa solution. Merci à lui pour son aide précieuse, sa bonne humeur, son soutien, son écoute et sa présence dans chaque bon et mauvais moment.

Le plus grand merci revient à eux, mes parents, ma sœur Medina, mon frère Aymen, et mon rayon de soleil Ranim ainsi que ma petite nièce adorée Jassmine. Eux qui m'encouragent continuellement, me donnent l'envie toujours d'avancer et d'aller vers le meilleur; eux qui font tout (particulièrement avec ma fille) pour me créer une bonne ambiance de travail; eux qui m'ont beaucoup aidé avec leur soutien moral et m'ont supportée durant cette dernière période, que dieu les protège et les garde en bonne santé ainsi que toute ma famille.

Je remercie mes cousines pour tous les moments de folie pendant cette période, particulièrement Amira pour avoir été à mes cotés aux bons et mauvais moments. Un remerciement très particulier à mon ami Tarek pour son encouragement continuel, son écoute, sa bonne humeur et sa disponibilité autant de loin que de près. Un grand merci au trio Amel, Zinou et Yassine pour leur soutien en gardant le grand sourire et la bonne humeur et pour leur disponibilité lors de la pêche aux têtards.

Merci à tous.

Résumé

Dans ce travail nous avons recherché les effets d'un mimétique œstrogène (MOS) d'origine fongique (Mancozèbe) sur des organismes dulcicoles bioindicateurs de pollution: les têtards de la grenouille verte (*Rana saharica*) traités par différentes concentrations 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 mg/l sur une durée d'exposition de 5 semaines (avant la fin de la métamorphose). Ce xéno-œstrogène induit des perturbations de la croissance linéaire et pondérale et de l'indice de condition des têtards, mettant en évidence un net retard de la période de reproduction et une affection de la maturité sexuelle ainsi qu'un certain taux de mortalité et des difformités pour les traités par les plus fortes concentrations.

Nous avons mis en évidence une augmentation du taux de protéines parallèlement à une perturbation des systèmes de détoxification anti oxydantes (GSH, GST et CAT) qui constituent des mécanismes de défense contre le stress causé par le Mancozèbe. Nous avons également constaté une augmentation du taux du MDA ainsi qu'une induction de l'activité AchE. L'effet perturbateur endocrinien du mimétique œstrogène Mancozèbe a été confirmé par une augmentation du taux d'Œstradiol dans le sang des têtards.

Nous avons également mis en évidence une augmentation de la consommation d'O₂ chez les têtards traités parallèlement à une induction de la production des ROS particulièrement le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) aux plus fortes concentrations du xénobiotique.

L'induction du stress oxydatif nous a incités à explorer notamment le côté histologique et les atteintes tissulaires causées par le Mancozèbe chez les têtards et nos résultats ont révélé des nécroses au niveau des hépatocytes et des vacuolisations cytoplasmiques.

Mots clés: stress oxydant, mimétique œstrogène, fongicide, Mancozèbe, têtards, ROS, histologie.

Abstract

In this thesis we sought the effects of estrogen mimetic (MOS) fungal origin (Mancozeb) on freshwater organisms bioindicators of pollution: the tadpoles of the green frog (*Rana saharica*) treated with different concentrations 0.25; 0.5; 0.75 and 1 mg /l on an exposure period of 5 weeks (before the end of metamorphosis). This xeno-estrogen induced perturbations of linear and weight growth and on condition index tadpoles, showing a net delay of the breeding and affection of sexual maturity and some mortality and deformities in tadpoles treated with the highest concentration.

We have shown an increased rate of protein parallel to a disruption of antioxidant detoxification systems (GSH, GST and CAT) which are defense mechanisms against stress caused by the mancozeb. We also found an increase in MDA levels and an induction of AChE activity. The endocrine disruption of estrogen mimetic Mancozeb was confirmed by an increase in Estradiol levels in the blood of tadpoles.

We also highlighted an increase in O₂ consumption in treated tadpoles parallel to an induction generation of the ROS particularly hydrogen peroxide (H₂O₂) to the highest concentration of the xenobiotic.

The induction of oxidative stress prompted us to explore a histological side and the tissue damages caused by Mancozeb in tadpoles and results revealed necrosis in hepatocytes and cytoplasmic vacuolations..

Keywords: oxidative stress, mimic estrogen, fungicide, Mancozeb, tadpoles, ROS, histology.

ملخص

في هذه الأطروحة بحثنا عن آثار متسم بتقليد لهرمون الاستروجين، ذو أصل مبيد فطري (منكوزيب) على كائنات حية لمياه عذبة مؤشرة حيوية للتلوث : شراغف الضفدع الأخضر (رنا ساريكا) معالجة بتركيزات مختلفة 0.25، 0.5، 0.75 و 1 ملغ / لتر على فترة 5 أسابيع (قبل نهاية التحول). هذا المتسم بالتقليد لهرمون الاستروجين يؤدي إلى اضطرابات في النمو الخطي و الوزني و في مؤشر حالة الضفادع الصغيرة، تظهر تأخير في فترة التكاثر و مودة في النضج الجنسي وبعض الوفيات والتشوهات في الضفادع الصغيرة المعالجة بالتراكيز العالية.

لقد أثبتنا زيادة في نسبة البروتين إلى جانب لتعطل أنظمة إزالة السموم المضادة للأكسدة (TSG، HSG و TAC) التي هي آليات دفاع ضد التوتر الناجم عن (المنكوزاب). كما وجدنا زيادة في مستويات ال DAM وتحريض نشاط EhcA. تأثير جانب اضطراب الغدد الصماء تم تأكيده بزيادة في مستويات الاستراديول في دم الضفادع الصغيرة.

أظهرت زيادة في كمية استهلاك الأكسجين عند الضفادع الصغيرة المعالجة بالتوازي مع تحريض إنتاج الأصناف المفاعلة للأكسجين (SOR) خاصة بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) في أعلى تراكيز المنتج.

تحريض إجهاد الأكسدة دفعنا كذلك إلى استكشاف الجانب النسيجي و تلف الأنسجة الذي يسببها المنكوزيب في شراغف الضفدع الأخضر (رنا ساريكا) وهذا تركنا نستنتج أن هذا المنتج يسبب تنخر خلايا الكبد و فجوات حشوية ربما ناجمة عن تنكس دهني كبدي.

كلمات البحث: إجهاد الأكسدة، تأثير متسم بتقليد لهرمون الاستروجين، المنكوزاب، الضفادع الصغيرة، الأصناف المفاعلة للأكسجين (ROS)، علم الانسجة

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	iii
Abstract	iv
ملخص	v
Table des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des planches	xi
Abréviations	xiv
Chapitre I: Introduction	1
Introduction générale	2
1. Les perturbateurs endocriniens	4
1.1. Définition	4
1.2. Origines des substances à effet œstrogénique	5
1.3. Mécanismes de la perturbation endocrinienne	7
1.4. Effet des PE sur les Poissons et les Amphibiens	8
2. Généralité sur le Mancozèbe	10
3. Mode et site d'action du Mancozèbe	11
4. Les Amphibiens, excellents bio-indicateurs	11
5. Cycle vital et métamorphose de la grenouille	12
6. Les malformations chez les Amphibiens	16
Objectifs de la recherche	18
Chapitre II: Etude expérimentale	20
1. Matériel biologique	21
2. Matériel chimique	22
3. Méthodes	23
3.1. Mode d'échantillonnage	23
3.2. Traitement	24
3.3. Paramètres physiques et biométriques	25
3.3.1. Suivi du pH et de la température du milieu	25
3.3.2. Mensuration et pesée	25

3.3.3. Pourcentage de Mortalité	25
3.3.4. Mortalité corrigée.....	26
3.3.5. Indice de condition.....	26
3.3.6. Observation des malformations.....	26
3.4. Evaluation du stress oxydant	27
3.4.1. Extraction et dosage des protéines totales.....	27
3.4.2. Dosage du Glutathion (GSH)	27
3.4.3. Mesure de l'activité de la Glutathion S-transférase (GST)	29
3.4.4. Mesure polarographique	29
3.4.5. Quantification des espèces réactives de l'Oxygène (ROS)	30
3.4.6. Mesure de l'activité Catalase (CAT)	31
3.4.7. Dosage du taux de la Malondialdéhyde (MDA)	32
3.4.8. Mesure de l'activité de l'Acétylcholinestérase (AChE)	33
3.4.9. Dosage de l'Estradiol	35
3.5. Etude histologique	36
3.6. Etude statistique	36
Chapitre III: Résultats.....	37
1. Effet du Mancozèbe sur le développement et la croissance des têtards	
(<i>Rana saharica</i>)	38
1.1. Variation du pH et de la température du milieu	38
1.2. Variation du poids et de la taille des têtards	39
1.3. Evaluation du pourcentage de mortalité des têtards	41
1.4. Evolution de l'indice de condition	43
1.5. Evaluation du taux de malformations	43
2. Evaluation d stress oxydant	45
2.1. Evolution du taux des protéines totales	45
2.2. Evolution du taux du Glutathion	46
2.3. Evolution de l'activité Glutathion-S-transférase.....	47
2.4. Effet du Mancozèbe sur le métabolisme respiratoire des têtards (<i>Rana saharica</i>).....	48
2.5. Evolution du taux de d-ROMs chez les têtards (<i>Rana saharica</i>)	49
2.6. Evolution de l'activité Catalase	49
2.7. Evolution du taux du Malondialdéhyde	50
2.8. Evolution de l'activité Acétylcholinestérase	51
2.9. Evolution du taux d'Œstradiol sanguin (E2).....	52
3. Etude histologique.....	53

<u>Chapitre IV:</u> Discussion et conclusion générale56
Perspectives72
Références bibliographiques73

Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Page
1	Principaux perturbateurs endocriniens.	6
2	Effet de la température de l'eau sur la durée d'incubation pour la grenouille verte.	13
3	Effet de la température de l'eau sur la durée d'incubation pour la grenouille verte.	12
4	Les valeurs de référence du test D-ROMs.	31
5	Pourcentages de mortalité (%) observés chez les têtards témoins et traités avec des concentrations croissantes de Mancozèbe pendant les 5 semaines.	42
6	Pourcentage de mortalité corrigé (%) des têtards traités avec des concentrations croissantes de Mancozèbe pendant les 5 semaines.	42
7	Variations quantitatives des métabolites réactifs de l'oxygène observées dans le sang des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe.	49

Liste des figures

N°	Titre de la figure	Page
1	Modes d'action des perturbateurs endocriniens.	7
2	Déformation de la colonne vertébrale chez des poissons médakas âgés de 10 semaines.	9
3	Ponte d'une grenouille.	12
4	Métamorphose d'un têtard de grenouille.	14
5	Étape de la métamorphose avec la mâchoire déformée, de grands yeux et une relique de la poche branchiale.	15
6	Une jeune grenouille dont la métamorphose est presque complète.	16
7	Difformités des pattes des crapauds communs métamorphiques européens.	17
8	La grenouille verte de l'Afrique du nord : (<i>Rana saharica</i>).	21
9	Têtards de la grenouille verte (<i>Rana saharica</i>).	21
10	Structure chimique du Mancozèbe.	23
11	Variation du pH du milieu d'élevage durant la période de traitement des têtards par le Mancozèbe.	38
12	Variation de la température du milieu d'élevage durant la période de traitement des têtards par le Mancozèbe.	39
13	Evolution du poids des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe.	40
14	Evolution de la taille des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe.	41
15	Variation de l'indice de condition des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe.	43
16	Difformités de pattes postérieures observées chez les têtards (b et c) traités par le Mancozèbe (1 mg/l) comparés à un têtard sain (a).	44
17	Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur les variations du taux moyen des protéines totales chez les têtards (<i>Rana Saharica</i>).	45

18	Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur les variations du taux moyen de GSH chez les têtards (<i>Rana Saharica</i>).	46
19	Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur l'évolution de l'activité de la GST chez les têtards (<i>Rana Saharica</i>).	47
20	Variation du métabolisme respiratoire des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe.	48
21	Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur l'évolution de l'activité CAT chez les têtards (<i>Rana Saharica</i>).	50
22	Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur les variations du taux moyen de MDA chez les têtards (<i>Rana Saharica</i>).	51
23	Effets des concentrations croissantes de Mancozèbe sur l'évolution de l'activité AchE chez les têtards (<i>Rana Saharica</i>).	52
24	Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur les variations du taux d'Œstradiol chez les têtards (<i>Rana Saharica</i>).	53

Liste des planches

1	Coupe histologique au niveau du foie d'un têtard (<i>Rana saharica</i>) témoin.	54
2	Coupe histologique du foie d'un têtard (<i>Rana saharica</i>) exposé à 1 mg/l de Mancozèbe.	55

Abréviations

PE: Perturbateurs Endocriniens.

IC: l'indice de condition somatique.

ROS: espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species).

d-ROMs: métabolites réactives de l'oxygène.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

BBC: bleu brillant de Coomassie.

GSH: Glutathion.

CAT: Catalase.

GST: Glutathion-S-transférase.

GCS: glutamylcystéine synthase.

GS: glutathion synthétase.

AchE: Acétylcholinestérase.

MDA: Malondialdéhyde.

E2: Estradiol.

Vg: vitellogénine.

pg/ml: Picogramme par millilitre.

CL50: Concentration inhibitrice de 50% de la population.

PCB: Polychlorobiphényle.

Chapitre I:

Introduction

Introduction générale

Aujourd'hui plus que jamais, la protection de la santé et le respect de l'environnement font partie des préoccupations de l'homme qui est confronté chaque jour à de nouveaux dangers. Le développement de l'activité humaine a été accompagné par une altération des ressources naturelles et une perturbation des différents écosystèmes. Compte tenu de son statut de réceptacle final, le milieu aquatique regroupe les écosystèmes les plus touchés, directement ou indirectement, par les effets délétères des polluants.

Le développement de l'industrie depuis le 18ème siècle a profondément transformé notre mode de vie. Cela a permis d'améliorer notre confort, d'augmenter fortement l'espérance de vie et de lutter de manière plus efficace contre les maladies.... Aujourd'hui, au quotidien, des produits issus de l'industrie chimique sont utilisés. En effet, ces produits contiennent de nombreuses molécules issues de la chimie n'existant pas naturellement dans le monde vivant: les xénobiotiques.

Ces composés notamment les pesticides ou les produits de la plasturgie sont soupçonnés d'être des Perturbateurs Endocriniens (PE). D'origine naturelle ou synthétique, les perturbateurs endocriniens peuvent altérer le fonctionnement du système hormonal. Ces substances pourraient donc induire des effets néfastes sur la santé d'un organisme, sa descendance, ou une population, et constituer par conséquent un danger sanitaire potentiel non encore évalué.

Aujourd'hui, le sujet des PE reste largement focalisé sur les problèmes de reproduction, notamment chez certaines espèces de poissons, d'Amphibiens et des problèmes liés à certains cancers chez l'homme (Ibn Hadj Hassine, 2014). Classiquement, un perturbateur endocrinien est défini comme une substance exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, la libération, le transport, le métabolisme, la fixation, l'action ou l'élimination des hormones naturelles du corps responsables de l'homéostasie, de la reproduction et du développement. Ces substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme,

pouvant interférer avec l'organisme, sont appelées xéno-hormones, dont les xéno-œstrogènes qui miment l'effet de l'œstradiol et qui peuvent se lier aux récepteurs cellulaires de la même façon que les œstrogènes. Ces xéno-estrogènes, de nature très variée, peuvent être d'origine naturelle (phyto-œstrogène, myco-estrogène) et d'origine anthropique (pesticides, produits d'origine industrielle, produits pharmaceutiques et de soin corporels,...), et sont dotés d'effets œstrogéniques (Ibn Hadj Hassine, 2014).

Il est donc nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement; des organismes ou un ensemble d'organismes que l'on utilise comme sentinelles en étudiant les modifications physiologiques, biochimiques et écologiques qui les affectent. Ces êtres vivants très sensibles aux contaminants présentent l'intérêt de se prêter plus facilement que l'homme aux études des effets des polluants et permettent de mettre en évidence des pollutions chroniques ou brutales (Hellowell, 1986; Echaubard, 1995).

1. Les perturbateurs endocriniens:

1.1. Définition:

Diverses définitions du terme «perturbateur endocrinien» ou PE sont proposées et font objet de débat. Selon Kavlock et *al.* (1996) un PE est une substance exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, la libération, le transport, le métabolisme, la fixation, l'action ou l'élimination des hormones naturelles du corps responsables de l'homéostasie, de la reproduction et du développement. Un PE est défini en 1998 par l'Agence de protection de l'environnement des USA (EDSTAC, 1998) comme un agent exogène (substance chimique d'origine naturelle ou artificielle) ou un mélange de substances exogènes qui agissent sur le système endocrinien et qui ont des effets néfastes au niveau d'un organisme intact, de sa progéniture et des sous-populations. Une autre définition a été proposée au cours du congrès européen sur les perturbateurs endocriniens selon laquelle un perturbateur endocrinien est une substance exogène qui provoque des effets néfastes sur un organisme sain ou sa progéniture dus à une modification des fonctions endocrines (European Commission, 1997).

Quoi qu'il en soit, identifier un perturbateur endocrinien revient donc à identifier une molécule pouvant être reliée à une activité hormonale; si elle se lie au récepteur ou si elle modifie l'action de certaines hormones, elle peut être considérée comme un perturbateur endocrinien. Pour certaines substances, ayant une activité plus ou moins importante sur le système endocrinien, on distingue deux groupes de molécules: celles qui produisent des effets délétères et celles qui suscitent une réponse de l'organisme non problématique ou encore qui produisent des effets adaptatifs (OMS, 2002). De ce fait, une xéno-hormone (ou pseudo-hormone) n'est pas une hormone véritable, mais une substance naturelle ou synthétique qui se comporte comme une hormone. Les xéno-estrogènes sont des substances qui «miment» l'œstradiol, hormone naturelle, et qui peuvent se lier aux récepteurs cellulaires de la même façon que les œstrogènes (Parent, 2009).

1.2. Origines des substances à effet œstrogénique:

Les perturbateurs endocriniens se répartissent en plusieurs classes :

- **Les hormones naturelles produites dans le corps** : œstrogènes, testostérone, hormones thyroïdiennes, insuline, etc.
- **Les hormones naturelles fabriquées par des plantes** : phytoestrogènes (effets de type œstrogénique ou anti-œstrogénique), isoflavones (soja) ou resvératrol (raisin et vin). (OFSP, 2002).
- **Substances chimiques produites pour leur effet hormonal** (ex. pilules contraceptives) et étant, en leur structure, similaires ou identiques aux hormones naturelles.
- **Substances chimiques** d'origine industrielle, agricole et les produits de consommation, ou utilisées comme sous-produits, mais dont l'effet sur les hormones n'est pas intentionnel. Elles peuvent avoir une similarité structurelle avec les hormones naturelles. Les différentes variétés de ces substances sont sur réparties le Tableau (1).

Tableau 1: Principaux perturbateurs endocriniens

(Colborn et Clement, 1992; Colborn et *al.*, 1993; Brevini et *al.*, 2005).

HERBICIDES ET FONGICIDES		INSECTICIDES	
Fongicides	Vinclozoline	Organochlorés	DDT
	Procymidione		DDE
	Fénarimol		Méthoxychlore
	Zirame		Lindane
	Nitrofène		Dieldrine
	Trifuraline		Heptachlore
	Bénomyle		Endosulfan
	Mancozèbe		Toxaphène
	Manèbe		Mirex
	Amitrole		
	Zinèbe		Organophosphorés
	Tributylétain	Carbamates	Méthomyl
	Carbaryl		
Herbicides	Atrazine	Pyréthriinoïdes de synthèse	Cyperméthrine
	Alachlore		
	Linuron	Carbinols	Dicofol
PRODUITS CHIMIQUES INDUSTRIELS		PHYTOŒSTROGENES	
Hexachlorobenzène		Génistéine	
Biphényles polychlorés (PCB) et Dioxines		Coumestrol	
Bisphénol A		Daidzéine	
Styrènes		Enterolactone	
Alkylphénols		Zéaralénone	
Phtalates			

1.3. Mécanismes de la perturbation endocrinienne:

Étant donnée la diversité des fonctions physiologiques impliquées dans le système endocrinien, les mécanismes par lesquels de nombreuses molécules de l'environnement peuvent agir sur ce système sont variés (Figure 1):

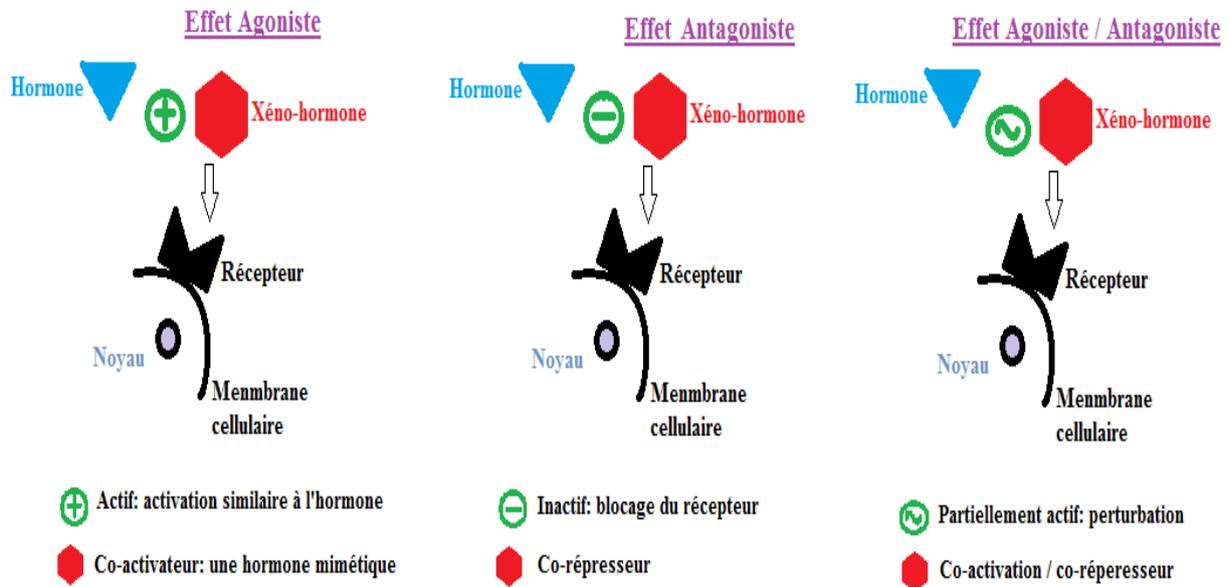


Figure 1: Modes d'action des perturbateurs endocriniens.

- **Effet similaire à des hormones (agoniste):** La substance se lie dans le corps à un récepteur hormonal et l'active de la même façon qu'une hormone.
- **Blocage de l'effet hormonal (antagoniste):** La substance se lie à un récepteur hormonal puis le bloque. Les hormones ne peuvent alors plus s'y fixer.
- **Influence sur la disponibilité des hormones (agoniste ou antagoniste):** La substance perturbe la synthèse ou la dégradation des hormones, rendant variable la quantité à disposition. La substance peut aussi influencer sur la circulation des hormones dans le sang.

- **Effet indirect:** Dans les cellules ou l'organisme, le perturbateur endocrinien modifie des mécanismes qui sont en interaction avec le système hormonal, et parviennent donc à agir sur les hormones.

Le plus souvent, ces mécanismes d'action des PE résultent d'une combinaison des deux mécanismes agoniste et antagoniste. (Gronemeyer et *al.*, 2004; Germain et *al.*, 2006).

Les autres modes d'action des PE peuvent se traduire par une perturbation de la synthèse, du transport, du métabolisme ou de la sécrétion des hormones, altérant ainsi les concentrations des hormones naturelles dans l'organisme (Ibn Hadj Hassine, 2014).

1.4. Effet des PE sur les Poissons et les Amphibiens:

Les observations les plus flagrantes sont celles faites sur la faune aquatique, exposée à l'ensemble des polluants de l'environnement dans les cours d'eau contaminés par la pluie, le ruissellement et le rejet des stations d'épuration.

Les travaux de Purdom et *al.* (1994) et Sumpter (1995) sur les effets des PE sur la truite arc en ciel exposée à des effluents d'eaux usées et des phyto-œstrogènes montrent une féminisation des poissons. Ce phénomène est un des plus observés chez les poissons, comme chez les flets sauvages mâles capturés dans la baie de Tokyo contaminés par de grandes quantités d'effluents industriels et domestiques (Hashimoto et *al.*, 2000). Larsson et Forlin (2002), Toft et Guillette (2005) et Cheshenko et *al.* (2008) ont mis en évidence une diminution de la masculinisation et du taux de spermatozoïdes des poissons exposés à de différents xéno-œstrogènes, il en est de même concernant les travaux de Vigano et *al.* (2001) et Van Aerle et *al.* (2001) qui ont rapporté l'apparition des phénomènes d'intersexualité, un impact sur la croissance et la différenciation sexuelle chez le poisson chat (Sridevi et *al.*, 2013) ainsi que des perturbations hormonales (Antunes et Da Cunha, 2002; Dulcic et *al.*, 2003).

Les malformations squelettiques sont les plus spectaculaires dans la mesure où le squelette constitue la charpente de l'animal. L'exposition à des extraits de sédiments contaminés par des polluants organiques, des œufs de poissons de médaka japonais (*Oryzias latipes*) entraîne chez les embryons une déformation marquée de la colonne vertébrale absente chez les individus témoins (Figure 2) (Cachot et al., 2007).

Des observations similaires ont été mentionnées pour d'autres espèces en présence de composés comme la dioxine, les hydrocarbures polyaromatiques HAP, les polychlorobiphényles PCB (Cachot et al., 2006; Yamauchi et al., 2006; Gagnon et Rawson, 2009; Kessabi et al., 2012).

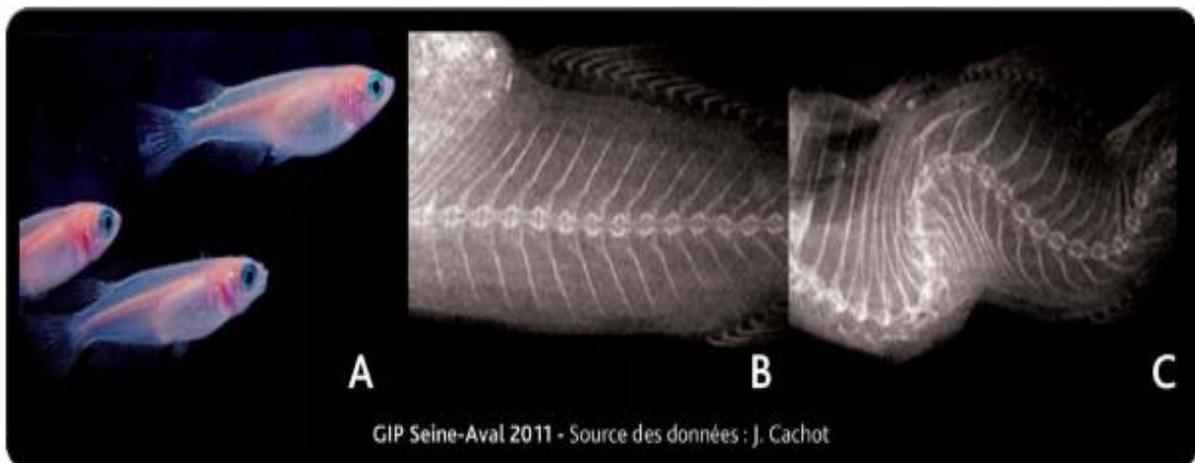


Figure 2: Déformation de la colonne vertébrale chez des poissons médakas âgés de 10 semaines. (cachot et al., 2006).

Chez les Amphibiens, les données sont beaucoup moins abondantes. Dans la majorité des régions du globe ces espèces sont en voie d'extinction. La sensibilité des Amphibiens vis-à-vis des perturbateurs endocriniens peut être représentée par: une augmentation de la fréquence d'anomalies morphologiques en particulier chez les grenouilles; des effets perturbateurs sur la biologie de la reproduction, le système thyroïdien et le développement neural chez les organismes tels que le xénope (*Xenopus laevis*) (Urbatzkaa et al., 2007; Cevasco et al., 2008).

Les œstrogènes conduisent à la féminisation, les anti-œstrogènes neutralisent la différenciation sexuelle, les androgènes provoquent une masculinisation, tandis que les anti-androgènes ont des effets féminisants. (Kloas et Lutz, 2006).

2.. Généralités sur le Mancozèbe:

Plusieurs pesticides, parmi lesquels des insecticides (DDT, endosulfan, dieldrine, méthoxychlore, dicofol, chlordécone, toxaphène), des nématocides (aldicarbe), des herbicides (alachlore, atrazine, nitrofène, 2,4D), des fongicides (bénomyl, **Mancozèbe**, vinchlozoline) figurent sur les listes de perturbateurs endocriniens (Taylor et *al.*, 1978). Certaines de ces molécules actives sont aujourd'hui interdites en Europe mais la majorité est néanmoins toujours présente et encore utilisée dans les pays du tiers monde. Le mancozèbe est un fongicide non systémique appartenant à la famille des carbamates. C'est un dithiocarbamate (du groupe éthylène-bis-dithiocarbamate (EBDC)), qui comprend le Manèbe et le Métirame comme ingrédients actifs (Lyman et Lacoste, 1975)

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la toxicité du Mancozèbe, qui a été enregistré pour la première fois aux États-Unis en 1948 comme un fongicide à large spectre. Le Mancozèbe est utilisé en agriculture sur les cultures vivrières et ornementales pour protéger les récoltes de la détérioration due au stockage ou au transport. Il est aussi utilisé dans la gestion du gazon professionnel et dans l'horticulture. En termes de pourcentage de cultures traitées, celles qui sont le plus souvent traitées par le Mancozèbe sont les pommes de terre (avec 54 à 65% des cultures traitées) et les oignons (avec 50 à 65% des cultures traitées). Le Mancozèbe est aussi largement utilisé sur les pommes, les raisins, les poires, les tomates et pastèques (Satterthwaite, 1986; Rohm et Haas, 1975; Debra, 2005).

3. Mode et site d'action du Mancozèbe:

Le Mancozèbe perturbe le métabolisme cellulaire au niveau de plusieurs sites. Le zinc et le manganèse qu'il contient sont des oligo-éléments essentiels intervenant dans le métabolisme des plantes. Sa résistance au lessivage par les pluies et sa faible dégradation par les rayons ultraviolets lui confèrent une grande persistance. Il freine le développement des acariens rouges et jaunes (Hagan et *al.*, 1986).

L'activité préventive de ce fongicide multi-site se résume principalement dans l'inhibition de la germination des spores, qui est en rapport avec le blocage de plusieurs enzymes contenant des groupements thiol impliqués dans la germination des spores. Cette action est appuyée par l'effet du Zinc et du Manganèse, que comporte la molécule, et qui contribuent à son activité en dénaturant des protéines non spécifiques du champignon (Debra, 2005).

4. Les Amphibiens, excellents bio-indicateurs:

Les Amphibiens sont importants pour la recherche en écologie et biodiversité, les particularités de leur physiologie en font des indicateurs sensibles de la qualité des milieux; la plupart des espèces présentent en effet un cycle complexe impliquant la proximité de deux types d'habitats vitaux, l'un aquatique et l'autre terrestre. La particularité du métabolisme hydrominéral et de la respiration (en grande partie cutanée, impliquent une forte perméabilité de la peau à divers échanges), les conditions physico-chimiques des habitats (humidité, acidité, polluants) sont par conséquent directement perçus par les sens et la qualité de ces échanges (Joly, 2000; Mann et Bidwell, 2000).

Les Amphibiens sont tous prédateurs au stade adulte et peuvent aussi à ce titre jouer le rôle de bio-accumulateurs. Ce rôle d'indicateur de changement de la qualité des milieux est retenu au niveau international pour le suivi des changements globaux comme le réchauffement de la planète, l'augmentation des rayonnements

UV-B, les nouvelles maladies, la dispersion des pesticides et autres polluants (Ankley et *al.*, 1998; Joly, 2000).

5. Cycle vital et métamorphose de la grenouille :

La grenouille verte pond ses œufs au printemps dans des nappes d'eau dormantes (marre, bords d'étangs) regroupés en amas à aspect gélatineux (Figure 3) immergés sur le fond à faible profondeur ou accrochés aux plantes aquatiques.



Figure 3: Ponte d'une grenouille (Tarquin, 2004).

Comme d'autres Amphibiens, le cycle de vie de la grenouille commence dans l'eau avec un œuf qui éclos pour donner une larve sans membres munie de branchies, que l'on appelle têtard. Après une période de croissance, durant laquelle le têtard développe des membres et des poumons, il se métamorphose et son aspect général et l'arrangement de ses organes internes sont modifiés. Il peut quitter l'eau sous la forme d'une grenouille miniature.

- **Les œufs:**

Le nombre d'œufs pondus varie selon les espèces. L'œuf, fécondé en dehors du corps de la femelle, contient une masse noirâtre qui correspond à l'embryon prenant peu à peu une forme de virgule. L'éclosion dépend du milieu ambiant. Une

augmentation de la température de l'eau raccourcit la durée de l'incubation selon le Tableau (2).

Tableau 2: Effet de la température de l'eau sur la durée d'incubation pour la grenouille verte (Aubert,1987).

Température de l'eau °C	Incubation en jours
15	20
20	10
24	7
28	5

L'éclosion des œufs d'une même ponte est en principe synchronisée mais parfois après un délai de 24 heures. Le vent peut par exemple créer des courants d'air qui, en déplaçant plus ou moins les œufs, favorisent les échanges respiratoires des embryons situés au centre des pontes et facilitent la sortie des larves (Aubert, 1987). Les œufs embryonnés sont beaucoup plus sensibles à l'acidité que les têtards.

- **Les têtards:**

Une petite larve de 5 à 6 mm sort de l'œuf. Cette larve est couverte de cils et reste sur la masse gélatineuse de la ponte qu'elle consomme peu à peu. Plus tard, cette larve se fixera aux végétaux par un organe adhésif en forme de V sécrétant un mucus. Pendant quelques jours la larve est inerte et consomme son vitellus ovulaire. Le stade suivant est la transformation progressive en têtard, comme elle est démontrée sur la Figure (4). La larve devient «phanérobbranche » : les fentes branchiales se forment, la queue s'allonge, la bouche et l'anus se percent, tandis que l'organe adhésif progresse. Les narines apparaissent et les yeux deviennent visibles. (Moncuit, 2006).

Deux semaines plus tard, les branchies externes disparaissent et sont remplacées par des petites branchies internes, correspondant au stade «cryptobranché». Le têtard mène alors une vie autonome. L'intestin du têtard, qui est herbivore, est encore long. La bouche est armée d'un bec corné et entoure des lèvres charnues molles sur lesquelles les dents apparaissent. La queue s'allonge et prolonge le corps globuleux (Moncuit, 2006).

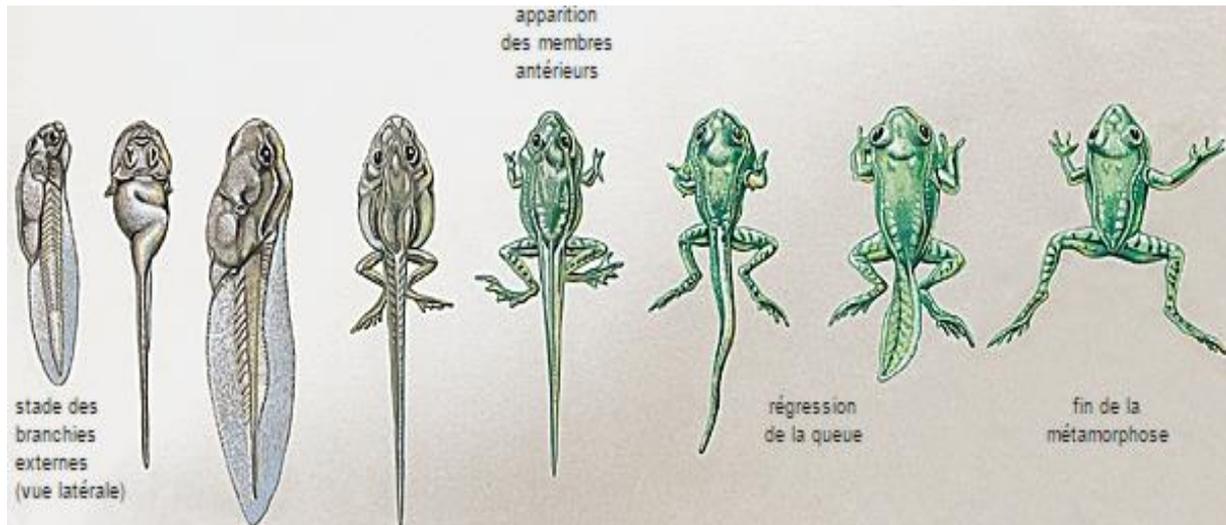


Figure 4: Métamorphose d'un têtard de grenouille
(Archive Larousse Encyclopédie, 2014).

Le têtard va se développer en dimension et en poids (Figure 4). Peu à peu, sa morphologie change et on voit apparaître des ébauches de pattes postérieures. Avec le temps, celles-ci se développent pendant que les membres antérieurs commencent à grandir. Cette évolution va se poursuivre, et progressivement la queue se résorbe jusqu'au moment où l'animal prend l'aspect d'une grenouille en miniature. La vie larvaire dure environ 2 à 3 mois (Delton, 1991).

Selon Delton (1991) le poids des têtards double presque chaque semaine lorsqu'ils sont dans de bonnes conditions. Par contre, dès que la métamorphose commence et malgré l'apparition d'organes supplémentaires (pattes), le poids vif diminue. Les animaux ne mangent plus pendant cette transformation, très exigeante en énergie. La température de $20,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ permet d'obtenir après 18 jours des poids de têtards plus élevés qu'à $18,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ou qu'à $21,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

- **La métamorphose:**

À la fin du stade têtard, la grenouille se métamorphose et son corps se transforme rapidement en celui d'un adulte. Cette métamorphose dure entre 2 à 8 semaines selon les conditions externes, et est initiée par la production d'une hormone, la thyroxine. Cela conduit différents tissus à se développer de différentes façons. Les principaux changements sont le développement de poumons et la disparition des branchies et des poches branchiales, laissant les pattes avant visibles. La mâchoire inférieure devient la grande mandibule de l'adulte carnivore (Figure 5), et le long intestin spiralé du têtard herbivore est remplacé par un intestin court typique d'un prédateur (Stebbins et Cohen, 1995). Le système nerveux devient bien adapté à l'audition et la vision stéréoscopique, et pour de nouvelles méthodes de locomotion et d'alimentation (Stebbins et Cohen, 1995). Les yeux sont repositionnés plus haut sur la tête et les paupières et glandes associées apparaissent. Le tympan, l'oreille moyenne et l'oreille interne se développent. La peau devient plus épaisse et plus dure, la ligne latérale disparaît et les glandes de la peau apparaissent (Stebbins et Cohen, 1995). La dernière étape est la disparition de la queue, mais elle a lieu plus tard, le tissu étant utilisé pour accélérer la croissance des membres. La (Figure 6) représente une jeune grenouille avec courte queue avant la fin de sa métamorphose.



Figure 5: Étape de la métamorphose avec la mâchoire déformée, de grands yeux et une relique de la poche branchiale (Viridiflavus, 2006).



Figure 6: Une jeune grenouille dont la métamorphose est presque complète (Chemicalinterest, 2010).

6. Les malformations chez les Amphibiens:

Les malformations chez les Amphibiens touchent aussi bien les stades adultes que larvaires et peuvent inclure des membres supplémentaires (ex. cinq ou six pattes) ou l'absence de membres (pattes ou yeux) (Figure 7), des mandibules de taille réduite, des testicules trop petites, des systèmes digestifs anormaux, etc. Un grand nombre de facteurs sont soupçonnés de causer des malformations. Parmi ceux-ci, on retrouve en particulier les parasites (Trématodes), les rayons UV-B et la contamination toxique de la pollution chimique (Kiesecker et *al.*, 2001).

Des études ont établi un lien direct entre un milieu contaminé et un taux élevé de difformités chez les Amphibiens (Ouellet, 1996; Linzey et *al.*, 2003; Yu et *al.*, 2014).



Figure 7: Difformités des pattes des crapauds communs métamorphiques européens (Sunter, 2006).

Objectifs de la recherche

La présente recherche s'inscrit dans la problématique du développement de bioindicateurs en milieu aquatique, représentatifs du groupe des Amphibiens, en caractérisant sous plusieurs aspects la sensibilité à un xéno-œstrogène d'une espèce amphibienne en phase têtard.

Considérés comme «des sentinelles de l'environnement», les Amphibiens, avec leur peau mince et perméable, sont beaucoup plus sensibles aux changements environnementaux que les Mammifères (Cohen, 2001; Roy, 2002). Ces sentinelles semblent maintenant moins nombreuses que jamais. En effet, il est maintenant bien reconnu que les population de grenouilles sont en déclin au niveau mondial (Houlahan et *al.*, 2000). Diverses hypothèses sont avancées pour expliquer ce déclin mondial, mais toutes semblent anthropogéniques. La contamination des eaux par divers polluants, l'introduction de nouvelles espèces, la perte d'habitat et les changements climatiques sont quelques-unes de ces hypothèses (Cohen, 2001).

Il a été prouvé que des substances telles que les fertilisants (nitrates) réduisaient l'activité des larves d'Amphibiens et pouvaient provoquer des malformations, des paralysies ou la mort d'individus (Ortiz et *al.*, 2004). Johnson et Chase (2004) ont montré que l'eutrophisation des eaux favorisait la malformation des grenouilles. Les pesticides, herbicides ou métaux lourds affectent directement ou indirectement les Amphibiens et les reptiles (Hall et Henry, 1992). Il a été montré également que les pesticides causent également une mortalité importante chez les reptiles et que des insecticides peuvent s'accumuler dans leur métabolisme et en inhiber le bon fonctionnement (Hall, 1980; Hayes, 1997).

Cependant, Afin de contribuer à prévenir au mieux les risques liés à l'utilisation et à l'exposition aux xéno-œstrogènes. il nous a parut intéressant de faire une étude sur l'impact toxicologique d'un perturbateur endocrinien, mimétique œstrogène, provenant de source agricole, le fongicide " Mancozèbe" sur les têtards de la grenouille verte (*Rana saharica*).

Dans notre étude nous avons créé un milieu artificiel créé en laboratoire (pH et T°) et nous avons mesuré les paramètres biométriques (Evolution pondérale et linéaire et coefficient de condition), nous avons également observé le taux de mortalité et les malformations des individus pendant la période de traitement.

Des recherches visaient à évaluer le potentiel énergétique des têtards et ce à travers la détermination de la consommation d'O₂ et la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Une étude biochimique a été consacrée aux effets du mimétique œstrogénique au niveau des biomarqueurs en évaluant les activités spécifiques de l'Acétylcholinestérase, la Catalase et la Glutathion S-transférase ainsi que le Glutathion et le malondialdéhyde (AChE, CAT, GST, GSH et MDA). Nous avons aussi effectué un dosage endocrinien, celui de l'hormone Estradiol.

Des coupes ont été effectuées pour caractériser les altérations au niveau tissulaire par une observation microscopique histologique des têtards témoins et traités au mimétique œstrogène fongique.

Les expérimentations ont été menées pour l'essentiel au Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Annaba et les coupes histologiques ont été effectuées au Laboratoire d'Anatomie Pathologique (Anapath) au Centre Hospitalier Universitaire de Annaba.

Chapitre II:

Étude expérimentale

L'étude expérimentale a été effectuée au laboratoire de Toxicologie Cellulaire, département de Biologie, Université Badji Mokhtar à Annaba.

1. Matériel biologique :

Le matériel biologique utilisé dans notre étude est le têtard de la grenouille verte d'Afrique du nord : *Rana (Pelophylax) saharica*. (Figure 8 et 9) (Llorente et *al.*, 1996; Boulenger, 1913).



Figure 8: La grenouille verte de l'Afrique du nord : (*Rana saharica*). (Mamou, 2011)



Figure 9: Têtards de la grenouille verte (*Rana saharica*).

- **Répartition et systématique:**

Rana saharica est l'Amphibien le plus abondant dans notre région (Algérie) dont la position systématique selon Boulenger (1913) est donnée ci-dessus. Ce sont des espèces présentes dans la plupart des régions humides du nord algérien, Tunisie et Maroc, également dans le nord du Sahara occidental, Tripoli et les oasis du Sahara algérien (Geniez et *al.*, 2004). Selon Baha El Din (2006), cette espèce est répartie sur l'ensemble de l'Afrique du nord : Maroc, Algérie, Tunisie, Lybie et Egypte.

Embranchement : Vertébrés

Super classe : Tétrapodes

Classe : Amphibiens

Ordre : Anoures

Famille : Ranidés

Genre : *Rana*

Espèce : *saharica*

Nom scientifique : *Rana saharica*

2. Matériel chimique:

Le Mancozèbe pur se présente sous forme de poudre jaunâtre. C'est un complexe polymérisé qui renferme environ 20% de Manganèse pour 2,5 % de Zinc. Il est fabriqué par action d'un sel de Zinc (Sulfate par exemple) sur le Manèbe ou Ethylène bis (dithiocarbamate) de Manganèse en suspension dans l'eau.

Le Mancozèbe est pratiquement insoluble dans l'eau (2 à 20 mg/l) et dans la plupart des solvants organiques et il se décompose vers 192- 204 °C.

Le Mancozèbe [Manganèse Zinc éthylène bis dithiocarbamate] dont la structure chimique est schématisée dans la Figure (10) est un fongicide homologué

pour une utilisation sur une variété de cultures agricoles, plantes ornementales, et le gazon.

Il se décompose lentement sous l'effet de la chaleur, de l'humidité ou au contact d'acides. Par décomposition thermique, il libère des fumées/ gaz toxiques renfermant notamment oxydes de soufre, oxydes d'azote, sulfure d'hydrogène, oxydes de manganèse et de zinc, disulfure de carbone...

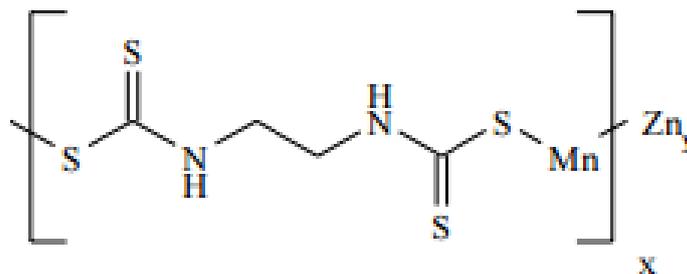


Figure 10: Structure chimique du Mancozèbe.

Nom commun: Mancozèbe.

Nom commercial: Mancozèbe, Dithane 45®, Manzate 200®, Penncozeb®, Fore.

Nom chimique: le dithiocarbamate de manganèse et de zinc.

Famille chimique: Dithiocarbamate.

Poids moléculaire: $(265,3)_x + (65,4)_y$

Formule brute: $(C_4H_6MnN_2S_4)_x (Zn)_y$

3. Méthodes:

3.1. Mode d'échantillonnage:

Nous avons effectué notre échantillonnage durant la période d'activité des grenouilles, depuis le mois d'avril jusqu'au mois de septembre. Durant le reste de l'année, la grenouille verte d'Afrique du Nord est en hibernation. Les échantillons

proviennent d'un plan d'eau dans la région d'El Kala qui est considérée comme le site le moins pollué de la région (Brahamia et Semouk, 2010).

Les fragments de pontes de *Rana saharica* sont collectés sur le terrain après leur fécondation et sont maintenus dans des bacs en plastique contenant de l'eau de robinet préalablement décolorée et aérée par un bulleur d'aquarium. La nourriture pour poisson est fournie régulièrement en plus de quelques débris de végétaux. La température est maintenue entre 13 et 16°C.

3.2. Traitement:

Nous avons opté pour un type de toxicité qui nous permet d'obtenir une réponse biologique en un temps assez court. De plus la recherche sur la toxicité sublétales est nécessaire pour la compréhension des effets toxiques autres que létaux puisque ce sont ces effets qui s'expriment le plus souvent dans les situations réelles de pollution environnementale.

A partir du produit commercial, nous avons préparé une solution mère de 2 mg de Mancozèbe dans un litre d'acétone à 2%, puis nous avons déterminé 04 concentrations de Mancozèbe (C_1 , C_2 , C_3 et C_4) correspondant respectivement à 0.25, 0.5, 0.75 et 1mg/l et un échantillon témoin (T) ainsi qu'un échantillon témoin acétone. Ces concentrations sont déterminées à partir d'une CL_{50} d'un essai de test de toxicité aiguë chez les poissons et les invertébrés aquatiques 1mg/l $<CL_{50}$ <10 mg/l. (Fiche de donnée de sécurité du produit).

Les expérimentations sont menées sur des têtards aux premiers stades du développement larvaire (stade 26-32) et prennent fin avec les stades de pré-métamorphoses (37-39) (Gosner, 1960), Ce qui impose une durée d'exposition limitée à 5 semaines (avant que la plus forte concentration ne tue tous les têtards). Chaque lot est composé de 10 têtards (Botosoa, 2010).

3.3. Paramètres physiques et biométriques:

Nous avons choisi des têtards de même poids et de même taille ainsi que des conditions de milieu bien contrôlées.

3.3.1. Suivi du pH et de la température du milieu:

La mesure du pH et de la température de nos échantillons est effectuée toutes les 24 heures à l'aide d'un pH mètre (type HANNA HI2211 pH/ORP Meter) et d'une sonde thermique.

3.3.2. Mensuration et pesée:

La cinétique de croissance est contrôlée par le suivi du poids et de la taille des têtards, l'étude de ce paramètre permet d'évaluer l'effet du toxique sur la croissance et le développement des têtards.

Les têtards sont pesés chaque semaine à l'aide d'une balance de précision (type Sartorius TE 124S 1/10mg). Les variations de la taille sont mesurées dans les mêmes périodes en posant le têtard sur du papier filtre en l'allongeant à côté d'un ruban mètre, la longueur du têtard correspond à la distance entre les extrémités (de la pointe du museau jusqu'à la nageoire caudale) (Kerstant, 1985).

3.3.3. Pourcentage de mortalité:

Le pourcentage de mortalité observée chez les têtards traités par le Mancozèbe à différentes concentrations ainsi que chez les témoins est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de mortalité (\%)} = \left(\frac{\text{Nombre de têtards morts après traitement}}{\text{Nombre total de têtards traités}} \right) \times 100.$$

3.3.4. Mortalité corrigée:

Le pourcentage de mortalité observé est corrigé par la formule d'Abbott (1925) qui permet d'éliminer la mortalité naturelle.

$$\text{Mortalité corrigée (\%)} = ((\text{Mortalité observée chez les traités} - \text{Mortalité observée chez les témoins}) / (100 - \text{Mortalité observée chez les témoins})) \times 100.$$

3.3.5. Indice de condition :

L'indice de condition permet d'évaluer le statut physiologique général d'un individu. De multiples facteurs peuvent affecter cet indice de condition somatique, il faut donc le considérer avec une certaine précaution en écotoxicologie (Gilliers et *al.*, 2004).

La variation de l'indice de condition en fonction du temps et de la taille du têtard permet de connaître la période de reproduction et de déterminer la taille approximative au moment de la première maturité sexuelle (Le cren, 1951). Selon Le cren (1951) l'indice de condition somatique (IC) est calculé selon la formule suivante :

$$\text{IC} = (P / L^3) \times 100$$

P: Poids total (g)

L: Longueur du têtard (cm)

3.3.6. Observation des malformations:

Lors de l'exposition des têtards aux différentes concentrations du mimétique œstrogène testé, nous suivons régulièrement les malformations des têtards dans chaque lot par simple observation.

3.4. Evaluation du stress oxydant:

Pour les dosages à réaliser dans la présente étude, Les corps décapités ont servi aux dosages des activités spécifiques des antioxydants: du Glutathion (GSH), la catalase (CAT), ainsi que d'autres biomarqueurs: la glutathion S-transférase (GST), le malondialdéhyde (MDA) et enfin un dosage endocrinien celui de l'œstradiol. Les têtes des têtards des séries témoins et traitées aux différentes concentrations du mimétique œstrogène (le Mancozèbe) ont fait l'objet d'un dosage de l'activité acétylcholinestérase (AChE). Les dosages ont été menés sur des têtards en pré-métamorphose ayant approximativement les mêmes caractéristiques pondérales et linéaires. En parallèle, et pour les dosages enzymatiques, la concentration en protéines totales des échantillons a été préalablement déterminée suivant la méthode de Bradford (1976).

3.4.1. Extraction et dosage des protéines totales:

L'extraction des métabolites protéiques est réalisée selon le procédé de Shibko *et al.* (1966) sur le corps entier des têtards en pré-métamorphose ayant approximativement les mêmes caractéristiques pondérales et linéaires.

Les protéines sont mesurées par colorimétrie selon la méthode de Bradford (1976). La lecture de la densité optique est effectuée à une longueur d'onde $\lambda = 595$ nm (spectrophotomètre JENWAY 6300, Visible).

3.4.2. Dosage du Glutathion (GSH) :

Le dosage du glutathion est effectué après 5 semaines d'exposition au Mancozèbe. Il est quantifié selon la méthode de Weckbecker et Cory (1988), qui repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5- mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobinzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm. Le dosage s'effectue après homogénéisation (30 secondes) des échantillons dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M (7,44 g EDTA et 1000 ml

d'eau distillée) à l'aide d'un ultrason (Sonifer B-30). L'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) 0,25% (0,25 g d'ASS, 100 ml d'eau distillée). Ainsi, 200 µl de l'ASS sont additionnés à 800 µl d'homogénat. Le mélange après agitation est plongé pendant 15 mn dans un bain de glace, puis centrifugé à 1000 tours /mn pendant 5 mn. Une fraction aliquote (500 µl) du surnageant récupéré est ajoutée à 1 ml du tampon tris /EDTA (0,02 M, pH 9,6) (63,04 g tris, 7,4448 g EDTA et 1000 ml d'eau distillée) et 25 µl de DTNB (0,01 M) (3,96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu). Le mélange est laissé pendant 5 mn à température ambiante avant la mesure des absorbances contre un blanc où 500 µl du surnageant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée. Le taux de GSH est exprimé par rapport aux quantités de protéines.

La lecture de la longueur d'onde est effectuée à $\lambda = 412$ nm après 5 min de repos (spectrophotomètre type JENWAY 6300) et la concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{Taux de GSH } (\mu\text{M/ mg de prot}) = \left(\frac{\Delta\text{DO}}{13,1} \times \frac{V_d}{V_h} \times \frac{V_t}{V_s} \right) / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines ($\mu\text{M/mg}$ de protéines).

ΔDO : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH).

V_d : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1ml (0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat).

V_h : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0,8 ml.

V_t : volume total dans la cuve : 1,525 ml (0,5 ml surnageant + 1ml tris/EDTA + 0,025 ml DTNB).

V_s : volume du surnageant dans la cuve : 0,5 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

3.4.3. Mesure de l'activité de la Glutathion S-transférase (GST):

La mesure de l'activité GST est réalisée selon la méthode de Habig et *al.* (1974) basée sur la mesure photométrique de la cinétique de conjugaison du produit formé avec un substrat: le 1-chloro-2,4 dinitrobenzène (CDNB) en présence d'un cofacteur, le glutathion (GSH). Les têtards décapités sont homogénéisés dans 1ml de tampon de phosphate de sodium (0,1 M, pH 6) à l'aide d'un broyeur à ultrasons. L'homogénat est centrifugé à 14000 tours/min pendant 30 minutes et le surnageant récupéré servira de source d'enzyme. Une fraction aliquote du surnageant de 0,2 ml a été ajoutée à 1,2 ml du mélange [CDNB(1 Mm) -GSH (5 mM)] dans un tampon phosphate (1 mM, pH 6). La lecture des absorbances est effectuée toutes les 15 secondes pendant une minute à une longueur d'onde de 340 nm (spectrophotomètre, type JENWAY 6300, Visible) contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée. L'activité de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante:

$$\text{Activité GST } (\mu\text{M/ min/ mg de prot}) = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min}}{9,6} \times \frac{\text{Volume total de la cuve}}{\text{Prise d'essai} \times \text{mg de protéine}}$$

X: micro-moles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines.

Δ DO: pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat.

9,6: coefficient d'extinction molaire du CDNB ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.4.4. Mesure polarographique:

La consommation d'O₂ est mesurée grâce à une électrode à oxygène de type Hansatech qui permet de mesurer des taux d'O₂ de l'ordre du nano-mole selon la méthode de Chagra et *al.* (2007), sur des têtards ayant approximativement les mêmes caractéristiques pondérales et linéaires, après 5 semaines de traitement par le mimétique œstrogène "Mancozèbe" (en pré-métamorphose) .

Avant la respirométrie, les têtards sont mis dans des flacons hermétiques contenant de l'eau distillée pour les témoins et du milieu de traitement de chaque

concentrations pour les individus traités. Les solutions doivent être bien aérées en essayant d'avoir la même quantité d'oxygène initiale. La mesure est effectuée après 5, 24 et 72 heures à partir de la mise en flacon.

3.4.5. Quantification des espèces réactives de l'Oxygène (ROS):

Le taux de ROS est quantifié sur des échantillons de sang récupérés à partir de têtards traités pendant 5 semaines par des concentrations croissantes de Mancozèbe . La technique utilisée est basée sur le test d-ROM. Ce test est effectué grâce à un système d'analyse de radicaux libres (FRAS4) qui est composé d'un photomètre couplé à une centrifugeuse intégrée, conçus pour permettre l'évaluation globale du stress oxydatif. Nous avons utilisé le d-ROM tests, sur un petit échantillon de sang capillaire. Ce système très innovant fournit des informations en temps réel sur l'équilibre oxydatif global d'un individu (Celi et *al.*, 2010).

L'essai d-ROM permet de déterminer la concentration sanguine de métabolites réactifs de l'oxygène (ROMs) et en particulier, celle de hydroperoxydes qui sont des marqueurs et des amplificateurs de radicaux libres qui induisent des dommages oxydatifs.

Le terme D-ROM est de "dérivés de métabolites réactives de l'oxygène", la classe à laquelle ils appartiennent, en fait, est hydroperoxydes.

➤ Principe de la méthode :

Le test d-ROM utilise le principe de la réaction de Fenton: par mélange d'un échantillon biologique avec un tampon acide (Réactif R1), le nouvellement créé ion de métal de transition (fer ou cuivre) catalyse la décomposition d'hydroperoxyde, génère de nouvelles espèces de radicaux tels que l'hydroxyperoxyl (RO +) et alcoyle (RO +). En ajoutant un chromogène (N, N-diéthyl-paraphénylendiamine, Réactif R2) ayant la capacité de donner une couleur d'électrons, cette coloration est progressive et graduelle au mélange rose de réaction (plasma + chromogène), initialement incolore. et ce changement est due lorsqu'il est oxydé par les radicaux libres, et en utilisant une lecture photométrique disponible avec le matériel d'analyse

FRAS 4 dédié, il devient possible de quantifier le niveau d'hydroperoxydes disponibles dans l'échantillon (Kilk et *al.*, 2014).

Dans un échantillon de sang de 20 µL, les hydroperoxydes réagissent avec un substrat chromogène à 37°C, pour développer un dérivé de couleur dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration de d-ROMs, selon la loi de Beer-Lambert (Alberti et *al.*, 2000). Cette intensité de la couleur est quantifiée par le FRAS4 et les résultats sont exprimés en unités Caratelli (U.Carr.), où une U.Carr. est équivalente à 0,08 mg /100 ml de peroxyde d'hydrogène (Trotti et *al.*, 2002). L'interprétation des résultats du test de d-ROMs est indiquée dans le Tableau (4).

Tableau 4: Les valeurs de référence du test D-ROMs.

d-ROMs test REFERENCE VALUES	
250-300	Normal range
300-320	Border condition
321-340	Low level of oxidative stress
341-400	Middle level of oxidative stress
401-500	High level of oxidative stress
> 500	Very high level of oxidative stress
Unit of measurement: U. Carr 1 U. Carr = 0.08 mg H ₂ O ₂ /dl	

3.4.6. Mesure de l'activité Catalase (CAT):

La mesure de l'activité catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de Regoli et Principato (1995) dont le principe repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à une longueur d'onde de 240 nm.

Les fragments sont broyés aux ultrasons dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7). L'homogénat est centrifugé à 15000 g pendant 10 minutes et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel contient: 20 µl de surnageant, 200 µl de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (500 mM) et 780 µl de tampon (0,1 M, pH 7,5). La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée.

L'activité catalase est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \frac{\Delta\text{DO} \times 10}{\varepsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéines}}$$

X : µmoles de H₂O₂ consommées par minute et par mg de protéines.

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

ε : Le coefficient d'extinction linéique molaire est de 40 M⁻¹. Cm⁻¹

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant une minute toutes les 15 secondes (spectrophotomètre, Jenway 63000) pour une longueur d'onde λ = 240 nm.

3.4.7. Dosage du taux de la Malondialdéhyde (MDA):

La peroxydation lipidique est estimée par la quantification du taux de MDA selon la méthode de Draper et Hadley (1990). Cette méthode est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA), qui donne un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm. Les échantillons sont broyés aux ultrasons dans 1 ml de tampon tris-HCl (50 mM, pH 7,5) [1,5137 g tris, 0,0730 g EDTA (acide éthylène diamine tetra-acétique), 42,78 g sucrose, 250 ml eau distillée]. Après centrifugation à 10 000 tours/ min pendant 10 minutes, le surnageant est récupéré et servira au dosage du MDA.

Le dosage est réalisé avec 500 µl du surnagent additionné de 2,5 ml de TCA [100 g TCA, 1000 ml eau distillée]. Après chauffage au bain Marie à 100 °C pendant 15 mn et refroidissement dans de la glace, une centrifugation est effectuée à 10000

tours /min pendant 10 minutes. Une fraction aliquote de 2 ml du surnageant à laquelle on ajoute 1ml de TBA [6,7 g TBA, 1000 ml eau distillée] est alors prélevée. Après un second chauffage (100 °C pendant 15 min) et refroidissement, 1,5 ml de butanol sont rajoutés. Après agitation, une dernière centrifugation (10000 tours/ mn pendant 10 min) est réalisée et le surnageant constitué de 1 ml de butanol renfermant les complexes TBA/MDA est récupéré et une lecture des absorbances est effectuée a 532 nm (spectrophotomètre, type JENWAY 6300) contre un blanc (tampon tris-HCl).

Le taux de MDA est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de MDA } (\mu\text{M/ mg de prot}) = \left(\frac{\Delta\text{DO}}{1,36 \times 10^4} \times \frac{V_t}{V_s} \right) / \text{mg de protéines}$$

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: 1 ml [volume total du butanol recuperé renfermant les complexes TBA/MDA].

Vs : volume du surnageant utilise dans le dosage : 0,5 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

3.4.8. Mesure de l'activité acétylcholinestérase (AChE):

La méthode de dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) que nous avons choisie est celle d'Ellman et *al.* (1961) consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'acétylthiocholine (ASCh), dont l'hydrolyse libère de la thiocholine (SCh) et de l'acide acétique. La quantité de thiocholine obtenue est proportionnelle à l'activité enzymatique, on la révèle grâce à une méthode colorimétrique faisant intervenir le dithiobis nitrobenzoate (DTNB) qui se lie avec la thiocholine pour former un complexe de couleur jaune que l'on dose à 412 nm. Les échantillons sont homogénéisés pendant quelques secondes dans 1 ml de solution détergente (38,03 mg éthylène glycol tris-betaaminoéthyl éther N N N' N' ou EGTA, 1 ml triton X 100%, 5,845 g NaCl, 80 ml tampon tris 10mM) à l'aide d'un homogénéisateur à ultrasons (Sonifer B-

30) puis centrifugés à 5000 tours/mn pendant 5 mn. Le surnageant est utilisé immédiatement pour la mesure de l'activité AChE.

Le dosage de l'AChE est déterminée comme suit : 100 µl de surnageant sont additionnées à 100 µl de DTNB (0,1 M, pH 8) (39,6 mg de DTNB, 15 mg CO₃ Na, dans 10 ml tris 0,1 M pH 7) et 1 ml du tampon tris (0,1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes de repos nécessaire pour épuiser la réaction spontanée, 100 µl de substrat acétylthiocholine iodide (Sigma R) (118 mg ASCh dans 5 ml d'eau distillée) sont ajoutés. La lecture des densités optiques s'effectue à 412 nm toutes les 4 minutes pendant 20 minutes contre un blanc où le surnageant est remplacé par un volume équivalent de solution détergente (100 µl).

La lecture de la longueur d'onde est effectuée à $\lambda = 412$ nm toutes les 4 minutes pendant 20 minutes (spectrophotomètre type JENWAY 6300). L'activité spécifique de l'AChE est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Activité l'AchE (nM/ min/ mg de prot)} = \left(\frac{\Delta DO}{1,36 \times 10^4} \times \frac{V_t}{V_s} \right) / \text{mg de protéines}$$

X: nanomole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines.

ΔDO : pente de la droite de régressions obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps (/minute).

$1,36 \times 10^4$: coefficient d'extinction molaire du DTNB ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

V_t : volume total dans la cuve : 1,3 ml [0,1 ml surnageant + 0,1 ml DTNB + 1 ml tampon tris (0,1 M, pH 7) + 0,1 acétylcholine].

V_s : volume du surnageant dans la cuve : 0,1 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

3.4.9. Dosage de l'Estradiol:

L'œstradiol est l'œstrogène primaire, c'est un dérivé naturel du métabolisme du cholestérol (via la testostérone) qui est nécessaire au maintien de la fertilité et des caractères sexuels secondaires chez la femme. Une production endogène d'œstradiol (17 β -œstradiol ou «E2») existe aussi dans le cortex visuel du cerveau, dans le cortex visuel primaire, avec des récepteurs situés dans la même région, dont la fonction n'est pas encore comprise. Cet œstradiol affecte le traitement perceptif des indices visuels (Jeong et *al.*, 2012). L'œstradiol est environ 10 fois plus efficace que l'estrone et environ 80 fois plus efficace que l'estriol dans ses effets œstrogéniques. Dans l'environnement, en tant que perturbateur endocrinien, il devient potentiellement polluant.

➤ Principe de la méthode :

Le principe du système VIDAS est basée sur une méthode immunoenzymatique par compétition avec détection par fluorescence de l'Estradiol dont la quantification repose sur une étape qui utilise un agent de relargage pour libérer l'Estradiol de ses liaisons protéiques (Kyrou et *al.*, 2009).

Ce dosage est effectué selon le protocole du système VIDAS des analyseurs automatisés immuno multiparamétriques reconnus pour leur performance fiable et précise. Ils sont utilisés dans les centres de fertilité. Chaque test de l'hormone dans VIDAS est un outil de diagnostic et de suivi essentiel pour spécialistes de la fertilité dans l'enquête de dysfonctionnements hormonaux (Kyrou et *al.*, 2009).

Nous avons utilisé ce système pour le dosage du taux d'œstradiol (E2) chez les têtards (*Rana saharica*) traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe et ce après la première et la 5^{ème} semaine de traitement.

3.5. Etude histologique:

Pour l'étude histologique, nous avons procédé selon le protocole de Martoja et Martoja (1967).

Les échantillons sont fixés dans le liquide de Bouin alcoolique ou du formol à 10% pendant 48h. Puis déshydratés dans l'éthanol 95° au moins deux fois pour éliminer l'excès d'acide picrique. Après déshydratation, les pièces sont conservées dans du butanol. Après imprégnation dans la paraffine (3 bains de 24 h.) les pièces sont coupées (2µm) à l'aide d'un microtome (Anglia scientific), étalées avec l'eau gélatinée et séchées à l'étuve (37 °C) pendant au moins 48 h. Les coupes sont par la suite déparaffinées avant d'être colorées à l'hémalum éosine (hématoxyline 1 g, iodate de sodium 0,2 g et chloral hydrate 150 g) qui permet une coloration différentielle. Après déshydratation dans les bains suivants : 2 bains d'éthanol 95°, un bain de xylène pur et enfin un autre du xylène pur, les pièces sont montées à l'aide du baume de Canada.

Les coupes sont observées par un microscope LEICA DM 1000.

3.6. Etude statistique:

L'analyse statistique des données est effectuée par le test t de Student. Ce test est réalisé à l'aide d'un logiciel d'analyse des données: Minitab (Version 14.0) (Dagnelie, 1999). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm écart-type.

Chapitre III:

Résultats

1. Effet du Mancozèbe sur le développement et la croissance des têtards (*Rana saharica*):

1.1. Variations du pH et de la température du milieu:

Le pH est un paramètre très important pour la physiologie des Amphibiens. La Figure (11) montre que le pH du milieu d'élevage varie entre 6,47 et 8,56 pour les témoins et traités avec le Mancozèbe et ce durant les 4 semaines de traitement.

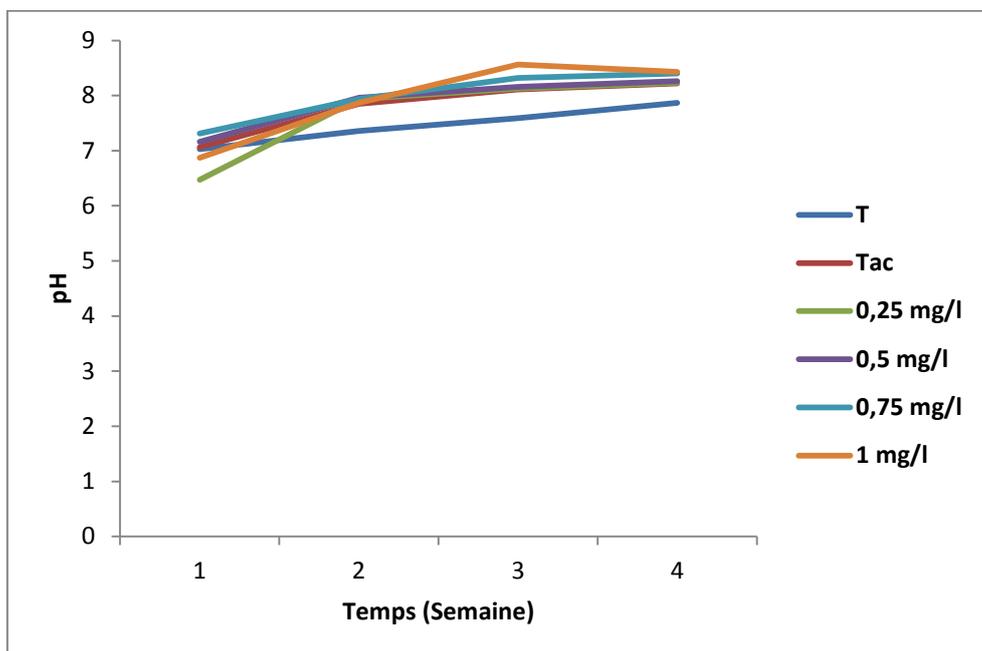


Figure 11: Variation du pH du milieu d'élevage durant la période de traitement des têtards par le Mancozèbe.

Il en est de même concernant la température qui doit être contrôlée régulièrement, ce facteur peut être déterminant pour l'évolution et la croissance des têtards. La Figure (12) montre que durant le traitement des têtards, nous avons maintenu une température constante du milieu d'élevage favorable au développement des têtards et qui se situe entre 13,5 et 15 °C.

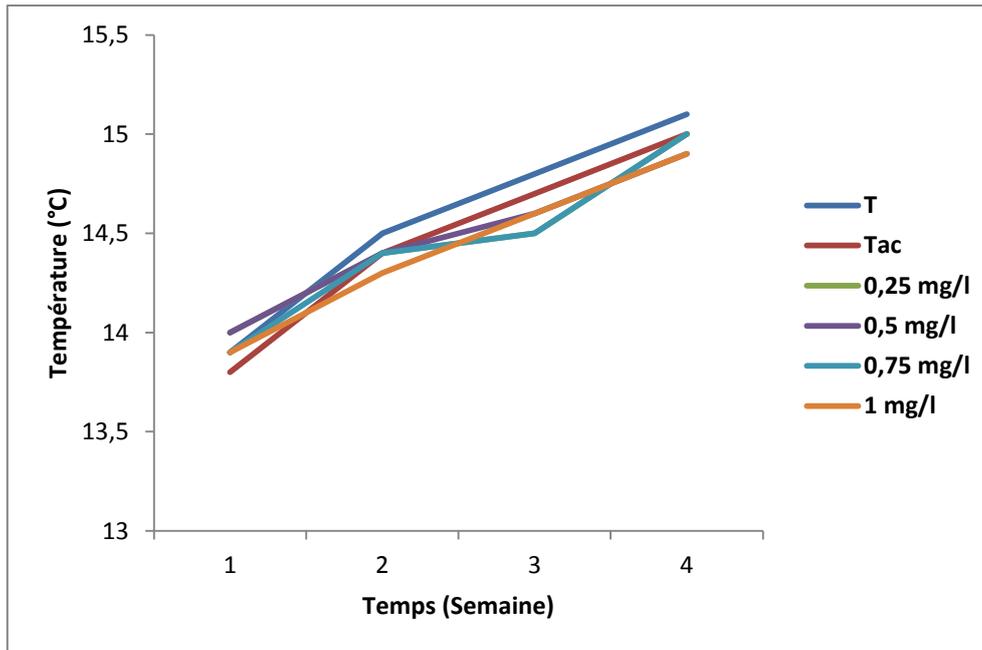


Figure 12: Variation de la température du milieu d'élevage durant la période de traitement des têtards par le Mancozèbe.

1.2. Variation du poids et de la taille des têtards:

La Figure (13) illustre l'effet de concentrations croissantes de Mancozèbe (0.25, 0.5, 0.75 et 1 mg/l) sur la variation pondérale des têtards durant une période de 5 semaines précédant l'étape de la morphogénèse.

Nous constatons que jusqu'à la deuxième semaine, la différence entre l'évolution du poids des témoins et des traités semble peu significative; cependant dès la 3^{ème} semaine de traitement, nous constatons un retard hautement significatif ($p=0,000$) dans l'évolution du poids des têtards traités par rapport aux témoins et cela jusqu'à la fin du traitement. Ce retard se manifeste particulièrement chez les traités avec les plus fortes concentrations de Mancozèbe (C3 et C4).

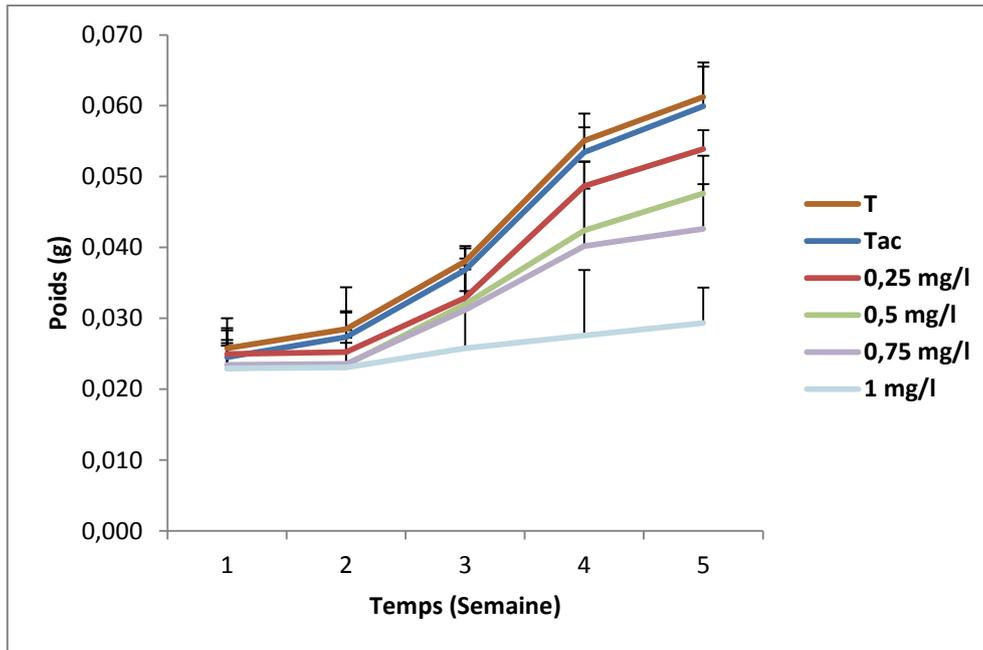


Figure 13: Evolution du poids des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe.

La Figure (14) illustre l'effet du Mancozèbe sur l'évolution de la taille des têtards soumis au mimétique œstrogène durant 5 semaines. Nous remarquons que dès la moitié de la 2^{ème} semaine de traitement un retard hautement significatif ($p=0,000$) dans l'évolution de la taille des têtards traités par rapport aux témoins est constaté et qui persiste jusqu'à la fin du traitement. Ce retard se manifeste particulièrement chez les têtards traités par la plus forte concentration du Mancozèbe (1 mg/l).

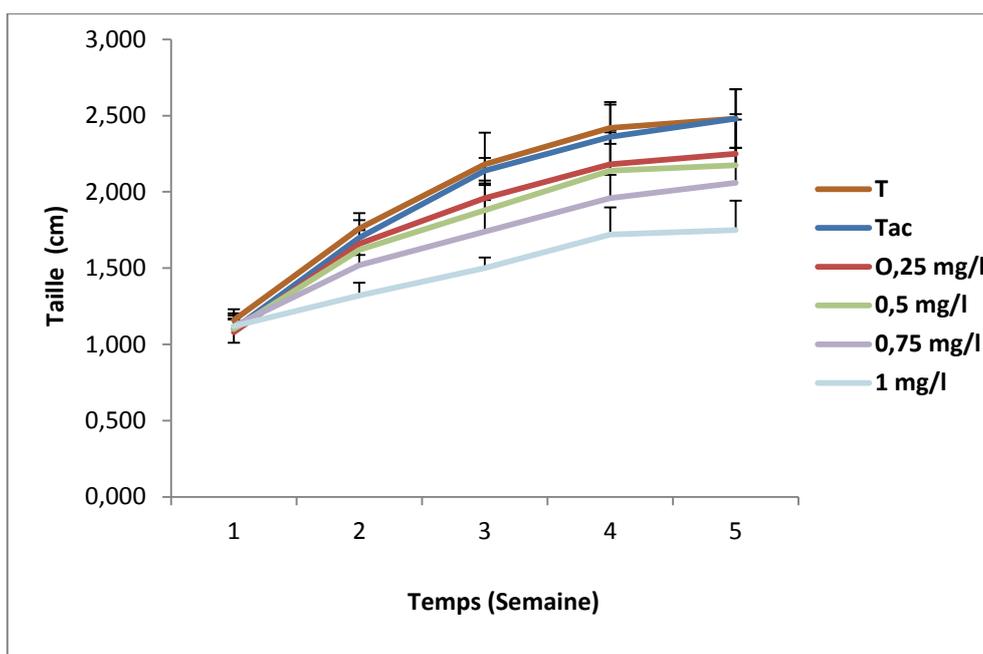


Figure 14: Evolution de la taille des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe.

1.3. Evaluation du pourcentage de mortalité des têtards:

Le tableau (5) représente l'effet du Mancozèbe sur le pourcentage de mortalité des têtards pendant la période de traitement. Nous constatons que le traitement par des concentrations croissantes de Mancozèbe (0.25, 0.5, 0.75 et 1 mg/l), induit une mortalité pouvant atteindre jusqu'à 80 % pour la concentration la plus élevée (1 mg/l). Alors que chez les séries témoins nous avons enregistré une mortalité de 20% dans la 5^{ème} semaine.

Tableau 5: Pourcentages de mortalité (%) observés chez les têtards témoins et traités avec des concentrations croissantes de Mancozèbe pendant les 5 semaines.

	1 ^{ère} semaine	2 ^{ème} semaine	3 ^{ème} semaine	4 ^{ème} semaine	5 ^{ème} semaine
Témoin	0	0	0	10	20
Témoin AC	0	0	0	10	20
0,25 mg/l	0	0	10	20	30
0,5 mg/l	0	0	20	30	30
0,75 mg/l	0	10	30	40	60
1 mg/l	0	20	30	70	80

Le tableau (6) représente le pourcentage de mortalité corrigé pour chaque lot de têtards traités, calculées par la formule d'Abbott (1925) qui montrent l'effet réel du traitement par le xénobiotique. Le pourcentage de mortalité corrigé varie de 2,22 % pour la faible concentration (0,25 mg/l) et cela à partir de la 4^{ème} semaine de traitement arrivant jusqu'à 20 % pour la concentration la plus élevée (1 mg/l).

Tableau 6: Pourcentage de mortalité corrigé (%) des têtards traités avec des concentrations croissantes de Mancozèbe pendant les 5 semaines.

	1 ^{ère} semaine	2 ^{ème} semaine	3 ^{ème} semaine	4 ^{ème} semaine	5 ^{ème} semaine
0,25 mg/l	0	0	0	2,22	7,5
0,5 mg/l	0	0	0	3,33	7,5
0,75 mg/l	0	0	0	4,44	15
1 mg/l	0	0	0	7,77	20

1.4. Evolution de l'indice de condition:

La Figure (15) représente des variations de l'indice de condition des têtards traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe. Nous remarquons ainsi que l'indice de condition tend à diminuer chez les têtards témoins et traités par la plus faible concentration (0,25 mg/l) et cela dès la première semaine de traitement, tandis qu'il reste dans un intervalle de 1,62 à 2,09 g/cm et cela depuis le début du traitement pour les plus fortes concentrations de Mancozèbe (0.5, 0.75, 1 mg/l).

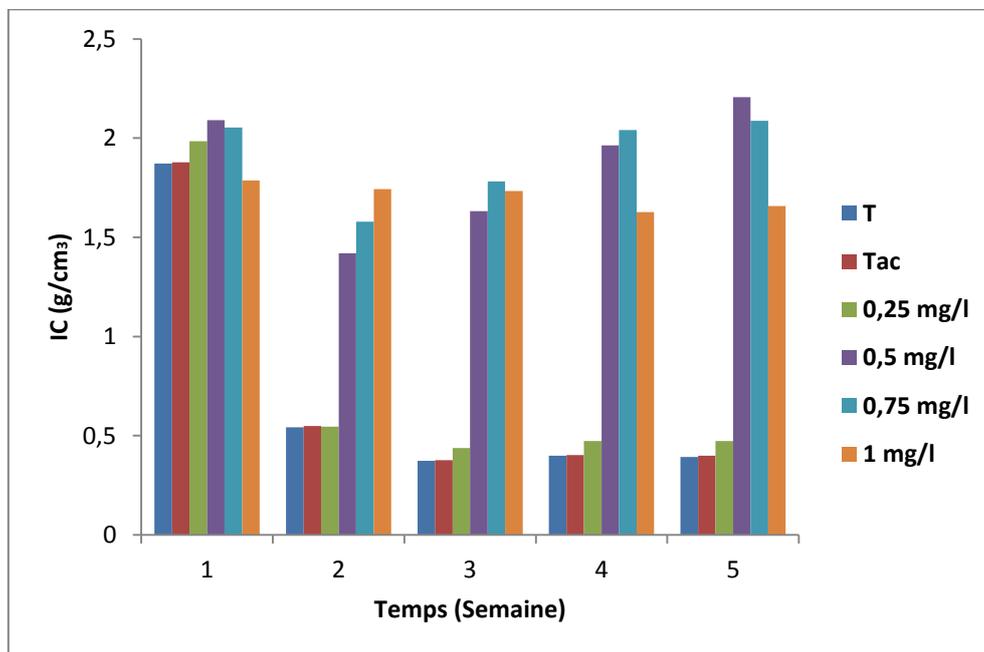


Figure 15: Variation de l'indice de condition des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe.

1.5. Evaluation du taux de malformations:

Après suivi de la croissance et de la mortalité des têtards exposés au Mancozèbe, nous avons observé parallèlement les malformations potentielles pouvant être détectées chez les têtards traités.

Nous avons observé une différence de couleur des têtards traités par rapport aux témoins. Ainsi les traités paraissent dépigmentés (plus clairs).

A la plus forte concentration de Mancozèbe (1 mg/l): nous avons pu détecter que 30% des têtards traités présentent des anomalies. Ces anomalies se manifestent principalement par une absence d'un des membres postérieurs Figure (16 b et c).

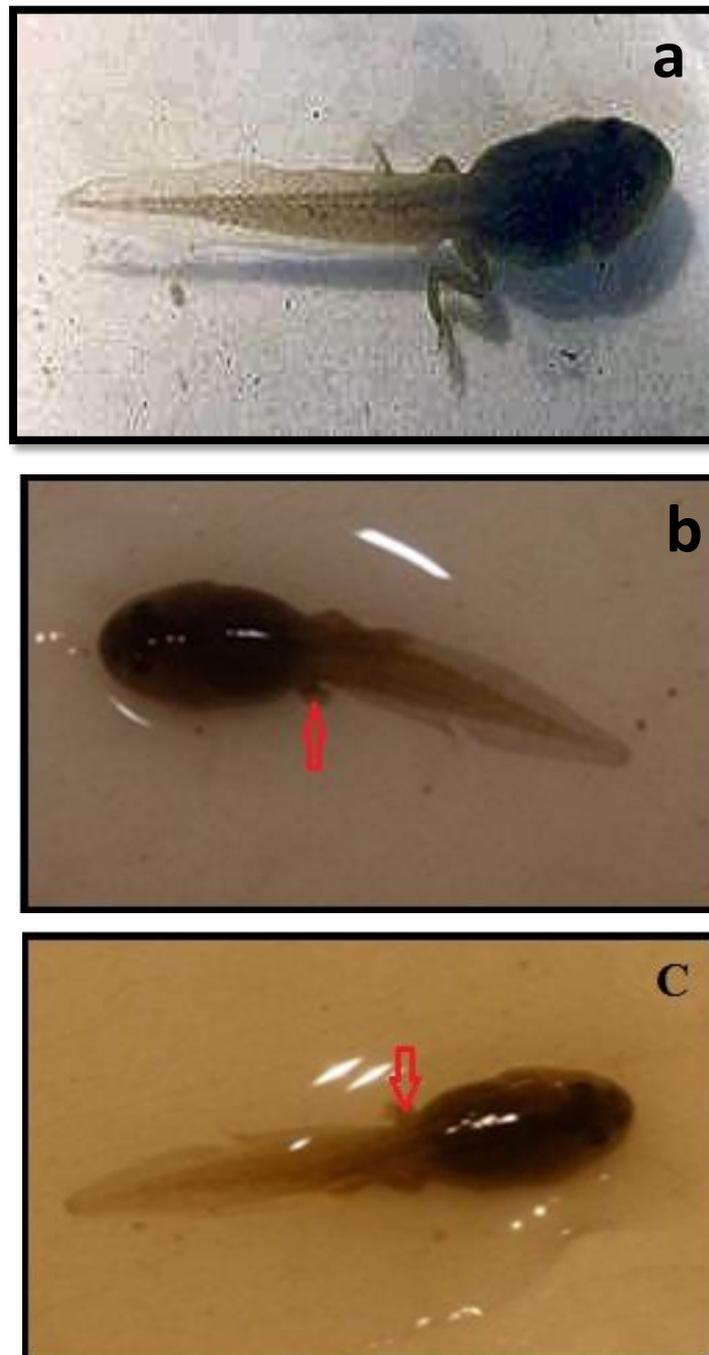


Figure 16: Difformités de pattes postérieures observées chez les têtards (b et c) traités par le Mancozèbe (1 mg/l) comparés à un têtard sain (a).

2. Evaluation du stress oxydant:

2.1. Evolution du taux des protéines totales:

La Figure (17) montre l'effet du Mancozèbe sur le taux des protéines totales chez les têtards soumis au traitement par les différentes concentrations du mimétique œstrogène. Nos résultats montrent qu'en présence du xénobiotique, le taux de protéines totales tend à augmenter de manière dose-dépendante et significative ($p= 0,017 < 0,05$) chez les têtards traités par la concentration 0,75 mg/l et hautement significative ($p= 0,002 < 0,001$) chez les têtards traités par la plus forte concentration (1 mg/l) comparativement aux témoins.

En effet, pour la concentration 0,75 mg/l de Mancozèbe le taux de protéines augmente de 63% alors que chez les traités par la plus forte concentration (1 mg/l) le taux de protéines totales augmente de 79% par rapport aux témoins et témoins acétone.

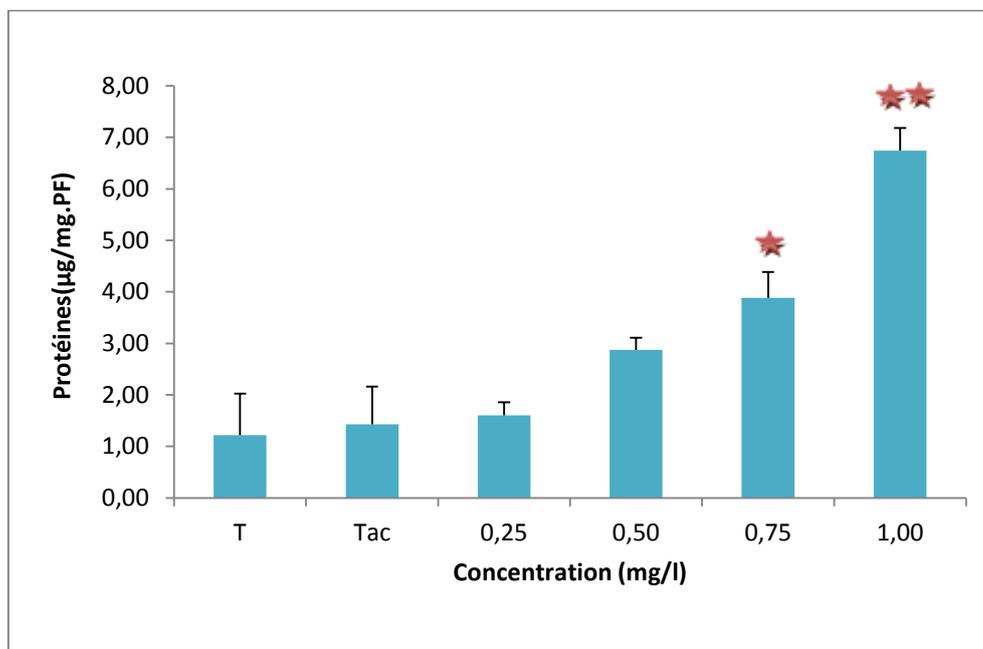


Figure 17: Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur les variations du taux moyen des protéines totales chez les têtards (*Rana Saharica*).

2.2. Evolution du taux du Glutathion:

La Figure (18) montre l'évolution du taux de GSH chez les têtards (*Rana saharica*) en réponse à un traitement avec des concentrations croissantes du mimétique œstrogène. Nous constatons qu'en présence du xénobiotique, le taux de GSH tend à diminuer d'une manière dose-dépendante et significative ($p= 0,042 < 0,05$) après quatre semaines. Cette diminution est de 32% chez les têtards traités par la concentration 0,25 mg/l alors que le taux du GSH diminue de 34% chez les traités par la plus forte concentration (1 mg/l) par rapport aux témoins.

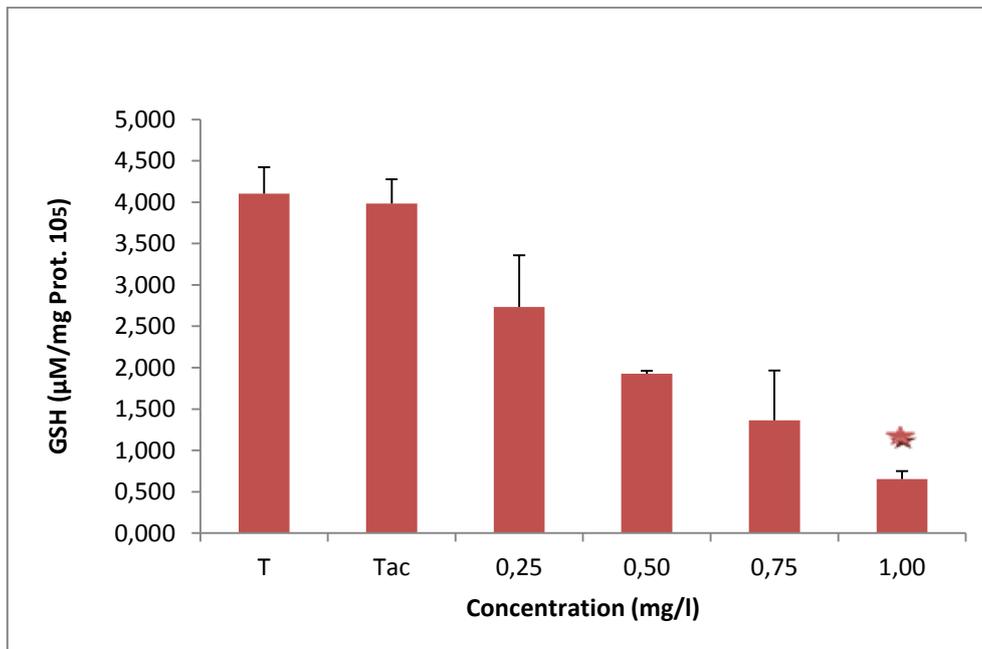


Figure 18: Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur les variations du taux moyen de GSH chez les têtards (*Rana Saharica*).

2.3. Evolution de l'activité Glutathion-S-transférase:

D'après la Figure (19) nous constatons que le traitement des têtards par des concentrations croissantes du mimétique œstrogène induit une augmentation significative ($p= 0,045 < 0,05$) de l'activité enzymatique GST par rapport aux témoins.

En effet, l'activité GST est de l'ordre de 0,015 nM/ mg de protéines chez les individus témoins et augmente d'environ 63% (0,032 nM/ mg) chez les têtards traités par la plus faible concentration (0,25 mg/l), tandis que cette augmentation est de 84% (0,093 nM/ mg) chez les têtards traités par la plus forte concentration (1 mg/l).

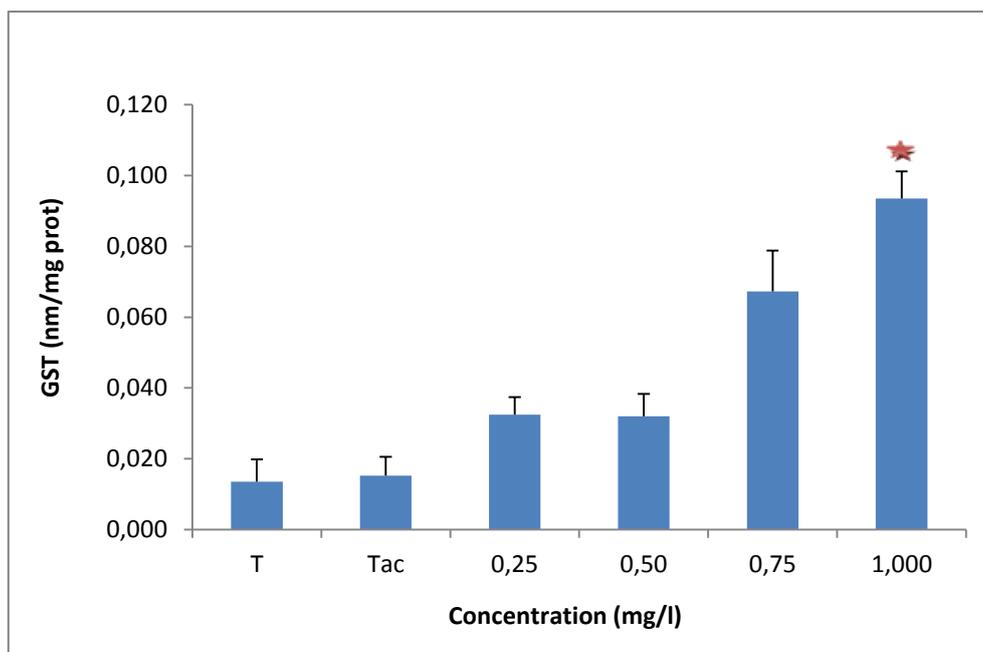


Figure 19: Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur l'évolution de l'activité de la GST chez les têtards (*Rana Saharica*).

2.4. Effet du Mancozèbe sur le métabolisme respiratoire des têtards (*Rana saharica*):

La figure (20) montre les effets de concentrations croissantes du Mancozèbe sur le métabolisme respiratoire des têtards et ce pour différents temps de traitement. Ainsi, nous constatons que chez les traités, la consommation d'oxygène du milieu par les têtards augmente de manière hautement significative ($p=0,000$) et dose-dépendante par rapport aux témoins. En effet, le taux d'oxygène consommé, après 72H de la réalisation de la méthode, diminue de 65 à 70% chez les têtards traités par toutes les concentrations de Mancozèbe par rapport aux témoins.

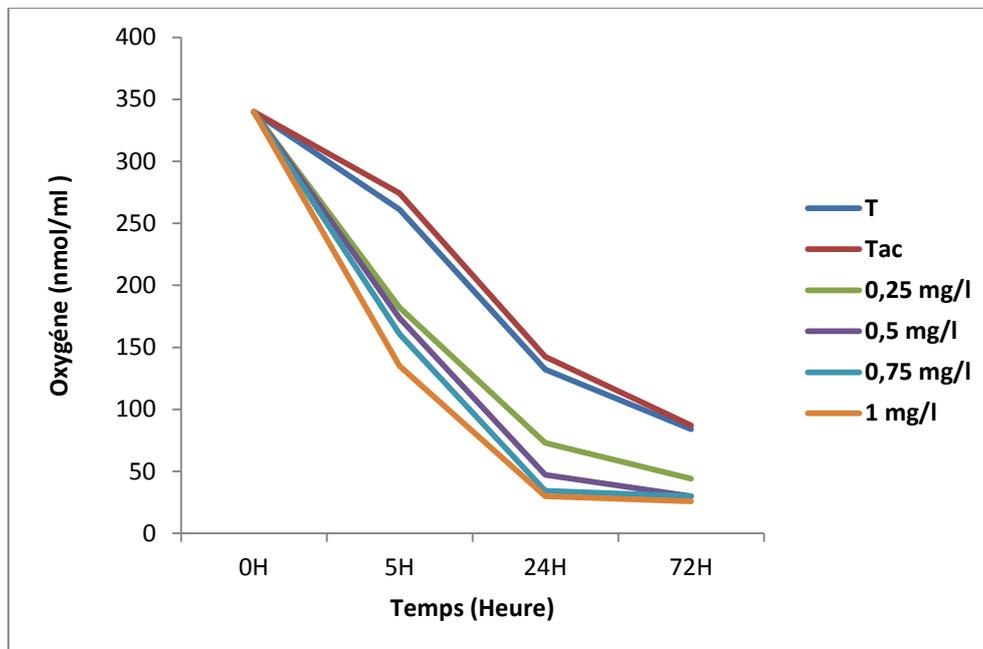


Figure 20: Variation du métabolisme respiratoire des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe.

2.5. Evolution du taux de d-ROMs chez les têtards (*Rana saharica*):

Le tableau (7) met en évidence l'évolution du taux de métabolites réactifs de l'oxygène dans le sang des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes du mimétique œstrogène fongique (le Mancozèbe).

Tableau 7: Variations quantitatives des métabolites réactifs de l'oxygène observées dans le sang des têtards témoins et traités par des concentrations croissantes de Mancozèbe.

	T	Tac	0,25 mg/l	0,5 mg/l	0,75 mg/l	1 mg/l
d-ROMs (U.Carré)	266	266	269	298	314	464

La coloration rouge indique un stress oxydatif.

Nos résultats montrent que dès la plus faible concentration de Mancozèbe, le taux de ROMs tend à augmenter de manière dose-dépendante. Chez les têtards traités par la concentration de 0,75mg/l le taux de métabolites réactifs de l'Oxygène (d-ROMs) est de 464 U.Carré confirmant ainsi l'installation d'un stress oxydatif.

2.6. Evolution de l'activité Catalase:

La Figure (21) illustre l'évolution de l'activité CAT chez les têtards de *Rana saharica* traités par les concentrations croissantes du mimétique œstrogène. Cette activité tend à augmenter de manière dose-dépendante et significative ($p = 0,038 < 0,05$) chez les têtards traités par la plus faible concentration (0,25 mg/l) et hautement significative ($p < 0,001$) chez les traités par les plus fortes concentrations comparativement aux témoins.

En effet, pour la plus faible concentration (0,25 mg/l de Mancozèbe) l'activité catalase augmente de 78% alors que chez les traités par les plus fortes concentrations l'activité catalase augmente de 80% à 85% et ce par rapport aux témoins.

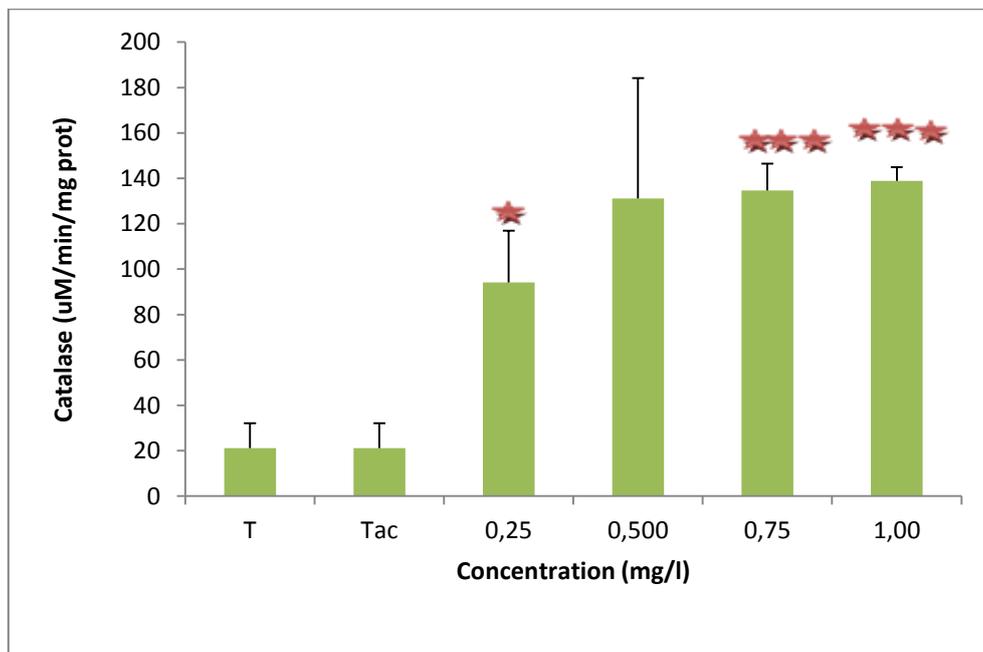


Figure 21: Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur l'évolution de l'activité CAT chez les têtards (*Rana Saharica*).

2.7. Evolution du taux du Malondialdéhyde:

La Figure (22) illustre l'évolution de la teneur en MDA chez les têtards soumis à un traitement par des concentrations croissantes de fongicide. Nous constatons que le taux de MDA tend à augmenter de façon dose-dépendante. Cette augmentation est significative ($p=0,039 < 0,05$) et est de l'ordre de 53% pour la concentration 0,75 mg/l de Mancozèbe et hautement significative ($p=0,019 < 0,01$) pour la plus forte concentration (1 mg/l) dont elle augmente de 63% par rapport aux témoins.

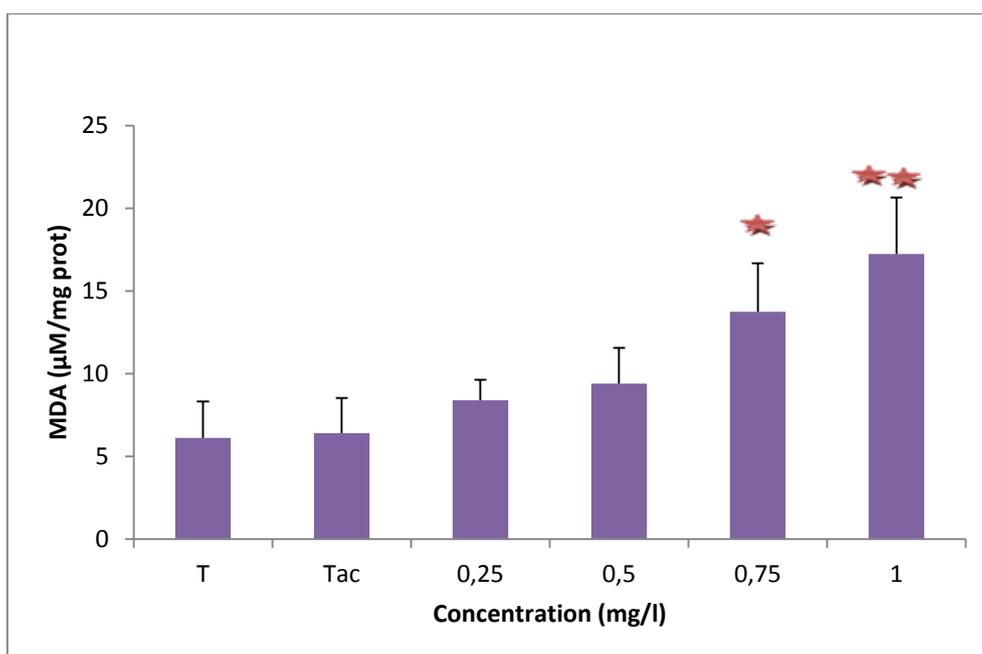


Figure 22: Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur les variations du taux moyen de MDA chez les têtards (*Rana Saharica*).

2.8. Evolution de l'activité Acétylcholinestérase:

La Figure (23) illustre l'effet du Mancozèbe sur l'activité choline-ésthérasique chez les têtards (*Rana saharica*). Nous constatons une diminution significative ($p=0,05$) de l'activité enzymatique AChE après une période d'exposition de 4 semaines (avant la métamorphose) qui passe de $1,55 \text{ nM/min/mg de protéines} \cdot 10^5$ chez les témoins à $0,44 \text{ nM/min/mg de protéines} \cdot 10^5$ chez les traités par la plus forte concentration (1 mg/l). Ainsi, cette activité diminue de 72% chez les traités par la plus forte concentration de Mancozèbe et ce par rapport aux témoins.

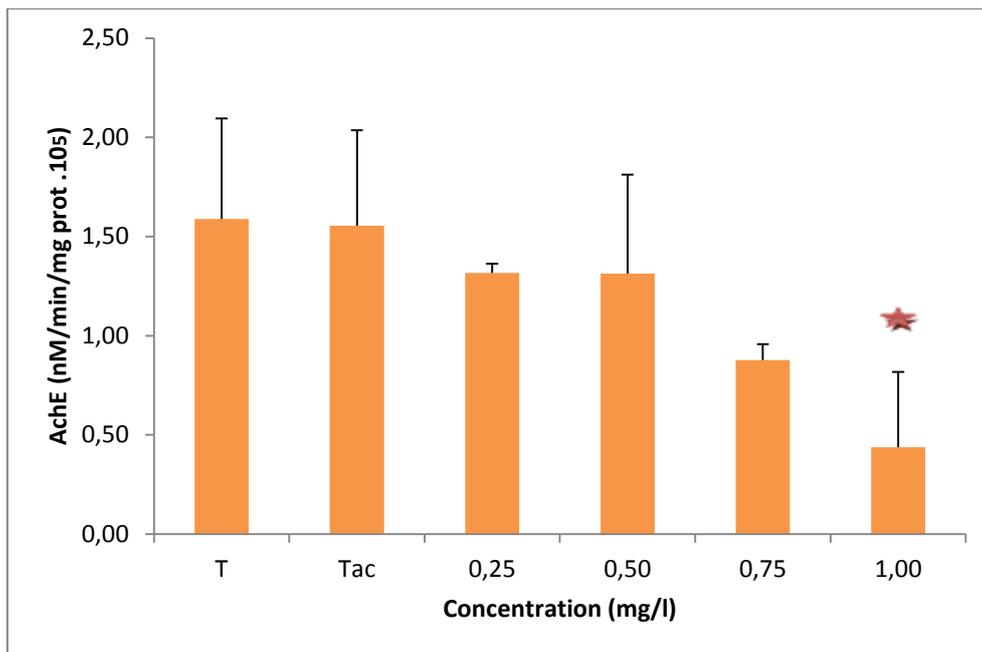


Figure 23: Effets des concentrations croissantes de Mancozèbe sur l'évolution de l'activité AchE chez les têtards (*Rana Saharica*).

2.9. Evolution du taux d'Œstradiol sanguin (E2):

La Figure (24) montre l'effet du Mancozèbe sur les variations du taux d'Œstradiol (E2) dans le sérum sanguin des têtards qui est considéré comme un biomarqueur d'exposition aux substances œstrogéniques. Nous constatons qu'au cours de la première semaine de traitement, les niveaux de E2 dans le sang sont stables et équivalents à ceux des témoins environ 20 pg/ml. Cependant à la cinquième semaine de traitement, nous constatons une augmentation du taux de l'E2 dans le sang particulièrement pour les plus fortes concentrations de mancozèbe (0,75 et 1 mg/l).

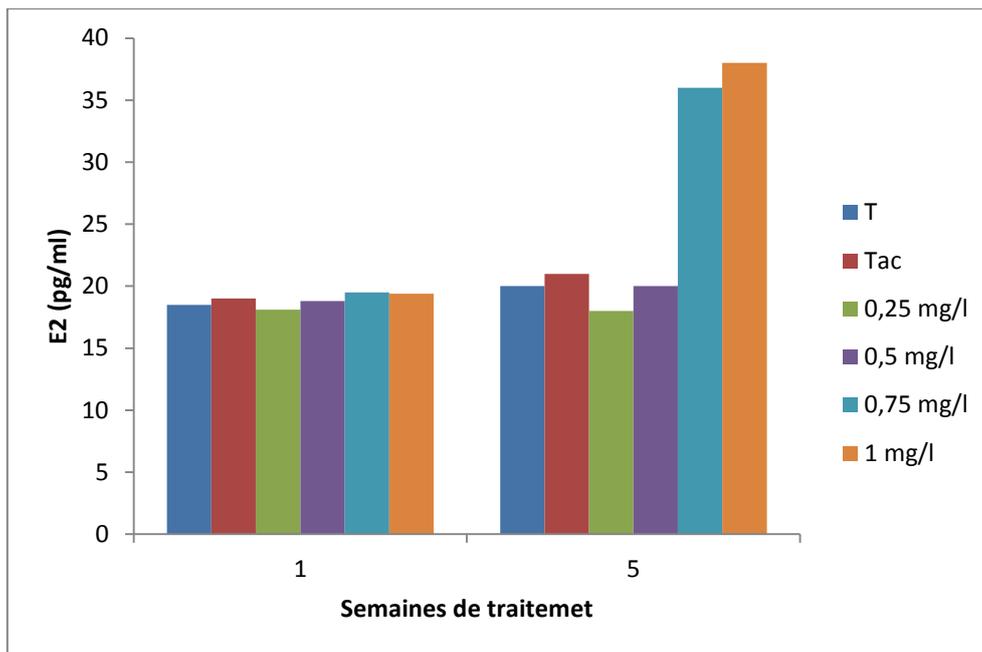


Figure 24: Effets des concentrations croissantes du Mancozèbe sur les variations du taux d'Œstradiol chez les têtards (*Rana Saharica*).

3. Etude histologique:

La planche (1) illustre l'aspect du tissu hépatique des têtards. L'examen histologique nous a permis de constater que le foie des têtards n'est pas divisé en lobules distincts comme chez la plupart des mammifères. Cependant, la périphérie des lobules est délimitée par les espaces portes et leur centre est occupé par une veine centrolobulaire (la veine porte VP) vers laquelle les sinusoides (S) convergent. Les espaces portes avec la veine porte (VP), comprennent des canaux lymphatiques (→) ainsi que les constituants de la triade portale soit la veine porte, une artère hépatique (A) et des canaux biliaires (CB). Nous remarquons également des rangées d'hépatocytes dont les canalicules biliaires (→) cheminant entre ces hépatocytes séparés par des sinusoides (S) (planche 1. a et b)

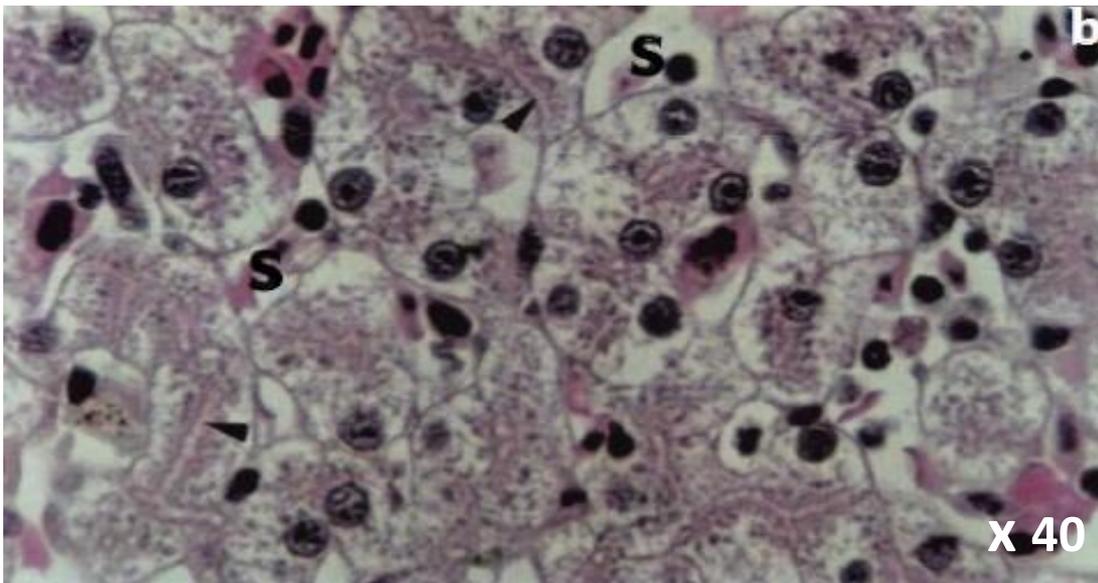
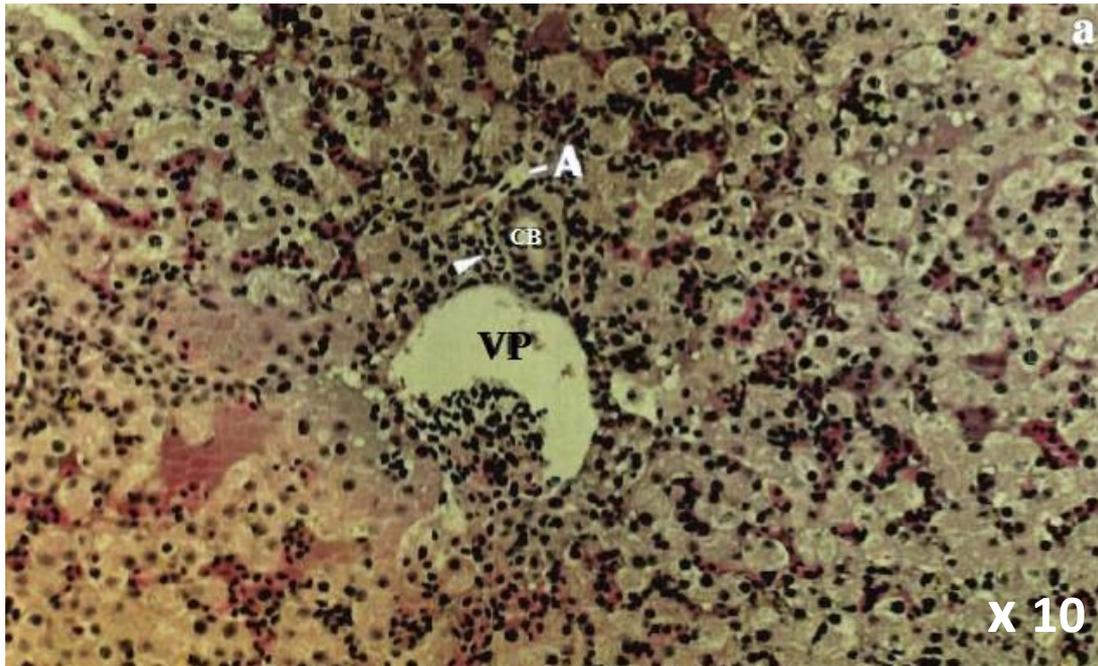


Planche 1: Coupe histologique au niveau du foie d'un têtard (*Rana saharica*) témoin.

Chez les traités, nous remarquons que les hépatocytes des têtards exposés au Mancozèbe (1mg/l), sont déformés avec une perturbation de l'architecture du tissu (Figure 26 a). Le cytoplasme des hépatocytes est plus aéré que la normale, les organites cellulaires (→) sont regroupés près des canalicules biliaires. Des zones de

parenchyme dans lesquelles le nombre élevé de cellules nécrosées donne un aspect mité sont observées chez ces individus (Figure 26 b).

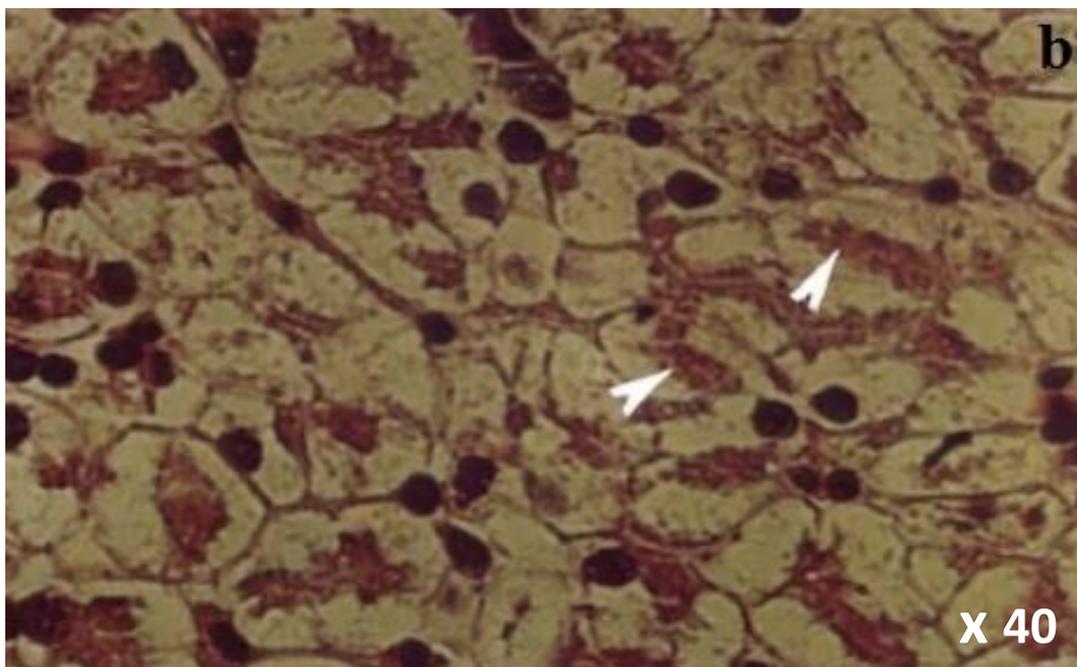
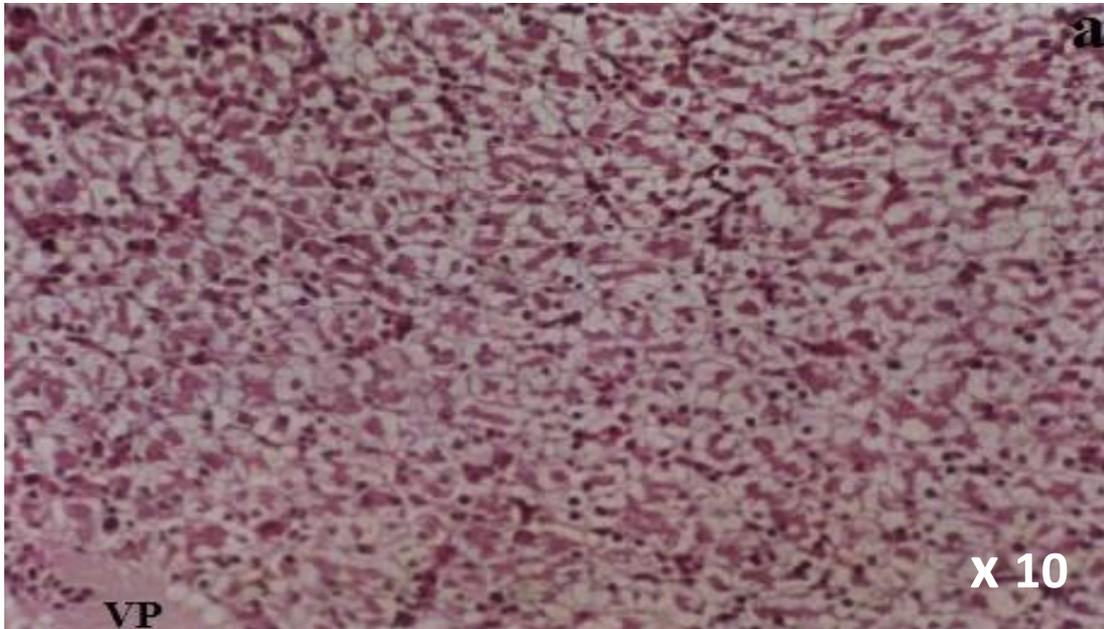


Planche2: Coupe histologique du foie d'un têtard (*Rana saharica*) exposé à 1 mg/l de Mancozèbe.

Chapitre IV:

Discussion

et

conclusion

Générale

Les espèces bioindicatrices de pollution environnementale, font l'objet de nombreux travaux, particulièrement les Amphibiens. Ainsi ces espèces sont sensibles aux variations physicochimiques de leur milieu, notamment la température, les fréquences électromagnétiques (Regoli et *al.*, 2005) et toute forme de pollution urbaine, mais ils sont également sensibles vis-à-vis des xénobiotiques variés tels que les xéno-œstrogènes qui sont considérés comme des perturbateurs endocriniens (Ismert et *al.*, 2002).

Nombreux sont les essais toxicologiques ayant mis en évidence la sensibilité des Amphibiens vis à vis d'une multitude de xénobiotiques toxiques. Hors la majorité des études concernant l'impact des xéno-œstrogènes est réalisée sur l'être humain. Leur impact sur la faune et la flore reste encore à élucider.

Plusieurs études sur les bioindicateurs, convergent vers l'idée que l'espèce de grenouilles *Rana saharica*. est un excellent modèle biologique pour les études toxicologiques et pour la compréhension des mécanismes d'action des xénobiotiques *in situ*. Dans ce travail, nous avons opté pour un type de toxicité nous permettant d'obtenir une réponse biologique en un temps assez court. En effet, la toxicité sublétales est nécessaire pour la compréhension des effets toxiques autres que létaux qui peuvent survenir le plus souvent dans les situations réelles de pollution de l'environnement. C'est dans ce contexte que se situe notre travail dont le but est d'étudier les conséquences d'une pollution par un mimétique œstrogène d'origine agricole sur une espèce d'Amphibiens, des têtards de la grenouille verte *Rana saharica*. **Ces espèces bio-indicatrices sont très sensibles aux moindres variations de l'écosystème et tout changement intervenant dans leur milieu pourrait avoir des conséquences sur leur développement embryonnaire et leur physiologie** (Joly, 2000).

En effet, une théorie concernant la survie et la santé des Amphibiens qui a été souvent proposée, invoque le concept selon lequel, l'acidification des étangs, constitue une menace pour leur survie; il en est de même concernant les variations de la température qui influent sur la croissance des têtards (Joly, 2000; Chagra et *al.*, 2007). Selon Jung et Jagoe (1995), un pH acide peut ralentir le développement des embryons et des têtards, particulièrement au moment de la métamorphose, avec un

effet négatif sur leur survie (Dunson et connell, 1982). Ainsi les travaux de Schonweger et *al.* (2000) et de Mann et Bidwell (2000) montrent qu'une température froide (entre 1 et 10°C) est néfaste pour le développement du têtard et que les températures variant entre 10 et 25°C sont les plus favorables. En revanche, Mikkelsen et Jenssen (2006) stipulent que la température idéale pour le développement des Amphibiens doit varier entre 16 et 20 °C.

Dans notre travail, nous avons choisi **des températures moyennes maintenues entre 13 et 16°C pour garantir des conditions favorables au développement des têtards.**

D'un autre côté, Il a été prouvé que les Amphibiens sont très sensibles aux variations physico-chimiques de leur biotope. De nombreux travaux , ont montré qu'un large éventail de contaminants et de polluants sont à l'origine de l'atteinte de la population d'Amphibiens dans leur durée de vie et leur diversité : pesticides, fongicides, herbicides et fertilisants et bien d'autres molécules (Sparling et *al.*, 2000). Tous ces xénobiotiques sont toxiques directement à travers une atteinte de l'environnement immédiat des animaux (milieu) ou indirectement en réduisant leur croissance par le biais d'une atteinte de leur système endocrinien ou en induisant une immuno-suppression (Sparling et *al.*, 2000). Par ailleurs, la nature et l'intensité des effets toxiques d'un fongicide sur un organisme dépendent de sa concentration dans les organes cibles. Cette concentration est liée à la dose administrée, à sa distribution et à son métabolisme (Muckter, 2003). Selon les travaux de Yoon et *al.* (2003), le traitement d'embryons de xénopes par des concentrations croissantes d'un fongicide (le benomyl) provoque non seulement une augmentation du nombre des malformations dès les plus faibles concentrations testées (5, 10, 15µM) mais aussi la mort de tous les embryons à la plus forte concentration (20µM).

Nos résultats, montrent qu'en présence du Mancozèbe, **la croissance des têtards est inhibée, la toxicité de ce xénobiotique chez les têtards se manifeste en premier lieu à travers un retard dans la croissance pondérale et de la taille** à toutes les concentrations testées (0.25, 0.50, 0.75et 1 mg/l). Cependant et à la plus

forte concentration, nous avons enregistré un taux de mortalité supérieur à 80% et après 5 semaines de traitement.

Si Castelle et *al.* (1994), affirment que les fongicides constituent une menace réelle pour la plupart des espèces d'Amphibiens, Bridges et Semlitsch (2000); Kiesecker et *al.* (2001); Yu et *al.* (2013) ont quand à eux expliqué cette toxicité par un dysfonctionnement au niveau du développement sexuel et une fréquence beaucoup plus élevée de malformations au cours du développement des Amphibiens soumis à un traitement par des fongicides. Ces malformations sont diverses et comprennent notamment des membres supplémentaires, des systèmes digestifs anormaux et une diminution de la taille et du poids des têtards. Selon Simmaco et *al.* (1998), ces malformations seraient dues à une diminution des concentrations d'hormones thyroïdiennes dans le sang des têtards exposés aux fongicides. Cette déplétion hormonale aurait des conséquences sur la métamorphose des animaux. Ainsi, Blaustein et Johnson (2003), confirment que le stress biotique est la principale cause de l'apparition de malformations chez les Amphibiens et contribue indirectement dans la suppression pure et simple de leur défense immunitaire.

Dans notre travail, nous avons également mis en évidence une diminution à la fois du poids et de la taille des têtards traités, confirmée par la valeur de l'indice de condition. **Ce retard de croissance peut perturber tout le métabolisme de l'animal y compris la maturation sexuelle** comme le suggère Laskowski et Hopkin (1996), qui confirment que l'inhibition de la croissance induite par les polluants peut induire des troubles comportementaux, métaboliques et/ou neuroendocriniens. Selon Paro et *al.* (2012) et Ksheerasagar et *al.* (2003) même les mammifères peuvent être affecter par le Mancozèbe (retard de croissance notamment) et ce dès les plus faibles concentrations.

De nombreux xénobiotiques tels que les fertilisants sont capables de réduire l'activité des larves d'Amphibiens et provoquer par là même des malformations pouvant altérer jusqu'à la paralysie ou la mort. Selon Marco et *al.* (1999); Ortiz et *al.* (2004) et Johnson et Chase (2004) l'eutrophisation des eaux favorise la malformation des grenouilles car il existe un lien direct entre un milieu contaminé et un taux élevé de difformités chez les Amphibiens (Ouellet, 1996; Linzey et *al.*, 2003), et selon Hall

et Henry (1992) les pesticides, herbicides ou métaux lourds peuvent affecter directement ou indirectement les Amphibiens et les Reptiles par accumulation dans leur organisme avec pour conséquence une toxicité plus ou moins importante (Hall, 1980; Hayes, 1997).

L'exposition aux xéno-oestrogènes avec toutes ses variétés perturbe divers paramètres comportementaux, physiologiques, anatomiques, génétiques et surtout biochimiques et endocrinologiques (Hyne et Maher, 2003).

Kubrak et *al.* (2012) ont rapporté une augmentation de la teneur en protéines dans le sang et les branchies du poisson rouge *Carassius auratus* exposés au Mancozèbe. Il en est de même des travaux de Chagra et *al.* (2007); Azzouz (2012) Amamra et *al.* (2015) et Boucenna (2009), qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents respectivement têtards, protistes ciliés ou encore gastéropodes. Cette augmentation du pools de protéines totales pourrait être due à l'activation de gènes dont le gène HSPs (Heat shock proteins / les protéines de choc thermique) responsable de l'induction du pool de protéines chez le têtard de *Rana saharica* soumis à un stress abiotique pouvant entraîner une forte mortalité comme le confirme Stegeman et *al.* (1992).

Nos résultats sont en accord avec les travaux suscités, en effet, nous avons pu mettre en évidence une atteinte du métabolisme des têtards à travers la perturbation du taux de protéines totales. Selon Lagadic *et al.* (1997) et Nzengue (2008) lorsque le changement (stress) n'est pas intense et les concentrations de xénobiotique dans l'organisme encore faibles, les têtards déploient une batterie de réponses à travers l'activation de leurs mécanismes de détoxification afin de lutter, de survivre et de s'acclimater à ce nouveau paramètre. Il en est ainsi de **l'induction des enzymes de la métabolisation/détoxification pour la prise en charge du xénobiotique tant que la balance xénobiotique/enzyme penche pour le second paramètre.**

Le système de détoxification impliqué dans la dégradation des pesticides est un mécanisme majeur dans l'organisme. En effet, l'organisme est doté d'une batterie de systèmes antioxydants dont certains comme la vitamine E, C, l'ubiquinone ou les caroténoïdes sont exogènes apportés principalement par les aliments et agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. D'autres composés endogènes jouent un rôle essentiel dans les phénomènes de biotransformation/détoxification à l'instar du glutathion qui intervient non seulement au cours de la phase II mais également comme piègeur de radicaux libres et de peroxydes (Nzengue, 2008). Ces molécules vont interrompre la chaîne de réaction radicalaire (Cadenas, 1989).

Parmi les enzymes intervenant dans la protection de l'organisme contre le stress oxydant, nous distinguons principalement : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX), ou encore la catalase (CAT). Ces enzymes sont également inductibles sous l'effet d'un stress chimique (Kappus, 1987; Winston et Di Giulio, 1991). De ce fait, ces systèmes enzymatiques sont considérés comme d'excellents biomarqueurs. L'inhibition ou l'induction *in vivo* des biomarqueurs est un bon outil pour évaluer l'exposition et les effets toxiques potentiels des xénobiotiques sur les organismes vivants. La capacité d'un organisme à s'adapter à un environnement altéré par la contamination anthropogénique, dépend principalement des mécanismes efficaces de la détoxification de divers composés endo et exogènes (Jakanovic, 2001). En effet, L'utilisation des biomarqueurs s'est généralisée, essentiellement chez les milieux marins (Livingstone, 1993) ainsi que les milieux dulçaquicoles qui sont largement soumis à diverses pollutions d'origine industrielle, agricole et domestique (Réseau du Bassin Adour-Garonne, 1997). Les effets des contaminants sur l'intégrité des tissus de divers organes sont mis en évidence chez plusieurs espèces de poissons marin et d'eau douce (Evans *et al.*, 2000; Hylland *et al.*, 2003).

Le GSH, est le thiol cellulaire le plus abondant, il est particulièrement important car c'est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes (Halliwell and Gutteridge, 1999), ainsi qu'il participe avec la glutathion réductase à l'établissement de ponts disulfures dans de nombreuses protéines et dans des hormones

polypeptidiques et prend part au métabolisme des xénobiotiques, il est impliqué dans les processus métaboliques et de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques d'une série de composés endogènes et exogènes, y compris des espèces réactives de l'oxygène (Meister et Anderson, 1983; Sies et Ketterer, 1988; Taniguchi et al., 1989). Les fonctions du GSH sont principalement dues à son caractère nucléophile. En effet, sa conjugaison aux composés électrophiles rend ceux-ci plus hydrosolubles et donc plus facilement transportables et excrétables de la cellule. De cette façon, il est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques, et joue notamment un rôle central dans la défense cellulaire contre le stress oxydant et les xénobiotiques (Choi et al., 1997). **Il intervient notamment dans la détoxification des xénobiotiques en neutralisant divers produits du stress oxydant grâce à son potentiel réducteur mais également dans la prolifération cellulaire et la régulation de l'apoptose** (Sies, 1999; Dringen, 2000). Une déficience en GSH expose les cellules à un risque de dommage oxydatif (Droge, 2002). Le maintien d'un niveau élevé de glutathion est donc essentielle pour prévenir d'éventuels dégâts oxydatifs.

Le Mancozèbe inducteur d'un stress oxydant ?

Afin d'évaluer la toxicité du fongicide mimétique oestrogène (le Mancozèbe) sur le métabolisme des têtards de *Rana saharica*., nous avons suivi l'évolution du taux de glutathion qui représente l'une des premières barrières contre la toxicité des xénobiotiques. Nos résultats révèlent une diminution dose-dépendante du taux de GSH. **Cette diminution est due à la mise en place des mécanismes de détoxification** comme le suggèrent Canesi et al., (1999). En effet, plusieurs études ont mis en évidence une diminution du taux de GSH en réponse chez *Rana ridibunda* traitée par des carbamates (Falfushinska et al., 2008) ou encore chez des larves de *Rhinella arenarum* après contamination par l'Azinphos-méthyl et le Carbaryl (Ferrari et al., 2011). Cette réduction du taux de GSH est également signalée chez les téléostéens d'eau douce *Channa punctatus* exposés aux métacide et aux carbaryl pendant 7 jours (Ghosh et al., 1993). Il en est de même pour les poissons *Oreochromis niloticus* après une exposition au Diazinon (insecticide organophosphoré) (Elwishy et al., 2007). Les travaux de Wu et al. (2011) montrent

que la présence de perturbateurs endocriniens tels que le Bisphénol A (BPA), le nonylphénol (NP) ainsi que leur mélange, dans les systèmes aquatiques, affectent les réponses antioxydantes du système GSH des embryons du poisson zèbre.

Cette diminution du taux de GSH chez les têtards est due d'une part à sa conjugaison spontanée aux toxiques ultimes et d'autre part à sa liaison à la GST. En effet, nos résultats révèlent une augmentation progressive de l'activité GST chez les têtards traités par le xéno-oestrogène fongique (Mancozèbe). Ce résultat est en accord avec les travaux de Zhang et *al.* (2013) qui mettent en évidence une augmentation de l'activité GST chez *Rana nigromaculata* suite à un traitement par une toxine bactérienne (microcystine-LR) ou encore ceux de Gillardin et *al.* (2009) qui ont étudié les effets de l'Aroclor 1254 (un polychlorobiphényle) sur l'induction du stress oxydatif chez les têtards de *Xenopus laevis*.

La glutathion-S-transférase (GST) représente une famille d'enzymes substrat-spécifiques qui catalysent la conjugaison du GSH avec les xénobiotiques dans la phase II de la métabolisation, favorisant ainsi leur élimination de l'organisme (Leaver et *al.*, 1992; Malmezat, 2000). Elle joue un rôle primordial dans le mécanisme de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la régulation de l'équilibre redox (Siritantikorn et *al.*, 2007), cette enzyme peut être affectée par des facteurs biotiques et abiotiques, elle est définie comme un biomarqueur de contamination par les xénobiotiques (Cantu-Medelli et *al.*, 2009; Bouhafs et *al.*, 2009). La mise en place de mécanismes de détoxification nécessite la présence de la GST pour neutraliser les effets toxiques des xénobiotiques ; le rôle physiologique de l'activité GST dans la protection de l'organisme contre de nombreux toxiques est confirmé aussi bien chez les Amphibiens que chez d'autres espèces telles que les gastéropodes, en l'occurrence l'escargot *Helix aspersa*, comme le suggèrent les travaux de Grara (2011) et Boucenna (2009) qui ont étudié respectivement l'effet de polluants industriels et des ETM sur ces organismes. Même les microorganismes sont dotés de cette batterie d'enzymes, il en est ainsi des travaux de Azzouz (2012) sur la paramécie, qui a étudié l'impact de deux pesticides (AmistarXtra et Glyphosate) sur ce modèle cellulaire et mis en évidence l'induction des enzymes de

la métabolisation chez cette dernière, particulièrement la GST, ou encore les travaux de Amamra et *al.* (2015) qui ont confirmé l'induction de cette enzyme chez les paramécies traitées par la Cyperméthrine.

La combinaison directe de l'oxygène introduit dans les cellules avec des électrons implique la formation d'anions superoxydes, à l'origine des phénomènes radicalaires, l'anion superoxyde peut alors dismuter soit spontanément, soit de manière enzymatique pour donner du peroxyde d'hydrogène H₂O₂, qui peut à son tour être transformé en radical hydroxyle OH°, le plus réactif des radicaux oxygénés libres (ROS).

La GST joue un rôle prépondérant dans le mécanisme de détoxification des xénobiotiques ; et comme pour le GSH dont la déplétion implique une toxicité, l'activité GST est également un biomarqueur fiable des capacités de détoxification d'un organisme. Toutefois, la vie en aérobie se traduit au niveau cellulaire par l'existence d'une chaîne respiratoire mitochondriale (Curtay et Robin, 2000); au niveau de laquelle l'oxygène est normalement transformé en eau. Cette réaction de réduction implique quatre électrons, et a lieu grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes (cytochromes). Elle permet d'apporter à la cellule toute l'énergie nécessaire sous forme d'Adénosine triphosphate (ATP) pour assurer ses fonctions vitales et **toute perturbation au sein de cet organite cellulaire peut avoir une influence directe sur le système ADME**. En effet durant la phase I de la métabolisation/biotransformation, un atome d'oxygène est introduit au niveau du xénobiotique par le biais d'un système enzymatique :monoxygénases à cytochrome P450 (Gueye, 2007), ceci laisse suggérer une disponibilité de l'oxygène du milieu assez suffisante pour permettre le bon fonctionnement des enzymes de la phase I.

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à la consommation d'oxygène du milieu par les têtards, notre but étant de prouver qu'une altération du métabolisme respiratoire suggérant d'une manière indirecte une atteinte mitochondriale. Les réserves énergétiques sont considérées comme des biomarqueurs qui permettent de refléter les changements subléthaux résultant d'un stress suite à une exposition aux xénobiotiques (Lagadic et *al.*, 1994). L'importance

de la déplétion énergétique pourrait refléter la puissance du stress subi (Rajalekshmi et *al.*, 1993).

Au moment de l'élimination des xénobiotiques, les électrons produits lors de la détoxification de l'organisme par les cytochromes P450 (CYP450), réagiront avec l'oxygène (Guengerich, 1991). L'oxygène peut également réagir avec les électrons qui s'échappent de la chaîne respiratoire mitochondriale (Sbartai et *al.*, 2009; Bouaricha et *al.*, 2012). Nos résultats **indiquent une diminution dose-dépendante de l'oxygène du milieu confirmant ainsi la mobilisation du CYP450 et les monooxygénases d'un côté mais suggérant également la possibilité de l'installation d'un stress oxydant**. Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Chagra et *al.* (2007) qui ont étudié l'effet d'un fongicide: Artea 330 EC sur la physiologie et le métabolisme respiratoire des têtards de *Rana saharica* et Orlofske et Hopkins (2009) qui ont étudié le métabolisme énergétique lors du paroxysme métamorphique chez la grenouille des marais *Lithobates palustris*. Le processus mitochondrial n'est toutefois pas parfait, car 2 à 5% de l'oxygène est transformé en espèces réactives oxygénées (ERO) ou reactive oxygen species (ROS) (Gueye, 2007); qui sont des formes variées de l'oxygène actif, et incluent les radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et les espèces non radicalaires qui peuvent être facilement transformées en radicaux comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Halliwell et Whiteman, 2004).

Les radicaux libres oxygénés sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe (Gueye, 2007). Cela leur confère une grande réactivité chimique (Dacosta, 2003). Leur hyperréactivité les engage dans des réactions de dénaturation des constituants cellulaires de type peroxydation avec les glucides, les lipides, les protéines et l'ADN, formants des produits très instables, ceux ci donnent lieu à des réactions en chaîne générant de nouveaux radicaux libres (Curtay et Robin, 2000). **L'espèce réactive primaire de l'oxygène est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui résulte de la réduction univalente de l'oxygène moléculaire. Une grande partie de l'anion superoxyde est transformée en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sous l'effet d'une enzyme, le superoxyde dismutase (Milane, 2004). A son tour, le peroxyde d'hydrogène selon la**

réaction de Fenton peut se décomposer en présence de cuivre cuivreux ou fer ferreux pour donner une espèce hautement réactive et à durée de vie très courte, le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) (Nzengue, 2008).

Le stress oxydatif est la conséquence d'un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants dans lequel l'activité de l'oxydant est supérieure à la capacité de neutralisation d'antioxydants. (Lykkesfeldt et Svendsen, 2007).

L'effet du Mancozèbe sur le métabolisme respiratoire nous incite à nous intéresser à la production de ROS chez les têtards traités. Dans cette étude, nous évaluons l'effet du mimétique œstrogène sur le taux de ROS dans des échantillons de sang de têtards. Nous avons ciblé la concentration sanguine en hydroperoxydes, une classe d'espèces oxydantes chimiques appartenant au groupe le plus large de métabolites réactives de l'oxygène (Celi et *al.*, 2010). Les hydroperoxydes sont générés par l'oxydation de plusieurs molécules telles que des glucosides, des lipides, des acides aminés, des peptides, des protéines et des nucléotides. En présence de fer libre, **les hydroperoxydes peuvent générer des radicaux libres, ils sont considérés comme des marqueurs spécifiques des dommages oxydatifs.**

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un stress oxydatif particulièrement pour la plus forte concentration de mancozèbe. Or, il est admis que **lors de la formation de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène, l'organisme implique l'induction d'une batterie des réactions orientées vers la protection contre ces métabolites formés, principalement des réactions de dismutations (protection contre les anions superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$) ainsi que des réactions de dégradation des peroxydes d'hydrogène, grâce à des enzymes telles que la catalase et/ou la glutathion peroxydase (selon les réactions de Haber-Weiss et Fenton).**

La catalase est une enzyme du système antioxydant. Elle est majoritairement localisée dans le cytosol et dans les péroxysomes principalement du foie et des reins où elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire (Regoli et Principato, 1995). Sa rapidité est l'une de ses caractéristiques,

elle peut convertir 40 millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en une seule seconde. Elle apporte une information importante quant à l'exposition des organismes à des polluants inducteurs de stress oxydant et à leur capacité de défense vis-à-vis de ce dernier.

Dans notre travail nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité catalase chez les têtards traités par le Mancozèbe probablement en vue de la dégradation des radicaux oxygénés et la conversion du peroxyde d'hydrogène (toxique pour les cellules) en oxygène gazeux et en eau.

Cette augmentation de l'activité CAT est enregistrée également chez les grenouilles *Rana ridibunda* contaminées par des carbamates (Falfushinska et al., 2008), chez les mâles de *Rana nigromaculata* traités par la microcystine-LR (Zhang et al., 2013) ainsi que chez les têtards de *Xenopus laevis* traités par l'Aroclor 1254 (Gillardin et al., 2009). Cette induction de l'activité catalase est également mise en évidence chez d'autres espèces en l'occurrence des micro-organismes tels que les paramécies (Amamra et al., 2015), les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) (Cherit et Djebbar, 2013) ainsi que le gastéropode (*Helix aspersa*) (Belhouchet et al., 2012) soumis à des stress chimiques.

Lorsque les systèmes de défense antioxydants sont saturés, les ROS deviennent abondants et leur toxicité se manifeste notamment par le phénomène de peroxydation lipidique lui-même à l'origine d'une augmentation du taux de MDA, produit final de la peroxydation lipidique (Pellerin-Massicotte, 1994; Grundy et al., 1996). Les malondialdéhydes sont considérés comme des produits terminaux de l'oxydation des acides gras poly-insaturés et sont des biomarqueurs spécifiques (Box et al., 2007; Nesto et al., 2007). Ainsi, un taux élevé en MDA est observé chez des poissons et des moules après exposition au paraquat, au Cu et au Hg et à des sédiments contaminés par diverses substances chimiques (Di Giulio et al., 1993 ; Livingstone et al., 1993). Sbartai (2013) et Cherit et Djebbar (2013) ont aussi mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez respectivement *Pamamecuim sp* et *Saccharomyces cerevisiae* soumis à un stress oxydatif. selon Chandran et al. (2005) les taux du MDA sont élevés dans

l'hépatopancréas et le rein de l'escargot *Achatina fulica* lorsqu' il est exposé à des concentrations élevées de Cadmium et de Zinc. D'ailleurs, la peroxydation des lipides peut être stimulée non seulement par divers cations inorganiques (Geret et *al.*, 2002) mais également par les produits chimiques organiques (Livingstone et *al.*, 2000; Shaw et *al.*, 2004).

Plusieurs études ont montré l'exacerbation de la peroxydation lipidique chez les organismes aquatiques exposés à de fortes concentrations de substances toxiques, notamment les perturbateurs endocriniens (Ibn Hadj Hassine, 2014). Nos résultats ont mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez les têtards de *Rana saharica*. **Cette augmentation du taux de MDA confirme la saturation des systèmes antioxydants et vient conforter l'augmentation du taux de ROS dans le sang des têtards observée précédemment.**

Les radicaux libres ainsi produits entraînent également des désordres structuraux et fonctionnels dans la cellule. **L'attaque radicalaire des membranes provoque des perturbations de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques** (Lawton et Donaldson, 1991, Bouaricha et *al.*, 2012; Zeriri et *al.*, 2013); tous les composants peuvent être touchés : lipides, protéines et donc la membrane dans son ensemble (Halliwell et Chirico, 1993). Il en est de même de l'ADN dont l'attaque a pour conséquence l'augmentation des pathologies à caractère chronique (Curtin et *al.*, 2002).

Schelling et *al.* (1995) stipulent que **les effets spécifiques d'une attaque radicalaire se manifestent à l'échelle cellulaire par une peroxydation lipidique induisant des perturbations prononcées du fonctionnement cellulaire.**

Hormis les ROS, l'inhibition de l'acétylcholinesthérase est considérée comme un des biomarqueurs majeurs de la toxicité par les pesticides. En effet , de nombreux toxiques particulièrement les insecticides entraînent une accumulation du médiateur chimique dans les espaces synaptiques, provoquant ainsi une tétanie (Burgeot, 1996; Bairy, 2000). L'inhibition de cette enzyme est la réaction directe de l'organisme par rapport à la plupart des insecticides neurotoxiques. Comme le suggèrent Payne

et *al.* (1996) chez les poissons exposés aux organophosphorés ou encore Bouaricha et *al.* (2012) sur la paramécie traitée par le Proclaim.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la neurotoxicité du Mancozèbe principalement en raison de sa forte lipophilie et la mesure de l'activité AChE nous a révélé un effet neurotoxique du Mancozèbe.

Le produit de dégradation dans l'eau du Mancozèbe est connu pour affecter les fonctions endocrines (Bisson et Hontela, 2002; Hayes et *al.*, 2002). Il est de ce fait, étudié *in vivo* et *in vitro* en tant que biomarqueur d'exposition aux oestrogènes. Les travaux de Rouhani et *al.* (2005) montrent que les grenouilles sont très sensibles aux effluents d'eaux usées contenant divers composés oestrogéniques et même à des concentrations infimes, ces composés pourraient interférer avec la production de l'oestrogène dans les hépatocytes de la grenouille rousse (*Rana temporaria*).

Chez les grenouilles femelles matures, l'oestradiol (E2) est généralement synthétisés en réponse aux œstrogènes endogènes, puis libérés dans la circulation sanguine et stockés dans les ovocytes. Récemment, l'E2 principalement chez les mâles et les femelles immatures, a été proposé comme un biomarqueur utile pour évaluer la contamination oestrogénique dans les milieux aquatiques

Chez l'être humain, particulièrement l'homme, bien que l'E2 est présent, il est silencieux (inactif) ; cependant à la présence des xéno-oestrogènes à certaines concentrations il devient actif (Matozzo et *al.*, 2008).

Les oestrogènes jouent un rôle central dans la physiologie de la reproduction et dans la différenciation sexuelle. Dans cette optique, la plupart des effets indésirables rapportés chez les poissons exposés aux oestrogènes environnementaux sont liés à la différenciation sexuelle et de la reproduction (Matozzo et *al.*, 2008). Quelques insecticides agonistes des stéroïdes comme le tébufénozide ou le methoxyfénoside perturbent les paramètres de la reproduction, la composition biochimique des ovaires et le taux de l'hormone de mue chez *Ephestia kuehniella* (Hami et *al.*, 2005). Mitsui et *al.* (2007) a réalisé des travaux sur l'activation de la Vitellogénine par des oestrogènes naturels, des œstrogènes

synthétiques, des phytoestrogènes, et des xéno-œstrogènes cultivées dans des hépatocytes primaires de *Xenopus laevis*, réalisé par un système de dosage immuno-enzymatique (ELISA), avait marqué une forte activation des oestrogènes naturels par rapport aux autres qui était très faible. Contrairement à Hishida (1965) qui a étudié le taux d'accumulation de l'Estrone-16-C¹⁴ et de la Diethylstilbestrol- (monioethyl-1- C¹⁴) dans les gonades des larves de medaka (*Oryzias latipes*) et trouvait une accumulation active de l'oestrogène, par conséquent à ces résultats, des inversions de sexe ont été obtenus chez les males des medaka.

Les travaux de Villeneuve et *al.* (2011) montrent qu'une exposition des poissons à 10 µg de BPA (xéno-œstrogène) via leur environnement aquatique provoque une induction significative d'E2 (œstradiol) considéré comme un biomarqueur d'exposition aux substances oestrogéniques.

Nos résultats abondent dans le même sens que ceux de Legler et *al.* (2000) et Villeneuve et *al.* (2011) et confirment **les perturbations et induction de l'activité oestrogénique (E2) qui est considéré comme un biomarqueur d'exposition aux substances œstrogéniques dans le sérum sanguin des têtards vertes de *Rana saharica*.**

L'autre aspect que nous avons abordé dans ce travail, concerne les éventuelles perturbations tissulaires pouvant être générées par la présence de Mancozèbe dans le milieu des têtards.

Nous nous sommes focalisés sur le foie en raison de forte implication dans le phénomène de métabolisation et parce que cet organe est le passage obligé de la plus-part des xénobiotiques.

Les principales affections hépatiques que nous avons observées sont principalement **une vacuolisation, une perturbation de l'architecture tissulaire causée par la déformation des hépatocytes et la nécrose des hépatocytes.**

Nos résultats corroborent ceux de Mantecca et *al.* (2006) qui ont également mis en évidence une vacuolisation, une perturbation de l'architecture normale des travées, une pycnose des noyaux indicatrice d'une nécrose hépatocytaire, une dégénérescence vacuolaire et des perturbations lipidiques au niveau des hépatocytes de larves de *Xenopus laevis* exposés à 25 ppb de Paraquat pendant 20 jours. Les auteurs attribuent l'apparition de ces lésions hépatiques à une atteinte cytolytique directe.

En conclusion de ce travail, le Mancozèbe fongicide mimétique œstrogène est toxique et cette toxicité se manifeste dans un premier temps par la perturbation de certains paramètres biométriques et physiologiques des têtards tels qu'un retard de croissance pondéral et linéaire, ainsi qu'une mortalité et des malformations.

Sur le plan biochimique et métabolique, nous avons mis en évidence une perturbation du taux de protéines totales, une induction des enzymes antioxydantes (CAT, GST) ainsi qu'une perturbation de l'activité GSH parallèlement à une augmentation du taux de MDA.

Nos résultats ont aussi montré une neurotoxicité du Mancozèbe traduite par une inhibition de l'AchE. Sur le plan endocrinologique, une perturbation du taux d'œstrogènes est assumée. La toxicité du Mancozèbe est confirmée d'un côté par la perturbation du métabolisme respiratoire à travers une augmentation de la consommation d'O₂ chez les têtards traités et une induction des ROS à travers l'augmentation du taux du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans le sang.

En complément de nos résultats nous avons mis en évidence des atteintes tissulaires et des nécroses au niveau des hépatocytes et vacuolisations cytoplasmiques dues à une stéatose hépatique (une accumulation de lipides) causées par le Mancozèbe chez les têtards.

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

Toutes les observations convergent vers une induction d'un stress oxydatif.

Perspectives

Au terme de cette recherche, il serait intéressant d'orienter nos investigations vers certains aspects non encore élucidés tels:

- Le suivi des effets du Mancozèbe au-delà du stade larvaire.
- Le dosage de la vitellogénine.
- Entreprendre d'autres expérimentations avec d'autres xénobiotiques considérés comme perturbateurs endocriniens.
- Rechercher d'éventuelles effets géno-toxicologiques.

Références bibliographiques

Abbot W. B., (1925): A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Jornal of Economic Entonology*. 18: 265-267.

Aït-Aïssa S., Palluel O., Porcher J.M., (2003); Biomarqueurs précoces d'écotoxicité. Rapport final BCRD, Ministère de l'Ecologie du Développement Durable, INERIS, Paris.

Alberti A., Bolognini L., Macciantelli D., Caratelli M., (2000): The radical cation of N,N-diethyl-para-phenylendiamine: a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Research on Chemical Intermediates*. 26: 253–267.

Amamra R., Djebbar M.R., Grara N., Moumeni O., Otmani H, Alayat A., Berrebbah H., (2015): Cypermethrin-Induces Oxidative Stress to the Freshwater Ciliate Model: *Paramecium tetraurelia*. *Annual Research & Review in Biology*. 5(5): 385-399.

Ankley G.T., Tietge J. E., Defoe D.L., Jensen K.M., Holcombe G.W., Durhan E.J., Diamond S.A., (1998): Effects of ultraviolet light and methoprene on survival and development of *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17: 2530-2542.

Antunes M., Da Cunha L., (2002): Skeletal anomalies in *Gobius niger*(Gobiidae) from Sado estuary, Portugal. *Cybiurn*. 26(3): 179-184.

Aubert C., (1987): Les grenouilles et l'éventualité de leur élevage en France, Ed. ITAVI Paris, 40 pages.

Azzouz Z., (2012): Etude des effets toxiques d'un fongicide (AmistarXtra) et d'un herbicide(Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Parameciumtetraurelia*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba.141 pages.

Baha El Din S., (2006): A guide to the reptiles and amphibians of Egypt. The American University in Cairo Press. 359 pages.

Bainy A.C.D., (2000): Biochemical responses in peneids caused by contaminants. *Aquaculture*. 191: 163-168.

Belhouchet N., Djebbar M. R., Meksem L., Grara N., Zeriri I., Berrebbah H., (2012): Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide: The Spinosad on an alternate model: *Helix aspersa*. *Annals of Applied Sciences Research*. 8(8): 4199-4206.

Bernabo I., Guardia A., La Russa D., Madeo G., Tripepi S., Brunelli E., (2013): Exposure and post-exposure effects of endosulfan on *Bufo bufo* tadpoles: Morpho-histological and ultrastructural study on epidermis and iNOS localization. *Aquatic Toxicology*. 142– 143:164–175.

Bernhoorn I.E.J., Van Vuren J.H.J., (2004): The use of different enzymes in feral freshwater fish as a tool for the assessment of water pollution in Africa; *Ecotoxicol. Environ. Saf* . 59: 180-185.

Blaustein A., Johnson P., (2003): The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 1: 87-94.

Botosoa J.A., (2010): Purification and partial chemical and biological characterization of the active extracts from leaves *Pechia madagascariensis* (APOCYNACEAE). PhD thesis, University of Antananarivo, Madagascar.

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

Bouaricha, H., (2013): Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium sp.*). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 55 pages.

Boucenna M., (2009): Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les aciéries 1et 2 du complexe sidérurgique d'EL-Hadjar sur un modèle bioaccumulateur *Helix aspersa*. Magister en biologie- Toxicologie. Université Badji Mokhtar d'Annaba, 85 pages.

Bouhafs N., Berrebbah H., Devaux A., Rouabhi R., Djebar M.R., (2009): Micronucleus Induction in Erythrocytes of Tadpole *Ranasaharica* (Green Frog of North Africa) Exposed to Artea 330EC. *American-Eurasian Journal of Toxicologic Sciences*. 1 (1): 07-12.

Box A., Sureda A., Galgani F., Pons A., Deudero S., (2007): Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146: 531–539.

Bradford M.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: 248-254.

Brahamia K., Semouk A., (2010): Tourist activity in a fragile snack space of El Kala National Park. El- Tawasso. 26 pages.

Brevini T.AL., Zanetto S.B., Cillo F., (2005): Effects of endocrine disruptors on developmental and reproductive functions. *Curr. Drug. Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 5(1): 1-10.

Bridges C. M., Semlitsch R. D., (2000): Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. *Conservation Biology* 14, 1490-1499.

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

Cachot J., Geffard O., Augagneur S., Lacroix S., Le Menach K., Peluhet L., Devier M.H., Couteau J., Pottier D., Budzinski H., (2006): Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic toxicology*. 79(3): 257-267.

Cachot J., Law M., Pottier D., Peluhet L., Norris M., Budzinski H., Winn R., (2007): Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka. *Environmental Science & Technology*. 41(22): 7830-7836.

Cadenas E., (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*. 58: 79-110.

Canesi L., Ciacci C., Piccoli G., Stocchi V., Viarengo A., Gallo G. (1998): *In vitro* and *in vivo* effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol*. 120: 261–268.

Chandran R., Sivakumar A., Mohandass S., Aruchami M., (2005): Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*. 140: 422–426.

Cantu-Medellin N., Olguin-Monroy N.O., Mendez-Rodríguez L.C., Zenteno-Savín T., (2009): Antioxidant Enzymes and Heavy Metal Levels in Tissues of the Black Chocolate Clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol*. 56:60–66.

Castelle A.J., Johnson A.W., Conolly C., (1994): Wetlands and Stream Buffer Size Requirements. A Review. *Journal of Environmental Quality*. 23: 878-882.

Celi P., Sullivan M., Evans D., (2010): The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood. *The Veterinary Journal*. 183: 217–218.

Cevasco A., Urbatzka R., Bottero S., Massari A., Pedemonte F., Kloas W., Mandich A., (2008): Endocrine disrupting chemicals (EDC) with (anti) estrogenic and (anti) androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis* : II. Effects on gonad histomorphology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*. 147(2): 241-251.

Chagra A., Rouabhi R., Berrebbah H., Djebbar M.R., (2007): The toxicity study of a systemic fungicide: artea 330 EC on the physiology and the respiratory metabolism of the tadpole (*Rana saharica*). *Commun Agric Appl Biol Sci*. 72(2): 191-195.

Chemicalinterest (2010): Juvenile Frog with tail top view.**JPG**.

Cheriet A., Djebbar M. R., (1013): Evaluation of dihydropyridine calcium antagonist effects on the stress bioindicator organism *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Biological Research*. 4 (10): 40-46.

Cheshenko K., Pakdel F., Segner H., Kah O., Eggen R.I., (2008): Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*. 155(1): 31-62.

Choi J., Liu R.M., Forman H.J., (1997): Adaptation to oxidative stress: quinone-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells. *Biochem Pharmacol*. 53 (7): 987-993.

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

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

Colborn T., Clement C., (1992): Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife human connection. In: Advances in modern environmental toxicology, Vol XXI. Princeton: NJ, Princeton Scientific Publishing Co, 403 pages.

Cosnefroy A., Brion F., B. Guillet B., Laville N., Porcher J.M., Balaguer P., Aït-Aïssa S., (2009): A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. Toxicology in Vitro. 23(8):1450–1454.

Curtay J.P., Robin J.M., (2000): Intérêt des complexes antioxydants. Nutrithérapie Info. 4 pages.

Curtin J.F., Donovan M., Cotter T.G., (2002): Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. Journal of immunological methods. 265: 49-72.

Dacosta Y., (2003): Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed).Paris. 317 pages.

Dagnelie P., (1999): Statistiques théoriques et appliquées. Tome 2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Univ De BOECK et LARCIER. 659 pages.

Debra E., (2005): How does the glass through which we view the world frame our view? Research and literacy policy. Melbourne Studies in Education. 46 (1): 63-72.

Djekoun M., Djebar M.R., Zaoui L., Bensoltan S., et Djebar H., (2012): Biochemical, Enzymatic and Energy Alteration observed in saccaromyces cervisiae subjected to oxidative stress. AEJTS. 2(1): 36-42.

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

Domico L.M., Zeevalk G.D., Bernard L.P., Cooper K.R., (2006): Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology* 27, 816–825.

Domico L.M., Cooper K.R., Bernard L.P., Zeevalk G.D., (2007): Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *NeuroToxicology*. 28: 1079–1091

Draper H. H., Hadley M., (1990): Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 186: 421–431.

Dringen R., (2000): Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 62: 649-671.

Droge W., (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82: 47- 95.

Dulčić J., Pallaoro A., Cetinić P., Kraljević M., Soldo A., Jardas, I., (2003): Age, growth and mortality of picarel, *Spicara smaris* L. (Pisces : Centranchidae), from the eastern Adriatic (Croatian coast). *Journal of Applied Ichthyology*. 19(1): 10-14.

Dunson W.A., Connell J., (1982): Specific-inhibition of hatching in amphibian embryos by low pH. *J. Herpetol*. 16: 314-316.

Echaubard M., (1995): L'environnement en France. Rapport sur l'état de l'environnement en France-Edition 1994-1995. *Le courrier de la Nature*. 152: 31-35.

EDSTAC., (1998): Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee Final Report. *Federal Register Notice*. 63(248): 71541-71568.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M., (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology and Physiology*. 38: 84-90.

Elnwishy N.H., Ahmed M.T., El-Sherif M.S., El-Hameed M.A., (2007): The Effect of Diazinon on Glutathine and Acetylcholinesterase in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Agriculture & Social Sciences. 2: 52-54.

European Commission, (1997): European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife : report of the proceedings. Brussels : European Commission. (EUR 17549).

Evans C., Hills J., Dickson M., (2000): Heavy metal pollution in Antarctica: a molecular ecotoxicological approach to exposure assessment. Journal of Fish Biology. 57: 8-19.

Falfushinska H., Romanchuk L. D., Stolyar O. B., (2008): Different responses of biochemical markers in frogs (*Rana ridibunda*) from urban and rural wetlands to the effect of carbamate fungicide. Comparative Biochemistry and Physiology.148: 223–229.

Fenoglio C., Grosso A., Boncompagni E., Gandini C., Milanesi G., Barni S., (2009): Exposure to heptachlor: evaluation of the effects on the larval and adult epidermis of *Rana kl. esculenta*. Aquat. Toxicol. 91: 151–160.

Ferrari A., Lascano C., Pechen de D'Angelo A.M., Venturino A., (2011): Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 153 (1): 34–39.

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

Gagnon M.M., Rawson C.A., (2009): Diuron increases spinal deformity in early-life-stage pink snapper *Pagrus auratus* . Marine pollution bulletin.58(7): 1083-1085.

Geniez P., Mateo J.A., Geniez M., Pether J., (2004): The amphibians and reptiles of the Western Sahara. Edition Chimaira. 229 pages.

Geret F., Jouan A., Turpin V., Bebianno M.J., Cosson R.P., (2002): Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalves mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 15: 61–66.

Germain P., Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V., (2006): Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 58: 685-704.

Ghosh P., Ghosh S., Bose S., Bhattacharya S., (1993): Glutathione depletion in the liver and kidney of *Channa punctatus* exposed to carbaryl and metacid-50. *Science of The Total Environment.* 134: 1641-645.

Gillardin V., Silvestre F., Divoy C., Thomé J. P., Kestemont P., (2009): Effects of Aroclor 1254 on oxidative stress in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 72 (2): 546–551.

Grara N., (2011): Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gasteropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, 120 pages.

Gronemeyer H., Gustafsson JA, Laudet V., (2004): Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov.* 3: 950-964.

Grundy M.M., Moore M.N., Howell S.M., Ratcliffe N.A., (1996): Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 34: 273-290.

Guengerich F.P., (1991): Reactions and significance of cytochrome P 450 enzymes. *Minireview. J. BiolChem.* 266: 10019-10022.

Gueye P. M., (2007): Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-erythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur Strosbourg. 247 pages.

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B., (1974): Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249 (22): 7130-7139.

Hagan J., Fisher J., Baldwin R., (1986): Subchronic Inhalation Toxicity Study in Rats: Mancozeb: Report No. 86R-003: Final Report. Unpublished study prepared by Rohm and Haas Co. 673 pages.

Hall R.J., (1980): Effects of environmental contaminants on reptiles: a review. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, special scientific report - wildlife no. 228. Washington D.C., USA. 12 pages.

Hall R. J., Henry P. F. P., (1992): Assessing effects of pesticides on amphibians and reptiles: Status and needs. *Herpetol. J.* 2(3): 65-71.

Halliwell B., Chirico S., (1993): Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 57: 715S-724S.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine: Oxford University Press.

Halliwell B., Whiteman M., (2004): Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology.* 142: 31-32.

Hami M., Taibi F., Smaghe G., Soltani-Mazouni N., (2005): Comparative toxicity of three ecdysone agonist insecticides against the Mediterranean flour moth. *Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University,* 70(4):767-773.

Hashimoto S., Bessho H., Hara A., Nakamura M., Iguchi T., Fujita K., (2000): Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder

Pleuronectes yokohamae from Tokyo Bay, Japan. Marine Environmental Research. 49(1): 37-53.

Hayes TB., (1997): Steroid-mimicking environmental contaminants: their potential role in amphibian declines. In: Herpetologia Bonnensis (Böhme W, Bischoff W, Ziegler T, eds). Bonn, Germany:SEH. 145–150.

Hellawell J.M., (1986): Biological Indicator of Freshwater Pollution and Environmental Management. Elsevier Applied Science Publishers, London. 188-188.

Hishida T.O., (1965): Accumulation of estrone-16-C¹⁴ and diethylstilbestrol- (monoethyl-1-C¹⁴) in larval gonads of the medaka Oryzias latipes, and determination of the minimum dosage of estrogen for sex reversal. General and Comparative Endocrinology. 5(2): 137-144.

Hylland K., Feist S., Thain J., Förlin L., (2003): Molecular/cellular processes and the health of the individual. In: Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses (eds. Lawrence A. J., Hemingway K. L.), Blackwell Sciences. 134-178.

Hyne R.V., Maher W.A., (2003): Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. Ecotoxicol. Environ. Saf. 54: 366-374.

Ibn Hadj Hassine A., (2014): Evaluation de l'activité oestrogénique de contaminants et développement d'un bio-recepteur d'affinité pour la detection d'une xéno-hormone. PhD Ecole National Supérieure des Mines. Saint-Etienne. 174 pages.

Ismert M., Oster T., Bagrel D., (2002): Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail Helix aspersa. Chemosphere. 46: 273-280.

Jakanovic M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicol. 166: 139- 160.

Johnson P.T.J., Chase J.M., (2004): Parasites in the food web: linking amphibian malformations and aquatic eutrophication. *Ecology Letters*. 7: 521–526.

Joly P., (2000): Invasions biologiques: état de l'art et perspectives. *Revue d'Ecologie (La Terre et la Vie)*. 7: 21-35.

Jung R.E., Jagoe C.H., (1995): Effects of low pH and aluminum on body size, swimming performance and susceptibility to predation of green treefrog (*Hyla cinerea*) tadpoles. *Canadian Journal of Zoology*. 73: 2171-2183.

Kappus H., (1987): "Oxidative stress in chemical toxicity." *Archives of toxicology*. 60 (1-3): 144-149.

Kavlock R.J., Daston G.P., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray L.E., Kaattari S., Tilson H.A., (1996): Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors : a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*. 104(4): 715-740.

Kerstant M., (1985): Age, growth, maturity and mortality estimates of horse mackerel *Trachurus trachurus* from the western West of Great Britain and Ireland in 1984. *Arch. Fishwiss*. 36 : 115-154.

Kessabi K., Annabi A., Navarro A., Casado M., Hwas Z., Saïd K., Messaoudi I, Piña B., (2012): Structural and molecular analysis of pollution-linked deformities in a natural *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821) population from the Tunisian coast. *Journal of Environmental Monitoring*. 14(8): 2254-2260.

Kiesecker J.M., Blaustein A.R., Belden L.K., (2001): Complex causes of amphibian population declines. *Nature*. 410: 681-684.

Kilk K., Meitern R., Härmson O., Soomets U., Hörak P., (2014): Assessment of oxidative stress in serum by d-ROMs test. *Free Radic Res*. 48(8): 883-889.

Kloas W., Lutz I., (2006): Amphibians as model to study endocrine disrupters. *Journal of Chromatography A*. 1130(1): 16-27.

Ksheerasagar R. L., Kaliwal B. B., (2003). Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 15: 9-17.

Kubrak O.I., Atamaniuk T.M., Husak V.V., Drohomiretska I.Z., Storey J.M., Storey K.B. , Lushchak V.I., (2012): Oxidative stress responses in blood and gills of *Carassius auratus* exposed to the mancozeb-containing carbamate fungicide Tattoo. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 85: 37–43.

Kyrou D., et al., (2009): Cynétique des paramètres hormonaux dans les cycles de stimulation par antagonistes et leur relation avec le taux de succès. *Hum Reprod*. 29: 2902-2909.

Lagadic L., Caquet T, Ramade F., (1994): The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*. 3: 193-208.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F., (1997): Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux, Paris. 1-10.

Larsson D.J., Förlin L., (2002): Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: temporary recovery after a short-term shutdown. *Environmental health perspectives*. 110(8): 739 pages.

Laskowski R., Hopkin S.P., (1996): Effect of Zn, Pb and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology Environmental Safety*. 34: 59-69.

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

Le cren E.D., (1951): The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight I and condition in the perch (*Perca fluviatilis*).I. Anion. Ecol. 20: 201-219.

Lefevre A.M., Chen I., Desreumaux P., Najib J., Fruchart J.C., Geboes K., Briggs M., Heyman R., Auwerx J., (1998): Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+mice. Nat. Med. 4: 1053–1057.

Linzey D.W., Burroughs J., Hudson L., Marini M., Robertson J., Bacon J.P., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S., (2003): Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. Int. J. Environ. Health Res. 13: 125-148.

Livingstone D.R., (1993): Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 57: 195- 211.

Livingstone D.R., Mitchelmore C.L., O'Hara S.C., Lemaire P., Sturve J., Forlin, L., (2000): Increased potential for NAD(P)H-dependent reactive oxygen species contaminants. Mar. Environ. Res. 50: 57–60.

Llorente G.A., Arano B., Carretero M.A., Garcia-paris M., Herrero P., Esteban M., (1996): Descripción de la larva de *Rana saharica* Boulenger, 1913. Bol. Asoc. Herpetol. Esp. 7:19-23.

Lykkesfeldt J., Svendsen O., (2007): Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. The Veterinary Journal. 173: 502–511.

Lyman W.R., Lacoste R.J., (1975): New developments in the chemistry and fate of ethylenebisdithiocarbamate fungicides. In Environmental Quality and Safety: Supplement Volume III: Pesticides: Lectures held at the IUPAC Third International Congress of Pesticide Chemistry, Helsinki, Finland, 67- 74

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

Mamou R., (2011): Contribution à la connaissance des amphibiens et des reptiles du Sud de la Kabylie (W. de Bouira et de Bordj Bou Arreridj). Magister Ecologie et Biologie des Populations. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, Algérie. 138 pages.

Mann R.M., Bidwell J.R., (2000): The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environmental Pollution.* 114: 195-205.

Mantecca P., Panseri S., Bacchetta R., Vismara C., Vailati G., Camatini M., (2006). Histopathological effects induced by paraquat during *Xenopus laevis* primary myogenesis. *Tissue Cell* 38: 209–217.

Matozzo V., Marin M.G., (2008): Can 17- β estradiol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 26(1): 38-44.

Marco A., Olson D. H., Reaser J.K., Anthony R.G., (1999): DNA repair and resistance to UV-B radiation in the western spotted frog complex, *Rana pretiosa* and *R. luteiventris*. *Ecological Applications.* 9: 1100–1105.

Martoja R., Martoja M., (1967): Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, 347 pages.

Meister A., Anderson M.E., (1983): Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711–760.

Mikkelsen M., Jenssen B.M., (2006): Polychlorinated biphenyls, sex steroid hormones and liver neoplasms in adult male European common frogs (*Rana temporaria*). *Chemosphere.* 63: 707-715.

Milane H. (2004). La quercétine et ses derives: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. These de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I. 155 pages.

Mitsui N., Tooi O., Kawahara A., (2007): Vitellogenin-inducing activities of natural, synthetic, and environmental estrogens in primary cultured (*Xenopus laevis*) hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 146(4): 581–587.

Moncuit T., (2006): Amphibiens. Grenouilles, crapauds, rainettes, tritons et salamandres. 192 pages.

Mückter H., (2003): What is toxicology and how does toxicity occur?. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology*. 17: 5–27.

Narbonne J.F, Garrigues P., Ribera D., Raoux C., Mathieu A., Lemaire P., Salaun J.P., Lafaurie M., (1991): Mixed function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring : field studies on the french coast of the mediterranean sea. *Comp. Biochem. Physiol.* 100: 37-42.

Nzengue Y., (2008): Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc: place des métallothionéines et de p53. Thèse de Doctorat. Université Joseph fourier– Grenoble. 297 pages.

Orlofske S.A., Hopkins W.A., (2009): Energetics of metamorphic climax in the pickerel frog (*Lithobates palustris*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A 154: 191–196.

Ortiz L.T., Rodriguez M.L., Alzueta C., Rebole A., Centeno C., Trevino J., (2004): Effect of carob (*Ceratonia siliqual.*) seed in broiler chick diets on nutrient digestibility and intestinal viscosity. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and oilseeds. Eds. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. Proceedings of the fourth international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds, Toledo, DSpain, 8-10 March 2004, 239-242.

OFSP., (2002): Office fédéral de la santé publique, Unité de direction Protection des consommateurs, Confédération Suisse. Fiche d'information Perturbateurs Endocriniens. Juillet 2002.

Parent L., (2009): Sabotage hormonale (Brochure). Comment des produits d'usage courant nuisent à notre santé.

Payne J.F., Mathieu A., Melvin W., Fancey L.L., (1996): Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin.* 32: 225-231.

Purdom C. E., Hardiman P. A., Bye V.V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P., (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology.* 8(4): 275-285

Paro R., Tiboni G.M., Buccione R., Rossi G., Cellini V., Canipari R., Cecconi S., (1012): The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 260: 155–161.

Pennec G.L., Pennec M.L., (2003): Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquat. Toxicol.* 64: 131–142.

Rajalekshmi P., Mohandas A., (1993): Effect of heavy metals on tissue glycogen in the freshwater mussel, *Lamellidens corrianus* (Lea). *Sci. Total Environ. Suppl.* 617-629.

Redouane S., (2004): Effet des rejets métalliques des acières du complexe sidérurgique d'El Hadjar de Annaba sur un modèle cellulaire marin : *Tetraselmis suecica*. *Revue des Sciences et de la Technologie Synthèse.* 22: 121 –124.

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

Regoli F., Gorbi S., Machella N., Tedesco S., Benedetti M., Bocchetti R., et al., (2005): Prooxidant effects of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EM) in the land snail *Helix aspersa*. *Free Radic Biol & Med* 39: 1620–1628.

Réseau du Bassin Adour-Garonne, (1997): Atlas et Données sur l'eau (Toulouse: Publications de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne), 149 pages.

Richert C., (1994): Comparaison de marqueurs biochimiques chez les poissons et d'indicateurs écologiques pour le diagnostic *in situ* de la pollution toxique dans les cours d'eau. Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 190 pages.

Rohm, Haas Co. (1975). Residues of Mancozeb and ETU in Apples and Processed Apple Products. Unpublished study. 7pages.

Rosenberry T.L., (1975): *Adv. Enzymol.* (1975), in press. 14. Rosenberry, T. L., Chen, Y. T. & Bock, E. *Biochemistry*. 13: 3068-3079.

Rouhani R.T., Sanderson J.T., van Holsteijn I., van Kooten P., Bosveld A.T.C., van den Berg M., (2005): Effects of environmental and natural estrogens on vitellogenin production in hepatocytes of the brown frog (*Rana temporaria*). *Aquat. Toxicol.* 71: 97–101.

Satterthwaite S., (1986): Analytical Reports of Mancozeb and ETU Residues for Processed Apple Samples: Tech. Report No. 310-86- 12. Unpublished study prepared by Rohm and Haas Co. in cooperation with Enviro-Bio-Tech, Ltd. 103 p.

Sbartai,I., (2013): Toxicite d'un Hydrazine carboxylate (Bifenzate) et d'un Oxidiazine (Indoxacarbe) observee chez un modele cellulaire d'eau douche: *Paramecium* sp. These de doctorat de l'universite d'Annaba, 132 pages.

Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi R., Sbartai H., Guy S., Djebbar M.R., (2009): Behavior of *Paramecium* sp. treated with Bifenazole with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. American-Eurasian Journal of Toxicological Science.1(1):13-18.

Segner H., Casanova-Nakayama A., Kase R., Tyler C.R., (2013): Impact of environmental estrogens on Yfish considering the diversity of estrogen signaling. General and Comparative Endocrinology, 191: 190-201.

Schonweger G., Schwerte T., Pelster B., (2000): Temperature-dependent development of cardiac activity in unrestrained larvae of the minnow Phoxinus-Phoxinus. American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology. 27: 1634-1640.

Shaw J.P., Large A.T., Donkin P., Evans S.V., Staff F.J., Livingstone D.R., Chipman J.K., Peters L.D., (2004): Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. Aquat. Toxicol. 67: 325–336.

Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyeck C., New hall A., Freidman L., (1966): A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. Analyt. Biochem. 19: 415-428.

Sies H., Ketterer B., (1988): Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance. Academic Press, London, 480 pages.

Sies H., (1999): Glutathione and role in cellular functions. Free Radical Biology & Medicine. 27: 916- 921.

Siritantikorn A., Johansson K., Ahlen K., Rinaldi R., Suthiphongchai T., Wilairat P., Morgenstern R., (2007): Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase 1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 355: 592–596.

Simmaco M., Mignogna G., Barra D., (1998): Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us?. *Biopolymers (Peptide Science)*. 47: 435-450.

Sparling D.W., Linder G., Bishop C.A., (2000): *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. In: SETAC Press, Pensacola, FL, 325.

Sridevi P., Chaitanya R.K., Prathibha Y., Balakrishna S.L., Dutta-Gupta A., Senthilkumaran B., (2013): Early exposure of 17 α -ethynylestradiol and diethylstilbestrol induces morphological changes and alters ovarian steroidogenic pathway enzyme gene expression in catfish, *Clarias gariepinus*. *Environmental toxicology*.

Stebbins R. C., Cohen N.W., (1995): *A Natural History of Amphibians*, Princeton University Press. 79-194.

Stegeman J.J., Brouwer M., Di Giulio R.T., Forlin L., Fowler B.A., Sanders B.M., Van Veld P.A., (1992): Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. - In: Huggett, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M. Jr., Bergman, H. L. (eds.). *Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, MI, USA: 253-336.

Stein R.S., Aykut A. Barka A.A., Dieterich J.H., (1997): Progressive failure on the North Anatolian fault since 1939 by earthquake stress triggering. *Geophysical Journal International*. 128: 594-604.

Sumpter J.P., Jobling S., (1995): Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103: 173-178.

Taniguchi N., Higashi T., Sakamoto Y., Meister A., (1989): *Glutathione Centennial: Molecular Perspectives and Clinical Applications*. Academic Press, London, 441 pages.

Tarquin, (2004): Frogspawn closeup.jpg

Taylor J.R., Selhorst J.B., Houff S.A., Martinez A.J., (1978): Chlordecone in toxication in man. I. Clinical observations. *Neurology*. 28 : 626-30.

Toft G., Guillette Jr L.J., (2005): Decreased sperm count and sexual behavior in mosquitofish exposed to water from a pesticide-contaminated lake. *Ecotoxicology and environmental safety*. 60(1): 15-20.

Trotti R., Carratelli M., Barbieri M., (2002): Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Medica*. 44: 37–40.

Urbatzka R., Bottero S., Mandich A., Lutz I., Kloas W., (2007): Endocrine disrupters with (anti) estrogenic and (anti) androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: I. Effects on sexsteroid levels and biomarker expression. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 144 (4): 310-318.

Van Aerle R., Nolanusan M., Jobling S., Christiansen L. B., Sumpter J. P., Tyler C. R., (2001): Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20(12): 2841-2847.

Villeneuve D.L., Garcia-Reyero N., Escalon B.L., Jensen K.M., Cavallin J.E., Makynen E., Durhan E., Kahl M.D., Thomas L.M., Perkins E.J., Ankley G.T., (2011): Ecotoxicogenomics to support ecological risk assessment: A case study with bisphenol A in fish. *Environ Sci Technol*. 46:51-59.

Vigano L., Arillo A., Bottero S., Massari A., Mandich A., (2001): First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). *Science of the total environment*. 269(1): 189-194.

Viridiflavus, (2006): *Rana TemporariaLarvaFinalStage.JPG*. Stage in the metamorphosis of the frog *Rana temporarialarva* with the deformed jaw, big eyes and a relic of the gill pocket Wageningen, The Netherlands.

Weckbercker G., Cory J.C., (1988): Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione -depleted mouse leukemia L 12: O Cells in vitro cancer. Letters. 40: 257-264.

Winston G.W., Di Giulio R.T., (1991): Prooxidant and anti- oxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19: 137-161.

Wu M., Xu H., Shen Y., Qiu W., Yang M., (2011): Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol and their mixture. Environ Toxicol Chem. 30: (10): 2335-2341.

Yamauchi K., Ishihara A., (2006): Thyroid system-disrupting chemicals : interference with thyroid hormone binding to plasma proteins and the cellular thyroid hormone signaling pathway. Reviews on Environmental Health. 21(4): 229- 252.

Yoon C.K., Jin J.H., Park J.H., Youn H.J., Cheong S.W., (2003): The fungicide benomyl inhibits differentiation of neural tissue in the *Xenopus* embryo and animal cap explants. Environmental Toxicology. 18: 327–337.

Yu S., Wages M.R., Cobb G.P., Maul J.D., (2013): Effects of chlorothalonil on development and growth of amphibian embryos and larvae. Environmental Pollution. 181: 329-34.

Zhang H., Cai C., Wu Y., Ye B., Han L., Shou X., Wang M., Wang J., Jia X., (2013): Toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male *Rana nigromaculata* in vitro. Aquatic Toxicology. 126: 283– 290.

Site web:

<http://3eme-annee.weebly.com/cycle-de-vie-de-la-grenouille.html>