



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث 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
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUEE

THESE

Présentée En Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat

Spécialité: Biologie Animale et Environnementale

Option: Reproduction et Développement

Intitulé

**Impact d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le novaluron,
sur le développement et la croissance d'un crustacé:
Palaemon adspersus.**

Présentée par: M^{lle}. Hamida BENRADIA

Membres de Jury:

M. Noureddine SOLTANI	Pr. Président	Université B.M-Annaba
M ^{me} . Hinda BENTOUBAL-BERGHICHE	Dr. Directeur de thèse	Université B.M-Annaba
M ^{me} . Samira KILANI-MORAKCHI	Pr. Examinatrice	Université B.M-Annaba
M. Hichem NASRI	Pr. Examineur	Université El-Tarf
M ^{me} . Nouha KAOUACHI	Dr Examinatrice	Université Souk-Ahras

Année Universitaire: 2015-2016.



Je dédie cette thèse à ma grand mère, qui aurait été certainement la plus heureuse en ce moment exceptionnel de ma vie. Malheureusement le seigneur l'a rappelé plus tôt. Où que tu sois, dans les cieux, je te dis infiniment merci, pour tout ce que tu as fait pour moi.

A ma mère pour elle et grâce à elle.

A mon fiancé : Ridha

A toute ma famille

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment,

Je dédis ce travail, fruit de patience et de persévérance.



وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا
وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفُلْكَ مَوَاجِرَ
فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ. وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ ﴿١٤﴾

Remerciements

Ma profonde et sincère considération à **M. Noureddine SOLTANI** (Professeur au Département de Biologie et Directeur du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Université Badji-Mokhtar) pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury. Je lui témoigne toute ma reconnaissance et ma gratitude de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

C'est un devoir d'exprimer toute ma gratitude et une infinie reconnaissance à **M^{me} Hinda BENTOUBAL-BERGHICHE** (Maître de Conférences au Département de Biologie, Université d'Annaba) pour avoir consacré beaucoup de son temps malgré ses nombreuses obligations et m'avoir dirigé et orienté dans la réalisation de cette thèse.


Toute ma considération à l'égard de **M^{me} Samira KILANI-MORAKCHI** Professeur au département de biologie à l'université Badji Mokhtar d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail. Je la remercie également de m'avoir aidé et initié à la technique de dosage de la chitine.

Mes plus vifs remerciements vont à **M. Hichem NASRI** (Professeur et Doyen à l'Université d'El-Taref) qui a bien voulu accepter d'être membre du jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Mes profonds remerciements vont également à **M^{me} Nouha KAOUACHI** (Maître de Conférences à l'Université Mohamed Chérif Messaadia de Souk Ahras, et Directeur du Laboratoire Des Ecosystèmes Aquatiques et Terrestres), qui a bien voulu accepter de faire partie de ce jury. Quelle trouve ici toute ma sympathie.

Mes remerciements vont également à mes remerciements à **M. Farid DERBAL** et **M. Hichem KARA** (Professeurs au Département de la Biologie Marine à l'Université Badji Mokhtar) pour avoir mis à ma disposition le matériel de pêche et initié à effectuer les échantillonnages.

Du plus profond du cœur je tiens à remercier **M^{me} Karima Sifi** (Maître de Conférences au département de biologie à l'université Badji Mokhtar) pour



sons soutien et de m'avoir encouragé au cours de mes premières années d'études. Merci infiniment.

Mes remerciements vont à l'ensemble des membres du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Université d'Annaba en particulier, **M^{me} Nadia SOLTANI-MAZOUNI** (Professeur, Université d'Annaba), **M^{me} Ouided DAAS** (Professeur, Université d'Annaba) **M^{me} Nadia ARIBI** (Professeur, Université d'Annaba), **M^{me} Dahbia HABES** (Professeur, Université d'Annaba), **M. Tarek DAAS** (Professeur, Université d'Annaba), et **M. Kamel KHALILI** (Professeur, Université d'Annaba) pour leurs orientations au cours de ma formation.

J'adresse également mes sincères remerciements à **M^{me} Dalila LADJAMA** et **M^{me} Zahra GUERFI** (Ingénieurs de Laboratoire de Biologie Animale Appliquée Université Badji-Mokhtar). Elles m'ont toujours facilité la tâche lors de mes dosages au laboratoire, je les remercie chaleureusement.

Je ne peux qu'exprimer mes sentiments d'amitié à **Mounira BOUGDAH**, **Raouf ZAIDI**, et **Abd El Haq BOUGATAYA** (Doctorants au Département de la Biologie Marine) qui m'ont soutenu le long de ce travail et aidé lors de mes sorties. Je dirai tous simplement mille mercis.

Je remercie également mes collègues **Bissel BOULAHBEL** et **Fethi BENSBA**A (Doctorants en Biologie Animale et Environnementale) qui m'ont beaucoup aidé et encouragé le long de ce travail.

Ma sympathie à l'adresse de tous le personnel de la lagune **EL-Mellah** (El-Kala) Wilaya d'El-Tarf pour leur aide et l'accueil lors des prélèvements des échantillonnages. Sans oublier Ami Moncéf.

Enfin, j'exprime mes plus vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.



« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information ».
Albert Einstein (1879-1955)

SOMMAIRE

1. Introduction	01
2. Matériel et méthodes	07
2.1. Présentation de l'espèce : <i>Palaemon adspersus</i>	07
2.1.1. Morphologie et anatomie d'une crevette.....	08
2.1.2. Cycle de vie et datation	09
2.2. Présentation du site d'échantillonnage.....	13
2.3. Stratégie d'échantillonnage et élevage.....	15
2.4. Dosage des biomarqueurs	18
2.4.1. Dosage de la glutathion S-transférase	18
2.4.2. Dosage de l'acétylcholinestérase	18
2.4.3. Dosage des protéines.....	19
2.5. Insecticide et traitement.....	20
2.6. Prélèvement des échantillons.....	21
2.7. Le dosage enzymo-immunologique des ecdystéroïdes.....	21
2.8. Détermination de la composition biochimique de la cuticule.....	23
2.9. Dosage de la chitine	23
2.10. Technique histologique	25
2.11. Analyse statistiques	26
3. Résultats.....	27
3.1. Détermination de l'activité enzymatique chez <i>P. adspersus</i>	23
3.1.1. Activité spécifique de la glutathion S-transférase.....	23
3.1.2. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase.....	28

3.2. Impact du novaluron sur la crevette <i>Palaemon adspersus</i>	30
3.2.1. Effet du novaluron sur les ecdystéroïdes	30
3.2.2. Effet du Novaluron sur la composition biochimique des cuticules	33
3.3.2.1. Effet sur le poids des cuticules	33
3.3.2.2. Effet du novaluron sur le contenu et le taux de la chitine	35
3.3.2.3. Effet sur les protéines cuticulaire	38
3.3.2.4. Effet sur le taux des sels calciques	39
3.2.3. Effet du novaluron sur la sécrétion cuticulaire	41
4. Discussion	44
4.1. Détermination de l'activité enzymatique chez <i>P. adspersus</i>	44
4.1.1. Activité spécifique de la glutathion-S-transférase	44
4.1.2. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase	46
4.2. Effet du novaluron sur la crevette <i>Palaemon adspersus</i>	47
4.2.1. Effet du novaluron sur les ecdystéroïdes hémolymphatiques	48
4.2.2. Effet du Novaluron sur la composition biochimique des cuticules	52
3.3.2.1. Effet sur le poids des cuticules	52
3.3.2.2. Effet du novaluron sur le contenu et le taux de la chitine	53
3.3.2.3. Effet sur les protéines cuticulaire	54
3.3.2.4. Effet sur le taux des sels calciques	55
4.2.3. Effet du novaluron sur la sécrétion cuticulaire	56
5. Conclusion et perspectives	58
6. Résumés	60
7. Références bibliographiques	66

Annexes

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Photographie de <i>Palaemon adspersus</i> (Rathke, 1837).	07
02	Morphologie (A) et anatomie (B) d'une crevette. (Anatomie d'une crevette: Crusta-Fauna.htm).	09
03	Cycle de vie de <i>P. adspersus</i> (Béguer, 2009).	10
04	Différents stades du cycle de mue d'après (Schiaivone, 2003) (A : post-mue, B: post-mue, C: inter-mue, D: pré-mue, E: exuviation).	12
05	Localisation géographique de la zone d'échantillonnage : la lagune El-Mellah, El-Kala (Algérie Nord-Est) (Benyacoub, 1996).	14
06	Photographie du site d'échantillonnage la lagune El-Mellah (photo personnelle).	14
07	Schéma du filet la senne (hauteur des ailes: 1,5m ; la poche: 1,6m ; maille: 4 mm) (photo personnelle).	15
08	Localisation des trois sites d'échantillonnage au niveau de la lagune El-Mellah El-Kala (site 1: zone d'étranglement du chenal qui débouche sur la méditerranée ; site 2: où déverse Oued El-Mellah au Sud: site 3: où se déverse Oued R'kibet à l'Ouest) (Figure personnelle).	16
09	Les différentes étapes de la technique de pêche de <i>P. adspersus</i> (A: tractage, B: triage, C: transport des crevettes D: élevage au laboratoire) (Photo personnelle).	17
10	Le novaluron (A: Formule de structure; B: structure 3D).	20
11	Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant le rapport B/B ₀ en fonction des concentrations molaires (M) de la 20- hydroxyecdysone (20E).	31
12	Effet du novaluron (CL ₅₀ = 0,91 µg/L et CL ₉₀ = 4,30 µg/L) sur la concentration des ecdystéroïdes hémolympatiques (pg 20E /µl d'hémolymphe) à différents stades du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> témoins et traitées (m ± SD, n = 4).	32
13	Durée relative des différents stades du cycle de mue de <i>P. adspersus</i> (← = un jour).	33
14	Effet du novaluron (CL ₅₀ = 0,91 µg /L et CL ₉₀ = 4,30 µg /L) sur le poids des cuticules à différents stades du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> témoins et traitées (m ± SD, n = 4-5).	34
15	Courbe étalon exprimant les densités optiques en fonction des quantités de glucosamine (µg).	35
16	Effet du novaluron (CL ₅₀ = 0,91 µg /L et CL ₉₀ = 4,30 µg /L) sur le contenu (µg de glucosamine/ mg de tissu) et le taux (%) de la chitine dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> témoins et traitées (m ± SD, n = 4-5).	37
17	Effet du novaluron (CL ₅₀ = 0,91 µg /L et CL ₉₀ = 4,30 µg /L) sur le taux (%) des protéines dans la cuticule aux différents stades du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> témoins et traitées (m ± SD, n = 8).	39
18	Effet du novaluron (CL ₅₀ = 0,91 µg/L et CL ₉₀ = 4,30 µg/L) sur le taux (%) des sels calciques dans la cuticule aux différents stades du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> témoins et traitées (m ± SD, n = 8).	40
19	Effet du novaluron (CL ₅₀ = 0,91 µg/L ; CL ₉₀ = 4,30 µg/L) sur l'épaisseur de la cuticule (µm) au cours du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> (m± SD, n= 4-7).	42
20	des coupes transversales de la cuticule chez les Témoins et les traités de <i>P. adspersus</i> durant le cycle de mue. (1) témoins: stages A-B, C, D; (2) Novaluron CL ₅₀ : stages A-B, C, D; (3) Novaluron CL ₉₀ : stages A-B, C, D. (e: epiderme; oc: exo cuticle; nc: nouvelle cuticle; es: espace exuvial	43
21	Schéma de conjugaison d'un substrat avec le glutathion réalisée par une GST.	45

22	Schéma de l'action d'un organophosphoré ou d'un carbamate sur le site actif de l'acétylcholinestérase (AchE).	46
23	Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule les processus de la mue chez les crustacés (modifié de Hyne, 2011 et Jubeaux, 2012). Flèche en vert : stimulation ; flèche en rouge : inhibition ; flèche en orange : sécrétion	49
24	La voie de la biosynthèse des ecdystéroïdes dans la glande de mue chez les crustacés. (Mykles, 2011).	50
25	Structure chimique de la chitine (Karine, 2012).	52

Liste des tableaux

N°	Titre	Pages
01	Les différents stades du cycle mue et leurs caractéristiques chez les Crustacés (Robertson <i>et al.</i> , 1987).	11
02	Dosage des protéines, réalisation de la gamme d'étalonnage.	20
03	Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) dans la chair de <i>P. adspersus</i> dans trois sites de la lagune El-Mellah durant l'été et l'automne des années 2013 et 2014 ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 7$).	28
04	Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) dans la tête des crevettes <i>P. adspersus</i> dans trois sites de la lagune El-Mellah durant l'été et l'automne des années 2013 et 2014 ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$).	30
05	Effet du novaluron ($\text{CL}_{50} = 0,91 \mu\text{g}/\text{L}$ et $\text{CL}_{90} = 4,30 \mu\text{g}/\text{L}$) sur la concentration des ecdystéroïdes hémolympatiques ($\text{pg } 20\text{E} / \mu\text{l}$ d'hémolymphe) à différents stades du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> témoins et traitées ($m \pm \text{SD}$, $n = 4$).	32
06	Effet du novaluron ($\text{CL}_{50} = 0,91 \mu\text{g} / \text{L}$ et $\text{CL}_{90} = 4,30 \mu\text{g} / \text{L}$) sur le poids des cuticules dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> témoins et traitées ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-5$).	34
07	Effet du novaluron ($\text{CL}_{50}=0,91\mu\text{g}/\text{L}$; $\text{CL}_{90}= 4,30 \mu\text{g}/\text{L}$) sur le contenu en chitine (μg de glucosamine/mg de tissu) au cours du cycle de mue chez <i>P.adspersus</i> ($m\pm \text{SD}$, $n= 4-7$).	36
08	Effet du novaluron ($\text{CL}_{50} = 0,91 \mu\text{g} / \text{L}$ et $\text{CL}_{90} = 4,30 \mu\text{g} / \text{L}$) sur le taux (%) de la chitine dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> témoins et traitées ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-5$).	37
09	Effet du novaluron ($\text{CL}_{50} = 0,91 \mu\text{g} / \text{L}$ et $\text{CL}_{90} = 4,30 \mu\text{g} / \text{L}$) sur le taux (%) des protéines dans la cuticule aux différents stades du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> témoins et traitées ($m \pm \text{SD}$, $n = 8$).	38
10	Effet du novaluron ($\text{CL}_{50} = 0,91 \mu\text{g} / \text{L}$ et $\text{CL}_{90} = 4,30 \mu\text{g} / \text{L}$) sur le taux (%) des sels calciques dans la cuticule aux différents stades du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> témoins et traitées ($m \pm \text{SD}$, $n = 8$).	40
11	Effet du novaluron ($\text{CL}= 0,91 \mu\text{g}/\text{L}$; $\text{CL}_{90}= 4,30 \mu\text{g}/\text{L}$) sur l'épaisseur de la cuticule (μm) au cours du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> ($m \pm \text{SD}$, $n= 4-7$).	42
12	Effet du novaluron ($\text{CL}_{50}= 0,91\mu\text{g}/\text{L}$ et $\text{CL}_{90}= 4,30 \mu\text{g}/\text{L}$) sur l'épaisseur de la nouvelle cuticule (μm) au stade D du cycle de mue chez <i>P. adspersus</i> ($m \pm \text{SD}$, $n= 4-7$).	42



Introduction générale

«J'affirme que le sentiment religieux cosmétique est le motif le plus puissant et le plus noble de la recherche scientifique.»

Albert Einstein

Introduction

Actuellement, la prise de conscience des problèmes environnementaux est réelle. Parmi les principales préoccupations exprimées par l'homme, figurent les pollutions directes liées à l'industrie et à l'utilisation massive et excessive des produits chimiques dans l'agriculture. Ces produits ont entraîné à long terme une altération des ressources naturelles, et un risque de dégradation accru de la qualité de l'environnement, se répercutant sur l'économie (Adamo *et al.*, 2008; An *et al.*, 2012; Ben Ameer *et al.*, 2012).

Compte tenu de son statut de réceptacle final, le milieu aquatique regroupe les écosystèmes les plus touchés directement ou indirectement par une grande variété de polluants toxiques. Environ 200 millions de tonnes de substances chimiques sont produites annuellement sur le marché européen (EEA, 2011). Plus de 100 000 molécules chimiques produites ou utilisées par les activités anthropiques (urbaines, industrielles et agricoles) sont rejetées dans tous les écosystèmes de la planète (Depledge & Galloway, 2005; Rao *et al.*, 2007). Et par le biais des eaux usées (domestiques et/ou industrielles) et le lessivage des sols lors des pluies finissent, ils par se retrouver dans les milieux aquatiques (Freitas *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2013).

Les écosystèmes aquatiques sont les plus exposés aux différents types de pollution, comme les rejets radioactifs, les matières organiques, les métaux lourds (Onivogui *et al.*, 2015; El Hassani *et al.*, 2016), les polychlorobiphényles (PCBs) (Kanzari *et al.*, 2014; Jayed *et al.*, 2015), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Simon, 2012; Souyei,

2015), les pesticides (Delorme *et al.*, 2002; Mokbel *et al.*, 2015) ou encore les substances médicamenteuses et les rejets de nanoparticules (Trabelsi & Dris, 2005; Buffet *et al.*, 2011). Toutes ces substances provoquent l'eutrophisation et la dégradation de la qualité des eaux (Ippolito *et al.*, 2012) tandis que leur bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire représente une grave menace pour la santé humaine mais aussi pour l'environnement (An *et al.*, 2012; Ben Ameur *et al.*, 2012).

Les pesticides sont actuellement utilisés dans de nombreux domaines comme la santé publique, l'hygiène vétérinaire, la protection des denrées alimentaires, les usages domestiques ou encore l'entretien des espaces publics. Cependant, ces produits restent principalement utilisés dans le domaine agricole afin d'accroître, de stabiliser les rendements et d'assurer une meilleure rentabilité de la production alimentaire (Nauen & Bretschneider, 2002; Calvet *et al.* 2005). Leur utilisation a également contribué à l'amélioration de la santé publique en luttant contre certains insectes vecteurs de maladies (Ramade, 2011). De ce fait, ils sont devenus un enjeu économique et sanitaire important. Néanmoins, leur utilisation massive dans l'environnement peut perturber plusieurs systèmes physiologiques tels que la croissance, la reproduction et le métabolisme des organismes non visés (Kegley *et al.*, 1999).

L'usage des pesticides en agriculture existe depuis des millénaires. D'abord, on utilisait des composés relativement simples à base d'arsenic, de soufre, de chaux, ensuite des dérivés du pétrole et des substances à base de fluor ou extraits de plantes comme la nicotine (Philogène *et al.*, 2002). Cependant, ce n'est qu'au XIXe siècle que l'utilisation des pesticides a connu un développement important justifié par l'accroissement démographique de la population humaine, l'affaiblissement des terres agricoles et l'apparition du machinisme agricole. Depuis, les traitements des cultures sont à base de sulfate de cuivre ou de mercure. Les insecticides tels l'arsénite de cuivre, l'acétoarsénite de cuivre, l'arséniate de plomb et le pyrèthre ont fait leur apparition.

Au cours de la seconde Guerre mondiale, les pesticides ont profité très largement du développement de la chimie organique avec l'apparition des insecticides de synthèse qui sont majoritairement des composés organochlorés. Le dichlorodophenyltrichloroethane (DDT) fut très efficace dans la lutte contre les insectes ravageurs comme les moustiques vecteurs du paludisme. D'autres organochlorés furent utilisés comme l'hexachlorocyclohexane (HCH) l'endosulfan, l'aldrine ou la dieldrine. Cependant, ces

molécules ont provoqué des effets secondaires; par leur bioaccumulation dans la chaîne alimentaire, leur rémanence et leur toxicité élevée chez les Mammifères (Hoffman & Lorenz, 1998; Bonde *et al.*, 2008). Aussi, l'apparition des espèces résistantes à ces pesticides a limité leur efficacité (Hemingway *et al.*, 2002).

Afin de faire face aux problèmes de toxicité, d'effets néfastes ou d'apparition d'espèces résistantes, les industries chimiques ont développé au cours de la seconde moitié du XXe siècle, une deuxième génération d'insecticides de synthèse dont le principe actif est différent. Ce sont les organophosphorés (téméphos, malathion), les carbamates (carbaryl, propoxur) et les pyréthrinoïdes de synthèse (perméthrine, deltaméthrine). Ces insecticides à action neurotoxique agissent sur le système nerveux des insectes, soit en bloquant l'acétylcholinestérase (organophosphorés et carbamates) soit en perturbant le fonctionnement des canaux sodium (pyréthrinoïdes) (Haubruge & Amichot, 1998). Leur forte capacité insecticide associée à une toxicité aigüe considérée modérée chez les mammifères et une stabilité relativement faible dans l'environnement (par rapport aux organochlorés) ont fait des organophosphorés et des carbamates, les principales classes d'insecticides les plus utilisés dans le monde (Casida & Durkin, 2013).

L'apparition des effets secondaires des insecticides (neurotoxiques) et les impératifs environnementaux, ont encouragé la recherche de méthodes alternatives de lutte contre les ravageurs et les vecteurs de maladies. Les recherches se sont tournées vers l'utilisation des pesticides naturels ou biopesticides (Maïza *et al.*, 2013; Tomè *et al.*, 2013; Cepeda-Palacios *et al.*, 2014). Les bactéries comme *Bacillus thuringiensis* peuvent être utilisées car elles produisent des endotoxines délétères pour l'insecte (Bravo *et al.*, 2011). D'autres familles d'insecticides agissent au niveau de cibles bien distinctes tels que les néonicotinoïdes (imidaclopride, acetamepride) mimant l'action de la nicotine *via* les récepteurs de l'acétylcholine (Tomizawa & Casida, 2003), les phénylpyrazoles (pyriprole) agissant sur les récepteurs GABAergiques (Nauen *et al.*, 2012), les oxadiazines ciblant les canaux sodium (Wing *et al.*, 2000) ou encore les régulateurs de croissance des insectes (Insect growth regulators: IGRs), renommés IGDs (Insect growth disruptors) ou perturbateurs de croissance des insectes appartenant aux insecticides de la troisième génération (Pener & Dhadialla, 2012).

Les IGDs présentent beaucoup d'avantage par rapport aux pesticides conventionnels, notamment une haute spécificité et une faible toxicité à l'égard des auxiliaires et des

Vertébrés (Dhadialla *et al.*, 2005; 2010; Pener & Dhadialla, 2012). Ils sont classés en 2 groupes selon leurs cibles d'actions. Le premier correspond à des substances qui perturbent l'action des hormones spécifiques des insectes, que ce soit en mimant, ou en inhibant l'action de l'hormone juvénile (Brook & McCaffery, 1990; Dhadialla *et al.*, 2005, Bensbaa *et al.*, 2015) et ecdysone (Tunaz & Uygun, 2004; Dhadialla *et al.*, 2005; 2010). Le second aux inhibiteurs de la synthèse de la chitine qui interviennent dans la formation de la cuticule (Tunaz & Uygun, 2004; Sun *et al.*, 2015).

Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine (un groupe de composés chimiquement différents) incluent les peptides de pyrimidine-nucléoside, les oxazolines, les thiazolidines, les tétrazines, les thiadiazines, les thiophthalimides, certains chromo-et fluorophores et les benzoylurées (Merzendorfer, 2013). Ces derniers empêchent la formation de structures chitineuses et interfèrent avec le processus de mue qui entrave le développement normal de l'exosquelette chez différents ordres d'insectes (Muthukrishna *et al.*, 2012). En raison de leur faible toxicité pour les mammifères et les insectes prédateurs, les benzoylurées sont largement utilisées dans les programmes de lutte intégrée et de gestion de la résistance aux insecticides (Sun *et al.*, 2015). En 2011, la part du marché mondial des benzoylurées est de 504 millions \$ US, soit 3,6%. Bien que ce taux soit faible, il n'en demeure pas moins qu'ils sont encore largement utilisés comme insecticides verts pour la protection des cultures agricoles et le contrôle des insectes nuisibles sanitaires, en particulier les mouches et les moustiques (Sparks 2013; Sun *et al.*, 2015).

Au cours des dernières décennies, plus de 10 000 composés benzoylurées sont synthétisés. Seulement 15 parmi ces derniers sont commercialisés (Sun *et al.*, 2015). Le diflubenzuron est le prototype des benzoylurées, développé et commercialisé dans les années 1970 par Dutch scientists from Philips-Duphar (van Daalen *et al.*, 1972). Depuis, plusieurs dérivés ont été établis et classés en trois générations selon la méthode de synthèse, la relation structure-activité (SAR), le mécanisme d'action, le comportement environnemental et l'écotoxicologie. Le diflubenzuron forme avec le dichlorbenzuron, le chlorbenzuron et le teflubenzuron la première génération des benzoylurées. La seconde génération, regroupe le penfluron, le triflumuron, l'hexaflumuron, le lufenuron, le bistrifluron, noviflumuron et le novaluron (qui va faire l'objet de cette étude). La troisième génération englobe le flufénoxuron, le flucycloxon, le chlorfluazuron et le fluazuron (Sun *et al.*, 2015).

Le novaluron, un composé inhibiteur de la synthèse de la chitine, appartenant à la classe des benzoylurées est très efficace contre les larves de moustique comme *Culiseta longiareolata* (Bouaziz *et al.*, 2011), *Aedes aegypti* (Farnesi *et al.*, 2012) et *Culex pipiens* (Djeghader *et al.*, 2013). Il agit en affectant la mue par le dépôt d'une endocuticule anormale (Farnesi *et al.*, 2012). En 2011, la part du marché mondial du novaluron était de 80,4 millions \$ US, classé troisième par rapport au montant de vente total des benzoylurées (Sun *et al.*, 2015). Il est désigné comme alternative à risque réduit par rapport aux organophosphorés, car il présente une faible toxicité aiguë pour les mammifères et ne présente aucun effet subchronique significatif chez les mammifères (EPA, 2001; FAO, 2003; FAO/WHO, 2005; PMRA, 2006). Selon ces agences internationales, le novaluron est considéré comme étant une molécule à faible risque pour l'environnement et pour les organismes non visés. Seulement, son utilisation pourrait contaminer les rivières qui déversent leurs polluants dans les milieux aquatiques, ce qui est le cas du golfe d'Annaba et des lacs du littoral de la région d'El-Kala (Nord-Algérie).

Par ses propriétés physicochimiques, le novaluron (FAO 2003) pourrait s'accumuler dans le sédiment et contaminer les crustacés aquatiques et particulièrement les crevettes, puisque toutes les étapes de leur cycle de vie sont en contact direct avec les sédiments. De plus, les crustacés représentent un groupe voisin des insectes qui sont caractérisés par la présence d'une cuticule chitino-protéique. De ce fait, ils peuvent être des cibles potentielles pour les inhibiteurs de la synthèse de la chitine. C'est dans ce contexte, que l'étude envisagée est en continuité avec les travaux antérieurs réalisés dans la lagune El-Mellah, notamment sur les Crustacés de la région qui ont fait l'objet de recherche sur des aspects physiologiques (Soltani & Bezzazel, 2002; Soltani *et al.*, 2002; Derbal & Soltani, 2008) et toxicologiques (Morsli & Soltani, 2003; Soltani *et al.*, 2009; Morsli *et al.*, 2015; Gheid *et al.*, 2011). Par ailleurs, en Algérie, très peu de travaux ont été consacrés à l'impact des inhibiteurs de la synthèse de la chitine sur les crustacés (Morsli & Soltani, 2003; Soltani *et al.*, 2009; Morsli *et al.*, 2015).

Les travaux de recherche de cette thèse s'inscrivent dans le cadre du projet de recherche du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée (2011-2015) «Biosurveillance de l'environnement: bioactivité des xénobiotiques et évaluation des risques» et consistent à utiliser la crevette *Palaemon adspersus* Rathke, 1837 (Decapoda, Palaemonidae) comme une

espèce modèle, pour son abondance dans la lagune El-Mellah (Nord-Algérie) et pour son importance dans le domaine de l'industrie de la pêche locale. Ainsi, ce travail consiste à:

- Évaluer la qualité des eaux de la lagune El-Mellah (El-Kala, Algérie) par la détermination de l'activité de deux biomarqueurs la glutathion S-transférase (GST) et l'acétylcholinestérase (AChE) chez *P. adspersus* durant deux saisons, l'été et l'automne de deux années consécutives (2013-2014) au niveau de trois sites dans la lagune.
- Examiner l'impact du novaluron, un inhibiteur de la synthèse de la chitine appartenant à la classe des benzoylurées sur le profil des ecdystéroïdes hémolymphatiques, la composition biochimique des cuticules (chitine, protéines, sels calciques) et la sécrétion cuticulaire chez cet organisme non visé, la crevette *P. adspersus*.



Matériel & Méthodes

«Comment l'indomptable recherche scientifique va-t-elle rester au service du mieux-être physique et mental de tous ? Deux maître mots : éducation et éthique, qu'il faut traduire en pratique.»

Etienne-Emile Baulieu

2. Matériel et méthodes

2.1. Présentation de l'espèce

La crevette *P. adspersus* (Rathke, 1837) communément appelée "bouquet balte" est très répandue dans les côtes norvégiennes et le sud de la mer baltique à la méditerranée (Hayward & Ryland, 1996). Sa longueur totale est d'environ 80 mm, elle est transparente, assez uniforme avec des bandes jaunes au niveau des articulations et présente des chromatophores sombres sur la moitié ventrale du rostre (Fig. 1). Ce qui permet de la distinguer facilement des autres crevettes Palaemonidés de la zone. La position systématique de *P. adspersus* selon la dernière classification d'après la source d'inventaire national du patrimoine naturel de France (MNHN, 2006) est la suivante:

Embranchement:	Arthropoda
Sous Embranchement:	Crustacea
Classe:	Malacostraca
Sous-Classe:	Eumalacostraca
Super Ordre:	Eucarida
Ordre:	Decapoda
Sous-Ordre:	Pleocyemata
Infra-Ordre:	Caridea
Super-Famille:	Palaemonoidea
Famille:	Palaemonidae
Sous-Famille:	Palaemoninae
Genre:	<i>Palaemon</i>
Espèce:	<i>adspersus</i> (Rathke, 1837).



Figure 1. Photographie de *P. adspersus* (Rathke, 1837) (Photo personnelle).

2.1.1. Morphologie et anatomie d'une crevette

Les crevettes sont des Crustacés Décapodes caractérisés par la présence de nombreux appendices articulés, d'un exosquelette segmenté chitineux, de deux paires d'antennes, et d'yeux composés. Le corps est constitué d'un céphalothorax qui unit la tête avec le thorax et un abdomen composé de six segments. Au cours de l'évolution, les segments et certaines parties du corps se sont spécialisés: Les appendices prenant part à la respiration, la nage, la reptation, l'alimentation, se sont fortement modifiés pour devenir mâchoires, organes reproducteurs ou autres, quand ils n'ont pas régressé ou disparu.

La crevette possède une «carapace» ou exosquelette qui part de la tête et recouvre la plus grande partie du corps, voire le corps entier. La tête porte deux paires d'organes sensoriels (antennes et mandibules), derrière lesquelles se trouvent deux paires de pièces buccales (maxilles). Elle comprend également une paire d'yeux composés et le céphalothorax qui porte des appendices servant à la locomotion et à la respiration. Ces derniers, appelés branchies, sont protégés par la carapace. D'autres appendices forment des pinces tandis que ceux situés sur l'abdomen servent à la locomotion ou à la respiration, mais sont souvent de taille réduite. La portion caudale, le telson, est parfois sert à la nage (Fig. 2A).

La cavité principale du corps fait partie du système circulatoire dans lequel le sang est pompé par un cœur dorsal. L'intestin est un tube droit souvent pourvu d'un moulin gastrique, comparable à un gésier servant à broyer les aliments, et d'une paire de glandes digestives qui sécrètent des sucs et absorbent les nutriments. Des structures comparables aux reins des Vertébrés sont situées près des antennes. Le système nerveux est composé de ganglions cérébraux, à proximité des organes des sens, d'une chaîne ganglionnaire et de nerfs situés sous l'intestin dans la partie ventrale (Fig. 2B).

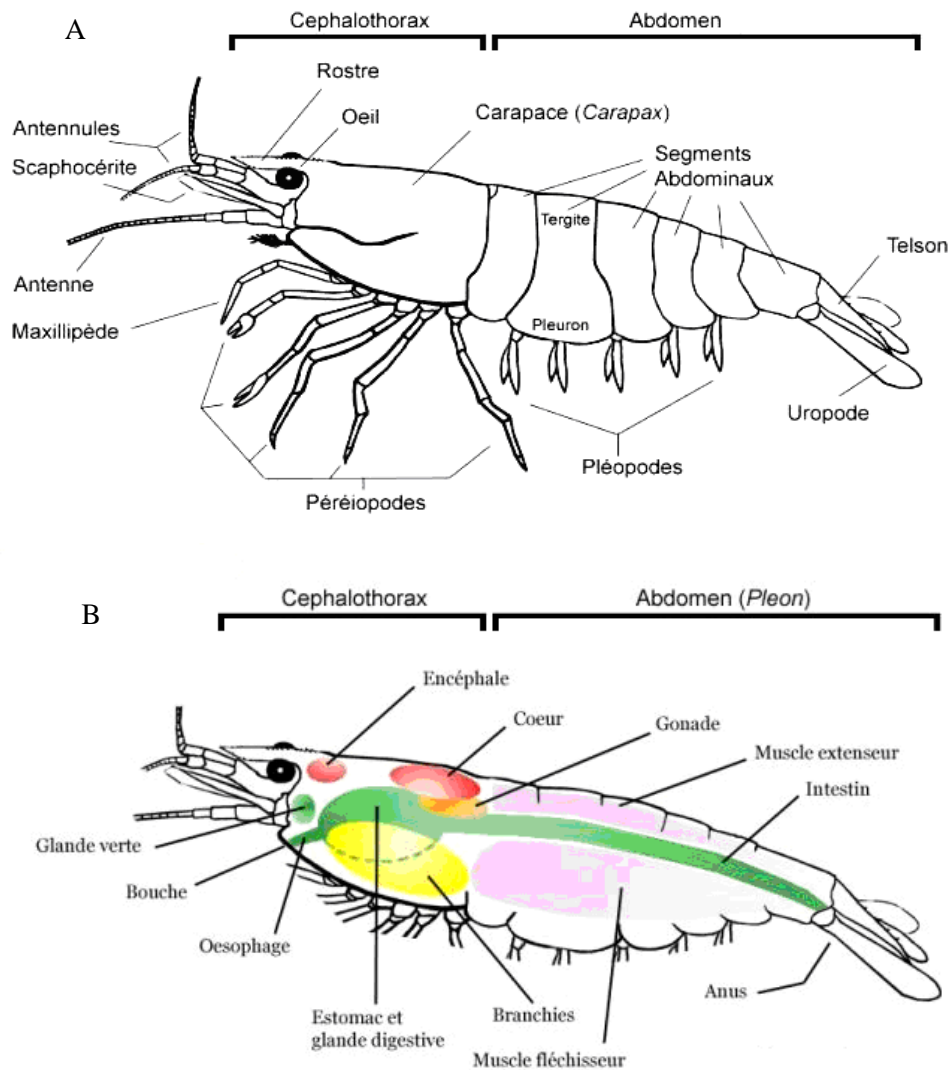


Figure 2. Morphologie (A) et anatomie (B) d'une crevette. (Anatomie d'une crevette: Crusta-Fauna.htm).

2.1.2. Cycle de vie et datation

P. adpersus effectue des migrations saisonnières dues aux régimes hydrologiques et à la reproduction. La population évolue dans le bas estuaire en période de crue [Décembre - Avril], puis dès l'amorce de l'étiage [Mai - Juin], elle se déplace vers le haut estuaire. Pendant la période de la reproduction, les femelles effectuent une migration vers l'aval. Ces dernières portent leurs œufs attachés en grappe entre leurs pléopodes où ils incubent durant plusieurs semaines. Les

larves naissent directement au stade dit Zoé1, suivi de cinq à sept stades Zoé (Fincham & Figueras 1986), puis un stade post-larve au vingtième jour (Fincham & Williamson 1978). Enfin, les juvéniles issus de ces pontes investissent en été et en automne la zone moyenne de l'estuaire.

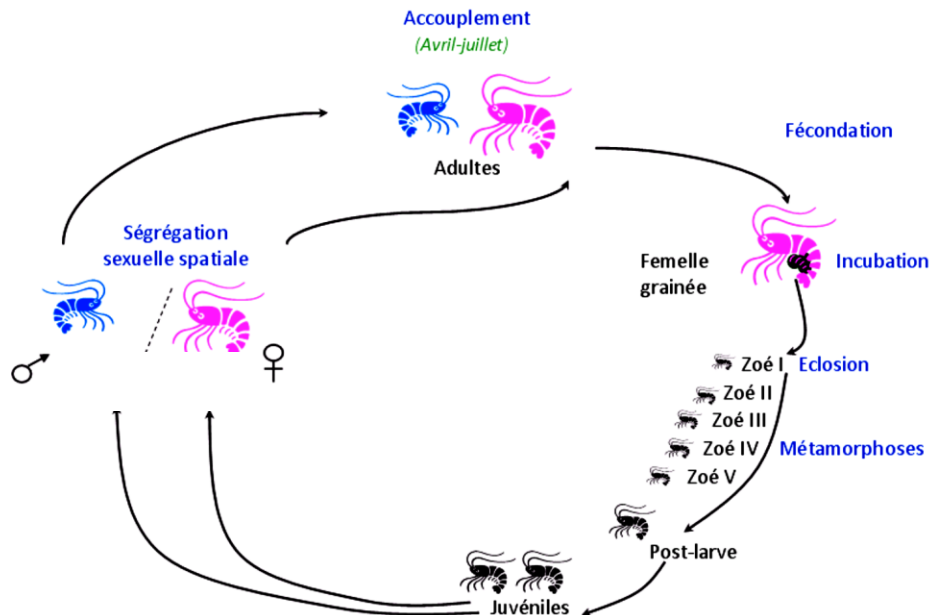


Figure 3. Cycle de vie de *P. adspersus* (Béguer, 2009).

Chez les Crustacés Décapodes le cycle de mue est subdivisé en quatre stades essentiels selon la nomenclature de Drach & Tchernigovtzeff (1967) et Cognie (1970): Deux stades en post-mue A et B, un stade intermue C, le stade prémue D, lui-même subdivisé en D0-D1; D2-D3. Enfin, le stade E correspond à l'exuviation de l'animal avec le rejet de l'ancienne cuticule se produisant uniquement dans la nuit.

La méthode de datation utilisée est celle de Robertson *et al.* (1987), elle est simple, rapide et efficace. Cette technique est basée sur l'étude de la morphogénèse des sois au niveau des appendices fins. Elle consiste à prélever un organe de référence: l'extrémité de l'uropode qui sera placé entre une lame et une lamelle dans de l'eau de mer et observé à l'aide d'un microscope binoculaire photonique (Wild). Les caractéristiques des différents stades de mue sont représentées dans le tableau 1 et la figure 3.

Tableau 1. Les différents stades du cycle mue et leurs caractéristiques chez les Crustacés.

		Durée	Caractéristiques
Post-mue	A	2 jours	L'animal est mou, les soies sont sans rigidité et la matrice cellulaire est remplie de granules. Les barbules portées par les soies adhérentes entre-elles.
	B		Le corps commence à se consolider, la pigmentation s'accroît d'avantage. Le matériel cellulaire commence à se rétracter des soies.
Intermue	C	5-7 jours	L'exosquelette est formé et acquiert sa consistance, pigmentation achevée, les soies sont transparentes sauf à la base où subsistent encore quelques cellules.
Prémue	D	13 jours	Comporte 3 sous stades: - <u>Stade D0-D1</u> : début de la phase active du processus de mue. Décollement de l'épiderme de l'ancienne cuticule, délimitation un espace exuvial, ainsi on observe un début de formation de nouvelles soies. - <u>Stade D2</u> : la nouvelle cuticule (épicuticule) est bien visible et les soies sont entièrement formées; absence des barbules. - <u>Stade D3</u> : les nouvelles barbules et les soies sont formées et bien organisées, laissant apparaître leur apex, ce qui donne l'impression d'un « peigne », terme cité par Cognie (1970)
Exuviation	E	10 secondes	Se produit la nuit, l'animal se dépouille de son ancienne cuticule.

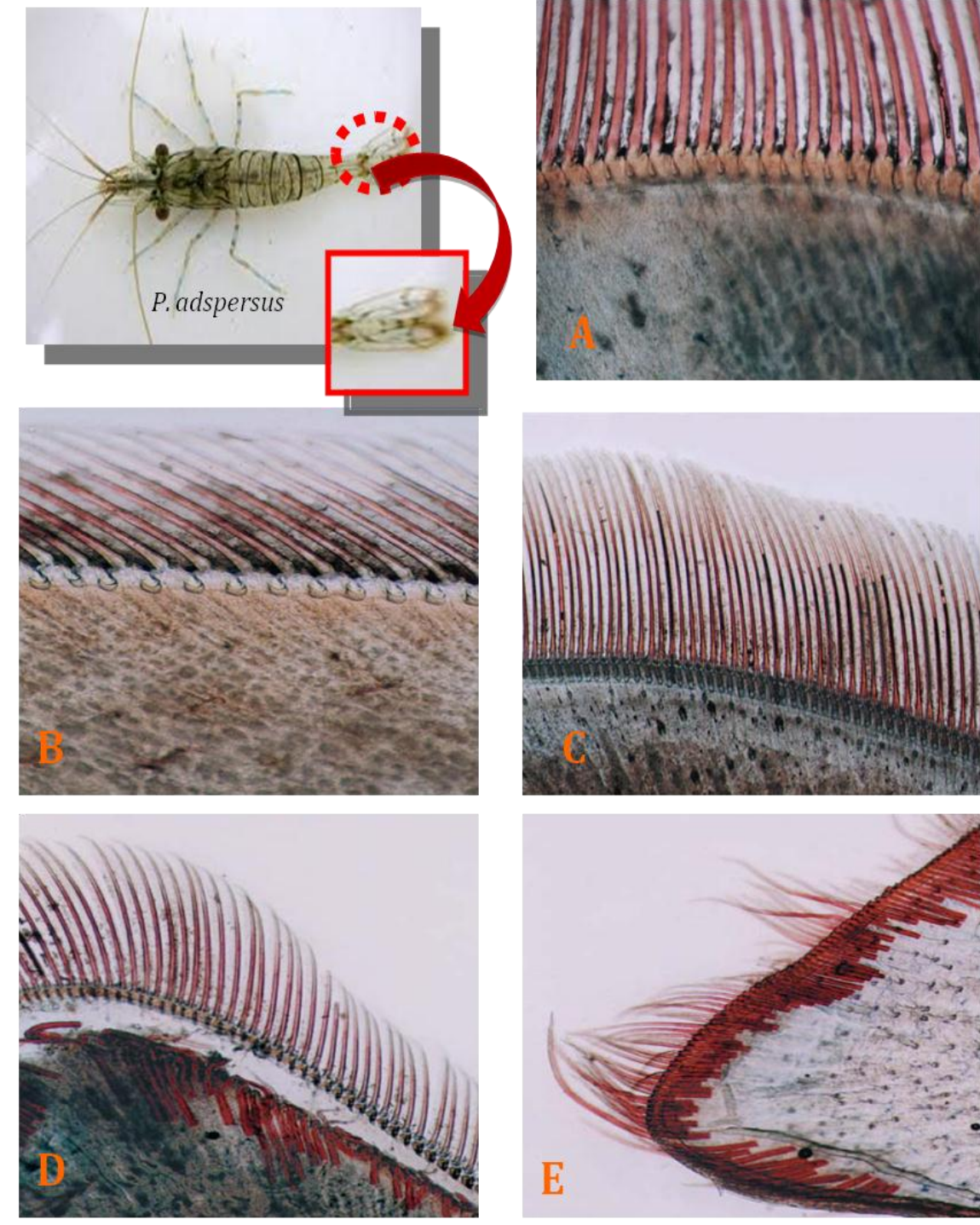


Figure 4. Différents stades du cycle de mue d'après (Schiavone, 2003) (A: post-mue, B: post-mue, C: inter-mue, D: pré-mue, E: exuviation).

2.2. Présentation du site d'échantillonnage

La lagune El-Mellah appartient au complexe des zones humides du Parc National d'El-Kala (PNEK) (Nord-Est Algérien), avec les lacs Oubéïra et Tonga. Créé en 1983, ce parc est classé comme réserve de la biosphère en 1990 et comme catégorie II (parc national) selon la classification de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature). Elle est considérée comme l'unique lagune du pays et est classée en 5^{ème} position par rapport aux 14 lagunes Nord-Africaines (Baba-Ahmed, 2008). La lagune se situe à l'extrême Nord-Est de la côte Algérienne (9,5 km à l'ouest de la ville d'El-Kala et 48,75 km à l'est de la ville d'Annaba), en bordure de la méditerranée entre le cap rosa et le cap roux (Fig. 5). De forme ovalaire, elle s'étend du Nord au Sud sur 4 km et d'Est en Ouest sur 2 km (Messerer *et al.*, 1999), couvrant ainsi une superficie de 865 hectares qui communique avec la mer par un chenal d'environ 870 m de longueur et 15 m de largeur (ONDPA, 2005) et reçoit les eaux douces des oueds Mellah et Bouaroug au sud et R'kibet à l'ouest (Derbal *et al.*, 2005). Ses coordonnées géographiques au centre sont de 36° 53' 565 Nord - 8° 19' 560 Est et la profondeur maximale est de 6,40 m. La lagune est un plan d'eau saumâtre dont la température et la salinité varient de 1,40 à 30,50°C et de 15,90 à 37,10 psu, respectivement (Draredja *et al.*, 2012).

La lagune du Mellah est un écosystème d'une richesse considérable, car il dispose de 199 espèces de phytoplancton (Rétima, 1999) et 47 espèces du zooplancton (Haridi, 1999). Les Crustacés Copépodes sont les mieux représentés avec 28 espèces appartenant à 14 genres. La macrofaune benthique est composée de 44 espèces (Polychètes, Mollusques, Crustacés et poissons) (Draredja et Kara, 2004 ; Melouah *et al.*, 2014; Mebarki *et al.*, 2015). De plus, 38 espèces de Poissons Téléostéens sont recensées, dont 71% sont des migrateurs marins. Les espèces sédentaires représentent 23,7% de la richesse ichtyologique totale du milieu (Chaoui *et al.*, 2005; Chaoui *et al.*, 2006; Derbal *et al.*, 2005; Laouira *et al.*, 2010, Hamdi, 2011).

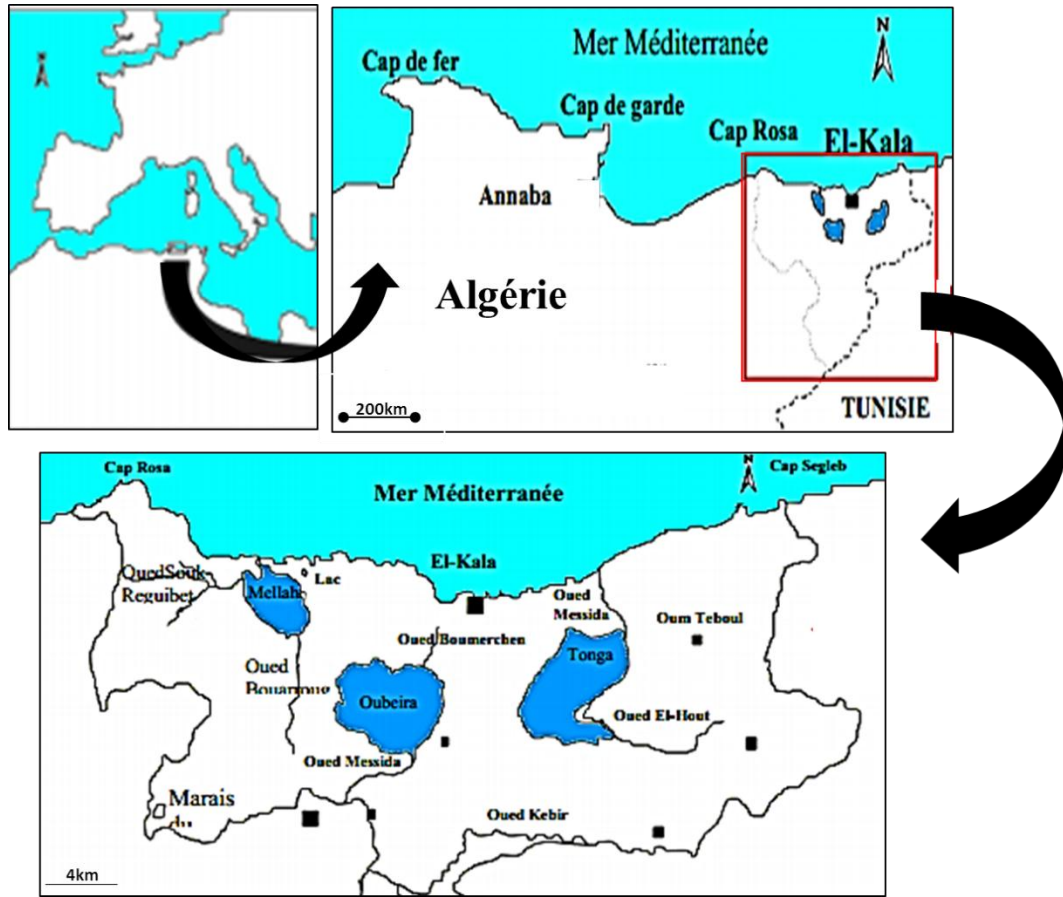


Figure 5. Localisation géographique de la zone d'échantillonnage: la lagune El-Mellah, El-Kala (Algérie Nord-Est) (Benyacoub, 1996).



Figure 6. Photographie du site d'échantillonnage la lagune El-Mellah (photo personnelle).

2.3. Stratégie d'échantillonnage et élevage

Les crevettes sont pêchées dans la lagune El-Mellah par une méthode de tractage à l'aide d'un filet appelé la senne ou (seine), dont les mailles sont régulières et de forme rectangulaire (la maille de 4 mm et la longueur environ 8 m). La bordure supérieure est garnie de flotteurs tandis que la partie inférieure est lestée et plombée. Le filet possède des anneaux dans lesquels passe un filin de chaque côté, et une poche de 1,60 m (Fig. 7). Son orientation est conduite par deux personnes à une profondeur qui varie de 0,5 à 1 m puis traîné afin de tirer les crevettes.

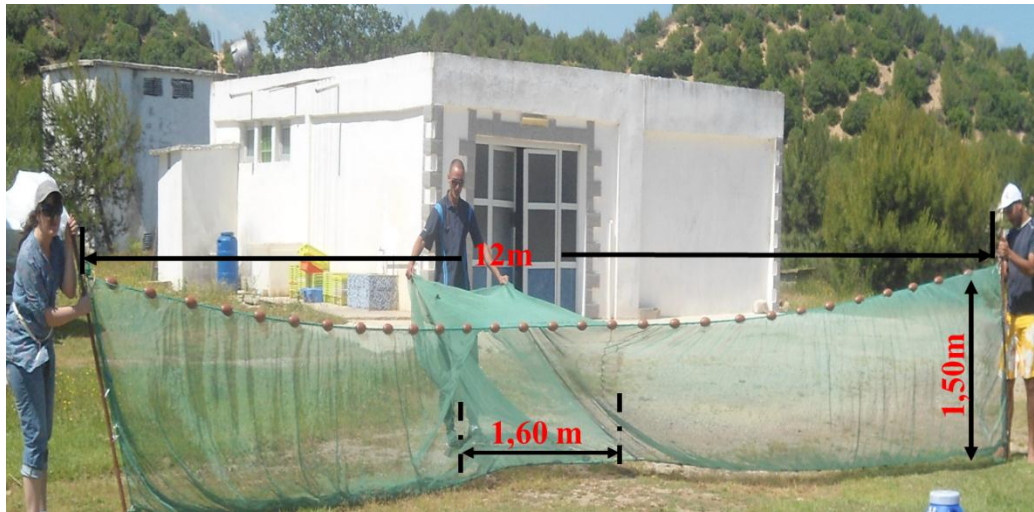


Figure 7. Schéma du filet la senne (hauteur des ailes: 1,5m ; la poche: 1,6m ; maille: 4 mm) (photo personnelle).

Pour le dosage des biomarqueurs: les crevettes sont collectées au niveau de trois sites de la lagune El-Mellah (Fig 8).

- Le site 1: se localise dans la zone d'étranglement du chenal qui débouche sur la méditerranée (36°54' N, 008°18'E): Point d'arrivée du chenal dans la lagune, sous influence des eaux marines avec une profondeur de 2,80 m.
- Le site 2: où se déverse Oued El-Mellah au Sud de la lagune (36°52' N, 008°19' E), à proximité du village Boumalek avec une profondeur de 1 mètre.
- Le site 3: où se déverse Oued R'kibet à l'Ouest de la lagune (36°54' N, 008°18' E) avec une profondeur d'un mètre.

Les crevettes sont disséquées puis un fragment de la chair et la tête, sont prélevés et placés dans les solutions appropriées pour le dosage de la GST et l'acétylcholinestérase, respectivement.

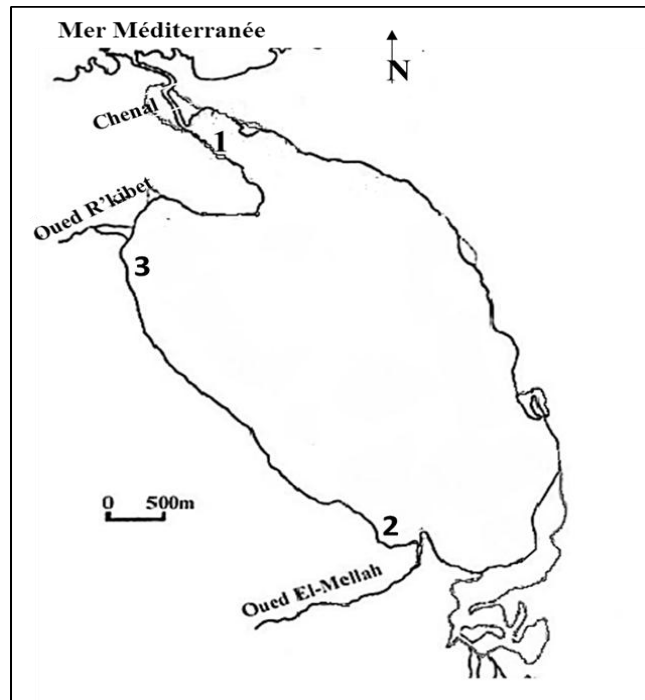


Figure 8. Localisation des trois sites d'échantillonnage au niveau de la lagune El-Mellah El-Kala (site 1: zone d'étranglement du chenal qui débouche sur la méditerranée; site 2: où déverse Oued El-Mellah au Sud; site 3: où se déverse Oued R'kibet à l'Ouest) (Figure personnelle).

Pour la réalisation de l'élevage au laboratoire: les crevettes sont pêchées au niveau du site le moins pollué (le chenal), puis elles sont transportées dans un bac en plastique d'une contenance de 25 L d'eau de mer. L'aération des échantillons est assurée par une pompe à air (BOYU® D-200) jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Les crevettes capturées sont transférées dans des aquariums d'une capacité de 80 litres, constitués d'une fine couche de sable fin de 4 cm d'épaisseur. Le milieu d'élevage est éclairé de lumière artificielle blanche (1000 lux) avec une photophase 14h/10h (lumière/obscurité). La salinité est proche de celle de l'eau de mer 37 ‰ et la température est comprise entre 22 et 27°C. L'eau doit être propre et continuellement oxygénée par des pompes à air (Rena 301: 2204, 651/mn). La filtration est assurée par des filtres à eau ayant un débit de 180 l/h (Rena 225) (Fig. 9).

Les animaux en captivité se nourrissent de la chair fraîche des haricots de mer distribuée en fin de journée. Le nettoyage des aquariums est effectué chaque matin, en enlevant la nourriture en excès ainsi que les coquilles.



Figure 9. Les différentes étapes de la technique de pêche de *P. adspersus* (A: tractage, B: triage, C: transport des crevettes D: élevage au laboratoire) (Photo personnelle).

2.4. Dosage des biomarqueurs

2.4.1. Dosage de la glutathion S-transférase

La mesure de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de [Habig et al. \(1974\)](#). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH). Les échantillons (chair) sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 14000 trs/mn pendant 30 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage consiste à faire réagir 200 µl du surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1 mM)/GSH (5 mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0,1 M, pH 6)]. La lecture des absorbances est réalisée dans un spectrophomètre visible /UV (WPA). Elle est effectuée toutes les 1 mn pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité du surnageant. L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante:

$$\text{Activité de la GST} \\ (\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO/\text{mn}}{e} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X: micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (µM/mn/mg de protéines).

Δ Do: pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

e: 9,6 coefficient d'extinction molaire du CDNB (mM⁻¹ cm⁻¹).

Vt: volume total dans la cuve : 1,4 ml [0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

Vs: volume du surnageant dans la cuve: 0,2 ml.

mg de protéines: quantité de protéines exprimée en mg.

2.4.2. Dosage de l'acétylcholinestérase

Le dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) est réalisé selon la méthode [d'Ellman et al. \(1961\)](#) qui 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 thiocholine en présence de DTNB (acide 5, 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) forme un complexe de couleur jaune dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 412 nm. Les échantillons (têtes) sont homogénéisés dans 1 ml de solution

détergente (solution D) [38,03 mg EGTA (acide éthylène glycol-bis, β -aminoéthyl éther NNN'N' tétra-acétique), 1ml Triton X 100%, 5,845 g NaCl (chlorure de sodium), 80 ml tampon tris (10 mM, pH 7)], puis centrifugés (5000 trs/mn, 5 mn). Le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage de l'activité AChE est réalisé sur une fraction aliquote de 100 μ l à laquelle on ajoute 100 μ l de DTNB préparé extemporanément [39,6 mg DTNB, 15 mg CO₃HNa (bicarbonate de sodium), 10 ml tampon tris (0,1 M, pH 7)] et 1 ml de tampon tris (0,1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes, 100 μ l de substrat acétylthiocholine préparé extemporanément [23,6 mg ASCh, 1 ml eau distillée] sont ajoutés. La lecture des absorbances (spectrophomètre WPA) s'effectue toutes les 4 mn pendant 20 mn à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc où 100 μ l de la solution détergente remplace les 100 μ l du surnageant.

Activité de AChE

$$(\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO/\text{mn}}{e} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

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

ΔDo : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

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

Vt : 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 ml acétylthiocholine].

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

2.4.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la technique de [Bardford et al., \(1976\)](#) sur une fraction aliquote de 0,1 ml de l'homogénat avec 4 ml de bleu brillant de Coomassie (BBC) (G 250, Merk) comme réactif (50 mg de bleu brillant de Coomassie, 25 ml d'éthanol (95%), 50 ml d'acide orthophosphorique (85%) et complété à 500 ml avec l'eau distillée) et l'albumine sérum de bœuf (Sigma, France) comme standard.

La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm, et la gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de bœuf (1 mg/ml) selon les indications ci-dessous.

Tableau 2: Dosage des protéines, réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution d'albumine (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

2.5. Insecticide et traitement

Le novaluron ou (±)-1-[3-chloro-4-1,1,2-trifluoro-2-trifluorométhoxyéthoxy) phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea, est un composé de la classe des benzoylurées qui agissent sur la sécrétion cuticulaire et l'inhibition de la synthèse de la chitine (Dhadialla *et al.*, 2010, Sun *et al.*, 2015). Sa formule brute est le C₁₇ H₉ Cl F₈ N₂ O₄, et son poids moléculaire est de 492,7 g/mol (Fig. 7). Le novaluron (EC 20%) a été gracieusement fourni par le Pr. G. Smaghe (Laboratoire d'Agrozoologie, Université de Ghent, Belgique). Firme: EC, courtesy by Rohm and Hass, Spring house, PA.

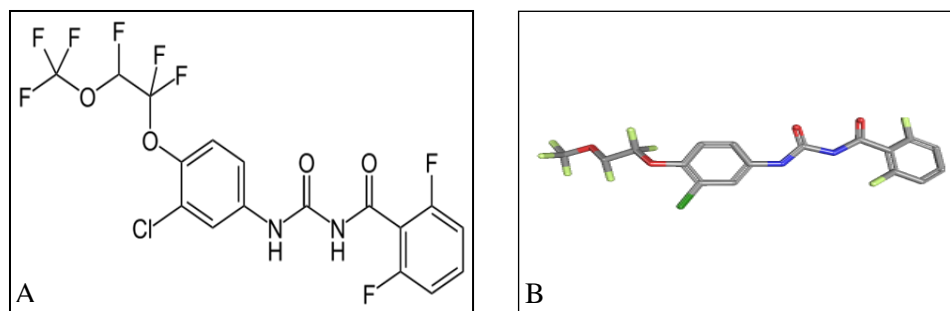


Figure 10. Le novaluron (A: Formule de structure; B: structure 3D).

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs=hsdb:@term+@rn+@rel+116714-46-6>

Le novaluron (EC 20%) est additionné dans l'eau d'élevage contenant des adultes de *P. adspersus* à l'exuviation (stade A). Le produit est utilisé à deux concentrations (0,91 µg/L et 4,30

µg/L) correspondant, respectivement, aux CL₅₀ et CL₉₀ obtenues à l'égard des larves du quatrième stade de *Culiseta longiareolata* (Diptera, Culicidae) (Bouaziz *et al.*, 2011). Les prélèvements des échantillons (hémolymphes, céphalothorax et uropode) sont effectués chez des individus de *P. adspersus* à différents stades du cycle de mue (A, B, C, et D) des séries témoins et traitées par le novaluron aux deux concentrations testées.

2.6. Prélèvement des échantillons

Les échantillons sont prélevés sur des individus témoins et traités aux différents stades (A-D) du cycle de mue. L'hémolymphes (3 µl/animal) est prélevée à l'aide de capillaires préalablement calibrés, par ponction entre le deuxième et le troisième sternite abdominal. L'hémolymphes collectée est additionnée à 500 µl de méthanol puis stockée à 4°C et servira au dosage enzymo-immunologique de l'hormone de mue (ecdystéroïdes). Parallèlement, le céphalothorax est coupé en deux parties égales. Une moitié servira à la détermination de la composition biochimique des cuticules (chitine, protéines cuticulaires et sels calciques) par une méthode gravimétrique. La deuxième moitié du céphalothorax permettra la quantification de la chitine par un dosage colorimétrique. Enfin, l'extrémité de l'uropode est prélevée puis fixée selon la technique histologique afin d'examiner la sécrétion et l'épaisseur des cuticules.

2.7. Le dosage enzymo-immunologique des ecdystéroïdes

La quantification des ecdystéroïdes est réalisée dans l'hémolymphes (3 µl) des séries témoins et traitées. Les échantillons sont broyés aux ultra-sons (2-3 minutes) dans 500 µl de méthanol. Après centrifugation (5000 trs/min, 10 minutes), les surnageants sont récupérés et évaporés (60°C). Chaque extrait est repris dans 500 µl de tampon EIA (100 ml tampon phosphate 0,1 M; pH 7,4; 23,4 g NaCl; 0,37 g EDTA; 1 g BSA et ajusté à 1 l d'eau distillée) et individuellement analysé par un dosage immuno-enzymatique (EIA).

Le dosage est réalisé selon la technique spécifique aux ecdystéroïdes, adaptée par Porcheron *et al.* (1989) puis modifiée par De Reggi *et al.* (1992). La méthode utilise un traceur enzymatique la peroxydase, couplée à la 2-succinyl 20-hydroxyecdysone (Aribi *et al.*, 1997), qui est mise en compétition avec les ecdystéroïdes des extraits biologiques pour les sites d'anticorps anti-ecdystéroïdes de lapin (anticorps primaire). Les complexes sont alors fixés par un second

anticorps polyclonal anticorps anti-immunoglobine de lapin (Sigma) retenu, préalablement, au cours d'un coating, sur une microplaque à 96 puits (NUNC Immunoplate Maxisorp F96, Danemark). Les anticorps polyclonaux et le traceur enzymatique utilisés sont fournis gracieusement par Dr. J.P. Delbecq (Laboratoire de neuroendocrinologie, Université de Bordeaux I, France) et C. Blaise (Université Pierre & Marie Curie, Paris, France), respectivement. Le coating est suivi d'une saturation pendant une heure dans le tampon EIA à 0,3% d'albumine (Sigma France) distribuée à raison de 100 µl dans chaque puits.

Les plaques subissent un rinçage avec un tampon de lavage (tampon phosphate 0,01 M pH 7,4 additionnée tween 20 à 0,5%) dans le but d'éliminer tous les éléments non retenus au cours de l'incubation. Puis la distribution des différents composés est réalisée à l'aide d'une micropipette multicanaux (Scorex, Suisse):

50 µl de traceur enzymatique dans tous les puits.

50 µl de tampon EIA dans les puits de blanc B₀ (absence d'hormone) et 100 µl dans le puit témoin (T).

50 µl des différentes concentrations de solutions standards dans les puits réservés à cet effet.

50 µl des différents échantillons dans les puits réservés à cet effet.

50 µl d'anticorps dans tous les puits excepté dans le puit témoin.

Au bout de 3 heures d'incubation à température ambiante, les éléments non retenus seront éliminés au cours d'un rinçage des plaques. La révélation est réalisée avec l'addition de 200 µl du réactif de révélation de la peroxydase: la tétraméthylbenzidine ou TMB (Sigma, France) à 0,5% dans le DMSO, 25 ml du tampon acétate 0,1 M à pH 6 et 250 µl de peroxyde d'urée et 22,5 ml d'eau distillée. La coloration se fait pendant 15 à 30 minutes à température ambiante. Les densités optiques sont lues grâce au lecteur de plaque (Labsystem, Finlande) à 630 nm. La mesure de la quantité de peroxydase fixée permet de déterminer la quantité d'ecdystéroïdes contenue dans les échantillons biologiques par comparaison avec une courbe de référence obtenue avec les solutions standards de la 20E. Les résultats sont exprimés en picogramme de 20 E par mg de tissu. Les densités optiques seront inversement proportionnel à la quantité d'ecdystéroïdes contenus dans les échantillons et exprimés selon la formule suivante:

$$B/B_0 (\%) = (B-T)/(B_0-T) \times 100$$

(B: absorbance de l'échantillon ou du standard;
 B₀: absorbance en l'absence de l'hormone;
 T: absorbance en l'absence de l'hormone et de l'anticorps).

2.8. Détermination de la composition biochimique de la cuticule

La technique utilisée pour la détermination des composants de la cuticule (chitine, protéines et sels calciques) est celle de [Wilinder \(1974\)](#). La moitié du céphalothorax est rincée à l'eau distillée puis séchée à 60°C et pesée (P₀). Une décalcification par l'acide trichloracétique (TCA 10 %) jusqu'à il n'y est plus de formation de bulles. Le résidu est rincé brièvement par l'eau distillée, séché à 60°C et pesé (P₁). La différence entre (P₀) et (P₁) correspond au poids des sels calciques.

La composition en protéines est déterminée après un traitement de la cuticule décalcifiée par la soude NaOH 2N à 110°C pendant 3 à 4 h. Le résidu décoloré est rincé abondamment avec de l'eau distillée, puis séché à 60°C et pesé (P₂). Ce dernier correspond au poids de la chitine. La différence entre P₁ et P₂ est le poids des protéines.

Les poids des cuticules sont exprimés en mg et les différents composants sont exprimés en mg puis représentés en % selon les calculs suivants:

Contenu en sels calciques: **Taux des sels calciques (%) = $\frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100$**

Contenu en protéines: **Taux des protéines (%) = $\frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100$**

Contenu en chitine: **Taux de chitine (%) = $\frac{P_2}{P_1} \times 100$**

P₀ : poids du départ
 P₁ : poids décalcifié
 P₂ : poids de la chitine

2.9. Dosage de la chitine

La quantification de la chitine est réalisée selon le protocole de [Lehman *et al.* \(1976\)](#) et adaptée par [Fortwendel *et al.* \(2008\)](#), modifié par [Farnesi *et al.* \(2012\)](#) et récemment par [Bensbaa](#)

et al. (2015). La quantification de la chitine repose sur trois étapes: la deacétylation, la dépolymérisation et la déamination du polymère N-acetyl-glucosamine.

Les échantillons (la moitié du céphalothorax) sont homogénéisés dans 0,5 ml d'eau distillée puis centrifugé à 1800 trs/mn pendant 15 mn à température ambiante. Une quantité de 0,4 ml de 3% SDS (dodécylsulfate de sodium) est ajoutée au culot et incubée pendant 15 mn à 100°C. Les échantillons refroidis à température ambiante subissent une deuxième centrifugation à 1800 trs/mn pendant 10 mn, puis une quantité de 0,5 ml d'eau est additionné au culot puis centrifugée à 1800 trs/mn pendant 2 mn à température ambiante. Le culot est suspendu dans 0,3 ml de KOH (Hydroxyde de potassium) à 14 M et incubé pendant une heure à 130°C dans un bain à sec. Les tubes sont transférés dans la glace pendant 15 mn. Cette étape vise à désacétyler la chitine de l'échantillon et former le chitosane (un polymère de la glucosamine).

L'étape suivante consiste à ajouter 0,8 ml d'éthanol à 75% préalablement refroidi à -20°C, aux différents tubes (le culot suspendu dans KOH) puis vortexé et laissé au repos dans la glace pendant 15 mn. Ensuite, 3 ml d'une suspension de Celite (100 mg de Celite par 1ml d'eau jusqu'à ce qu'une phase mousseuse soit formée) sont ajoutés dans chaque tube puis mélangés manuellement et centrifugés à 1800 trs/mn pendant 5 mn à température ambiante. Cette étape est suivie d'une addition de 0,5 ml d'éthanol à 40% (préalablement refroidie à -20°C) au culot puis centrifugée à 1800 trs/mn pendant 2 mn à température ambiante. Ultérieurement, 0,5 ml d'eau froide sont ajoutés au culot puis centrifugés à 1800 trs/mn pendant 2 mn à température ambiante. Le culot récupéré peut être conservé dans le réfrigérateur jusqu'au lendemain. Il est suspendu dans 0,5 ml d'eau à température ambiante.

Une quantité de 200 µl de chaque échantillon ainsi que les différents points de la gamme préalablement préparé (50 à 1000 µg de glucosamine) est prélevée. 200 µl d'eau seront utilisé pour le blanc. Dans chaque tube une quantité de 200 µl de NaNO₂ (Sodium nitrite) à 10% est ajouté, après 200 µl de KHSO₄ (Potassium bisulfate) à 10% sont ajoutés respectivement après avoir agité les tubes 3 fois pendant une période de 15 mn (Agitation douce). Les tubes sont centrifugés à nouveau à 1500 trs/mn pendant 2 mn à 4° C. Une quantité de 200 µl d'Ammonium sulfate (NH₄SO₃NH₂) à 12,5% est ajoutée à une fraction aliquote de 150 µl prélevée de chaque surnageant. Les échantillons sont vortexés toutes les minutes pendant 5 mn. Le MBTH (3-Méthyl

-2-benzothiazoline) fraîchement préparé est ajouté aux échantillons, avant de mettre les tubes au bain marie pendant 5 mn à 100°C et les laissés refroidir à température ambiante. Ensuite dans chaque tube 200 µl de FeCl₃ (Chlorure de fer) à 0,83% sont ajoutés et laissés incuber pendant 25 mn à température ambiante. Enfin les absorbances sont lus au spectrophomètre (WPA) à une longueur d'onde de 620 nm.

2.10. Technique histologique

L'étude histologique est réalisée sur l'extrémité de l'uropode à différents stades du cycle de mue (A-D) selon les indications de [Martoja & Martoja, \(1967\)](#).

Les échantillons sont prélevés sur des individus témoins et traités, puis fixés dans le formol (10%) pendant 48 heures. Après déshydratation dans des bains gradués d'éthanol et trois bains de xylène; les pièces sont imprégnées puis incluses dans un bloc de paraffine. Des coupes transversales de l'uropode (4 µm) sont réalisées à l'aide d'un microtome Leica RM2125T (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany), étalées avec de l'eau gélatinée puis séchées à l'étuve à 60°C.

Les coupes sont ensuite déparaffinées par trois bains de xylène (3 mn chacun), puis hydratées dans trois bains d'alcool 95° (2 mn chacun) et lavée à l'eau avant de subir une coloration à hématoxyline-éosine. La coloration proprement dite est réalisée d'abord, dans un bain d'hématoxyline (10 mn) suivie d'un rinçage et d'un traitement à l'eau ammoniacqué et un rinçage. Ensuite, les lames sont plongées dans un bain d'éosine (5 mn) suivi également d'un rinçage. Enfin, l'excès d'éosine est éliminé par un rinçage dans 2 bains d'alcool et un mélange acétone/xylène à volume égal (50 /50) et un bain de xylène.

Le montage est réalisé grâce au baume de Canada qui consiste à interposer entre lame et lamelle une goutte de baume en recouvrant les coupes d'une lamelle, évitant leur dessèchement, et assurant une meilleure conservation possible. Les observations des coupes et les mensurations sont faites à l'aide d'un microscope Leica DM500 équipé d'une camera Leica ICC50 HD et l'épaisseur des cuticules est mesurée avec un logiciel Leica Las EZ dans chaque série.

2.11. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne arithmétique plus ou moins l'écart type ($m \pm SD$). L'étude statistique est réalisée à l'aide du logiciel graphpad prism d'analyse et de traitement statistique des données version 6.01 pour Windows (GraphPad software, La Jolla California, USA, [www Graphpad. com](http://www.Graphpad.com)) et Minitab version 16. Pour toutes les séries de données, l'égalité des variances est contrôlée par les tests de Bartlett et de Levene (Dagnelie, 1998). La normalité des données a été vérifiée par l'application des tests d'Anderson–Darling et de Kolmogorov-Smirnov (Dagnelie, 1998).

Les résultats obtenus ont subi différents tests statistiques: La régression linéaire et non linéaire pour la détermination des différentes équations de régressions, le test t de Student, et l'analyse de la variance à deux critères et trois critères de classification. De plus, le test HSD (honest significative difference) de Tukey nous a permis de classer les différentes moyennes.



Résultats

“Peu réussissent à goûter au fruit de leurs succès et au résultat de leur œuvre.”

Alexandre Stamboliski

3. Résultats

3.1. Détermination de l'activité enzymatique chez *P. adspersus*

3.1.1. Activité spécifique de la glutathion S-transférase

Le dosage de la GST est réalisé au niveau de la chair des adultes de *P. adspersus* pêchés dans les trois sites de la lagune El-Mellah (le site 1: se localise dans la zone d'étranglement du chenal qui débouche sur la méditerranée; le site 2: où déverse Oued El-Mellah au Sud de la lagune, à proximité du village Boumalek; le site 3: où se déverse Oued R'kibet à l'Ouest de la lagune). Les données enregistrées pendant l'année 2013 révèlent que l'activité de la GST au niveau du site 2 est de l'ordre de $14,19 \pm 1,49$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines concernant l'été et de $13,46 \pm 2,23$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines en automne. Ces valeurs sont sans différence significative ($p > 0,05$) par rapport aux valeurs enregistrées au niveau du site 1 qui sont de l'ordre de $10,89 \pm 1,90$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines en été et $6,86 \pm 0,48$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines en automne. Par contre, l'activité de la GST au niveau du site 3 augmente de manière hautement significative ($p < 0,001$) par rapport au site 1 durant les deux saisons: été ($21,24 \pm 1,52$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) et automne ($24,25 \pm 2,25$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) durant la même année.

Les résultats acquis pendant l'été 2014 montrent une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité de la GST qui est de l'ordre de $75,17 \pm 8,06$ et $85,97 \pm 25,69$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines, respectivement, chez les individus de *P. adspersus* des sites 2 et 3, comparativement à ceux pêchés au niveau du site 1 qui enregistre une valeur de $46,05 \pm 3,10$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines. De plus, les valeurs de l'activité de la GST au niveau du site 1 ainsi que le site 3 sont plus élevées en été par rapport aux valeurs obtenues en automne. Au niveau du site 1 l'activité de la GST est de l'ordre de $21,16 \pm 0,08$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines. Celle-ci augmente pour atteindre une valeur de $51,74 \pm 4,65$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines au niveau du site 3 et la valeur de $61,42 \pm 1,02$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines au niveau du site 2 (Tableau 3).

L'analyse de la variance à trois critères de classification (sites, saisons, années) suivie du test HSD de Tukey démontre une différence hautement significative ($p < 0,001$) entre les trois sites 1, 2 et 3 ($F_{2, 41} = 44,96$; $p \leq 0,001$), entre les deux saisons d'été et automne ($F_{1, 41} = 31,25$; $p < 0,001$) et les années considérées ($F_{1, 41} = 318,04$; $p < 0,001$).

Le classement des sites durant les deux saisons (été et automne) de l'année 2013, révèle l'existence de deux groupes. Le premier renfermant les sites 1 et 2, le second: les sites 2 et 3. Pendant l'été et l'automne 2014, le test de Tukey a permis de distinguer également deux groupes: le premier représenté par le site 1. Tandis que, le second regroupant les sites 2 et 3. En effet, il existe une induction significative de l'activité de la GST au niveau des sites 2 et 3 plus élevée en comparaison à celle enregistrée chez des individus du site 1.

Tableau 3: Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) dans la chair de *P. adspersus* dans trois sites de la lagune El-Mellah durant l'été et l'automne des années 2013 et 2014 ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 7$).

Années	Saisons	Site 1	Site 2	Site 3
2013	Eté	10,89 \pm 1,90 a A	14,19 \pm 1,49 ab A	21,24 \pm 1,52 b A
	Automne	6,86 \pm 0,48 a A	13,46 \pm 2,23 ab A	24,25 \pm 2,25 b A
2014	Eté	46,05 \pm 3,10 a A	75,17 \pm 8,06 b A	85,97 \pm 25,69 b A
	Automne	21,16 \pm 0,08 a B	61,42 \pm 1,02 b A	51,74 \pm 4,65 b B

- Les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les trois sites durant la même saison et la même année.
- Les moyennes suivies d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les deux saisons au sein du même site. (comparaison: test HSD de Tukey).

3.1.2. Activité spécifique de l'acétylcholinestérase

La détermination de l'activité spécifique de l'AChE est réalisée au niveau de la tête des adultes de *P. adspersus* pêchés dans les sites 1, 2 et 3 au niveau de la lagune El-Mellah. Les données relatives à la saison estivale de l'année 2013 révèlent une activité maximale de l'ordre de $62,03 \pm 10,04 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines chez les crevettes pêchées au niveau du site 1. Cette activité diminue de manière significative ($p < 0,05$) au niveau des sites 2 ($51,32 \pm 2,09 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) et 3 ($45,50 \pm 3,25 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) comparativement au site

1. Aussi, pendant l'automne 2013, une diminution hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité spécifique de l'AChE est enregistrée. En effet, les valeurs obtenues sont de l'ordre de $107,45 \pm 13,96 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines pour le site 1 et diminue jusqu'à $77,77 \pm 4,82 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines pour le site 2 et $66,22 \pm 3,54 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines pour le site 3 (Tableau 4).

Quant à l'été de l'année 2014, une diminution hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité spécifique de l'AChE avec les valeurs respectives de $26,38 \pm 2,21$ et $14,23 \pm 1,08 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines est observée dans le second et le troisième site par rapport au premier qui est de l'ordre $44,18 \pm 6,66 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines. En ce qui concerne les résultats de la période automnale de l'année 2014, l'activité spécifique de l'AChE chez *P. adspersus* est inhibée, car elle passe de $55,5 \pm 2,78$ au niveau du site 1, à $24,44 \pm 3,92$ au niveau du site 2 et à $15,37 \pm 2,85 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines au niveau du site 3 (Tableau 4).

L'analyse de la variance à trois critères de classification (sites, saisons, années) est suivie du test HSD de Tukey. Elle révèle une différence hautement significative ($F_{2, 42} = 101,01$ $p < 0,001$) entre les sites 1, 2 et 3, entre les deux saisons ($F_{1, 42} = 48,55$; $p < 0,001$) et les années considérées ($F_{1, 42} = 397,17$; $p < 0,001$).

Le classement des sites durant l'été et l'automne 2013, révèle deux groupes: le premier renferme les sites 1 et 2, le second, les sites 2 et 3. Concernant les données relatives à l'automne de la même année, on distingue également deux groupes : le premier représente le site 1, le second représente les sites 2 et 3. Par contre, durant l'année 2014, 3 groupes sont enregistrés. Chacun d'eux correspondant à un site et ceci pour les deux saisons (été, automne). En effet, l'inhibition de l'activité de l'AChE est plus marquée au niveau du site 3 comparativement à celui du site 2.

Tableau 4: Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) dans la tête des crevettes *P. adspersus* dans trois sites de la lagune El-Mellah durant l'été et l'automne des années 2013 et 2014 ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-6$).

Années	Saisons	Sites 1	Site 2	Site 3
2013	Eté	62,03 \pm 10,04 a A	51,32 \pm 2,09 ab A	45,5 \pm 3,25 b A
	Automne	107,45 \pm 13,96 a B	77,77 \pm 4,82 b B	66,22 \pm 3,54 b B
2014	Eté	44,18 \pm 6,66 a A	26,38 \pm 2,21 b A	14,23 \pm 1,08 c A
	Automne	55,50 \pm 2,78 a B	24,44 \pm 3,92 b A	15,37 \pm 2,85 c A

- Les moyennes suivies d'une même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les trois sites durant la même saison et la même année.
- Les moyennes suivies d'une même lettre majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les deux saisons au sein du même site. (comparaison: test HSD de Tukey).

D'après les données de pluviométrie (2013, 2014) fournies par le Service Agricole d'El-Tarf, les précipitations annuelles (mm) sont intenses durant 2013 par rapport à l'année 2014. Ils ont enregistré 63 jours pluvieux avec 938 mm de précipitations, contre seulement 39 jours avec des précipitations de 649,6 mm en 2014. Ainsi, l'effet saison serait en rapport avec les apports des Oueds qui, en période humide, dilueraient la concentration des polluants. L'effet année est du à une pluviométrie plus importante en 2013. Le niveau de pollution s'établit par ordre décroissant: site 1 > site 2 > site 3.

3.2. Impact du novaluron sur la crevette *Palaemon adspersus*

3.2.1. Effet sur les ecdystéroïdes

Le dosage quantitatif des ecdystéroïdes hémolymphatiques ($\text{pg } 20\text{E}/\mu\text{l}$) chez *P. adspersus* est réalisé à différents stades (A-D) du cycle de mue chez les séries témoins et traitées au novaluron (CL_{50} , CL_{90}). La quantité des ecdystéroïdes est déterminée à partir d'une courbe de référence qui exprime le rapport B/B_0 (%) en fonction des concentrations molaires de l'hormone standard. (Fig. 11).

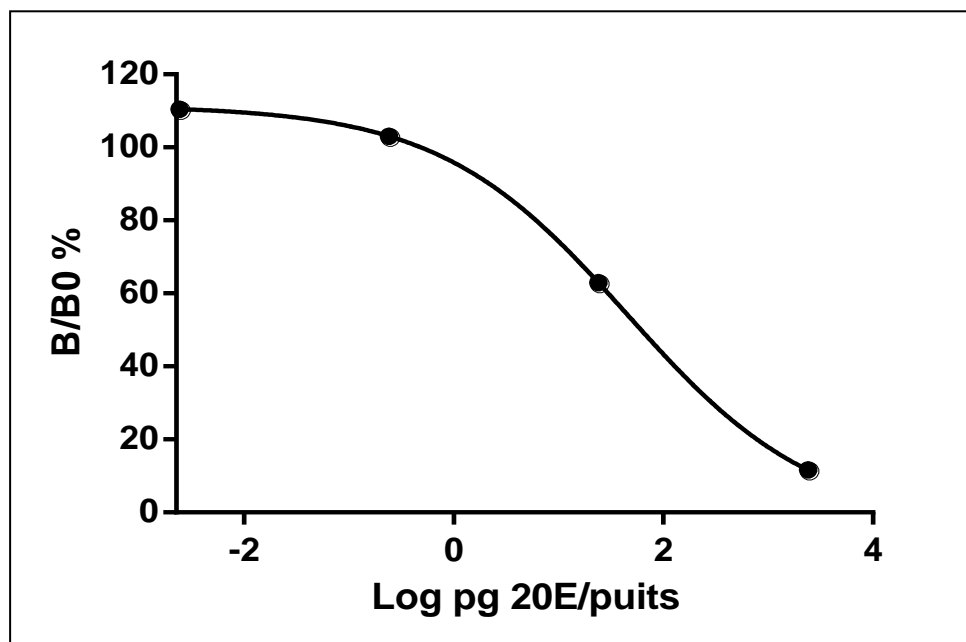


Figure 11. Courbe de référence établie avec un anticorps polyclonal (B de lapin) et exprimant le rapport B/B₀ en fonction des concentrations molaires (M) de la 20- hydroxyecdysone (20E).

Dans les conditions normales, la concentration des ecdystéroïdes hémolympatiques augmente au cours du cycle de mue allant du stade A ($33,48 \pm 0,25$ pg 20E/ μ l) jusqu'au stade C, où elle atteint une valeur de $83,77 \pm 8,53$ pg 20E/ μ l. Au stade D: à la veille de l'exuviation on observe une augmentation remarquable avec une valeur de $115,57 \pm 2,51$ pg 20E / μ l. Le même profil hormonal (A-D) est enregistré chez les séries traitées au novaluron (CL₅₀ et CL₉₀), avec une augmentation très significative ($p < 0,01$) des ecdystéroïdes à tous les stades. Les valeurs enregistrées au stade C sont de l'ordre de $116,59 \pm 7,20$ pg 20E / μ l à la CL₅₀ et $119,63 \pm 2,12$ pg 20E / μ l à CL₉₀. Au stade D, on observe toujours une augmentation très significative de la concentration des ecdystéroïdes. En effet, elles sont de l'ordre de $139,23 \pm 1,07$ et $137,44 \pm 2,87$ pg 20E / μ l, respectivement avec la CL₅₀ et CL₉₀ (Tableau 5, Fig. 12).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (stade, traitement) des données de la concentration des ecdystéroïdes hémolympatiques (pg 20E / μ l) au cours du cycle de mue de *P. adspersus*, indique un effet traitement ($F_{2, 24} = 16,02$; $p < 0,001$), stade ($F_{3, 24} = 124,8$; $p = 0,0006$) et une interaction stade/traitement significative ($F_{6, 24} = 2,06$, $p = 0,0207$).

Tableau 5: Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) sur la concentration des ecdystéroïdes hémolymphatiques ($\text{pg } 20\text{E} / \mu\text{l}$ d'hémolymphe) à différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm \text{SD}$, $n = 4$).

Traitements Stades	Témoins	Novaluron (CL_{50})	Novaluron (CL_{90})
A	$33,48 \pm 3,81$ a A	$36,41 \pm 4,40$ a A	$30,57 \pm 2,15$ a A
B	$68,57 \pm 9,13$ a B	$90,84 \pm 3,5$ b B	$93,76 \pm 1,5$ b B
C	$83,77 \pm 8,53$ a B	$116,59 \pm 7,20$ b C	$119,63 \pm 2,12$ b C
D	$115,57 \pm 2,51$ a C	$139,23 \pm 1,07$ b C	$137,44 \pm 2,87$ b C

- Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).
- Les lettres en minuscule comparent les moyennes entre les traitements au sein d'un même stade.
- Les lettres en majuscule comparent les valeurs des différents stades au sein d'un même traitement.
(Comparaison: test HSD de Tukey, 5%).

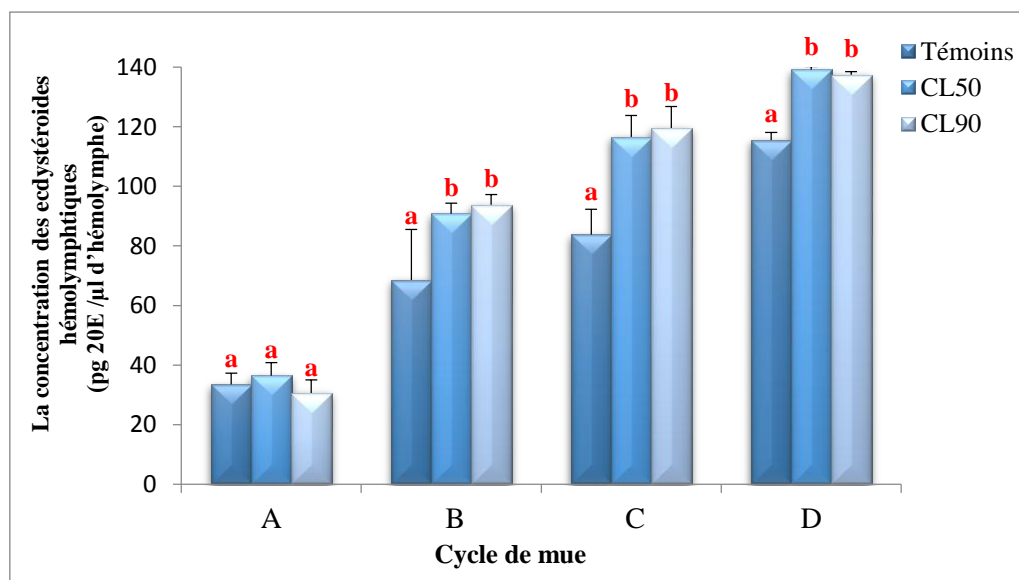


Figure 12. Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) sur la concentration des ecdystéroïdes hémolymphatiques ($\text{pg } 20\text{E} / \mu\text{l}$ d'hémolymphe) à différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm \text{SD}$, $n = 4$).

3.3.2. Effet sur la composition biochimique des cuticules

La composition biochimique des cuticules de *P. adspersus* est réalisée au niveau du céphalothorax des séries témoins et traitées au novaluron aux deux concentrations testées ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$). Le poids total (mg) ainsi que leurs les composants biochimiques des cuticules: la chitine ($\mu\text{g/mg}$ de tissu, %), les protéines cuticulaires (%) et les sels calciques (%) sont déterminés tout le long d'un cycle de mue (A-D). Le traitement est effectué au début du cycle (stade A) et dure 15 jours, jusqu'au stade D. (Fig. 13)

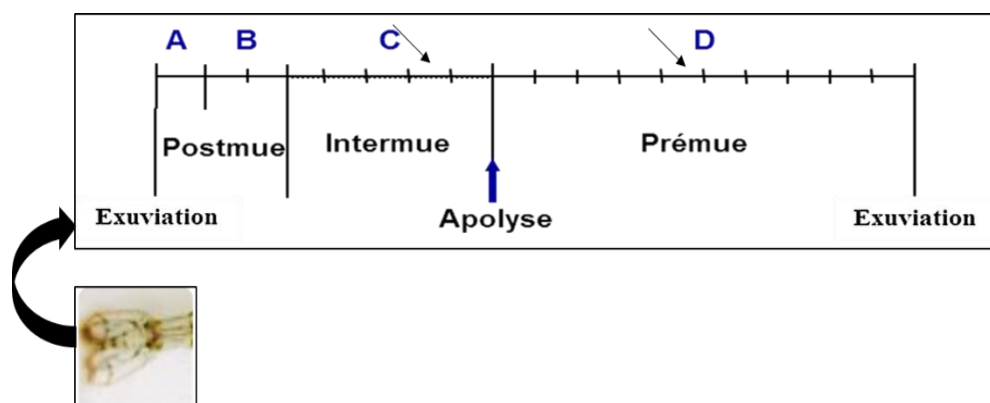


Figure 13. Durée relative des différents stades du cycle de mue de *P. adspersus* (—| = un jour).

3.3.2.1. Effet sur le poids des cuticules

Le poids des cuticules témoins augmente d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) au cours du cycle de mue. En effet, au début du cycle (stade A), le poids des cuticules est de l'ordre de $5,1 \pm 0,69 \text{ mg}$. Cette valeur passe à $7,29 \pm 0,26 \text{ mg}$ au stade D.

Chez les séries traitées au novaluron, la CL_{50} n'affecte pas le poids des cuticules, par contre, la CL_{90} le diminue d'une manière significative aux stades B et D ($p \leq 0,05$), et de façon hautement significative au stade C ($p \leq 0,001$). Le poids des cuticules enregistré au stade D chez la série témoin est de l'ordre de $7,29 \pm 0,26 \text{ mg}$; il diminue pour atteindre la valeur de $6,07 \pm 0,41 \text{ mg}$ à la CL_{90} durant le même stade (Tableau 6, Fig. 14).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (stade, traitement) des données du poids des cuticules au cours du cycle de mue de *P. adspersus*, indique un effet traitement ($F_{2, 36} = 16,55$; $p < 0,001$), un effet stade ($F_{3, 36} = 28,77$; $p < 0,001$) et une interaction stade/traitement ($F_{6, 36} = 1,67$; $p = 1569$).

Tableau 6: Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) sur le poids des cuticules à différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm SD$, $n = 4-5$).

Traitements Stages	Témoins	Novaluron (CL_{50})	Novaluron (CL_{90})
A	$5,1 \pm 0,69$ a A	$5,15 \pm 0,35$ a A	$4,81 \pm 0,31$ a A
B	$6,17 \pm 0,39$ a B	$5,54 \pm 0,56$ ab A	$5,19 \pm 0,26$ b A
C	$7,11 \pm 0,57$ a C	$6,61 \pm 0,56$ ab B	$5,8 \pm 0,38$ b AB
D	$7,29 \pm 0,26$ a C	$6,58 \pm 0,06$ ab B	$6,07 \pm 0,41$ b B

- Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).
- Les lettres en minuscule comparent les moyennes entre les traitements au sein d'un même stade.
- Les lettres en majuscule comparent les valeurs des différents stades au sein d'un même traitement.
(Comparaison: test HSD de Tukey, 5%).

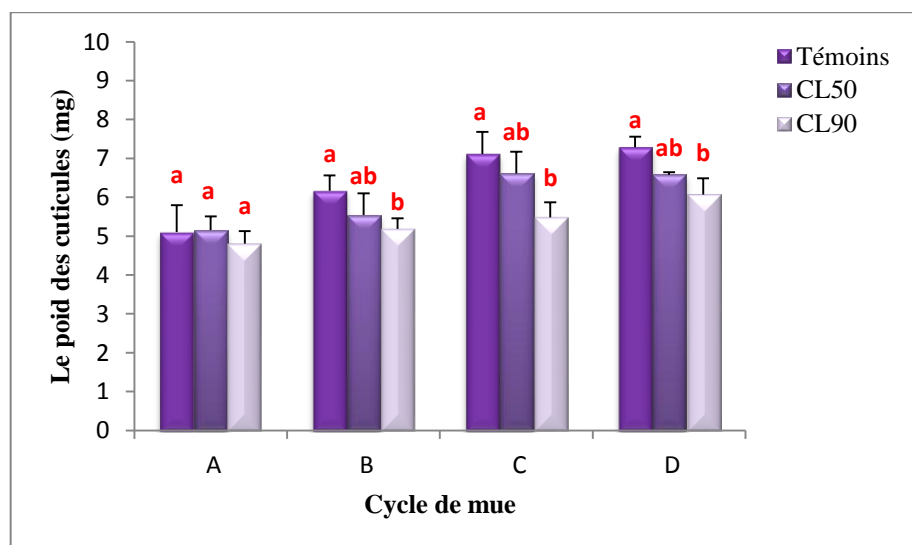


Figure 14. Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) sur le poids des cuticules à différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm SD$, $n = 4-5$).

3.3.2.2 Effet sur le contenu et le taux de la chitine

Le contenu en chitine chez *P. adspersus* est estimé au cours du cycle de mue des séries témoins et traités au novaluron. Les quantités en chitine sont déterminées à partir d'une courbe étalon, exprimant les densités optiques en fonction des différentes quantités du glucosamine (Fig. 15).

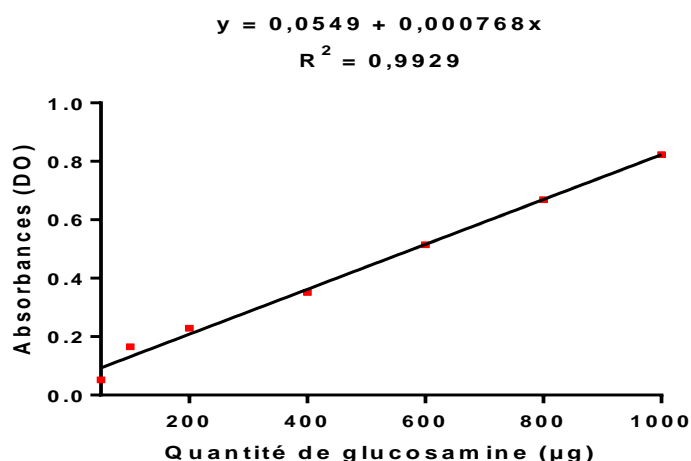


Figure 15. Courbe étalon exprimant les densités optiques en fonction des quantités de glucosamine (µg).

Les résultats de l'évolution du contenu et du taux en chitine au cours d'un cycle de mue sont rassemblés dans les tableaux 7 et 8 et représentés graphiquement dans la figure 16.

Dans les conditions normales, le contenu et le taux en chitine augmentent d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) au cours de la période allant du stade A ($71,12 \pm 1,92$ µg /mg de tissu; 44,09%) jusqu'au stade C, pour atteindre une valeur de $150,37 \pm 6,02$ µg /mg de tissu correspondant à 58,33%. Au stade D, il y a eu une diminution significative du contenu et du taux de chitine. Les valeurs enregistrées chez les séries témoins sont de l'ordre de $150,37 \pm 6,02$ µg /mg de tissu (58%) au stade C et $104,22 \pm 8,45$ µg /mg de tissu (49,13%) au stade D.

L'application du novaluron se traduit par une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) des quantités et des taux de chitine à tous les stades A, B et C. Les valeurs obtenues au stade C ont diminué jusqu'à $97,82 \pm 7,51$ µg /mg de tissu (52,97%) à la CL₅₀, et $76,44 \pm 4,63$ µg /mg de tissu (43,09%) à la CL₉₀ par rapport à la série témoin ($150,37 \pm 6,02$ µg /mg de

tissu: 58,33%). Tandis qu’au stade D, les valeurs obtenues sont de l’ordre de $87,25 \pm 8,88 \mu\text{g} / \text{mg}$ de tissu (45,13%), et $49,79 \pm 4,378 \mu\text{g} / \text{mg}$ de tissu (33,64%), respectivement, chez les séries traitées à la CL_{50} et CL_{90} , comparativement à la série témoin, où le contenu en chitine était de l’ordre de $104,22 \pm 8,45 \mu\text{g} / \text{mg}$ de tissu, l’équivalent de 49,13%. (Tableau 7 et 8 ; Fig. 16).

L’analyse de la variance à deux critères de classification (stade, traitement) des données du taux et du contenu de la chitine au cours du cycle de mue de *P. adspersus*, indique un effet traitement ($F_{2, 41} = 43,41$; $p < 0,001$); ($F_{2, 52} = 465,8$; $p < 0,001$), un effet stade ($F_{3, 41} = 53,11$; $p < 0,001$); ($F_{3, 52} = 216,4$; $p < 0,001$), et une interaction stade/traitement ($F_{6, 41} = 5,63$; $p = 0,0002$) ($F_{6, 52} = 40,77$; $p < 0,001$) respectivement.

Tableau 7 : Effet du novaluron ($CL_{50}=0,91\mu\text{g/L}$; $CL_{90}= 4,30 \mu\text{g/L}$) sur le contenu en chitine (μg de glucosamine/mg de tissu) au cours du cycle de mue chez *P.adspersus* ($m \pm SD$, $n= 4-7$).

Traitements Stades	Témoins	Novaluron (CL_{50})	Novaluron (CL_{90})
A	$71,12 \pm 1,92$ a A	$73,03 \pm 4,23$ a A	$48,51 \pm 1$ b A
B	$101,71 \pm 4,57$ a B	$85,43 \pm 2,1$ b B	$67,06 \pm 1,9$ c B
C	$150,37 \pm 6,02$ a C	$97,82 \pm 7,51$ b C	$76,44 \pm 4,63$ c C
D	$104,22 \pm 8,45$ a B	$87,25 \pm 8,88$ b B	$49,79 \pm 4,38$ c A

- Les moyennes suivies d’une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).
- Les lettres en minuscule comparent les moyennes entre les traitements au sein d’un même stade. Les lettres en majuscule comparent les valeurs des différents stades au sein d’un même traitement. (Comparaison: test HSD de Tukey,5%)

Tableau 8: Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) sur le taux (%) de la chitine dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm SD$, $n = 4-5$).

Stades \ Traitements	Témoins	Novaluron (CL_{50})	Novaluron (CL_{90})
A	44,09 ± 2,12 a A	42,04 ± 1,30 a A	35,34 ± 5,46 b A
B	45,07 ± 0,93 a A	35,61 ± 3,30 b B	37,61 ± 6,10 b A
C	58,33 ± 1,19 a B	52,97 ± 2,94 b C	43,09 ± 1,80 c B
D	49,13 ± 3,18 a A	45,13 ± 3,18 a B	33,64 ± 3,77 b A

- Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).
- Les lettres en minuscule comparent les moyennes entre les traitements au sein d'un même stade. Les lettres en majuscule comparent les valeurs des différents stades au sein d'un même traitement. (Comparaison: test HSD de Tukey, 5%).

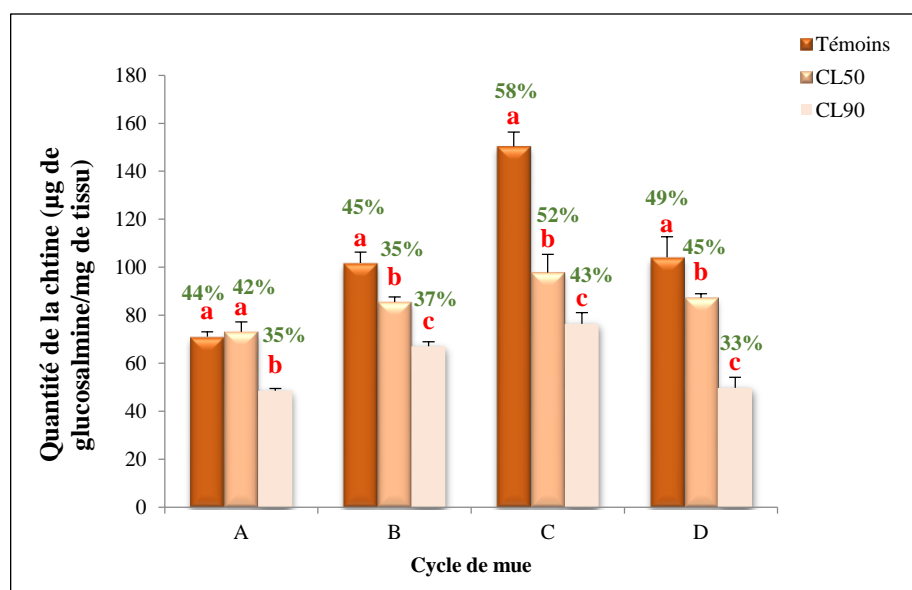


Figure 16. Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) le contenu (μg de glucosamine/ mg de tissu) et le taux (%) de la chitine dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm SD$, $n = 4-5$).

3.3.2.3. Effet sur les protéines cuticulaires

Les résultats concernant l'évolution du taux de protéines cuticulaires sont représentés dans le tableau 9 et la figure 17. Dans les conditions normales, les taux de protéines cuticulaires les plus élevés sont enregistrés au cours de la postmue (stade A: $60,54 \pm 4,26\%$; stade B: $54,92 \pm 0,93\%$). A l'intermue (stade C) le taux de protéines cuticulaires diminue d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) pour atteindre la valeur de $41,25 \pm 1,28 \%$ par rapport au stade A. Enfin, en prémue (stade D) on remarque une légère augmentation ($49,02 \pm 3,67\%$) du taux de protéines cuticulaires par rapport au stade C.

Le traitement par le novaluron à la CL_{50} a provoqué une augmentation significative ($p \leq 0,05$) uniquement au stade C. En effet, le taux des protéines cuticulaires est de l'ordre de $41,25 \pm 1,28\%$ chez les témoins et atteint à $48,93 \pm 1,13\%$ à la CL_{50} . Chez les séries traitées au novaluron à la CL_{90} le taux de protéines cuticulaires augmente de manière hautement significative ($p \leq 0,001$) aux stades A, C et D et de manière très significative ($p < 0,01$) au stade B. En effet, les valeurs enregistrées sont de l'ordre de $56,28 \pm 1,09\%$ au stade C et $66,35 \pm 3,77\%$ au stade D (Tableau 9; Fig. 17)

Le traitement des résultats par l'analyse de la variance à deux critères de classification révèle un effet traitement ($F_{2, 38} = 635,7; p < 0,0001$), un effet stade ($F_{3, 38} = 545,6; p < 0,0001$) et une interaction stade/traitement ($F_{6, 38} = 14,67; p = 0,1237$).

Tableau 9 : Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g /L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g /L}$) sur le taux (%) des protéines dans la cuticule aux différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm SD, n = 8$).

Traitements Stades	Témoins	Novaluron (CL_{50})	Novaluron (CL_{90})
A	$60,54 \pm 4,26$ a A	$63,37 \pm 2,79$ a A	$73,12 \pm 0,78$ b A
B	$54,92 \pm 0,93$ a AC	$57,41 \pm 3,84$ a B	$62,38 \pm 6,10$ b B
C	$41,25 \pm 1,28$ a B	$48,93 \pm 1,13$ b C	$56,28 \pm 1,09$ c C

D	49,02 ± 3,67 a C	52,87 ± 1,69 a CB	66,35 ± 3,77 b B
----------	-----------------------------------	------------------------------------	-----------------------------------

- Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).
- Les lettres en minuscule comparent les moyennes entre les traitements au sein d'un même stade.
- Les lettres en majuscule comparent les valeurs des différents stades au sein d'un même traitement.
(Comparaison : test HSD de Tukey, 5%).

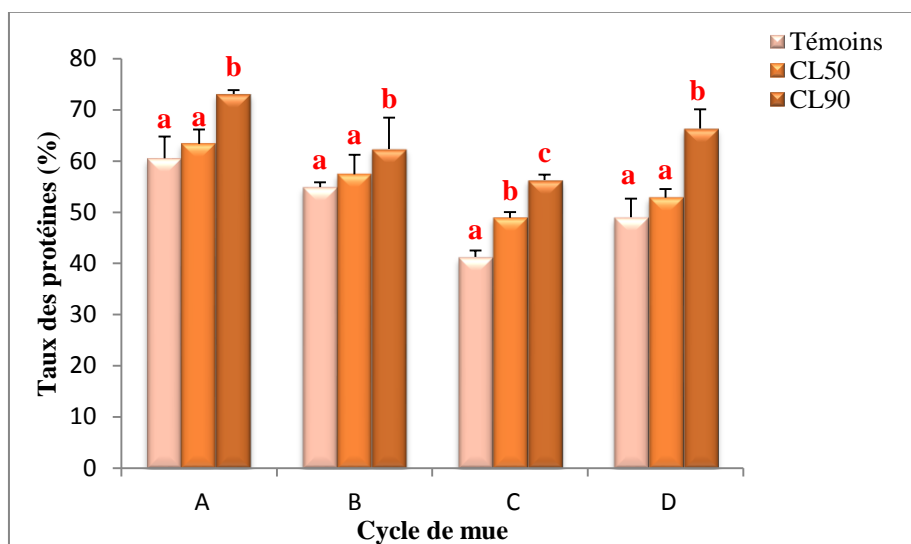


Figure 17. Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) sur le taux (%) des protéines dans la cuticule aux différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm SD$, $n = 8$).

3.3.2.4. Effet sur le taux des sels calciques

Les résultats de l'évolution du taux des sels calciques au cours d'un cycle de mue chez *P. adspersus* sont rassemblés dans le tableau 10 et représentés graphiquement dans la figure 18.

Chez les séries témoins, le taux de sels calciques augmente significativement ($P < 0,05$) uniquement au stade D, il passe de $42,69 \pm 1,87\%$ au stade A à $51,15 \pm 0,33\%$ au stade D. Le traitement par le novaluron aux deux concentrations testées s'avère sans effet significatif ($p > 0,05$) sur le taux des sels calciques.

L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle qu'il n'existe aucun effet significatif : ni traitement ($F_{2, 27} = 1,285$; $p = 0,2931$), ni stade ($F_{3, 27} = 2,111$; $p = 0,1222$) ni interaction stade/traitement ($F_{6, 27} = 0,9726$; $p = 0,4625$).

Tableau 10 : Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g} /\text{L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g} /\text{L}$) sur le taux (%) des sels calciques dans la cuticule aux différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traités ($m \pm SD$, $n = 8$).

Traitements Stades	Témoins	Novaluron (CL_{50})	Novaluron (CL_{90})
A	42,69 \pm 1,87 a A	46,17 \pm 3,81 a A	42,04 \pm 3,23 a A
B	42,1 \pm 8,50 a A	44,13 \pm 4,27 a A	41,6 \pm 0,67 a A
C	39,98 \pm 7,52 a A	42,71 \pm 7,88 a A	38,86 \pm 7,96 a A
D	51,15 \pm 0,33 a B	48,89 \pm 3,11 a A	44,64 \pm 3,47 a A

- Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).
- Les lettres en minuscule comparent les moyennes entre les traitements au sein d'un même stade
- Les lettres en majuscule comparent les valeurs des différents stades au sein d'un même traitement.
(Comparaison : test HSD de Tukey, 5%).

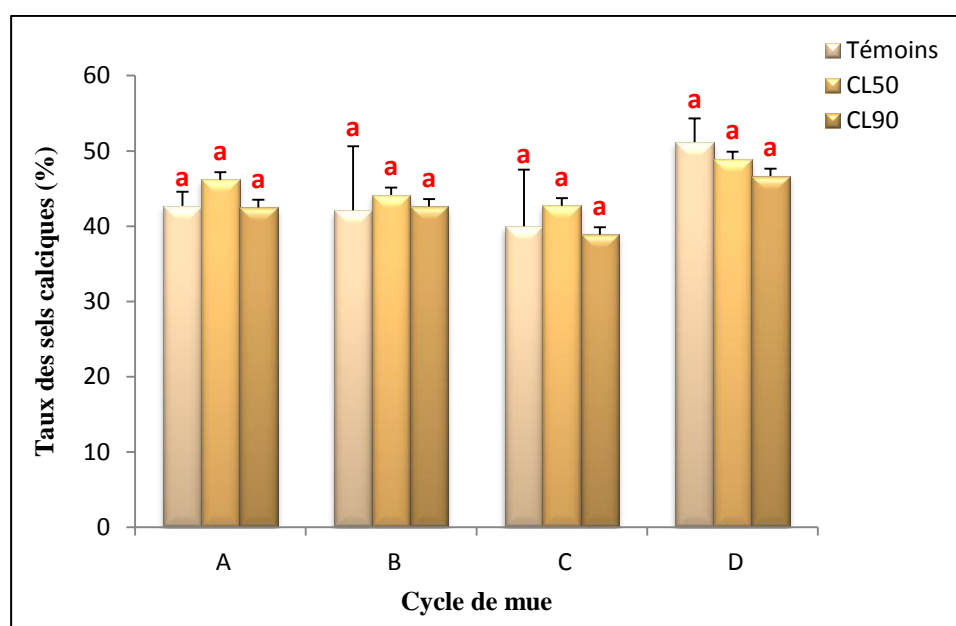


Figure 18. Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) sur le taux (%) des sels calciques dans la cuticule aux différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm SD$, $n = 8$).

3.2.3. Effet sur la sécrétion cuticulaire

Les observations des coupes histologiques sous microscope optique, nous donnent les informations sur la sécrétion cuticulaire. En effet, dans les conditions normales, l'épaisseur de la cuticule de *P. adspersus* augmente progressivement au cours des trois premiers stades (A, B, C) et diminue à la fin du cycle de mue (stade D) (Tableau 11, Fig. 19; 20). Au début du cycle (stade A), l'épaisseur de l'ancienne cuticule est de $2,43 \pm 0,82 \mu\text{m}$, elle augmente pour atteindre une valeur maximale de $8,06 \pm 0,71 \mu\text{m}$ durant le stade C. A la fin, du cycle, c'est à dire au cours du stade D, l'épaisseur des cuticules diminue jusqu'à une valeur de $4,83 \pm 0,28 \mu\text{m}$.

Les mensurations des cuticules chez les séries traitées au novaluron (CL_{50} et la CL_{90}) révèlent une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'épaisseur de l'ancienne cuticule au cours du stade C et D. En effet, les épaisseurs enregistrées au stade C sont de l'ordre de $5,25 \pm 2,14 \mu\text{m}$ à la CL_{50} et de $3,58 \pm 0,52 \mu\text{m}$ à la CL_{90} . Au stade D, les épaisseurs obtenues sont de l'ordre de $3,58 \pm 0,52$ et $2,77 \pm 0,11 \mu\text{m}$, respectivement, chez les séries traitées au novaluron à CL_{50} et la CL_{90} (Tableau 11, Fig. 19; 20).

L'analyse de la variance à deux critères a révélé un effet traitement ($F_{2, 28} = 35,82$; $p < 0,001$), un effet stade ($F_{2, 28} = 4,73$; $p < 0,001$) et l'interaction traitements/ stades ($F_{4, 28} = 4,73$; $p = 0,0048$).

Les observations des coupes histologiques, montrent que la sécrétion de la nouvelle cuticule chez les témoins a eu lieu au cours du stade D ($3,31 \pm 0,28 \mu\text{m}$). Le traitement par le novaluron à la CL_{50} a réduit significativement ($p < 0,001$) l'épaisseur de la nouvelle cuticule jusqu'à $1,54 \pm 0,48 \mu\text{m}$. Celle-ci absente chez les séries traitées par le novaluron à la CL_{90} (Tableau 12, Fig. 20).

Tableau 11: Effet du novaluron (CL= 0,91 µg/L; CL₉₀= 4,30 µg/L) sur l'épaisseur de la cuticule (µm) au cours du cycle de mue chez *P. adspersus* (m ± SD, n= 4-7).

Traitements / Stades	Témoins	Novaluron (CL ₅₀)	Novaluron (CL ₉₀)
A	2,43 ± 0,82 a A	2,11 ± 0,4 a A	1,71±0,28 a A
B	3,97 ± 0,30 a AC	3,18 ± 0,61 a A	2,05±0,31 a A
C	8,06 ± 0,71 a B	5,25 ± 2,14 b B	3,58 ± 0,52 c A
D	4,83 ± 0,28 a C	3,58 ± 0,52 b A	2,77 ± 0,11 b A

- Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).
- Les lettres en minuscule comparent les moyennes entre les traitements au sein d'un même stade. Les lettres en majuscule comparent les valeurs des différents stades au sein d'un même traitement. (Comparaison : test HSD de Tukey, 5 %).

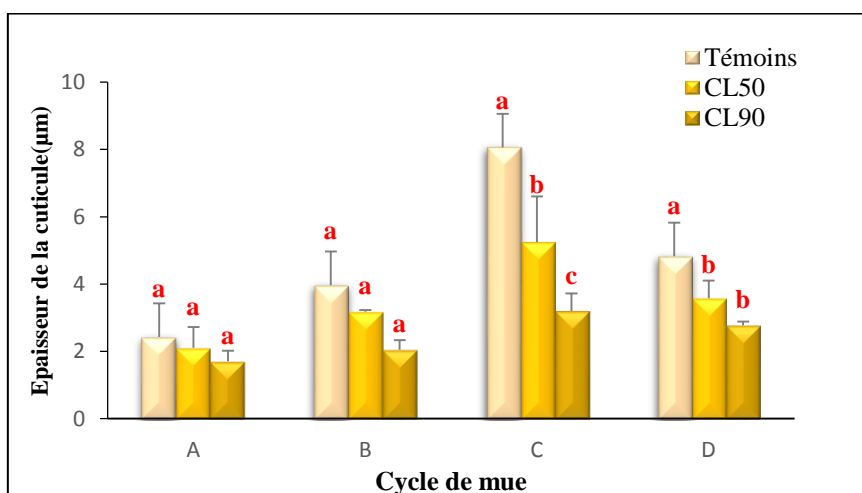


Figure 19. Effet du novaluron (CL₅₀= 0,91 µg/L ; CL₉₀= 4,30 µg/L) sur l'épaisseur de la cuticule (µm) au cours du cycle de mue chez *P. adspersus* (m± SD, n= 4-7).

Tableau 12: Effet du novaluron (CL₅₀= 0,91µg/L et CL₉₀= 4,30 µg/L) sur l'épaisseur de la nouvelle cuticule (µm) au stade D du cycle de mue chez *P. adspersus* (m ± SD, n= 4-7).

Traitements	Témoins	Novaluron (CL ₅₀)	Novaluron(CL ₉₀)	P
-------------	---------	-------------------------------	------------------------------	---

Nouvelle cuticule	$3,31 \pm 0,28$ a	$1,54 \pm 0,48$ b	–	0,0047**
-------------------	-------------------	-------------------	---	----------

- Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

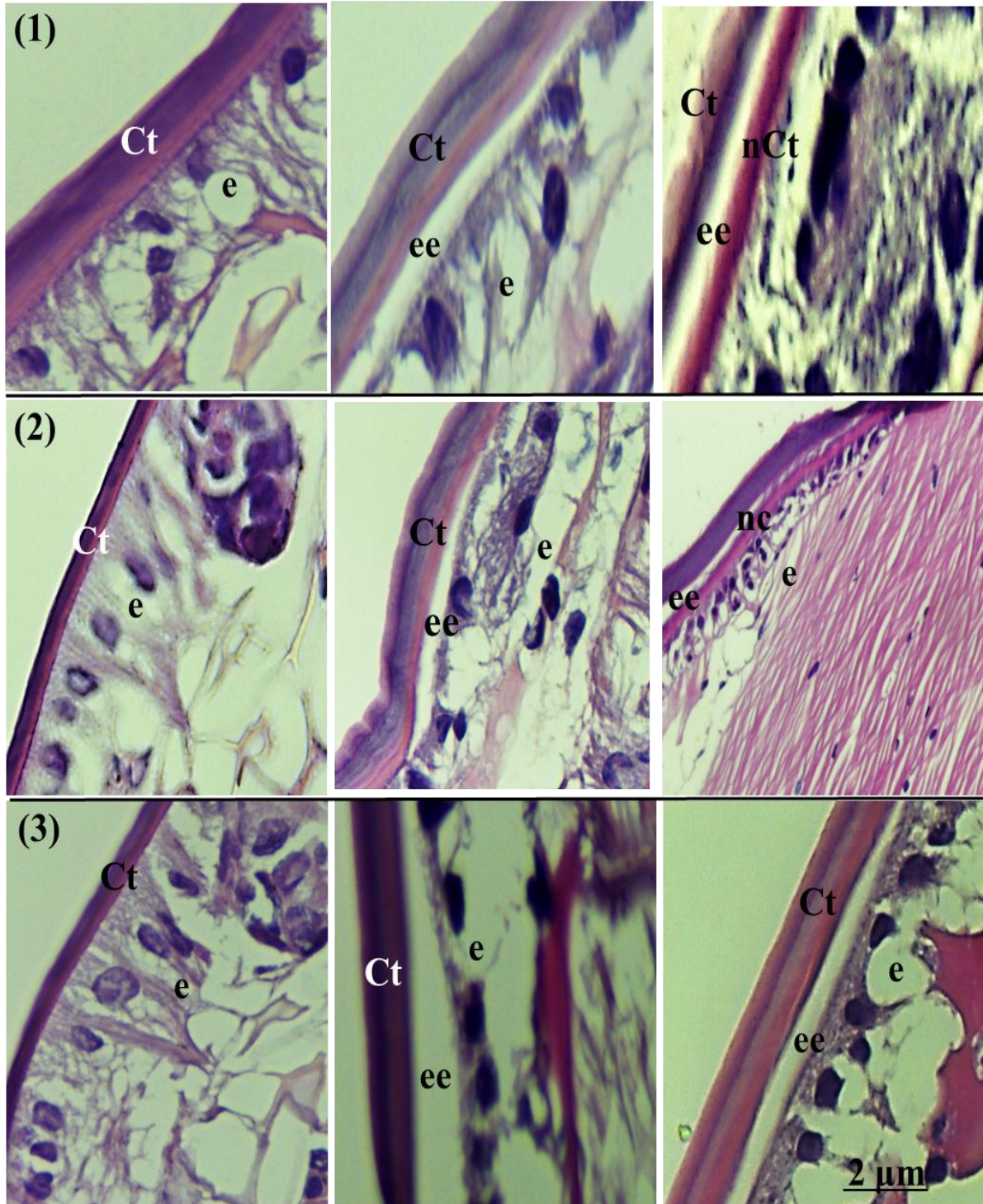
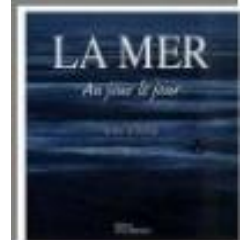


Figure 20. Coupes transversales de la cuticule chez les Témoins et les traités de *P. adspersus* durant le cycle de mue. (1) témoins: stages A-B, C, D; (2) Novaluron CL50: stages A-B, C, D; (3) Novaluron CL90: stages A-B, C, D. (e: epiderme; oc: exo cuticule; nc: nouvelle cuticule; es: espace exuvial)



Discussion

«La théorie c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi !»

Albert Einstein

4. Discussion

4.1 Détermination de l'activité enzymatique chez *P. adspersus*

Le milieu lagunaire est un écosystème très sensible en raison de sa situation d'interface, entre l'environnement continental et marin, et sa proximité aux activités anthropiques. Lors d'un stress environnemental causé par la présence des polluants, les réponses biochimiques sont immédiates dans les organismes exposés (David *et al.*, 2012). C'est pourquoi nous avons utilisé la crevette *P. adspersus* (Crustacea, Decapoda) comme espèce bioindicatrice, afin d'investiguer l'impact des activités anthropiques, sur la qualité des eaux de la lagune El-Mellah. L'étude consiste à examiner l'activité de la glutathion S-transférase (GST) et l'acétylcholinestérase (AChE), qui ont été largement utilisées comme biomarqueurs environnementaux chez différentes espèces (Mollusques, Poissons, Annélides) (Corsi *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2006).

4.1.1 Activité spécifique de la glutathion-S-transférase

La GST est impliquée dans diverses opérations de transport et de biosynthèse intracellulaire (Sheehan *et al.*, 2001). C'est l'une des enzymes les plus sollicitées lors d'un processus de détoxification d'un organisme soumis à un xénobiotique (Quiniou *et al.*, 2007). Les GSTs catalysent la réaction de conjugaison qui permet d'associer le substrat, au groupement thiol de la molécule glutathion réduit (GSH). Cette conjugaison neutralise les sites électrophiles des substrats pour protéger les différents composés de la cellule (Enayati *et al.*, 2005), en rendant le substrat hydrosoluble, facilitant ainsi son excrétion. Elles ont été mises en évidence dans la plupart des êtres vivants, tels que les Mollusques (Tlili *et al.*, 2013; Sifi *et al.*, 2013), les Crustacés (Rodrigues & Pardal, 2014), les Insectes (Shi *et al.*, 2012), les Poissons (Pérez-López *et al.*, 2002), les Mammifères (Pascal *et al.*, 1998) et les plantes (Hong *et al.*, 1999). (Fig. 21).

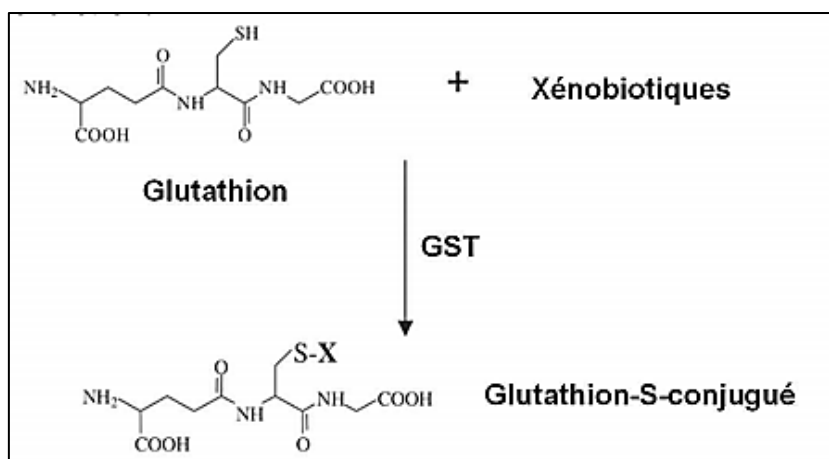


Figure 21. Schéma de conjugaison d'un substrat avec le glutathion réalisée par une GST.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent une induction de la GST chez les individus récoltés au niveau des sites 2 et 3 (où déversent l'Oued El-Mellah et l'Oued R'kibet, dans la lagune, respectivement) comparativement au site 1 (la zone d'étranglement du chenal qui débouche sur la méditerranée). Cette augmentation de l'activité de la GST nous permet de suggérer que le processus de détoxification contre les forces de pro oxydation est déclenché par cette enzyme (induite). En outre, les activités maximales de la GST sont enregistrées durant l'été par rapport à l'automne et durant l'année 2014. Le climat de la zone d'étude est de type méditerranéen, avec une température annuelle moyenne de 18°C et une pluviométrie annuelle de 650 à 1000 mm avec un pic des précipitations en hiver et des déficits qui se produisent généralement en été (Debieche, 2002). Ainsi, l'effet saison peut être dû à des pluies en automne qui favorisent la dilution des polluants qui suivent l'approvisionnement en eau par les rivières, tandis que l'effet année peut être expliqué par une pluviométrie plus élevée en 2013 par rapport à l'année 2014.

Nos résultats sont similaires aux travaux de Mebarki *et al.*, (2015) sur le Mollusque *Cerastoderma glaucum*, qui montrent que l'activité de la GST est maximale en période estivale et les valeurs les plus élevées sont enregistrées au niveau des site 2 et 3 (où déversent l'Oued El-Mellah et l'Oued R'kibet dans la lagune) par rapport au site 1 (la zone d'étranglement du chenal qui débouche sur la méditerranée). De plus, l'induction de l'activité de GST est observée chez différentes espèces de Crustacés tel que la crevette *Palaemonetes argentinus* exposée au fénitrothion, la crevette *Macrobrachium borelli* exposée à des insecticides organophosphorés (Lavarias *et al.*, 2013), et également la crevette *Palaemon*

serratus exposée au benzo (a) pyrène (BaP) (Silva *et al.*, 2013). Des travaux antérieurs sur la biosurveillance de l'état de santé du golfe d'Annaba, ont signalé également une augmentation de l'activité de la GST chez *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) à Sidi Salem comparativement à El-Battah (Abbes *et al.*, 2003; Sifi *et al.*, 2007 Amira *et al.*, 2011; Bensouda & Soltani-Mazouni 2014). D'autres études effectuées dans le cadre de la biosurveillance de la qualité des eaux de la lagune de Bizerte ont montré une induction de la GST chez le Crustacé *Carcinus maenas* (Ben-Khedher *et al.*, 2012) et le Mollusque *Mytilus galloprovincialis* (Barhoumi *et al.*, 2014). Des travaux récents ont montré également une augmentation de la GST chez des crevettes *Litopenaeus vannamei* exposés à différents pH du milieu (basic et acide) et aux métaux lourds (le cadmium et le zinc) (Furtado *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016). De même, une augmentation de GST est observée chez la crevette *Marsupenaeus japonicus* exposée à la dessiccation (Duan *et al.*, 2016).

4.2 Activité spécifique de l'acétylcholinestérase

L'AChE est une enzyme impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux. Elle catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique (Matozzo *et al.*, 2005). L'inhibition de l'AChE par de nombreux neurotoxiques entraîne l'accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique, ce qui maintient une transmission permanente de l'influx nerveux, conduit généralement à la tétanie musculaire et à la mort de l'organisme (Matozzo *et al.*, 2005). L'AChE constitue la cible de certains insecticides comme les organophosphorés ou les carbamates (Oliveira *et al.*, 2007; Kamel *et al.*, 2012), les herbicides et d'autres molécules neurotoxiques incluant les métaux lourds ou les huiles (Amiard-Triquet *et al.*, 1998; Tim-Tim *et al.*, 2009) (Fig. 22).

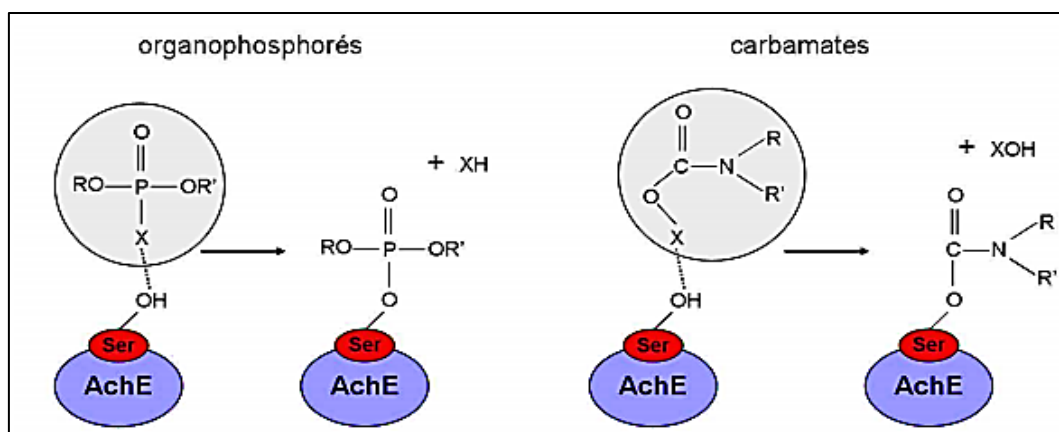


Figure 22. Schéma de l'action d'un organophosphoré ou d'un carbamate sur le site actif de l'acétylcholinestérase (AChE).

Nos résultats ont démontré une inhibition de l'activité de l'ACHé chez les crevettes *P. adspersus* récoltées aux niveaux des deux sites, 2 et 3 comparativement au site 1. De plus, l'inhibition est plus élevée en période estivale par rapport à la saison automnale et également plus élevée en 2014 par rapport à l'année 2013. Ces résultats nous permettent de suggérer une contamination par des polluants neurotoxiques tels que les métaux lourds et /ou pesticides. En effet, ces conclusions sont similaires à ceux rapportés par [Mebarki et al. \(2015\)](#). Ils confirment une inhibition de l'activité de l'ACHé en période estivale au niveau des sites 2 et 3 par rapport au site 1 chez *C. glaucum*. Des travaux antérieurs ont montré que la lagune El-Mellah est contaminée par le fer, le nickel et le chrome au niveaux des sites 2 et 3 ([Bendjama et al., 2011](#)). [Abbes et al. \(2006\)](#) ont également rapporté une inhibition élevée de l'activité AChE au niveau des sites Oued Bouaroug et El-Mellah durant la période estivale chez la palourde *Ruditapes decussatus*. Les travaux de [Kamel et al. \(2012\)](#) ont révélé une inhibition de l'ACHé due à différents effluents sur la palourde *R. decussatus* récoltées dans la lagune de Bizerte en Tunisie, des résultats similaires ont été obtenus avec le mollusque *Mytilus galloprovincialis* ([Barhoumi et al., 2013a, b](#); [Barhoumi et al., 2014](#)). Aussi, [Tlili et al. \(2010\)](#) ont enregistré une inhibition de l'activité de l'ACHé chez *D. trunculus* récoltés dans les sites pollués sur les côtes tunisiennes. Chez la même espèce du golfe d'Annaba à El-Battah et Sidi Salem (Algérie), plusieurs auteurs ont enregistré une importante inhibition de l'activité de l'ACHé qui est due à l'émission des déchets domestiques et industriels provenant du complexe FERTIAL (Usine de production de fertilisants et de produits phytosanitaires) ([Sifi et al., 2007](#); [Amira et al., 2011](#); [Bensouda et al., 2014](#)). De nombreux travaux ont montré que l'activité de l'ACHé est inhibée chez les crevettes d'eau douce *Palaemonetes argentinus* exposées au fénitrothion organophosphorée ([Lavarias et al., 2015](#)) et chez les bivalves *Modiolus babatus* exposées à un stress thermique ([Dimitriadis et al., 2012](#)) et *Scrobicularia plana* soumises à un stress par des nanoparticules métalliques ([Fossi-Tankoua et al., 2013](#)). On note aussi une inhibition de l'activité de l'ACHé chez les crabes *Carcinus maenas* exposé au fluorenthène ([Rodrigue et al., 2013](#)) et chez la crevette *Macrobrachium borelli* contaminée par des organophosphates ([Lavarias et al., 2013](#)).

4.2. Effet du novaluron sur la crevette *Palaemon adspersus*

Chez les Crustacés, le cycle de mue est sous le contrôle direct des ecdystéroïdes sécrétés par l'organe Y (OY) ([Lachaise et al., 1993](#); [Le Blanc et al., 1999](#)). Ce dernier est sous le contrôle négatif d'un neuropeptide sécrété par le complexe organe X/glande du sinus

(OX/GS) appelés hormone inhibitrice de la mue (MIH) (Lachaise *et al.*, 1993; Abuhagr *et al.*, 2014) (Fig. 23). La concentration de MIH circulante reste constante, au cours du cycle de mue, excepté un fort déclin durant les premières phases de la prémue (Nakatsuji et Sonobe, 2004) impliquant la synthèse et l'augmentation de la 20E dans l'hémolymphe. Au même titre que pour l'OY, l'activité de l'Organe Mandibulaire (OM) est négativement régulée par un neuropeptide appelé hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire (MOIH) qui est sécrété par le complexe OX/GS, (Borst *et al.*, 2001; Nagaraju *et al.*, 2003; Nagaraju, 2007).

4.2.1 Effet sur les ecdystéroïdes hémolympatiques

Chez les Crustacés, la régulation de la mue, la reproduction et l'embryogenèse sont assurées par les ecdystéroïdes (Subramoniam, 2000; Chang & Mykles, 2011). L'OY synthétise à partir d'un précurseur biosynthétique le cholestérol, une grande variété de prohormone (d'ecdystéroïdes) dans l'hémolymphe (Gilbert & Rewitz, 2009 ; Mykles, 2011). En fonction des espèces, YO peut produire l'ecdysone, la 3-dehydroecdysone (3De), la 25-deoxyecdysone (25dE) et la 3-déshydro-25-deoxyecdysone (3D25dE) (Chang & Mykles, 2011). Les tissus périphériques convertissent ces composés en hormone active: la 20E et la ponastérone A (PoA) (25-désoxy-20-hydroxyecdysone ou 25d20E) par le cytochrome P-450 mono-oxygénases (Mykles, 2011). En effet, chez les Crustacés décapodes, la 20E et la PoA représentent les hormones actives majeures circulant dans l'hémolymphe (Okumura *et al.*, 1989 ; Yu *et al.*, 2002 ; Soltani & Bezzazel, 2002) (Fig. 24). Les dosages des ecdystéroïdes ont été effectués chez un bon nombre de Crustacés Décapodes dans des extraits totaux, l'hémolymphe, les ovaires ou encore les œufs en utilisant des techniques comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Baldaia *et al.*, 1984), la méthode radio-immunologique (Cuzin-Roudy *et al.*, 1989) et une méthode enzymo-immunologique (Soltani & Bezzazel., 2002).

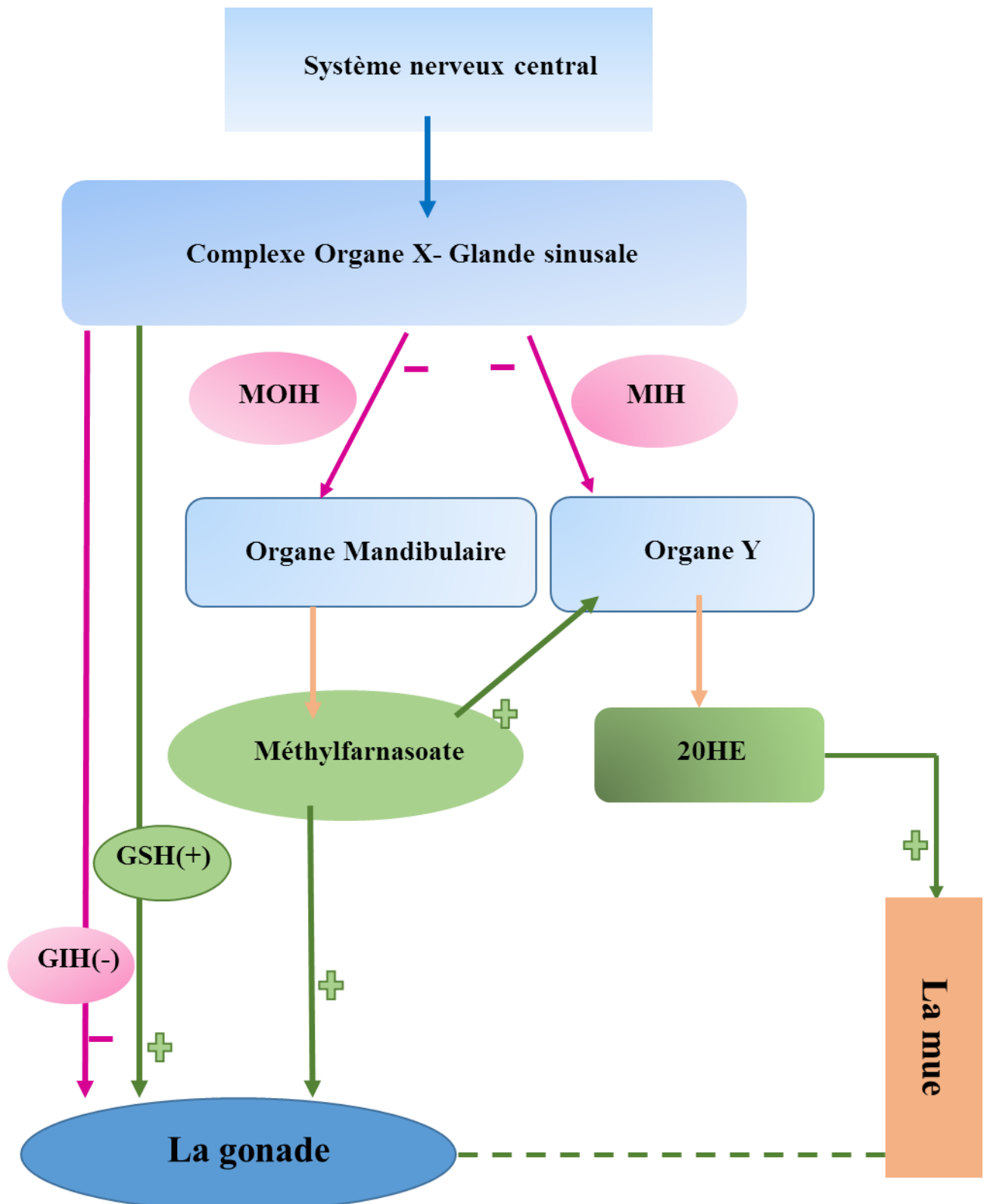


Figure 23. Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule les processus de la mue chez les Crustacés (modifié par : Hyne, 2011; Jubeaux, 2012).

Flèche en vert: stimulation; flèche en rouge: inhibition; flèche en orange: sécrétion.

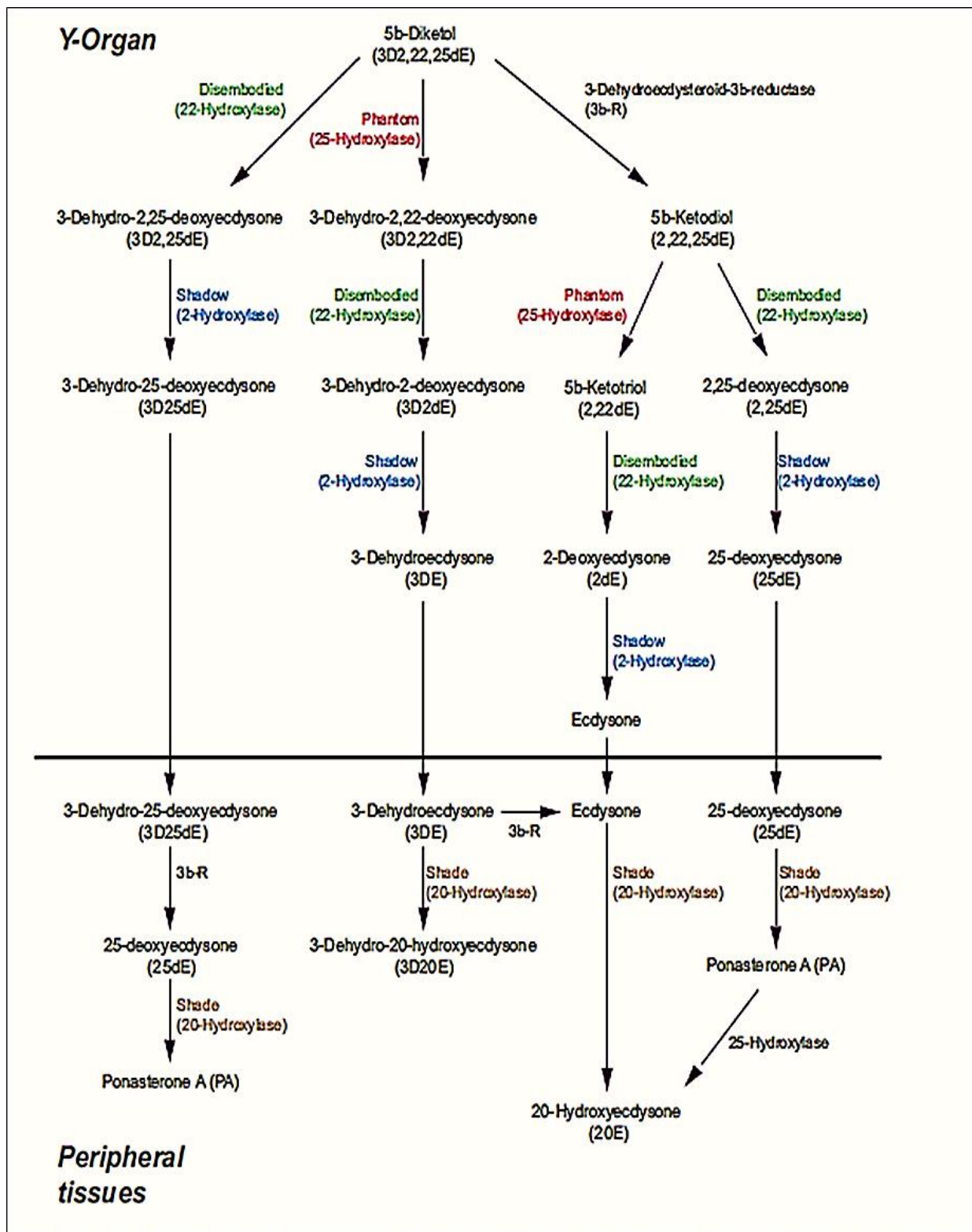


Figure 24. La voie de la biosynthèse des ecdystéroïdes dans la glande de mue chez les Crustacés. (Mykles, 2011).

L'analyse quantitative des ecdystéroïdes révèle une variation de la concentration de la 20E d'un stade à l'autre. Ces concentrations sont basse en période de postmue (A-B) et augmentent en intermue (stade C). Un seul pic a eu lieu en période de prémue (D). Le profil des ecdystéroïdes durant les différents stades de mue, met en évidence le rôle de ces hormones dans la mue de *P. adspersus*. Ainsi, le pic observé au stade D, semble être une stimulation hormonale pour la sécrétion de la nouvelle cuticule. Nos résultats sont globalement semblables à ceux enregistrés par d'autres auteurs, dans l'hémolymphe de plusieurs Crustacés: *Orchestia cavimana* (Cuzin-Roudy *et al.*, 1989); *Panaeus vannamei* (Blais *et al.*, 1994); *Panaeus kearathurus* (Soltani & Bezzazel, 2002) et *Callinectes sapidu* (Chen *et al.*, 2012). En accord avec nos résultats, Hurberman (2000) précise que la concentration de la 20E subit des variations impressionnantes tout au long du cycle de mue. Il souligne qu'immédiatement après l'exuviation, les concentrations de l'hormone de mue sont peu importantes et augmentent généralement durant l'intermue. Cependant, les plus importantes concentrations sont enregistrées au stade D (Yu *et al.*, 2002; Cuzin-Roudy *et al.*, 1989).

Les résultats obtenus suite à un traitement par le novaluron avec les deux concentrations CL₅₀ et la CL₉₀, ont révélé une augmentation des concentrations d'ecdystéroïdes hémolympatiques par rapport aux témoins. L'augmentation de ces hormones est en grande partie due à l'augmentation de la biosynthèse et la conversion des prohormones en ecdystéroïdes actifs. Le novaluron est connu pour être très efficace contre plusieurs Insectes nuisibles importants (Cutler & Scott-Dupree, 2007). Son activité est plus importante que les autres benzoylurées tel que le diflubenzuron et le téflubenzuron (Ishaaya *et al.*, 1996). Il présente une activité larvicide contre *Spodoptera littoralis* à 0,05 mg/L; *A. aegypti* à 0,002 mg/L et *Leptinotarsa decemlineata* à 5 mg/L (Sun *et al.*, 2015). Selon plusieurs auteurs, les espèces les plus sensibles au novaluron sont des moustiques comme *Aedes aegypti* (Farnasi *et al.*, 2012); *Culex spp* (Su *et al.*, 2003); *Anopheles albopictus*, *A. albimanus*, *A. punctipennis pseudo*, *Culex quinquefasciatus*, (Arredondo-Jiménez & Valdez-Delgado, 2006); *Culex pipiens* (Djehader *et al.*, 2013) et *Culisetae longiareolata* (Bouaziz *et al.*, 2011). L'activité larvicide de ce composé est le résultat de son interférence avec le processus de mue, notamment, la synthèse de la chitine qui conduit à une mue incomplète (Merzendorfer *et al.*, 2012; Salokhe *et al.*, 2013).

4.2.2. Effet sur la composition biochimique des cuticules

Les Crustacés sont dotés d'un exosquelette ou cuticule qui sert de barrière sélective entre le milieu intérieur et l'environnement (Prabu & Natarajan, 2012; Nagasawa, 2012). La cuticule est rejetée périodiquement (exuviation) et remplacée par une nouvelle cuticule. Ce phénomène est accompagné d'une série de modifications tissulaires et comportementales (Wang *et al.*, 2003). La cuticule est un édifice macromoléculaire complexe, tant par sa structure que par sa composition chimique. Elle est principalement constituée de fibres chitino-protéiques qui sont elles-mêmes entourées par une matrice protéique (Hepburn, 1985) et imprégnées de calcaire (Dennell, 1947).

Les trois constituants majoritaires, chitine, protéines et CaCO₃, forment un réseau dense. La chitine est un polymère linéaire composé de N-acétyl-glucosamines (Fig. 25). La biosynthèse de ce polymère fait intervenir plusieurs enzymes pour convertir différents sucres (glucose, tréhalose) en UPD-N-acétylglucosamine (Merzendorfer, 2013; Merzendorfer & Zimouch, 2003). Elle contribue considérablement à la fonction de la mise en forme de la cuticule, car elle constitue jusqu'à 40% de la masse sèche de la cuticule et varie considérablement selon les espèces (Van Leeuwen *et al.*, 2012).

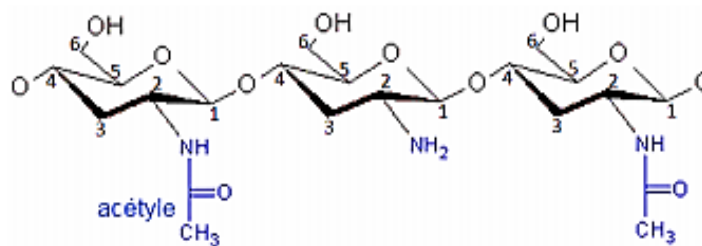


Figure 25. Structure chimique de la chitine (Karine, 2012).

4.2.2.1. Effet sur le poids des cuticules

Dans les conditions normales, le poids des cuticules de *P. adspersus* adultes augmente progressivement au cours du cycle de mue (de la période allant du stade A jusqu'au stade D). Le traitement par le novaluron provoque une diminution significative du poids des cuticules uniquement avec la CL₉₀. De même Soltani *et al.* (2009) ont trouvé une réduction du poids

des cuticules chez la crevette *P. kerathurus* suite à un traitement par un autre inhibiteur de la synthèse de la chitine, le dimilin. De même, chez les Insectes dont l'affiliation phylogénique avec les Crustacés est forte, [Bouaziz et al. \(2011\)](#) et [Djeghader et al. \(2013\)](#) ont démontré que le novaluron provoque une réduction du poids des larves de moustiques *C. longiareolata* et *C. pipiens*. Aussi une réduction du poids des larves et des nymphes de *Schistocerca gregaria* est obtenue suite à un traitement par un autre benzoyluré, le diflubenzuron, ([Tail et al., 2015](#); [Al Mokhlef et al., 2012](#)).

4.2.2.2. Effet sur la chitine

Nos résultats montrent que le contenu et le taux en chitine cuticulaire augmentent au cours du cycle de mue de la période allant du stade A au stade C. Au stade D, c'est-à-dire à la veille de l'exuviation, une légère diminution du contenu et du taux en chitine sont observés. L'augmentation de la chitine est due à la genèse et la mise en place des nouvelles couches cuticulaires. [Wilinder \(1974\)](#) a montré, qu'après déminéralisation de la cuticule de la crevette *Pandalus borealis*, le taux de chitine varie entre 66 et 72%. Aussi, [Svend Olav \(1991\)](#) a précisé qu'au poids sec des cuticules, les teneurs en chitine varient entre 66% et 72% chez *P. borealis*. D'après les travaux de [Morsli \(1994\)](#), le taux de la chitine cuticulaire au cours du cycle de mue varie entre 66 et 72 % chez la crevette *P. kerathurus*. [Christiansen et al. \(1984\)](#) ont mesuré la biosynthèse de la chitine par l'incorporation *in vivo* de deux précurseurs radiomarqués le D-[3-³H(N)]-glucose et le N-acétyl-D-[1-3H]-glucosamine (NAGA) dans la cuticule des larves du crabe *Rhithropanopeus harrisi* (Crustacés: Brachyura) aux différents stades du cycle de mue. Les auteurs ont montrés que l'incorporation des deux précurseurs était à son maximum à la postmue (stade A et stade B) lors de la sécrétion de l'endocuticule, elle diminue à l'intermue (stade C) (là où la sécrétion de la cuticule est complète). Le taux le plus bas de l'incorporation des deux précurseurs est noté à la prémue (stade D) où la sécrétion de l'exocuticule est achevée.

L'application du novaluron provoque une réduction des quantités et du taux de la chitine chez les séries traitées aux différents stades du cycle de mue comparativement aux séries témoins. Nos résultats sont en accord avec ceux de [Soltani et al. \(2009\)](#) réalisés avec un autre inhibiteur de la synthèse de la chitine, le diflubenzuron, sur *P. kerathurus*. Des travaux antérieurs de [Horst et al. \(1995\)](#) ont révélé que le dimilin a un effet inhibiteur sur l'incorporation de la 3H-N-acetylglucosamine dans la chitine cuticulaire au cours de la post

mue chez le crabe bleu *Callinectes sapidus*. Récemment, Duchet *et al.*, (2011) ont démontré un effet stimulateur de la chitobiase (intervient dans la dégradation de l'exosquelette) par le diflubenzuron chez deux espèces Crustacés *Daphnia pulex* et *Daphnia magna*. Aussi selon les travaux de Macken *et al.*, (2015), le diflubenzuron et le teflubenzurone interfèrent avec les enzymes qui contribuent à la synthèse de la chitine chez des espèces Crustacés tel que le Copépode benthique *Tisbe battagliai*. Ceci affirme que les dérivées de la benzoylphenylurée interfèrent avec le processus de mue en perturbant la sécrétion cuticulaire, *via* la synthèse de la chitine (Morsli & Soltani, 2003; Dhadialla *et al.*, 2010, Salokhe *et al.*, 2013).

L'efficacité du novaluron a été démontrée à l'égard de plusieurs espèces de moustiques (Apiwat *et al.*, 2007; Nwankwo *et al.*, 2011; Fontora *et al.*, 2012). Selon Farnasi *et al.* (2012) le novaluron réduit le contenu en chitine chez les larves d'*A. aegypti*. Parmi les différents effets induits par le diflubenzuron, une diminution du contenu en chitine chez *Tribolium castaneum* (Merzendorfer *et al.*, 2012). Par ailleurs, une augmentation de l'activité des chitinases a eu lieu lors d'un traitement des larves de *S. littoralis* au 4^{ème} stade par le diflubenzuron. Des résultats similaires ont été décrits pour le 3^{ème} stade larvaire des Anophèles traitées par le diflubenzuron (Zhu *et al.*, 2007) et les Armigères *Helicoverpa armigera* traitées au chlorfluazuron (Abdel-Aal, 2006, Al-shannaf *et al.*, 2012).

4.2.2.3 Effet sur les protéines cuticulaires

Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes (Mahler & Cordes, 1968). Les protéines peuvent assurer la catalyse biochimique (enzyme), la régulation hormonale et s'intégrer dans la cellule en tant que constituants structuraux (Jacob & Monod, 1961). Par ailleurs, la chitine forme, avec les protéines, des microfibrilles cristallines. L'élasticité de la carapace dépend du degré de liaison entre la chitine et les protéines, et de leur répartition dans la matrice (Bouligand, 1972). La relation entre les protéines et la chitine est assurée par un résidu d'hystidyle et un groupe catéchol (Stankiewicz *et al.*, 1996).

L'évolution du taux de protéines cuticulaires chez les témoins de *P. adspersus*, durant la période du cycle de mue, montre une diminution significative qui va du stade A jusqu'au stade D. Wilinder (1974) a constaté que la carapace de l'écrevisse *Astacus fluviatilis* est constituée de 30% de protéines cuticulaires et de 35,3% chez *Penaeus duorum*. Le taux de protéines cuticulaires est beaucoup plus important après une récente exuviation, qu'en période

d'intermue. Selon [Sugmar et al. \(2012\)](#), le taux des protéines cuticulaires augmente du stade A jusqu'au stade D durant le cycle de mue du crabe *Portunus pelagicus*.

Les résultats relatifs à l'effet du novaluron sur les protéines cuticulaires révèlent une augmentation hautement significative chez les séries traitées comparativement aux séries témoins. Des résultats similaires ont été rapporté par [Morsli et al., \(2015\)](#) précisant que le traitement par diflubenzuron provoque des variations dans les composants biochimiques, il augmente les taux des protéines au cours du cycle de mue de *P. kerathurus*. Aussi, [Soltani et al., 2009](#) ont rapporté que le diflubenzuron, a augmenté le taux des protéines cuticulaires chez la même espèce. Les travaux de [Hamadah et al., \(2012; 2014\)](#) et [Tanami et al., \(2012\)](#) révèlent une augmentation des protéines chez les Lépidoptères suite à un traitement par le Novaluron. Selon [Salokhe et al., 2006](#) le flufenoxuron augmente le taux des protéines chez les Lépidoptères .

4.2.2.4 Effet sur les sels calciques

La minéralisation de la cuticule a été étudiée chez le crabe par [Giraud-Guille et al. \(2004\)](#). Les cristaux de calcite sont produits à la surface de l'épicuticule par trois enzymes (protéines GAP 65, protéine de matrice gastrolithe (GAMP) et orchestine, stockées dans les organes de stockage de calcium chez les Crustacés appelés gastrolithes ([Glazer et al., 2010](#)). Les mêmes auteurs [Glazer et al. \(2010\)](#) suggèrent qu'il existe une quatrième protéine (GAP 10) qui est impliqué dans l'assemblage du complexe chitine-protéine-minérale en particulier dans le dépôt de carbonate de calcium amorphe. La production de ces complexes s'étend en surface tels des disques plats, puis s'infiltré verticalement et horizontalement, là où l'espace est libre entre les cellules épidermiques ([Giraud-Guille et al. \(2004\)](#)).

Cependant [Lafon \(1943\)](#) note que le taux des sels calciques est de 87,2% chez *Cancer pagurus*, 72,2% chez *Nephrops norvegicus*. Pour [Drach & Lafon \(1942\)](#), le taux des sels calciques est de 84,3% dans la cuticule de *Carcinus maenas*. D'autres travaux indiquent que le taux des sels calciques le plus élevé est approximativement de 22% chez le Crabe bleu *Callinectes sapidus* ([Vight & Dendinger, 1982](#)). Ces valeurs sont en accord avec les résultats obtenues 18,8% chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* ([Huner & Avault, 1976](#)), mais ils sont plus élevés que les taux des sels chez *Penaeus californiensis* (12,6%) et chez *Uca pugilator* (9,5%) ([Kleinholz, 1941](#)).

Nos résultats indiquent que le taux le plus bas des sels calciques est enregistré au stade A (42%), il est au maximum au stade D (51%). Nos résultats sont comparables à ceux de [Svend Olav \(1991\)](#) qui rapporte que le taux des sels calciques varie entre 50 et 60% du poids sec des cuticules chez *Pandalus borealis*. Ces valeurs correspondent à celles rapportées chez *Penaeus duorarum* 53,1% et *Leander adspersus* 55,8% ([Wilinder, 1974](#)). D'autres travaux indiquent que le taux des sels calciques le plus élevé est approximativement de 22% chez le Crabe bleu *Callinectes sapidus* ([Vight & Dendinger, 1982](#)).

Le traitement au novaluron aux deux concentrations (CL₅₀, CL₉₀) n'affecte pas le taux des sels calciques chez *P. adspersus*. De même, les travaux de [Soltani et al. \(2009\)](#) précisent que les sels calciques de *P. kerathurus* ne sont pas affectés.

4.2.3. Effet sur la sécrétion cuticulaire

La cuticule des Crustacés est composée d'une épicuticle externe, une exocuticule, une endocuticule, ainsi qu'une couche membraneuse interne reposant sur l'hypoderme. Les trois couches externes de l'épiderme sont calcifiées. La structure de la procuticule est composée par des lamelles de microfibrilles avec une disposition hélicoïdale au niveau des couches principale et membraneuse ([Bouligand, 1972](#); [Wilinder, 1974](#); [Morsli & Soltani 2003](#)). La formation et la consolidation de la cuticule post-exuviale, débutent en post-mue et se terminent en intermue, comme l'ont signalé [Drach & Tchernigovtzeff \(1967\)](#).

L'épaisseur de la cuticule chez les témoins de *P. adspersus* augmente progressivement au cours des trois premières étapes (A, B, C) et diminue à la fin du cycle de mue (stade D). Les mesures de l'épaisseur de la cuticule ont montré que le traitement avec le novaluron aux deux concentrations testées (CL₅₀, CL₉₀), provoque une diminution significative de l'épaisseur de la cuticule avec un effet dose-réponse par rapport aux témoins. Le produit provoque une inhibition de la sécrétion de la nouvelle cuticule à la concentration la plus élevée (CL₉₀). Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par [Morsli & Soltani \(2003\)](#) qui précisent que l'ultrastructure de la cuticule de *P. kerathurus* est affectée après un traitement par le diflubenzuron. Les mêmes auteurs démontrent que le nombre de lamelles au niveau de la couche membraneuse est réduit et les fibrilles ne montrent pas d'orientation particulière. Ceci a été observé également chez le crabe *Callinectes sapidus* suite à un traitement par le diflubenzuron ([Horst & Walker, 1995](#)). Plusieurs auteurs ont précisé que le novaluron

présente des effets semblables à ceux obtenus dans notre étude mais sur des Insectes. Il affecte l'épiderme des larves de *A. aegypti* (Farnasi *et al.*, 2012) et le phénotype des gènes qui interviennent dans la formation de la cuticule chez *D. melanogaster* (Moussian, 2010) ou sur les gènes codant la synthèse de la chitine chez *T. castaneum* (Arakan *et al.*, 2004). Ainsi, les benzoylurées interfèrent avec le processus de mue en perturbant la sécrétion de la cuticule par la synthèse de la chitine (Salokhe *et al.*, 2013; Dhadialla *et al.*, 2010). Ils induisent généralement des malformations de l'épiderme et une réduction du contenu en chitine (Merzendorfer *et al.*, 2012) en interférant une étape post catalytique de la synthèse de la chitine (Merzendorfer *et al.*, 2006).

Les résultats obtenus dans cette étude ont démontré que le novaluron a exercé des effets négatifs chez la crevette *P. adspersus*. Cet insecticide peut augmenter les quantités des ecdystéroïdes et perturber le contenu en chitine entraînant ainsi une inhibition de la sécrétion cuticulaire chez cette espèce non cible. Ces effets pourraient être expliqués soit par blocage directe de la synthèse de la chitine ou par un blocage du transport et de l'incorporation du précurseur biosynthétique de la chitine, la N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc). Selon Abo-Elghar *et al.*, (2004) et Gangishetti *et al.*, (2009), les benzoylurées ont une structure similaire aux sulfonylurées, les deux agissent sur les récepteurs sulfonylurées (SUR) des membranes intracellulaires des vésicules: subunités des canaux ioniques $Ca^{++} K^{+}$ provoquant l'inhibition du flux des ions Ca^{++} au niveau des vésicules tégumentaires, ce qui conduit à une inhibition de la synthèse de la chitine. Toutefois, ces mécanismes d'action restent à clarifier.

Ainsi, compte tenu de la composition biochimique de leur cuticule chitino-protéique, les Crustacés peuvent donc être des cibles potentiels de ces insecticides dérivés de la benzoylurée.



Conclusion & perspectives

“Toute science crée une nouvelle ignorance.”

Henri Michaux

5. Conclusion et perspectives

La présente étude est réalisée dans le cadre de la bioactivité des xénobiotiques et l'évaluation des risques environnementaux. Elle consiste à préciser la qualité des eaux de la lagune El-Mellah (El-Kala, Algérie) par la détermination de l'activité de deux biomarqueurs, la glutathion S-transférase (GST) et l'acétylcholinestérase (AChE), et l'évaluation de l'impact d'un insecticide inhibiteur de la synthèse de chitine (le novaluron) chez la crevette *P. adspersus* (Decapoda, Palaemonidae).

Les dosages de deux biomarqueurs, la GST et AChE durant les saisons d'été et d'automne de deux années consécutives (2013-2014) au niveau de la lagune El-Mellah a démontré une induction de l'activité de la GST et une inhibition de l'AChE dans les deux sites 2 et 3 par rapport au site 1. Les sites les plus contaminés sont situés à proximité des sources des polluants d'origine domestique et agricole comme les pesticides et les détergents. L'effet saison serait en rapport avec les apports des Oueds en période humide qui dilueraient la concentration des polluants et l'effet année est du à une pluviométrie plus importante en 2013. Le niveau de pollution s'établit ainsi par ordre décroissant: Site 1 > site 2 > site 3 qui est plus élevé en été durant l'année 2013 comparativement à l'année 2014. Les sites les plus contaminés sont situés près des sources de polluants agricoles et domestiques, tandis que les variations saisonnière et annuelle sont liées aux apports d'eau par les Oueds durant les périodes pluvieuses.

Le novaluron (EC20%), un insecticide de la classe des benzoylurées, très efficace contre les larves de moustiques, est testé sur un organisme non ciblé la crevette *Palaemon adspersus*. Les crevettes sont pêchées au niveau du site le moins pollué et élevées au laboratoire puis traitées par le novaluron à deux concentrations (0,91 mg/L et 4,30 mg/L) correspondant, respectivement, à la CL₅₀ et CL₉₀ déterminée contre le quatrième stade larvaire de *Culiseta longiareolata* (Diptères, Culicidae). Le traitement est effectué juste après l'exuviation (stade A) et se prolonge jusqu'au stade D.

Le dosage enzymoimmunologique des ecdystéroïdes a révélé une augmentation progressive au cours du cycle de mue. Le pic est enregistré à la veille de l'exuviation (stade D). Le traitement par le novaluron aux deux concentrations testées (CL₅₀ et CL₉₀), augmente les concentrations des ecdystéroïdes hémolymphatiques avec un effet dose-réponse.

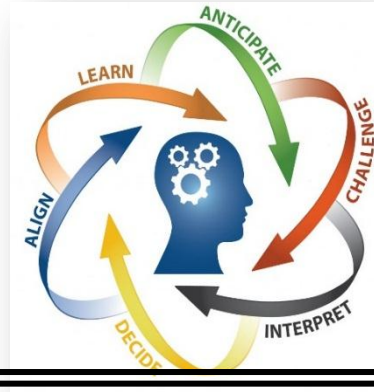
L'étude de la composition biochimique des cuticules nous a permis de préciser que le poids, la quantité et le taux de chitine augmentent de la période allant du stade A jusqu'au stade C, puis diminuent à la veille de l'exuviation (stade D). L'application du novaluron se traduit par une diminution significative du poids total des cuticules ainsi que les quantités et les taux de chitine à tous les stades avec un effet doses-réponses. Les résultats concernant l'évolution des taux de protéines cuticulaires révèlent une diminution au cours de la période allant du stade B jusqu'au stade D dans les conditions normales. Tandis que, le traitement par l'insecticide à la CL₉₀ augmente significativement le taux des protéines cuticulaires. Le taux des sels calciques augmente uniquement au stade D chez les séries témoins alors que le traitement par le novaluron s'avère sans effet significatif.

L'étude histologique nous a montré que l'épaisseur de la cuticule augmente progressivement au cours des trois premiers stades A, B et C puis diminue à la fin du cycle (stade D). L'effet du novaluron aux deux concentrations (CL₅₀ et la CL₉₀) entraîne une diminution significative de l'épaisseur de l'ancienne cuticule avec un effet dose-réponse. De plus, la formation de la nouvelle cuticule n'a lieu au cours du stade D. Le traitement au novaluron avec la concentration CL₅₀ a réduit l'épaisseur de la nouvelle cuticule. Celle-ci absente avec la CL₉₀.

Ainsi, Le novaluron peut perturber les concentrations des ecdystéroïdes hémolympatiques et des constituants biochimiques de la cuticule de *P. adspersus*. Ces perturbations pourraient s'expliquer soit par un blocage du transport et de l'incorporation du précurseur biosynthétiques de la chitine, la N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), ou bien une inhibition directe de la synthèse de la chitine. Toutefois, ces mécanismes d'action restent à clarifier.

À l'avenir, il paraît intéressant de compléter ce travail par l'évaluation des effets du novaluron sur:

- La structure fine des cuticules.
- Technique de marquage par N-acetyl-D-glucosamine*.
- Analyse des résidus dans l'eau et le sédiment de la lagune El-Mellah.
- Analyse des résidus dans les organes.



Résumé

6. Résumés

6.1. Résumé

La présente étude s'inscrit dans le cadre du projet de recherche du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée (2011-2015) «Biosurveillance de l'environnement: bioactivité des xénobiotiques et évaluation des risques». A cet effet, nous avons utilisé la crevette *Palaemon adspersus* Rathke, 1837 (Crustacea, Decapoda) comme une espèce modèle. D'une part pour la détermination de la qualité des eaux du site d'échantillonnage (la lagune El-Mellah, El-Kala, Algérie), et d'autre part pour l'évaluation de l'impact d'un insecticide de la classe des benzoylurées, le novaluron, sur cette espèce non visée.

La mesure de l'activité enzymatique ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) de la glutathion S-transférase (GST) et l'acétylcholinestérase (AChE) a été réalisée au niveau de trois sites dans la lagune El-Mellah (Site 1: zone d'étranglement du chenal qui communique avec la Méditerranée; site 2: où se déverse l'Oued El-Mellah au Sud de la lagune; site 3: où se déverse l'Oued R'kibet à l'Ouest de la lagune). Les résultats ont montré une induction de la GST et une inhibition de l'activité spécifique de l'AChE significatives chez les individus récoltés aux niveaux des deux sites, 2 et 3 comparativement à ceux du site 1. Les réponses des biomarqueurs sont plus marquées en été en comparaison à la saison automnale en 2014 par rapport à l'année 2013. Ainsi, les sites 2 et 3 sont plus pollués que le site 1.

Les crevettes ont été récoltées au niveau du site de l'embouchure du chenal dans la lagune, puis maintenues dans les conditions de laboratoire et traitées par le novaluron. L'insecticide a été additionné à l'eau d'élevage des adultes de *P. adspersus* à deux concentrations (0,91 $\mu\text{g}/\text{L}$ et 4,30 $\mu\text{g}/\text{L}$) correspondant, respectivement aux CL_{50} et CL_{90} obtenues à l'égard des larves du quatrième stade de *Culiseta longiareolata* (Diptera, Culicidae) (Bouaziz *et al.*, 2011). Le traitement a été effectué au stade A et a duré jusqu'au stade D.

L'analyse des ecdystéroïdes hémolympatiques par dosage enzymoimmunologique a révélé que les concentrations des ecdystéroïdes (pg équi 20E / μl) dans les conditions normales, augmentent progressivement au cours du cycle de mue pour atteindre une valeur

maximale à la veille de l'exuviation (stade D). Le traitement par le novaluron aux deux concentrations testées (CL₅₀ et CL₉₀), augmente les concentrations des ecdystéroïdes hémolymphatiques avec un effet dose-réponse.

Le poids des cuticules (mg), la quantité (µg/mg de tissu) et le taux (%) de chitine augmentent de la période allant du stade A jusqu'au stade C puis diminuent à la veille de l'exuviation (stade D). L'application du novaluron se traduit par une diminution significative du poids des cuticules, les quantités et le taux de chitine à tous les stades avec un effet doses-réponses. Les résultats concernant l'évolution des taux de protéines cuticulaires chez les témoins révèlent une diminution au cours de la période allant du stade B jusqu'au stade D. Tandis que, le traitement par l'insecticide à la CL₉₀ augmente de façon significative le taux des protéines cuticulaires. Dans les conditions normales, le taux des sels calciques augmente uniquement au stade D et le traitement par le novaluron s'avère sans effet significatif.

Enfin, l'étude histologique a démontré que l'épaisseur (µm) de la cuticule augmente progressivement au cours des stades B et C puis diminue à la fin du cycle (stade D). L'effet du novaluron avec les deux concentrations (CL₅₀ et CL₉₀) a entraîné une diminution significative de l'épaisseur de l'ancienne cuticule avec un effet dose-réponse. De plus, la formation de la nouvelle cuticule a eu lieu au cours du stade D et le traitement par le novaluron réduit l'épaisseur de la nouvelle cuticule à CL₅₀ et l'inhibe à la CL₉₀.

La somme des résultats obtenus démontre que le novaluron a exercé des effets secondaires sur cette espèce non visée *P. adspersus*. Compte tenu de la composition biochimique de leur cuticule, les crustacés peuvent être des cibles potentielles des dérivés des benzoylurées.

Mots clés: Pollution, *Palaemon adspersus*, Lagune El-Mellah, Biomarqueurs, Novaluron, cuticule, chitine.

6.2. Abstract

The present study is part from the research project in the Laboratory of Applied Animal Biology (2011-2015) «Environmental biomonitoring: bioactivity of Xenobiotics and risk assessment». We used shrimp *Palaemon adspersus* Rathke, 1837 (Crustacea, Decapoda) as a model species to determine the quality of the water in the lagoon El-Mellah, El-Kala, Algeria and for the assessment of the impact of a class of the benzoylurees insecticide novaluron on this non-target species.

The measurement of the enzymatic activity ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein) of the glutathion S-transferase (GST) and acetylcholinesterase (AChE) was conducted at three sites in the El Mellah lagoon. (Site 1: constriction zone of the channel with Mediterranean, site 2: output of El Mellah River in South of the lagoon, site 3: the output of R'kibet River to West of the lagoon). The results showed a significant induction in GST and also a significant inhibition in AChE activities in individuals from the sites 2 and 3 compared to those of the site 1. Indeed, marked responses are observed in the summer compared to autumn. Also, induction of GST and inhibition of the activity of AChE were higher in 2014 compared to 2013.

The shrimp were collected at the site level of the channel mouth in the lagoon, and then maintained in the laboratory conditions and treated by novaluron. Insecticide was added to the rearing water of *P. adspersus* adults at two concentrations (0.91 mg / L and 4.30 mg / L) corresponding respectively to the LC_{50} and LC_{90} determined against fourth-stage larvae of *Culiseta longiareolata* (Diptera, Culicidae) (Bouaziz *et al.*, 2011). The treatment was performed in stage A until stage D.

Analysis of hemolymphatic ecdysteroids by enzyme-immunoassay revealed that the concentrations of ecdysteroids (pg 20E / μl). Under normal conditions, changes in hemolymphatic ecdysteroid concentrations during the molting cycle presented a gradual increase to achieve a maximum value just before moulting (stage D). Treatment with Novaluron at two concentrations tested (LC_{50} and LC_{90}), increases the concentrations of haemolymph ecdysteroids with a dose-dependent manner.

Cuticle weights (mg), the amount (g/mg) and the rate (%) of chitin increase during the period from stage A until stage C then they decrease just before moulting (D stage).

Novaluron-treatment resulted in a significant decrease in weight of the cuticles, the amounts and the rate of chitin in all stages with a dose-response effect. Results for the evolution of cuticular protein levels in the controls showed a decrease during the period from stage B to stage D. Treatment with insecticide at the LC₉₀ increase significantly the cuticular proteins. Under normal conditions, the rate of calcium salts increased only in stage D and treatment novaluron turns without significant effect.

The percentage of cuticular protein showed a decrease from stage B to stage D in controls. Novaluron can cause a significant increase in cuticular proteins. Therefore, the overall data confirm the primary mode of action of novaluron to inhibit chitin biosynthesis. Lastly, under normal conditions, the percentage of calcium salts increases only in stage D and novaluron-treatment appears with no significant effect.

Finally, histological study showed that the thickness (μm) of the cuticle increased in stages B and C and then decreased at the end of the cycle (stage D). The effect of novaluron at the concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) resulted in a significant decrease in the thickness of the old cuticle with a dose-dependent manner. Moreover, the formation of the new cuticle occurred during stage D. Cuticle thickness measurement showed that novaluron-treatment affect the cuticle secretion with a reduction in the thickness of the old cuticle with CL₅₀ as compared to controls and an inhibition of the new cuticle with CL₉₀.

Thus, the overall data showed that novaluron present secondary effects on this non-target shrimp species *P. adspersus*. Given the biochemical composition of the cuticle, the crustacean can be a potential target of benzoylureas derivatives.

Key words: Pollution, *Palaemon adspersus*, lagoon El-Mellah, biomarkers, Novaluron, cuticle chitin.

3.6 الملخص

هذه الدراسة تعتبر جزء من مشروع بحث يجري في مختبر علم الاحياء الحيوانية التطبيقية (2011-2015) "الرصد البيولوجي للبيئة: النشاط الحيوي للاكسيوبيوتك وتقييم المخاطر". لتحقيق هذا الهدف، استخدمنا الجمبري *adspersus* Rathke Palaemon 1837 (قشريات، عشاريات الأرجل) كنوع نموذج، من ناحية، لتحديد نوعية المياه في موقع اخذ العينات (بحيرة الملاح، ولاية الطارف القالة، الجزائر) ومن ناحية اخرى لتقييم تأثير مبيد حشري النوفالورون من فئة Benzoylureas، على هذه الحيوانات غير المستهدفة.

قياس نشاط إنزيم الجلوتاثيون S-ترانسفيراز (GST) واستيلكولينستراز (AChE) أجري على مستوى ثلاثة مواقع في بحيرة الملاح (الموقع 1: مجال انقباض القناة الذي يتصل بالبحر الأبيض المتوسط؛ والموقع 2: حيث يصب واد الملاح في جنوب البحيرة؛ وموقع 3: حيث يصب واد ركيبات في غرب البحيرة). أظهرت النتائج أن هناك ارتفاع لنشاط إنزيم الجلوتاثيون S-ترانسفيراز (GST) وتثبيط كبير لنشاط استيلكولينستراز (AChE) في العينات التي تم جمعها على مستوى الموقعين 2 و3 بالمقارنة مع الموقع 1. المؤشرات الحيوية اظهرت ردود أكثر وضوحا في فصل الصيف مقارنة بموسم الخريف وفي عام 2014 مقارنة مع عام 2013. اذن، المواقع 2 و3 هم أكثر تلوثا من الموقع 1. ودالك لتواجدها بالقرب من مصادر الملوثات الزراعية والمنزلية، في حين ترتبط التغيرات الموسمية والسنوية لإمدادات المياه من الأودية خلال فترات الأمطار.

تم صيد الجمبري على مستوى الموقع 1 (أقل تلوثاً). ثم وضعه تحت الظروف المختبرية ومعالجتها بنوفالورون. لقد تم إضافة المبيد الحشري إلى المياه التي يوجد فيها *adspersus* P. بتركيزين اثنين (0.91 ميكروغرام/لتر و 4.30 ميكروغرام/لتر) المقابلة، على التوالي للتركيز المميت 50 و 90 ضد يرقات الطور الرابع لبعوض *Culiseta longiareolata* (ذوات الجناحين، البعوضيات). العلاج تم في المرحلة A واستمر حتى مرحلة التطوير D، وذلك قبل عملية الإنسلاخ الجليدي.

تم الكشف على الاكديستيرويدات الليمفاوية بواسطة المعايرة الإنزيمومناعية، تحصلنا على اثرها على ان تركيزات الاكديستيرويدات الليمفاوية (pg 20E/μl) في الظروف العادية تزيد تدريجيا خلال دورة الإنسلاخ الجليدي من A إلى عشية رميها (نقطة D). العلاج بنوفالورون (بالتتركيز المميت، 50 و90)، يزيد من تركيزات الاكديستيرويدات الليمفاوية مع تأثير جرعة واستجابة.

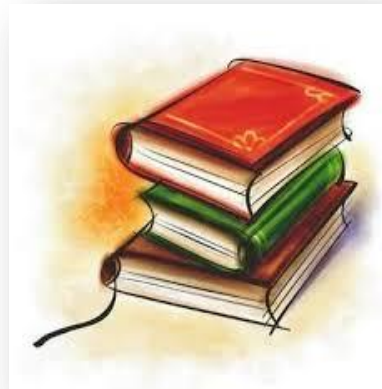
كشفت الدراسة البيوكيميائية لتكوين القشرة (كمية بميكروغرام/mg) ونسبة الكيتين، البروتينات وأملاح الكالسيوم(%) أن كمية و نسبة الكيتين زادت في الفترة الممتدة من المرحلة

Aحتى مرحلة C, ثم انخفضت عشية الانسلاخ الجليدي (المرحلة D). تطبيق النوفالورون ادى الى انخفاض كبير في الكميات و نسب الكيتين في جميع المراحل مع تأثير جرعة واستجابة. فيما يتعلق بنتائج البروتينات نجد ان البروتينات عند الشاهد انخفضت من المرحلة B الي غاية المرحلة D. بينما العلاج بالجرعة المميمة 90 ادت الى زيادة كبيرة في معدل البروتينات القشرية. ، أملاح الكالسيوم تكون مرتفعة فقط عند النقطة D بالمقارنة بالمراحل الثلاث A،B،C في ظل الظروف العادية والعلاج بالنوفالورون لم يؤدي الى أي تأثير.

وأخيراً، الدراسة النسيجية أظهرت أن سمك القشرة يزداد تدريجياً خلال المراحل الثلاث C،B،A و ثم ينخفض في نهاية الدورة (نقطة D) عند الشاهد. اثر المعالجة بالنوفالورون بالتركيزين (التركيز المميت، 50 و 90) نجد انخفاض كبير في سمك القشرة مع تأثير جرعة واستجابة. ويتم تشكل القشرة الجديدة خلال المرحلة D. العلاج بنوفالورون مع تركيز 50 يقلل من سمك القشرة الجديدة. حيث تغيب هذه الاخيرة عند تطبيق التركيز 90.

مجموع النتائج تبين أن نوفالورون خلف آثار جانبية على هذه الأنواع الغير المستهدفة *P. adspersus*. وبالنظر إلى التركيبة الكيميائية الحيوية للقشرة، يمكن أن تكون القشريات الأهداف المحتملة من مشتقات benzoylureas.

الكلمات الرئيسية: التلوث، *P. adspersus*، وبحيرة الملاح، والمؤشرات الحيوية، نوفالورون، كيتين قشرة.



Bibliographie

“Etudie, non pour savoir plus, mais pour savoir mieux. ”

Sénèque

Références bibliographiques




- Abbes, A., Chouahda, S. & Soltani, N. (2003).** Activité comparée de deux biomarqueurs du stress environnemental dans divers tissus chez deux espèces de bivalves pêchées dans la région d'Annaba. *Bull. Inst.* **8** : 123-126.
- Abbes, A., Soltani N. & Djabar, A. B. (2006).** Utilisation de l'acétylcholinestérase chez la palourde *Ruditapes decussatus* dans la surveillance d'un système lagunaire El Mellah-Algérie. 2^{ème} colloque méditerranéen de la biologie environnementale (2) :22.
- Abdel-Aal AE. (2006).** Effect of chlorfluazuron, nuclear polyhydrosis virus (SLNP) and *Bacillus thuringiensis* on some biological and enzyme activity of cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Bull Ent Soc., Cairo University, Egypt.*
- Abo-Elghar, G.E., Fujiyoshi, P. & Matsumura, F. (2004).** Significance of the sulfonyleurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, **34**, 743-752.
- Abuhagr, A. M., Blindert, J. L., Nimitkul, S., Zander, I. A., Labere, S. M., Chang, S. A., & Mykles, D. L. (2014).** Molt regulation in green and red color morphs of the crab *Carcinus maenas*: gene expression of molt-inhibiting hormone signaling components. *The Journal of experimental biology*, **217(5)**, 796-808.
- Adamo P., Bargagli R., Giordano S., Modenesi P., Monaci F. & Pittao E. (2008).** Natural and pre-treatments induced variability in the chemical composition and morphology of lichens and mosses selected for active monitoring of airborne elements. *Environmental Pollution*. **152**:9-11.
- Al-Mokhlef, A. A., Mariy, F. M., Emam, A. K., & Ali, G. M. (2012).** Effect of teflubenzuron on ultrastructure and components of the integument in *Schistocerca gregaria* (Forsk.) 5th instar nymphs. *Annals of Agricultural Sciences*, **57(1)**, 1-6.
- Al-shannaf, H. M., Mead, H. M., & Sabry, A. K. H. (2012).** Toxic and Biochemical Effects of Some Bioinsecticides and Igrs on American Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hub.) (noctuidae: lepidoptera) in Cotton Fields. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides* .
- Amiard-Triquet, C., Altamann, S., Amiard J.C., Ballan-Dufrancais, C., Baumard, P., Budzinski, H., Crouzet, C., Guarrigue, J.P., His, E, Jeantet, A.Y., Menarsia, R., Mora P., Mouneyrac, C., Narbonne J.F. & Pavillon J.F., (1998).** Fate and effects of micropolluants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiologia*. **373/374**: 259 - 279.

- Amira. A., Sifi, K. & Soltani, N. (2011).** Mesure of environmental stress biomarkers in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *European Journal of Experimental Biology*. **1(2)**:7-16.
- An, L.H., Zheng, B.H., Wang, L.J., Zhang, Y.Q., Chen, H., Zhao, X.R., Zhang, L., & Lei.K. (2012).** Biomarker responses and genotoxicity in the mud snail (*Bullacta exarata*). *Mar. Pollut. Bull.* **64 (2)**: 303-9.
- Apiwat T., Payu B., Jakhawarn.,Padet S., and Mulla (2007).** Field evaluation of Novaluron a chitin synthesis inhibitor larvicide, against mosquito larvae in polluted water in urban areas of Bangkok, Thailand. *Insect Sci* .**98(3)**:434-440.
- Arakane Y, Hogenkamp DG, Zhu YC, Kramer KJ, Specht CA, et al. (2004).** Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochem Mol Biol.* **34**: 291–304.
- Aribi, N. (1997).** *L'entrée en métamorphose chez Zophoba atratus (Coleoptera: Tenebrionidae): Analyse des ecdystéroïdes; effets de l'isolement (groupement); effets de régulateurs de croissance et étude des sources hormonales* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Université d'Annaba, Algérie).
- Arredondo-Jiménez, Valdez-Delgado (2006).** Effect of novaluron (Rimon ®) 10 EC on the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Chiapas, Mexico. *Med Vet Entomol.* **20**: 377-387.



- BABA-AHMED R. (2008).** Identification des sources d'effluents domestiques et voies de contamination d'une zone humide : cas du lac Mellah, mémoire Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister, Juin.
- Baldaia L, Porcheron P, Coimbra J, Cassier P. (1984).** Ecdysteroids in the shrimp *Palaemon serratus*: relations with molt cycle. *Gen Comp Endoc.*; **55**: 437-443.
- Barhoumi, B., Le Menach, K., Clérandeau, C., Ameer, W.B., Budzinski, H., Driss, M.R., Cachot, J. (2014).** Assessment of pollution in the Bizerte lagoon (Tunisia) by the combined use of chemical and biochemical markers in mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin* (sous presse).
- Barhoumi, B., LeMenach, K., Dévier, M-H., Ameer, W.B., Etcheber, H., Budzinski, H., Cachot, J., Driss, M.R. (2013 a).** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface


- sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia: levels, sources and toxicological significance. *Environ. Monit. Assess.* **186**, 2653–2669.
- Barhouni, B., LeMenach, K., Dévier, M-H., El megdiche, Y., Hammami, B., Ameer, W.B., Hassine, S.B., Cachot, J., Budzinski, H., Driss, M.R. (2013 b).** Distribution and ecological risk of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in surface sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia. (Article in Press).
- Béguer, M. (2009).** Réponses d'une population aux forçages environnementaux et anthropiques: le suivi à long terme de la crevette *Palaemon Longirostris* de l'Estuaire de la Gironde (1979-2007) (Doctoral dissertation, Bordeaux 1).
- Ben Ameer, W., Lapuente, J., El Megdiche, Y., Barhouni, B., Trabelsi, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-Lopez, D., Gonzalez-Linares, J., Driss, M.R. & Borrás, B. (2012).** Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte lagoon (Tunisia)., *Mar. Pollut. Bull.* **64**: 241-251.
- Bendjama A, Morakchi K, Meradi H, Boukari A, Chouchane T, Belaabed BE, Djabri L. (2011).** Caractérisation des matériaux biologiques issus d'un écosystème naturel « pnek » situé au nord-est de l'Algérie. *J Soc Alger Chim.*; **21(1)** : 45-58.
- Ben-Khedher, S., Jebali, J., Kamel, N., Banni, M., Rameh, M., Jrad, A., Boussetta, H. (2012).** Biochemical effects in crabs (*Carcinus maenas*) and contamination levels in the Bizerta Lagoon: an integrated approach in biomonitoring of marine complex pollution. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20**, 2616–2631.
- Bensbaa F., Kilani-Morakchi S., Aribi N. & Soltani N. (2015).** Evaluation of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on *Drosophila melanogaster*: insecticidal activity, ecdysteroid content and cuticle formation. *European Journal of Entomology.* **112(4)** 625.
- Bensouda, L. & Soltani-Mazouni, N. (2014).** Measure of Oxidative Stress and Neurotoxicity Biomarkers in *Donax trunculus* from the Gulf of Annaba (Algeria): Case of the Year 2012. *Annual Research & Review in Biology*; **4 (12)**: 1902-1914.
- Benyacoub, S. (1996).** Diagnose écologique de l'avifaune du parc national d'El-Kala. Expertise 107 projets banque mondiale. 96 pages.
- Blais C, Sefiani M, Toullec JY, Soyeux D. (1994).** *In vitro* production of ecdysteroids by Y-organs of *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Correlation with hemolymph titers. *Inverteb Repr Dev.* **26**: 3-12.
- Bonde, J. P., Toft, G., Rylander, L., Rignell-Hydbom, A., Giwercman, A., Spano, M., Manicardi, G. C., Bizzaro, D., Ludwicki, J. K., Zvyezdny, V., Bonfeld-Jorgensen, E. C., Pedersen, H. S., Jonsson, B. A., and Thulstrup, A. M. (2008).** Fertility and markers of male reproductive function in Inuit and European populations spanning large

- contrasts in blood levels of persistent organochlorines. *Environ Health Perspect.* **116**: 269-277.
- Borst, D.W., Ogan, J., Tsukimura, B., Claerhout, T., Holford, K.C. (2001).** Regulation of the Crustacean Mandibular Organ1. *American Zoologist.*, 41 430-441.
- Bouaziz A, Boudjelida H, Soltani N. (2011).** Toxicity and perturbation of the metabolite contents by a chitin synthesis inhibitor in the mosquito larvae of *Culiseta longiareolata*. *Ann Biol Res.* **2 (3)**: 134-142.
- Bouligand, Y. (1972).** Recherches sur les textures des états mésomorphes-1. Les arrangements focaux dans les smectiques: rappels et considérations théoriques. *Journal de Physique*, **33(5-6)**, 525-547.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 254-278.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011).** Bacillus thuringiensis: a story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology.* **41(7)**: 423-431.
- Brooks, G. T., & McCaffery, A. R. (1990).** The precocene antijuvenile hormones (allatotoxins): a case history in insect toxicology. In *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones* (pp. 33-42). Springer US.
- Buffet, P.E., Tankoua, O.F., Pan, J.F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Bérard, J.B., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Reip, P., Valsami-Jones, E. & Mouneyrac, C. (2011).** Behavioral and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemospher.* **84**: 166–174.
- 
- Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charay M.P. & Coquet Y. (2005).** Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricole, 637 p.
- Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013).** Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of entomology.* **58**: 99-117.
- Cepeda-Palacios R., Servín R., Ramírez-Orduña J. M., Ascencio F., Dorchies P., Angulo-Valadez C. E. (2014).** *In vitro* and *in vivo* effects of neem tree (*Azadirachta*

- indica A. Juss) products on larvae of the sheep nose bot fly (*Oestrus ovis* L. Díptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*. **200**: 225-228.
- Chang, E.S., Mykles, D.L., (2011).** Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. *General and Comparative Endocrinology*. **172**: 323-330.
- Chaoui, L. Derbal, F., Kara, M.H., & Quignard, J.P. (2005).** Alimentation et condition de la dorade *Sparus aurata* (Teleostei : Sparidae) dans la lagune du Mellah (Algérie Nord-Est). *Cah. Biol. Mar.* **46** : 221-225.
- Chaoui, L., Kara, M. H., Faure, E. & Quignard, J. P. (2006).** L'ichtyofaune de la lagune du Mellah : diversité, production et analyse des captures commerciales. *Cybium*, **30** (2) : 123-132.
- Chen B, Landry MR, Huang B, Liu H. (2012).** Does warming enhance the effect of microzooplankton grazing on marine phytoplankton in the ocean?. *Limnol Oceanogr.* **57**(2): 519-526.
- Christiansen, M.E., Gosling, E., & Williams, M.A. (1984).** Effect of the insect growth regulator diflubenzuron (Dimilin ®) on the uptake of glucose and N-acetylglucosamine into the cuticle of crab larvae. *Marine Biology*. **83**, 225-230.
- Cognie, D. (1970).** Contribution à l'étude de la biologie de *Penaeus kerathurus* (Forskäl) 1775, crustace decapode, en fonction du cycle d'intermue (Doctoral dissertation).
- Corsi, I., Mariottini, M., Sensini, C., Lancini, L., & Focardi, S. (2003).** Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanologica Acta*, **26**(1) : 129-138.
- Cutler GC, Scott-Dupree CD, Tolman JH, Harris CR. (2007).** Field efficacy of novaluron for control of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on potato. *Crop Prot.*; **26**:760-767.
- Cuzin-Roudy J, Strambi C, Strambi A, Delbecq JP. (1989).** Hemolymph ecdysteroids and molt cycle in males and females of *Siriella armata* M.- Edw. (Crustacea: Mysidacea): Possible control by the MI-ME X-organ of the eyestalk. *Gen Comp Endoc.* **74**:96-109.
- David, E., Tanguy, A., Riso, R., Quiniou, L., Laroche, L. & Morago, D. (2012).** Responses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* populations to abiotic stress environmentally contrasted estuaries along the Atlantic coast of France. *Aquatic toxicology* **109**: 70-79.



- Debieche, T. H. (2002).** *Evolution de la qualité des eaux (salinité, azote et métaux lourds) sous l'effet de la pollution saline, agricole et industrielle: application à la basse plaine de la Seybouse Nord-Est algérien* (Doctoral dissertation, Université de Franche-Comté).
- De Reggi M.L., Pitoizet N., Gharib B. & Delbecque J.P. (1992).** New enzyme immunoassay for ecdysteroids using peroxydase enzyme and polyclonal or monoclonal antibodies. Xth Ecdysone Workshop, 6-7 th April; Liverpool. p 91.
- Delorme, R., Lerroux, P. & Gaillardon, P. (2002).** Évolution des produits phytosanitaires à usage agricole : Les insecticides-acaricides. *Phytoma, La défense des végétaux*, **548**: 7-13.
- Dennell, R. (1947).** The occurrence and significance of phenolic hardening in the newly formed cuticle of Crustacea Decapoda. *Proc. R. Soc.*, **134(B)**, 485-503.
- Depledge, M. H. & Galloway, T. S. (2005).** Healthy animals, healthy ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*. **3(5)**: 251-258.
- Derbal, F., Chaoui, L., Kara, M.H. & Quignard, J.P. (2005).** Alimentation et embonpoint de la daurade *Sparus aurata* dans la lagune du Mellah. *Cah. Biol.Mar.*, **46** : 221-225.
- Derbal, F., Chaoui, L., Draredja, B., Kara, M.H. & Faure, E. (2005).** Composition et variations du régime alimentaire de la sole du Sénégal *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) dans la lagune du Mellah (Algérie Est). VIème Congrès Maghrébin des Sciences de la Mer, Mounastir (Tunisie) :17-21 décembre 2005.
- Derbal, F., Soltani, N. (2008).** Cycle cuticulaire et variations de la protéinémie et de la lipémie chez la crevette royale *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775) des côtes Est algériennes. *Science & Technologie C*. **28**: 80-86.
- Dhadialla T. S., Carlson, G. R., Lee D. P. (1998).** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.*, **43**: 545-569.
- Dhadialla T. S., Retnakaran A., Smagghe G. (2005).** Insect growth and development disrupting insecticides. In: Gilbert, L.I., Kostas, I. and Gill, S. (eds.) *Comprehensive Insect Molecular Science*. Vol. 6. Pergamon Press, New York, NY. pp 55-116.
- Dhadialla TS, Retnakaran A, Smagghe G. (2010).** Insect growth and development disturbing insecticides. In: *Gilber, L.I., Gill, S.S. (Eds). Insect Control.* : Elsevier;p. 121-184.
- Dimitriadis, V.K., Gougoula, C., Anestis, A., Pörtner, H.O., Michaelidis, B. (2012).** Monitoring the biochemical and cellular responses of marine bivalves during thermal stress by using biomarkers, *Marine Environmental Research* **73**: 70-77.

- Djeghader, N.E.H., Boudjelida, H., Bouaziz, A., Soltani, N. (2013).** Biological effects of a benzoylphenylurea derivative (Novaluron) on larvae of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Adv App Sci Res.* **4 (4)**: 449-456.
- Drach, P., & Lafon, M. (1942).** Etudes biochimiques sur le squelette tégumentaire des décapods brachyours (variations au cours du cycle d'intermue). *Arch. Zool. Exp. Gen.*, **82**, 100-118.
- Drach, P., & Tchernigovtzeff, C. (1967).** Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie milieu.* **18 (3A)**: 595-609.
- Draredja, B. & Kara, M.H. (2004).** Diversité de la macrofaune benthique de la lagune Mellah (Algérie Nord-Est)'. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.* **37** : 515.
- Draredja, B., Melouah, K., Beldi, H. & Benmarce S. (2012).** Diversité De La Macrofaune Benthique De La Lagune Mellah (Parc National D'El-Kala, Algérie Nord-Est). *Bull. Soc. Zool. Fr.* **137(1-4)**: 73-86.
- Duan, Y., Zhang, J., Dong, H., Wang, Y., Liu, Q., & Li, H. (2016).** Effect of desiccation and resubmersion on the oxidative stress response of the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & shellfish immunology*, **49**, 91-99.
- Duchet, C., Inafuku, M. M., Caquet, T., Larroque, M., Franquet, E., Lagneau, C., & Lagadic, L. (2011).** Chitobiase activity as an indicator of altered survival, growth and reproduction in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) exposed to spinosad and diflubenzuron. *Ecotoxicology and environmental safety*, **74(4)**, 800-810.
- 
- EEA. (2011).** awarded cooperative partner in the European Water Stewardship Program, set up by the European Water partnership (EWP), launch event 24 November 2011, Brussels, Belgium.
- El Hassani, F., Boushaba, A., Raïs, N., & Benaabidate, L. (2016).** Etude De La Contamination Par Les Métaux Lourds Des Eaux Et Des Sédiments Au Voisinage De La Mine De Tighza (Maroc Central Oriental). *European Scientific Journal.* **12(6)**.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Abdres, V. & Featherstone, R.M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol. Physiol.*, **38**: 84-90.

Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* **14** : 3–8.

EPA. (2001). *Novaluron Pesticide Fact Sheet*, US EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. p 4.



Fang, H., Li, W. & Myneni, R.B. (2013).The Impact of Potential Land Cover Misclassification on MODIS Leaf Area Index (LAI) Estimation: A Statistical Perspective. *Remote Sens.* **5**: 830-844.

FAO. (2003). Novaluron FAO specifications and evaluations of plants production protect. Food and Agriculture Organization of United Nations. p29.

FAO/WHO. (2005). Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, 20-29 September; Geneva, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. p 360.

Farnesi, L.C, Brito, J.M., Linss, J.G., Pelajo-Machado, M., Valle, D., Rezende, G.L. (2012). Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the chitin synthesis inhibitor Novaluron. *PLoS ONE.* **7**, e30363.

Fincham, A. A., & Figueras, A. J. (1986). Larval keys and diagnoses for the subfamily Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) in the north-east Atlantic and aspects of functional morphology. *Journal of natural history.* **20** (1): 203-224.

Fincham, A. A., & Williamson, D. I. (1978). Crustacea decapoda: larvae, 6: Caridea, families: Palaemonidae and Processidae. *Fiches d'Identification du Zooplancton (Denmark).*

Fontoura NG, Bellinato DF, Valle D, Lima JB. (2012). The efficacy of chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz;* 107 (3): *Print version* ISSN 0074-0276.

Fortwendel, J. R., Juvvadi, P. R., Pinchai, N. (2008). Differential Effects of Inhibiting Chitin and 1,3-β ββ β-D-glucan Synthesis in Ras and Calcineurin Mutants of *Aspergillus fumigates*. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.01154-08.

Fossi- Tankoua, O., Buffet, P.E., Amiard, J.C., Berthet, B., Mouneyrac, C. & Amiard-Triquet, C. (2013). Integrated assessment to estuarine sediment quality based on a multi-biomarker approach in the bivalve *Scobiculariaplana*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **88**: 117-125.

Freitas, R., Ramos Pinto, L., Sampaio, M., A., Silva, M., Rodrigues, A.M., Quintino, V. & Figueira, E. (2012). Effects of depuration on the element concentration in bivalves:

Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Estuarine, Coastal and Shelf science*. **110**: 43-53.

Furtado, P. S., Fugimura, M. M., Monserrat, J. M., Souza, D. M., Garcia, L. D. O., & Wasielesky, W. (2015). Acute effects of extreme pH and its influences on the survival and biochemical biomarkers of juvenile White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, **48(6)**, 417-429.



Gangishetti U, Breitenbach S, Zander M, Saheb SK, Muller U, et al. (2009). Effects of benzoylphenylurea on chitin synthesis and orientation in the cuticle of the *Drosophila* larva. *Eur J Cell Biol.* **88**:167–180.

Giraud-Guille MM, Belamie E, Mosser G. (2004). Organic and mineral networks in carapaces, bones and biomimetic materials. *Comptes Rendus Palevol*, **3(6-7)**:503-513.

Glazer, L., Shechter, A., Tom, M., Yudkovski, Y., Weil, S., Aflalo, E.D., Pamuru, R.R., Khalaila, I., Bentov, S., Berman, A., Sagi, A. (2010). A protein involved in the assembly of an extracellular calcium storage matrix. *J Biol Chem.* **285(17)**: 12831-9.



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

Hamadah KH. (2014). Metabolic activity of the chitin synthesis inhibitor, Flufenoxuron on the desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acaracidae). *J Entomol Zool Stud.* **2014**; **2(1)**: 87-95.

Hamadah, Kh., Ghoneim, K.S and Tanani M.A. (2012). effect of certain insect growth regulators on the lipid content of some tissues of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *African J.Res.*, **6 (9)**:121-128.

Hamdi, S. (2011). Rythme alimentaire, embonpoint et parasitisme à *Anguillicola crassus* (Kuwahara, Niimi et Itagaki, 1974) chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla*

- Linnaeus, 1758) dans la lagune Mellah. Thèse Magister. Univ. Annaba : 89p (+ Annexes).
- Haridi, H., (1999).** Le zooplancton de la lagune Mellah (El Kala, Algérie). Bilan d'échanges avec la mer et incidences écologiques en hiver et au printemps. Mémoire de Magister en Océanographie. Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ISMAL., Alger). 64 p + annexes.
- Haubruge, É., & Amichot, M. (1998).** Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*. **2(3)** : 161-174.
- Hayward, P. J., & Ryland, J. S. (1996).** Some British Phidoloporidae (Bryozoa: Cheilostomatida). *Zoological Journal of the Linnean Society*. **117(1)**: 103-112.
- Hemingway, J., Field, L., & Vontas, J. (2002).** An overview of insecticide resistance. *Science*. **298(5591)** : 96-97.
- Hepburn, H.R. (1985).** Structure of the integument. In *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Eds. G.A. Kerkut & L.I. Gilbert, Pergamon Press (Oxford)., **3**,1-58.
- Hoffmann, J.A., Lagueux, M., Hetrué, C., Charlet, M., Goltzene, F. (1980).** Ecdysone in reproductively competent adults and in embryos of insects. In: Hoffmann, J.A. (Ed.), *Progress in Ecdysone Research*. Elsevier Biomedical Press, North Holland. 247- 280.
- Hong, Y. Y., Chiu, C. Y., Dweck, C. S., Lin, D., & Wan, W. (1999).** Implicit theories, attributions, and coping: A meaning system approach. *Journal of Personality and Social Psychology*, **77**: 588 – 599.
- Horst, M. N., & Walker, A. N. (1995).** Biochemical effects of diflubenzuron on chitin synthesis in the postmolt blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of crustacean biology*, **15**, 401-401.
- Huberman A. (2000).** Shrimp endocrinology. *rev Aquacul*. **191**: 191-208.
- Hunter, E., & Vincent, J. F. V. (1974).** The effects of a novel insecticide on insect cuticle. *Experientia*, **30(12)**, 1432-1433.
- Hyne, R.V., (2011).** Review of the reproductive biology of amphipods and their endocrine regulation: Identification of mechanistic pathways for reproductive toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry*., **30**, 2647-2657.



Ippolito, J.A., Novak, J.M., Busscher, W.J., Ahmedna, M., Rehrah, D. & Watt, D.W. (2012). witchgrass biochar affects two Aridisols. *J. Environ. Qual.* **41**:1123–1130.

Ishaaya I, Yablonski S, Mendelson Z, Mansour Y, Horowitz AR. (1996). Novaluron (MCW-275), a novel benzoylphenyl urea, suppressing developing stages of lepidopteran, whitefly and leafminer pests. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases; **3**: 1013-1020.



Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, **3(3)**, 318-356

Jayed, M., Benbrahim, S., Bakkas, S., Ramdani, M., & Flower, R. (2015). Accumulation of Organochlorines in the European Clam (*Ruditapes decussatus*) and Sediment of the Oualidia Lagoon (Morocco). *Bulletin of environmental contamination and toxicology.* **94(5)**: 614-621.

Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Quéau, H., Chaumot, A., Geffard, O., (2012). Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquatic Toxicology*, 112-113, 72-82.



Kamel, N., Jebali, J., M., Benkhedher, S., Chouba, L. & Boussetta, H. (2012). Biochemical response and metals levels in *Ruditapes decussatus* after exposure to treated municipal effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **82**: 40-46.

Kanzari, F., Syakti, A. D., Asia, L., Malleret, L., Piram, A., Mille, G., & Doumenq, P. (2015). Distributions and sources of persistent organic pollutants (aliphatic hydrocarbons, PAHs, PCBs and pesticides) in surface sediments of an industrialized urban river (Huveaune), France. *Science of the Total Environment*. **478**: 141-151.

Karine, L. E. (2012). *Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisations des produits et optimisation du procédé* (Doctoral dissertation, Université de Nantes).

Kegley, S., Neumeister, L., Martin, T., Network, P.A. (1999). Disrupting the balance. Ecological impacts of pesticides in California. *Pesticide Action Network*. **99**.

Kleinholz, L.H. (1941). Molting and calcium deposition in decapod crustaceans. *J. Cell. Physiol.*, **18**, 101-107.



Lachaise, F., Le Roux, A., Hubert, M., Lafont, R. (1993). The molting activity of crustaceans: Localization, activity, and endocrine control. *Journal of Crustacean Biology*., **13**, 198-234.

Lafon, M. (1943). Recherches biochimiques et physiologiques sur la squelette tegumentaire arthropodes. *Ann. Sci. nat. Zool. Biol. animale.*, **11**, 113-146.

Laouira, L., Hamdi, S., Derbal, F., Chaoui, L., & Kara, M.H. (2010). Régime alimentaire de l'anguille *Anguilla anguilla* dans les hydrosystèmes continentaux en Algérie. Cas de la lagune du Mellah et de l'Oued El-Kébir. 12ème journées tunisiennes des sciences de la mer. Hammamet (Tunisie) : 18-21 décembre 2010.

Lavariás, S & García, C. F. (2015). Acute toxicity of organophosphate fenitrothion on biomarkers in prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Palaemonidae). *Environ Monit Assess* **187**: 65.

Lavariás, S., García, C., Crespo, R., Pedrini, N. & Heras, H. (2013). Study of biochemical biomarkers in freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to organophosphate fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **96**: 10-16.

LeBlanc, G.A., Campbell, P., den Besten, P., Brown, R., Chang, E., Coats, J., deFur, P., Dhadialla, T., Edwards, J., Riddiford, L., Simpson, M., Snell, T.M.T., Matsumura, F., (1999). The endocrinology of invertebrates. Endocrine disruption in invertebrates:

Endocrinology, testing and assessment.de Fur, P.,Crane, M., Ingersoll, C. and Tattersfield, L. *Pensacola SETAC Press*, 23-106.

Lehman, P. F., White, L. O. (1976). Acquired Immunity to *Aspergillus fumigates*. *Infection and Immunity*. P. 1296-1298 Vol. **13**, No. **4**.



Macken, A., Lillicrap, A., & Langford, K. (2015). Benzoylurea pesticides used as veterinary medicines in aquaculture: Risks and developmental effects on nontarget crustaceans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **34**(7), 1533-1542.

Mahler, H. R., & Cordes, E. H. (1968). Basic biological chemistry.

Maiza A., Aribi N., Smaghe G., Kilani-Morakchi S., Bendjedid M & Soltani N. (2013). Sublethal effects on reproduction and biomarkers by spinosad indoxacarb in cockroaches *Blattella germanica*. *Bulletin. Insectol.* **66** (1): 11-20.

Martoja R. & Martoja M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson; 345.

Matozzo, V., Tomei, A., Marin, M.G. (2005). Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar. Pollut. Bull.* **50**, 1686–1693.

Mebarki, R., Khebbeb, M.E.H. & Soltani, N. (2015). Biomonitoring of El Mellah Lagoon (Northeast, Algeria): Seasonal Variation of Biomarkers in *Cerastoderma glaucum* (Mollusc, Bivalvia). *JEZS*; **3**(4): 408-413.

Melouah, K., Draredja, B. & Beldi, H. (2014). Dynamique de la Coque *Cerastoderma Glaucum* (Mollusca, Bivalvia) Dans La Lagune Mellah (Algérie Nord-Est). *Revue Synthèse, Univ. Annaba. Rev. Sci. Technol., Synthèse.* **28**: 34-45.

Merzendorfer H. (2013). Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Sci.* **20**: 121-138.

Merzendorfer H, Kim HS, Chaudhari SS, Kumari M, Specht CA, Butcher S, Brown SJ, Robert Manak J, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan S. (2012). Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol.* **42**: 264-276.

- Merzendorfer H. (2006).** Insect chitin synthases: a review. *JComp Physiol [B]*. : 1-15.
- Merzendorfer H, Zimouch L. (2003).** Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol.* **206 (24)**:4393-4412.
- Messerer, Y., (1999).** Etude morphométrique et morphologique du complexe lacustre d'El Kala (cas du lac Mellah et du lac Oubéira).
- Mokbel, H., ElMoll, A., Liaud, C., & Millet, M. (2015).** Développement de méthodes d'analyses pour évaluer les niveaux de contamination atmosphérique d'OCP, PCB ET HAP. *Lebanese Science Journal.* **16(2)**: 47-64.
- Monteiro, D.A., De Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. (2006).** Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **143** : 141–149.
- Morsli S.M., Merad I., Khebbeb M.E.H. & Soltani N. (2015).** Potential hazards of a chitin synthesis inhibitor diflubenzuron in the shrimp *Penaeus kerathurus*: biochemical composition of the hemolymph and muscle during the molt cycle. *Advances in Environmental Biology.* **9(3)**: 518-525.
- Morsli, M. S., & Soltani, N. (2003).** Effets d'un insecticide inhibiteur de la synthèse de la chitine, le diflubenzuron, sur la cuticule de la crevette *Penaeus kerathurus*. *J. Rech. Oceanogr.* **28(1-2)**, 85-88.
- Morsli, M.S. (1994).** Effet d'un dérivé de la benzoylphenylurée, le dimilin sur la physiologie de *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda): Etude structural et biologique. *Thèse de Magister. Université de Annaba.*, 90 p.
- Morsli, S., & Bezzazel, N. (2001).** Composition chimique de la cuticule au cours d'un cycle de mue de *Penaeus kerathurus*.
- Moussian B (2010)** Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochem Mol Biol* **40**: 363–375.
- Muthukrishna, S., Merzendorfer, H., Arakan, Y & Kramer K.J. (2012).** Chitin metabolism in insects. *Comprehensive Molecular Insect Science* (ed. L.I. Gilberts), pp. 193-235. Academic Press, London.
- Mykles, D.L., (2011).** Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol., in the press.*



- Nagaraju, G.P.C. (2007).** Is methyl farnesoate a crustacean hormone? *Aquaculture*. **272**, 39-54.
- Nagaraju, G.P.C., Suraj, N.J., Reddy, P.S. (2003).** Methyl farnesoate stimulates gonad development in *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, **76**: 1171-1178
- Nagasawa H. (2012).** The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. **4**: 711-200.
- Nakatsuji, T., Sonobe, H. (2004).** Regulation of ecdysteroid secretion from the Y-organ by moltinhibiting hormone in the American crayfish, *Procambarus clarkii*. *General and Comparative Endocrinology*, **135**, 358-364.
- Nauen, R., & Bretschneider, T. (2002).** New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook*. **13(6)**: 241-245.
- Nauen R., Elbert A., Mccaffery A., Slater R. et Sparks T. C. (2012).** Insecticide resistance, and mode of action classification of insecticides, in: W. Krämer, U.Schirmer, P. Jeschke, M. Witschel (Eds.), *Modern Crop Protection Compounds*, second ed., Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, *Germany*. pp 935–95.
- Nwankwo EN, Okonkwo NJ, Okafor EG. (2011).** Comparative studies on the larvicidal action of Novaluron (Mosquiron 100 EC) and *Moringa oliefera* Seed Oil against *Aedes Aegypti*. *Int J Multi-Discip Res, Ethiopia*; **5 (1)**: 424-437



- Okumura, T., Han, C.H., Suzuki, Y., Aida, K., Hanyu, I. (1989).** Changes in hemolymph ecdysteroid levels during the molt cycle in the kumura prawn *Penaeus japonicas*. *Nippon Suisan Gakk.* **55**: 2091-2098.

Oliveira, M.M., Silva Filho, M.V. Fernandes F.C. & Cunha Bastos, J. (2007). Brain Acetylcholinesterase as a Marine Pesticide Biomarker using Brazilian Fishes. *Marine Environmental Research*, **63**: 303-309.

ONDPA. (2005). Étude portant sur la connaissance des biomasses des lacs de la wilaya d'El-Tarf et établissement des règles de gestion halieutiques spécifique. Expertises et rapport pour le compte du ministère de pêche et ressources halieutiques. Tome 1 et 2. 420 p.

Onivogui, G., Balde, S., Bangoura, K., & Barry, M. K. (2015). Évaluation des risques de pollution en métaux lourds (Hg, Cd, Pb, Co, Ni, Zn) des eaux et des sédiments de l'estuaire du fleuve Konkouré (Rep. de Guinée). *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*. **9(3)** : 36-44.



Pascal M., Siorat F. & Bernard F. (1998). Interaction between Noways rats and shrews in Brittany Island. *Aliens Newsletter*, 8. IUCN, Invasive Species Specialist Group, Special Survival Commission : 7.

Pener, M.P., Dhadialla, T.S. (2012). An Overview of Insect Growth Disruptors; Applied Aspect. *Adv Insect Physiol.* **43**. ISBN 978-0-12-391500-9.

Perez-López, M., Nóvoa-Valiñas, M.C., Melgar Riol, M.J. (2002). Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. *Toxicol. Lett.* **136**, 97–106.

Philogène B.J.R, Regnault-Roger C. & Vincent C. (2002). Produits phytosanitaires insecticides d'origine végétale : promesses d'hier et d'aujourd'hui. In: Philogène B.J.R, Regnault-Roger C. & Vincent C., coord. *Biopesticides d'origine végétale*. Paris: *Lavoisier-Éditions Tec & Doc*, 1-17.

PMRA. (2006). Proposed Registration Decision - Novaluron, Health Canada's Pest Management Regulatory Agency, Report No. PRD2006-05. p 108.

Porcheron P, Oberlander H, Leach CE. (1988). Ecdysteroid regulation of amino sugar uptake in a lepidopteran cell line derived from imaginal discs. *Arch Insect Biochem Physiol.* **7**:145-155.

Prabu K, Natarajan E. (2012). Bioprospecting of shells of crustaceans. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; **4(4)**:1-3.



Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, A., Mouneyrac, C., Budzinski, H. & Romeo, M. (2007). Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Environ. International.*, **33**: 27-33.



Rao, J.V., Kavitha, P., Srikanth, K., Usman, P.K. et Rao, T.G. (2007). Environmental contamination using accumulation of metals in marine sponges, *Sigmadocia fibulata* inhabiting the coastal waters of Gulf of Mannar, India. *Toxicol. Environ. Chem.* **89**: 487–498.

Ramade, F. (2011). Introduction à l'écochimie: les substances chimiques de l'écosphère à l'homme. *Lavoisier*.

Rathke, (1837). Ventilatory behavior and chloride regulation in relation to oxygen tension in the shrimp *Palaemon adspersus* .1 (2), 193-200.

Retima, A. (1999). Incidences des échanges hydrologiques, chimiques, biochimiques et phytoplanktoniques sur la fertilité de la lagune Mellah et du littoral voisin (El Kala, Algérie) selon le régime de marée dix ans après l'aménagement du chenal de communication. Mémoire de Magister en Ecologie. Université d'Annaba. 87 p.

Robertson, N.L., Bray, W., Leung-Trujillo, J. & Lawrence, A. (1987). Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society.* **18 (3)**: 180-185.

Rodrigues, A.P., Lehtonen, K.K., Guilhermino, M. & Guimarães, L. (2013). Exposure of *Carcinus maenas* to waterborne fluoranthene: Accumulation and multibiomarker responses *Science of the Total Environment*, **443**: 454–463.

Rodrigues, E. T., & Pardal, M. Â. (2014). The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. *Environment international*, **70**, 158-182.



- Salokhe S.G. Deshpanded S.G. Pakhle K. & Maniyare A.B. IGR (2013).** Lufenuron, alters chitin and total soluble protein content of *Aedes aegypti* larvae during development of *Aedes aegypti*. *Curr Sci.*; **99(9)**:1256-59.
- Salokhe, S., Sarkar, A., Kulkarni, A., Mukherjee, S., & Pal, J. K. (2006).** Flufenoxuron, an acylurea insect growth regulator, alters development of *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae) by modulating levels of chitin, soluble protein content, and HSP70 and p34 cdc2 in the larval tissues. *Pesticide biochemistry and physiology*, **85(2)**, 84-90.
- Schiavone. (2003).** Departement of Biogical and Environment Sciences and Technologies. University of Lecce via Provinciale Lecce_ Monteroni 73.100 Marine Aquaculture and Fisheries Research Centre Frigole_ Lecce Jtaly.
- Sheehan D., Meade G.,Foley V.M. et Dowd C.A.,(2001).** Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of anancient enzyme super family . *Biochem J.* (**360**):1-16.
- Shi, H., Pei, L., Gu, S., Zhu, S., Wang, Y., Zhang, Y., & Li, B. (2012).** Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics*,**100** (5), 327-335.
- Sifi, K., Amira, A., & Soltani, N. (2007).** Mesure de deux biomarqueurs du stress oxydatif chez un mollusque bivalve (*Donax trunculus*): corrélation avec la reproduction au niveau du golfe d'Annaba. 9^{ème} journées tunisiennes des sciences de la mer Tabarka (Tunisie) 15-18 décembre 2007.
- Sifi, K., Amira, A., & Soltani, N. (2013).** Oxidative stress and biochemical composition in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *Advances in Environmental Biology*, 595-605.
- Silva, C., Oliveira, C., Gravato, C. & Almeida, J.R. (2013).** Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo(a)pyrene in the common prawn *Palaemon serrates*. *Marine Environmental Research.*, **90**: 39- 46.
- Simon, E. (2012).** Étude des mécanismes de mobilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques contaminants des sédiments fluviaux (Doctoral dissertation, Lille 1).
- Soltani, N., Lechekhab, H. & Smagghe, G. (2009).** Impact of insect growth regulator diflubenzuron on biochemical composition of cuticle of shrimp *Penaeus kerathurus*. *Comm. Appl. Biol. Sci*, Ghent University, **74/1**: 137-141.

- Soltani, N., & Morsli, S. M. (2003).** Quantification du Dimilin par Chromatographie Liquide à Haute Performance: Etude de sa Dégradation dans L'eau de Mer. *Journal de Recherche Oceanographique*, **28**, 118-120.
- Soltani N, Bezzazel N. (2002).** Profile of ecdysteroids haemolymph and correlations with secretion cuticular during a cycle of molt shrimp *Penaeus kerathurus*. *J de Recher Océano*. **27** (34): 226-231. French.
- Soltani, N., Aribi, N., Berghiche, H., Lakbar, S., & Smagghe, G. (2002).** Activity of rh-0345 on integumental explants of mealworms: ecdysteroid production, cuticle deposition and protein analysis. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*. **65 (2a)**, 431-439.
- Souyei, B. (2015).** Calculation of coefficient of sharing Octanol-Water of organic compounds using molecular descriptors. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. **2(2)**: 217-224.
- Sparks, T.C. (2013).** Insecticide discovery: An evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **107**: 8–17.
- Stankiewicz, B.A., vanBergen, P.F., Duncan, I.J., Carter, J.F., Briggs, D.E.G. (1996).** Evershed RP: Recognition of chitin and proteins in invertebrate cuticles using analytical pyrolysis gas chromatography and pyrolysis gas chromatography mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(14):1747-1757
- Su TY, Mulla MS, Zaim M. (2003).** Laboratory and field evaluations of novaluron, a new insect growth regulator (IGR), against *Culex mosquitoes*. *J Am Mosq Control Assoc.*; **19**: 408-418.
- Subramoniam T. (2000).** Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp Biochem Physiol, Part C* 125: 135-156.
- Sugumar, V., Vijayalakshmi, G., & Saranya, K. (2013).** Molt cycle related changes and effect of short term starvation on the biochemical constituents of the blue swimmer crab *Portunus pelagicus*. *Saudi journal of biological sciences*, **20(1)**, 93-103.
- Sun, R., Liu, C., Zhang, H., & Wang, Q. (2015).** Benzoylurea Chitin Synthesis Inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*. **63(31)**: 6847-6865.
- Svend Olav, A. (1991).** Cuticular proteins from the shrimp, *Pandalus borealis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **99B(2)**, 453-458.



- Tail, G., Kara, F. Z., Doumandji-Mitiche, B., & Porcheron, P. (2015).** The Effects of Diflubenzuron on the Cuticle and on Hemolymphatic Ecdysteroids of Fifth Instar Nymphs of the Desert Locust, *Schistocerca Gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research*, **24**(2), 77-81.
- Tanani MA, Ghoneim KS, Hamadah KS. (2012).** Comparative effects of certain IGRs on the carbohydrates of hemolymph and fat body of *schistocercagregria*: (Orthoptera: Acaracidae). *Fla Entomol.*; **95**(4): 928-935
- Tim-Tim, A.L.S., F. Morgado, S. Moreira, R. Rangel, A.J.A. Nogueira, A.M. Soares & L. Guilhermino. (2009).** Cholinesterase and Glutathione S-transferase Activities of Three Mollusk Species from the NW Portuguese Coast in Relation to the Prestige Oil Spill. *Chemosphere*, **77**: 1465-1472.
- Tlili, S., Métais, I., Boussetta, H, & Mouneyrac, C. (2010).** Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*: Assessment of marine stress. *Chemosphere* **81**: 692-700.
- Tlili, S., Minguez, L., Giamberini, L., Geffard, A., Boussetta, H., & Mouneyrac, C. (2013).** Assessment of the health status of *Donax trunculus* from the Gulf of Tunis using integrative biomarker indices. *Ecological indicators*, **32**, 285-293.
- Tomé, H. V. V., Martins, J. C., Corrêa, A. S., Galdino, T. V. S., Picanço, M. C. et Guedes, R. N. C., (2013).** Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Crop Protection* **46**: 63-69.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2003).** Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*. **48**(1): 339-364.
- Trabelsi, S. & Dris, M.R. (2005).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Mar Pollut Bull.* **50**: 344-9.
- Tunaz, H., Uygun N. (2004).** Insect Growth Regulators for Insect Pest Control. *Turk J Agric For.* **28**: 377-387.



Van Daalen, J.J., Meltzer J., Mulder, R., Wellinga, K. A. (1972). Selective insecticide with a novel mode of action. *Naturwissenschaften*. **59**: 312–313.

Van Leeuwen T, Demaeght P, Osborne EJ, Dermauw W, Gohlke S, Nauen R, Grbic M, Tirry L, Merzendorfer H, Clark RM. (2012). Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1094**: 407–4412.

Vight, D.A., & Dendinger, J.E. (1982). Temporal relationships of postmolt deposition of calcium, magnesium, chitin and protein in the cuticle of the atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* rathbun. *Comp. Biochem. Physiol.*, **72(A)**, 365-369.



Wang, S. L., Chiou, J. M., Chen, C. J., Tseng, C. H., Chou, W. L., Wang, C. C., ... & Chang, L. W. (2003). Prevalence of non-insulin-dependent diabetes mellitus and related vascular diseases in southwestern arseniasis-endemic and nonendemic areas in Taiwan. *Environmental Health Perspectives*, **111(2)**, 155.

Wilinder, B.S. (1974). The crustacean cuticle. Studies on the composition of the cuticle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **47 (A)**, 779-787.

Wing, J.P., Schwartz, L.M., Nambu, J.R. (2000). An EP-based screen to identify genes involved in the grim-reaper cell death pathway. *A. Dros. Res. Conf.* **41**; 620A.



Yu, Y. Y., Chen, S. J., Chen, M., Tian, L. X., Niu, J., Liu, Y. J., & Xu, D. H. (2016). Effect of cadmium-polluted diet on growth, salinity stress, hepatotoxicity of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Protective effect of Zn (II)-curcumin. *Ecotoxicology and environmental safety*, **125**, 176-183.

Yu, X.L., Chang, E.S., Mykles, D.L. (2002). Characterization of limb autotomy factor-proecdysis (LAF_{PRO}) isolated from limb regenerates, that suspends molting in the land crab *Gecarcinus lateralis*, *Biol Bull.* **202**: 204-212.



Zhu KY, Heise S, Zhang J, Anderson TD, Starkey SR. (2007). Comparative studies on effects of three chitin synthesis inhibitors on common malaria mosquito (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **44**: 1047–1053.

Annexe 1
Données Statistiques

Annexes

Tableau 1: Activité spécifique de la glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) dans la chair de *P. adspersus* dans trois sites de la lagune El-Mellah durant l'été et l'automne des années 2013 et 2014 ($m \pm \text{SD}$, $n = 4 - 7$). Tableau de l'analyse de la variance à trois critères de classification.

Source	SCE	MS	DDL	F _{obs}	P
Sites	6634,9	3317,4	2	44,96	0,000 ***
Saisons	2305,9	2305,9	1	31,25	0,000 ***
Années	23468,8	23468,8	1	318,04	0,000 ***
Sites* saisons	265,3	132,6	2	1,80	0,179 ns
Saisons* Années	2110,9	2110,9	1	28,61	0,000 ***
Sites* Années	2302,7	1151,4	2	15,60	0,000 ***
Interaction	485,3	242,6	2	3,29	0,047 *
Erreur résiduelle	3025,4	73,8	41		
Total			52		

Tableau 2: Activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) dans la tête de *P. adspersus* dans trois sites de la lagune El-Mellah durant l'été et l'automne des années 2013 et 2014. Analyse de la variance à trois critères.

Source	SCE	MS	DDL	F _{obs}	P
Sites	9766,2	4883,1	2	101,01	0,000 ***
Saisons	2347,1	2347,1	1	48,55	0,000 ***
Années	19200,3	19200,3	1	397,17	0,000 ***
Sites* saisons	95,0	47,5	2	0,98	0,383 ns
Saisons* Années	3973,7	3973,7	1	82,20	0,000 ***
Sites* Années	89,9	44,9	2	0,93	0,403 ns
Interaction	861,8	430,9	2	8,91	0,000 ***
Erreur résiduelle	2030,4	48,3	42		
Total			53		

Différence significative. ($p < 0,05$), *** Différence hautement significative ($p < 0,001$).
 SCE: somme des carrés des écarts, DDL: degré de liberté, CM : somme des carrés, F_{obs} : F observé, P: seuil de signification.

Tableau 3 : Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) sur la concentration des ecdystéroïdes hémolymphatique (pg équivalent 20E / μl d'hémolymph) à différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traités ($m \pm SD$, $n = 4$). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	F_{obs}	P
Traitements	2	4005	2003	16,02	$P < 0,0001$ ***
Stades	3	46780	15593	124,8	$P < 0,0001$ ***
Interaction	6	1551	258,5	2,069	$P = 0,0952$ ns
Erreur résiduelle	24	3000	125,0		

* Différence significative. ($p < 0,05$), *** Différence hautement significative ($p < 0,001$). SCE: somme des carrés des écarts, DDL: degré de liberté, CM : somme des carrés, F_{obs} : F observé, P: seuil de signification.

Tableau 4 : Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) sur le poids des cuticules dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traités ($m \pm SD$, $n = 4-5$). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	F_{obs}	P
Traitements	2	7,589	2,838	16,55	$P < 0,0001$ ***
Stades	3	19,78	6,496	28,77	$P < 0,0001$ ***
Interaction	6	2,296	0,243	1,670	$P = 0,1569$ ns
Erreur résiduelle	36	8,252	0,2193		

* Différence significative. ($p < 0,05$), *** Différence hautement significative ($p < 0,001$).
 SCE: somme des carrés des écarts, DDL: degré de liberté, CM : somme des carrés, F_{obs} : F observé, P: seuil de signification.

Tableau 5 : Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g} /\text{L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g} /\text{L}$) sur le taux (%) de la chitine dans la cuticule à différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm s$, $n = 4$). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitements	2	939,3	383,8	43,41	P < 0,0001 ***
Stades	3	1151	496,9	53,11	P < 0,0001 ***
Interaction	6	298,7	49,79	5,63	P = 0,0002 ***
Erreur résiduelle	41	362,5	884,3		

Tableau 6: Effet du novaluron ($CL_{50}=0,91\mu\text{g}/\text{l}$; $CL_{90}= 4,30 \mu\text{g}/\text{L}$) sur le contenu en chitine ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au cours du cycle de mue chez *P.adspersus* ($m \pm sd$, $n= 4-7$). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitements	2	22836	11418	465,8	P< 0,0001 ***
Stades	3	15918	5306	216,4	P< 0,0001 ***
Interaction	6	5997	999,5	40,77	P< 0,0001 ***
Erreur résiduelles	52	1275	24,51		

* Différence significative. ($p < 0,05$), *** Différence hautement significative ($p < 0,001$).

SCE: somme des carrés des écarts, DDL: degré de liberté, CM: somme des carrés, F obs: F observé, P: seuil de signification.

Tableau 7 : Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g} /\text{l}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g} /\text{l}$) sur le taux (%) des protéines dans la cuticule aux différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traitées ($m \pm s$, $n = 8$). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitements	2	1461	730,6	635,7	P < 0,0001 ***
Stades	3	1702	567,4	545,6	P < 0,0001 ***
Interaction	6	141,1	23,51	14,67	P = 0,1237 ns

Erreur résiduelle	40	309,4	773,4
--------------------------	----	-------	-------

* Différence significative. ($p < 0,05$), *** Différence hautement significative ($p < 0,001$).
 SCE: somme des carrés des écarts, DDL: degré de liberté, CM: somme des carrés, F obs: F observé, P: seuil de signification.

Tableau 8: Effet du novaluron ($CL_{50} = 0,91 \mu\text{g/L}$ et $CL_{90} = 4,30 \mu\text{g/L}$) sur le taux (%) des sels calciques dans la cuticule aux différents stades du cycle de mue chez *P. adspersus* témoins et traités ($m \pm SD$, $n = 4$). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	MS	Fobs	P
Traitements	2	69,33	34,66	1,285	P = 0,2931 ns
Stades	3	170,9	56,96	2,111	P = 0,1222 ns
Interaction	6	157,4	26,24	0,9726	P = 0,4625 ns
Erreur résiduelle	27	728,5	26,98		

* Différence significative. ($p < 0,05$), *** Différence hautement significative ($p < 0,001$).
 SCE: somme des carrés des écarts, DDL: degré de liberté, F obs: F observé, CM: somme des carrés P: seuil de signification.

Tableau 9: effet du novaluron ($CL_{50}=0,91 \mu\text{g/L}$; $CL_{90}= 4,30 \mu\text{g/L}$) sur l'épaisseur de la cuticule (μm) au cours du cycle de mue chez *P. adspersus* ($m \pm SD$, $n= 4-7$). Analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Traitement	2	24,01	12	35,28	P < 0,0001 ***
Stades	3	56,23	18,74	47,3	P < 0,0001 ***
Interaction	6	17,88	2,981	4,37	P = 0,0035 **
Erreur résiduelle	35	12,41	0,4966		

* Différence significative. ($p < 0,05$), *** Différence hautement significative ($p < 0,001$).
 SCE: somme des carrés des écarts, DDL: degré de liberté, CM : somme des carrés, F obs: F observé, P: seuil de signification.

Annexe 2
Productions Scientifiques

Publications (2):

1. **BENRADIA H.**, BERGHICHE H. & SOLTANI N. (2016). Measure of environmental stress biomarkers in the shrimp *Palaemon adspersus* from the mellah lagoon (algeria): spatial and temporal variations. *Fresenius Environmental Bulletin*. **25 (4)**: xxx-xxx.
2. BERGHICHE H. **BENRADIA H** & SOLTANI N. (2016). Impact of insect growth disruptor, novaluron, on biochemical composition of cuticle from the shrimp *Palaemon adspersus*. *Journal of Entomological and Zoological Studies*, **4(1)**: xx-xx.

Publication soumise (1):

3. BERGHICHE H. **BENRADIA H** & SOLTANI N. (2016). Evaluation of the potential side-effects of novaluron an insect growth disruptor on the shrimp *Palaemon adspersus*: moulting hormone profile, cuticle secretion and chitin contents. *South African Journal of Science*. soumis

Communications internationales (6):

1. BERGHICHE H, **BENRADIA H**, SOLTANI N. (2015). Évaluation des effets secondaires d'un insecticide, le novaluron, chez la crevette *Palaemon adspersus*: ecdystéroïdes, chitine et sécrétion cuticulaire. *4th International Congress of physiology and Environmental Biomonitoring*, 23-25 décembre 2015, Tabarka Tunisie. (Communication orale).
2. BERGHICHE H, **BENRADIA H**, SOLTANI N. (2015). Évaluation de l'impact d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le novaluron, sur l'hormone de mue et la composition biochimique des cuticules chez *Palaemon adspersus*. *45^e congrès du Groupe Français des Pesticides*. Versailles France, 27-29 mai 2015 (Communication orale)
3. **BENRADIA H.**, BERGHICHE H. & SOLTANI N. (2014). Biosurveillance de la lagune El-Mellah par la mesure de biomarqueurs chez la crevette *Palaemon adspersus*. *IX^{ème} Congrès Maghrébin des Sciences de la Mer*, Sousse, Tunisie 21-24 décembre 2014. (Communication affichée).
4. **BENRADIA H.**, BERGHICHE H. & SOLTANI N. (2014). Evaluation des risques ecotoxicologiques: Effet du novaluron sur la chitine et les protéines cuticulaires chez *Palaemon adspersus*. *Deuxième Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources*, Tabarka, Tunisie 18-20 Mars 2014. (Communication orale)
4. **BENRADIA H.**, BERGHICHE H. & SOLTANI N. (2013). Effets secondaires d'un insecticide (Novaluron) chez la crevette *Palaemon adspersus* : taux d'hormone de mue et de chitine. *Quinzièmes Journées Tunisiennes des Sciences de la Mer*, Mahdia, Tunisie 14-17 Décembre 2013. (Communication orale).

6. **BENRADIA H.**, BERGHICHE H. & SOLTANI N. (2013). Biosurveillance de la qualité du lac mellah par mesure de deux biomarqueurs chez un crustacé décapode *Palaemon adspersus*. 3^{ème} colloque international sur la biodiversité et ecosystème littoraux., Oran, Algérie 26-28 novembre 2013. (Communication orale).

Communications nationales (1):

1. BERGHICHE H., **BENRADIA H.** & SOLTANI N. (2015). Effet d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le novaluron, sur l'hormone de mue et la chitine chez *Palaemon asspersus*, 1^{er} Séminaire National sur l'Entomologie Médical et la Lutte Biologique 19-20 octobre Tébessa, Algérie (Communication affichée).

Tâches pédagogiques :

- Assistante de TP Licence Génome, Cellule, Développement et Évolution.
- Assistante de TP Master 1 Biologie du Développement, et Master 1 Physiotoxicologie.
- Assistante de TD Tronc commun de science de la nature et la vie.
- Assistante encadrement Master 2 Biologie de Développement.



MEASURE OF ENVIRONMENTAL STRESS BIOMARKERS IN THE SHRIMP *PALAEMON ADSPERSUS* FROM THE MELLAH LAGOON (ALGERIA): SPATIAL AND TEMPORAL VARIATIONS

Hamida Benradia, Hinda Berghiche and Nouredine Soltani

Laboratory of Applied Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Science
Badji Mokhtar University 23000 Annaba, Algeria

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the impact of anthropogenic activities on the water quality of the Mellah lagoon using the shrimp *Palaemon adspersus* (Crustacea, Decapoda) as a bioindicator. The activities of glutathione S-transferase (GST) and acetylcholinesterase (AChE), biomarkers of oxidative stress and neurotoxicity, respectively, were measured in shrimps collected from each site. The samples were collected for two consecutive years (i.e. 2013 and 2014) and two seasons, summer and autumn, were considered in each year. Three sampling sites were chosen: the first one corresponds to the channel of the Mellah lagoon (site 1) is considered as reference site, the second one located in the output of El Mellah River (site 2) is characterized by their proximity to urban activities, and the last one situated in the output of R'kibet River (site 3) is exposed to agricultural and domestic activities. GST and AChE activities were found to vary between sites and by season and year. The results showed a significant induction in GST and also a significant inhibition in AChE activities in individuals from the sites 2 and 3 compared to those of the site 1. Indeed, marked responses are observed in the summer compared to autumn. Also, induction of GST and inhibition of the activity of AChE were higher in 2014 compared to 2013. The differences recorded between the sites studied in the Mellah lagoon are related to their level of pollution, while the seasonally and annually variations were due to the water supply by the Rivers during rainy periods.

KEYWORDS:

Pollution, Biomonitoring, Lagoon El Mellah, Crustacea, *Palaemon adspersus*, Glutathione S-transferase, Acetylcholinesterase.

INTRODUCTION

Urbanization, industrialization and agricultural intensification have caused an increase and diversification of discharges which caused in long-term a high risk of degradation of ecosystems. Coastal lagoons are receiving increasing attention worldwide in recognition of their multiple uses and services [1, 2], but also because of their exposure to anthropogenic disturbances and stress [3, 4]. Today aquatic ecosystems were exposed to pollution such as radioactive wastes, organic matter, heavy metals, polychlorinated biphenyls (PCBs), pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs) or drugs and nanoparticles [5-8]. These compounds exert their negative impacts on environment even on very low concentrations and often have great spatial and temporal variability which complicates the assessment of quantity released and their impacts on ecosystems [9]. However, both complementary approaches were used as pollution indicators: biomarkers and bioindicators [10-12]. In recent years, ecotoxicological researches on biomarkers have made considerable progress, to synthesize biological responses of organisms to pollutants for diagnosing the degree of contamination and the state of the environments health [9].

The Mellah lagoon belongs to the complex of wetlands National Park of El Kala (PNEK) (North-eastern Algeria), with Oubeira and Tonga lakes. Created in 1983, this park is classed as Biosphere Reserve in 1990 and Category II (National Park) as classified by the International Union for Conservation of Nature. Various studies were performed in ecosystem [13,14,2] exposed to agricultural and domestic pollutants provides by the R'kibet and El Mellah Rivers, causing contamination of aquatic organisms such as fish, mollusks and crustaceans [15, 16]. In this context, the current study, in continuation with previous works especially made on bivalve molluscs from this lagoon [17, 18]. Moreover some crustacean species from the Annaba gulf have been the subject of research on physiological [19-21] and toxicological aspects [22-25]. This study aims to

evaluate the response of two biomarkers, glutathione S-Transferase (GST) a biomarker of oxidative stress and acetylcholinesterase (AChE) a biomarker of neurotoxicity, measured in *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837) (Crustacea, Decapoda). The activity of both biomarkers was determined during the summer and autumn seasons during two consecutive years 2013 and 2014.

MATERIALS AND METHODS

Study sites and sampling. The Mellah lagoon is located in the extreme northeast of the Algerian coast, between Rosa Cap and Roux Cap ($36^{\circ} 53' 565 \text{ N} - 8^{\circ} 19' 560 \text{ E}$). It is extended from North to

South on 4 Km and from East to West on 2 Km covering an area of 865 hectares. The salinity varied from 15.9 to 37.1 psu and the temperature from 11.4 to 30.5 °C [14]. The lagoon communicates with the Mediterranean by a channel with 870 meters long and 15 meters wide [26] and received gentle waters from three rivers: El Mellah and Bouaroug to the South and R'kibet in the West (Fig. 1). Three sites were chosen for collecting the shrimps. The site 1 is considered as reference site, the second one located in the output of El Mellah River (site 2) is characterized by their proximity to urban activities, and the last one situated in the output of R'kibet River (site 3) is exposed to agricultural and domestic activities.

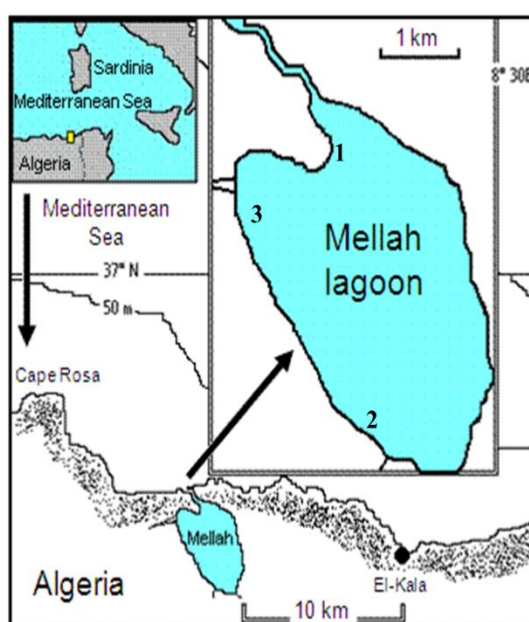


FIGURE 1

Location of the sampling sites in the Mellah lagoon (Northeast Algeria). Site 1: constriction zone of the channel with Mediterranean, site 2: output of El Mellah River in South of the lagoon, site 3: the output of R'kibet River to West of the lagoon [14].

Sampling of shrimps. *P. adspersus* (Rathke, 1837) is a common shrimp distributed in Norwegian coast and South of the Baltic Sea to the Mediterranean Sea. This species is clear with no lines or bands, excepting presence of dark chromatophores on the half ventral rostrum. Shrimps length: 25 mm, weight: 850 mg were fished by the seine net (mesh: 4 mm; length: 1.80 m) at three sites in the Lagoon during two seasons (summer and autumn) of two consecutive years 2013-2014.

Determination of glutathion S-transferase activity. Shrimps were collected and the flesh

fragments and the shrimp heads were used for quantification of GST and AChE activities, respectively. GST activities were determined with the soluble fraction as enzyme source. GST activities toward 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) were measured [27] as previously described [20]. Flesh fragments were homogenized in sodium; phosphate buffer (0.1 M, pH 6) and centrifuged (14000 g, 30 min). 200 µl of the resulting supernatant was added to 1.2 ml of reaction mixture containing 1 Mm CDNB and 5 Mm reduced glutathione (GST) in the homogenization buffer. Changes in absorbance were recorded at 340 nm.

Determination of cholinesterase activity.

The AChE activity was determined [28] as previously described [29] using acetylthiocholine as a substrate. Heads were homogenized in the following solution containing 38.03 mg ethylene glycol tetraacetic (EGTA), 1ml Triton X-100, 5.845 g NaCl and 80 ml Tris buffer (10Mm, pH 7). After centrifugation (9000g, 5 min), the AChE activity was measured in aliquots (100µl) of resulting supernatants added to 100 µl of 5-5' dithiobis -(2-nitrobenzoic acid) (DNTB) in Tris buffer (0.01 M, pH 8) and 1 ml Tris (0.1 M, pH 8). After 5 min, 100

µl acetylthiocholine was added. Measurements were conducted at a wavelength of 412 nm with a run time of 20 minutes. In parallel, total protein content was quantified according to Bradford [30] using bovine serum albumin as a standard. Enzyme activities were expressed as µM/min/mg proteins.

Rainfall data. The annual rainfall data (mm) and number of rainy days from two consecutive years 2013 and 2014 were kindly provided by the Agricultural Service of El-Tarf, Algeria (Table 1).

TABLE 1
Annual rainfall (mm) and number of rainy days during the experimental study.

Years	Rainfall	Number of rainfall days
2013	938	63
2014	649	39

Data analysis. Results were represented as mean \pm standard deviation (SD). The statistical analyses were performed using prism version 6.01 for Windows (GraphPad software, La Jolla California, USA, www.Graphpad.com). The homogeneity of variances was checked by Bartlett's and Brown-Forsythe tests. Data from enzyme activities (GST, AChE) were tested using three-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc HSD Tukey test.

RESULTS

Seasonal and annual variations of glutathione S-transferase activities. The GST activity was performed on flesh adults of *P. adspersus* fished in the different sites. Data were summarized in table 1. Results obtained during the summer of 2014 showed a higher significant increase ($p < 0.001$) in the GST activities in *P. adspersus* from the sites 2 (75.17 ± 8.06 µM/min/mg) and 3 (85.97 ± 25.69 µM/min/mg) as compared to individuals the site 1 (46.05 ± 3.1 µM/min/mg). In addition, the values of the GST activity in individuals from the site 1 and 3 were higher in summer in comparison to values obtained in autumn. The induction of GST is also higher in 2014 compared to 2013 (Table 2). The three-way

ANOVA (sites, seasons and years) showed a significant difference ($F_{2, 41} = 44.96$; $p \leq 0.001$) between the three sites: 1, 2 and 3 between the two seasons: summer and autumn ($F_{1, 41} = 31.25$; $p \leq 0.001$) and the years: 2013 and 2014 ($F_{1, 41} = 318.04$; $p \leq 0.001$) (Table 3).

Seasonal and annual variations of acetylcholinesterase activities. The AChE activity was evaluated in heads of adult *P. adspersus* collected in three sites of Mellah lagoon. As shown in table 4, data obtained in summer 2013 indicated a maximum AChE activity was about 62.03 ± 10.04 µM / min / mg in shrimp collected in the site 1. This activity was inhibited significantly ($p < 0.05$) at the site 2 (51.32 ± 2.09 µM / min / mg) and the site 3 (45.50 ± 3.25 µM / min / mg) compared to the first one. As for the summer of 2014 showed a significant inhibition ($p < 0.001$) of the AChE activity with the respective values of 26.38 ± 2.21 and 14.23 ± 1.08 µM / min / mg in the sites 2 and 3 compared to the site 1 which was about 44.18 ± 6.66 µM / min / mg. The three-way ANOVA (sites, seasons and years) showed a ($F_{2, 42} = 101.01$; $p \leq 0.001$) between the three sites 1, 2 and 3 between the two seasons, summer and autumn ($F_{1, 42} = 48.55$; $p \leq 0.001$) and the years considered ($F_{1, 42} = 397.17$; $p \leq 0.001$) (Table 5).

TABLE 2
Glutathione S-transferase (GST) activity ($\mu\text{M}/\text{min} / \text{mg}$ protein) in the flesh of *P. adspersus* in three sites from Mellah lagoon in the summer and autumn of 2013 and 2014 ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-7$)

Years	Seasons	Site 1	Site 2	Site 3
2013	Summer	10.89 \pm 1.90 a A	14.19 \pm 1.49 ab A	21.24 \pm 1.52 b A
	Autumn	6.86 \pm 0.48 a A	13.46 \pm 2.23 ab A	24.25 \pm 2.25 b A
2014	Summer	46.05 \pm 3.10 a A	75.17 \pm 8.06 b A	85.97 \pm 25.69 b A
	Autumn	21.16 \pm 0.08 a B	61.42 \pm 1.02 b A	51.74 \pm 4.65 b B

For the same season and year, means followed by the same small letter are not significantly different ($p > 0.05$) while for the same site and season, means followed by the same capital letter are not significantly different ($p > 0.05$).

TABLE 3
Glutathione S-transferase (GST) activities ($\mu\text{M}/\text{min}/ \text{mg}$ protein) in the flesh of *P. adspersus* in three sites from Mellah lagoon in the summer and autumn of 2013 and 2014 three-way ANOVA.

Sources of variation	FD	SS	MS	F _{obs}	P
Sites	2	6634.9	3317.4	44.96	0.000***
Seasons	1	2305.9	2305.9	31.25	0,000***
Years	1	23468.8	23468.8	318.04	0.000***
Sites/Seasons	2	265.3	132.6	1.80	0.179 ns
Seasons/Years	1	2110.9	2110.9	28.61	0.000***
Sites/Years	2	2302.7	1151.4	15.60	0.000
Interactions Sites/Seasons/Years	2	485.3	242,6	3.29	0.047*
Residual Error	41	3025.4	73.8		
Total	52				

DF: Degrees of freedom; SS: Sum of squares; MS: Mean squares

TABLE 4
Acetylcholinesterase (AChE) activity ($\mu\text{M} / \text{min} / \text{mg}$ protein) in the head of *P. adspersus* in three sites from Mellah lagoon in the summer and autumn of 2013 and 2014 ($m \pm \text{SD}$, $n = 4-7$).

Years	Seasons	Site 1	Site 2	Site 3
2013	Summer	62.03 \pm 10,04 a A	51.32 \pm 2.09 ab A	45.5 \pm 3.25 b A
	Autumn	107.45 \pm 13,96 a B	77.77 \pm 4.82 b B	66.22 \pm 3.54 b B
2014	Summer	44.18 \pm 6.66 a A	26.38 \pm 2.21 b A	14.23 \pm 1.08 c A
	Autumn	55.50 \pm 2.78 a B	24.44 \pm 3.92 b A	15.37 \pm 2.85 c A

For the same season and year, means followed by the same small letter are not significantly different ($p > 0.05$) while for the same site and season, means followed by the same capital letter are not significantly different ($p > 0.05$)

TABLE 5
Acetylcholinesterase activities ($\mu\text{M} / \text{min} / \text{mg}$ protein) in the head of *P. adspersus* in three sites from Mellah lagoon in summer and autumn of 2013 and 2014 three-way ANOVA (sites, seasons and years).

Sources of variation	DF	SS	MS	F _{obs}	P
Sites	2	9766.2	4883.1	101.01	0.000 ***
Seasons	1	2347.1	2347.1	48.55	0.000 ***
Years	1	19200.3	19200.3	397.17	0.000 ***
Sites/Seasons	2	95.0	47.5	0.98	0.383 ns
Seasons/years	1	3973.7	3973.7	82.20	0.000 ***
Sites/Years	2	89.9	44.9	0.93	0.403 ns
Interactions Sites/Seasons/years	2	861.8	430.9	8.91	0.000***
Residual Error	42	2030.4	48.3	-	-
Total	53			-	-

DF: Degrees of freedom; SS: Sum of squares; MS: Mean squares

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Lagoon environments are sensitive ecosystems due to their situation of interface between continental and marine environments and their proximity to anthropogenic activities. During environmental stress caused by presence of the pollutants, the biochemical responses are immediate in exposed organisms [31]. GST is involved in various operations of transport and biosynthesis intracellular [32]. This is one of the most solicited enzymes during a detoxification process of organisms subjected to pollution [33]. GST and AChE activity were found to vary between sites and by season. Indeed, the results obtained in this study showed an induction of GST in individuals collected from the both polluted sites 2 and 3, compared to reference site 1. This increase in GST activity suggests that the detoxification process against pro oxidation forces, which are mediated by this enzyme, is induced. In addition, the highest levels of GST activity were registered during the summer and also during the year 2013 in comparison to 2014. The climate of the study areas is Mediterranean, with an average annual temperature of 18 °C and an annual rainfall ranging from 650 to 1,000 mm with peak rainfall in winter and deficits occurring typically during summer [34]. Thus, the effect of seasons may be due to autumn rains which promote dilution of pollutants following water supply by the Rivers, while the year effect can be explained by a rainfall higher in 2013 in comparison to 2014. Similarly, in the mollusc *Cerastoderma glaucum*, a maximum of GST activity was recorded in summer and the

highest values were obtained from sites 2 and 3 by comparison to the site 1 [16]. Moreover, an induction in the GST activity was observed in several crustacean species such as *Palaemonetes argentinus* a exposed to fenitrothion [35], *Macrobrachium borelli* treated with organophosphorus insecticides [36] and also *Palaemon serratus* exposed to benzo a pyrene (BaP) [37]. Previous studies on the biomonitoring of health status of the Annaba gulf reported a highest GST activities in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from Sidi Salem as compared to El-Battah [17, 38-40].

Several works were focused on measurement of the enzymes activity involved in the degradation of some neurotransmitters such as AChE [41, 42]. Measurements of AChE activity provided information about exposure to contaminants such as pesticides [43,44] and other contaminants as heavy metals [45] or oils [46]. In the current study, the AChE activity in *P. adspersus* was inhibited in the individuals collected from sites 2 and 3 compared to the site 1. In addition, inhibition is higher in summer compared to the autumn and also in 2013 than 2014. This result suggests a contamination by neurotoxic pollutants such as heavy metals and/or pesticides. Indeed, a contamination of sites 2 and 3 by several heavy metals (iron, nickel and chromium) [47] support the inhibition of AChE activity observed in the clam *Ruditapes decussates* [48] and also our finding using *P. adspersus*. Similarly, an inhibition of AChE activity due to different effluents to the clam *R. decussatus* from the lagoon of Bizerte in Tunisia was also demonstrated [44]. Many studies revealed an inhibition of AChE activity in *P. argentinus* a

freshwater shrimp exposed to fenitrothion organophosphoree [35] and in the bivalve *Modiolus babatus* exposed to thermal stress [49] and *Scrobicularia plana* subjected to stress by metal nanoparticles [50]. There is also an inhibition of AChE activity in crabs *Carcinus maenas*, exposed to the fluoranthene [51] and in shrimp *M. borelli* contaminated with organophosphates [36]. Also, inhibition of AChE activity is due to neurotoxic insecticides and metal heavy was observed in the mussel *Dreissena polymorpha* collected from different contaminated sites from French coast [52] and among the clam *Ruditapes philippinarium* collected from different contaminated sites from Venice (Italy) [53].

Induction of GST and inhibition of AChE activities were higher in both sites 2 and 3 compared to the site 1 and it was higher in summer and during 2014 compared to 2013. Then, it can be concluded that site 2 and 3 were more polluted to site 1 as supported by heavy metal analysis. The most contaminated sites were located near the sources of the domestic and agricultural pollutants. In addition, season and annual effects were due to the water supply by de River during rainy that dilute the concentration of pollutants. Based on the biomaker responses, the shrimp *P. adspersus* is more suitable for the assessment of the health status of the Mellah lagoon than the mollusc *C. glaucum* [16].

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the National Fund for Scientific Research of Algeria (Laboratory of Applied Animal Biology to Pr. N. Soltani) and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (CNEPRU project, code: F 011201440046 to Dr. H. Berghiche).

REFERENCES

- [1] Basset, A., Elliott, M., West, R.J., and Wilson, J.G. (2013). Estuarine and lagoon biodiversity and their natural goods and services. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 132: 1-4.
- [2] Magni P., Draredja B., Melouah K., and Como S.. (2015). Patterns of seasonal variation in lagoonal macrozoobenthic assemblages (Mellah lagoon, Algeria). *Marine Environmental Research.* 109 :168-176.
- [3] Boudouresque, C.F., Bernard, G., Pergent, G., Shili, A. and Verlaque, M., 2009. Regression of Mediterranean seagrasses caused by natural processes and anthropogenic disturbances and stress: a critical review. *Bot. Mar.* 52, 395-418.
- [4] Depledge, M.H. and Galloway, T.S. (2005). Healthy animals, healthy ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment.* 3(5): 251-258.
- [5] Galloway, T.S. and Depledge, M.H. (2001). Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology.* 10: 5-23.
- [6] Trabelsi, S. and Dris M.R. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Mar Pollut Bull.* 50: 344-9.
- [7] Beldi, H., Gimbert, F., Maas, S., Scheifler, R. and Soltani, N. (2006). Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusk *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba, Algeria. *African Journal of Agricultural Research.* 1(3): 85-90.
- [8] Buffet, P.E., Tankoua, O.F., Pan, J.F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Bérard, J.B., Risso, C., Guibolini, M., Roméo, M., Reip, P., Valsami-Jones, E. and Mouneyrac, C. (2011). Behavioral and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* 84: 166–174.
- [9] Carriera, S., Costa, P.M., Martins, M., Lobo, J., Costa, M.H. and Caeiro, S. (2013). Ecotoxicological heterogeneity in transitional costal habitats assessed through the integration of biomarkers and sediment contamination profiles: a case study using a commercial clam. *Arch. Environ Contam Toxicol.* 64: 97-109.
- [10] Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fobbri, E. and Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutants introduced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 146 C: 281-300.
- [11] Lagadic L, Caquet T, Amiard J.C. and Ramade F. Use of biomarkers for environmental quality assessment, first ed. CRC Press, USA.2000.
- [12] Chambost-Manciet, Y. (2002). Ampleur et effets biologiques de la contamination métallique (Cd, Cu, Fe, PB et Zn) des sédiments en Mer du Nord. Utilisation de l'étoile de mer *Asterias rubens* (L.) comme bioindicateur et biomarqueur. Mémoire. Université Libre de Bruxelles.
- [13] Chaoui, L., Kara, M.H., Faure, E. and Quignard, J.P. (2006). L'ichtyofaune de la lagune du Mellah: diversité, production et analyse des captures commerciales. *Cybium* 30(2): 123-132.

- [14] Draredja, B., Melouah, K., Beldi, H. and Benmarce, S. (2012). Diversité De La Macrofaune Benthique De La Lagune Mellah (Parc National D'El-Kala, Algérie Nord-Est). *Bull. Soc. Zool. Fr.* 137(1-4): 73-86.
- [15] Melouah, K., Draredja, B. and Beldi H. (2014). Dynamique de la Coque *Cerastoderma Glaucum* (Mollusca, Bivalvia) Dans La Lagune Mellah (Algérie Nord-Est). *Revue Synthèse, Univ. Annaba. Rev. Sci. Technol.*, Synthèse. 28: 34-45.
- [16] Mebarki, R., Khebbeb, M.E.H. and Soltani, N. (2015). Biomonitoring of El Mellah Lagoon (Northeast, Algeria): Seasonal Variation of Biomarkers in *Cerastoderma glaucum* (Mollusc, Bivalvia). *JEZS* . 3(4): 408-413.
- [17] Abbas, A., Chouahda, S., and Soltani, N. (2003). Activité comparée de deux biomarqueurs du stress environnemental dans divers tissus chez deux espèces de bivalves pêchées dans la région d'Annaba. *Bull. Inst.* 8 : 123-126.
- [18] Bouzeraa, N, Abbas, A. and Soltani, N. (2004). Analyse des protéines chez trois espèces de bivalves vivants dans des milieux différents, la lagune d'El Mellah et le golfe d'Annaba. *Bull. INSTM, Salammbô* 9: 97-100.
- [19] Soltani, N. and Bezzazel, N. (2002). Profil des ecdystéroïdes hémolympatiques et corrélations avec la sécrétion cuticulaire au cours d'un cycle de mue chez la crevette, *Penaeus kerathurus*. *Journal de Recherche Océanographique.* 27(3-4), 226-231.
- [20] Soltani N, Amira A, Sifi K. & Beldi H. (2012). Environmental monitoring of the Annaba gulf (Algeria): measurement of biomarkers in *Donax trunculus* and metallic pollution. *Bull. Soc. zool. Fr.* 137(1-4): 47-56.
- [21] Derbal, F. and Soltani, N. (2008). Cycle cuticulaire et variations de la protéinémie et de la lipémie chez la crevette royale *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775) des côtes Est algériennes. *Science & Technologie* 28: 80-86.
- [22] Morsli, M.S. and Soltani, N. (2003). Effets d'un insecticide inhibiteur de la synthèse de la chitine, le diflubenzuron sur la cuticule de la crevette *Penaeus kerathurus*. *J. Rech. Oceanogr.* 28 (1/2): 85-88.
- [23] Soltani, N., Lechekhab, H. and Smagghe, G. (2009). Impact of insect growth regulator diflubenzuron on biochemical composition of cuticle of shrimp *Penaeus kerathurus*. *Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University*, 74/1: 137-141
- [24] Morsli, M. S., Merad, I., Khebbeb, M.E.H. and Soltani, N. (2015). Potential hazards of a chitin synthesis inhibitor diflubenzuron in the shrimp *Penaeus kerathurus*: biochemical composition of the hemolymph and muscle during the molt cycle. *Advances in Environmental Biology.* 9(3): 518-525.
- [25] Gheid, S., Nadji, S. and Khebbeb M.E.H. (2011). Taux des lipides et des protéines et composition en acides gras du tissu comestible des crustacés et des mollusques pêchés en Algérie: effet du halofenozide (RH-0345) sur la composition en acides gras de *Penaeus kerathurus* (Crustacé, Décapode). *Synthèse.* 22: 41-47.
- [26] ONDPA. (2005). Étude portant sur la connaissance des biomasses des lacs de la wilaya d'El-Tarf et établissement des règles de gestion halieutiques spécifique. Expertises et rapport pour le compte du ministère de pêche et ressources halieutiques 2005. Tome 1 et 2. 420 p.
- [27] Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jacobi, W.B. (1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- [28] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Abdres, V. and Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol. Physiol.* 38: 84-90.
- [29] Zaidi, N. and Soltani, N. (2013). Laboratory evaluation of environmental risk assessment of pesticides for mosquito control: toxicity of dimilin on a larvivorous fish, *Gambusia affinis*. *Advances in Environmental Biology.* 7(4): 605-613.
- [30] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 254-278.
- [31] David, E., Tanguy, A., Riso, R., Quiniou, L., Laroche, L. and Morago, D. (2012). Responses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* populations to abiotic stress environmentally contrasted estuaries along the Atlantic coast of France. *Aquatic toxicology.* 109: 70-79.
- [32] Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M. and Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme super family. *Biochem J.* (360):1-16.
- [33] Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, A., Mouneyrac, C., Budzinski, H. and Romeo, M. (2007). Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Environ. International.* 33: 27-33.
- [34] Debieche, T.H. (2002). Evolution de la qualité des eaux (salinité, azote et métaux lourds) sous l'effet de la pollution saline, agricole et industrielle - Application à la basse plaine de la Seybouse (Nord-Est Algérien). Thèse

- d'Etat, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Franche-Comté.
- [35] Lavarías, S & García, C.F. (2015). Acute toxicity of organophosphate fenitrothion on biomarkers in prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Palaemonidae). *Environ Monit Assess.* 187: 65.
- [36] Lavarías, S., García, C., Crespo, R., Pedrini, N. and Heras H. (2013). Study of biochemical biomarkers in freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to organophosphate fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 96: 10-16.
- [37] Silva, C., Oliveira, C., Gravato, C. and Almeida, J.R. (2013). Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo (a)pyrene in the common prawn *Palaemon serrates*. *Marine Environmental Research.* 90: 39- 46.
- [38] Sifi, K., Amira, A. and Soltani N. (2007). Mesure de deux biomarqueurs du stress oxydatif chez un mollusque bivalve (*Donax trunculus*) : corrélation avec la reproduction au niveau du golfe d'Annaba. 9^{ème} journées tunisiennes des sciences de la mer Tabarka (Tunisie) 15-18 décembre.
- [39] Amira, A., Sifi, K. and Soltani N. (2011). Mesure of environmental stress biomarkers in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the golf of Annaba (Algeria). *European Journal of Experimental Biology.* 1(2):7-16.
- [40] Bensouda, L. and Soltani-Mazouni, N. (2014). Measure of Oxidative Stress and Neurotoxicity Biomarkers in *Donax trunculus* from the Gulf of Annaba (Algeria): Case of the Year 2012. *Annual Research & Review in Biology* 2014. 4 (12): 1902-1914.
- [41] Sarkar, A., Holkar, P.K.R. and Patil, S.S. (2010). Application of Acetylcholinesterase Activity in Marine Organisms as a Biomarker of Coastal Pollution. *National Conference on Emerging Trends in Engineering, Technology and Management, MS2K.* 10: 383-386.
- [42] Barra, R., Notarianni, V. and Gentili, G. (2001). Biochemical biomarker responses and chlorinate compounds in the fish *Leuciscus cephalus* along a contaminant gradient in a polluted river. *Bulletin of Environ. Contam. and Toxicol.* 66: 582-590.
- [43] Oliveira, M.M., Silva, L., Filho, M.V., Fernandes, F.C. and Cunha Bastos, J. (2007). Brain Acetylcholinesterase as a Marine Pesticide Biomarker using Brazilian Fishes. *Marine Environmental Research.* 63: 303-309.
- [44] Kamel, N., Jebali, J., M Benkhedher, S., Chouba, L. and Boussetta, H. (2012). Biochemical response and metals levels in *Ruditapes decussatus* after exposure to treated municipal effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 82: 40-46.
- [45] Amiard-Triquet, C., Altamann, S., Amiard, J.C., Ballan-Dufrancais, C., Baumard, P., Budzinski, H., Crouzet, C., Guarrigue, J.P., His, E., Jeantet, A.Y., Menarsia, R., Mora P., Mouneyrac, C., Narbonne, J.F. and Pavillon, J.F. (1998). Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiologia.* 373/374: 259 - 279.
- [46] Tim-Tim, A.L.S., Morgado, S., Moreira, R., Rangel, A.J.A. Nogueira, A.M. Soares L. and Guilhermino, L. (2009). Cholinesterase and Glutathione S-transferase Activities of Three Mollusk Species from the NW Portuguese Coast in Relation to the Prestige Oil Spill. *Chemosphere* 77: 1465-1472.
- [47] Bendjama, A., Morakchi, K., Meradi, H., Boukari, A., Chouchane, T., Belaabed, B.E. and Djabri, L. (2011). Caractérisation des matériaux biologiques issus d'un écosystème naturel « pnek » situé au nord-est de l'Algérie. *J.Soc.Alger.Chim.* 21(1), 45-58.
- [48] Abbes, A., Soltani, N. and Djebar, A.B. (2006). Utilisation de l'acétylcholinestérase chez la palourde *Ruditapes decussatus* dans la surveillance d'un système lagunaire El Mellah Algérie. 2^{ème} Colloque Euro-méditerranéen de Biologie Environnementale, Marseille (France), 7-9 décembre 2006, (2) : 22.
- [49] Dimitriadis, V.K, Gougoula, C., Anestis, A., Pörtner, H.O. and Michaelidis, B. (2012). Monitoring the biochemical and cellular responses of marine bivalves during thermal stress by using biomarkers, *Marine Environmental Research.* 73: 70-77.
- [50] Fossi- Tankoua O., Buffet, P.E., Amiard, J.C, Berthet, B., Mouneyrac, C. and Amiard-Triquet, C. (2013). Integrated assessment to estuarine sediment quality based on a multi-biomarker approach in the bivalve *Scobicularioplana*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88: 117-125.
- [51] Rodrigues, A.P, Lehtonen, K.K., Guilhermino, M. and Guimarães, L. (2013). Exposure of *Carcinus maenas* to waterborne fluoranthene: Accumulation and multi-biomarker responses *Science of the Total Environment.* 443: 454-463.
- [52] Palais, F., Dedourge-Geffard, O., Beaudon, A., Pain-Devin, S., Trapp, J., Geffard, O. Noury, P., Gourlay-France, C., Uher, E., Mouneyrac, C., Biagianti-Risbourg, S. and Geffard, A. (2012). One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology.* 21: 888-905.



- [53] Matozzo V, Binelli, A, Parolini M, Previato M, Masiero L, Finos L. and Brassan, H.N. (2012). Inventaire du patrimoine naturel. Muséum d'Histoire Naturelle de France. <http://inpn.mnhn.fr/isb/servlet/ISBServlet>.

Received: 28.10.2015

Accepted: 03.05.16

CORRESPONDING AUTHOR

Hinda Berghiche

Ecotoxicology Group

Laboratory of Applied Animal Biology,

Department of Biology, Faculty of Sciences

Badji Mokhtar University, 23000 Annaba, Algeria

e-mail: hindabentoubal@hotmail.ca



E-ISSN: 2320-7078
P-ISSN: 2349-6800
JEZS 2016; 4(2): 147-151
© 2016 JEZS
Received: 01-01-2016
Accepted: 02-02-2016

Hinda berghiche
Laboratory of Applied Animal
Biology, Department of Biology,
Faculty of Science University of
Annaba, 23000 Annaba, Algeria

Hamida Benradia
Laboratory of Applied Animal
Biology, Department of Biology,
Faculty of Science University of
Annaba, 23000 Annaba, Algeria.

Noureddine Soltani
Laboratory of Applied Animal
Biology, Department of Biology,
Faculty of Science University of
Annaba, 23000 Annaba, Algeria.

Impact of insect growth disruptor, novaluron, on biochemical composition of cuticle from the shrimp *Palaemon adspersus*

Hinda berghiche, Hamida Benradia, Noureddine Soltani

Abstract

novaluron (20% Wettable Powder), is a recently developed benzoylurea insecticide which is considered as chitin synthesis inhibitor with excellent activity against mosquito larvae. The current study aimed to evaluate under laboratory conditions the potential side-effects of novaluron on non-target shrimp, *Palaemon adspersus* Rathke, 1837 (Decapoda, Palaemonidae). The compound was tested at two concentrations (0.91 µg/L and 4.30 µg/L) corresponding respectively to LC₅₀ and LC₉₀ determined against fourth-instar larvae of *Culiseta longiareolata* (Diptera, Culicidae). Novaluron was added to the rearing seawater of newly-ecdysed adult shrimps of *P. adspersus* and exposed for 15 days, i.e. until stage D during the molting cycle. The weight of cuticles and their biochemical composition (chitin, proteins) were measured in peripheral integument by a gravimetric method. Under normal conditions, the weight of cuticle increase significantly during the period from the stage A until the stage D. Novaluron-treatment was found to reduce the weight of cuticle at the stage B, C and D. The chitin percentage, increase from stage A to stage C followed by a decrease at stage D. Exposition of shrimps to novaluron resulted in a significant decrease of values at all molting stages with a dose-dependent manner. Lastly, the percentage of cuticular protein showed a decrease from stage B to stage D in controls. Novaluron can cause a significant increase in cuticular proteins. Therefore, the overall data confirm the primary mode of action of novaluron to inhibit chitin biosynthesis.

Keywords: Cuticle, chitin, protein, Novaluron, *Palaemon adspersus*.

Introduction

The use of pesticides in agriculture is the most widespread method for pest control [1]. However, the intensive utilisation of neurotoxin insecticides becomes environmentally hostile and ecologically hazardous [2]. So, in this context, search for new insect-selective insecticides with minimal ecotoxicological risks is relevant. Insect growth disruptors (IGDs) seem promising because of their specific mode of action on insect and their lower toxicity against non-target organisms than conventional insecticides [3, 4]. On the basis of the mode of action, these compounds can be grouped on the substances that interfere with the action of insect hormones (i.e. juvenile hormones, ecdysteroids) and chitin synthesis inhibitors (i.e. of cuticle formation). The prototype of a benzoylurea insecticide is diflubenzuron, which was developed as a commercial insecticide in the early 1970s. In the following years, many derivatives with insecticidal activities enhanced have been successfully established such as triflumuron [5], chlorfluazuron [6], teflubenzuron [7], hexaflumuron [8], flufenoxuron [9], lufenuron [10] and more recently, novaluron [11]. Novaluron is a new derivative of the benzoylurea class which is considered as a chitin synthesis inhibitors [12], with excellent activity against several important insect pests with a high toxicity level and effectiveness against several mosquito larvae as, *Culiseta longiareolata*, [13] *Aedes aegypti* [14] and *Culex pipiens* [15]. The US Environmental Protection Agency (EPA) and Canadian Pest Management Regulatory Agency (PMRA) designed novaluron a "reduced-risk/organophosphorus alternative" as it exhibit low acute mammalian toxicity and no significant subchronic effects in mammals [16-19]. According to these agencies, novaluron was considered a low risk to the environment and non target organisms. Use of novaluron can contaminate rivers which diverse their pollutants into the lakes of El- kala and the Annaba gulf (Northeast Algeria). Thus, in the present study, we examine the impact of novaluron on a non-target organism, shrimp *Palaemon adspersus* Rathke, 1837 (Decapoda, Palaemonidae) abundant in the lagoon El-Mellah (Northeast Algeria) and a relatively important species for the

Correspondence
Hinda berghiche
Laboratory of Applied Animal
Biology, Department of Biology,
Faculty of Science University of
Annaba, 23000 Annaba, Algeria

local fishery industry. Novaluron was added to the rearing seawater of newly-ecdysed adult shrimps during a molt cycle. The effects of this compound were examined on the weight and biochemical composition of cuticle (chitin, proteins).

Materials and Methods

Collection and rearing of shrimps

P. adspersus Rathke, 1837 (Decapoda, Palaemonidae) were collected from the lagoon El-Mellah (Northeast Algeria), in the constriction zone of the channel that leads to the Mediterranean Sea (Fig. 1). This site is far from any source of

pollution and expected as a relatively clean site away from pollution sources [20, 21]. Shrimps were transported to the laboratory alive and reared in laboratory conditions by maintaining them in glass aquaria (100 x 60 x 80 cm) filled with sea water (salinity 37 psu; temperature 22-25 °C; photoperiod 14 h of light). Filtration is performed by water filter having a flow rate of 180 l/h (Rena 225). The animals were daily fed with fresh mussels distributed in the afternoon. Prior to exposure, shrimps were acclimated to laboratory conditions for a week. Shrimps with of similar size (length: 25 mm and weight: 850 mg) were used in the experiment.

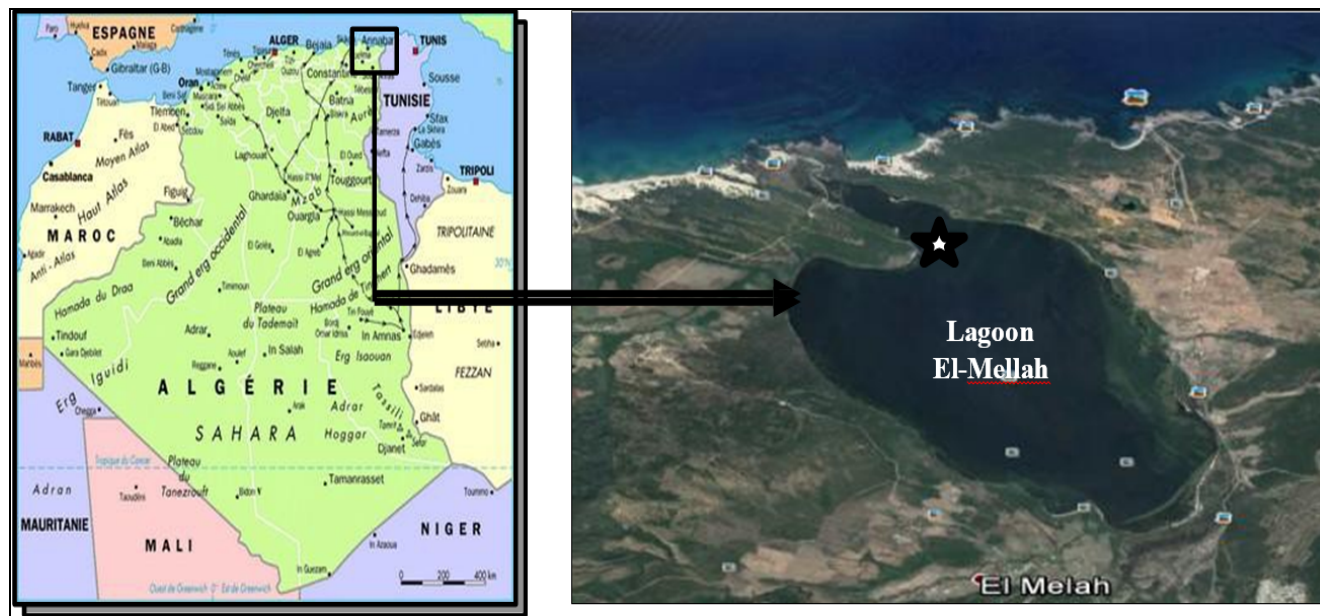


Fig 1: Geographical location of the sampling sites of lagoon El Mellah, El-Kala (Northeast Algeria). *: constriction zone of the channel with Mediterranean, (www.Google Earth.com).

Shrimp datation

P. adspersus is a Decapod Palemonides a common shrimp in Norwegian coast and South of the Baltic Sea to the Mediterranean. This species is clear with no lines or bands, excepting presence of dark chromatophores on the half ventral rostrum. Shrimps were fished by the seine net (mesh: 4 mm; length: 1.80 m). The moult cycle is divided into five stages: A (early postmolt), B (late postmolt), C (intermolt) and D (pre-molt) and moulting (E). The datation was made according to the method of [22], based on morphogenesis at the uropod. This method is simple, fast and efficient. Under these conditions, *P. adspersus* has a molt cycle of 20 days with 20% for A+B, 25% for C, and 65% for D.

Insecticide and treatment

Novaluron (wetttable powder 20% active ingredient), was kindly provided by Pr. G. Smagghe (Ghent University, Belgium) (Fig. 2). The compound was added to the rearing sea water at two final concentrations (0.91 µg/L and 4.30 mg/L) corresponding respectively to the LC₅₀ and LC₉₀ obtained with respect to the fourth-stage larvae *Culiseta longiareolata* (Diptera, Culicidae) [13]. Newly-ecdysed adult shrimps (0-8 h old) were exposed continuously to treatment. Control shrimps were reared in sea water only. Samples (cephalothorax) were collected from each shrimp at different stages of molt cycle (A, B, C, and D) in control and treated series.

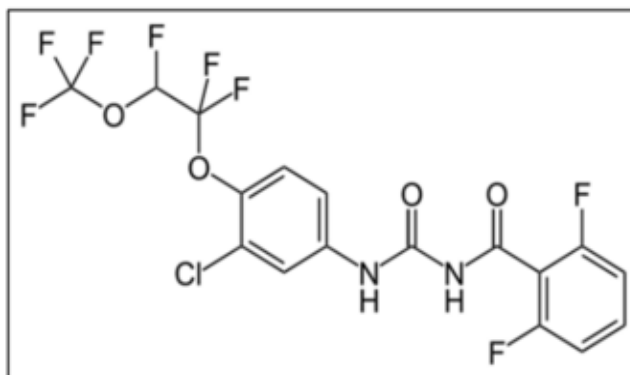


Fig 2: Molecular structure of novaluron

Biochemical procedure

The biochemical composition of cuticle was determined in peripheral integument at different stages during the molting cycle. The percentage of chitin and cuticular proteins were performed following the procedure of [23]. Samples were washed and dried at 60 °C to constant weight and decalcified by means of 10% TCA. The decalcified cuticle was extracted in 2 N NaOH at 110 °C for 3-4 h. The colourless residues were washed in distilled water and dried at 60 °C to constant weight. The weight loss was supposed to be due to removal of proteins, and the residue to be chitin.

Statistical analysis

Results were represented as mean \pm standard deviation (SD). The statistical analyses were performed using the Prism software version 6.01 for Windows (GraphPad Software Inc., www.graphpad.com). The homogeneity of variances was checked by Bartlett's test. Data were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc HSD Tukey test.

Results

Effect on the cuticular weight

In control series, the cuticular weight of *P. adspersus* increased progressively during the period from the stage A (5.1 \pm 0.69 mg) until the stage D (7.29 \pm 0.26 mg) at the end of the cycle (Table 1). Treatment with novaluron at the two tested concentrations (LC₅₀ and LC₉₀), reduced very significantly ($p \leq 0.01$) weight of cuticle at all stages as compared to controls. ANOVA indicated significant effects of concentration (F 2, 36 = 16.55; $P < 0.0001$) and stage (F 3, 36 = 28.77; $P < 0.0001$) and interaction stage/treatment (F6, 36 = 1.67; $P = 1569$).

Table 1: Effect of novaluron (LC₅₀ = 0.91 μ g/l and LC₉₀ = 4.30 μ g/l) on the cuticular weight (mg) of *P. adspersus* during the molt cycle in control and treated series (mean \pm SD, n = 4-5).

Stages	Control	Novaluron (LC ₅₀)	Novaluron (LC ₉₀)
A	5.1 \pm 0.69 a A	5.15 \pm 0.35 a A	4.81 \pm 0.31 a A
B	6.17 \pm 0.39 a B	5.54 \pm 0.56 a A	5.19 \pm 0.26 b A
C	7.11 \pm 0.57 a C	6.66 \pm 0.56 ab B	5.8 \pm 0.38 b AB
D	7.29 \pm 0.26 a C	6.58 \pm 0.06 ab B	6.07 \pm 0.41 b B

Different capital letters indicate a significant difference between stages of the same series; different small letters indicate a significant difference between control and treated series of the same stage ($p > 0.05$).

Effect on the percentage of chitin

Under normal conditions, the percentage of chitin showed a progressive increase from stage A (44.09 \pm 2.12%) until stage C to reach a maximum of 58.33 \pm 1.19% and decreased at stage D (45.13 \pm 3.18%) compared to the stage C. Novaluron treatment (LC₅₀ and LC₉₀) resulted in a significant ($p \leq 0.01$) decrease in the percentage of chitin with a dose-response relationship comparatively to controls. The percentage recorded at stage C was 52.97 \pm 2.94% with novaluron at the LC₅₀ and 43.09 \pm 1.80% with the LC₉₀ as compared to the controls (Table 2). ANOVA showed significant effects of concentration (F 2, 41 = 43.41; $P < 0.0001$), stage (F 3, 41 = 53.11; $P < 0.0001$) and interaction concentration/stage (F6, 41 = 5.63; $P = 0,0002$).

Table 2: Effect of novaluron (LC₅₀ = 0.91 μ g/l and LC₉₀ = 4.30 μ g/l) on the percentage (%) of chitin in the cuticle of *P. adspersus* during the molt cycle in control and treated series (mean \pm SD, n = 4-5).

Stages	Control	Novaluron (CL ₅₀)	Novaluron (CL ₉₀)
A	44.09 \pm 2.12 a A	42.04 \pm 1.30 a A	35.34 \pm 5.46 b A
B	45.07 \pm 0.93 a A	35.61 \pm 3.30 b B	37.61 \pm 6.10 b A
C	58.33 \pm 1.19 a B	52.97 \pm 2.94 b C	43.09 \pm 1.80 c B
D	49.13 \pm 3.18 a A	45.13 \pm 3.18 a B	33.64 \pm 3.77 b A

Different capital letters indicate a significant difference between stages of the same series; different small letters indicate a significant difference between control and treated series of the same stage ($p > 0.05$).

Effect on cuticular proteins

In control series, the highest percentage of cuticular proteins were observed at stage A (60,54 \pm 4,26%). Then they decrease at the three stages of the molt cycle, B (54,92 \pm 0,93%), C (41.25 \pm 1.28%) and D (49,02 \pm 3,67%). In treated series by novaluron at the two tested concentrations (LC₅₀ and LC₉₀), presented a significant increase ($p < 0.01$) at stages B, C and D as compared to control series. The values recorded at the end of the cycle were in order of 52,87 \pm 1,69% and 66,35 \pm 3,77% with LC₅₀ and LC₉₀, respectively (Table 3). In addition, ANOVA revealed a significant effects of concentration (F 2, 38 = 635.7; $P < 0.0001$), stage (F 3, 38 = 545.6; $P < 0.0001$) and interaction concentration /stage (F6, 38 = 14.67, $P = 0.1237$).

Table 3: Effect of novaluron (LC₅₀ = 0.91 μ g/l and LC₉₀ = 4.30 μ g/l) on the percentage (%) of cuticular protein in the cuticle of *P. adspersus* during the molt cycle in control and treated series (mean \pm SD, n = 4-5).

Stages	Control	Novaluron (LC ₅₀)	Novaluron (LC ₉₀)
A	60,54 \pm 4,26 a A	63,37 \pm 2,79 a A	73,12 \pm 0,78 b A
B	54,92 \pm 0,93 a AC	57,41 \pm 3,84 a B	62,38 \pm 6,10 b B
C	41,25 \pm 1,28 a B	48,93 \pm 1,13 b C	56,28 \pm 1,09 c C
D	49,02 \pm 3,67 a C	52,87 \pm 1,69 a CB	66,35 \pm 3,77 b B

Different capital letters indicate a significant difference between stages of the same series; different small letters indicate a significant difference between control and treated series of the same stage ($p > 0.05$).

Discussion

Chitin a polymer of *N*-acetyl-D-glucosamine, contribute considerably to barrier and shaping function of exoskeletons or cuticle which is an extracellular matrix covering the animal [24]. It constitutes up to 40% of the exuvial dry mass depending on the species and varies considerably with the different cuticle types even in a single organism [25]. In this current study, weight and biochemical composition of cuticle in *P. adspersus* adults were determined by the gravimetric method during a molting cycle. In control individuals weight increased progressively during the period from the stage A until the stage D, at the end of the cycle. While, the chitin percentage showed a progressive increase from stage A until stage C to reach a maximum and decreased at stage D. These variations are correlated with the apolysis, the secretion of the new cuticle and the digestion of the old cuticle [26]. So according to [27] the chitin content varied between 66 and 72% during molting cycle in shrimp *P. kerathurus*. The same authors reported an incorporation of two precursors, D-[3-3H(N)]-glucose and N-acetyl- D-[1-3H]-glucosamine (NAGA) in the postmolt (stage A and B) leading to the secretion of endocuticle, followed by a decrease at the intermolt (stage C) (where the secretion of cuticle is complete) and the least content of incorporation of the two precursors is noted in premolt (stage D) where exocuticle secretion is completed. Novaluron-treatment increased significantly the percentage of chitin with a dose-response effect probably by inhibit of the incorporation of sugars into the growing chitin chain. In addition, the modification of the produced cuticle could be explained by the decrease in the chitin and thereby the weight of cuticle. This is in accordance with a previous report made with diflubenzuron, another chitin synthesis inhibitor on *P. kerathurus* [28, 29] and several benzoylurea derivatives which interfere with the molting process by disrupting secretion

cuticular, *via* the synthesis of chitin [3, 30]. The effectiveness of novaluron was demonstrated by several studies in respect of several species [31, 32]. Indeed, this insecticide is very effective against mosquito larvae such as *C. longiareolata* [13], *A. aegypti* [14] and *C. pipiens* [15].

Cuticular proteins are suggested to be involved in the calcification process [33] and in chitin binding in crustacean exoskeleton. The evolution of cuticular proteins in control series of *P. adspersus*, showed a significant decrease at all stages of the molt cycle. [23] Found that the *Astacus fluviatilis* shell consists of 30% of cuticular proteins and 35.3% in *Penaeus duorum*. The cuticular protein content is much more important after a recent exuviation than the intermolt stage [27]. The results for the Novaluron-effect on cuticular proteins reveal a significant increase at stages B, until stage D as compared to control series. Also [29] reported that diflubenzuron, showed an increase in the amount of cuticular proteins on *P. kerathurus*. Variations in the cuticular weight, chitin and proteins during the molting cycle of *P. adspersus* were modified by novaluron. Thus, the biochemical composition of their cuticle, the crustaceans can be the potential targets of these benzoylurea derivatives.

Conclusion

In current study, *P. adspersus* present a significant variation in the biochemical composition of cuticle during the molt cycle. Novaluron-treatment resulted in biochemical modification of the produced cuticle as evidenced by a decrease in the chitin and thereby the weight of cuticle. Therefore, novaluron caused side-effects on the non target organism the shrimp *P. adspersus*. These effects could be explained by different modes of action, such as a blockage of transport and incorporation of the precursor biosynthetic chitin, N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), or by direct inhibition of chitin synthesis. However, these mechanisms of action remain to be clarified.

Acknowledgements

This research was supported by the National Fund for Scientific Research of Algeria (Laboratory of Applied Animal Biology to Pr. N. Soltani), by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (CNEPRU project D01N01UN23012014114 to Dr. H. Berghiche. Authors are grateful to Pr. G. Smagghe (Ghent University, Belgium) for the sample of novaluron.

References

- Casida JE, Quistad GB. Annual Review of Entomology 1998; 43:1-16.
- Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdisciplinary Toxicology 2009; 2(1):1-12.
- Dhadialla TS, Retnakaran A, Smagghe G. Insect growth and development disturbing insecticides. In: Gilber, L.I., Gill, S.S. (Eds). Insect Control: Elsevier, 2010, 121-184.
- Pener MP, Dhadialla TS. An Overview of Insect Growth Disruptors; Applied Aspect. Advances in Insect Physiology, ISBN 978-0-12-391500-9, 2012, 43.
- Hamman I, Sirrenberg W. Laboratory evaluation of SIR 8514, a new chitin synthesis inhibitor of the benzoylated urea class. Pflanzenschutz-Nachr Bayer 1980; 33:1-34.
- Haga T, Tobi T, Koyanagi T, Nishiyama R. Structure activity relation nships of a series of benzoylpyridyloxyphenyl- urea derivatives. In 5th International Congress of Pesticide Chemistry (IUPAC). Kyoto, 1982, 7.
- Becher HM, Becker P, Prokic-Immel R, Wirtz W. CME-134, a new chitin synthesis inhibiting insecticide. Proceeding of 10th International Congress of Plant Protection 1983; 1:408-415.
- Sbragia RJ, Bishabri-Ershadi B, Risterink RH, Clifford DP, Dutton R. XRD-473, a new acylurea insecticide effective against Heliothis. Proceedings of British Crop Protection Conference on Pests and Diseases. Brighton, UK 1983; 1:417-424.
- Anderson M, Fisher JP, Robinson J. Flufenoxuron-an acylurea acaricide/insecticide with novel properties. Proceedings of British Crop Protection Conference on Pests and Diseases. Brighton, UK, 1986, 89-96.
- Hink WF, Drought DC, Barnet S. Effect of an experimental systemic compound, CGA- 184699, on life stage of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). Journal of Medecine and Entomology. 1991; 28:424-427.
- Ishaaya I, Yablonski S, Mendelson Z, Mansour Y, Horowitz AR. Novaluron (MCW-275), a novel benzoylphenyl urea, suppressing developing stages of lepidopteran, whitefly and leafminer pests. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases 1996; 3:1013-1020.
- Merzendorfer H. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. Insect Sciences 2013; 20:121-138.
- Bouaziz A, Boudjelida H, Soltani N. Toxicity and perturbation of the metabolite contents by a chitin synthesis inhibitor in the mosquito larvae of *Culiseta longiareolata*. Annals Biology Researches 2011; 2(3):134-142.
- Farnesi LC, Brito JM, Linss JG, Pelajo-Machado M, Valle D, Rezende GL. Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the chitin synthesis inhibitor Novaluron. Plos One 2012; 7:e30363.
- Djeghader NEH, Boudjelida H, Bouaziz A, Soltani N. Biological effects of a benzoylphenylurea derivative (Novaluron) on larvae of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Advances in Applied Science Researches. 2013; 4(4):449-456.
- EPA. Novaluron Pesticide Fact Sheet, US EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 2001, 4.
- FAO. Novaluron FAO specifications and evaluations of plants production protect. Food and Agriculture Organization of United Nations, 2003, 29.
- FAO/WHO. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, 20-29 September; Geneva, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, 2005, 360.
- PMRA. Proposed Registration Decision- Novaluron, Health Canada's Pest Management Regulatory Agency, Report No. PRD2006-05, 2006, 108.
- Bendjama A, Morakchi K, Meradi H, Boukari A, Chouchane T, Belaabed BE *et al.* Caracterisation des materiaux biologiques issus d'un ecosysteme naturel « pnek » situe au nord-est de l'algerie. Journal of Society Alger Chimie. 2011; 21(1):45-58.
- Mebarki R, Khebbab MEH, Soltani N. Biomonitoring of El Mellah Lagoon (Northeast, Algeria): Seasonal Variation of Biomarkers in *Cerastoderma glaucum* (Mollusc, Bivalvia). Journal of Entomology and Zoologie Studies. 2015; 3(4):408-413.
- Robertson NL, Bray W, Leung-Trujillo J, Lawrence A. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus*

- stylirostris. Journal of the World Aquaculture Society. 1987; 18(3):180-185.
23. Wilinder BS. The crustacean cuticle. Studies on the composition of the cuticle. Comparative Biochemistry and Physiology 1974; 47(A):779-787.
 24. Prabu K, Natarajan E. Bioprospecting of shells of crustaceans. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2012; 4(4):1-3.
 25. Van Leeuwen T, Demaeght P, Osborne EJ, Dermauw W, Gohlke S, Nauen R. Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2012; 1094:407-4412.
 26. Derbal F, Soltani N. Cycle cuticulaire et variation de la protéinémie et de la lipémie chez la crevette royale *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775) des côtes Est Algériennes. Science & Technologie 2008; C28:80-86.
 27. Morsli SM, Soltani N. Effet d'un insecticide inhibiteur de la synthèse de la chitine, le diflubenzuron sur la cuticule de la crevette *Penaeus kerathurus* Effect of an inhibitory insecticide of the synthesis of chitin, diflubenzuron on the cuticle of the shrimp *Penaeus kerathurus*. Journal of recherches oceanology French. 2003; 28(1/2):85-88.
 28. Morsli MS, Merad I, Khebbeb MEH, Soltani N. Potential hazards of a chitin synthesis inhibitor diflubenzuron in the shrimp *Penaeus kerathurus*: biochemical composition of the hemolymph and muscle during the molt cycle. Advance in Environment and Biology. 2015; 9(3):518-525.
 29. Soltani N, Lechekhab HG, Smagghe G. Impact of the insect growth regulator diflubenzuron on biochemical composition of cuticle of the shrimp *Penaeus kerathurus*. Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University 2009; 74/1:137-141.
 30. Salokhe SG, Deshpande SG, Pakhle K, Maniyare AB. IGR, Lufenuron, alters chitin and total soluble protein content of *Aedes aegypti* larvae during development of *Aedes aegypti*. CURRENT Sciences 2013; 99(9):1256-59.
 31. Nwankwo EN, Okonkwo NJ, Okafor EG. Comparative studies on the larvicidal action of Novaluron (Mosquiron 100 EC) and Moringa oliefera Seed Oil against *Aedes Aegypti*. International multi-disciplinary Journal Ethiopia. 2011; 5(1):424-437.
 32. Fontoura NG, Bellinato DF, Valle D, Lima JB. The efficacy of chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate resistant *Aedes aegypti* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz *Print version* ISSN 0074-0276 2012; 107:3.
 33. Andersen SO. Exoskeletal proteins from the crab, *Cancer pagurus*. Comparative Biochemistry and Physiology 1999; 123A:203-211.