



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

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité: Biologie
Option : Santé Environnementale
Intitulé

**Evaluation de la toxicité à court terme générée par une
pollution mixte « Pesticides/ Métaux lourds » sur un
modèle unicellulaire alternatif : *Paramecium sp.***

Présentée par : Mme. BENLAIFA Meryem

Membres de Jury:

| | | | |
|----------------------|------------|--------------------|-----------------------|
| OUALI Kheireddine | Professeur | Président | Université de Annaba |
| DJEBAR Med - Réda | Professeur | Directeur de thèse | Université de Annaba |
| KHEBBEB Med El Hadi | Professeur | Examineur | Université de Annaba |
| BOUCHELAGHEM Sabrina | MCA | Examinatrice | Université d'El Taref |

Année universitaire: 2016/2017

Remerciements

Je remercie Dieu de m'avoir donné la force, le courage, la patience et un peu de sa grande sagesse pour être ce que je suis aujourd'hui.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au **Professeur DJEBAR Mohammed Reda** qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ces nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de recherche.

Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) et pour votre confiance en mes compétences scientifiques et humaines.

J'aimerais aussi adresser mes plus sincères gratitude au **Professeur BERREBBAH Houria** pour sa disponibilité, sa grande patience, pour son affection et toutes les corrections qu'elle a bien voulu apporter à ce travail.

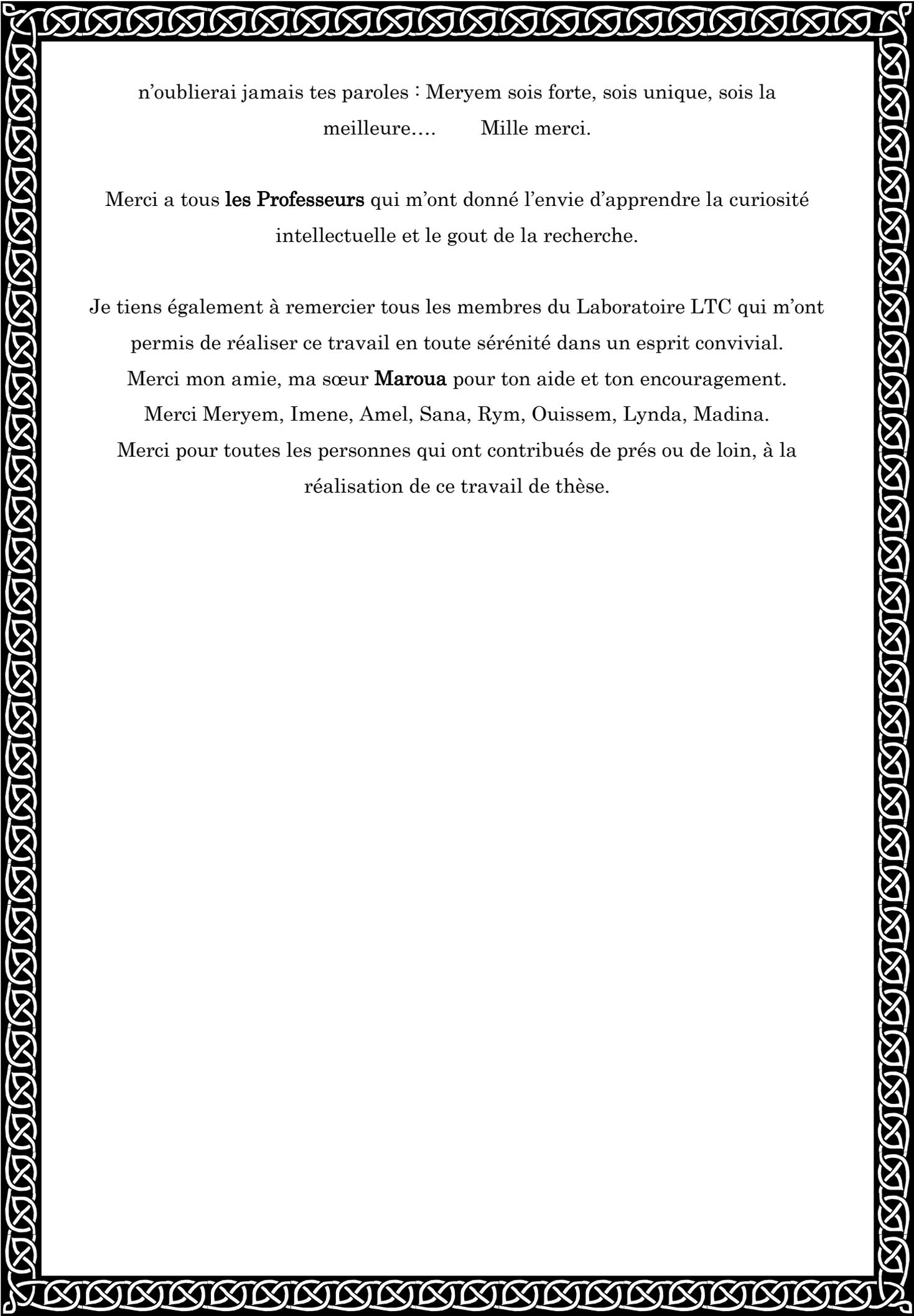
Merci du fond du cœur.

Je remercie vivement le Professeur **OUALI Khairedine** pour avoir accepté de présider ce jury et de m'avoir donné la chance de présenter ce travail.

Ces mêmes remerciements s'adressent au Professeur **KHEBBAB Mohammed EL Haddi** pour avoir accepté d'examiner ce travail et faire partie de ce jury.

J'exprime aussi toute ma gratitude à Mme **BOUCLAGHEM Sabrina** Maître de Conférence de l'Université d'El Taref d'avoir accepté d'examiner ce travail et faire partie de ce jury.

Un très grand merci à une personne exceptionnelle et très généreuse ma tante Docteur **BERREDJEM Hadjira** Maître de Conférence à l'Université de Annaba, pour son soutien, son aide, son conseil, sa patience et son encouragement. Je



n'oublierai jamais tes paroles : Meryem sois forte, sois unique, sois la
meilleure.... Mille merci.

Merci a tous **les Professeurs** qui m'ont donné l'envie d'apprendre la curiosité
intellectuelle et le gout de la recherche.

Je tiens également à remercier tous les membres du Laboratoire LTC qui m'ont
permis de réaliser ce travail en toute sérénité dans un esprit convivial.

Merci mon amie, ma sœur **Maroua** pour ton aide et ton encouragement.

Merci Meryem, Imene, Amel, Sana, Rym, Ouissem, Lynda, Madina.

Merci pour toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin, à la
réalisation de ce travail de thèse.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mon grand père et à mes très chers parents à qui je dois tous, je vous aime énormément.

A ma jolie sœur Amina que je ne pourrais jamais vivre sans elle

A mon mari Jamel, Sans ton aide, ta grande patience, ta compréhension, ton soutien et ton amour je n'aurais pu mener ce travail à bien.

A mes tantes chéries Wahida, Hajira, Karouma, Hassiba et souad

A mes petites cousines princesses Maroua, Hanene et Lilou

A ma belle famille qui m'a tant soutenu Tata Farida, Tonton Hamid, Janet et Reda

A toute la famille BENLAIFA, BERREDJEM et HOUAMRI

La sagesse c'est d'avoir des rêves suffisamment grands pour ne pas les perdre de vue lorsqu'on les poursuit

« Oscar wilde »

Résumé

L'objectif de notre travail est l'étude des modifications physiologiques et biochimiques observées chez un protiste cilié *Paramecium sp.* Soumis à un fongicide, le Mandipropamide, à un métal lourd le Cadmium et à leur combinaison.

Les résultats obtenus mettent en évidence une toxicité des deux composés ainsi que leur combinaison, exprimée par l'inhibition de la croissance cellulaire, la perturbation du métabolisme biochimique dont entre autre l'augmentation des taux de protéines totales. Parallèlement nous avons noté une diminution de la consommation de l'oxygène pour les cellules traitées par rapport aux cellules témoins.

Parallèlement le suivi des biomarqueurs révèle d'importantes fluctuations doses dépendantes pour les deux molécules ainsi que leur combinaison, ces fluctuations sont mises en évidence par une induction des activités enzymatiques CAT et GST, une diminution du taux de GSH et de l'activité AchE.

En conclusion, ces données indiquent clairement la mise en évidence d'un stress oxydatif. Le suivi de l'état redox cellulaire montre une augmentation des Espèces Réactives à l'Oxygène (ROMs), et une stimulation du Potentiel Antioxydant Biologique (BAPs), indiquant le caractère temporaire du stress oxydatif induit par les deux xénobiotiques et leur combinaison.

Mots clés : *Paramecium sp.*, Mandipropamide, Cadmium, Combinaison, Mixture, Cytotoxicité, Stress Oxydatif, Biomarqueurs.

Abstract

The main objective of our work is a study of physiological and biochemical modification showed on a cellular model, a ciliar protists *Paramecium sp.* By fungicide Mandipropamid, heavy metal Cadmium and their mixture.

The results show a sustained toxicity of the two compounds and their mixture by the inhibition of growth, we have also showed a disturbance of biochemical metabolisms through the alternation of the total protein, similarly, we reported induction of respiratory metabolism supported by a decrease in oxygen consumption.

On another level monitoring biomarkers showed significant dose-dependent fluctuations in the two molecules and their mixture, which are expressed by induction of CAT activity and GST, a decrease in GSH and AchE activity.

Our results indicate clearly an occurrence of oxidative stress, however, the condition of cellular redox state characterized by the increase of the levels of Reactive Oxygen Metabolite (ROMs) counterbalanced by a stimulation of Biological Antioxidant Potential (BAPs) and antioxidant defense system, can be defined this stress as « passive oxidative stress ».

Key words : *Paramecium sp.*, Mandipropamid, Cadmium, mixture, cytotoxicity, oxidative stress, biomarkers.

ملخص

ان مشكلة التلوث ليست ظاهرة او صدفة انما تعد من اقدم الظواهر الناتجة عن الفضلات و القدرة على تشويهِ المناظر الطبيعية تلويث المحيط و التأثير على صحة الانسان.

ان بحثنا هذا يقوم على دراسة الاثر السمي للكادميوم و مييد الفطريات المونديبروباميد و للمزيج معا على نموذج بيولوجي و المتمثل في كائن احادي الخلية برامسيوم.

النتائج المتحصل عليها تظهر سمية المركبين المتمثلة في تثبيط النمو التركيزات المثبطة المحسوبة تعكس خلال ني عملية الايض الكيميائي من خلال عرقلة البروتين الكلي موازاة داك لاحظنا نقص في عملية التنفس.

اكنت دراسة المؤشرات الحيوية وجود تغيرات هامة في النشاط الانزيمي و المتمثلة في زيادة و نقصان ني معدل كمية الاكسجين المستهلكة من طرف الخلايا المعرضة للمواد السامة.

كما ابرزت هذه الدراسة حالة اكسدة و ارجاع و ارتفاع خلوي للكادميوم البروباميد و للمزيج.

الكلمات المفتاح

برامسيوم. كادميوم. مونديبروباميد. المزيج. التسمم, المؤشرات الحيوية, الاجهاد التاكسدي.

SOMMAIRE

Chapitre I : Introduction générale

| | |
|---|----|
| 1. Classification des pesticides | 5 |
| 2. Devenir des pesticides dans l'environnement | 7 |
| 3. Toxicité et génotoxicité des pesticides | 7 |
| 4. Caractéristiques des métaux lourds | 8 |
| 5. Sources des métaux lourds dans l'environnement | 9 |
| 6. La bioaccumulation des métaux lourds | 10 |
| 7. Toxicité des métaux lourds | 11 |
| 8. Effet du cadmium sur les microorganismes | 11 |
| 9. Toxicité du cadmium | 11 |
| 10. Radicaux libres et stress oxydatif | 12 |
| 11. Système de défense antioxydants | 13 |

Chapitre II : Matériel et Méthodes

| | |
|---|----|
| 1. Matériel biologique | 15 |
| 2. Matériel chimique | 16 |
| 3. Méthodes | 18 |
| 3.1. Culture des paramécies | 18 |
| 3.2. Traitement des paramécies | 18 |
| 3.3. Cinétique de la croissance cellulaire | 19 |
| 3.4. Calcul du pourcentage de réponse | 19 |
| 3.5. Méthode de dosage des métabolites biochimiques | 20 |
| 3.5.1. Dosage des protéines totales | 20 |
| 3.6. Etude du métabolisme respiratoire | 20 |
| 3.7. Evaluation des indicateurs de stress oxydatif | 21 |
| 3.7.1. Mesure du taux de glutathion (GSH)..... | 21 |
| 3.7.2. Evaluation l'activité Catalase (CAT) | 22 |
| 3.7.3. Mesure l'activité glutathion- S- transférase (GST) | 23 |
| 3.7.4. Mesure de l'activité acétylcholinestérase (Ache) | 24 |
| 3.8. Mesure de l'état Redox cellulaire | 24 |
| 3.8.1. Quantification des Espèces Réactives l'Oxygène (ROMs) | 25 |
| 3.8.2. Quantification du Potentiel Antioxydant Biologique (BAPs) | 25 |
| 3.9. Etude statistique | 25 |

Chapitre III : Résultats

| | |
|---|----|
| 1. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur la cinétique de croissance de <i>Paramecium sp.</i> | 26 |
| • Cas de MAD | 26 |
| • Cas de Cd | 27 |
| • Cas de la combinaison MAD/Cd | 28 |
| 2. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur le pourcentage de réponse de <i>Paramecium sp.</i> | 29 |
| • Cas de MAD | 29 |
| • Cas de Cd | 30 |
| • Cas de la combinaison MAD/Cd | 31 |
| 3. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur le métabolisme biochimique de <i>Paramecium sp.</i> | 32 |
| • Cas de MAD | 32 |
| • Cas de Cd | 33 |
| • Cas de la combinaison MAD/Cd | 34 |
| 4. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur le métabolisme respiratoire chez <i>Paramecium sp.</i> | 35 |
| • Cas de MAD | 35 |
| • Cas de Cd | 36 |
| • Cas de la combinaison MAD/Cd | 37 |
| 5. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur les variations de l'activité Catalase chez <i>Paramecium sp.</i> | 38 |
| • Cas de MAD | 38 |
| • Cas de Cd | 39 |
| • Cas de la combinaison MAD/Cd..... | 40 |
| 6. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur l'évolution du taux de GSH chez <i>Paramecium sp.</i> | 41 |
| • Cas de MAD | 41 |
| • Cas de Cd | 42 |
| • Cas de la combinaison MAD/Cd..... | 43 |
| 7. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur les variations de l'activité GST chez <i>Paramecium sp.</i> | 44 |

| | |
|--|-----------|
| • Cas de MAD | 44 |
| • Cas de Cd | 45 |
| • Cas de la combinaison MAD/Cd..... | 46 |
| 8. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur l'activité Ache chez <i>Paramecium sp.</i> | 47 |
| • Cas de MAD | 47 |
| • Cas de Cd | 48 |
| • Cas de la combinaison MAD/Cd | 49 |
| 9. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur l'évolution du taux d'Espèces Réactives à l'Oxygène chez <i>Paramecium sp.</i> | 50 |
| • Cas de MAD | 50 |
| • Cas de Cd..... | 51 |
| • Cas de la combinaison MAD/CD..... | 51 |
| 10. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur l'évolution du Potentiel Antioxydant Biologique chez <i>Paramecium sp.</i> | 52 |
| • Cas de MAD | 52 |
| • Cas de Cd..... | 53 |
| • Cas de la combinaison MAD/CD..... | 53 |
| Chapitre IV : Discussion | 55 |
| Chapitre V : Conclusion générale et perspectives | 63 |
| Références bibliographiques | 65 |

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification de la toxicité aiguë des pesticides (OMS, 2005)

Tableau 02 : Croisements Sources industrielles et agricoles des métaux présents dans l'environnement

Tableau 03 : Caractéristiques physicochimiques et structure moléculaire du Mandipropamide

Tableau 04 : Caractéristiques physicochimiques et structure moléculaire du Cadmium

Tableau 05 : Effets des concentrations croissantes du MAD sur la quantification des ROS chez *Paramecium sp.*

Tableau 06 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur la quantification des ROS chez *Paramecium sp.*

Tableau 07 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur la quantification des ROS chez *Paramecium sp.*

Tableau 08 : Effets des concentrations croissantes de MAD sur la quantification des BAPs chez *Paramecium sp.*

Tableau 09 : Effets des concentrations croissantes de Cd sur la quantification des BAPs chez *Paramecium sp.*

Tableau 10 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur la quantification des BAPs chez *Paramecium sp.*

Liste des figures

Figure 01 : Structure d'une paramécie au microscope MO.

Figure 02 : Représentation d'une structure de paramécie (Génoscope.,2007).

Figure 03 : Schéma de l'électrode à oxygène (Djebar et Djebar , 2000).

Figure 04 : Effets des concentrations croissantes du MAD sur la cinétique de croissance chez *Paramecium sp.*

Figure 05 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur la cinétique de croissance chez *Paramecium sp.*

Figure 06 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur la cinétique de croissance chez *Paramecium sp.*

Figure 07 : Effets des concentrations croissantes du MAD sur le pourcentage de réponse chez *Paramecium sp.*

Figure 08 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur le pourcentage de réponse chez *Paramecium sp.*

Figure 09 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur le pourcentage de réponse chez *Paramecium sp.*

Figure 10 : Effets des concentrations croissantes de MAD sur le taux des protéines totales chez *Paramecium sp.*

Figure 11 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur le taux des protéines totales chez *Paramecium sp.*

Figure 12 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur le taux des protéines totales chez *Paramecium sp.*

Figure 13 : Effets des concentrations croissantes du MAD sur le métabolisme respiratoire chez *Paramecium sp.*

Figure 14 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur le métabolisme respiratoire chez *Paramecium sp.*

Figure 15 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur le métabolisme respiratoire chez *Paramecium sp.*

Figure 16 : Effets des concentrations croissantes du MAD sur la variation de l'activité CAT chez *Paramecium sp.*

Figure 17 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur la variation de l'activité CAT chez *Paramecium sp.*

Figure 18 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur la variation de l'activité CAT chez *Paramecium sp.*

Figure 19 : Effets des concentrations croissantes du MAD sur l'évolution du taux du GSH chez *Paramecium sp.*

Figure 20 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur l'évolution du taux du GSH chez *Paramecium sp.*

Figure 21 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur l'évolution du taux du GSH chez *Paramecium sp.*

Figure 22 : Effets des concentrations croissantes du MAD sur la variation de l'activité GST chez *Paramecium sp.*

Figure 23 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur la variation de l'activité GST chez *Paramecium sp.*

Figure 24 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur la variation de l'activité GST chez *Paramecium sp.*

Figure 25 : Effets des concentrations croissantes du MAD sur la variation de l'activité AchE chez *Paramecium sp.*

Figure 26 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur la variation de l'activité AchE chez *Paramecium sp.*

Figure 27 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur la variation de l'activité AchE chez *Paramecium sp.*

Liste des abréviations

- AChE** : Acetylcholinestérase
- ASCH** : Substrat acetylcholinestérase.
- ASS** : Acide Sulfosalicylique.
- BAPs** : Potentiel Antioxydant Biologique.
- BSA** : Serum Albumin Bovin.
- CAT** : Catalase.
- Cd** : Cadmium
- CDNB** : 1-Chloro,2,4-Dinitrobenzène.
- CGA** : Centre de gestion agréé
- CL**: Concentration létale.
- CYP**: Cytochrome P.
- DL** : Dose létale.
- DTNB** : Acide 5,5'Dithiodis-2-Nitrobenzoïque.
- DEPPD** : N,N-diethylparaphénylendiamine
- ERO** : Espèces Actives de l'Oxygène.
- EDTA** : Ethylène diamine tetra-acétique.
- EC** : Concentration efficace
- ETM** : Eléments Traces Métalliques.
- GSH** : Glutathion-S-transférases.
- GSSG** : Glutathion disulfure.
- GST** : Glutathion-S-transférases.
- H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène.
- KOC** : Carbone organique
- MAD** : Mandipropamide
- NADPH** : Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate.
- OASTL** : O-acétylserine thiole lyase.
- OP** : Organophosphoré
- PCs** : Phytochélatines
- ROS** : Réactifs oxygen species.
- SAT** : Sérine acétyltransférase

SC : Suspensions concentrées

SNC : thiocyanate

SOD : Superoxyde dismutase.

Les activités humaines sont à l'origine d'une dégradation de l'environnement, en grande partie par la dispersion croissante de substances ou d'éléments synthétiques et naturels. Il en résulte de nombreuses conséquences délétères pour la santé humaine, et, au-delà, celle des écosystèmes. Ainsi, le 20ème siècle a connu l'émergence d'une prise de conscience : celle de la nécessité de préservation et de restauration de la qualité de l'environnement. L'ampleur de ces enjeux socio-économiques et scientifiques alimente désormais les préoccupations et les efforts concertés des scientifiques et des gestionnaires. (zaouani, 2010).

Parmi les polluants, représentant un danger sérieux pour les organismes vivants, les métaux lourds et les produits phytosanitaires occupent une place de choix.

Les effets toxiques de ces composés sur l'individu, les populations ou les écosystèmes peuvent être discrets ou visibles vu la complexité du déclenchement de l'action toxique.

Ceci a pour conséquence de compromettre l'équilibre des écosystèmes, d'altérer les ressources naturelles et menacer la santé humaine. (Nakhlé, 2003 ; El-Morhit,2009).

Ainsi, l'utilisation abusive de produits phytosanitaires, est à l'origine de la contamination des sols et des milieux aquatiques (Jamet, 1994). De plus, l'organisme pollué peut être consommé tout au long de la chaîne alimentaire en amplifiant les dangers sur plusieurs échelles selon le rang du consommateur. Ainsi, les pesticides, du fait de leur potentiel toxique aussi bien pour l'Homme que pour son environnement sont à l'origine des pathologies telles que le cancer, des dysfonctions des systèmes respiratoires, reproductifs, endocriniens et immunitaires, des malformations congénitales, des atteintes aiguës et chroniques du système nerveux (Jawich,2010, Veillerette,2005).

De plus, l'industrie est également considérée comme le pollueur par excellence du fait de l'émission dans les trois compartiments à savoir l'air ,l'eau , et le sol de molécules diverses comme c'est le cas de la sidérurgie qui émet dans l'atmosphère des particules métalliques (ETM).

La présence des ETM dans les différents écosystèmes est à l'origine d'une atteinte de la majorité des organismes vivants (Baize, 1997). Aussi, la recherche d'outils de surveillance de

la qualité des écosystèmes et la mise au point de méthodes d'évaluation du risque environnemental s'avèrent nécessaires.

Il en est ainsi de l'utilisation intégrée de marqueurs biologiques. Ces approches écotoxicologiques sont spécifiques aux problèmes environnementaux pour l'estimation des risques engendrés par la pollution des écosystèmes à travers le suivi de paramètres biochimiques et physiologiques (Huggett et *al.*, 1992 ; Travis, 1993).

L'utilisation de bioindicateurs sensibles, permet ainsi d'estimer la qualité des milieux et d'évaluer toute pression exercée par la pollution sur la santé et la structure des organismes vivants avant que toute la population ou l'écosystème ne soient perturbés (Huggett et *al.*, 1992 ; Travis, 1993 ; Forbes et *al.*, 1997). Il en est ainsi des systèmes aquatiques par exemple où plusieurs espèces font l'objet de normalisation pour l'évaluation de la toxicité. Selon Blaise (1989), la réponse des organismes vivants soumis à l'agression toxique constitue le point central des stratégies de dépistage.

Ces outils de surveillance de la qualité environnementale s'inscrivent dans deux approches complémentaires : le contrôle analytique de paramètres physico-chimiques et la mise en œuvre de méthodes d'observation et/ou de quantification de paramètres biologiques (Amiard et *al.*, 1998).

En dépit de leurs dimensions microscopiques, les protozoaires jouent un rôle fondamental dans la nature. Les êtres unicellulaires représentent un chaînon de base dans les chaînes alimentaires des eaux douces et marines. Leur valeur est toute aussi importante car, faciles à cultiver, les protozoaires étant des cellules hautement organisées (Dragesco, 1980).

L'utilisation d'espèces du genre *Paramecium* comme modèle d'étude a été rapportée par plusieurs auteurs ; en génétique, en raison de son génome bien connu, les chercheurs ont utilisé *P. tetraurelia* pour l'analyse génétique, l'expression des gènes et les mutations (Houten et *al.*, 1977 ; Brygoo, 1977 ; Mayer et *al.*, 1998 ; Haynes et *al.*, 2000 ; Vayssié et *al.*, 2000). En physiologie, les paramécies sont utilisées pour étudier l'organisation cellulaire, le rôle des organites et les mécanismes des différentes fonctions physiologiques.

Objectif du travail :

Notre travail a un double objectif d'un côté l'évaluation de la toxicité et/ou des effets de deux xénobiotiques en l'occurrence le Cd sous forme de sel et un fongicide : le Mandipropamide ainsi que leur combinaison en vue de l'évaluation d'un éventuel effet cocktail et ce à l'échelle cellulaire et d'un autre côté l'effet de la pollution industrielle et de l'utilisation abusive des pesticides en agriculture.

Pour cela nous avons subdivisé notre travail en quatre parties : ainsi après une étude bibliographique sur l'état de l'art concernant notamment la toxicité des métaux lourds en général et le Cd en particulier ainsi que sur le fongicide choisi, à travers la première partie de ce travail, qui est une introduction générale assez exhaustive dans laquelle nous avons cité notre problématique actuelle, concernant la contamination de l'environnement par les pesticides et les métaux lourds, ainsi que leur mixture. Nous nous sommes focalisés ensuite sur l'utilisation des protistes ciliés en argumentant au passage le choix de ce modèle biologique alternatif *Paramecium sp.* pour les études en toxicologie expérimentale.

La seconde partie de ce travail a été consacrée à l'étude de la toxicité potentielle de ces deux xénobiotiques sur l'évolution de certains paramètres physiologiques des paramécies susceptibles de fournir en amont des indications sur le degré de toxicité de ces xénobiotiques. En troisième lieu, nous nous sommes focalisés sur les variations métaboliques induites par le Cd, le MAD et leurs combinaisons et ce à travers le suivi des activités de certaines enzymes impliquées dans le processus de métabolisation/détoxication (CAT, GST), ainsi que l'activité AchE en tant que biomarqueur d'une éventuelle neurotoxicité ; parallèlement à une étude polarographique qui pourrait apporter de précieuses réponses sur l'implication des activités mitochondriales dans le processus de toxicité.

Les effets du stress oxydant sont bien connus et conduisent à des dommages cellulaires et à des défaillances fonctionnelles diverses et parfois irréversibles. En effet il est admis maintenant que cet état de stress est à l'origine d'une multitude de pathologies chroniques.

Plusieurs milliers de substances chimiques se retrouvent dans les milieux aquatiques étant donné son statut réceptacle final. Certains comme les pesticides sont complètement étrangers alors que d'autres tels que les éléments traces métalliques (ETM) présents naturellement dans

l'environnement, mais dont les concentrations dépassent les normes requises par l'OMS du fait de leur utilisation en milieu industriel.

La démarche choisie pour cette quatrième partie consiste, en premier lieu, à mettre en évidence l'induction d'un stress oxydant. Pour cela nous nous sommes intéressés à l'évaluation du taux de radicaux libres oxygénés (ROS) dont la présence en abondance dans la cellules est un indicateur de toxicité et le cas échéant au potentiel biologique antioxydant (BAPs) qui rend compte des capacités antioxydantes réelles de la cellules.

Introduction générale

Les pesticides sont des composés chimiques utilisés par les agriculteurs pour lutter contre les animaux (insectes, rongeurs) ou les plantes (champignons, mauvaises herbes) jugés nuisibles. Si les pesticides sont d'abord apparus bénéfiques, leurs effets secondaires nocifs ont été rapidement mis en évidence. Leur toxicité, liée à leur structure moléculaire, ne se limite pas en effet aux seules espèces que l'on souhaite éliminer. Ils sont notamment toxiques pour l'homme (Calvet, 2005 ; Khopkar, 2007).

Estimer les effets sur les écosystèmes d'une pollution liée aux pesticides s'avère difficile, car il existe un millier de familles de pesticides, soit des dizaines de milliers de pesticides. Ils sont en outre utilisés à faibles doses et leurs comportements sont très divers. Leur impact dépend à la fois de leur mode d'action, de leur persistance dans le temps et de leurs sous-produits de dégradation lesquels sont parfois plus toxiques et se dégradent moins vite que le composé initial. Leurs effets sur le vivant sont, eux aussi, encore très mal connus.

Selon Forbes et Forbes, (1997) la pollution des milieux aquatiques par les pesticides se manifeste par différentes formes et provoque des effets pouvant être de deux types :

- Effet immédiat ou à court terme conduisant à un effet toxique brutal et donc à la mort rapide de différents organismes,
- Effet différé ou à long terme, par accumulation au cours du temps, des substances chez certains organismes.

Plusieurs facteurs déterminent l'importance de la migration des pesticides vers les eaux de surface , en premier lieu les concentrations , l'importance et l'intensité des événements de pluie qui surviennent après l'application des pesticides aux champs et le délai entre l'application et la pluie (Forbes et Forbes, 1997).

1. *Classifications des pesticides :*

Les pesticides peuvent être classés en fonction de la nature de l'espèce à combattre mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose (Fourrier, 1988). Le premier système de classification repose sur le type de parasites à contrôler.

il existe principalement trois grandes familles de produits phytosanitaires selon la nature des cibles visées : les herbicides, les fongicides et les insecticides, à celles-ci s'ajoutent des produits divers tels que les acaricides (contre les acariens), les nématocides (contre les nématodes), les rodenticides (contre les rongeurs) , les taupicides (contre les taupes), les molluscides (contre les limaces et les escargots), les corvicides et les corvifuges (contre les oiseaux ravageurs de culture et surtout les corbeaux) et enfin les répulsifs (ACTA, 2005). Le deuxième système repose sur la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires (tableau 2), les principaux groupes chimiques comprennent les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoides, les triazines et les urées substituées. (Merhi, 2008 ; UIPP, 2009).

Les systèmes de classifications sont universels, néanmoins l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2005) a classé les produits phytosanitaires en fonction de la toxicité orale et de la toxicité cutanée des matières actives de ces derniers (tableau 1). cette classification comprend cinq niveaux allant d'extrêmement dangereux au sans risque.

Tableau 01 : Classification de la toxicité aiguë des pesticides (OMS, 2005)

| Classification | Désignation | DL50 pour le rat (mg/kg poids du corps) | | | |
|----------------|---|---|------------|------------|------------|
| | | Orale | | Cutané | |
| Classe | Niveau du risque | Solide | Liquide | Solide | Liquide |
| Ia | Extrêmement dangereux | ≤ 5 | ≤ 20 | ≤ 10 | ≤ 40 |
| Ib | Très dangereux | 5 – 50 | 20 – 200 | 10 – 100 | 40 – 400 |
| II | Modérément dangereux | 50 – 500 | 200 – 2000 | 100 – 1000 | 400 - 4000 |
| III | Peu dangereux | ≥ 500 | ≥ 2000 | ≥ 1000 | ≥ 4000 |
| U | Sans risque dans le cadre d'une utilisation normale | ≥ 2000 | ≥ 4000 | | |

2. Devenir des pesticides dans l'environnement :

L'utilisation abusive des produits phytosanitaires en agriculture est à l'origine d'une contamination de l'environnement. Ces molécules sont susceptibles de quitter leurs sites d'application et sont alors considérées comme micropolluants organiques à l'origine de la pollution de tous les compartiments environnementaux (Shrack et Coquil, 2009).

Du fait de leur toxicité et de leur potentiel de bioaccumulation, ces molécules présentent un risque pour l'environnement en général (Wendt-Rasch et *al.*, 2004 ; Capkin et *al.*, 2006). D'un autre côté de nombreuses études ont montré la présence de produits phytosanitaires ou de leurs résidus dans l'atmosphère aussi bien en milieu rural, qu'en milieu urbain (Terfaya et *al.*, 2009) ces composés peuvent être soumis au transport atmosphérique.

La diffusion est possible sur de grandes distances comme en témoigne la détection de pesticides organochlorés dans les précipitations en Antarctique (Bidlelm et *al.*, 1993). Le sol et les ressources en eau sont aussi concernés par cette pollution. Les pesticides peuvent aussi être transportés par ruissellement et contaminer ainsi les eaux de surface et les nappes phréatiques, Actuellement la contamination des eaux par les pesticides est préoccupante et généralisée. (Grange et *al.*, 2008).

3. Toxicité et génotoxicité des pesticides :

En dépit de leur sélectivité et mode d'action spécifique, les pesticides exercent leur nocivité envers les organismes involontairement exposés, suite à la contamination de l'environnement et de la chaîne alimentaire. Ils peuvent être cytotoxiques, neurotoxiques, embryotoxiques, mutagènes, tératogènes ou carcinogènes (Fishbein, 1977).

Ces xénobiotiques peuvent donc subir une activation métabolique et former des intermédiaires électrophiles capables d'interagir avec les acides nucléiques ; ou induire un stress oxydatif, l'inhibition de la communication intercellulaire...etc (Lin et *al.*, 2002 ; Hurst et Sheahan, 2003). Souvent, les effets produits par la combinaison de plusieurs matières actives sont supérieurs aux effets individuels additionnés et ce à cause de l'interaction entre les molécules simultanément présentes. Il en est ainsi par exemple du penconazole qui

stimule la toxicité des organophosphorés (OP) envers les mammifères, ceci résulterait d'une induction du cytochrome P450 responsable de la réaction d'activation des OPs en leur métabolite toxique (Levine et Oris, 1999).

Pareillement, le propiconazole augmente l'action toxique du parathion en activant la formation du paraoxon ; la toxicité des pesticides organophosphorés envers des organismes non ciblés serait donc induite par une exposition antérieure au propiconazole (Levine et Oris, 1999). Aussi, la combinaison diméthoate, azinphos-méthyle, diazinon, pyrimiphos-méthyle, et bénomyl serait plus toxique comparée aux substances testées individuellement sur des cellules humaines.

4. *Caractéristiques des métaux lourds :*

On appelle en général métaux lourds les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à $4,5 \text{ g/cm}^3$ (Boutonnet, 2000).

Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en faibles concentrations, ils sont dits traces lorsque leur concentration est inférieure à 1 pour 1000 dans la croûte terrestre ou 0,1 pour 1000 chez les êtres vivants (Boutonnet, 2000). Ils s'accumulent à travers la chaîne alimentaire posant ainsi de sérieux problèmes pour la santé de l'homme (Pérez-Rama et *al.*, 2002).

La classification des métaux lourds est souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » comme le zinc, tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux comme l'Arsenic (Boutonnet, 2000 ; Miquel, 2001).

Les métaux lourds se caractérisent par leur persistance, leur toxicité et leur pouvoir d'accumulation dans le milieu naturel. Ils sont transportés dans l'atmosphère et peuvent se déposer dans des régions éloignées du lieu d'émission tel que l'arctique (Popescu et *al.*, 1998).

5. Source des métaux lourds dans l'environnement :

Compte tenu de la toxicité des métaux lourds, il importe d'en connaître les sources anthropogènes dans l'environnement.

- Effluents d'extractions minières
- Effluents industriels
- Effluents domestiques et ruissellements orageux urbains
- Lessivage de métaux provenant de décharges d'ordures ménagères et de résidus solides
- Apports de métaux provenant de zones rurales, par exemple métaux contenus dans les pesticides
- Sources atmosphériques, par exemple combustion de carburants fossiles, incinération des déchets et émissions industrielles
- Activités pétrochimiques

Le tableau 2 présente quelques exemples de sources industrielles et agricoles d'où peuvent provenir les métaux présents dans l'environnement.

Tableau 2 :
Sources industrielles et agricoles des métaux présents dans l'environnement

| Utilisations | Métaux |
|--|--|
| Batteries et autres appareils électriques | Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Ni, |
| Pigments et peintures | Ti, Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Sn, Cr, Al, As, Cu, Fe |
| Alliages et soudures | Cd, As, Pb, Zn, Mn, Sn, Ni, Cu |
| Biocides (pesticides, herbicides, conservateurs) | As, Hg, Pb, Cu, Sn, Zn, Mn |
| Agents de catalyse | Ni, Hg, Pb, Cu, Sn |
| Verre | As, Sn, Mn |
| Engrais | Cd, Hg, Pb, Al, As, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn |
| Matières plastiques | Cd, Sn, Pb |
| Produits dentaires et cosmétiques | Sn, Hg |
| Textiles | Cr, Fe, Al |
| Raffineries | Ni, V, Pb, Fe, Mn, Zn |
| Carburants | Ni, Hg, Cu, Fe, Mn, Pb, Cd |

Les métaux lourds qui contaminent l'environnement aquatique proviennent de sources naturelles et de sources anthropogènes. Leur entrée peut être le résultat soit de déversements effectués directement dans les écosystèmes marins et dans les eaux douces, soit d'un cheminement indirect comme dans le cas des décharges sèches et humides et du ruissellement agricole (Maas, 1987 ; Mechael et Kennich, 1998).

6. La bioaccumulation des métaux lourds :

La bioaccumulation est le processus d'assimilation et de concentration des métaux lourds dans l'organisme, désignant la capacité des Des organismes aquatiques à concentrer et à accumuler leur substances chimiques présentes à des concentrations supérieures à celles qui sont mesurées dans l'eau (Ting et *al.*, 1991), le processus se déroule en trois temps :

- L'assimilation
- La bioaccumulation par l'individu, ou bioconcentration
- La bioaccumulation entre individu, ou bioamplification

7. Toxicité des métaux lourds :

La plupart de nos connaissances sur la toxicité des métaux lourds proviennent d'études de cas d'intoxications collectives aigues ou professionnelles. Peu de cas confirment la responsabilité de la pollution dans l'accroissement de la mortalité, les exemples de Minamata (Pollution de la baie au Japon par le mercure : 100 morts) et Bhopal (Accident d'une usine d'insecticides en Inde : 2000 morts) sont des cas célèbres.

Dans le cas de l'Algérie, l'usine METANOF de Ghazaouet (Wilaya de Tlemcen) qui produit du zinc et du cadmium, depuis son entrée en production en 1978, a attiré l'attention des responsables de la santé sur des phénomènes de pollution peu connus auparavant et a fait ainsi l'objet de plusieurs études (Dahmani, 1988 ; Fekih et Belhouari, 1990 ; Gourari, 1991 ; Gouaouar, 2002).

8. Effet du cadmium sur les microorganismes :

Le Cd peut inhiber la croissance des champignons, de *Saccharomyces cerevisiae* (Guelfi et al., 2003) et *Aspergillus Niger* (Tsekova et al., 2000). Il inhibe la production de l'acide citrique de l'*aspergillus Niger*, réduit les protéines et l'ADN contenus dans les cellules et augmente les lipides et les polysaccharides (Tsekova et al., 2000).

Chez *Stereum hirsutum* et *Phanerochaete chrysosporium* (moisissures blanches), la présence du Cd inhibe la croissance, diminue l'activité catalase (Baldrian, 2002) et l'oxydation de l'acide 3- diméthylaminobenzoïc (Youngs et al., 2000).

Les ciliés comme les paramécies et *Tétrahymena* sont devenus un matériel excellent pour tester les effets des pesticides, antibiotiques et autres drogues à coté des métaux lourds et leurs composants (Kamola, 1995). Chez les paramécies, le mouvement en arrière créé par le battement des cils (Backward swimming) est réduit à 18,4% à une concentration de 100 µM (Bernal, 1996).

Chez *Tétraselmis suecica* traitées au Cd, la croissance est inhibée et les valeurs de l'EC50 sont de 7,9 mg Cd/L après 6 jours d'exposition (Pérez-Rama et al., 2002).

9. Toxicité du cadmium :

Le cadmium est à l'origine de divers types de toxicité aussi bien chez l'Homme que son environnement (retard de croissance, , induction /inhibition des enzymes, altérations de l'action somatique, l'afflux des cations et la génération des radicaux libres inhibition de la photosynthèse) (Prasad, 1995).

Les perturbations des mécanismes enzymatiques par le cadmium sont souvent dues à son affinité vis-à-vis des groupements thiols ou phosphates.

Il a été montré que chez les algues marines, le Cd induit l'induction de l'activité des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la cystéine comme la SAT (Serine acetyltransférase) et les OASTL. (O-acetylserine thiole lyase), diminue la nitrite réductase et la nitrate réductase

(Mosulen et *al.*, 2003). Ces algues peuvent réagir vis-à-vis du stress métallique en synthétisant des molécules qui peuvent chélater ces métaux toxiques, à savoir le Glutathion réduit (SH-) le plus important antioxydant non enzymatique (Torricelli et *al.*, 2004) et les phytochélatines (PCs), ainsi que des peptides thiol de faibles poids moléculaires dérivés du GSH (Torricelli et *al.*, 2004).

Les PCs sont une classe de molécules qui se lient facilement aux métaux lourds et sont impliquées dans la détoxification primaire chez les plantes inférieures et supérieures (Cobbett, 2000 ; Di Toppi, 2002) et peuvent jouer un rôle dans l'homéostasie des métaux essentiels (Grill et *al.*, 1988). Il est attribué à cette catégorie de protéines cytosoliques un caractère de détoxification puisqu'elles réduisent la quantité de cadmium libre, responsable des effets toxiques dans la cellule.

Chez *Dunaliella bioculata*, Penada-Saraiva (1975) a mis en évidence une altération de l'activité mitotique par le cadmium. Outre son action mutagène (Webb, 1979), le cadmium peut également stimuler la synthèse d'ADN. Des perturbations de la synthèse d'ARN et de protéines ont également été mises en évidence chez de nombreuses espèces (Bracken et Shama, 1985).

10. Radicaux libres et stress oxydatif :

Le métabolisme cellulaire normal produit en permanence des espèces oxygénées réactives (ERO). Par exemple, au cours de la respiration, chaque cellule réduit l'oxygène en eau. Parfois, une partie de cet oxygène échappe à la transformation complète et donne une forme d'oxygène très réactive : l'anion superoxyde (caractéristique des radicaux libres).

D'autres radicaux libres sont générés en chaîne à partir des diverses réactions chimiques de notre organisme. Ces molécules, très agressives, sont normalement éliminées par des systèmes de défense enzymatiques ou biochimiques. En outre, Il existe aussi des systèmes réparateurs chargés de corriger les effets toxiques des radicaux libres. Les radicaux libres peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller altérer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules (Boveris et *al.*, 1972). De plus, l'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) engendre la transmission d'une cascade radicalaire, soit à

l'intérieur d'une même cellule, soit à l'intérieur d'un même tissu en agissant d'une cellule à une autre.

En absence d'équipement antioxydant tissulaire efficace pour stopper cet enchaînement radicalaire, le phénomène de dégradation connaît une progression rapide, qui, après interaction avec les autres systèmes tissulaires, devient très vite exponentielle. Cette transmission extrêmement rapide peut alors conduire au transfert de l'agression radicalaire sur plusieurs centimètres au sein d'un tissu en une fraction de seconde (Neuzil et *al.*, 1993). Parfois, la production de ces molécules agressives, sous l'influence de diverses pathologies, ou de facteurs extérieurs comme la pollution, les radiations ionisantes, le stress, certaines drogues ou le tabagisme, s'exacerbe et les systèmes naturels de défense ou de réparation sont débordés.

On assiste alors à une désorganisation des structures membranaires, à l'oxydation des lipoprotéines circulantes qui ne peuvent plus être épurées, à l'oxydation de protéines qui perdent alors leur fonction, à l'attaque et à la fragmentation de l'ADN.

Le stress oxydatif touche donc l'ensemble des tissus et des métabolismes et de ce fait participe à un grand nombre de pathologies.

11. Systèmes de défenses antioxydants :

Lorsque des ERO commencent à s'accumuler dans la cellule, ils peuvent être neutralisés par des molécules de défense antioxydantes présentes dans la cellule comme le glutathion, les vitamines E et C, la bilirubine, l'acide lipoïque, et des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, les peroxyrédoxines... (Morel et Barouki, 1998; Delattre, 2005). Dans un premier temps, la cellule ne modifie pas ses propriétés biologiques. Si les ERO continuent à s'accumuler, une adaptation plus consistante de la cellule est nécessaire avec l'induction de gènes codant des enzymes anti oxydantes, des protéines chaperons, des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN et des protéines. On observe aussi une répression des systèmes susceptibles de libérer des ERO, notamment la chaîne respiratoire, les cytochromes P450 et la NADPH oxydase (Morel et Barouki, 1999 ; Barouki et Morel, 2001). Dans ces conditions, nous pouvons parler de stress dans la mesure

où la cellule a adapté ses fonctions biologiques, notamment son expression génique, aux modifications de son environnement.

À un stade ultime, la cellule peut suivre la voie de l'apoptose ou de la sénescence. Selon cette définition, il est aisé de détecter un stress oxydant provoqué par une élévation aiguë des ERO. La situation est plus complexe lorsque l'on recherche un stress oxydant chronique au cours duquel, d'une part, les élévations des ERO sont atténuées par des boucles de régulation, et, d'autre part, les inductions des enzymes antioxydantes et réparatrices sont plus modestes, ces enzymes étant parfois elles-mêmes altérées par oxydation. (Conconiet *al.*, 1996 ; Conconiet et Friguet, 1997 ; Wirth et *al.*, 2003).

CHAPITRE II
MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre travail a été effectué au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) de l'Université Badji Mokhtar –Annaba.

1. Matériel biologique :

Nous avons utilisé un modèle unicellulaire, un microorganisme de la classe des protistes ciliés, représenté par : *Paramecium sp.* La systématique actuelle du genre *Paramecium*, d'après Corliss (1961) et Honigberg (1964), peut être établie comme suit :

Phylum : Protozoa

Subphylum : Ciliophora

Classe : Ciliata

Sous-classe : Holotrichia

Ordre : Hymenostomatida

Sous-ordre : Peniculina

Famille : Parameciidae



Figure 1 : Structure d'une paramécie vue par MO (Benlaifa,2016)

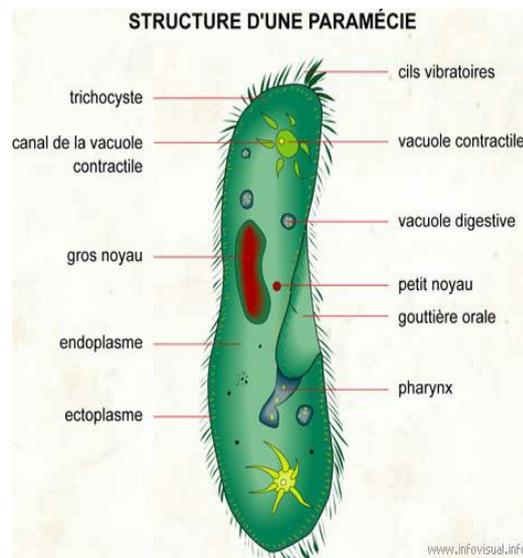


Figure 2 : Représentation de la structure d'une paramécie (Génoscope, 2007)

2. Matériel chimique :

Nous avons utilisé dans notre étude deux xénobiotiques, un fongicide (Mandipropamide) et un métal lourd (Cadmium). Les caractéristiques physicochimiques des deux composés étudiés et leurs structures sont représentées dans les tableaux (3) et (4).

Tableau 3 : Caractéristiques physicochimiques et structure moléculaire du Mandipropamide

Nom chimique 2-(4-chloorfenyl)- N-[3-methoxy-4-(prop-2-ynyloxy) fenethyl]-
2-(prop-2-ynyloxy)acetamide

Formule chimique $C_{23}H_{22}ClNO_4$

Poids moléculaire 411,9 g /mol

pH Entre 6,9 et 7

Stabilité Stabilité au stockage de 7 jours à 0°C et 14 jours à 54°C et à
température ambiante durant 2 ans

Solubilité soluble dans l'eau et non dans les solvants organiques

Structure moléculaire

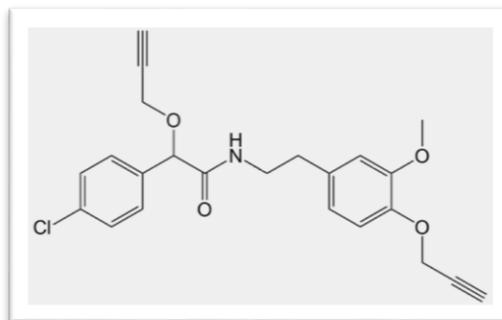


Tableau 4 : Caractéristiques physicochimiques du Cadmium

| | |
|------------------------------|--|
| Nom chimique | 2(anhydre)-8(monohydrate)-5(hémipentahydrate) 8 (hydrate) |
| Masse Molaire | 183,317 g/mol |
| Masse volumique | 4,05 g·cm |
| Aspect | Solide blanc hygroscopique, inodore |
| Solubilité | Soluble dans l'eau |
| Structure cristalline | Trigonale |

3. Méthodes :

3.1. Culture des Paramécies :

La méthode utilisée est celle de Beaumont et cassier (1998) modifiée par (Azzouz, 2011) et comprend :

Une culture mixte :

Du foin est coupé en petits morceaux et infusé dans un récipient contenant de l'eau de robinet. La préparation est laissée dans un lieu tiède, sombre et aéré. Quelques jours plus tard (3 à 4 jours) apparaît un voile bactérien sur la solution. On filtre l'infusion et on observe, sous microscope optique et sans coloration, les premiers ciliés. Ces organismes se nourrissent au dépend du voile bactérien.

Une culture pure :

Le milieu de culture composé à base de poudre de laitue et d'un mélange de constituants à base de légumes et de levures est préparé selon la méthode de Azzouz, (2011).

3.2. Traitement des paramécies :

3.2.1. traitement des Paramécie par le Cadmium :

Les tests sont réalisés sur des aliquotes de 10 ml de culture de paramécie, nous avons retenu quatre concentrations croissantes de Cadmium : 0,5. 1. 2 et 5 mM.

3.2.2. traitement des Paramécie par le MAD :

Les tests sont réalisés sur des aliquotes de 10 ml de culture de paramécie, nous avons retenu trois concentrations croissantes de MAD :
2,5. 5 et 7,5 µl/l.

3.2.3. *traitement des paramécies par la combinaison des deux xénobiotiques :*

Les tests sont réalisés sur des aliquotes de 10 ml de culture de paramécie, nous avons mixé les trois concentrations croissantes du Fongicide (2.5. 5. 7,5 µl/l) avec une faible concentration du Cadmium (0.5µl/l), en utilisant cette dernière comme témoin positif.

Les tests effectués sont répétés trois fois

3.3. **Cinétique de croissance :**

La cinétique de croissance des paramécies est effectuée par comptage cellulaire manuel en fonction du temps selon la méthode de Amamra (2015). Le comptage est facilité après fixation des cellules avec du lugol. La cinétique de croissance commence 24h après la mise en contact des paramécies avec les xénobiotiques. L'observation microscopique est réalisée sous microscope photonique (Leica DL 1000) au grossissement 10, tous les jours pendant une semaine.

3.4. **Calcul du pourcentage de réponse :**

C'est un calcul qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis des xénobiotiques, et permet d'estimer le nombre de paramécies viables il est calculé selon l'équation suivante :

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

Où :

N_c : Nombre des cellules témoins

N_E : Nombre final des cellules traitées

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

3.5. Méthode de dosage des métabolites biochimiques :

3.5.1. Dosage des protéines totales :

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de Bradford (1976), la lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre (JENWAY 6300). La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une protéine standard, (ASB).

3.6. Suivi du métabolisme respiratoire :

L'activité respiratoire des paramécies est mesurée grâce à une électrode à oxygène de type Hansentech selon la méthode de Djebar et Djebar (2000).

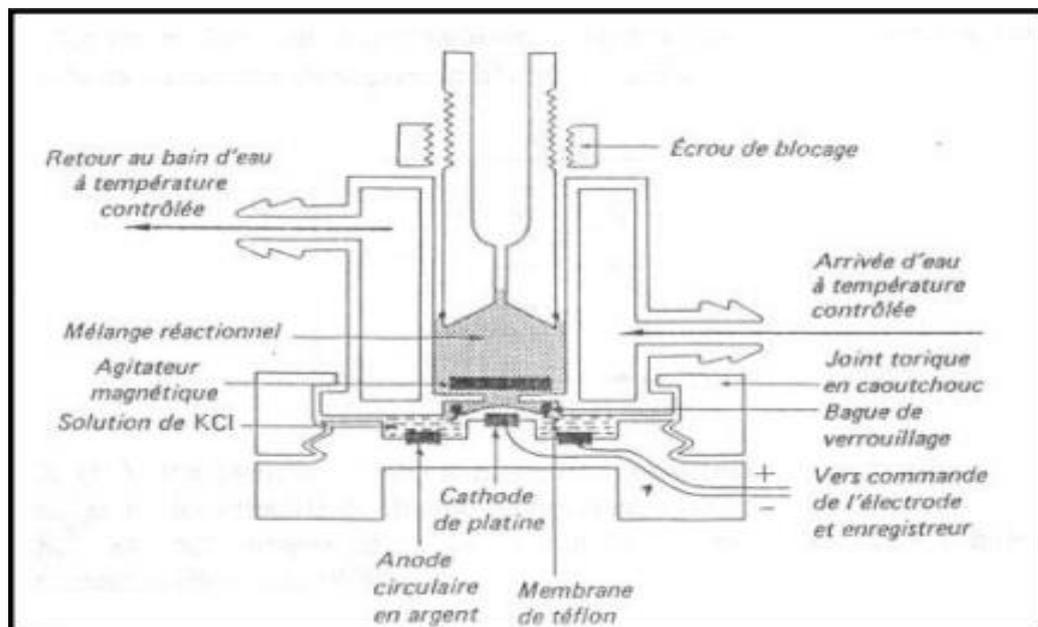


Figure 03. Schéma de l'électrode à oxygène (Djebar et Djebar , 2000).

3.7. Evaluation des biomarqueurs du stress oxydatif :

3.7.1. Dosage du Glutathion (GSH) :

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de Weckberker et Cory (1988), dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5-mercaptopurique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion.

- Mettre 3ml de milieu de cultures (témoins et traités) en présence de 1ml d'EDTA à 0,02M.
- Broyer les échantillons aux ultrasons (SONICS, VCX 130PB) pendant 35 secondes dans un bac contenant des glaçons.
- Prélever 0,8ml de l'homogénat auquel y ajouter 0,2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25%.
- Passer au Vortex et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à la vitesse de 1000 tours/min pendant 5 minutes.
- Ajouter au mélange : 1ml de tampon Tris-EDTA (0,02M d'EDTA pH = 9,6), 0,025ml de DTNB et 0,5ml du surnageant.
- Laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément.
- Mesurer les absorbances à 412 nm (Spectrophotomètre JENWAY 6305), Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$X = [(\Delta Do \cdot Vd \cdot Vt / 13,1 \cdot Vh \cdot Vs)] / \text{mg de protéines}$$

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

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

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

Vd : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1 ml [0,2 ml ASS + 0,8ml homogénat].

Vh : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 1 ml [0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat].

Vt : volume total dans la cuve : 1,525 ml [0,5 ml surnageant + 1 ml tris/EDTA + 0,025 ml DTNB].

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

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

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

- Mettre 1 ml de milieux de cultures (témoins et traités) en présence d'1 ml de tampon phosphate (0,1M, pH = 6).
- Broyer les échantillons aux ultrasons (SONICS, VCX 130PB) pendant 35 secondes dans un bac contenant des glaçons.
- Centrifuger l'homogénat à 14000 tours/min pendant 15 minutes
- Faire réagir 0.75 ml de tampon phosphate avec 0.2 ml de H₂O₂ et 0.025 ml surnagent
- La lecture est effectuée toutes les 15 s pendant 1 min à la longueur d'onde 240 nm

L'activité Catalase (CAT) est exprimée en μmol d'H₂O₂ par minute et par mg de protéines selon la formule suivante :

:

$$X = [(\Delta Do \cdot 10 / \epsilon \cdot L \cdot 0.05)] / \text{mg de protéines}$$

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

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

ϵ : Le coefficient d'extinction est de $0,0040 \text{ m M}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$

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

3.7.3. Mesure de l'activité Glutathion –S- transférase (GST) :

La mesure de l'activité 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) selon la réaction suivante:



- Mettre 3ml de milieux de cultures (témoins et traités) en présence d'1ml de tampon phosphate .
- Broyer les échantillons aux ultrasons (SONICS, VCX 130PB) pendant 35 secondes dans un bac contenant des glaçons ;
- Centrifuger l'homogénat à 14000tours/min pendant 30 minutes ;
- Prélever 0.2ml du surnageant auquel on ajoute 1,2ml du mélange : CDNB (1mM), GSH (5mM), Tampon phosphate.
- Mesurer les DO à 340 nm toutes les minutes pendant 5 minutes (Spectrophotomètre JENWAY 6305, U.V. et Visible).

L'activité est déterminée d'après la formule suivante :

$$X = [(\Delta \text{Do} \cdot V_t / 9,9 \cdot V_s)] / \text{mg de protéines}$$

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.

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB.

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

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

3.7.4. Mesure de l'activité acétyl cholinestérase (Ache) :

La méthode de dosage de l'activité enzymatique est réalisée selon la méthode d'Ellman *et al.*, (1961) modifiée par Trielli *et al.*(2006). Après une centrifugation à 3000 rpm /10 min, nous récupérons 400 µl de surnageant dans un tampon phosphate (0,2 M, pH 8). L'activité Acétylcholine Estérase est calculée selon la formule suivante :

$$X = [(\Delta Do \cdot V_t / 1,36 \cdot 10^4 \cdot V_s)] / \text{mg de protéines}$$

X : nanomole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (nM/mn/mg de protéines).

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

$1,36 \times 10^4$: coefficient d'extinction molaire du DTNB.

V_t : volume total dans la cuve.

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

3.8. Mesure de l'état Redox Cellulaire :

La mesure de cet état comporte deux tests celui des composés prooxidants (d-ROM test) qui nous permet de mesurer le stress oxydant, et celui des composés antioxydants (BAP test) pour la mesure des réponses antioxydantes biologiques.

Il est réalisé grâce à un spectrophotomètre de type (FRAS Evolve System) diagnostic Kit (Pasquini *et al.*, 2008), que nous avons adapté à nos conditions de travail

.

Ainsi la mesure de l'état Redox cellulaire (ROMs et BAPs) nécessite au préalable, un arrêt de la culture, en phase exponentielle, par centrifugation à 1500g x 15 min. s'ensuit une homogénéisation par broyage à l'ultrason des cellules dans un bac de glace pour éviter une dénaturation Cette procédure se déroule en tampon phosphate 100 mM à pH7. L'homogénat obtenu nous servira pour la réalisation des deux tests.

3.8.2. Mesure de Métabolites Réactifs d'Oxygène (ROMs) :

Le principe de ce test est basé sur la réaction des ROMs (ROS) sur un tampon chromogène spécifique N,N-diéthylparaphényldiamine (DEPPD) donnant ainsi une coloration rouge qui sera mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'ondes de 505nm.

3.8.3. Mesure du Potentiel Oxydant Biologique (BAPs) :

Le Potentiel Antioxydant Biologique de nos échantillons est proportionnel à la capacité de réduction de l'ion ferrique Fe^{3+} en ions ferreux Fe^{2+} en suivant par spectrophotométrie (DO505nm) l'intensité de la décoloration par les antioxydants cellulaires de la mixture $FeCl_3$ avec un substrat chromogénique spécifique : le thiocyanate $[SCN]^-$ qui donne une coloration rouge sang en présence d'ions Fe^{3+} par la formation de complexe $[Fe(NCS)(H_2O)_5]^{2+}$.

3.9. L'étude statistique :

L'analyse statistique des données est effectuée en utilisant le test t de student et le test d'analyse de la variance à deux critères (ANOVA) .

Ces tests sont réalisés grâce à un logiciel d'analyse de traitement statistique des données : Minitab13. Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart type ($m \pm s$).

les différences sont considérées comme significatives lorsque * $p \leq 0,05$; hautement significatives lorsque ** $p \leq 0,01$ et très hautement significative lorsque *** $p \leq 0,001$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

1. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur la cinétique de croissance de *Paramecium sp.* :

• Cas de MAD :

La figure (04) représente l'effet des concentrations croissantes du fongicide sur la cinétique de croissance des paramécies témoins et traitées.

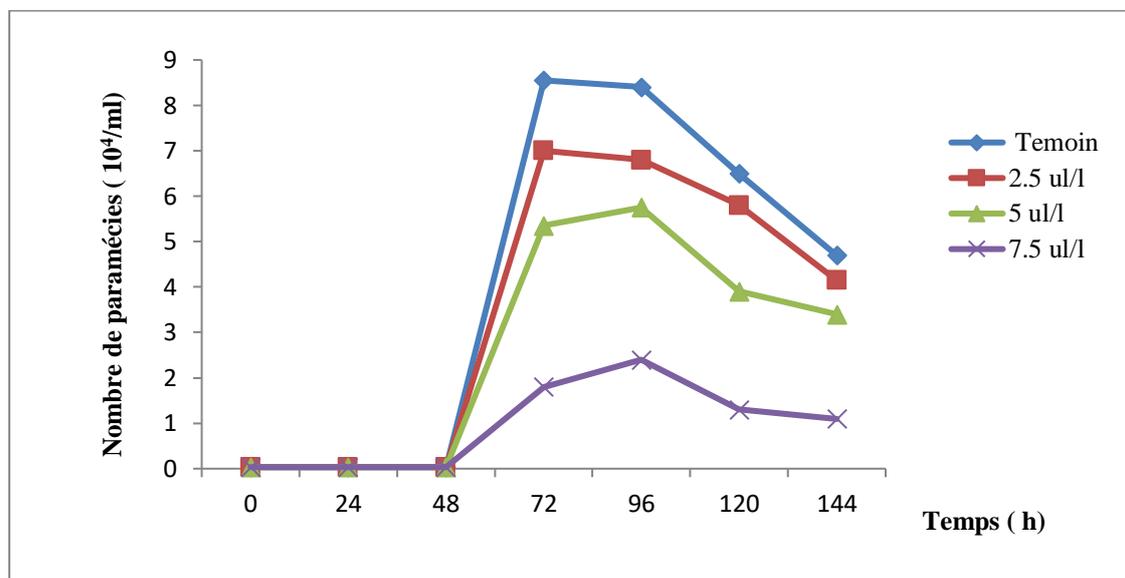


Figure 04 : Effets des concentrations croissantes du MAD sur la cinétique de croissance chez *Paramecium sp.*.

Nous constatons que chez les cellules témoins la croissance est exponentielle à partir de 48h suivie d'un plateau pour diminuer ensuite vers 96h avec un maximum de cellules de l'ordre de 8.5 (10⁴) cellules /ml. Chez les cellules témoins, en revanche, nous observons une inhibition de la croissance cellulaire dose dépendante. Cette inhibition est respectivement de l'ordre de 88% chez les cellules traitées par la plus forte concentration de MAD après 48h de traitement.

• Cas de Cd :

La figure (05) illustre l'effet des concentrations croissantes de Cd sur l'évolution de la cinétique de croissance des paramécies témoins et traitées.

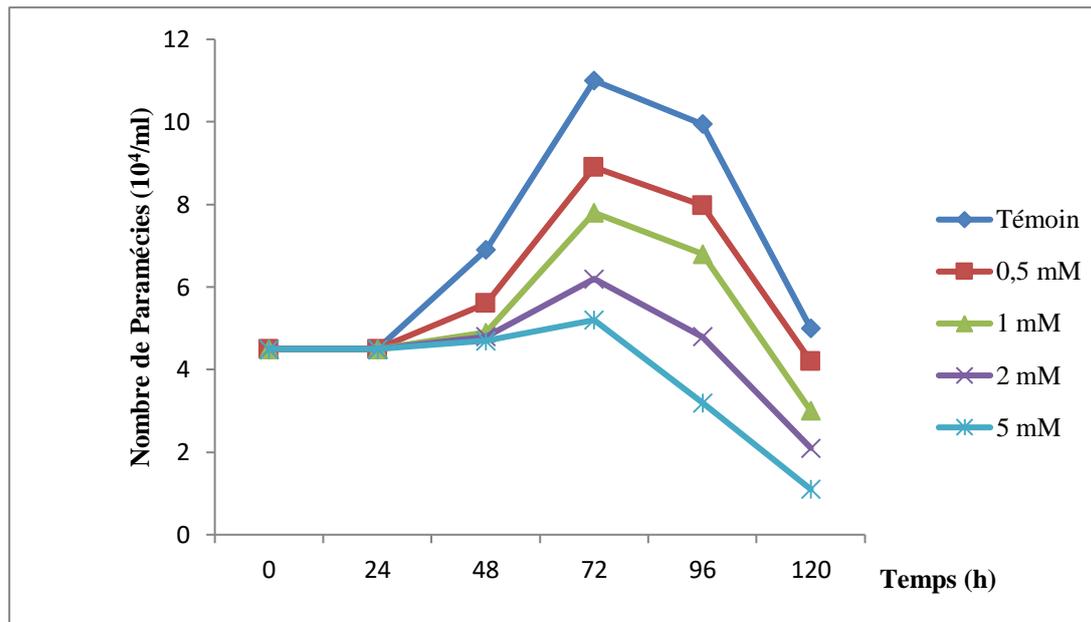
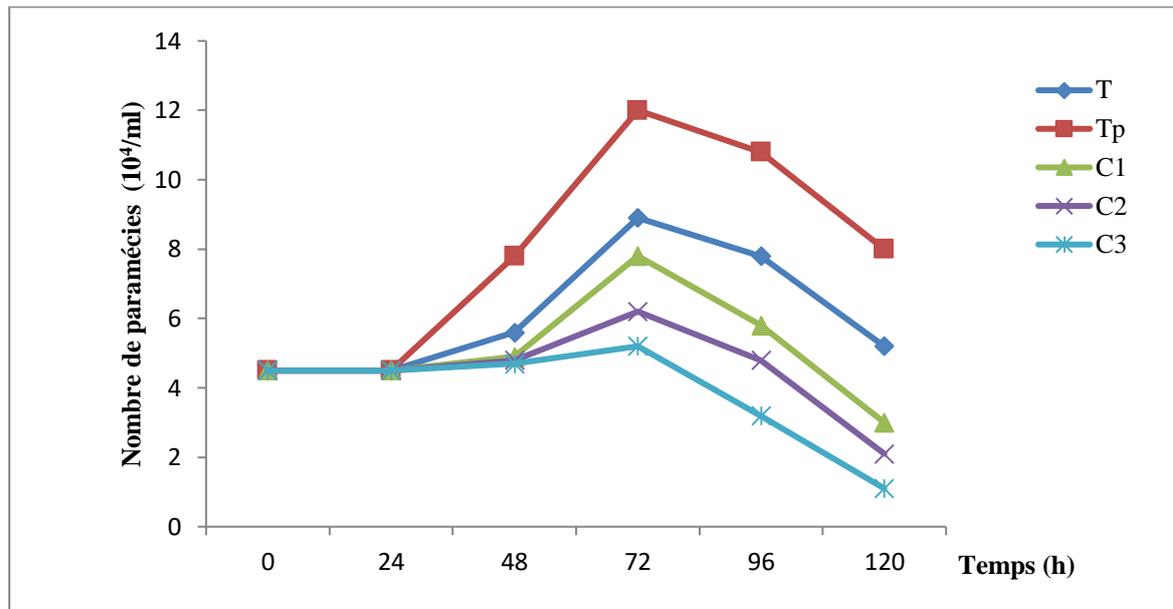


Figure 05 : Effets des concentrations croissantes de Cd sur la cinétique de croissance chez *Paramecium sp.*

Nous remarquons que chez les cellules témoins la croissance est normale avec un pic vers 72h et nombre de cellules de l'ordre de $11(10^4)$, parallèlement chez les cellules traitées, nous constatons une inhibition dose dépendante de la croissance cellulaire. Cette inhibition est de l'ordre 91% chez les cellules traitées par la plus forte concentration de Cd après 24h avec un nombre de cellules ne dépassant pas $45(10^4)$ cellules /ml.

• Cas de la combinaison MAD/Cd :

La figure (06) illustre l'effet des combinaisons de xénobiotiques sur l'évolution de la cinétique de croissance des paramécies avec la présence d'un témoin positif (Tp) qui est la plus faible concentration de Cd ayant induit une stimulation de la croissance cellulaire.



C1 : 2.5 μ l/l (MAD) + 0.5 μ l/l (Cd) C2 : 5 μ l/l (MAD) + 0.5 μ l/l (Cd)
C3 : 7.5 μ l/l (MAD) + 0.5 μ l/l (Cd)

Figure 06 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur la cinétique de croissance chez *Paramecium sp.*

Nous constatons que chez les cellules témoins la cinétique de croissance est normale, alors que chez les témoins positifs, nous observons une stimulation de la croissance de l'ordre de 30% par rapport au témoin.

Parallèlement chez les cellules traitées par les différentes combinaisons de xénobiotiques, la croissance cellulaire est inhibée de manière dose dépendante. Cette inhibition est de l'ordre de 60% et ce dès 24h de traitement par rapport aux témoins. Ainsi chez les témoins le nombre de cellules est de l'ordre de 9 (10^4) cellules après 72h de traitement chez les témoins alors qu'il n'est que de 5 (10^4) cellules pour le même temps de traitement.

2. Effet de mandipropamide de cadmium et leurs combinaisons sur le pourcentage de réponse de *Paramecium sp.* :

• Cas de MAD :

La figure (07) met en évidence l'évolution du pourcentage de réponse des cellules traitées par des concentrations croissantes de MAD. Ainsi, nous constatons que ce paramètre reste positif et ce pour toutes les concentrations testées confirmant l'effet inhibiteur du xénobiotique.

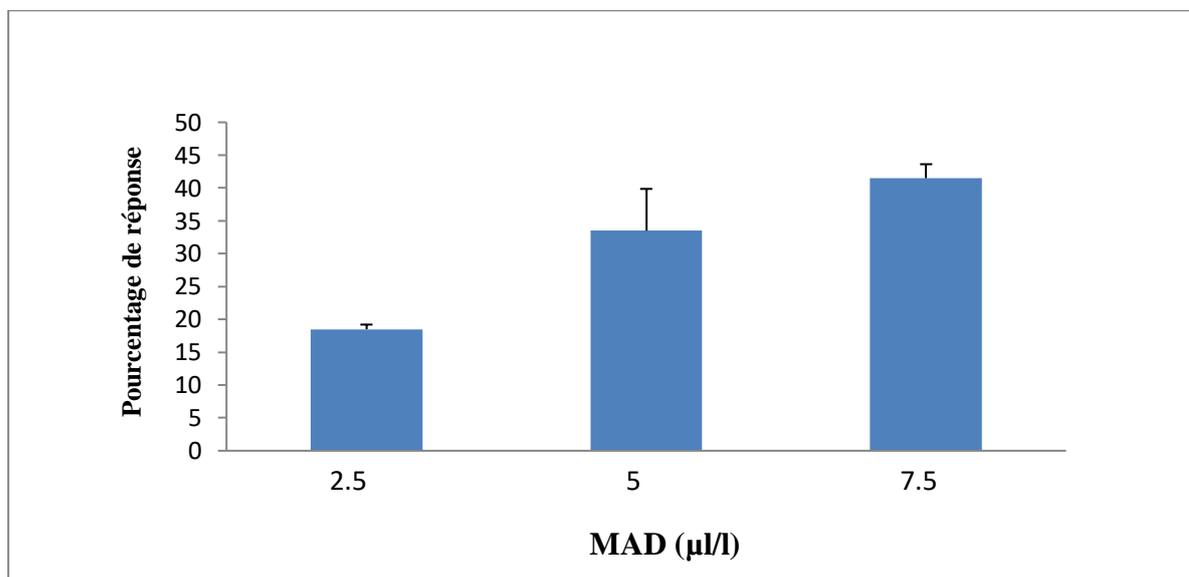


Figure 07 : Effets des concentrations croissantes du MAD sur le pourcentage de réponse chez *Paramecium sp.*

Ce pourcentage varie respectivement de 19% à 35% pour les concentrations 2.5 et 5 µl/l. et augmente jusqu'à 50% à la plus forte concentration de MAD (7.5 µl/l).

• Cas de Cd :

La figure (08) met en évidence l'évolution du pourcentage de réponse des paramécies traitées par des concentrations croissantes de Cd. Nous constatons une augmentation dose dépendante de ce paramètres.

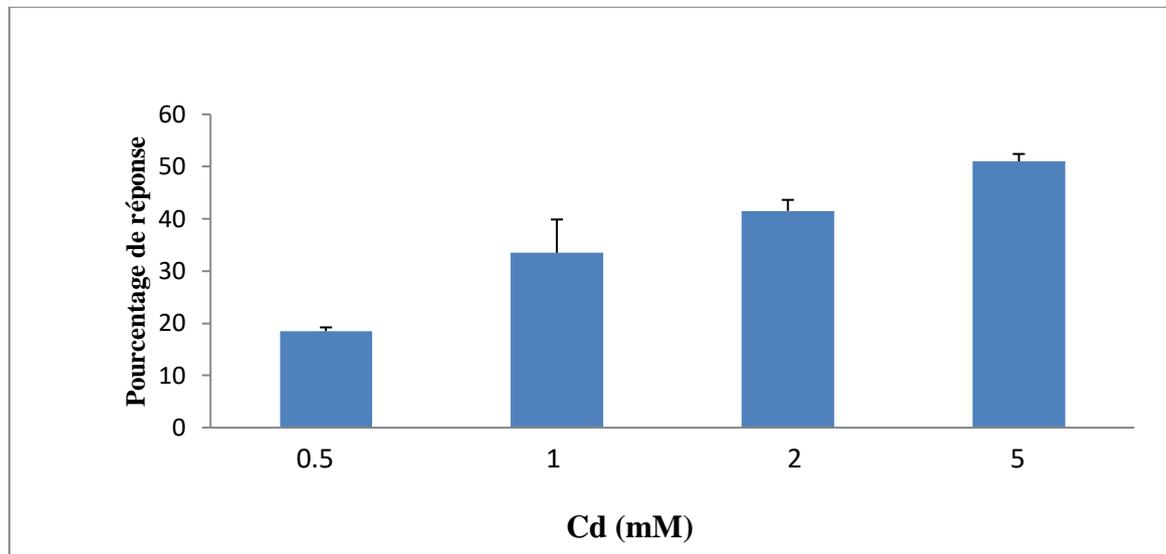
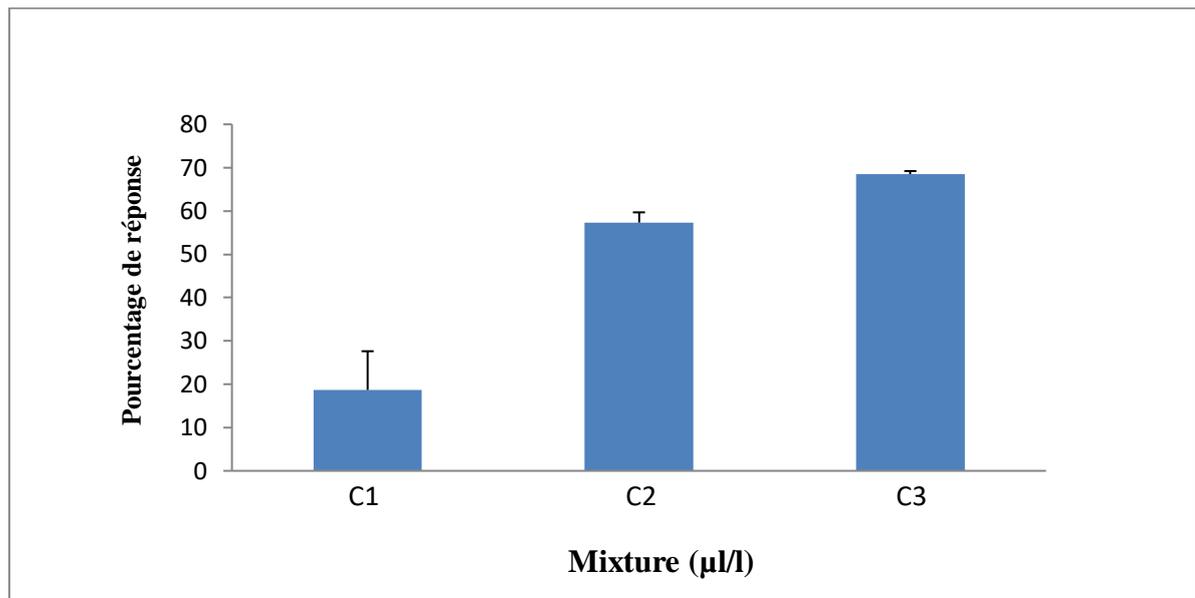


Figure 08 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur le pourcentage de réponse chez *Paramecium sp.*

Ce pourcentage varie respectivement de 19% ,35% à 40% pour les concentrations 0.5 et 1 et 2 mM et augmente de 50% à la plus forte concentration de Cd (5 mM).

• Cas de la combinaison :

La figure (09) illustre l'effet des combinaisons MAD/Cd sur l'évolution du pourcentage de réponse.



C1 : 2.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd) C2 : 5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)
C3 : 7.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)

Figure 09 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur le pourcentage de réponse chez *Paramecium sp.*

Nous constatons que le pourcentage de réponse est positif pour toutes les combinaisons testées. Ceci reflète une forte inhibition dose dépendante. Ainsi, ce pourcentage varie respectivement de 20% à 60% pour les concentrations 2.5 et 5 µl/l. et augmente de 70% chez les traitées avec la combinaison MAD/Cd.

3. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et leurs combinaisons sur les variations du taux des protéines totales des *Paramecium sp.* :

• Cas du MAD :

La figure (10) représente l'évolution du taux de protéines en fonction des différentes concentrations de MAD à court terme.

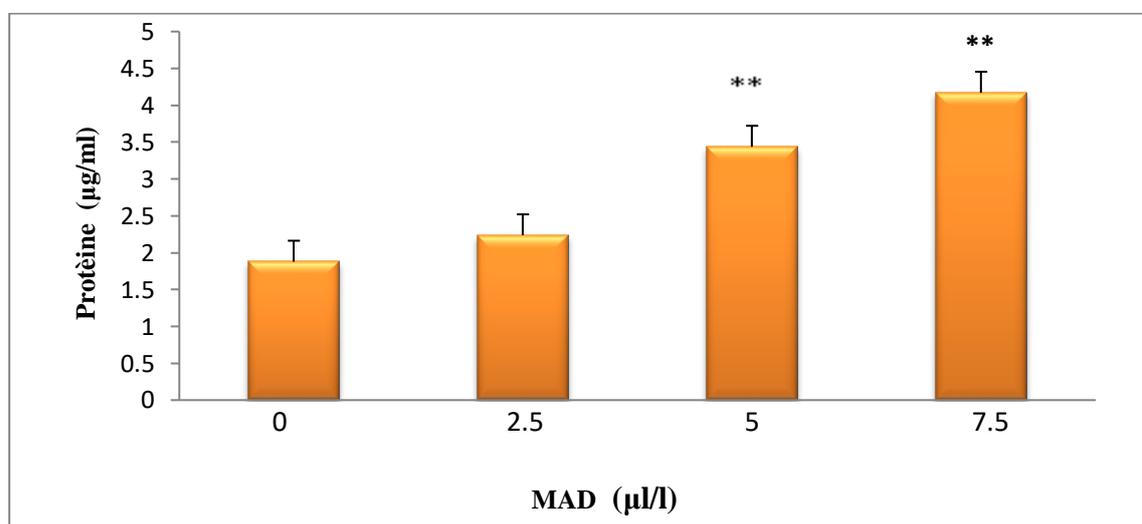


Figure 10 : Effets des concentrations croissantes de MAD sur le taux des protéines totales chez *Paramecium sp.*

Nous constatons que ce paramètre tend à augmenter de manière dose dépendante et hautement significative ($p \leq 0,01$) pour les concentrations 5 et 7.5 µl/l par rapport au témoin.

En effet, le taux passe de 1.9 µg/ml de protéines chez les cellules témoins à 4 µg/ml de protéines pour les cellules traitées.

• Cas de Cd :

La figure (11) représente l'évolution du taux de protéines en fonction des différentes concentrations de Cd au court terme.

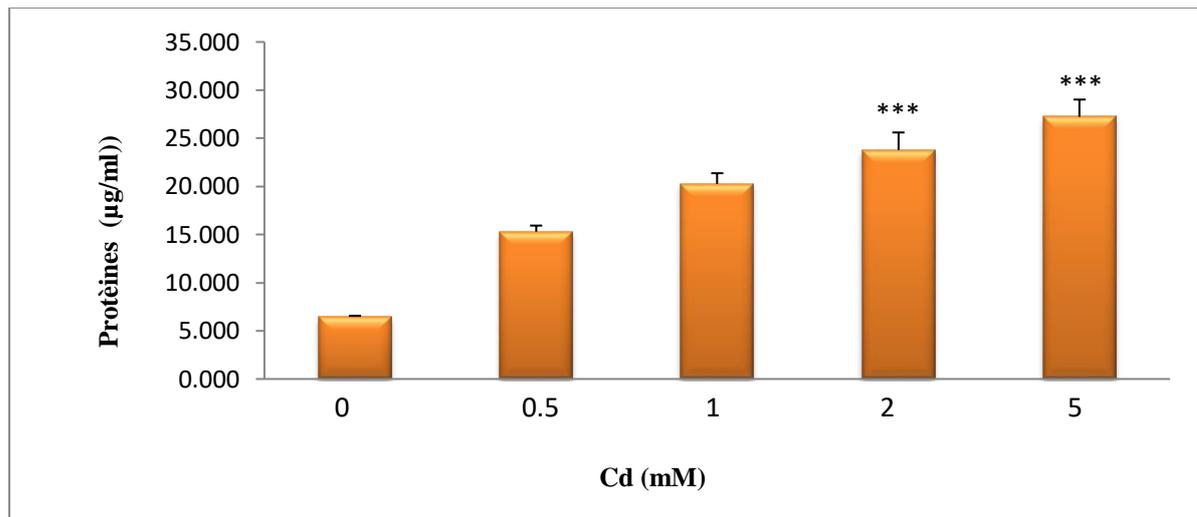


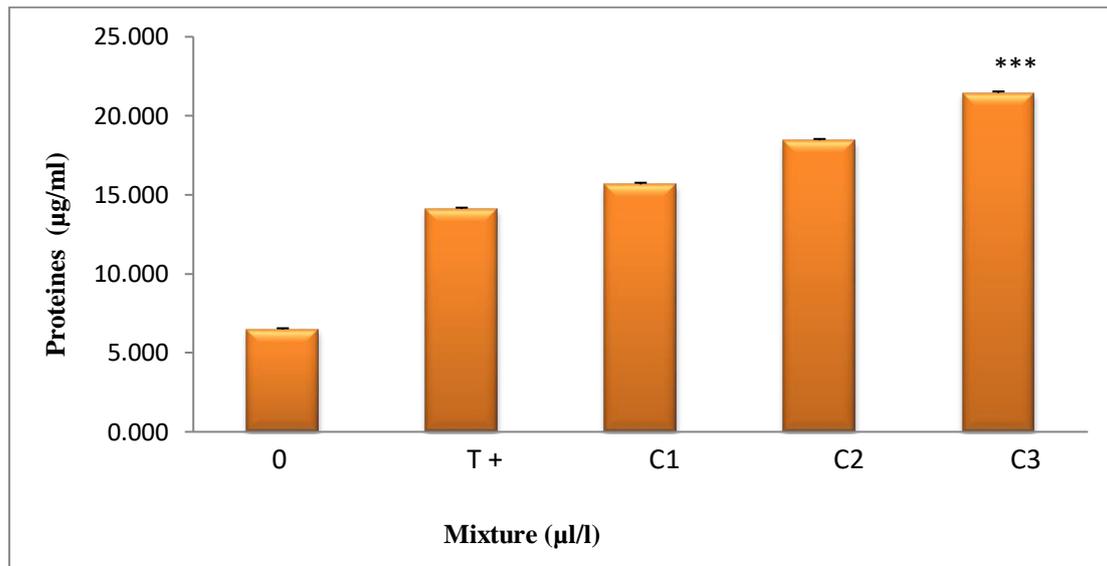
Figure 11 : Effets des concentrations croissantes de Cd sur le taux des protéines totales chez *Paramecium sp.*

Nous observons ainsi une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) du taux des protéines chez les traitées par les concentrations 2 et 5 mM par rapport aux cellules témoins.

En effet, le taux passe de 8 µg/ml de protéines chez les cellules témoins à 27 µg/ml de protéines pour les cellules traitées.

• **Cas de la combinaison :**

La figure (12) représente l'évolution du taux des protéines totales en fonction des différentes concentrations de la mixture des deux xénobiotiques à court terme.



C1 : 2.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd) **C2** : 5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)
C3 : 7.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)

Figure 12 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur le taux des protéines totales chez *Parametium sp.*

Nous remarquons en premier lieu une importante déplétion du témoin positif par rapport au témoin, tant dis que les concentrations croissantes de la mixture augmentent de façon très hautement significative ($p \leq 0.001$).

Le taux passe de 6 µg/ml de protéines chez les cellules témoins à 22 µg/ml de protéines pour les cellules traitées par la plus forte concentration C3

4. Effets de Mandipropamide, de cadmium et de leurs combinaisons sur le métabolisme respiratoire chez *Paramecium sp.* :

• Cas de MAD :

La figure (13) illustre l'effet du MAD sur le métabolisme respiratoire des paramécies témoins et traitées aux différents temps de traitement.

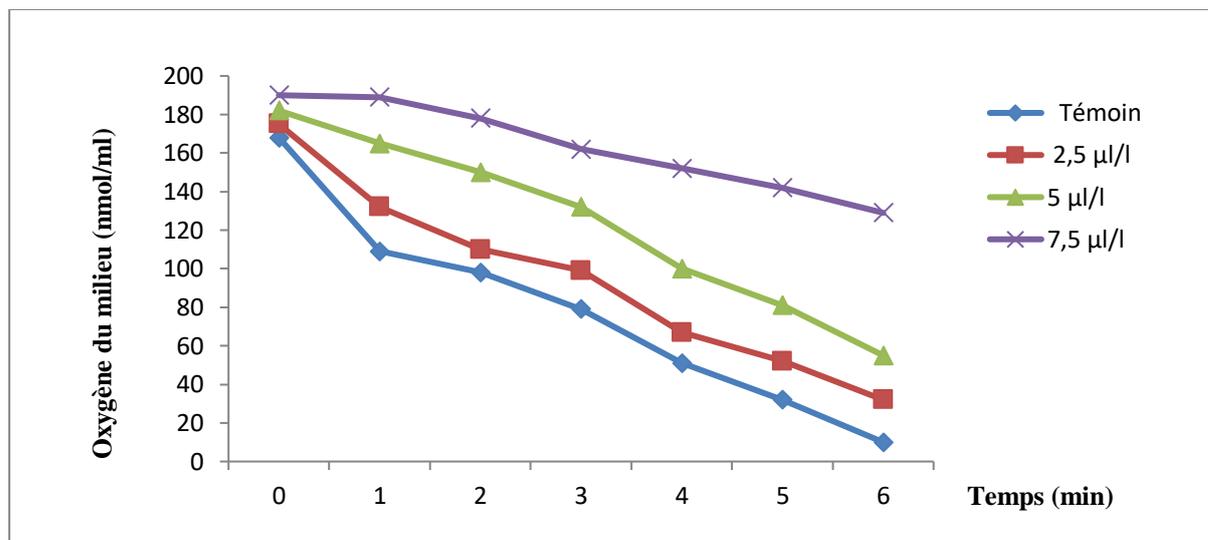


Figure 13 : Effets des concentrations croissantes de MAD sur le métabolisme respiratoire chez *Paramecium sp.*

Nous remarquons que les cellules traitées consomment moins d'oxygène, cette consommation semble dose dépendante. Le taux d'oxygène dans le milieu chez les témoins et traitées à 0 min est de l'ordre de 180 nmol/ml. Il baisse en fonction des concentrations du xénobiotique et atteint après 6 min d'incubation les 15 nmol/ml oxygène chez les témoins, parallèlement ce taux chez les cellules traitées n'est que d'environ 140 nmol/ml oxygène. Ainsi, le MAD a tendance à inhiber la respiration des cellules particulièrement à la plus forte concentration (7.5µl/l).

• Cas de Cd :

La figure (14) illustre l'effet de Cd sur le métabolisme respiratoire des paramécies témoins et traitées aux différents temps de traitement.

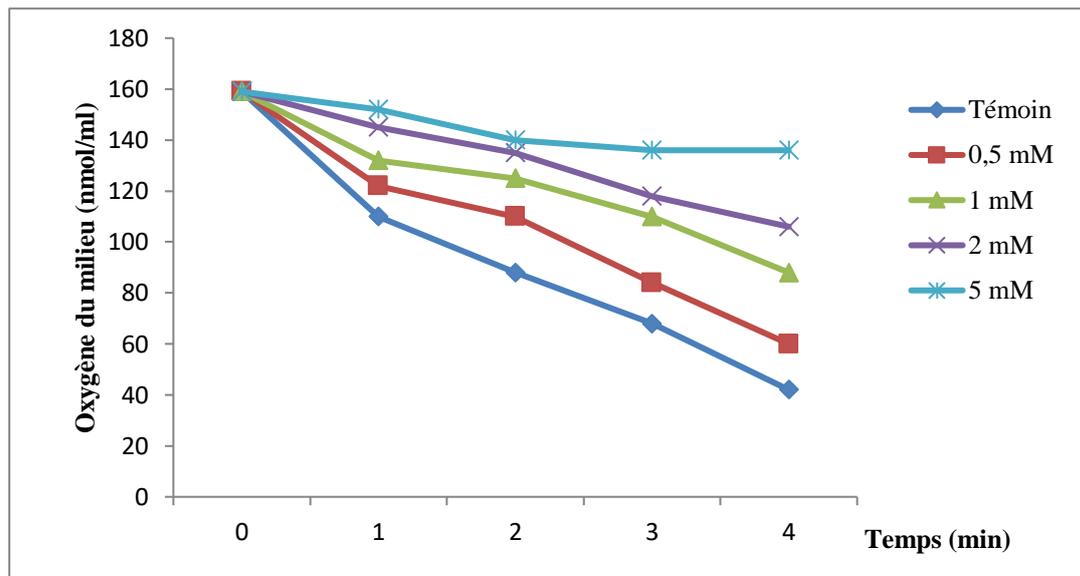
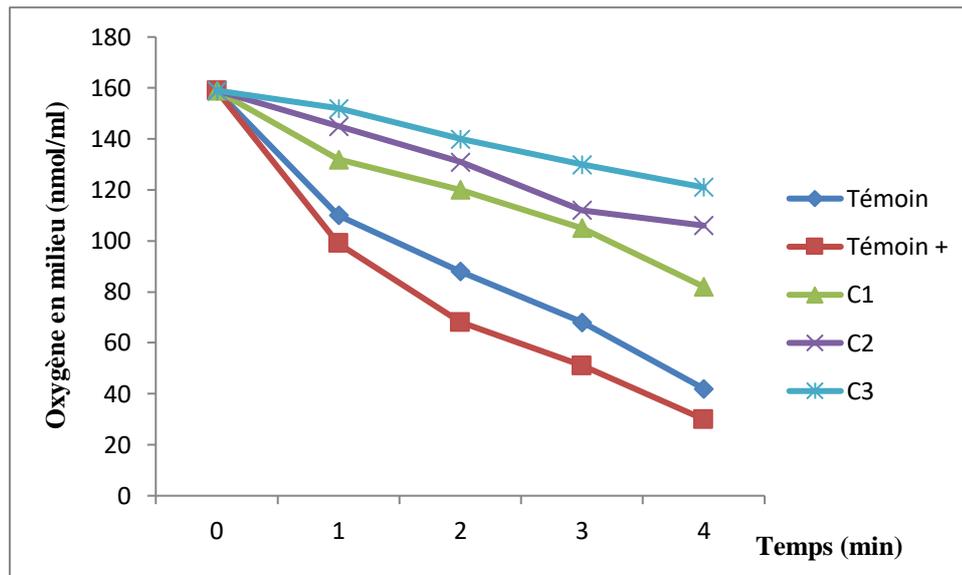


Figure 14 : Effets des concentrations croissantes de Cd sur le métabolisme respiratoire chez *Paramecium sp.*

Nous remarquons que les cellules traitées consomment moins d'oxygène, cette consommation semble dose dépendante. Le taux d'oxygène dans le milieu chez les témoins et traitées à 0 min est de l'ordre de 160 nmol/ml. Il baisse en fonction des concentrations du xénobiotique et atteint après 4 min d'incubation les 50 nmol/ml oxygène chez les témoins, parallèlement ce taux chez les cellules traitées n'est que d'environ 140 nmol/ml oxygène. Ainsi, le Cd a tendance à inhiber la respiration des cellules particulièrement à la plus forte concentration (5 mM).

• Cas de la combinaison MAD/Cd :

La figure (15) illustre l'effet de différentes combinaisons des deux xénobiotiques sur le métabolisme respiratoire des paramécies témoins et traitées aux différents temps de traitement.



C1 : 2.5 μ l/l (MAD) + 0.5 μ l/l (Cd) C2 : 5 μ l/l (MAD) + 0.5 μ l/l (Cd)
 C3 : 7.5 μ l/l (MAD) + 0.5 μ l/l (Cd)

Figure 15 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur le métabolisme respiratoire chez *Paramecium sp.*

Nous constatons que les cellules traitées consomment moins d'oxygène, cette consommation semble dose dépendante. Le taux d'oxygène dans le milieu chez les témoins, les témoins + et les traitées à 0 min est de l'ordre de 160 nmol/ml. Il baisse en fonction des concentrations du xénobiotique et atteint après 4 min d'incubation les 50 nmol/ml oxygène chez les témoins, 35 nmol/ml chez les témoins + ; cette stimulation est plus faible que celle enregistrée chez les témoins parallèlement ce taux chez les cellules traitées n'est que d'environ 130 nmol/ml oxygène. Ainsi,

5. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur les variations de l'activité catalase chez *Paramecium sp.* :

• cas de MAD :

La figure (16) représente les variations de l'activité catalase chez les paramécies traitées par les concentrations croissantes de MAD.

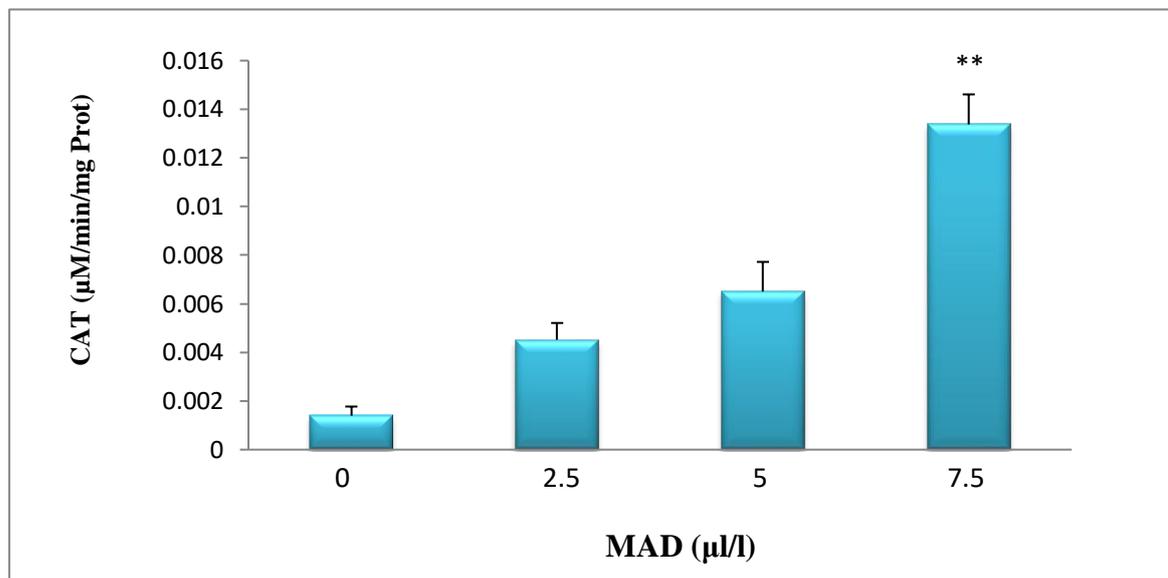


Figure 16 : Effets des concentrations croissantes de MAD sur les variations de l'activité CAT chez *Paramecium sp.*

Nous constatons que cette activité enzymatique tend à augmenter de manière dose-dépendante et hautement significative ($P \leq 0.01$) chez les traités. En effet, l'activité catalase passe de 0.002 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines chez les cellules témoins à 0.013 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines pour la plus forte concentration 7.5 $\mu\text{l}/\text{l}$. cette augmentation est de l'ordre de 65 %

• Cas de Cd :

La figure (17) met en évidence les variations de l'activité catalase chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes de Cd.

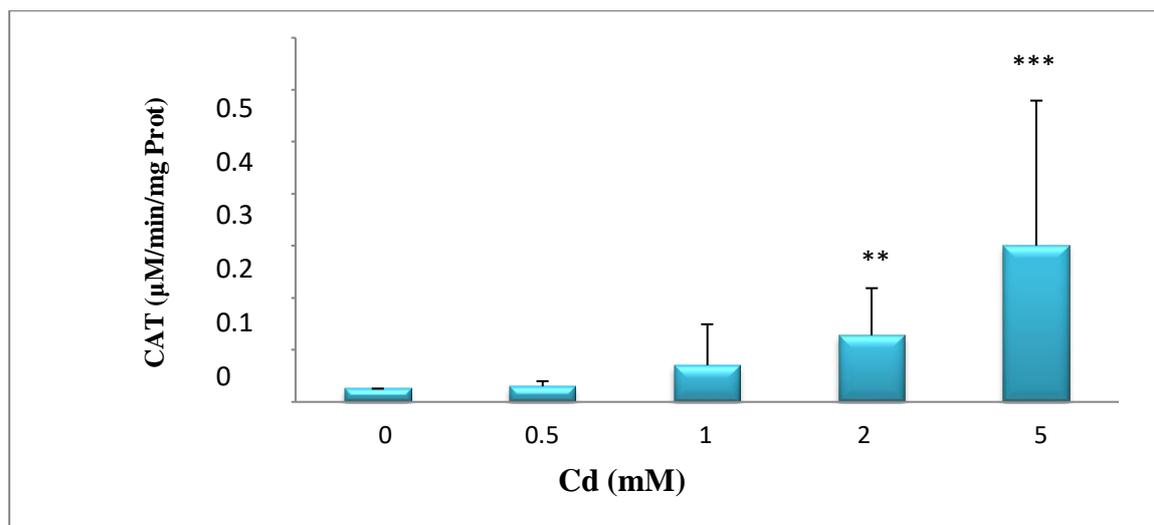
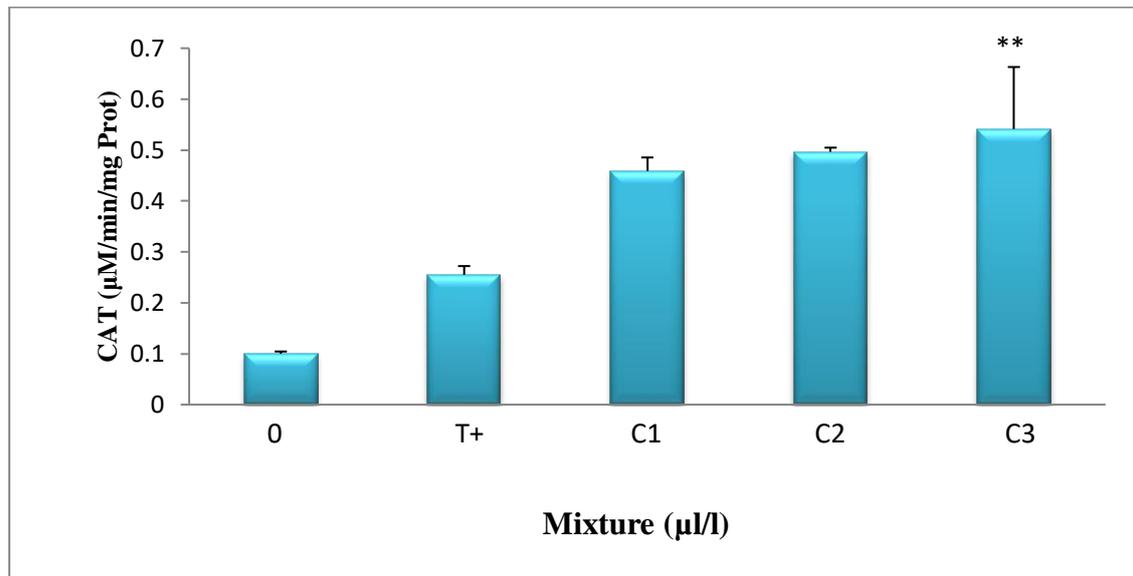


Figure 17 : Effets des concentrations croissantes de Cd sur les variations de l'activité CAT chez *Paramecium sp.*

Nos résultats montrent que cette activité enzymatique tend à augmenter de manière dose-dépendante et très hautement significative ($P \leq 0.001$) particulièrement pour la plus forte concentration de Cd (5 mM). Ainsi, cette activité passe de 0.05 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines chez les cellules témoins à 0.3 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines pour la plus forte concentration 5 mM.

• Cas de la combinaison MAD/Cd :

La figure (18) illustre les variations de l'activité catalase chez les paramécies traitées par les différentes combinaisons MAD/Cd.



C1 : 2.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd) **C2** : 5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)
C3 : 7.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)

Figure 18 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur les variations de l'activité CAT chez *Paramecium sp.*

Nos résultats montrent que cette activité enzymatique tend à augmenter de manière hautement significative ($P \leq 0.01$) pour la concentration C3, elle est proportionnelle à la concentration du MAD. En effet, cette activité passe de 0.1 µM/min/mg protéines chez les cellules témoins à 0.55 µM/min/mg protéines pour la plus forte concentration 7.5 µl/l. D'autre part, nos résultats révèlent un faible effet de la concentration de Cd testée sur l'activité catalase puisque celle-ci n'est que de l'ordre de (40%) chez les traitées par le Cd.

6. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur l'évolution du taux de GSH chez *Paramecium sp.* :

- Cas de MAD :

La figure (19) illustre l'évolution du taux de GSH chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes de MAD.

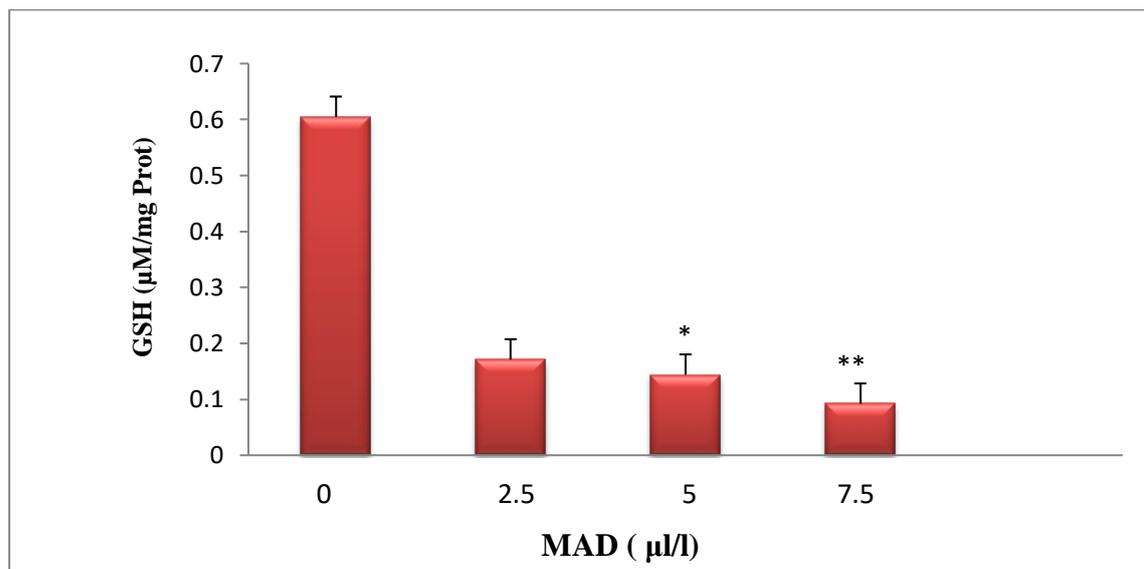


Figure 19 : Effets des concentrations croissantes de MAD sur l'évolution du taux de GSH chez *Paramecium sp.*

Nous constatons que le taux de GSH tend à diminuer de manière dose dépendante et hautement significative particulièrement pour traitées par la dernière concentration de MAD (7.5 µl/l) comparées aux témoins. Ainsi , ce taux passe de 0.60 µM/min/mg de protéines chez les témoins à 0.10 µM/min/mg de protéines chez les cellules traitées par la plus forte concentration (7.5 µl/l).

- Cas de Cd :

La figure (20) illustre l'évolution du taux du GSH chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes de Cd :

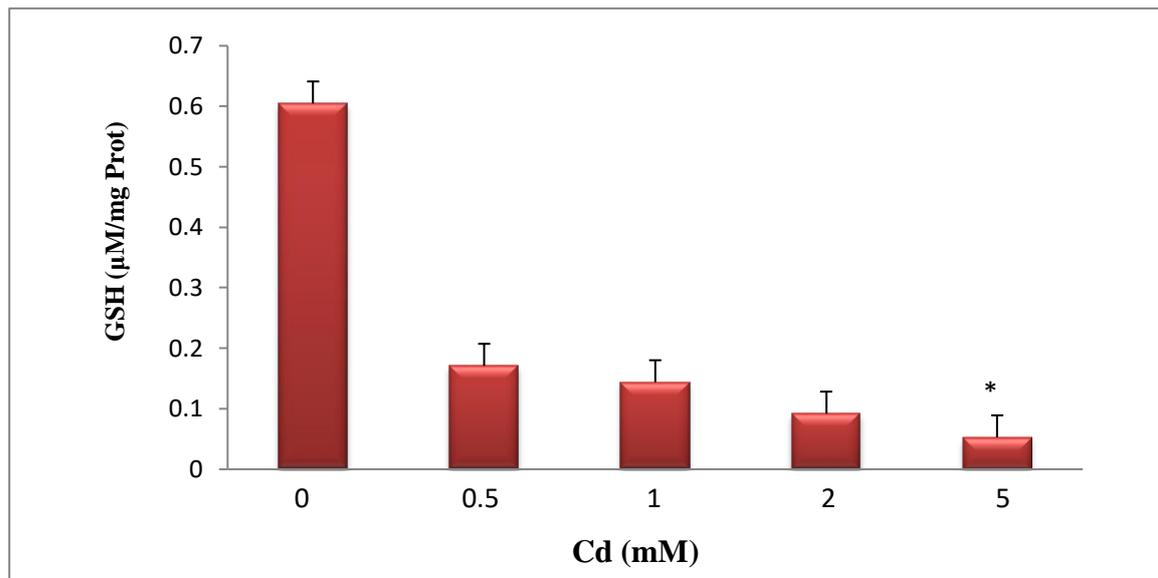
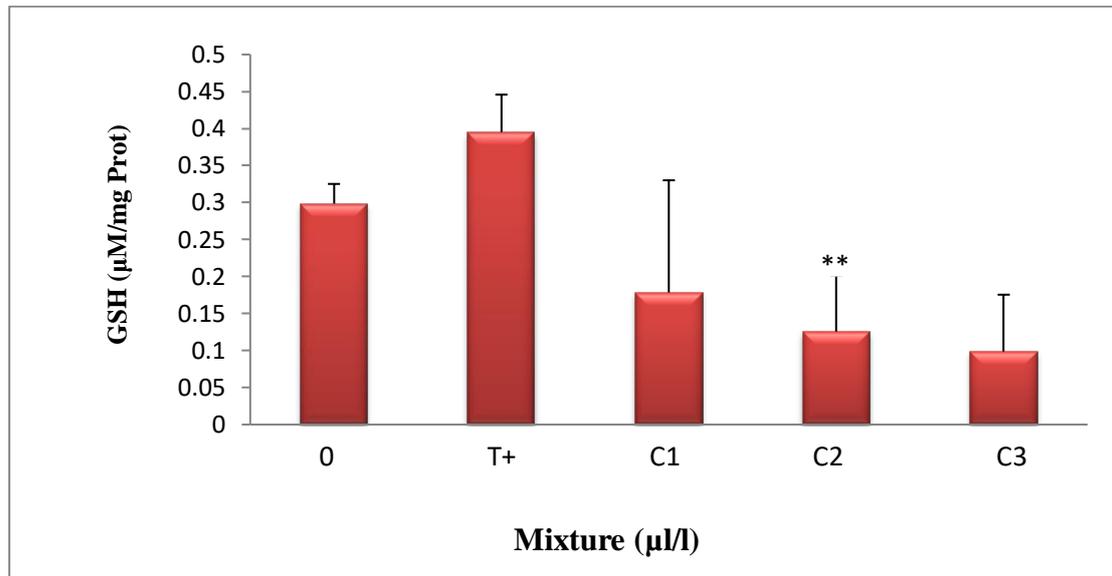


Figure 20 : Effets des concentrations croissantes de Cd sur l'évolution du taux du GSH chez *Paramecium sp.*

Nous constatons que le taux de GSH tend à diminuer de manière dose dépendante et significative ($P \leq 0.05$) particulièrement chez les paramécies traitées par la plus forte concentration (5 mM) comparées aux témoins. Ainsi, ce taux passe de 0.60 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins à 0.05 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les cellules traitées par la plus forte concentration (5 mM).

• Cas de la combinaison MAD/Cd :

La figure (21) illustre l'évolution du taux du GSH chez les paramécies traitées par les différentes combinaisons de xénobiotiques.



C1 : 2.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd) C2 : 5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)
 C3 : 7.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)

Figure 21 : Effets des différentes combinaisons de MAD/Cd sur l'évolution du taux du GSH chez *Paramecium sp.*

Nous constatons que le taux de GSH tend à diminuer de manière dose dépendante et hautement significative ($P \leq 0.01$) particulièrement chez les paramécies traitées par la combinaison C2 comparées aux témoins. Ainsi, le taux de GSH passe de 0.30 µM/min/mg de protéines chez les témoins à 0.10 µM/min/mg de protéines chez les traitées par la combinaison C3.

Cependant, chez le témoin positif (Cd) nos résultats révèlent une augmentation du taux de GSH de l'ordre de 11% par apport aux témoins.

7. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur les variations de l'activité GST chez *Paramecium sp.* :

• Cas de MAD :

La figure (22) illustre les variations de l'activité GST chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes du MAD.

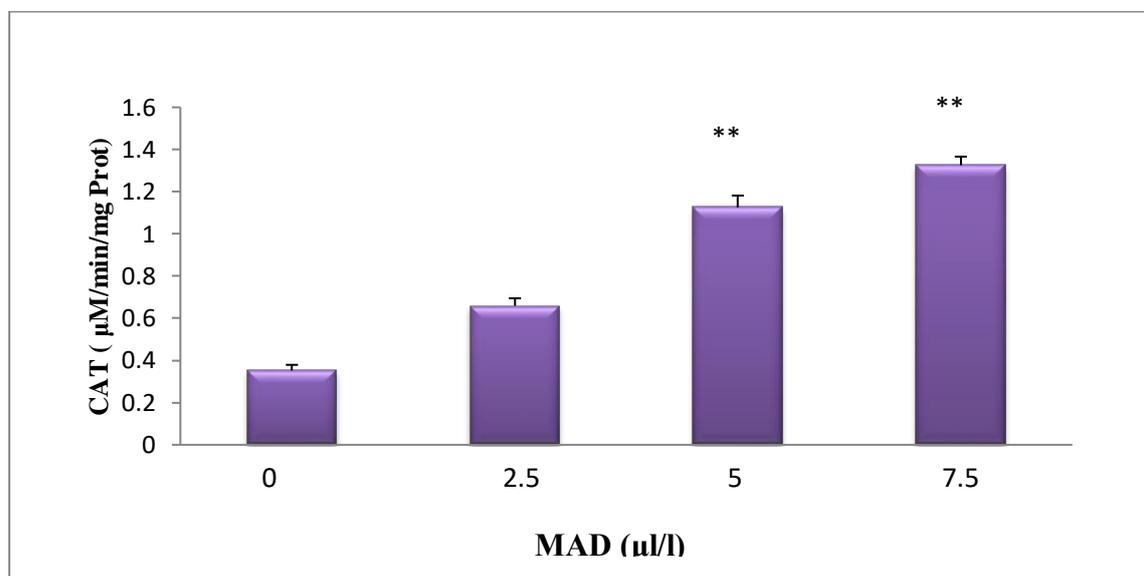


Figure 22 : Effets des concentrations croissantes de MAD sur les variations de l'activité GST chez *Paramecium sp.*

Nos résultats montrent que l'activité GST est induite de manière dose dépendante et hautement significative ($P \leq 0.01$) particulièrement pour les plus fortes concentrations de MAD 5 et 7.5 (μl/l). Ainsi, elle atteint environ 1.4 μM/min/mg de protéines chez les traitées par la plus forte concentration de xénobiotiques par rapport aux témoins qui est de 0.4 μM/min/mg de protéines.

• Cas de Cd :

La figure (23) illustre les variations de l'activité GST chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes de Cadmium.

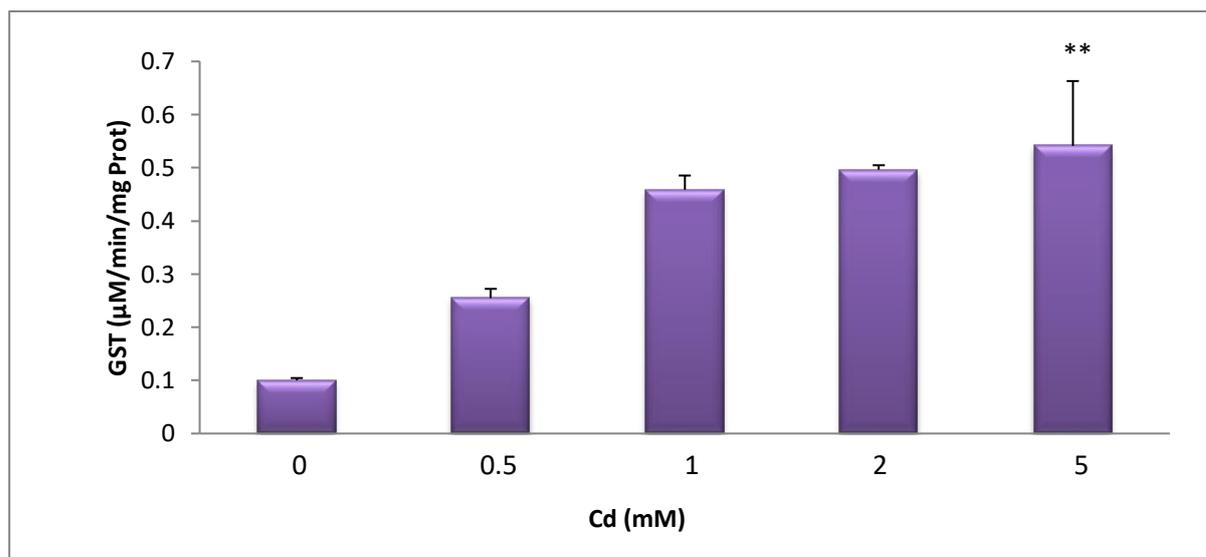
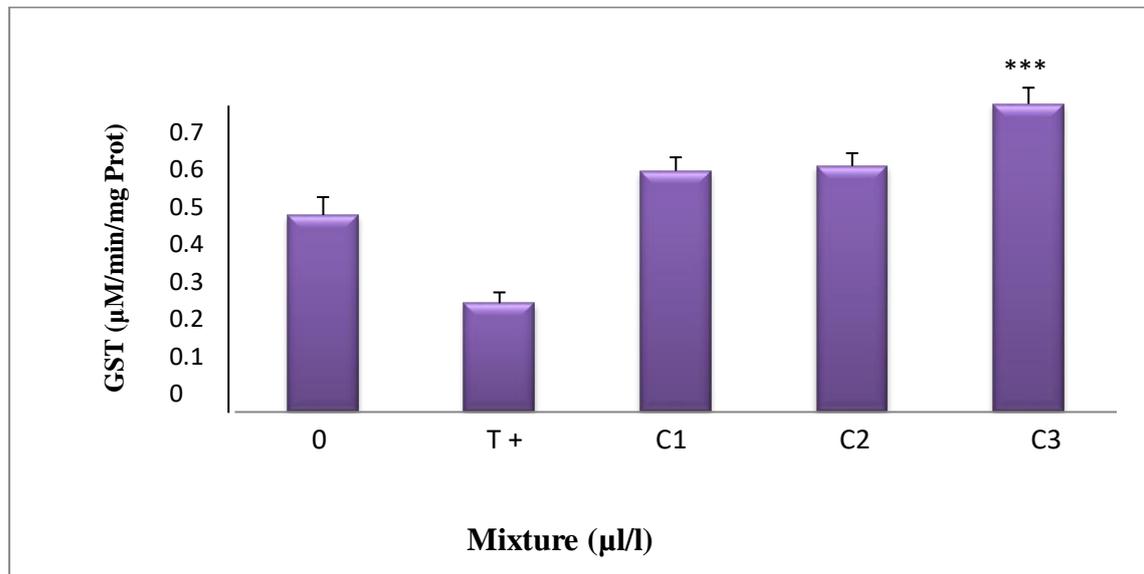


Figure 23 : Effets des concentrations croissantes de Cd sur les variations de l'activité GST chez *Paramecium sp.*

Nos résultats montrent que l'activité GST augmente de manière dose dépendante et hautement significative ($P \leq 0.01$) chez les paramécies traitées par la plus forte concentration de Cd (5 mM). Ainsi, cette activité atteint jusqu'à 0.50 µM/min/mg protéines pour la plus forte concentration de Cd alors qu'elle n'est que de 0.1 µM/min/mg protéines chez les témoins.

• Cas de la combinaison MAD/Cd :

La figure (24) illustre les variations de l'activité GST chez les paramécies traitées par les différentes combinaisons de xénobiotiques.



C1 : 2.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd) C2 : 5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)
 C3 : 7.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)

Figure 24 : Effets des combinaisons MAD/Cd sur les variations de l'activité GST chez *Paramecium sp*

Nos résultats montrent que l'activité GST augmente de manière dose dépendante et très hautement significative ($P \leq 0.001$) pour la combinaison C3 et ce par rapport aux témoins. Ainsi, l'activité enzymatique de 0.5 µM/min/mg de protéines chez les témoins à 0.7 µM/min/mg de protéines chez les traitées par la combinaison C3. Parallèlement nous avons mis en évidence une induction du témoin positif de l'ordre de 49% par rapport aux témoins.

8. Effets de Mandipropamide, de Cadmium et de leurs combinaisons sur les variations de l'activité AchE chez *Paramecium sp.* :

• Cas de MAD :

La figure (25) illustre les variations de l'activité AchE chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes de MAD.

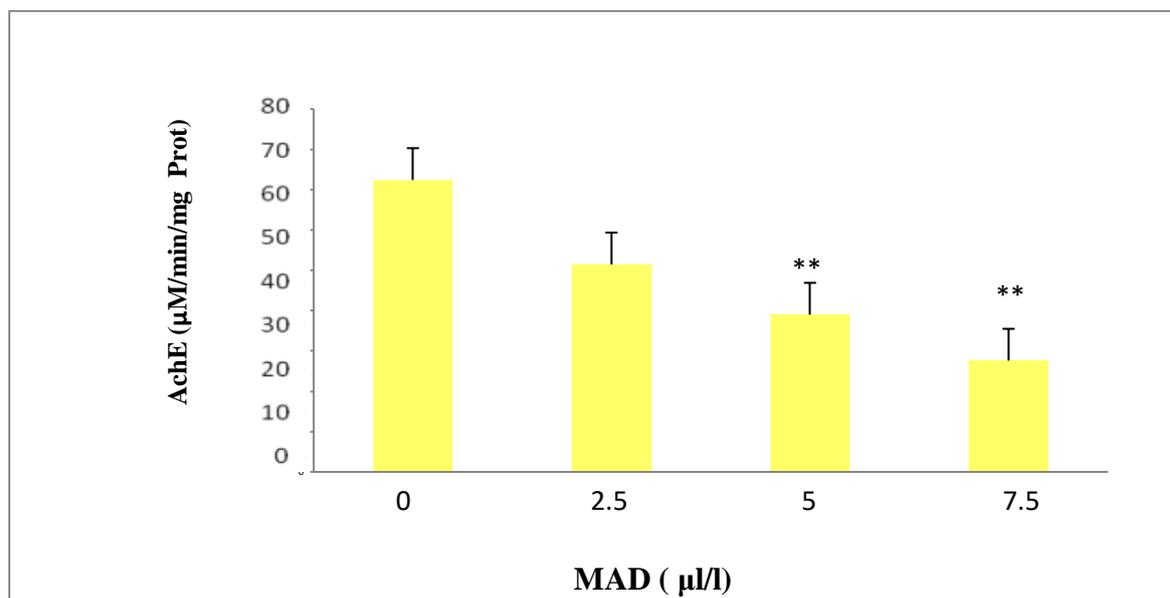


Figure 25 : Effets des concentrations croissantes de MAD sur les variations de l'activité AchE chez *Paramecium sp*

Nous constatons que l'activité AchE tend à diminuer de manière dose dépendante et hautement significative ($P \leq 0.01$) chez les paramécies traitées par la plus forte concentration de xénobiotique comparées aux témoins. Ainsi, cette activité enzymatique passe de 60 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins à 30 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les cellules traitées par la plus forte concentration de MAD (7.5 $\mu\text{l}/\text{l}$).

• Cas de Cd :

La figure (26) illustre les variations de l'activité AchE chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes de Cadmium.

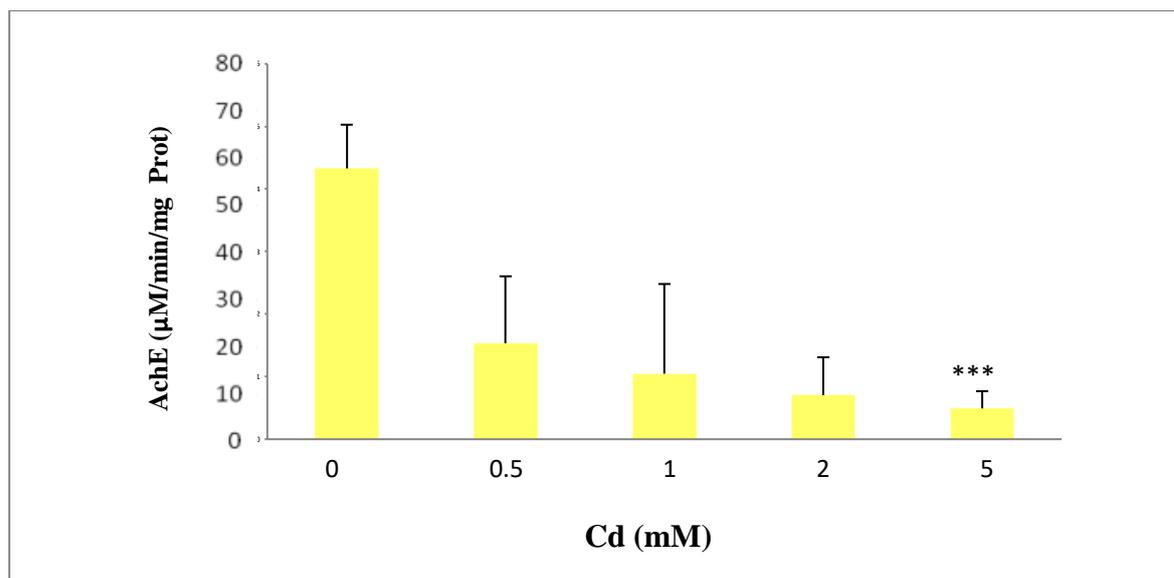
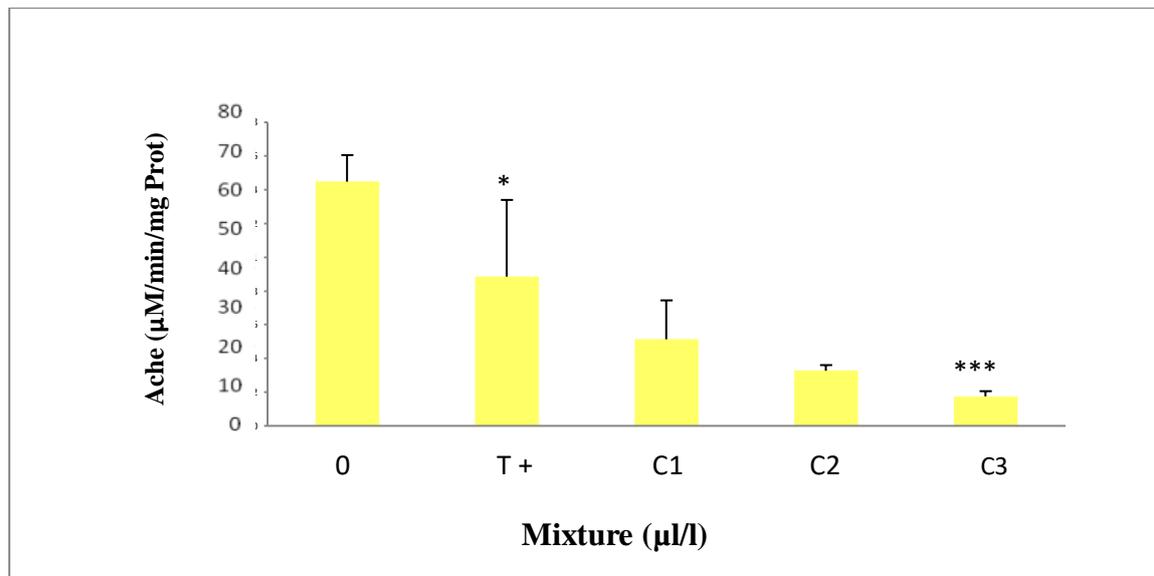


Figure 26 : Effets des concentrations croissantes du Cd sur les variations de l'activité AchE chez *Paramecium sp*

Nous constatons que de l'activité AchE tend à diminuer de manière dose dépendante et très hautement significative ($P \leq 0.001$) chez les paramécies traitées par la plus forte concentration comparées aux témoins. Ainsi , cette activité passe de 40 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins à 5 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les cellules traitées par la plus forte concentration (5 mM).

• Cas de la combinaison MAD/Cd :

La figure (27) illustre les variations de l'activité AchE chez les paramécies traitées par les différentes combinaisons de xénobiotiques.



C1 : 2.5μl/l (MAD) + 0.5μl/l (Cd) C2 : 5μl/l (MAD) + 0.5μl/l (Cd)
 C3 : 7.5μl/l (MAD) + 0.5μl/l (Cd)

Figure 27 : Effets des différentes combinaisons MAD/Cd sur les variations de l'activité AchE chez *Paramecium sp*

Nous constatons que l'activité AchE tend à diminuer de manière dose dépendante très hautement significative ($P \leq 0.001$) chez les paramécies traitées par la combinaison C3 comparées aux témoins et témoins positifs dont l'induction est plus importante que celle des témoins. Ainsi, l'activité enzymatique passe de 70 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins à 5 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les cellules traitées par la combinaison C3.

9. Effets de Mandipropamide, Cadmium et des combinaisons MAD/Cd sur Evolution du taux d'espèces Réactifs à l'Oxygène chez *Paramecium sp.* :

- Cas de MAD :

Les résultats concernant l'évolution du taux d'Espèces Réactive à l'Oxygène (ROS) chez *Paramecium sp.* exposées à des concentrations croissantes de MAD, sont représentés dans le tableau (5).

Tableau 5 : Effets des concentrations croissantes de MAD sur le taux de ROS chez *Paramecium sp.*

| MAD ($\mu\text{l/l}$) | 0 | 2.5 | 5 | 7.5 |
|-------------------------|----|-----|----|-----|
| ROS (U carr) | 11 | 17 | 20 | 24 |

Nous constatons que le taux de ROS augmente de manière dose dépendante chez toutes les cellules traitées comparées aux témoins. Ainsi ce taux passe de 11 U carr chez les témoins à 24 U carr chez les traités par la plus forte concentration de MAD.

- **Cas de Cd :**

L'évolution du taux de ROS chez *Paramecium sp.* Exposées à des concentrations croissantes de Cd, est illustrée dans le tableau (6).

Tableau 6 : Effets des concentrations croissantes de Cd sur l'évolution du taux de ROS chez *Paramecium sp.*

| Cd (mM) | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
|--------------|------|-------|----|-------|----|
| ROS (U carr) | 12.6 | 13.80 | 15 | 17.30 | 24 |

Nous constatons que le taux de ROS augmente de manière dose dépendante chez toutes les cellules traitées comparées au Cd par rapport aux témoins. Ainsi ce taux passe de 12.6 U carr pour le témoin à 24 U carr chez les traités par la plus forte concentration de Cd

- **Cas de la combinaisons MAD/Cd :**

Les résultats concernant l'évolution du taux de ROS chez *Paramecium sp.* Exposées aux différentes combinaisons de xénobiotiques sont représentés dans le tableau (7).

Tableau 7 : Effets des combinaisons de xénobiotiques sur l'évolution du taux de ROS chez *Paramecium sp.*

| MAD/Cd (µl/l) | 0 | 0.5 | C1 | C2 | C3 |
|---------------|------|-----|----|----|----|
| ROS (U carr) | 12.6 | 13 | 24 | 24 | 24 |

C1 : 2.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd) **C2** : 5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)

C3 : 7.5µl/l (MAD) + 0.5µl/l (Cd)

Nous constatons que le taux de ROS, augmente chez toutes les cellules traitées comparées au témoin. Ainsi ce taux passe de 12.6 U carr pour les témoins à 24 U carr chez les traités. Nos résultats mettent en évidence également une très faible augmentation du taux de ROS chez les témoins positifs (13 U carr).

10. Effets de Mandipropamide, Cadmium et de leurs combinaisons MAD/Cd sur Evolution du Potentiel Antioxydant Biologique chez *Paramecium sp.* :

• Cas de MAD :

Le tableau (8) représente l'évolution du Potentiel Antioxydant Biologique (BAPs) chez *Paramecium sp.* exposées à des concentrations croissantes de MAD.

Tableau 8 : Effets des concentrations croissantes de MAD sur l'évolution du BAPs chez *Paramecium sp.*

| MAD (µl/l) | 0 | 2.5 | 5 | 7.5 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| BAPs (µmol/l) | 12555 | 13215 | 13221 | 12555 |

Le potentiel antioxydant biologique augmente chez les cellules traitées par le MAD par rapport aux témoins. Ce potentiel est de l'ordre de 13221 chez les traités par la concentration 5 $\mu\text{l/l}$ avec toutefois une légère diminution de l'ordre de 10.5% chez ceux traités par la plus forte concentration de MAD.

• Cas de Cd :

Le tableau (9) représente l'évolution du Potentiel Antioxydant Biologique (BAPs) chez *Paramecium sp.* Exposées à des concentrations croissantes de Cd.

Tableau 9 : Effets des concentrations croissantes de Cd sur l'évolution du BAPs chez *Paramecium sp.*

| Cd (mM) | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| BAPs ($\mu\text{mol/l}$) | 12555 | 13075 | 12998 | 12935 | 13081 |

Nous constatons une augmentation du BAPs toutes les cellules traitées par le Cd par rapport au témoin. Cette stimulation du Potentiel Antioxydant Biologique atteint son maximum à la concentration 5 mM (13081), cette augmentation est de l'ordre de 15% par rapport au témoin (12555).

• Cas de la combinaison MAD/Cd :

Les résultats concernant l'évolution du Potentiel Antioxydant Biologique (BAPs) chez *Paramecium sp.* exposées aux différentes combinaisons de xénobiotiques sont illustrées dans le tableau (10).

Tableau 10 : Effets des différentes combinaisons de MAD/Cd sur l'évolution du potentiel antioxydant chez *Paramecium sp.*

| MAD/Cd ($\mu\text{l/l}$) | 0 | 0.5 | C1 | C2 | C3 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| BAPs ($\mu\text{mol/l}$) | 12555 | 12325 | 13309 | 12998 | 11615 |

C1 : $2.5\mu\text{l/l}$ (MAD) + $0.5\mu\text{l/l}$ (Cd) **C2** : $5\mu\text{l/l}$ (MAD) + $0.5\mu\text{l/l}$ (Cd)

C3 : $7.5\mu\text{l/l}$ (MAD) + $0.5\mu\text{l/l}$ (Cd)

Nous constatons une augmentation du potentiel antioxydant biologique chez les cellules traitées par le Cd par rapport aux témoins. En effet, ce potentiel est de l'ordre de $12555 \mu\text{mol/l}$ chez les témoins alors qu'il est de l'ordre de $13309 \mu\text{mol/l}$ chez les traités par C1. En revanche nous constatons une diminution du BAPs chez les traités par C3.

CHAPITRE IV
DISCUSSION

Les bioindicateurs de la pollution environnementale sont sensibles aux variations physicochimiques de leurs milieux, notamment la température (Bride et *al.*, 1993), les fréquences électromagnétiques (Regoli et *al.*, 2006) et toute forme de pollution urbaine (Terfaya et *al.*, 2006), mais également sensible vis-à-vis des xénobiotiques variés tels que les hydrocarbures (Ismart et *al.*, 2002), les éléments traces métalliques (Gomot, 1997), les pesticides (Coourdassier et *al.*, 2002 ; Vidal 2001 et Rouabhi, 2005) d'autre part l'exposition des mélanges de certains polluants peuvent causer des effets toxiques sur une population (McDermott et *al.*, 2008).

Depuis de très longues années, les protozoaires ont été étudiés, décrits et classés par les protozoologistes (Savant et *al.*, 1999). Les protistes sont des cellules eucaryotes, ubiquitaires dans l'environnement aquatique et terrestre, caractérisés par un système biologique comparable à ceux des animaux supérieurs, tel un noyau, une mitochondrie, un cytosquelette (Fent et *al.*, 2006), un court cycle de vie, une multiplication rapide (Beal et Anderson., 1993) et dont le comportement normal dans la nature pourrait être affecté en présence de polluants. Ce qui a conduit à les utiliser comme un excellent modèle cellulaire pour toutes les études ecotoxicologiques, toxicologiques et pour la compréhension des mécanismes d'action des xénobiotiques. (Benbouzid et *al.*, 2012, Grara, 2011, Boulassel et *al.*, 2013).

En effet plusieurs travaux ont été effectués et suggère l'utilisation des eucaryotes unicellulaires comme bioindicateurs de pollution aquatique, tel que Amamra (2015) qui a montré que les insecticides Cyperméthrine et Deltaméthrine induisaient un stress oxydative chez *paramecium tetraurelia*. D'un autre coté une étude menée par Frabklin et *al.*, (2000) sur l'algue *Dinioflagellée chlorella* utilisée indicateur d'une pollution par le cuivre et l'uranium.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la toxicité de deux molécules : le Cadmium (Cd) et un fongicide Mandipropamide (MDP) ainsi que des combinaisons MAD/Cd le modèle biologique alternatif à savoir *paramecium sp.* Pour cela nous

sommes intéressés en premier lieu à l'effet de ces xénobiotiques sur la croissance cellulaire qui est le paramètre le mieux indiqué pour rendre compte de la toxicité d'un xénobiotique (Savant et *al.*, 1999 ; Perez Rama, 2001).

Ainsi, le traitement par les xénobiotiques testés est à l'origine d'une inhibition de la croissance cellulaire confirmant par la même l'influx des xénobiotiques à l'intérieur des cellules, malgré la présence de la membrane cellulaire qui pourrait constituer une barrière contre l'entrée massives des xénobiotiques. (Beaumont et cassier, 1998).

Nos résultats sont en accord avec ceux de EiniCker-Lamas et *al.*, (2002) qui a étudié la toxicité du zinc et du cuivre sur *Euglema gracilis* (algue chlorophyllienne), cependant, les travaux de Fukushima et *al.*, (1979) montrent l'inhibition de la croissance cellulaire des paramécies en présence de certains métaux lourds tels que le Mn, Pb, Cd et le Cr.

Nos résultats sont en accord aussi avec ceux de Bouaricha et *al.*, (2013) qui ont étudié le proclain (biopesticide) sur les paramécies et ceux de Benbouzid et *al.*, (2015) qui ont testé l'effet du chlorfenapyre sur les paramécies et ceux de Azzouz et *al.*, (2012) qui ont observé l'effet inhibiteur d'un fongicide et d'un herbicide sur la biologie et le Comportement de *paramecium sp.*

Concernant la combinaison des deux xénobiotiques, nos résultats sont en accord avec ceux de Ruth Angerville, 2007 qui a indiqué une perte de mobilité des daphnie traitées par un mélange de trois métaux lourds Zn,Cd et Cu.

D'autre part, les valeurs positives du pourcentage de réponse démontrent est confirment l'effet inhibiteur des deux xénobiotiques et de leur mixture sur le métabolisme physiologique des protistes ciliés *Paramecium sp.* (Wong et *al.*, 1999).

Un des domaines où réside beaucoup de potentiel, concerne l'étude des effets des produits toxiques au niveau moléculaire, de plus spécifiquement la synthèse des protéines de stress que l'ont définit comme biomarqueurs de susceptibilité. Ces protéines peuvent correspondre à des constituants structuraux, fonctionnels et énergétiques pour les fonctions essentielles comme la croissance et la reproduction (Stoechmann et Garton, 2001). Lorsqu'elles sont surexprimées ou sous exprimées,

ces protéines augmentent la sensibilité d'un organisme à un contaminant (Schlenk, 1999 ; Aarab, 2004).

A fin de mieux comprendre l'effet des deux xénobiotiques (Cd et MDP) à l'échelle cellulaire, nous nous sommes intéressés à l'évolution des principaux métabolites biochimiques à savoir les protéines, en présence ou en absence des xénobiotiques qui en plus de leur rôle comme élément constitutif de la membrane plasmique, participent dans le métabolisme globale de la cellule. Ainsi, Grara (2012) a mis en évidence une forte perturbation du taux de protéines chez l'escargot traité par les métaux lourds ou encore ceux de Benbouzid (2012) et Boulassel (2013) qui ont respectivement testé des pesticides (pour la première citée) et un médicament à base de paracetamol, ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines. Ce phénomène a été déjà décrit par Massaya et *al.*, (2002) après avoir mis en évidence une augmentation significative du taux des protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapin). D'un autre côté, Rouabhi et *al.*, (2006), Radouane-Salah (2004) ont mis une corrélation entre la perturbation du taux des protéines totales et la toxicité des pesticides chez la paramécie, l'auteur explique ce phénomène d'une part par l'induction de la synthèse des protéines en rapport avec le phénomène de la bioactivation/biotransformation mis en œuvre par le système antioxydant de *Paramecium sp.* (Lagadic et *al.*, 1997) et d'autre part par la peroxydation lipidique générée par les ROS (Aurousseau, 2002).

Nos résultats sont en parfait accord avec ceux cités ci-dessus puisque nous avons mis en évidence une augmentation du taux de protéines totales, confirmant ainsi, un effet sur le métabolisme cellulaire en général des xénobiotiques testés. **Suite à ces perturbations générées par le Cd, le MAD et leur combinaison, il nous a semblé judicieux de nous intéresser à un autre métabolisme non moins important et dont le siège n'est rien d'autre que la mitochondrie, organite connu pour ses nombreuses implications non seulement dans le métabolisme respiratoire, mais aussi dans le phénomène de l'apoptose.** En premier lieu nous nous sommes penchés sur l'étude polarographique qui nous permettra d'évaluer les effets des deux xénobiotiques et de leur combinaison sur le métabolisme respiratoire des paramécies. un excellent indicateur du fonctionnement du système respiratoire mitochondrial et un bon outil d'évaluation de la cytotoxicité (Haubenstricker et *al.*, 1990).

Plusieurs travaux ont mis en évidence que les contaminants environnementaux perturbent la fonction respiratoire de différentes manières certains tels que (Hulbert et *al.*, 2006 ; Abele et *al.*, 2007). (Boulassel et *al.*, 2013 ; Saib, 2015 ; Djekoun, 2012), ont montré que les xénobiotiques ont un effet inhibiteur de la respiration (Boulassel et *al.*, 2013 ; Saib, 2015 ; Djekoun, 2012) alors que d'autres parlent de stimulation de ce mécanisme à travers l'induction de la consommation d'O₂ (Hulbert et *al.*, 2006) . L'inhibition de la fonction respiratoire pourrait être liée à la fois à un effet toxique direct sur la mitochondrie mais également à l'induction des enzymes de la métabolisation particulièrement ceux de la phase I comme le système monooxygénase à CYP450 qui vont réagir avec l'oxygène (Guengerich, 1991)

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une inhibition de la consommation d'oxygène chez les paramécies traitées avec le Cd, MDP et leur mixture confirmant ainsi la toxicité de ces molécules observés sur la croissance cellulaire.

L'oxygène peut également réagir avec les électrons qui échappent à la chaîne respiratoire (Cadenas et *al.*, 1977). En effet il est connu que la mitochondrie est le siège principal de genèse des ROS. La combinaison directe de l'oxygène apporté aux cellules avec ces électrons implique la formation des anions superoxydes qui sont à l'origine des phénomènes radicalaires, ces derniers peuvent alors dismuter soit spontanément, soit de façon enzymatique pour donner de l'eau oxygénée (H₂O₂), qui peut à son tour se transformer en radical hydroxyle °OH, le plus réactif des radicaux oxygénés libres (ROMs)

Le système de défense antioxydant est présent chez toutes les cellules aérobies et neutralise les réactions chimiques intermédiaires produites par voie endogène et/ou le métabolisme des xénobiotiques. L'activité du système antioxydant peut subir une augmentation ou une inhibition sous l'effet d'un stress chimique (Winston et Di Giulio, 1991).

Ainsi, dans le contexte environnemental, les biomarqueurs offrent l'avantage d'être des indicateurs sensibles démontrant que le contaminant a été internalisé par l'organisme, distribué dans les différents tissus et a induit des effets toxiques au niveau de cibles spécifiques (McCarthy et Shugart, 1990).

Dans notre travail nous nous sommes intéressés aux conséquences de la toxicité des xénobiotiques testés à l'échelle mitochondriale via le suivi de certains biomarqueurs spécifiques du stress oxydant.

En premier lieu nous nous sommes intéressés aux variations de l'activité CAT, qui est une enzyme héminique et qui constitue avec la SOD la première ligne de défense contre les attaques radicalaires (Winston et Di Giulio, 1991; Lemaire et Livingstone, 1993). Cette enzyme localisée principalement au niveau des peroxysomes catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau, elle peut, par conséquent réduire l'effet toxique des ROS (Greulich et al., 2002).

Après traitement des paramécies, l'activité catalase est fortement induite. Nos résultats corroborent ceux de Banerjee (1999) et Lopez (2007) qui ont clairement démontrés que les pesticides induisaient l'activité des enzymes antioxydantes, il en est de même concernant les travaux de Mountassif et al., (2007) qui ont mis en évidence une induction de l'activité CAT chez *Tetrahymena pyriformis* soumise à une pollution métallique, le traitement de *paramecium aurelia* avec des phosphoramidates a également induit l'activité CAT (Benbouzid, 2012), résultat confirmé par les travaux de Azzouz (2012) qui a mis en évidence une forte induction de l'activité CAT chez *paramecium tetraurelia* traitées avec un pesticide Amistar Xtra et le Glyphosate. D'autres organismes peuvent être touchés par ce phénomène comme le montrent les travaux de Grara et al., (2009) a révélé une induction de l'activité CAT chez l'escargot *Helix aspersa* traité par des métaux lourds, ou encore les travaux de Wenwen et al., (2011), qui a étudié l'effet du cadmium chez le crabe d'eau douce.

L'autre enzyme intervenant dans le processus de détoxification des ROS est la GST qui lors de la phase II de la biotransformation/métabolisation des xénobiotiques fait appel au GSH comme agent de conjugaison mais qui est aussi impliquée dans le mécanisme de détoxification comme agent non enzymatique. Les glutathion S-transférases (GSTs) sont des enzymes du métabolisme capables de conjuguer une molécule de glutathion réduit (GSH) au centre électrophile d'un xénobiotique afin de rendre celui-ci plus soluble et donc plus facilement excrétable par l'organisme. Leur expression peut être induite ou inhibée par certains xénobiotiques, ce qui leur confère un grand intérêt en tant que biomarqueurs potentiels de la pollution (Vidal, 2001). En

interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD.

Dans notre travail nous avons mis en évidence une induction de l'activité GST parallèlement à une diminution du taux de GSH ce résultat est en accord avec ceux de Azzouz (2012), qui a étudié la toxicité d'un insecticide, à base d'azoxystrobin et de cyproconazole sur *paramecium tetraurelia*, où encore Benbouzid et *al.*, (2012), qui ont testé des phosphoramidate sur *paramecium aurelia.*, l'augmentation de l'activité GST et la diminution du taux de GSH, sont dus au fait que le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales, c'est le thiol cellulaire le plus abondant, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, y compris les espèces réactives de l'oxygène et les métaux lourds (Dickinson et Forman 2002 ;Viarengo et Nott, 1993; Viarengo, 1994).

L'AChE constitue joue chez les vertébrés, un rôle majeur qui consiste à hydrolyser un neuromédiateur, l'acétylcholine (Massoulié et Bon, 1993). L'AChE est très rapidement hydrolysée en acétate et choline par L'AChE.

L'inhibition de l'AChE peut avoir des conséquences graves pouvant aller jusqu'à la Mort (Vidal, 2001).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une diminution dose-dépendante de l'activité de cette enzyme chez les paramécies traités par les concentrations croissantes des xénobiotiques et de leurs combinaisons, Il semblerait que l'inhibition de l'AChE est due à l'accumulation du xénobiotique au niveau cellulaire comme le stipule Barillet (2007), conséquence d'un stress oxydant à l'échelle intracellulaire. Le même mécanisme est rapporté par Trielli et *al.*, (2006), concernant l'effet de composés organophosphorés sur des protistes terrestres *Colpoda inflata*, et ont constaté une inhibition progressive de l'activité AChE. Cette inhibition a été attribuée par les auteurs à des phénomènes d'oxydation (notamment les groupements thiols) et à la formation de ponts disulfures en réponse à la libération de radicaux libres au moment de l'irradiation.

Il en est de même concernant les travaux de Moutassif et *al.*, (2007), qui ont étudié l'effet des métaux lourds sur *Tetraymena pyriformis*, ou encore de Remor et *al.*, (2009) qui a évalué la neurotoxicité de certains pesticides sur chez des agriculteurs.

Suite à l'induction des systèmes antioxydants mis en évidence dans notre travail, il nous a paru logique de suivre l'état redox cellulaire, un fragile équilibre entre la production des ROS et leur élimination, et qui est indispensable pour le maintien de la vie cellulaire. Pour cela nous avons mesuré la production des Métabolites Réactifs à l'Oxygène (ROMs) et le Potentiel Antioxydant Biologique (BAPs).

Nos résultats mettent en évidence une augmentation des ROMs chez les paramécies traitées par le Cd, MAD et leur combinaison. Cette augmentation est due à l'induction de l'activité du système CYP450, l'une des sources principales de formation des ROS (Caro et Cederbaum, 2004 ; Zangar et *al.*, 2004), mais aussi au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale considérée comme le siège principal de la génération des ROS et qui fait suite à l'inhibition de la respiration mise en évidence dans notre travail. D'un autre côté, l'augmentation de l'activité des peroxydases dépendantes peut également générer des radicaux libres (Deby et Deby-Dupont, 2009).

Nos travaux sont en accord avec ceux de Cheriet, (2015) qui a mis en évidence une augmentation des ROMs chez *Saccharomyces cerevisiae* traitées par la Nifédipine, ou encore McDermoot et *al.*, 2008 qui a observé un changement sur le statut redox chez des protistes traités par trois mélanges de pesticides.

Nous avons également mis en évidence une augmentation du Potentiel Antioxydant Biologique (BAPs). Ce résultat est en accord avec les travaux de Amamra, (2015) qui a mis en évidence une augmentation du BAPs chez *Paramecium tetraurelia* exposée à la Deltaméthrine, ou encore ceux de Cherait, (2015) et Guidoni et *al.*, (2003) qui ont noté une augmentation de la capacité antioxydante biologique chez *Saccharomyces cerevisiae* d'un côté et confirmé chez des patients souffrants d'hypertension après traitement par différentes concentrations de Nifédipine.

Cette action inductrice du BAPs, est expliquée par la défaillance du système antioxydant, suite à l'intensité du stress et à la déplétion des enzymes antioxydantes créant ainsi , un déséquilibre de l'hémostasie redox qui joue un rôle dans la défense contre les électrophiles et les oxydants, en activant l'expression de plusieurs enzymes de la phase II de la biotransformation, les enzymes et les molécules de détoxification des ROS et de réduction des thiols (les SOD, CAT, GSH et la glutathion réductase..), impliquées dans la défense contre le stress oxydatif, et en stimulant la production d'antioxydants (Baird et Dinkova-Kostova, 2011 ; Kovac et *al.*, 2015 ; Kim et *al.*, 2011 ; Sirota et *al.*, 2015).

L'état redox des cellules, nous a permis de montrer que la production des ROS est contrebalancée par une induction du système antioxydant chez la paramécie confirmant d'une part, la capacité de ces organismes à développer un système de défense semblable à celui de organismes pluricellulaires et d'autre part que les doses toxiques des xénobiotiques testés induisent un stress chimique qui peut aller jusqu'à la mort cellulaire.

CHAPITRE V

CONCLUSION GÉNÉRALE ET

PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Les protistes ciliés *Paramecium sp.* occupent une position privilégiée dans l'écosystème en tant que bioindicateurs/bioaccumulateurs. La paramécie étant constamment présente dans les milieux dulçaquicoles est un élément de base des réseaux trophiques mais aussi un modèle alternatif de choix pour les études toxicologiques et écotoxicologiques.

Ainsi il ressort de nos résultats, que *paramecium sp.* a répondu d'une manière quasi similaire au traitement par les xénobiotiques.

Notre travail s'inscrit l'estimation des effets biologiques dus à la toxicité potentielle des deux xénobiotiques : le fongicide Mandipropamide et le métal lourd Cadmium, ainsi que leur combinaison sur un microorganisme d'eau douce considéré comme un modèle bioindicateur : *Paramecium sp.*

Cette sensibilité des deux espèces s'est manifestée en premier lieu par une perturbation dans le développement des paramètres physiologiques (une inhibition de la croissance des paramécies corrélée par un pourcentage de réponse positif), d'un autre côté, nous avons mis en évidence une perturbation globale du métabolisme biochimique et respiratoire, à travers l'augmentation des taux de protéines totales chez *paramecium sp.* or nous savons que la synthèse des protéines totales implique plusieurs événements en particulier celui de l'induction des activités enzymatiques, et une diminution importante de la quantité d'oxygène consommé par les cellules traitées comparativement aux témoins.

Concernant l'étude des biomarqueurs du stress oxydant nous avons mis en évidence une diminution importante du taux de GSH parallèlement à une augmentation des activités GST et de l'enzyme antioxydante CAT. L'activité AChE n'étant pas une enzyme qui intervient dans les systèmes de défense est inhibée sous l'effet du MAD, de Cd et de leur combinaison, étant donné que l'AChE est inhibée par les molécules neurotoxiques ayant pour cibles les canaux chlore de la synapse inhibitrice, nos résultats confirment ainsi une neurotoxicité.

Enfin toutes ces données confirment la mise en place d'un stress oxydatif généré chez la paramécie après traitement par les xénobiotiques et leurs combinaison, le suivi de la balance Redox, révèle une augmentation des ROMs corrélée à une augmentation des BAPs, confirmant ainsi la nature temporaire du stress oxydatif.

Perspectives :

Tout le long de ce travail, nous avons essayé de répondre à plusieurs interrogations concernant l'effet de MAD, Cd et leurs combinaisons sur le stress oxydant, mais chaque réponse apportée a ouvert la porte à d'autres interrogations nécessitant de plus amples recherches.

Afin d'éclaircir d'autres points concernant le traitement de ces molécules sur le stress oxydatif, il serait intéressant d'effectuer d'autres recherches portant sur :

- Le niveau subcellulaire des mitochondries isolées en tant que cibles/siège de la respiration et des ROS.
- Développement des dosages de nouveaux biomarqueurs (GPX, LDH et $O_2^{\cdot-}$)
- Réalisation d'une étude ultrastructurale afin de localiser et d'évaluer l'importance des perturbations enregistrées.
- Essai de cytotoxicité sur des cellules en culture

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarab, N., 2004 : Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves : De l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de BORDEAUX 1, page 276.

Abbasi SA., 1998 : Heavy in the environment ; mittal publications, New Delhi ; 20.

Abele, A. E. & Wojciszke, B. (2007): Agency and communion from the perspective of self versus others. *Journal of Personality and Social Psychology*, 93 , 751-763.

Abele, A. E. (2003) : The dynamics of masculine-agentic and feminine-communal traits: Findings from a prospective study. *Journal of Personality and Social Psychology*, 85, 768-776.

Abele, A. E., Rupperecht, T., & Wojciszke, B. (2005) : The influence of success and failure on the agentic self-concept. *European Journal of Social Psychology ACTA*, « Index phytosanitaire ACTA » .41 ème édition.Paris page 821.

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

Amaroli et al.,2009: Nitric oxide production inhibited by xenobiotic compounds in the protozoan *Paramecium primaurelia*. *Ecological Indicators*. 2010;(10):212-216.

Amiard, J-C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998 : Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, edited by par L. Lagadic, T. Caquet, J.C.

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

Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D. 2008 : *Radicaux libres* antioxydants et vieillissement. In *Aspects biologiques et pathologiques*. *Aquatic Toxicology* 76, 122-159

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

Azzouz, Z., 2012 : Etude des effets toxiques d'un fongicide (Amistar Xtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. Doctorat de l'université d'Annaba. page 114.

Azzouz, Z., Berrebbah, H., et Djebbar M.R., 2011 : Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. African Journal of Microbiology Research, Vol. 5(20), 3243-3250.

Baize D. (1997) : In "Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols", Ed. INRA.

Baldrian P., Gabriel J and Nerud F., 1996 : effect of cadmium on the ligninolytic activity of *stereum hirsutum* and *phanerochaete chrysosporium*, *folia microbiol.* 41(4), 363-267.

Banerjee, B.D., Koner, B.C., Ray, A., 1997 : Influence of stress on DOT-induced humoral immune responsiveness in mice. *Environ Res.* 74, 43-7.

Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K., 1999 : Biochemical effects of some pesticides on lipid-peroxydation and free – radical scavengers *Toxicol. Lett.* 107, 33-47.

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

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

Beaumont et Cassier., 1998 : Travaux Pratique de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3ème édition DUNOD.

Beisel J.N., Lévêque C. (2010) : Introductions d'espèces dans les milieux aquatiques: Faut-il avoir peur des invasions biologiques ? Editions Quae. Page 248.

Benbouzib,H., 2012 : Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliées.these de doctorat de l'université d'Annaba.page 87.

Benbouzid, H., Berrebbah,H., Berredjem,M., Djebbar,M.R., (2012): Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium sp.* with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 655-696.

Bernal J., Ruvalacaba S., 1995 : pharmacological prevention of acute lead poisoning in paramecium. *Toxicology* 108, 165-173.

Bodenheimer F.S. (1955) : Précis d'écologie animale. Edit. Payot. Université de Cornell. page 315.

Bontoux J., 1993 : introduction à l'étude des eaux douces eaux naturelles, eaux usées, eaux de boisson. Qualité et santé, édition CEBE DOC sprl. Liege , 44-121.

Boulassel A, Djebbar M.R., Rouabhi R., Berrebbah H. 2013 : Physiological and biochemical changes observed in alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia* treated with paracetamol. *International Journal of Biosciences*. 3(9):132-141.

Boutonnet Fabien., 2000 : rapport de réseau de surveillance de la qualité de l'air, université d'orléans. Page 5.

Boveris A, Oshino N, and Chance B., 1972 : the cellular production of hydrogen peroxide. *Biochim J* 128 : 617-630.

Bracken W.M et Sharma R.P., 1985 : cytotoxicity related changes in biochemical cell function following in vitro Cd treatment toxicology, *Biochim J* 34, 189-200.

Bradford, M.M.A., 1976: Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Brygoo Y. (1977) : Genetic analysis of mating-type differentiation in *Paramecium tetraurelia*. *Genetics*. 87: 633-653.

Cadenas E. and Sies H., 1985: Oxidative stress: Excited oxygen species and enzyme activity, *Advances in Enzyme Regulation*, 23: 217-237.

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

Calvet R. (2005) : Les pesticides dans le sol: Conséquences agronomiques et environnementales. France Agricole Editions. page 637.

Capkin, E., Altinok I. and Karahan S., 2006: Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan , an organochlorine pesticide, to rainbow trout”, *Chemosphere*, 64, 1793-1800.

Charle, D.F. and J.P. Smole 1999 : long terme chemical changes in lakes : cantitative inferences using biotic remains in the sediments records american chemical society , wachington D.C. page 627.

Charlene, C.M., Milene, B.F., Adriana, S., Alexendra, P., 2010 : Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. *Archives environmental contamination and toxicology*; Available: <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-010-9574-6>.

Chevreuil, M. and Garmouma, M., 1993: « Occurrence of hepatic glutathione system of enzymes in suckling mouse pups exposed translactionally to malathion, *J. Appl. Toxicol.* 13, 411-416.

Cobbet C.S., 2000 : phytochelatin biosynthesis and function in heavy metal detoxification . *Curr opin plant biol* ; 31 :19-48.

Coeurdassier, M., 2001 : Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnia stagnalis* et *Lymnia palustris*) comme indicateurs de pollution

par les éléments métalliques et les xénobiotiques .Thèse de doctorat, université de franche comté, France. Page 281.

Coeurdassier, M., M. Saint-Denis, A. Gomot-de Vaufleury, D. Ribera, P.M. Badot, 2001: The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1951-1957.

Cohen G., Hochstein P. (1963): Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*. 2: 1420-1428.

Corliss, J. O., Lacy, D. And Palay,S.O., 1961: Fixing and staining of Protozoa in the Microtome's Vade-Mecum (Bolles-Lee). London, *X I I e* ed. Culture Medium with Considerable Delay between Transcription and Surface Expression.

Dagnelie, P., 2006 : Statistiques théoriques et appliquées.Tome2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles.Univ De boeck et Larcier, page 659.

Dahmani B., 1988 : protection de l'environnement du site de Ghazaouet, etude du traitement du gaz des grillages de blindes (ZnS) du complexe des métaux non ferreux et leur diffusion dans l'atmosphère, thèse de magistère en chimie appliquée, INES, ; hydraulique, Telemcen de l'université d'Annaba.141, page 84.

Delmonte Corrado, M.U., F. Trielli, A. Amaroli, M. Ognibene, Falugi,C., 2005 : Protists as tools for environmental biomonitoring :importance of cholinesterase enzyme activities, Nova Sciences Publishers, 181-200.

Delmonte Corrado, M.U., H. Politi, F. Trielli, C. Angelini, Falugi, C., 1999 :Evidence for the presence of a mammalian-like cholinesterases in paramecium primaurelia (Protista Ciliophora) developmental cycle.J.Exp. Zool, 283,102-105.

Deneer J. W. (2000) : *Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems*. Pest Management Science 56, 516-520.

Di toppei L.S., Lambardi M., Pecchioni N, 1999 : effect of cadmium stress on hairy roots of *Daucus carota*. *J.plant physiol.* 154, 385-391.

Dias N., Mortara R.A. and Lima N.; 1999: Morphological and physiological changes in defenses are not inducible by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 279: 31157-63.

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

Djebar, H and Djebar, M.R., 2000 : Bioénergétique, Les mitochondries végétales. *Revue des sciences et technologie ; Synthèse2000*. Publication de l'Université de Annaba. Edition Végarol : 103.

Djekoun, M., 2012 : Évaluation de l'effet du stress oxydatif généré par le Cadmium à l'échelle cellulaire: Cas de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat de l'université de Annaba., 129 p., 34-110.

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

Dragesco J., Dragesco-Kernéis A., Fryd-Versavel G. (1986): Ciliés libres de l'Afrique ecotoxicology, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (1): 272-280.édition Flammarion, 552-577.

EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Commission) (1980) : Report on combined effects on freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water, Rome, page 49.

Einicker-Lamas M., Mezian G.A., Fernandes T.B., Silva F.L.S., Miranda K., Attia M. and Oliveira M. M.; 2002: *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu₂₊ and Zn₂₊ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environment Pollution*, 120: 779-786.

Références bibliographiques

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Featherstone, R.M., 1961 : A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*, 7, 88-95.

El-Mohir M. 2009 : Thèse de doctorat, Université Mohammed V – Agdal, Rabat, Maroc, P260, Hydrochimie, éléments traces métalliques et incidences écotoxicologiques sur la différentes composantes d'un écosystème estuarien (Bas Loukkos).

Fekih A., Belhouari M., 1990 : étude et application d'un modele de diffusion de polluants à deux dimensions (cas de Ghazaouet, mémoire d'ingénieur d'état en météorology, intitit hydraulique et frmation de recherche Oran.

Fenske, C., and Gunther, B., 2001 : Electro-fishing in the lab: A new method to detect actue effects of heavy metals and organic pollutants in invertebrate indicator organisms. *Int.J.Hyg.Environ.Health*, 204: 157 -163.

Fent, K., Weston, A., Caminada D., 2006 : Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat toxicol.* 10 ;76 (2) : 122-59.

Fifield Fu. Et Haines P.J., 1995 : environnement analytical chemistry. Eddition chapman and hall : 320-326.

Fishbein, L., 1977: Toxicological aspects of fungicides, in *Antifungal compounds*, vol. 2, Marcel Dekker, New York, 537-598.

Forbes V.E., Forbes T.L. (1997). : *Ecotoxicologie: Théorie et applications*. Editions Quae. Page 256.

Forestner U et Wittman .G, 1981: *metal pollution in the aquatic environment* , 2nd ed, springer-verlag : Berlin, page 486.

Fourrier J., (1988): « *Chimie des Pesticides* », Paris.

Fukushima, S., Shiota, C.,Ogawa ,H.et Sasagawa, S.,1979: Effects of heavy metals *iparamecium tetraurelia*. : Effects on cell division. *Jap. J.Hyg*, 34(5):507- 510.

Génoscope; 2007: Centre National de Séquençage. France.

Glaser O. (1924) : Temperature and forward movement of *Paramecium*. *J. Gen. Physiol.* 7(2): 177-88.

Gomot, A., 1997 : a. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 33, 209-216.

Gomot, A., 1997 : Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme. *Bull. Acad. Natle.Méd* ,181, 59-75.

Gomot, A., Gomot, L., 1995: Neurohormonal control of body and shell growth of the snail *Helix*. *Bull. Inst. Océanog. Monaco* , 14, 141-149.

Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., Bruckert, S., 1989 : Influence of soil on the growth on the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of absorption route for the stimulating factors. *J. Moll. Stud*, 55, 1-7.

Gomot-de Vaufleury, A., Bispo, A., 2000 : Method for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. 1. Sublethal effects on growth. *Environ. Sci. Technol* ,34, 1865-1870.

Gourari., 1991 : contribution à l'étude de quelques rejets de l'usine d'électrolyse de zinc en Metanof de ghazaouet, mémoire DES écologie et environnement, institut de biologie, telemcen.

Gräf F. and Stahr K.; 1999: A Soil and Terrain Map of SW-Niger (NiSOTER). In: Atlas of Grange, D., Camard, J.P., Host, S., Grémy, I., 2008 : Les pesticides et les considérations sanitaires. *Environnement et Santé* ; ISBN : 20, 25-39.

Grara ,N., Berrebbeh, H., Rouabhi, R., Atailia, A et Djebbar, M.R., 2009: Impact of pollution by industrial metallic Dust on Bio-Accumulator Organism *Helix aspersa*. Global Veterinaria, 3(4), 276-280.

Grara,N., 2011 : Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gasteropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux .Thèse de doctorat de l'université de Annaba.120 , page 91.

Greulich H, Chen TH, Feng W, Janne PA, Alvarez JV, Zappaterra M, Bulmer SE, Frank DA, Hahn WC, Sellers WR, Meyerson M.2002 : Oncogenic Transformation by Inhibitor-Sensitive and-Resistant EGFR Mutants. PLoS Med. 2: e 313

Guelfi A., Azevedo Ricardo A., Lea peter J and Silvia M.G. molina , 2003 : growth inhibition of the filamentous fungus *aspergillus nidulans* by cadmium an antioxydant enzyme approach. J.gen. appl. Microbiol., 49, 63-73.

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

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974 : Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry, 249(22), 7130-7139.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1990) : The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys 280: 1–8

Halliwell B, Gutteridge JMC (2006) : Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4. Clarendon Press, Oxford

Halliwell B, Whiteman M (2004) : Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol 142: 231–255

Haubenstricher, M.E., Meier, P.G., Mancy K.H., et al.,1990 : Rapid toxicity testing based on yeast respiratory activity . Bull. environment contam. Toxicol, 44,669-674.

Haynes W.J., Ling K.Y., Preston R.R., Saimi Y., Kung C. (2000) : The Cloning and Molecular.

Hemmersbach R., Bromeisl B., Block I., Btiucke R., Krause M., Freiberger N., Stieber C., Wilczek M. (2001) : *Paramecium* a model system for studying cellular graviperception. *Adv. Space Res.* 27(5): 893-898.

Honigberg R., 1964: Morphology and evolution of Ciliophora. III. Diagnoses and Phylogensis of 53 Sapropelbiontes mainly of the order Heterotrichida. *Arch. Protistenk.*, 107.185-294.

Houten J.V, Chang S.Y., Kung C. (1977): Genetic analysis of paranoiac mutants of *Paramecium tetraurelia*. *Genetics* 86: 113-120.

Hubert et al 2010 : MPE (PDF Download Available). Available from: https://www.researchgate.net/publication/235408557_Hubert_et_al_2010_MPE [accessed May 29, 2016].

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

Ismert, M., Oster, T., Bagrel, D., 2002 : Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere* 46, 273-280. *J. Memb. Biol.* 200: 15-23.

Jamet P., (1994). : The COST action 66: « fate of pesticides in the soil and the environment ».58, 342-359.

Jawich, D., 2006 : Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire. Thèse de doctorat, INP Toulouse. Page 129.

Jones D.P., Ekl6w L, Thor H, Orrenius S. (1981) : Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocyte : relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. Arch Biochem Biophys, 210 (2) : 505-16.

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

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

Khopkar S.M., Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurnman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., (2007) : Environmental pollution monitoring and control. Edit. New Age. (28) : 135-155.

Krishnan K, Brodeur J. Toxicological consequences of combined exposure to environmental pollutants. Arch. Complex Environ. Stud. 1991 ; 3(3):1-106

Lagadic, L., Caquet, T., 1996 : Marqueurs biologiques de pollution: des outils au service de l'écotoxicologie. *Phytoma - La Défense des Végétaux*, 480, 10-13.

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

Legal Yves., 1988 : biochimie marine. Edition masson : 236-246.

Levine R.L.; 1983: Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue, *Journal of Biological Chemistry*, 258 (19): 11823-11827.

Lin, P. H., La, D. K., Upton, P. B., Swenberg, J. A., 2002 : Analysis of DNA adducts in rats exposed to pentachlorophenol. *Carcinogenesis*, 23, 2, 365-369.

Lópeza, O., 2007:"Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides". *Toxicology Letters*.171:3, 146-153.

Maas G., 1987 : la pollution de l'eau : origine naturel et effets des polluant, contrôle et législation. Epuration des eaux. WWE Belgique pp : 01-34. macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community”, *Ecotox Environ, Safe* 57, 283-398.

Madoni P, Guiseppa Roeo M. 2006 : Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environmental pollution*. (141):1-7.

Majima T., Hamasaki T., Arai T., (1986) : Increase in cellular cyclic cGMP level by potassium. *Ecotoxicology* , 4(4), 191-205.

Marinovich, M., Ghilardi, F., Galli, C. L., 1996: Effect of pesticide mixtures on in vitro nervous cells: Comparison with single pesticides. *Toxicology*, 108, 201-206.

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

Massoulié, J., Bon, S., 1993 : L'acétylcholinestérase: une structure originale pour une fonction vitale. *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités*, 4(1), 35-49.

Mc Carty, L.S., Mackay, D., 1993 : Enhancing ecotoxicological modeling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.*, 27, 1719-1728.

McDermott C, Allshire A, van Pelt PF *et al.*, 2010 : *In vitro* exposure of jurkat T-cells to industrially important organic solvents in binary.

Mechael et Kennish., 1998 : pollution impacts on marine biotic communities. Eddition CRC press LLC : 59-61. Méditerranée). Food & Agriculture Org. Page 76.

Merhi ,M.,2008 :Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses :caractérisation des effets sur des lignées cellulaire humaines et sur le système hématopoïétique murin ».

Miquel Gérard., 2001 : rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé.

Momayezi M., Albrecht P., Plattner H., Schmidt H.J. (2004) : Temperature-Induced Change of variant surface antigen expression in *paramecium* involves antigen release into the culture medium with considerable delay between transcription and surface expression. *J Member Biol*, 200 (1) : 15-23.

Morel Y., Barouki R. (1998) : Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Med. Sci.* 14: 713-21.

Morel Y., Barouki R. (1999) : Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* 342:481-96.

Mosulen S., Dominguez M.J., Viagara J., Vilchez C., Guiraum A., Vega J.M., 2003 : metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect on sulfate and nitrate assimilation.

Mountassif, D., Kabine, M., Manar, R., Bourhim, N., Zaroual, Z., Latruffe, N., El Kebbaj, M. S., 2007: Physiological , morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vivo cytotoxicity assessment of metallic pollution: Impact on D-B-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Ecological Indicators*, 7 , 882-894.

Djebar M.R., 2012 : Potential toxicity of an insecticide of the family of carbaamates on a bioindicator model of the pollution the earthworm *Octodrilus complanatus* (*Oligochaeta, Humbricidae*). *Annals of Biological Research*. 3(11):5367-5373.

Nakhlé K.F, 2003 : Thèse de doctorat Université Paris 7, le mercure, le cadmium et le plomb dans les eaux littorales libanaises : Apports et suivi au moyen de bioindicateurs quantitatifs (Eponge, Bivalves et Gastéropodes). 255 page.

Neuzil J, Svensson I, Weber T, Weber C, Brunk UT.1999 : α -Tocopheryl succinate-induced apoptosis in Jurkat T cells involves caspase-3 activation, and both lysosomal and mitochondrial destabilisation. *FEBS Lett.*445:295–300

OMS, (2005): «Organisation mondiale de la santé, The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification».

Otto H.J. (1998) : Ecologie forestière. Edit. Forêt privée française. Page 397.

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

Piégay H., Pautou G., Ruffinoni C. (2003) : Les forêts riveraines des cours d'eau: Ecologie, pond.Bull.Environ.Contam.Toxicol.51 : 551-556.

Popescu M., Blanchard J.M., Carre J., 1998 : analyse et traitement physicochimique des rejets atmosphériques industriels : émissions, fumées, odeurs et poussières. Edition lavoisier TFC et DOC : 15-666-667.

Prasad M.N.V, 1995 : cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. Environment and experimental botany, vol 35, Issue 4, 525-545

Purves W.K. ; Orians G.H. ; Heller H.G. et Sadava D.; 2000: the science of biology. New york : freeman.

Rakitsky, V.N., Koblyakov, V.A., Tutusov, V., 2000. Nongenotoxic (Epigenetic) Carcinogens: Pesticides as an Example. A critical Review. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 20, 229- 240.

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

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

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

Regoli,F.,Gorbi,S.,Fattorini,D.,Tedesco,S.,Notti,A.,Machella,N.,Bocchetti,R.,Benedetti.,M.,Piva,F., 2006: Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organisme for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution:An integrated approach. *Environmental Health Perspectives*, 114, 63-69.

Remor, A.P., C.C. Totti, D.A. Moreira, G.P. Dutra, V.D. Heuser and J.M. Boeira, 2009 : Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ. Int.*, 35: 273-273.

Richardson K, Band PR, Astrakianakis G et al., 2014 : Male bladder cancer risk and occupational exposure according to a job-exposure matrix-a case-control study in British Columbia, of *Applied Sciences Research*, 8(8): 4172-4180.

Ricklefs R.E., Miller G.L. (2005) : *Ecologie*. Edit. De Boeck Supérieur. Paris. page 858.

Rouabhi, R., 2005 : Impact de deux pesticides le Diflubenzuron et le Flucycloxuron sur trois modèles cellulaires alternatifs : *Paramecium .sp*, *Tetrahymena pyriformis*, *Tetraselmis suecica* et sur le développement embryonnaire de la poule domestique (*Gallus domesticus*),thèse de doctorat université de Annaba page 99.

Rouabhi, R., Djebbar-Berrebah, H., and Djebbar, M.R., 2006: Evaluation of toxicity of two pesticides: Flucycloxuron and Diflubenzuron on a cellular model, *Paramecium sp. Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University*, 71/2a, 83-90.

Ruth Angerville, Evens Emmanuel, Yves Perrodin. 2007 : Impact écotoxique potentiel sur les milieux récepteurs aquatiques des métaux en mélange dans les eaux pluviales urbaines. NOVATECH , Lyon, CDROM.

S.A. Amin, D.H. Green, M.C. Hart., 2009 : Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106 (2009), 17071–17076 |

S.A. Amin, M.S. Parker, E.V. Armbrust., 2012 : Interactions between diatoms and bacteria *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 76 (2012), 667–684

Sanita di Toppi, L and R. Gabbrielli 1999: Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.

Sanusi,A.A.,2006 : “Comportement physico-chimique et transport des pesticides particulaires et gazeux dans l’atmosphère” Thèse de doctorat de 3ème cycle,université Louis Pasteur et Strasbourg.p.22-72.

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

Sbartai, I., Berrebbah, H., Rouabhi, R., Sbartai, H., Smagghe, G. and Djebbar, M.R., 2009: Behavior of *Paramecium* sp. treated with bifenthrin with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci.*, 1, 13-18.

Schrack, D.M et Coquil., 2009 : « Rémanence des pesticides dans les eaux issues de parcelles agricoles récemment converties à l’agriculture biologique ». *Innovations Agronomiques* 4, 259-268.

Stelly N., Mauger J.P., Claret M., Adoutte A. (1991) : Cortical Alveoli of *Paramecium*: a Vast stimulation in *Paramecium tetraurelia*. *Experientia*, 42: 62-64.

Štirn J. (1982) : Manuel des méthodes de recherche sur l’environnement aquatique: huitième Submembranous Calcium Storage Compartment. *J. Cell Biol.* 113: 103-112.

Suty L. (2010) : La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. Editions Quae.

Références bibliographiques

Terfaya, M., Djebbar, M.R., Rouabhi, R et Berrebbeh, H., 2009 : « Relationship between air pollution generated by traffic emission and cardiopulmonary disease in Annaba (Algeria). American Eurasian journal of Toxicological Sciences 1(1), 01-06.

Terfaya, M., Djebbar, M.R., Rouabhi, R et Berrebbeh, H., 2009 : « Relationship between air pollution generated by traffic emission and cardiopulmonary disease in Annaba (Algeria). American Eurasian journal of Toxicological Sciences 1(1), 01-06.

Torricelli F., Gorbi G., Pawlik-Skowronska R., Sanita Di Toppi I., Corradi M.G., 2004 : cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromium-tolerant strains of *Scenedesmus acutus*. Aquatic toxicology 68, 315-323.

Trielli, F., M. Giovanna Chessa, A. Amaroli, M. Ognibene, M. Delmonte Corrado, 2006 : Effects of organophosphate compounds on a soil protist, *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodidae). Chemosphere., 65, 1731-1737.

Trielli, F., M. Giovanna Chessa, A. Amaroli, M. Ognibene, M. Delmonte Corrado, 2006 : Effects of organophosphate compounds on a soil protist, *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodidae). Chemosphere., 65, 1731-1737.

Trundle, D., Marcial, G. 1988: Detection of Cholinesterases inhibition. The significance of Cholinesterases measurements. Annals of Clinical and Laboratory Science. 18 (5), 345-352.

Tsekova K et Galabova D., 2003 : phosphatase production and activity in copper accumulating *Rhizopus delemar* enzyme and microbial technology 33, 926-931.

Tsekova K., Dentchev D., Todorova D., 2000 : effect of Cd and copper on the production of citric by *Aspergillus niger* : *Folia microbiol* : 45(4), 331-334.

UIPP., (2009) : Union des Industries de la Protection des Plantes) site de l'union des industries de la protection des plantes <http://www.uipp.org> Page consultée.

Université Badji Mokhtar, Annaba, page 55.

Vander Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003 : Fish bioaccumulation and biomarkers Variant Surface Antigen Expression in *Paramecium* Involves Antigen Release into the

Vayssié L., Skouri F., Sperling L., Cohen J., (2000) : Molecular genetics of regulated secretion in *Paramecium*. *Biochimie*. 82(4): 269-88.

Veillerette , F., 2005 : « Le piège se referme ». *Terre et vie* : 94,113-0237.

Venkateswara Rao, Arepalli SK, Gunda VG, Bharat Kumar J. 2008 : Assessment of cytoskeletal damage in *Paramecium caudatum*: An early warning system for apoptotic studies. *Pesticide biochemistry and physiology*. (91):75-80.

Viarengo, A., 1994: Heavy metal cytotoxicity in marine organ-isms: effects on Ca²⁺ homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol* ,20, 85–110.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991 : Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C (1/2), 187-190.

Vidal.ML., 2001 : Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalves d'eau douce *Corbicula fluminea*(Muller)- Purification et caractérisation des Glutathion S-Transférases .Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux .267 ,15,17.

Weckberker, G., Cory, G., 1988 : Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells in vitro. *Cancer letters* ,40 ,257-264.

Wehner R., Gehring W. (1999) : *Biologie et physiologie animales: Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles, orientations comparée et évolutive. De Boeck Université*, page 844.

Wendt-Rasch L.,Van den Brink P.J.;Crum S.J.H and Woin P.,(2004): “ The effects of a pesticides mixture on aquatic ecosystem differing in trophic status: responses of the

Wenwen , L.,Lan, W.,Dongmei, L.,Tuan, X.,Jixian, L., 2011 : Histopathological and biochemical alteration of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*.*Chemosphere*.84:689-694.

Références bibliographiques

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

Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991: Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19, 137-161.

Young, M. S., Early, M. F., Mallet, C. R., Krol, J., 2001: Application of a mixed-mode solid-phase extraction and cleanup procedure for LC/MS determination of thiabendazole and carbendazime in apple juice. *Journal of AOAC international*, 84, 5, 1608-1613.

Zaoui, M., 2010 : Contribution à l'évaluation de la toxicité aiguë et subchronique d'un produit phytosanitaire (Proclaim) chez le rat wistar. Thèse de doctorat de l'Université de Annaba.97 page.