



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie
Option : Toxicologie

Intitulé

**Evaluation de la toxicité de quelques métaux lourds sur le
comportement d'un modèle animal du groupe des
Coelomates**

Présentée par : M^{me} OTMANI Hadjer Epouse SELMANE

Membres de Jury :

KHEBBEB Mohamed El Hadi	Professeur	Président	Université d'Annaba
TADJINE Aicha	Professeur	Directeur de thèse	Université d'El Tarf
BENSOLTANE Samira	Professeur	Co Directeur de thèse	Université d'Annaba
GRARA Nedjoud	Professeur	Examineur	Université de Guelma
BOURNANE Naziha	M.C.A	Examineur	Université d'Annaba
BOUDALIA Sofiane	M.C.A	Examineur	Université de Guelma

Année universitaire : 2017/2018

REMERCIEMENTS

M'y voici...Enfin ! Quelle aventure ! Quelle expérience de vie...

Une thèse de doctorat peut paraître comme un document très aride, très froid et rigide. Pourtant, le doctorat en soi est loin d'être dénué de vie, de créativité et d'interactions humaines. Il s'agit d'un travail de longue haleine, d'un défi que l'on se donne à soi-même. Mais surtout d'une longue aventure humaine et scientifique pleine d'influences, d'entraves, d'évolution et de rencontres. Cette période de doctorat aura été probablement l'un des plus beaux chapitres de ma vie.

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate.

J'aimerais remercier ceux et celles qui d'une manière ou d'une autre ont participé à son écriture ...

En premier lieu, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Madame TADJINE Aïcha, Professeur à l'université d'El Tarf, pour la confiance qu'elle m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux de thèse. Je lui suis extrêmement reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ces années de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, et de sa gentillesse certaine que je n'oublierai jamais.

Mes sincères remerciements s'adressent, aussi à mon codirecteur Madame BENSOLANE Samira, Professeur à l'université d'Annaba, pour son soutien et ses précieux conseils.

Je remercie vivement une deuxième fois le Professeur Mohamed El Hadi KHABEB d'avoir accepté la présidence du jury.

Toute ma reconnaissance pour mon Professeur DJEBAR Mohamed Réda, directeur du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université d'Annaba de m'avoir si gentiment accueillie au sein de son équipe. Je tiens à lui

exprimer ma sincère gratitude, de m'avoir accompagné et soutenu tout au long de ces années de formation et d'avoir veillé au bon déroulement de ce travail. Soyez assuré de ma profonde gratitude pour tout ce que vous m'avez appris.

De simples remerciements ne sont pas suffisants pour exprimer ma sincère reconnaissance à Madame BERREBBAH Houria, Professeur à l'université d'Annaba. Merci pour son soutien sans relâche, sa grande disponibilité, son écoute, sa patience et ses précieux conseils. Elle a fourni beaucoup d'efforts pour que j'évolue dans ma carrière scientifique. J'espère être à la hauteur de sa confiance.

Je remercie infiniment GRARA Nedjoud, Professeur à l'université de Guelma, d'avoir accepté d'examiner et de venir honorer de sa présence mon jury de thèse.

Mes sincères remerciements vont aussi à Madame BOURNANE Naziha Maître de conférences à l'université d'Annaba qui m'a fait l'honneur d'évaluer et d'examiner ce travail.

Je remercie également Mr BOUDALIA Sofiane, Maître de Conférences à l'université de Guelma, d'avoir accepté de juger mon travail en qualité d'examineur.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude au Professeur BENSLAMA Mohamed, directeur du Laboratoire de Pédologie de l'Université d'Annaba de m'avoir si gentiment accueillie au sein de son Laboratoire, pour faire mes analyses de sol.

Mes remerciements vont également à tous mes enseignants et mes professeurs pour la formation scientifique très enrichissante qu'ils m'ont dispensé tout au long de mon cursus universitaire.

Mon travail de recherche sur l'étude histopathologique a été particulièrement facilité par le personnel du laboratoire d'anatomopathologie du CHU IBN ROCHD Annaba. Je tiens à exprimer tout particulièrement ma reconnaissance au Dr. MESYUGHY Asem Médecin en Anapath au CHU IBN ROCHD Annaba pour son aide vraiment très précieuse.

Je ne saurais terminer sans souligner le soutien chaleureux et enthousiasmant de mes chers amis et collègues du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire qui ont contribué, chacun à sa façon, à l'exécution de ce travail. Un grand merci du fond du cœur à Ouissem, Rym, Amel, Sana, Manel, Amira, Billel, Fateh et Zinou, pour les innombrables et inoubliables moments de plaisir, de joies, de folies, de détente, de fous rires, de stress, de peine... que nous avons partagé ensemble. J'en garde un souvenir de profonde complicité et de sincère dévouement. Sachez simplement que votre amitié m'est précieuse et indispensable.

Merci également à Linda, Khadija, Medina, Ibtissem, Nawel, pour leur aide précieuse, leur sympathie et leurs encouragements.

Enfin, Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à mon mari Dr Selmane Mehdi, pour toutes les heures qu'il a consacrées à la relecture de cette thèse, pour ses multiples conseils et pour son soutien affectif sans faille.

DEDICACES

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
L'amour, le respect, la reconnaissance...
Aussi, c'est tout simplement que
Je dédie cette thèse ...

À MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A MON TRES CHER MARI MEHDI

Mon conseiller, et ami fidèle, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles....

Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.

Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A MES CHERS ET ADORABLE FRERES ET SŒURS

Amina, la prunelle de mes yeux, Mounia, la douce, au cœur si grand, Asma l'aimable, Mohamed le généreux, Oussama mon petit frère que j'adore, Mounir l'ainé que j'aime profondément.

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour, L'affection et le respect que je porte pour vous.

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A MA CHERE BELLE MERE ANISSA

Ton encouragement et ton soutien étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance. Merci d'être à mes côtés, par ta présence, par ton amour dévoué et ta tendresse, pour donner du goût et du sens à notre vie de famille. Je te prie de trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A MON CHERE BEAU PERE

Je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité et ta générosité.

A MES BELLES SŒURS ET BEAUX FRÈRES

Asma, Safa, Ihcene , Fayçal, et Nouri .Vous êtes pour moi des sœurs et frères ;Je vous remercie, pour vos appuis, conseils et encouragements qui m'ont été d'un grand soutien au cours de ce long parcours, et pour tous les moments de joie et de plaisanteries qu'on a pu partager ensemble... Puisse DIEU, le tout puissant, vous préserver du mal, vous combler de santé et de bonheur.

À MES CHERS PETITS NEVEUX ET NIECES

Anes Abderrahmen, Mouad, Mosaab, Said, Aroua, Zaid, Samar, Sirine, et Ouais. Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me combler de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

Résumé

Les organismes vivants dans le sol sont soumis à des fluctuations régulières des paramètres abiotiques, ainsi qu'à une contamination chimique du milieu due aux activités anthropiques. Ils sont donc sujets à des stress multiples auxquels ils doivent faire face. Le but de ce travail est l'étude des effets de deux métaux lourds (le cadmium le zinc et leurs mixtures), dont l'un d'eux est considéré comme le polluant le plus toxique et le plus répandu dans l'environnement des zones à fortes activités humaines. Dans cette perspective nous nous sommes fixés comme objectif leurs effets sur un modèle bio-accumulateur et bio-indicateur en éco-toxicologie : le ver de terre *Allolobophora caliginosa*.

Leurs effets ont été étudiés non seulement par une approche ciblée au laboratoire, consistant à évaluer l'effet de ces molécules et de leurs mixtures sur la mortalité, le taux de croissance, la mesure des niveaux de défenses enzymatiques anti-oxydantes ainsi que l'estimation des effets histopathologiques.

Les premiers résultats montrent que la contamination par le Cadmium et les mixtures provoquent une diminution dose-dépendante du poids chez les vers de terre qui pourrait être due à la répulsion de la nourriture. L'étude du métabolisme biochimique a révélé une perturbation significative du taux des principales macromolécules biologiques.

Le suivi des biomarqueurs du stress oxydant montre des perturbations doses-dépendantes et statistiquement significatives suite à la contamination par ces métaux lourds. Nous avons, ainsi, mis en évidence une induction des activités enzymatiques CAT, MDA et GST ainsi qu'une déplétion du taux de GSH, témoignant de la survenue d'une peroxydation lipidique.

Enfin, l'aspect histologique des tissus des vers de terre a permis de mettre en évidence les atteintes tissulaires de l'exposition aux particules métalliques se manifestant par une hypertrophie cellulaire, une nécrose et une présence de particules sphériques sous forme d'amas confirmant ainsi la bioaccumulation des métaux .

Mots clés : *Allolobophora caliginosa*, Cadmium, Zinc, mixtures, bio marqueurs, histologie.

Abstract

The purpose of this work was to study the effects of two heavy metals (the cadmium the zinc and their mixtures), which one of them is considered as the most toxic pollutant, the most spread in the environment of zones with strong human activities. In this perspective we are focused on their effects on bio-indicator bio-accumulator specie, the earthworms *Allolobophora caliginosa*.

Their effects have been studied not only by a targeted approach in the laboratory, consisting of evaluating the effect of these molecules and their mixtures on mortality, the growth rate, the measurement of enzymatic anti-oxidant defenses and the estimation of histopathological effects.

The first results show that cadmium contamination and mixtures cause a dose-dependent decrease in earthworm's weight. The study of biochemical metabolism revealed an alteration of the level of the main biological macromolecules (proteins).

The biomarkers monitoring of oxidative stress shows dose- dependent disturbances and statistically significant following contamination by these heavy metals. We have thus demonstrated an induction of CAT, MDA and GST enzymatic activities as well as a depletion of the GSH level, testifying to the occurrence of lipid peroxidation.

Finally, the histological aspect of earthworm's revealed tissue damage after exposure to metal particles manifested by cellular hypertrophy, necrosis and the presence of spherical particles, confirming the bioaccumulation of metals.

Key words: *Allolobophora caliginosa*, cadmium, zinc, bio markers, histology.

المخلص

الكائنات الحية التي تعيش في التربة، تخضع لتقلبات منتظمة للملحقات الغير حيوية، والتلوث الكيميائي للبيئة بسبب الأنشطة البشرية. فهذا ، فالكائنات تخضع لضغوطات متعددة.

الهدف من هذا العمل هو دراسة السمية المحتملة على اثنين من المعادن الثقيلة (الزنك والكاديوم ومخاليطهما) واحد منهم يعتبر أكثر الملوثات السامة، والأكثر انتشارا في البيئة نتيجة الأنشطة البشرية القوية وأثارها على الكائنات الحية الحيوية المستعملة كمؤشر حيوي للتلوث الإيكولوجي، الديدان *Allolobophora caliginosa*.

قد تم دراسة هذه الآثار في المختبر، من خلال نهج لتقييم تأثير المركبات المختارة وخلائطها على النمو، لتحديد التركيب البيوكيميائي ، لقياس مستويات مضادات الأكسدة الأنزيمية، وأخيرا لدراسة الآثار على الأنسجة.

وأظهرت النتائج الأولية أن وجود الكاديوم والمخاليط تسبب بانخفاض وزن ديدان الأرض متناسب مع الجرعات. وكشفت دراسة الأيض الكيميائي الحيوي عن تغيير مستوى الجزيئات البيولوجية الرئيسية (البروتينات)، في ديدان الأرض المعاملة باثنين من المعادن الثقيلة ومخاليطها.

علاوة على ذلك، يظهر رصد المؤشرات الحيوية للأكسدة في وجود المعادن الثقيلة اضطرابات ذات دلالة إحصائية متناسبة طرديا مع الجرعة. لوحظ ذلك من خلال تحريض الأنشطة الإنزيمية GST و CAT، إلى جانب انخفاض حاد في معدل GSH، بالتوازي مع زيادة في مستويات MDA مما يدل على حدوث تأكسد للدهون.

وأخيرا، أظهرت نتائج الدراسة النسيجية للديدان بعد المعالجة بمختلف المواد محل البحث، إتلاف نوعي لمختلف الأنسجة، تضخم الخلية ، نخر ووجود جسيمات كروية في شكل مجموعات وبالتالي يؤكد تراكم المعادن.

الكلمات المفتاحية : *Allolobophora caliginosa*، كاديوم، زنك، تلوث، مخاليط، المؤشرات الحيوية، الدراسة النسيجية.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des Planches

Liste des abréviations

Introduction générale 1

Chapitre1: Synthèse bibliographique

1^{ère} PARTIE : Etude bibliographique sur les Métaux lourds

1. Définition des « métaux lourds ».....	5
1.1. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds.....	7
1.2. Mobilité et biodisponibilité des métaux lourds.....	9
2. Bioaccumulation et toxicité des métaux lourds.....	9
3. Molécules candidates	11
3.1. Zinc.....	11
3.1.1. Généralités.....	11
3.1.2. Utilisations.....	11
3.1.3. Propriétés.....	12
3.1.4. Le zinc dans le sol.....	12
a) Influence des paramètres physico-chimiques et des principaux constituants du sol sur la mobilité du zinc.....	13
b) Influence des micro-organismes sur la mobilité du zinc dans les sols.....	14
3.2. Cadmium.....	14
3.2.1. Caractéristiques Chimiques.....	14

3.2.2. Origines.....	15
3.2.3. Concentrations dans l'environnement et métrologie	16
3.2.4. Mobilité et biodisponibilité dans le Sol	16
3.2.5. Mobilité biodisponibilité et toxicité du cadmium chez l'homme	18

2^{ème} PARTIE : Le stress oxydant

1. Les espèces oxygénées activées.....	20
2. Rôles des espèces réactives de l'oxygène dans les situations physiologiques.....	20
3. Le déséquilibre : origines et conséquences	21
4. Principales cibles biologiques des EOA.....	21
4.1. L'acide désoxyribonucléique ou AND.....	21
4.2. Les protéines.....	21
4.3. Les Lipides membranaires.....	22
4.4. Les Lipoprotéines.....	22
5. Les défenses antioxydantes.....	22
5.1. Systèmes de défense enzymatiques.....	23
5.1.1. Les superoxyde dismutases (SOD).....	23
5.1.2. Les glutathion peroxydases (GPxs).....	23
5.1.3. Le système thiorédoxine.....	24
5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	24
5.2.1. Le glutathion et les protéines-thiols.....	24
5.2.2. Le Coenzyme Q10.....	24
5.3. Les oligoéléments.....	25

5.3.1. Le sélénium.....	25
5.3.2. Le cuivre.....	25
5.3.3. Le zinc.....	25
6. Notion de biomarqueurs	25
6.1. Les biomarqueurs d'exposition.....	26
6.2. Les biomarqueurs d'effet.....	26
6.3. Les biomarqueurs de sensibilité/susceptibilité.....	26

3^{ème} PARTIE : Organisme à l'étude: le ver de terre *Allolobophora caliginosa*

1. Importance écologique.....	27
2. Biologie du ver de terre.....	28
3. Description morphologique	29
4. Anatomie interne	30
5. Description de l'espèce <i>A. caliginosa</i> et cycle de vie.....	32
6. Ver de terre et métaux lourds.....	33
7. Utilisation du ver de terre comme bioindicateur.....	35

Chapitre2: Etude des paramètres morphophysologiques

1. Introduction	37
2. Matériel et méthodes.....	38
2.1. Région d'étude	38
2.2. Méthodes d'échantillonnage.....	38
2.3. Matériel biologique.....	38
2.3.1. Choix de l'espèce.....	38

2.3.2. Systématique du ver de terre.....	38
2.4. Matériel chimique.....	39
2.4.1. Protocole de contamination par le cadmium.....	39
2.4.2. Protocole de contamination par le zinc.....	39
2.4.3. Protocole de contamination par les mixtures	39
3. Méthodes.....	39
3.1. Conduite de l'essai.....	39
3.1.1. Conditions expérimentales.....	39
3.1.2. Dissection des vers de terre.....	42
3.2. Biomarqueurs physiologiques.....	43
3.2.1. Suivi du pourcentage de mortalité	43
3.2.2. Suivi du poids des vers de terre	43
3.3. Analyse statistique.....	44
4. Résultats	44
4.1. Evaluation du pourcentage de Mortalité	44
4.2. Evaluation du poids des vers de terre.....	45
5. Discussion.....	48

Chapitre 3: Etude du stress oxydant

1. Introduction	51
2. Matériel et méthodes	52
2.1. Dosage des protéines totales	52
2.2. Détermination du taux de glutathion (GSH)	52

2.3. Mesure de l'activité glutathion-S-transférase (GST)	53
2.4. Mesure de l'activité catalase (CAT)	53
2.5. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)	54
3. Analyses statistiques.....	54
4. Résultats	55
4.1. Effet du PH	55
4.2. Effets du Cadmium, du Zinc et de leurs mixtures sur le métabolisme biochimique d' <i>Allolobophora caliginosa</i>	55
4.2.1. Effet sur l'évolution du taux de protéines totales	55
Effet du Cadmium	55
Effet du Zinc	56
Effet des mixtures de cadmium et de zinc	57
4.3. Effets du Cadmium, du Zinc et de leurs mixtures sur les indicateurs du stress oxydant.....	58
4.3.1. Effets sur l'évolution du taux de glutathion (GSH)	58
Effet du Cadmium	58
Effet du Zinc.....	59
Effet des mixtures de cadmium et de zinc	60
4.3.2. Effets sur l'évolution de l'activité glutathion S-transférase (GST).....	61
Effet du Cadmium	61
Effet du Zinc	62
Effet des mixtures de cadmium et de zinc	63
4.3.3. Effets sur la variation de l'activité catalase (CAT)	64
Effet du Cadmium	64

Effet du Zinc	65
Effet des mixtures de cadmium et de zinc	66
4.3.4. Effets sur la variation de la concentration de malondialdéhyde (MDA)	67
Effet du Cadmium.....	67
Effet du Zinc	68
Effet des mixtures de cadmium et de zinc.....	69
5. Discussion	70

Chapitre 4: Etude histopathologique

1. Introduction.....	76
2. Matériel et méthodes.....	77
2.1. Préparation des échantillons.....	77
2.2. Microscopie optique.....	77
3. Résultats.....	78
4. Discussion	84
Conclusion générale et Perspectives.....	87
Références bibliographiques.....	90

Annexe

Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
1	Classification des principaux ETM selon leur affinité pour des ligands oxygénés (classe A), des ligands azotés ou soufrés (classe B) et pour les deux types de ligands (classe intermédiaire)	5
2	Principaux éléments métalliques essentiels et non-essentiels	6
3	Principaux propriétés Physico-chimiques du zinc	12
4	Composition des mixtures testées	39
5	La méthode de traitement des vers de terre	40
6	Conditions expérimentales	41
7	Pourcentage de mortalité observé chez des vers de terre adultes traités par les métaux durant la période d'exposition	44

Liste des figures

N°	Titres	Pages
1	Origine des métaux lourds dans le sol	8
2	Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds	9
3	Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production	23
4	Description et représentation schématique des trois groupes écologiques de lombriciens	28
5	Morphologie d'un ver de terre	30
6	Schéma de la coupe transversale d'un lombric	31
7	Anatomie interne d'un ver de terre	31
8	Cycle de vie de l'espèce <i>Allolobophora caliginosa</i>	33
9	<i>Allolobophora caliginosa</i>	38
10	Dispositif de contamination des vers de terre	42
11	Dispositif de jeun des vers de terre avant dissection	43
12	Préparation des vers de terre pour la dissection	43
13	Effet du Cadmium sur le poids moyen des vers de terre adultes <i>Allolobophora caliginosa</i> pendant une période de sept et quatorze jours	45
14	Effet du Zinc sur le poids moyen des vers de terre adultes <i>Allolobophora caliginosa</i> pendant une période de sept et quatorze jours	46
15	Effet des mixtures de Cadmium et de Zinc sur le poids moyen des vers de terre adultes <i>Allolobophora caliginosa</i> pendant une période de sept et quatorze jours	47
16	Effet du Cadmium sur le taux de protéines totales chez <i>Allolobophora caliginosa</i>	55
17	Effet du Zinc sur le taux de protéines totales chez <i>Allolobophora caliginosa</i>	56
18	Effet des mixtures de Cadmium et de zinc sur le taux de protéines totales chez <i>Allolobophora caliginosa</i>	57
19	Variation du taux de GSH chez <i>Allolobophora caliginosa</i> exposée aux concentrations croissantes de Cadmium	58
20	Variation du taux de GSH chez <i>Allolobophora caliginosa</i> exposée aux concentrations croissantes de Zinc	59
21	Variation du taux de GSH chez <i>Allolobophora caliginosa</i> exposée aux concentrations croissantes des mixtures de Cadmium et de Zinc	60

22	Evolution de l'activité GST chez <i>Allolobophora caliginosa</i> en fonction des concentrations croissantes de Cadmium	61
23	Evolution de l'activité GST chez <i>Allolobophora caliginosa</i> en fonction des concentrations croissantes de Zinc	62
24	Evolution de l'activité GST chez <i>Allolobophora caliginosa</i> en fonction des concentrations croissantes des mixtures de Cadmium et de Zinc	63
25	Effet des concentrations croissantes de Cadmium sur la variation de l'activité CAT chez les <i>Allolobophora caliginosa</i>	64
26	Effet des concentrations croissantes de Zinc sur la variation de l'activité CAT chez les <i>Allolobophora caliginosa</i>	65
27	Effet des concentrations croissantes des mixtures de Cadmium et de zinc sur la variation de l'activité CAT chez les <i>Allolobophora caliginosa</i>	66
28	Evolution du taux de MDA chez <i>Allolobophora caliginosa</i> présence des concentrations croissantes de Cadmium	67
29	Evolution du taux de MDA chez <i>Allolobophora caliginosa</i> présence des concentrations croissantes de Zinc	68
30	Evolution du taux de MDA chez <i>Allolobophora caliginosa</i> présence des concentrations croissantes des mixtures de Cadmium et de Zinc	69
31	Représentation schématique de l'absorption, de la biotransformation, de l'accumulation et de l'élimination des métaux dans les vers de terre au cours de l'ingestion de sol contaminé par les métaux lourds chez le ver de terre	76

Liste des planches

N°	Titres	Pages
1	Observations au microscope optique de coupe histologique sagittale des vers témoins (X 40)	78
2	Observations au microscope optique de coupes histologiques sagittale des vers de terre témoins (A) et des traités par la concentration de cadmium 100 mg de cd/500g de sol après 14 jours d'exposition (B), (X 40).	79
3	Observations au microscope optique de coupes histologiques sagittale des vers de terre témoins (A) et des traités par la plus forte concentration de cadmium 150 mg de cd/500g de sol après 14 jours d'exposition (B), (X 100)	80
4	Observations au microscope optique de coupes histologiques sagittale des vers de terre témoins (A) et des traités par la plus forte concentration de cadmium 150 mg de cd/500g de sol après 14 jours d'exposition (B), (X 400)	81
5	Observations au microscope optique de coupes histologiques sagittale des vers de terre témoins (A), et des vers après 14 jours de traitement aux mixtures de cadmium et de zinc (M1) (B), (X 400)	82
6	Observations au microscope optique de coupes histologiques sagittale des vers de terre témoins (A), et des vers après 14 jours de traitement aux mixtures de cadmium et de zinc (M3) (B), (X 400)	83

Liste des abréviations

BCFs : Facteur (s) de bioconcentration
CAT : catalase
Cd: Cadmium
CE₅₀ : concentration efficace 50%
Cr : Chrome
Cu : Cuivre
ETM : Elément Trace Métallique
FBAs : Facteur(s) de bioaccumulation
Fe : Fer
GSH : Glutathion réduit
GSSG: Glutathion disulfide
GST : Glutathion S transférase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
Hg : Mercure
HSPs: Hydrocarbure(s) aromatique polycyclique
MDA: Malonedialdéhyde
Mn : Manganèse
MTs : métallothionéines
Ni : Nickel
O₂·- : Radical superoxyde
OP(s): organophosphoré(s)
Pb : Plomb
PCPs : Polychlorophénols
ROS : Espèce réactive oxygène
SOD : Superoxyde dismutase
Zn : Zinc

Introduction générale

Les éléments métalliques sont sous différentes formes, toujours présents au sein de l'environnement. A l'état de traces, ils sont nécessaires voire indispensables aux êtres vivants. A concentration élevée, en revanche, ils présentent une toxicité plus au moins grave. La présence de métaux dans l'environnement résulte de causes naturelles et des activités humaines. Ils posent un problème réel, car ils s'accumulent et ne sont pas biodégradables.

L'utilisation des métaux lourds pour le besoin du développement industriel entraîne un accroissement de la dissémination des résidus toxiques dans l'environnement. Chaque année des milliers de tonnes de métaux lourds se dispersent dans l'environnement. La pollution industrielle provenant des usines de production de l'activité humaine tels que les matières organiques et graisses (industries agroalimentaires), les produits chimiques divers (industries chimiques), les matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs) et la métallurgie, les déchets miniers et les terrils industriels sont une source particulièrement importante de pollution par le zinc, le plomb et le cadmium (Huynh, 2009; Alayat *et al.*, 2014). En effet l'Algérie a accumulé "un retard" dans la gestion des déchets industriels et spéciaux dangereux (produits phytosanitaires, huiles usagées contenues dans des appareils électriques etc.), elle est ainsi confrontée à la production et au stockage d'une quantité "notable" de déchets industriels avec une production de 2,5 millions de tonnes/an et un stockage de 4,5 millions de tonnes, dont les déchets spéciaux dangereux atteignent les 325.100 tonnes/an (Bourrelier *et al.*, 1998).

Certaines pratiques agricoles sont aussi à l'origine de l'introduction de métaux lourds dans le sol. Les produits destinés à améliorer les propriétés physico-chimiques du sol sont souvent plus riches en métaux lourds que le sol lui-même citons les engrais, les composts et les boues de station d'épuration (Alayat *et al.*, 2014).

Le rôle des pratiques industrielles et agricoles dans la contamination des sols doit être pris en compte : cela concerne une grande partie du territoire. Leur accumulation et leur transfert constituent donc un risque pour la santé humaine via la contamination de la chaîne alimentaire, mais aussi pour le milieu naturel dans son ensemble (Bourrelier *et al.*, 1998).

La préservation des écosystèmes est donc une des préoccupations majeures au niveau mondial. Pour évaluer la qualité des écosystèmes, les recherches actuelles sont axées principalement sur la détection précoce de signes traduisant des altérations plutôt que sur la

réalisation d'un état des lieux trop tardif (Viard-La Rocca, 2004 ; Moumeni et *al.*, 2016; Atilia et *al.*, 2016).

Dans cette optique, l'écotoxicologie revêt une importance primordiale : elle s'intéresse particulièrement aux interactions entre les produits chimiques présents dans l'environnement et le biotope et englobe plusieurs domaines dont la toxicologie, l'écologie appliquée, la chimie environnementale, mais aussi la mise au point de bioindicateurs (Viard-La Rocca , 2004), dont le rôle principal dans les études de biomonitoring est de fournir une réponse précoce à des effets délétères sur les systèmes biologiques et d'estimer les effets biologiques dus à des contaminants (Lam et Gray., 2003).

La présence de métaux constitue un stress majeur susceptible de perturber les grandes fonctions physiologiques des animaux (Labrot et *al.*, 1996 ;Brulle, 2008). Les invertébrés du sol sont considérés comme de bons indicateurs de la qualité du sol (Lokke et Van Gestel, 1998; Greig-Smith et *al.*, 1992) et certains d'entre eux, particulièrement les vers de terre, présentent un intérêt particulier, car ils peuvent être exposés aux contaminants par différentes voies (phase aqueuse, phase vapeur et ingestion de la phase solide). Certaines espèces sont ubiquistes et représentatives de la faune indigène tout en étant faciles à élever au laboratoire. Ces organismes considérés comme prioritaire en écotoxicologie (Spurgeon et *al.*, 2003a) sont souvent fortement affectés par la pollution métallique. Par conséquent, l'exposition métallique de certains Annélides Oligochètes pourrait engendrer des modifications exploitables permettant de dresser un état des lieux et de mesurer les risques provoqués par la présence de métaux polluants dans le sol (Brulle et *al.*, 2007).

L'étude des effets induits par les contaminants chimiques au niveau des organismes repose sur l'utilisation des marqueurs biologiques, ou biomarqueurs, une notion née au début des années 1980 (Michel, 2012). Les biomarqueurs sont des indices sensibles à la fois de la biodisponibilité d'un polluant et des réponses biologiques précoces. Ainsi, l'utilisation simultanée de plusieurs biomarqueurs pris à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, tissulaire, physiologique) chez diverses espèces apparait comme l'approche la plus satisfaisante pour le diagnostic des effets des polluants sur les individus (Lagadic et *al.*, 1997; Brulle et *al.*, 2007).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier, dans un premier temps, les effets de deux métaux lourds (Cadmium et Zinc) et leurs mixtures sur les vers de terre *Allolobophora caliginosa*. Pour cela, ce manuscrit est organisé en cinq grandes parties :

- La première partie synthétise les connaissances sur les effets et le devenir des métaux lourdes en général et des métaux étudiés en particulier, ainsi que sur les critères de choix du modèle biologique utilisé pour évaluer le risque.
- La deuxième partie est consacrée à l'impact du cadmium, du zinc et leurs mixtures sur la croissance et la survie des vers de terre.
- Dans la troisième partie nous avons étudié certains biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques du stress oxydant des vers de terre après une exposition au cadmium, au zinc et leurs mixtures.
- la quatrième partie est destinée à l'exploration histopatologique des vers de terre *Allolobophora caliginosa*.
- Enfin, une conclusion générale discute les résultats présentés dans les parties précédentes. Les perspectives envisagées dans la continuité de ces travaux sont également présentées.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

**1^{ère} PARTIE : Etude bibliographique sur les
Métaux lourds**

Les activités urbaines, industrielles et agricoles sont responsables d'une contamination croissante des sols et de l'eau par les ions métalliques. Les êtres vivants sont exposés à ces éléments dont le potentiel toxique est indéniable. Les métaux lourds sont parmi les contaminants majeurs de l'environnement, posent de sérieux problèmes écologiques, tant par le caractère ubiquiste de leur présence au sein de la biosphère que par leur forte rémanence, leur transfert potentiel vers les organismes vivants et leur toxicité élevée (Kabata-Pendias *et al.*, 2007; Atilia *et al.*, 2016). A ce jour, aucune fonction métabolique connue ne requiert à certains métaux lourds, qui présentent une importante toxicité, même à faible dose, pour les animaux et les plantes (Remon, 2006). Leur accumulation dans les différents compartiments des écosystèmes, génère par conséquent un risque non négligeable pour les équilibres écologiques et la santé publique (Brulle *et al.*, 2007; Alayat *et al.*, 2014).

L'importance des invertébrés dans la structure des communautés et le fonctionnement des écosystèmes terrestres et aquatiques justifie l'intérêt d'étendre les recherches et les procédures écotoxicologiques à ces groupes d'animaux (Ramade, 1992). Les approches actuelles tendent à étudier les interactions entre les contaminants et une grande diversité d'organismes animaux afin d'évaluer l'impact des contaminants sur l'ensemble des communautés animales. Cet objectif implique l'élargissement de l'éventail taxonomique et écologique (niveau trophique) classiquement étudié et la prise en compte dans les études d'écotoxicologie d'autres groupes d'invertébrés tels que les vers de terre (Cœurdassier *et al.*, 2001). Le suivi en tandem espèce bioindicatrices-biomarqueurs conduit ainsi à une vision intégrée de l'impact du stress chimique sur les écosystèmes (Dupuy, 2012; Moumeni *et al.*, 2016).

Il est donc nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement à travers des organismes ou un ensemble d'organismes que l'on utilise comme sentinelles en étudiant les modifications physiologiques, biochimiques et écologiques qui les affectent. (Sanchez et Tarazona ; 2002; Brown *et al.*, 2004; Moumeni *et al.*, 2016).

Ces êtres vivants très sensibles aux contaminants présentent l'intérêt de se prêter plus facilement que l'homme aux études des effets des polluants et permettent de mettre en évidence des pollutions chroniques ou brutales (Grara *et al.*, 2011; Zeriri *et al.*, 2012; Aït Hamlet *et al.*, 2013).

1. Définition des « métaux lourds »

La définition des "métaux lourds" est encore indéfinie et controversée. Habituellement, on définit comme "métaux lourds", les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments ceux dont la densité relative est supérieure à 5. Il existe cependant de nombreuses publications faisant mention de l'aluminium (lequel n'est pas "lourd") ou même le sélénium (lequel n'est pas un métal). Loin de cette controverse de chimistes, il est plus judicieux pour les biologistes d'utiliser un autre type de classification (Nieboer et Richardson ; 1980) basée sur des propriétés chimiques, les propriétés des acides de Lewis. La théorie de Pearson (Pearson, 1963; Migeon, 2009) permet de classer les métaux en fonction de leurs affinités et donc de leur faculté de liaison soit avec l'oxygène (Classe A) soit avec les ligands porteurs d'azote ou de soufre (classe B). Entre les deux, on trouvera les métaux de classe intermédiaire (*borderline*) qui présentent des caractéristiques propres aux deux classes. Cette distinction reflète davantage la facilité des métaux à traverser les membranes cellulaires, à être stockés au sein de granules de détoxification ou à être complexés à des protéines fixatrices de métaux. Les différentes classes de métaux sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1: Classification des principaux ETM selon leur affinité pour des ligands oxygénés (classe A), des ligands azotés ou soufrés (classe B) et pour les deux types de ligands (classe intermédiaire) (Hopkin, 1989).

Classe A	Classe intermédiaire	Classe B
Calcium	Zinc	Cadmium
Magnésium	Plomb	Cuivre
Manganèse	Fer	Mercure
Potassium	Chrome	Argent
Sodium	Cobalt	
Strontium	Nickel	
Sodium	Arsenic	
	Vanadium	

La plupart des métaux considérés comme polluants dans l'environnement sont ceux des groupes B ou " intermédiaires " qui forment des complexes inorganiques dans les solutions

salines, sont extrêmement solubles dans les lipides et traversent alors très facilement les membranes cellulaires (Simkiss, 1983).

D'un autre point de vue biologique, on en distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques (tableau 2).

- (i) **Les métaux essentiels** sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (Loué, 1993). Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe). Par exemple, le zinc (Zn), à la concentration du millimolaire, est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénases, protéinase, peptidase) et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides (Kabata-Pendias et Pendias ; 2001 ; Migeon, 2009).
- (ii) **Les métaux non-essentiels** (métaux toxiques) ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd). Le terme métaux lourds, « heavy metal », implique aussi une notion de toxicité (Kabata-Pendias et Pendias ; 2001; Migeon, 2009).

Le terme « éléments traces métalliques » est aussi utilisé pour décrire ces mêmes éléments, car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement (Baker et Walker; 1989; Migeon, 2009). Dans ce contexte, nous utiliserons le terme « métaux lourds » dans le sens de l'impact toxique sur les humains et l'environnement.

Tableau 2: Principaux éléments métalliques essentiels et non-essentiels (Hopkin, 1989)

Eléments essentiels majeurs	Oligo-éléments essentiels	Eléments "essentiels" en ultra trace	Eléments non-essentiels
Calcium, Phosphore, Potassium, Soufre Magnesium, Chlore, Sodium	Fer, Iode, Cuivre, Manganese, zinc, Cobalt, Molybdène, Sélénium, Chrome, Nickel, Vanadium, Silicone, Arsenic	Lithium, Fluor, Aluminium, Étain, Plomb, (Cadmium)* * essentiel si deficit de Zinc	Cadmium, Mercure

1.1. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds

Contrairement aux contaminants organiques, la majorité des métaux lourds ne sont pas bio transformés et persistent dans l'environnement. Ils ont un temps de rémanence qui est de l'ordre de millions d'années, dans le sol. Les métaux lourds par leurs propriétés non biodégradables sont toxiques et responsables de nombreuses pathologies (Adriano, 2001). Par conséquent, la pollution par les métaux lourds a une certaine particularité qui est surtout son irréversibilité. Une fois les métaux dissipés dans la nature, il est impossible de les récupérer aisément.

Le problème principal avec les métaux lourds comme le plomb, le cadmium, le cuivre et le mercure est qu'ils ne peuvent pas être biodégradés, et donc persistent pendant de longues périodes dans des sols (Huynh, 2009). Leur présence dans les sols peut être naturelle ou anthropogénique

(a) Origine naturelle

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (Bourrelier et Berthelin, 1998). La concentration naturelle de ces métaux lourds dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge (Baize, 2002; Migeon, 2009).

(b) Origine anthropique

Cependant, la source majeure de contamination est d'origine anthropique (Klute, 1986). Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation du flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle (Franklin et al., 2005; Huynh, 2009 ; Migeon, 2009).

- La pollution atmosphérique résulte des activités industrielles (rejets d'usine) et urbaines (gaz d'échappement, etc...). Il faut distinguer les apports diffus aériens d'origine lointaine des apports massifs localisés d'origine proche. Dans les apports diffus sont classés les poussières et aérosols provenant des chauffages ainsi que des moteurs d'automobiles. Les apports massifs localisés résultent d'apports anthropiques accidentels liés aux activités industrielles sans protection efficace contre la dispersion dans l'environnement (Baize, 1997).
- Certaines pratiques agricoles sont à l'origine de l'introduction de métaux lourds dans le sol. Les produits destinés à améliorer les propriétés physico-chimiques du

sol tel que les engrais, les composts et les boues de station d'épuration sont souvent plus riches en métaux lourds que le sol lui-même d'épuration (Robert et Juste, 1999; Migeon, 2009).

- La pollution industrielle provenant des usines de production de l'activité humaine tels que les matières organiques et graisses (industries agro-alimentaires), les produits chimiques divers (industries chimiques), les matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs) et la métallurgie (Godin *et al.*, 1985; Franklin *et al.*, 2005; Migeon, 2009). Les déchets miniers et les terrils industriels sont une source particulièrement importante de pollution par le zinc, le plomb et le cadmium.

Le rôle des pratiques industrielles et agricoles dans la contamination des sols doit être pris en compte : cela concerne une grande partie du territoire. Leur accumulation et leur transfert constituent donc un risque pour la santé humaine via la contamination de la chaîne alimentaire, mais aussi pour le milieu naturel dans son ensemble (Bourrelier et Berthelin; 1998 ; Franklin *et al.*, 2005; Migeon, 2009).

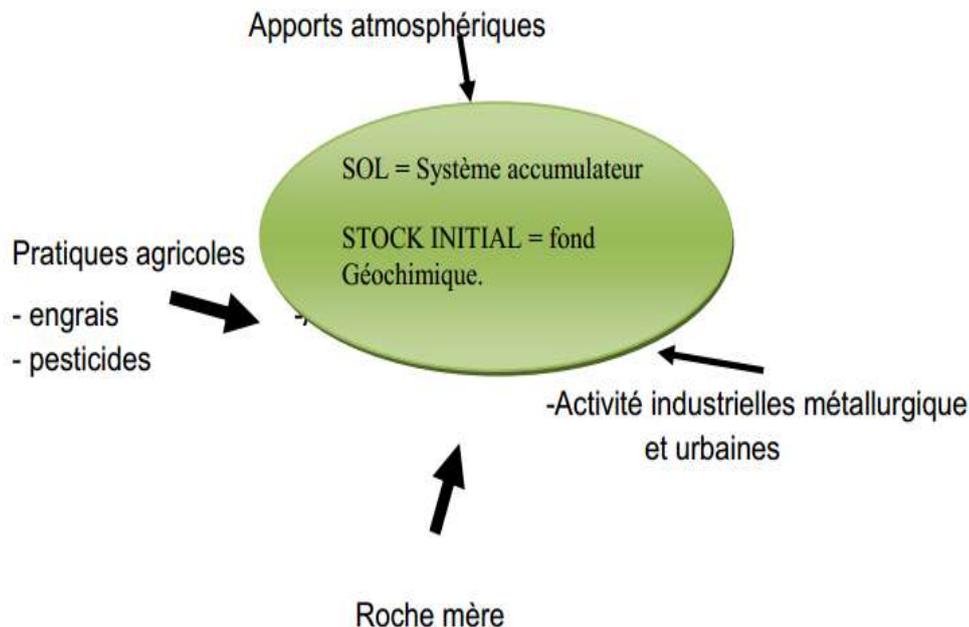


Figure 01 : Origine des métaux lourds dans le sol (Slatni, 2014)

1.2. Mobilité et biodisponibilité des métaux lourds

La toxicité d'un métal dépend de sa spéciation (forme chimique) autant que des facteurs environnementaux (Babich, 1980). Dans le sol, les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules du sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre ; il est alors biodisponible. Comme tout élément chargé positivement, les cations métalliques peuvent interagir dans le sol avec toute particule organique ou minérale chargée négativement. De l'équilibre entre les formes libres et fixées de l'ion va dépendre sa biodisponibilité, directement liée à sa toxicité. Leur distribution entre la phase solide et la phase liquide ou leur solubilisation (leur passage de la phase solide à la phase liquide) constitue la clé pour mieux comprendre leur sort et leur transport dans le sol (Ross, 1994 ; Adriano, 2001). Enfin, la biodisponibilité et la mobilité (Figure 1) des métaux lourds varient en fonction de plusieurs facteurs du sol. Parmi lesquels, la capacité d'échange de cation (CEC), le pH, le potentiel redox (Eh), la teneur en phosphate disponible, la teneur en matière organique et les activités biologiques (Carrillo Gonzalez et al., 2006; Huynh, 2009 ; Migeon, 2009).

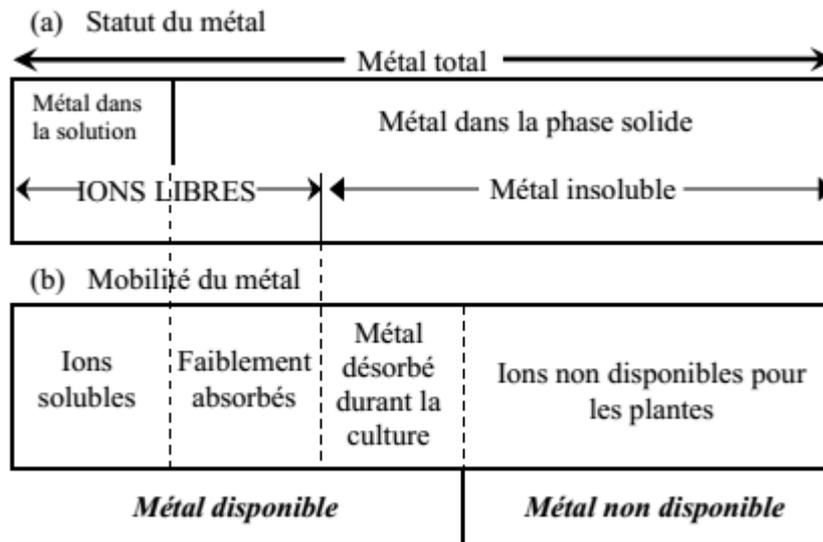


Figure 02 : Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds (Huynh, 2009).

2. Bioaccumulation et toxicité des métaux lourds

Les métaux lourds sont les polluants les plus connus pour leur accumulation dans l'organisme. Cependant, La bioaccumulation est un phénomène par lequel: une substance présente dans un biotope pénètre dans un organisme même si elle n'a aucun rôle métabolique ou même si elle est toxique pour ce dernier (Ramade, 1993). Le rapport de la teneur de

l'organisme en une certaine substance à la teneur du milieu est généralement appelé facteur de bioconcentration. L'étude de la bioaccumulation permet donc d'indiquer le niveau de contamination d'un milieu. Les métaux toxiques sont des polluants bien connus pour leur accumulation dans les organismes, notamment dans les organismes terrestres. Ce phénomène, bien que largement étudié, ne fait l'objet d'aucune proposition de protocole standardisé à l'heure actuelle en ce qui concerne les animaux terrestres (Phillips, 1983).

La bioaccumulation des métaux lourds est définie comme étant un processus pour lequel l'organisme assimile et concentre les métaux lourds à des concentrations supérieures à celles existantes dans le milieu (Biney et Amuzou ; 1994).

Il existe deux principaux phénomènes responsables de la bioaccumulation de contaminants par les organismes : la bioconcentration et l'amplification.

- **La bioconcentration** est le transfert direct des substances à partir du milieu ambiant (eau, sédiments, etc.) vers les tissus et les organes (Markert *et al.*, 2003 ; D'Adamo *et al.*, 2008).
- **L'amplification** est le résultat du transfert des contaminants le long des différents niveaux de la chaîne alimentaire (D'Adamo *et al.*, 2008).

La bioaccumulation de substances toxiques peut entraîner chez certains organismes des modifications du comportement, de la structure des populations et des processus métaboliques ainsi que des changements au niveau morphologique, histologique et cellulaire (Biney et Amuzou ; 1994).

La majorité des ETM sont caractérisés par une accumulation lente et un temps de rémanence très long souvent, les sols se comportent comme des tampons naturels facilitant le transport des ETM vers l'hydrosphère et la biocénose. Ainsi leur persistance dans le sol, considérée la plus longue par rapport aux autres compartiments de la biosphère et leur biodisponibilité favorise la contamination de la chaîne trophique à partir des micro-organismes jusqu'au dernier maillon : l'homme (Mc Grath, 1997).

Au niveau cellulaire la majorité des ETM ne traverse pas la membrane plasmique hydrophobe qu'à l'aide d'un ligand-transporteur. Une fois à l'intérieur de la cellule il est rapidement fixé par un autre ligand pour limiter sa diffusion à l'extérieur de la cellule. Ces ligands constituent ce qu'on appelle les systèmes de « piégeage cinétique » caractérisés par le pouvoir de liaison à leur système tous deux spécifiques du métal lourd en jeu. Il faut néanmoins conserver à l'esprit que la toxicité observée ou l'accumulation des xénobiotiques

résultent de phénomènes physiologiques complexes comprenant vraisemblablement des phénomènes de détoxification voire même d'excrétion, nécessairement omis et amenant certainement à sous-estimer la quantité de xénobiotiques assimilés (Huynh ,2009).

3. Molécules candidates

3.1. Zinc

3.1.1. Généralités

Le zinc est un élément trace essentiel pour l'Homme, les animaux et les plantes supérieures. La concentration totale en Zn dans la lithosphère est approximativement de 80 mg/kg et la gamme de concentration rencontrée dans les sols varie entre 10 et 300 mg/Kg avec une concentration moyenne de 50 mg/kg (il ne représente que 0,012% de la croute terrestre), il est présent dans l'eau, le sol et l'air. Dans les sols contaminés en zinc, des concentrations de quelques milliers à des dizaines de milliers de mg/kg ont été rencontrées (kaiser, 2011).

Le zinc est, dans la nature, habituellement associé à d'autres métaux tels que le cuivre et le plomb. Parmi ces composés, citons :

- l'oxyde de zinc ZnO (blanc de zinc ou blanc de neige),
- le chlorure ZnCl₂,
- le sulfure ZnS (blende),
- le sulfate ZnSO₄.

Les apports anthropiques du Zn résultent de trois groupes d'activités majeures:

- Les sources minières et industrielles: traitement du minerai, raffinage, galvanisation du fer, gouttières, toitures, fabrication de piles électriques, piments, matières plastiques, caoutchouc.
- Les épandages agricoles.
- De nombreuses activités urbaines et le trafic routier libèrent du Zn dans l'environnement: toitures, gouttières, usure de pneus de voitures, incinération des déchets domestiques (Migeon, 2009; kaiser, 2011).

3.1.2. Utilisations

Le zinc est surtout utilisé comme protecteur du fer et de l'acier (galvanisation par trempage dans le zinc fondu). Il sert aussi à la fabrication du laiton (alliage de zinc et de cuivre (% maxi. Zinc = 46%). Dans la construction, il est utilisé dans les toitures et les gouttières ainsi que le bardage dans la construction de charpentes ou de façades. 75% du zinc est consommé sous sa forme métallique; les 25% restant sont employés soit sous la forme

d'oxyde, soit sous celle de sulfure de zinc. L'oxyde de Zinc est utilisé dans la fabrication de pigments pour peintures. Le sulfure de zinc quant à lui, est principalement employé dans la confection de peintures peu toxiques (NAS, 1997).

3.1.3. Propriétés

- *Chimiques.*

L'air sec n'attaque pas le zinc. Humide, il l'attaque et le ternit par formation d'une pellicule grise d'hydrocarbonate grise qui le patine et le protège contre l'oxydation. Il n'est pas considéré comme toxique. Le zinc est facilement attaqué par les acides et d'autant mieux qu'il est moins pur, particulièrement les acides chlorhydrique et sulfurique (NAS, 1997).

- *Physiques et mécaniques.*

Métal blanc bleuâtre et brillant, susceptible de prendre un beau poli mais qui se ternit rapidement à l'air humide. Sa densité est de 7.2 et fond vers 420°C. Fondu, il se montre homogène à Froid, il est cassant; mais devient malléable et ductile entre 100 et 150°C (NAS, 1997).

Tableau 03: Principales propriétés Physico-chimiques du zinc (kaiser, 2011)

Symbole chimique	Zn
Numéro atomique	30
Masse atomique	65.37
Densité (à 25°C)	7133 kg/m ³
Température de fusion	419°C (692,7°K)
Isotopes	60à73

3.1.4. Le zinc dans le sol

Dans des conditions acides et oxydantes, le zinc est le cation le plus soluble et le plus mobile ce qui lui rend le microélément le plus toxique après l'aluminium et le manganèse (McBride, 1994). Alors que dans des conditions alcalines, il est plutôt lié aux carbonates, oxydes de Fe et de Mn et aux aluminosilicates (Jaradat et al., 2006). Le zinc peut migrer dans le profil du sol sous forme d'ions libres en solution étudié dans un *in situ* lysimètre pour un sol sableux et légèrement acide (Citeau et al., 2003). Pourtant, il est intercepté par les constituants négatifs du sol comme les phyllosilicates et les oxydes de fer (Van Oort et al.,

2006; Fernandez *et al.*, 2007). Des études macroscopiques de sorption de Zn ont montré qu'il peut être adsorbé sur les oxydes et hydroxydes de Fe et de Mn (Stahl et James ; 1991) et sur les aluminosilicates (Huang et Rhoads; 1989; Spark *et al.*, 1995) et que son adsorption augmente avec le pH. Cependant, à un pH alcalin et à des concentrations élevées de Zn, la précipitation devient le mécanisme le plus important qui contrôle la solubilité de Zn (Sadiq, 1991). Une diffusion de Zn dans les micropores des oxydes de fer est observée qui est responsable de son immobilité dans le sol (Manceau *et al.*, 2000).

a) Influence des paramètres physico-chimiques et des principaux constituants du sol sur la mobilité du zinc

Il semble qu'en-deçà d'un pH égal 8 la forme prédominante de Zn soit Zn^{2+} , alors qu'au-delà, se forme $ZnOH^+$. Au-delà d'un pH = 9, l'espèce neutre $Zn(OH)_2^0$ est majoritaire (Joubert, 2006). La quantité totale de zinc dans le sol est distribuée selon différentes formes :

- (i) ions libres Zn^{2+} et complexes organiques dans la solution du sol,
- (ii) Zn adsorbé et échangeable dans la fraction colloïdale du sol, composé de particules argileuses, de composés humiques et d'hydroxydes de Fe et d'Al,
- (iii) minéraux secondaires et complexes insolubles dans la phase solide du sol.

La distribution du zinc est donc gouvernée par les processus :

- (i) de précipitation/dissolution,
- (ii) de complexation/ décomplexation et
- (iii) d'adsorption / désorption.

Le Zn précipite avec les hydroxydes, les carbonates, les phosphates, les sulfures mais aussi avec les acides humiques, fulviques et d'autres ligands organiques. Le Zn forme des complexes avec les chlorures, les phosphates, les nitrates et les sulphates. Il semble que les complexes $ZnSO_4^0$ et $ZnHPO_4^0$ soient les formes majoritaires complexées contribuant au Zn total en solution mais il existe également des formes organiques complexées du Zn. Les acides fulviques peuvent former des complexes avec le Zn sur une large gamme de pH, augmentant la solubilité et la mobilité du Zn. À des pH faibles, le Zn est présent sous forme cationique et la complexation avec les acides humiques augmente avec le pH (Nemery, 1990; NAS, 1997).

Enfin, les composés organiques simples tels que les aminoacides, les hydroxyacides ainsi que les acides phosphoriques contribuent également à la complexation du Zn.

Les composés du sol participant à l'adsorption du Zn sont les argiles, les oxydes métalliques hydratés et la matière organique, constituant la phase colloïdale du sol. Les argiles et la matière organique peuvent adsorber fortement le Zn et il semble que deux mécanismes d'adsorption différents aient lieu : l'échange cationique en conditions acides et la complexation de surface pour des conditions plus alcalines (Nemery, 1990; Alloway, 1990 ; NAS, 1997;).

b) Influence des micro-organismes sur la mobilité du zinc dans les sols

La microflore des sols intervient essentiellement de façon indirecte dans les phénomènes de solubilisation du Zn. La minéralisation de la matière organique et la production de composés solubles acides et/ou complexants par des bactéries et des champignons seront donc les principaux processus par lesquels les micro-organismes pourront modifier la solubilité et la biodisponibilité du Zn dans les sols.

3.2. Cadmium

3.2.1. Caractéristiques Chimiques

Le cadmium est un métal blanc argent, légèrement bleuté. Cet élément, appartenant à la famille des métaux de transition, possède 8 isotopes naturels stables. Ses propriétés chimiques présentent beaucoup de similitudes avec celles du zinc. Il possède une résistance à la corrosion dans diverses atmosphères et plus particulièrement en milieu marin et s'utilise comme moyen de protection contre les neutrons thermiques. En solution, il se trouve principalement sous la forme de cation, à l'état d'oxydation +II (Tricot, 1999). Le rayon de cet ion et sa configuration électronique ressemblent pour beaucoup à ceux du calcium. Cette analogie se traduit par des comportements en solution et une réactivité aux interfaces solide/solution voisins (ex. système carbonate) (Stipp *et al.*, 1992 ; Van Cappellen *et al.*, 1993). Le Cd est considéré comme cancérogène pour l'homme et il présente des effets génotoxiques (Bourrelier *et al.*, 2008). Les apports anthropiques de Cd dans les sols sont importants par rapport aux autres métaux lourds, par l'industrie (essentiellement par voie atmosphérique), les engrais phosphatés l'épandage de déchets (OCDE, 1994).

Le cadmium n'est pas essentiel au développement des organismes animaux ou végétaux et ne participe pas au métabolisme cellulaire. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus.

3.2.2. Origines

➤ **Naturelle**

Le cadmium (stable) est un élément relativement rare présent dans l'écorce terrestre à des concentrations faibles. Ces principales formes cristallines sont : le greenockite et l'hawleyite (CdS), l'otavite (CdCO₃), le montéponite (CdO) et la cadmosélite (CdSe). La source de dispersion naturelle du cadmium dans l'atmosphère est principalement liée à l'activité volcanique. L'enrichissement en cadmium des sols et des systèmes aquatiques résulte de l'altération des matériaux de la croûte terrestre et des retombés atmosphériques (OCDE 1994).

➤ **Artificielle**

Le Cd n'existe pas à l'état natif. Son minerais, la greenockite CdS est très rare. Cependant, le Cd est présent dans presque tous les minerais de Zn. Il est également présent dans les minerais de Pb et de Cu ainsi que dans les phosphates naturels. La mobilité du Cd dans les sols dépend fortement du pH, un pH acide favorisant la disponibilité de celui-ci.

Les principales sources de dispersion du cadmium dans l'atmosphère, les sols et les systèmes aquatiques sont liées aux nombreuses activités industrielles et en agriculture, l'apport de cadmium dans les sols cultivés est essentiellement lié aux apports d'engrais minéraux de type superphosphate et un peu à l'épandage des déchets urbains. Les principaux domaines d'utilisation du cadmium (18 882 tonnes en 1994, dans le monde) sont la galvanoplastie, les accumulateurs alcalins, les alliages et, dans une moindre mesure, l'industrie nucléaire (OCDE, 1994 ; Migeon, 2009).

Parmi les autres applications, la galvanoplastie ou cadmiage (ajout d'un revêtement de cadmium sur divers métaux), les pigments de cadmium (à base de sulfures) qui représentent une branche importante de l'utilisation industrielle de cet élément. Le sulfure de cadmium a la propriété de former des solutions solides avec des produits de même nature chimique (le sulfure de zinc ; le séléniure de cadmium ; le sulfure de mercure). Ainsi les pigments de cadmium se retrouvent dans de nombreux produits industriels en matières plastiques, dans la peinture, dans le verre et les émaux pour garantir des nuances vives de colorations et une forte résistance à la lumière et à la chaleur (OCDE ,1994).

3.2.3. Concentrations dans l'environnement et métrologie

Le cadmium stable est présent à l'état naturel dans l'écorce terrestre aux concentrations moyennes comprises entre 0,1 et 1 mg.kg⁻¹ (Das et al., 1997). Les teneurs naturelles de cet

élément varient peu dans la plupart des roches : de 0,05 à 0,3 mg.kg⁻¹ (Bourrelier et Berthelin; 1998).

La mesure du cadmium dans les matrices simples (eau) ou complexes (solutions de sol chargées, organismes) peut s'effectuer par spectrophotométrie d'absorption atomique (four graphite, flamme) ou spectrométrie d'émission de plasma à couplage inductif (ICP-AES ou ICP-MS) (OMS, 1991 ; OCDE, 1994).

3.2.4. Mobilité et biodisponibilité dans le sol

Les concentrations naturelles de cadmium dans les horizons supérieurs des sols cultivés sont comprises entre 0,2 et 0,4 mg.kg⁻¹ (Bourrelier et Berthelin; 1998 ; Alloway, 1990). Elles peuvent atteindre des valeurs supérieures à 150 mg.kg⁻¹ sur certains sites pollués suite, par exemple, à l'épandage de boues contaminées (Jackson et Alloway; 1992). Dans les sédiments, on estime le stock de cadmium naturel à une teneur inférieure à 0,2 mg.kg⁻¹. Dans les sols, le cadmium est considéré comme un élément relativement mobile par rapport à d'autres métaux en traces tels que le cuivre ou le plomb (Bourrelier et Berthelin; 1998 ; Li et Thornton; 2001). Son comportement dans la solution du sol (disponibilité au transport ou immobilisation) et aux interfaces solution/solide et solution/plante (phytobiodisponibilité) dépend d'un grand nombre de paramètres bio-géochimiques liés à la nature du sol, au contexte micro-biologique, et aux formes chimiques du métal dans la solution du sol et associé à la phase solide. En conséquence, la distribution du cadmium dans le système et sa toxicité ne peuvent pas s'expliquer simplement par la connaissance de la concentration totale de cet élément dans le milieu (Kirkham, 2006).

Les principales formes du cadmium présentes en solution sont Cd²⁺, CdSO₄⁰, CdCl⁺ et CdHCO₃⁺ en l'absence de ligands organiques (Sposito, 1989 ; Citeau et al., 2003 ; Kirkham, 2006). Le cadmium forme des complexes avec les principaux acides organiques carboxyliques (acide citrique, oxalique, malique, etc.) susceptibles de se trouver dans les zones superficielles des sols cultivés. Ces associations modifient son comportement aux interfaces et peuvent faciliter, dans certaines conditions (formations de complexes stables), son entraînement avec la phase liquide. Le très faible produit de solubilité du carbonate de Cd (CdCO₃) limite fortement la concentration du métal en solution dans les sols calcaires. Dans ce cas, les carbonates (CaCO₃, (Ca_xMg^y)CO₃...) constituent également une phase de sorption dominante qui contrôle la distribution de l'élément et sa mobilité dans le milieu (McBride, 1980 ; Martin-Garin, 2000 ; Citeau et al., 2003 ; Kirkham, 2006). D'autres constituants solides du sol sont susceptibles d'interférer avec le cadmium et de limiter sa mobilité. On

retiendra principalement le rôle joué par la matière organique et par les argiles ainsi que l'importance du pH et de la composition cationique de la solution du sol (notamment Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} et Fe^{3+}) dans le contrôle de ces réactions aux interfaces solide/solution (Citeau et *al.*, 2003).

Influence des paramètres physico-chimiques et des principaux constituants du sol sur la mobilité du cadmium

En solution, le Cd se trouve principalement sous forme de cation divalent Cd^{2+} . Le comportement du cadmium se rapproche de celui du zinc Zn^{2+} . Dans les eaux douces et à pH > 8.2, le complexe aqueux dominant est CdCO_3 (aq). À pH < 8.2, le cadmium serait majoritairement sous forme Cd^{2+} en milieu oxydant mais de fortes concentrations en chlore provoquent la formation de complexes de type CdCl_2 ou CdCl^+ . Dans des milieux réduits, il est plutôt piégé sous forme de sulfure (CdS) ou en solution solide dans la blende (ZnS) mais le chlore peut entrer en compétition avec les ions sulfures et provoquer, là encore, la formation de complexes CdCl_2 ou CdCl^+ (Seidal et *al.*, 1993 ; Gonzalez, 2001 ; Citeau et *al.*, 2003). Lorsque le pH dépasse 8.2, l'otavite (CdCO_3) va pouvoir précipiter dans des conditions de surface. L'adsorption du cadmium par des surfaces minérales concernerait donc essentiellement les solutions à pH < 8.

D'après Bolton et Evans (1996), le principal mécanisme influençant la mobilité du cadmium serait la complexation de surface. Le pH est le facteur qui régit de façon importante la solubilité du cadmium dans les sols (Sauve et *al.*, 2000). De pH 3.5 à 7, le substrat pédologique pour lequel le cadmium aurait le plus d'affinité serait les acides humiques. À pH supérieur à 7, le cadmium s'adsorberait préférentiellement sur des hydroxydes de fer mal cristallisés (de type ferrihydrite). La solubilité du cadmium serait plus forte en milieu oxydant qu'en milieu réducteur. Le cadmium serait contrôlé en milieu réducteur par la greenockite (CdS) ou lié à de la matière organique. Près de 95 % du cadmium transporté par les rivières le serait sous forme particulaire, adsorbé à la surface de colloïdes minéraux et/ou organiques (Seidal et *al.*, 1993 ; Gonzalez, 2001 ; Citeau et *al.*, 2003). En effet, le cadmium se lie aussi avec les matières organiques acido-solubles (acides fulviques), possédant du fait de leur solubilité, une grande capacité de transport.

Influence des micro-organismes sur la mobilité du cadmium dans les sols

La microflore des sols intervient essentiellement de façon indirecte dans les phénomènes de séquestration (biosorption, bioaccumulation) et de solubilisation du

cadmium (solubilisation des phosphates et minéralisation de la matière organique). La minéralisation de la matière organique et la production de composés solubles acides et/ou complexant par des bactéries et des champignons seront donc les principaux processus par lesquels les microorganismes pourront modifier la solubilité et la biodisponibilité du cadmium dans les sols (Deneux-Mustin, 2003 ; Citeau et *al.*, 2003; Kirkham, 2006).

3.2.5. Mobilité biodisponibilité et toxicité du cadmium chez l'homme

Le cadmium est notamment présent dans l'eau de boisson, les aliments, la fumée de cigarette. Il présente de fortes capacités à se retrouver dans les fumées et s'accumule après inhalation. La demi-vie biologique chez l'homme est estimée à 20 ans ; les principaux sites d'accumulation et de toxicité sont les reins et le foie. Le cadmium s'accumule dans d'autres organes tels que la rate, le cerveau, les poumons, le muscle, le sang. La toxicité du cadmium est liée à la perturbation du métabolisme du zinc et secondairement d'autres éléments essentiels tels que le calcium, le fer et le cuivre. Le cadmium est aussi considéré comme un agent carcinogène (Thun et *al.*, 1991 ; Waalkes, 2000).

➤ Chez les organismes

Le modèle de l'ion libre (Free Ion Activity Model, FIAM) (Morel, 1983) permet de décrire la biodisponibilité du cadmium qui détermine l'efficacité du transfert à travers les membranes biologiques. Celle-ci dépend alors de la forme chimique du métal (Tessier et *al.*, 1993) mettent en évidence une relation linéaire entre le cadmium bio-accumulé dans les branchies et l'activité du Cd^{2+} , calculée à partir de modèles thermodynamiques chez le bivalve *Anadonta grandis*. De plus, la diffusion facilitée du Cd^{2+} serait assurée par des canaux calciques potentiels— dépendant au niveau des branchies de mollusques, le cadmium se comportant comme un analogue du calcium (rayon ionique $\text{Ca}^{2+} = 0,97 \text{ \AA}$ et $\text{Cd}^{2+} = 0,99 \text{ \AA}$) (Deneux-Mustin, 2003 ; Citeau et *al.*, 2003; Kirkham, 2006).

En conséquence, l'accumulation et les effets induits sont étroitement dépendant des conditions d'exposition déterminant la spéciation du cadmium. La dureté et le pH, facteurs abiotiques de la colonne d'eau sont deux paramètres majeurs régissant l'entrée du Cd (Markich et Jeffree; 1994 ; Jumarie et *al.*, 2001). La forme Cd^{2+} peut être ensuite prise en charge par de nombreux ligands intracellulaires dont le glutathion, les HMBP (Heavy Metal Binding Protein) ou les métallothioniénes (MT). Les MT participent à la régulation des concentrations cellulaires en métaux libres essentiels (Zn^{2+} , Cu^{2+}) et jouent le rôle de réservoir à zinc, (Dallinger et *al.*, 1987 ; Kagi, 1991). L'exposition des organismes au cadmium conduit à

l'induction de ces petites protéines cytosoliques. Ainsi, la forte affinité du cadmium pour les métallothionéines (la liaison Cd- α domaine de la MT est thermodynamiquement stable) entraîne le déplacement du Zn^{2+} (initialement fixé sur la MT) et perturbe l'absorption et le transport du zinc. Ce métal essentiel participe à de nombreuses fonctions physiologiques (croissance, développement) et cellulaires (co-facteur d'enzymes et régulation d'enzymes intervenant dans la réplication et la transcription).

En parallèle de ce mécanisme de séquestration protéique, le cadmium peut être dirigé vers les lysosomes et précipité sous forme de structures granuleuses, composés de phosphates de magnésium ou de calcium. Ces dernières peuvent ensuite être extrudées hors des cellules et contribuent aux mécanismes de décontamination. Les tissus cibles comprennent les barrières biologiques (branchies, tractus digestif) et les organes de détoxification (rein et foie), le muscle n'apparaît pas comme un site de stockage de cet élément (OMS, 1991 ; OCDE, 1994 ; Simon, 2000).

Si la compréhension de l'entrée du Cd^{2+} à partir du milieu extérieur suit le modèle de l'ion libre, certains auteurs supposent que la traversée de la barrière intestinale répond au même mécanisme. En effet, le taux de transfert gastro-intestinal est faible, de l'ordre de 5 %. Cette faible efficacité de transfert est associée à la présence de nombreux ligands dans le tractus digestif qui réduit la quantité relative de Cd^{2+} . D'autres approches montrent cependant que le Cd^{2+} n'est pas la seule espèce chimique à être absorbée par des cellules intestinales en culture ; des complexes Cd-glutathion (ou Cd-PC) possèdent la capacité de traverser les barrières biologiques, les mécanismes de transport étant toutefois différents de ceux utilisés pour le transport des espèces inorganiques (Jumarie et al., 2001).

D'autres études montrent que le cadmium présent dans des proies (macrophytes ou bivalve) peut être accumulé après transferts trophiques chez des prédateurs (invertébrés ou poisson) (Munger et Hare; 1997 ; Simon, 2000 ; Wallace et Lopez; 1997). Ce transfert trophique (1 à 5 %) entraîne cependant d'importants niveaux d'accumulation dans les prédateurs compte tenu des fortes capacités d'accumulation du cadmium chez de telles proies (Kirkham, 2006).

2^{ème} PARTIE : Le stress oxydant

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, la superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EOA. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants.

1. Les espèces oxygénées activées

Le rôle des EOA est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'EOA pour percer la paroi membranaire de l'ovule.

Le monoxyde d'azote radicalaire ou NO^\bullet est un composé important; il est notamment synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L-arginine. C'est une molécule labile très diffusible, dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme (maintien du tonus vasculaire, neurotransmission, fonctionnement rénal,...) (Hare, 2004). Toutefois, le NO^\bullet peut former avec l'anion superoxyde le peroxynitrite (HOONO), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques (Sekli-Belaidi, 2011).

2. Rôles des espèces réactives de l'oxygène dans les situations physiologiques

Du fait de l'importance de l'oxygène dans les systèmes biologiques, en situations physiologiques, les espèces réactives sont créées en continu dans l'organisme. Ainsi, les radicaux libres générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène, ne sont pas seulement des produits agressifs mais aussi des modulateurs de voies de transduction du

signal et de l'expression de gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. Ils jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections (Harman, 2002). Formés en trop grande quantité, les EOA deviennent «pathologiques» en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion. En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies (Delattre *et al.*, 2005).

3. Le déséquilibre : origines et conséquences

La notion de stress oxydant a été utilisée pour la première fois par Sies (1985). Il est défini comme une altération cellulaire et tissulaire par des molécules oxydantes. C'est la résultante d'un déséquilibre profond dans la balance entre les prooxydants, producteurs d'espèces radicalaires, et les antioxydants, au profit des premiers. Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, d'une activation de systèmes enzymatiques (NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine, transferrine) ou d'une oxydation de certaines molécules. Les ERO très électrophiles tentent de ré-apparier leur électron célibataire en agressant toutes les molécules susceptibles de céder un électron ; leur durée de vie est donc très courte. L'espèce agressée devient à son tour radicalaire, initiant de cette façon un processus de réactions en chaîne (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). Les ERO interagissent avec toute une série de substrats biologiques. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation du glucose, des cassures au niveau de l'ADN avec possibilité de mutation et des processus de peroxydation lipidique peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule (Pincemail *et al.*, 2002).

4. Principales cibles biologiques des EOA

4.1. L'acide désoxyribonucléique ou ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les EOA. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\cdot\text{OH}$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

4.2. Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque

radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Haleng *et al.*, 2007).

4.3. Les Lipides membranaires

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO^\bullet), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (Atkin *et al.*, 2005).

Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

4.4. Les Lipoprotéines

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) (Nakajima *et al.*, 2006). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les macrophages (Saad *et al.*, 2006).

5. Les défenses antioxydantes

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (Fig. 3). On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se

compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Pelletier *et al.*, 2004 ; Haleng *et al.*, 2007).

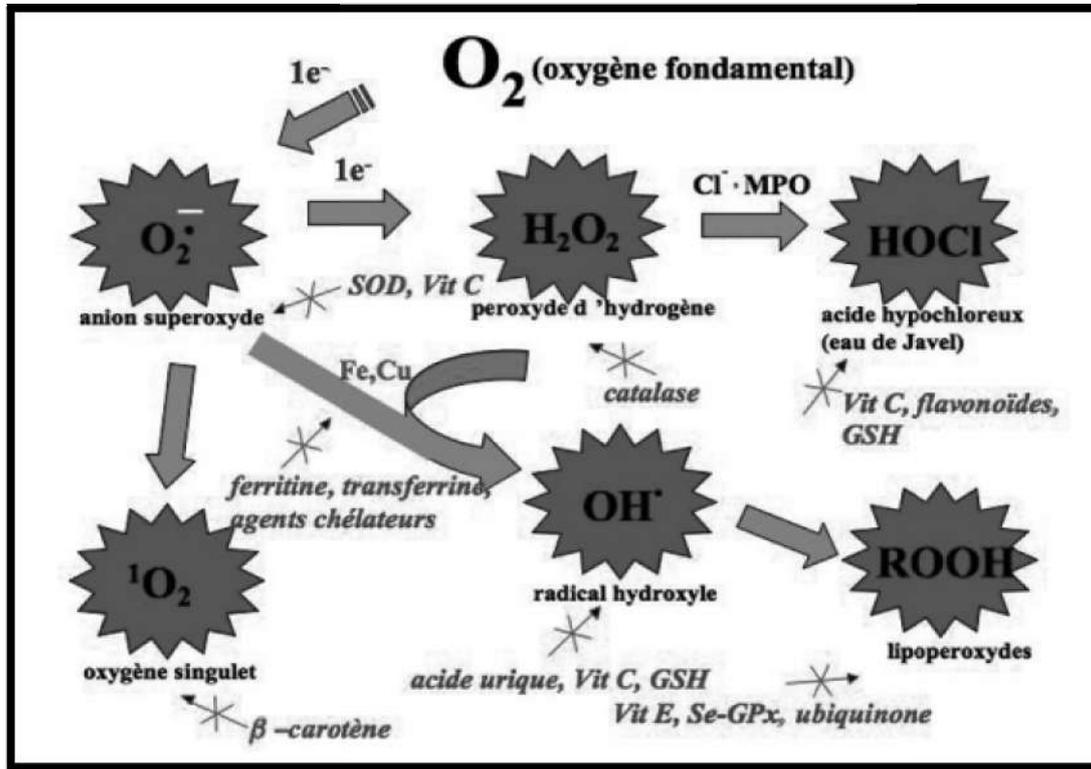


Figure 03. Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng *et al.*, 2007)

5.1. Systèmes de défense enzymatiques

5.1.1. Les superoxyde dismutases (SOD)

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Wirth *et al.*, 2003 Haleng *et al.*, 2007).

5.1.2. Les glutathion peroxydases (GPxs)

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium, elle est donc

un bon reflet de cette carence. Toutefois, pour un apport adéquat en sélénium, les teneurs en GPx atteignent un plateau. Le dosage en GPx ne peut donc être utilisé comme marqueur d'une intoxication en sélénium (Haleng *et al.*, 2007).

5.1.3. Le système thiorédoxine

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares. L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Bors *et al.*, 1990 ; Aviram *et Fuhrman* ; 2002 ; Bhat *et Pezzuto* ; 2002 ; Haleng *et al.*, 2007).

5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

5.2.1. Le glutathion et les protéines-thiols

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intra-cellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH).

Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible.

Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer. Les autres propriétés antioxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire.

La plupart des protéines dont l'albumine contiennent des groupements « thiols » qui possèdent des propriétés réductrices et piègent facilement les espèces oxygénées activées (Pincemail *et al.*, 2002).

5.2.2. Le Coenzyme Q10

Le coenzyme Q10, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique. Cette chaîne latérale confère à la molécule un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E. (Langsjoen *et Langsjoen* ; 2003).

5.3. Les oligoéléments

5.3.1. Le sélénium

Le sélénium n'est pas un anti-oxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx (Aviram et Fuhrman ; 2002 ; Bhat et Pezzuto ; 2002; Pincemail et *al.*, 2002).

5.3.2. Le cuivre

A concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD, le cytochrome C oxydase, la dopamine β -hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'EOA (réactions de Fenton) et peut – lorsque sa concentration est élevée devenir pro-oxydant (Aviram et Fuhrman ; 2002 ; Bhat et Pezzuto ; 2002; Pincemail et *al.*, 2002).

5.3.3. Le zinc

Le zinc joue un rôle de cofacteur pour plusieurs enzymes et intervient ainsi dans de nombreuses fonctions comme le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines, le fonctionnement de l'anhydrase carbonique. Comme le cuivre, le zinc est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège également les groupements thiols des protéines et il peut inhiber les réactions de formation d'EOA induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre. Le rapport Cu / Zn, (normalement inférieur à 1,5) sera un excellent indicateur de l'état de stress oxydant d'un individu (Bhat et Pezzuto ; 2002; Pincemail et *al.*, 2002).

6. Notion de biomarqueurs

Un biomarqueur se définit comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Key et *al.*, 2006). Les biomarqueurs permettent de détecter les pressions environnementales dans un milieu donné avant même que les effets néfastes se fassent sentir au niveau des organismes. On peut ainsi prédire les dommages potentiels pouvant menacer un écosystème et prendre des mesures nécessaires pour remédier à la situation avant que celle-ci

ne devienne trop critique (Den Besten et *al.*, 2001). Les biomarqueurs peuvent être classés en trois catégories :

6.1. Les biomarqueurs d'exposition, qui sont généralement caractérisés par leur réponse précoce et leur spécificité de réaction. Ils sont induits par un type spécifique de polluants et, de ce fait, leurs variations sont indicatrices d'une exposition de l'organisme à cette classe de polluants.

6.2. Les biomarqueurs d'effet correspondent à une altération biologique qui, en fonction de l'intensité de la réponse, peut être associée à une altération possible de l'état physiologique de l'individu, comme des effets sur la croissance ou sur le succès reproducteur.

6.3. Les biomarqueurs de sensibilité/susceptibilité utilisent la mise en évidence de caractères de résistance d'origine génétique des organismes à certains contaminants, comme la synthèse d'enzymes moins sensibles ou une augmentation du pouvoir de détoxification (résistance des insectes aux pesticides) (Champeau, 2005).

3^{ème} PARTIE : Organisme à l'étude: le ver de terre *Allolobophora caliginosa*

1. Importance écologique des vers de terre

Comme Darwin (1809-1882) l'a démontré, l'activité des vers de terre a des effets bénéfiques sur les sols. De par leur importante biomasse et en raison de leur place dans la chaîne alimentaire ainsi que dans la formation, l'aération et le maintien du sol, les vers de terre sont des éléments incontournables et essentiels dans un écosystème (Ruppert et Barnes, 1994). Ils sont présents dans tous les types de sols (forêts, prairies, savanes, pâturages, etc.) à l'exception des milieux extrêmes (glaciers, déserts, sols très acides ou très salés, etc.) et ils représentent de 60% à 80% de la biomasse animale du sol (Edwards et Bohlen ; 1992; Rida, 1994).

Le rôle écologique important des vers provient de leur comportement. Ils se nourrissent essentiellement de débris végétaux et de matière organique incorporée dans le sol et occasionnellement de matière organique vivante comme des champignons ou bactéries (Edwards et Bohlen; 1992; Rida, 1994; Scott-Fordsmand et Weeks; 2000). Les lombrics favorisent aussi l'entrée d'eau, d'air et de racines en creusant d'importants réseaux de galeries, améliorant ainsi l'aération et le drainage du sol (Edwards et Bohlen ; 1992; Rida, 1994; Efroymson et *al.*, 1997; Bazri, 2015). L'activité de brassage des sols résultant du déplacement des vers et de leur quête de nourriture favorise également le transport et le mélange des différents composants du sol. Les vers de terre créent ainsi un milieu favorable pour les micro-organismes décomposeurs comme certains champignons et bactéries, augmentant aussi la fertilité des sols (Edwards et Bohlen, 1992; Rida, 1994). De plus, ils représentent une importante source de protéines pour de nombreux animaux, aussi bien vertébrés qu'invertébrés (Ireland, 1983; Cooke et *al.*, 1992; Rida, 1994; Efroymson et *al.*, 1997).

Les espèces lombriciennes sont classiquement réparties en trois groupes écologiques (Bouché, 1972) en fonction de leur mode de vie:

- les épigés : sont des lombriciens de petite taille, très pigmentés, vivant généralement à la surface du sol et qui se nourrissent de débris végétaux en décomposition ou de racines ;
- les anéciques : sont des organismes de grande taille, caractérisés par une pigmentation suivant un gradient antéro-postérieur, qui vivent dans le sol et cherchent leur nourriture à la surface et la redistribue en profondeur grâce aux galeries verticales, pouvant dépasser le mètre, qu'ils creusent ;

- les endogés : sont de taille petite à moyenne, non pigmentés, vivent en permanence dans le substrat du sol, construisent des galeries essentiellement horizontales et sont essentiellement géophages (se nourrissent essentiellement de matière organique plus ou moins intégrée au substrat).

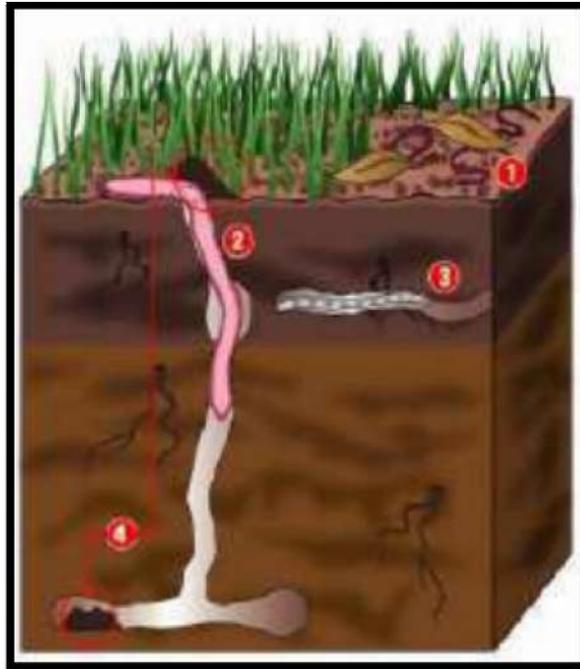


Figure 04. Description et représentation schématique des trois groupes écologiques de lombriciens (Piron, 2008).

(1) les épigés, (2) les anéciques et (3) les endogés. L'indication (4) indique la production de Middens (structures de rejets produites par les anéciques composées de déjections et de débris végétaux) et de turricules.

2. Biologie du ver de terre

Le ver de terre, ou lombric, appartient à la classe des oligochètes dans le phylum des annélides. Un des traits distinctifs de cette famille est la segmentation ou la métamérisation, soit la division de l'organisme en parties similaires, ou segments, disposés en série le long de l'axe antéro-postérieur. Lors de l'évolution, on a pu assister à une spécialisation régionale: le corps du ver s'est divisé de façon grossière en une tête, un thorax et un abdomen. La tête, ou acron, représentée par le prostomium (bouche) contient le cerveau, alors que le pygidium, ou telson, est la partie terminale du corps qui forme l'anus (Ruppert et Sames ; 1994). Outre l'acron et le pygidium, les vers possèdent un nombre variable de segments intermédiaires.

Chez les espèces segmentées de façon quasi parfaite, les muscles, les cordons nerveux et les ganglions (système nerveux), les vaisseaux sanguins, le cœlome, les systèmes excréteur

(néphrostome et néphridiopore) et reproducteur (testicules et ovaires) sont répliqués dans chaque segment (Ruppert et Sames ; 1994). On a suggéré que l'un des avantages de la segmentation repose sur la division de l'organisme en une série de compartiments pouvant être régulés de manière plus ou moins indépendante (Ruppert et Sames ; 1994). Toutefois, en observant la locomotion des annélides, le zoologiste anglais R. S. Clark développa une autre explication sur la signification de la segmentation.

Son idée, appelée théorie de l'enfouissement ("burrowing theory"), établit que la segmentation du coelome permet au ver de s'enfouir et de creuser de façon plus efficace qu'un ver non segmenté. Un grand avantage de la métamérisation consiste à permettre un certain mouvement péristaltique qui facilite le déplacement de l'animal dans les sols. Des muscles longitudinaux et circulaires, des muscles rétracteurs ainsi que la présence de soies sur l'animal facilitent ce type de mouvement (Morin et Houseman ; 2003).

3. Description morphologique

Les annélides possèdent une cavité du corps appelée coelome. L'apparition de cet espace qui entoure l'intestin et qui le sépare des parois du corps représente un important développement dans l'histoire de l'évolution des invertébrés (Wallwork, 1983; Hickman et *al.*, 1996). En effet, la présence du coelome fournit de l'espace pour les organes viscéraux et offre ainsi une meilleure flexibilité au ver de terre puisqu'il est rempli de liquide.

En effet le liquide coelomique, joue le rôle d'un squelette hydrostatique permettant au ver de mieux se mouvoir et de creuser. Il possède également plusieurs autres fonctions: il transporte les gaz et les matières nutritives (transport interne), il fournit des liquides pour le processus d'excrétion des déchets (transport externe) et il est le site de maturation des gamètes et de la fabrication des embryons.

De façon typique, le coelome est composé de nombreuses paires de chambres (gauche et droite) séparées par des cloisons, les septas « les dissépiments ». Chaque septum est composé de deux couches de péritoine, l'un provenant du segment postérieur à la jonction et l'autre provenant du segment antérieur à la jonction, ainsi que d'une couche de tissu connectif entre les deux. Chez la plupart des vers de terre, chaque compartiment coelomique (à l'exception des extrémités) est connecté à l'extérieur par un pore médiadorsal débouchant par un sphincter (Ruppert et Sarnes, 1994).

Ces pores expulsent le fluide cœlomique, ce qui aide à maintenir l'humidité de la peau du ver. Lorsqu'ils sont stressés, certains vers de terre rejettent ce fluide vers l'extérieur (Ruppert et Barnes ; 1994).

L'intestin du ver de terre se présente sous la forme d'un tube droit reliant la bouche et l'anus. La nourriture y circule principalement par l'action péristaltique des muscles de l'intestin. Des cellules d'entreposage spécialisées (cellules chloragogènes ou chloragocytes) dérivent de l'épithélium cœlomique et sont associées à la paroi de l'intestin.

Ces forment le tissu chloragogène qui présente plusieurs fonctions dont l'accumulation des déchets produits par la digestion (Jamieson, 1981; Hopkin, 1989). Ces déchets peuvent entre autres inclure les métaux qui seront éventuellement emmagasinés dans les chloragosomes (ou granules) des chloragocytes (Ireland. 1978; Hopkin, 1989; Morgan et Morgan ; 1989; Morgan et *al.*, 1999).

Les chloragosomes peuvent ensuite être déchargés dans le liquide cœlomique et être excrétés par les néphridies (principaux organes d'excrétion présents en paires dans chaque segment) ou encore être emmagasinés de façon permanente avec d'autres produits d'excrétion dans des nodules à déchets situés dans des sacs cœlomiques de la partie postérieure du ver (Morgan et Morgan ; 1989; Morgan et *al.*, 1999).

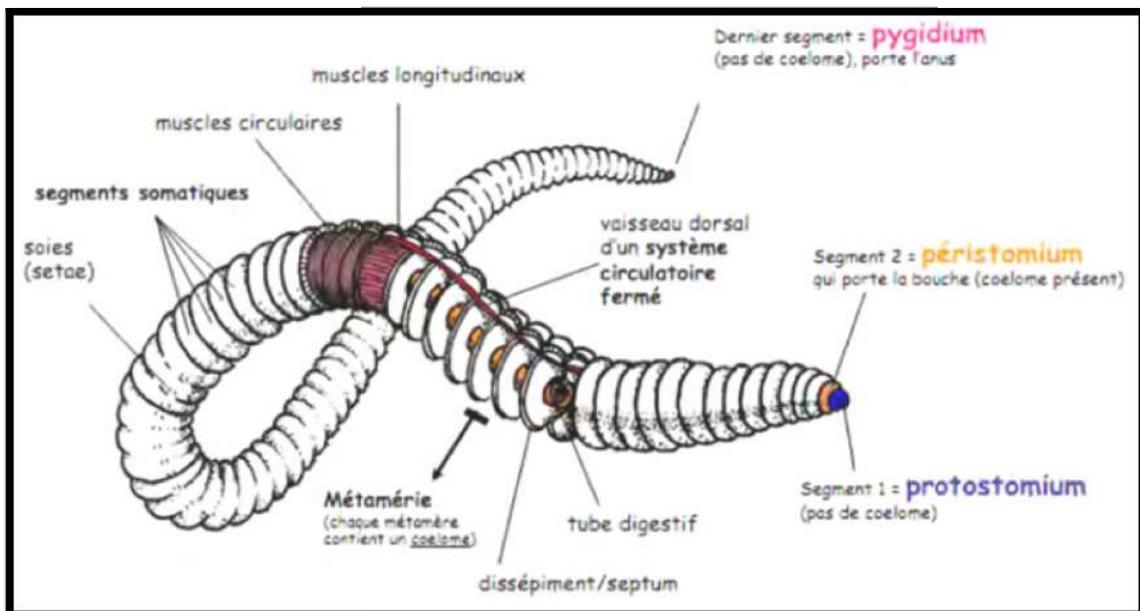


Figure 05. Morphologie du ver de terre (Sims et Gerard; 1999).

4. Anatomie interne

L'anatomie interne du ver de terre est caractérisée par la présence d'organes axiaux, s'étendant sur toute la longueur du corps de l'animal (appareil circulatoire, appareil digestif et

chaîne nerveuse), d'organes métamériques pairs se répétant dans chaque segment (néphridies, cavités coelomiques, ganglions nerveux) et d'organes à localisation stricte comme les structures génitales (testicules et vésicules séminales de l'appareil génital mâle, ovaires, oviductes et spermathèques de l'appareil femelle). En outre, il prouve une symétrie bilatérale nette (Sims et Gerard; 1999).

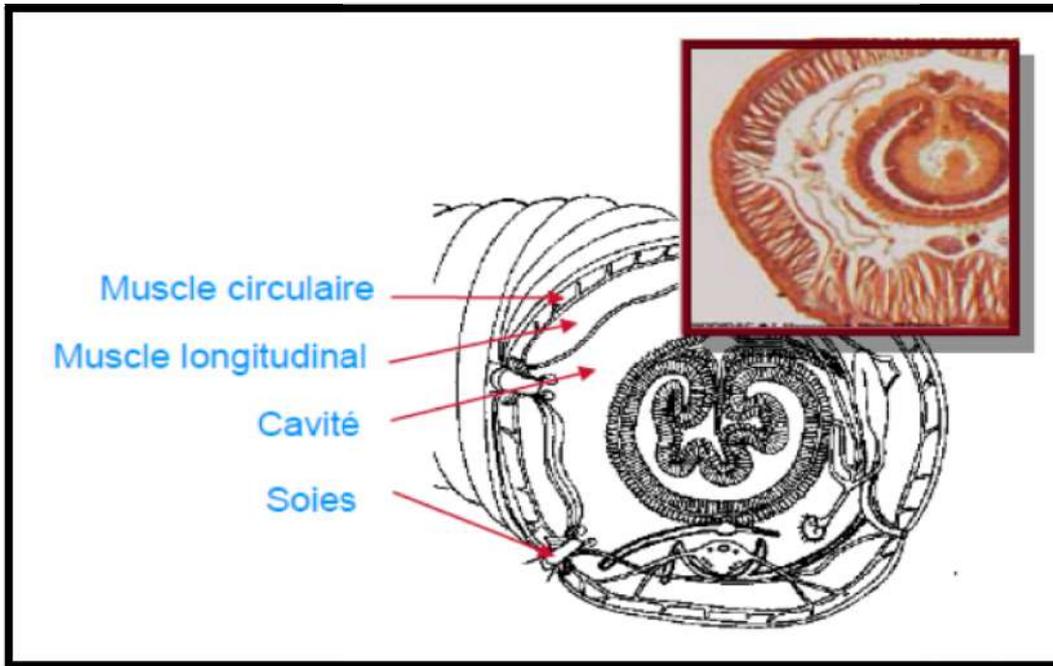


Figure 06. Schéma de la coupe transversale d'un lombric (Morin et Houseman; 2002).

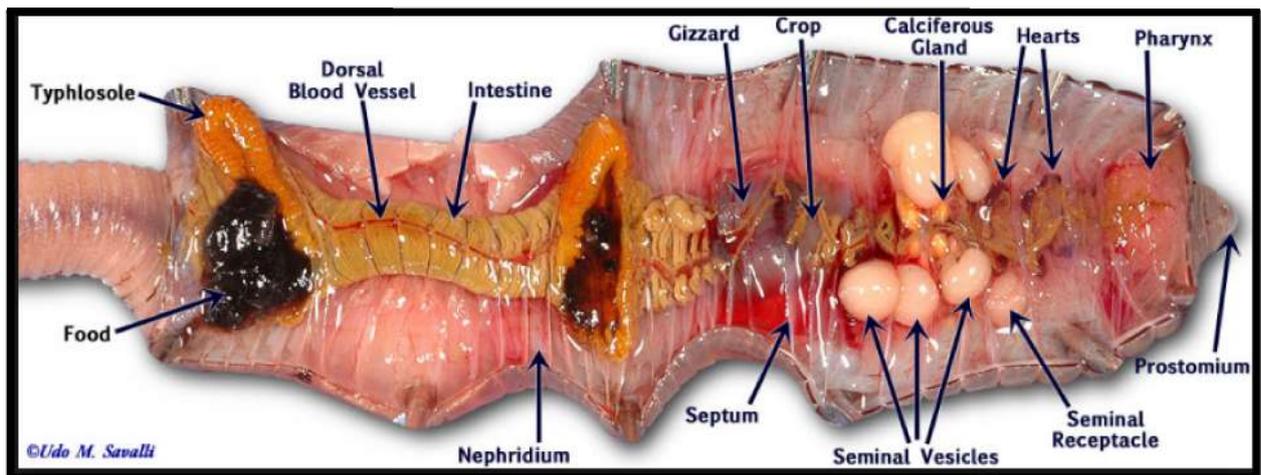


Figure 07. Anatomie interne d'un ver de terre (Morin et Houseman; 2002).

5. Description de l'espèce *Allolobophora caliginosa* et cycle de vie

L'espèce endogée *Allolobophora caliginosa* qui est connue aussi sous le nom *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826) est caractérisée par des individus de taille petite à moyenne (40 à 180 mm de longueur et 3.5 à 7 mm de diamètre), avec une morphologie cylindrique et peu pigmentés. Appartenant à la catégorie des endogées, ils sont géophages, vivent constamment enfouis dans le substrat et se nourrissent de matières organiques plus ou moins liées à la fraction minérale du sol. Ils construisent des galeries principalement horizontales, qui peuvent devenir exceptionnellement verticales, lorsque les conditions du milieu deviennent très défavorables (Sims et Gerard; 1999).

Cette espèce est communément rencontrée dans les sols français et est fréquemment majoritaire dans les communautés. Elle est ubiquiste, on la retrouve aussi bien dans des prairies, des sols forestiers, des jardins ou des systèmes cultivés. Cette espèce est également peu exigeante et n'est pas spécifique de certains substrats. Lentzsch et Golldack (2006) ont étudié la répartition d'*A. caliginosa* sur un transect de 151 km en Allemagne. Elle s'adapte facilement à son environnement et peut devenir invasive des milieux dans lesquels elle est introduite lorsque les espèces natives se sont éteintes. Cette espèce est également connue pour s'adapter aux milieux pollués (De Oliveira, 2012).

A. caliginosa a une reproduction obligatoirement biparentale, Sims et Gerard, (1999) et Jensen et Holmstrup (1997) lui attribuent une reproduction obligatoirement zygogénétique. Des études ont rapporté que cette espèce pouvait présenter des cas de gemellité deux vers pour un cocon (Evans et Guild; 1948 ; Nair et Bennour; 1998 ; Nair et Premkumar ; 2007 ; Reinecke et Viser; 1981). Les vers adultes produisent plusieurs cocons par an, en fonction de leur âge (Svendsen et al., 2005) et les conditions dans lesquelles ils se trouvent (Lee, 1985). Une synthèse de plusieurs études par Satchell (1967) montre qu'*Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea longa* et *Octalasion cyaneum*, qui sont des espèces anéciques ou endogées, produisent entre 3 à 13 cocons par an alors que les épigés *L. rubellus*, *Lumbricus castaneus* et *Dendrobaena rubidus* sont capables d'en produire entre 42 à 106 par an. Les cocons sont résistants aux conditions défavorables comme la sécheresse ou une modification de la température (Edwards et Bohlen ; 1996).

Le ver de terre juvénile va progressivement acquérir des caractères sexuels secondaires externes liés à l'accouplement comme le puberculum tuberculeux ou les pores sexuels, il sera alors au stade sub-adulte. Un clitellum, organe lié au processus de ponte, va ensuite se former et permettre au ver de terre de devenir sexuellement mature pour pouvoir se reproduire à son

tour ; il devient alors adulte. Le temps de maturation varie beaucoup entre espèces et dépend des conditions de milieu (température, humidité, nourriture). Boström et Lofs (1996) rapportent qu'un juvénile *A. caliginosa* devient mature en 3 à 6 semaines.

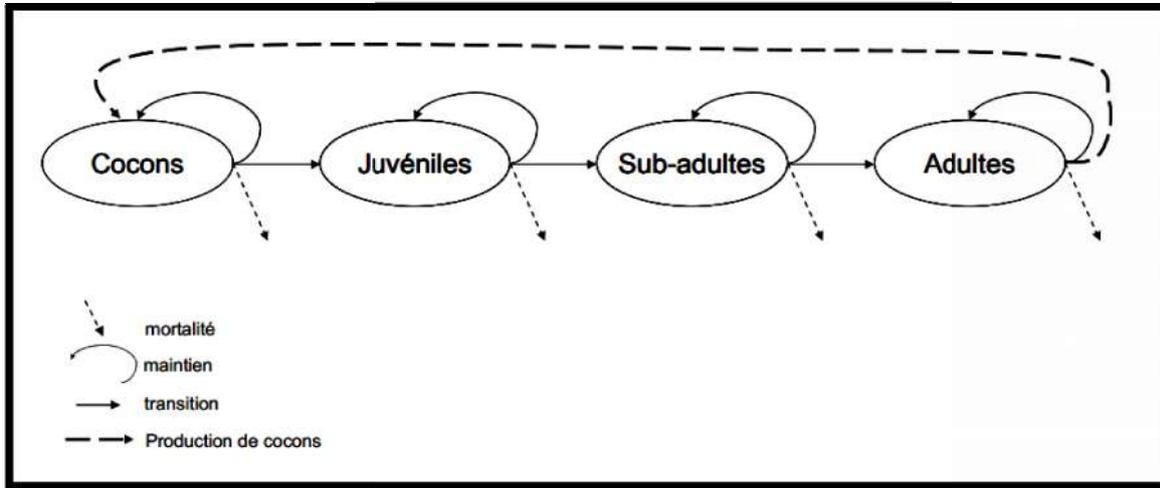


Figure 08. Cycle de vie de l'espèce *Allolobophora caliginosa*. Les flèches représentent les différents processus qui affectent l'abondance dans chaque stade (mortalité, maintien dans le même stade, passage au stade supérieur, ponte) (De Oliveira, 2012).

Lorsque les conditions sont défavorables (sécheresse ou grand froid) *A. caliginosa* est capable de rentrer en léthargie, quiescence ou diapause facultative (Edwards et Bohlen; 1996 ; Mazantseva, 1982 ; Nordström, 1975). Ils ne migrent pas en profondeur comme le font les anéciques.

6. Ver de terre et métaux lourds

Chez les lombriciens, les teneurs en métaux *in vivo* varient selon le métal et/ou selon des critères propres aux organismes, mais également en fonction des conditions chimiques du sol (Ma, 1982). Ainsi Terhivuo *et al.* (1994) travaillant sur l'impact des sols fortement pollués en plomb sur des espèces écologiquement différentes (épigées et endogées), ont pu montrer des teneurs élevées étaient mesurées chez ver endogé *Allolobophora caliginosa* alors que les vers à mœurs plutôt épigées (*Lumbricus rubellus* et *Lumbricus castaneus*) présentaient des concentration beaucoup plus faibles.

Ainsi, tout en proposant l'espèce *A. caliginosa* comme meilleur outil pour évaluer la biodisponibilité du plomb, l'exposition préalable de ces organismes aux métaux influe sur leur capacité à les accumuler.

D'autre part, les métaux ne sont pas concentrés avec la même intensité : contrairement au plomb qui est moyennement accumulé, le cadmium est connu pour être concentré de manière importante par les Oligochètes, induisant souvent des facteurs de concentration bien supérieurs à 1.

L'accumulation chez les Oligochètes est en outre un facteur agissant sur leur propre faculté de détoxification. Plusieurs voies d'intoxication sont possibles chez les Oligochètes. De par leur vie terricole, ils sont en contact perpétuel avec les toxiques du sol via le tégument, et ils les ingèrent également dans la mesure où ils sont géophages (Grelle, 1998).

La détoxification peut se faire par stockage plus ou moins définitif des métaux dans des granules spécifiques (les chloragosomes) au sein de cellules entourant l'intestin (les chloragocytes) (Ireland et Richard; 1981). Ces granules peuvent être larguées dans le liquide coelomique, excrétés via les nephridies ou bien stockés de façon permanente avec d'autres déchets dans les derniers segments.

Ils pourront ensuite être perdus par autotomie (Andersen et Laursen; 1982). Chez certaines espèces possédant des glandes calcifères très actives (excrétant le calcium excédentaire dans le tube digestif), le plomb peut également être éliminé par leur intermédiaire. D'autre part, les métaux peuvent également être stockés dans les cellules intestinales et éliminés par simple desquamation.

La bioaccumulation chez les Oligochètes est donc fonction non seulement des paramètres physico-chimiques du sol, mais aussi de la biologie de l'animal et de l'espèce considérée (Grelle, 1998).

Les vers de terre sont plus sensibles aux teneurs en métaux lourds que les autres invertébrés dans le sol (Bengtsson *et al.*, 1992) et leur capacité à accumuler des métaux lourds est souvent plus élevée que pour d'autres espèces animales (Beyer *et al.*, 1982). Cependant, les métaux lourds ont des effets variables en fonction des espèces, du stade de développement, du mode de vie (lieu de vie et régime alimentaire) et de leur capacité d'adaptation face à la pollution. Ces effets varient également suivant la nature du métal, sa forme chimique et les propriétés du sol.

L'augmentation de la teneur en métaux lourds au delà d'un certain seuil réduit la densité des vers de terre (Pizl et Josen; 1995) et influe négativement sur leur croissance pondérale, leur développement sexuel et la production de cocons (Spurgeon et Hopkin; 1999). Spurgeon *et al.* (2000) ont observés une réduction significative du taux de survie de 4 espèces de vers de terre pour des concentrations en zinc comprises entre 2000 – 3600 ppm. De plus,

ils ont notés des pertes significatives de poids à partir de 1200 – 2000 ppm de zinc. Par ailleurs, Depta *et al.* (1999) indiquent que l'un des mécanismes potentiels d'adaptation des vers à la pollution est l'évitement. Les vers, placés en sols pollués, seraient ainsi en mesure de différencier la matière organique selon son niveau de contamination.

La capacité d'accumulation de métaux lourds par les vers de terre (étudiée sur quelques espèces) a été reconnue dans la littérature dès la fin du 19^{ème} siècle (Hopkin, 1989). Chez les vers de terre, les métaux lourds s'accumulent notamment dans les tissus digestifs après leur ingestion (voie orale), soit par voie cutanée chez les vers de terre n'ayant pas de cuticule protectrice et vivant en contact direct et permanent avec le sol. De nombreuses études ont permis d'identifier les paramètres dont dépend ce processus de bioconcentration (i) l'espèce de ver de terre et sa catégorie écologique, (ii) le type de métal et sa spéciation, (iii) les propriétés physiques et chimiques du sol, (iv) la saison et (v) quand il s'agit d'une pollution diffuse, la distance à la source de contamination. Ainsi, les métaux lourds complexes sont moins disponibles pour le ver de terre (Hartenstein et Hartenstein; 1981). Enfin, l'étude de l'accumulation des métaux lourds dans les tissus des vers pourrait être un bon bioindicateur des métaux lourds dans le sol (Lanno et Mc carty; 1997 ; Conder et Lanno; 2000 ; Conder *et al.*, 2001 ; Oste *et al.*, 2001).

Par ailleurs, quelques études traitent également de l'impact des vers de terre et de leurs activités sur la dynamique des métaux lourds dans le sol tels que la solubilité, l'extractibilité, la biodisponibilité (Wen *et al.*, 2004 ; Devliergher et Verstraete ; 1997). Ainsi, la présence du ver de terre *L. terrestris* augmente la disponibilité du cuivre de 6% (Wen *et al.*, 2004).

7. Utilisation du ver de terre comme bioindicateur

L'intérêt des Oligochètes en tant qu'indicateurs est renforcé par le fait qu'ils ne migrent pas sur de longues distances et qu'ils sont parfaitement ubiquistes. C'est ce qui a présidé à leur choix comme modèle pour notre travail de recherche. En plus de leur vaste distribution et de leur importance écologique, plusieurs éléments font du ver de terre un bon modèle pour l'étude de la contamination de l'écosystème terrestre. Cet organisme est en effet en contact direct et constant avec le sol. La surface externe de son épiderme est très vascularisée, ce qui permet une entrée directe des contaminants présents dans le milieu, lors d'un processus très semblable à l'absorption pulmonaire chez les organismes supérieurs. Son mode alimentaire fournit également une autre porte d'entrée aux contaminants via l'ingestion de particules de sol (Lanno *et al.*, 2004 ; Booth *et al.*, 2000).

Ces animaux peuvent donc être contaminés par des éléments exogènes suite à une exposition cutanée ou par ingestion (Vijver *et al.*, 2003). Plusieurs études ont démontré que les vers bioaccumulent et bioconcentrent les contaminants (Hopkin, 1989). Ces derniers peuvent alors être distribués vers des niveaux trophiques supérieurs via la chaîne alimentaire car les vers sont des proies de choix pour de nombreux animaux (Cooke *et al.*, 1992; Edwards et Bohlen; 1992). De plus, des modifications chimiques peuvent survenir dans le tractus alimentaire du ver pouvant rendre les contaminants plus disponibles pour les plantes.

La décomposition et la minéralisation de vers morts peuvent aussi entraîner un relargage des contaminants bioaccumulés dans l'environnement (Ireland, 1983). La reproduction du ver de terre peut aussi être altérée par la présence d'un stress dans son environnement. Le succès reproductif du ver de terre peut effectivement être compromis par l'action directe d'un contaminant, mais également par un changement de distribution énergétique en réponse à un stress (Morgan *et al.*, 1999 ; Robidoux *et al.*, 2005). En effet, différents mécanismes au coût énergétique élevé sont mis en place chez l'organisme dans l'espoir de s'acclimater ou de s'adapter aux stress auxquels il est soumis (Postma *et al.*, 1995). De ce fait, la proportion d'énergie disponible chez l'animal pour la production de biomasse (croissance et/ou reproduction) peut être réduite. Les organismes invertébrés du sol peuvent donc être utilisés comme des éléments bioindicateurs de la contamination d'un écosystème terrestre (Morgan et Morgan; 1988 ; Dallinger, 1994). De plus, les vers de terre sont reconnus comme étant des outils de biosurveillance efficaces (Ribera et St-Denis; 1999), en particulier pour mesurer les effets des métaux (Morgan et Morgan; 1988; Edwards et Bohlen; 1992; Dallinger, 1994), des pesticides et des HAPs (Edwards et Bohlen; 1992; Booth *et al.*, 2000) et des explosifs (Robidoux *et al.*, 2000a, 2005).

Sur le terrain, on utilise des mésocosmes afin de permettre aux vers d'évoluer dans les milieux naturels tout en étant récupérables à la fin de l'expérience pour des analyses (Robidoux *et al.*, 2004b ; Robidoux *et al.*, 2005). Dans une brève revue de littérature, Furst (2002) rappelle que les niveaux de toxicité relative du Cd chez les vers sont comparables à ceux obtenus chez le rat (Nguyen et Furst; 1988) et que la même observation s'applique quant aux effets d'autres ions métalliques chez le ver de terre. Les vers de terre constituent donc une bonne alternative à l'utilisation de mammifères lors d'études sur la toxicité des métaux en laboratoire (Matthias, 2010).

Chapitre 2 :

Etude des paramètres
morphophysiologiques

1. Introduction :

Les lombrics jouent un rôle essentiel dans la conservation de la structure du sol et la régulation de l'équilibre minéralisation humification au cours de la décomposition (7 à 8 espèces cohabitent sur un même lieu). Leurs travaux sont plus importants que ceux des instruments de culture, parmi lesquels une action mécanique par laquelle ils contribuent à la construction d'agrégats stables, une action chimique où ils limitent la décalcification du sol en remontant en surface une partie des éléments lessivés, et une action télé-métabolique, par le fractionnement des débris organiques et leur brassage aux éléments minéraux et par la sécrétion enzymatique du tube digestif. Leur cuticule est riche en matière organique et éléments assimilables par les végétaux. Il en ressort des données bibliographiques que la présence des vers de terre dans les sols est d'une extrême importance pour l'agriculture.

Au cours des deux dernières décennies, les problématiques de sols contaminés et de déchets solides ont connu une hausse dans l'ensemble des pays industrialisés, entraînant un besoin d'élaboration de méthodes de caractérisation toxicologique plus performantes. Les invertébrés du sol sont considérés comme de bons indicateurs de la qualité du sol (Lokke et Van Gestel ; 1998; Greig-Smith *et al.*, 1992) et certains d'entre eux, particulièrement les vers de terre, qui représentent 70 % de la biomasse terrestre présentent un intérêt particulier car ils peuvent être exposés aux contaminants par différentes voies (phase aqueuse, phase vapeur et ingestion de la phase solide). Certaines espèces sont ubiquistes et représentatives de la faune indigène tout en étant faciles à élever en laboratoire. Ils sont révélateurs des états et des usages du sol parce qu'ils sont intimement liés aux constituants du sol, ils réagissent ainsi aux modifications que subit leur environnement. Les deux espèces les plus utilisées au cours des tests de toxicité sont *Eisenia andrei* et *Eisenia fetida*. Alors que nous nous avons choisi de travailler sur une espèce endogée abondante dans la région de Annaba, *Allolobophora caliginosa* appelée aussi *Aporrectodea caliginosa*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Région d'étude

La forêt de Seraidi située au Nord de la wilaya de Annaba, sur les hauteurs du massif de l'Edough à 850 mètres d'altitude et à 13.3 kilomètres du centre de la ville .

2.2. Méthodes d'échantillonnage

Nous avons utilisé une méthode physique pour l'échantillonnage du sol. Le prélèvement des vers de terre se fait à la main, et réalisé sur une aire de 1/2 m² selon la méthode de Bouché (1972).

Ces prélèvements d'échantillons du sol et des vers de terre ont été effectués pendant les mois de décembre, janvier et février 2014, car les conditions climatiques sont favorables (température, précipitation) pour la répartition de la totalité des espèces faunistiques et des communautés d'être vivants dans la biosphère (Ramade, 1984).

Les vers de terre récoltés sont identifiés au laboratoire de l'École Normale Supérieure de Kouba (Alger) par les spécialistes des clés de détermination.

2.3. Matériel biologique

2.3.1. Choix de l'espèce

Notre choix s'est porté sur le ver de terre *Allolobophora caliginosa* (Figure 9) appelé aussi *Aporrectodea caliginosa*, récolté au niveau de la région de Séraïdi. Les vers de terre adultes (avec un clitellum) sont conservés dans des terrariums, au laboratoire. Leur longueur varie entre 150 à 200 mm et d'un poids de l'ordre de 0,7 à 1,5 g.

2.3.2. Systématique du ver de terre

Règne : Animalia

Embranchement : Annelidae

Classe : Clitellata

Sous-Classe : Oligochaeta

Ordre : Haplotaxida

Famille : Lumbricidae

Genre : *Allolobophora*

Espèce : *Allolobophora caliginosa* (Savigny, 1826).



Figure 9: *Allolobophora caliginosa*.

2.4. Matériel chimique

2.4.1. Protocole de contamination par le cadmium

Le chlorure de cadmium (CdCl_2 pentahydrate, Fluka) est le produit chimique utilisé dans notre étude comme xénobiotique. L'eau dé-ionisée a été utilisée comme véhicule pour enrichir le sol avec le cadmium. Les solutions étaient préparées pour obtenir les concentrations nominales suivantes dans le sol: 0 (témoin), 25, 50, 100, 150 mg / 500g de sol. On a choisi deux concentrations supérieures et deux concentrations inférieures au 1/4 de la DL_{50} (560 mg/Kg de sol) (CEPA, 2012) du cadmium pour les vers de terre.

2.4.2. Protocole de contamination par le zinc

Le sulfate de Zinc (ZnSO_4 heptahydrate, Sigma-Aldrich) était le produit chimique utilisé dans notre expérience. L'eau dé-ionisée a été utilisée comme véhicule pour enrichir le sol avec le zinc. Les solutions étaient préparées pour obtenir les concentrations nominales suivantes dans le sol: 0 (témoin), 150, 300, 450, 750 mg / 500g de sol. On a choisi deux concentrations supérieures et deux concentrations inférieures au 1/4 de la DL_{50} (870 mg/Kg de sol) (CEPA, 2012) du zinc pour les vers de terre.

2.4.3. Protocole de contamination par les mixtures

Les mixtures ont été testées aux concentrations citées ci-dessous (tableau 4), et la méthode de traitement des vers de terre est détaillée dans le (tableau 5).

Tableau 4: Composition des mixtures testées.

Mixture	Désignation	Concentration en cadmium et zinc
Mixture 1	M1	25 mg de cd/500g de sol + 150 mg de Zn/500g de sol
Mixture 2	M2	50 mg de cd/500g de sol + 300 mg de Zn /500g de sol
Mixture 3	M3	100 mg de cd/500g de sol + 450 mg de Zn /500g de sol
Mixture 4	M4	150 mg de cd/500g de sol + 750 mg de Zn /500g de sol

NB : Le pH de toutes les solutions précédentes varie entre 5.70 et 6.82

3. Méthodes

3.1. Conduite de l'essai

3.1.1. Conditions expérimentales

Après avoir effectué l'analyse du sol (sol prélevé de la région de Seraidi), il s'est avéré que ce dernier est adéquat pour la réalisation de l'expérimentation, car il possède une texture et des propriétés de compaction similaires au sol artificiel (sable : 70 %, limon : 22 %, kaolinite : 5 % et terre noire : 3 %) utiliser pour les essais toxicologiques au laboratoire. La texture et les propriétés physiques du sol rendent la matrice propice à la survie et à la croissance des organismes pendant le test de façon à ne mesurer que l'effet des contaminants (voir le tableau 6).

La réalisation d'un test de toxicité nécessite des conditions environnementales optimales au cours de la période d'exposition, lesquelles sont adaptées spécifiquement à l'organisme biologique utilisé (CEAEQ, 2003). Ces conditions expérimentales sont détaillées dans le (tableau 6).

Les contenants sont déposés dans une chambre environnementale ou une pièce à température contrôlée pour une période de 14 jours à une température de 20 °C. Une vérification de la mortalité est effectuée pendant le 7^{ème} jour d'exposition. Les individus morts sont alors retirés et le nombre d'individus morts est noté. Au cours du test, il faut vérifier si le milieu conserve suffisamment son humidité; S'il y a lieu, il faut réhydrater.

Tableau 5: La méthode de traitement des vers de terre.

Groupes	7jours	14 jours
Témoin	Vers de terre témoins non traités	Vers de terre témoins non traités
Groupe Cd 1	25 mg de cd/500g de sol	25 mg de cd/500g de sol
Groupe Cd 2	50 mg de cd/500g de sol	50 mg de cd/500g de sol
Groupe Cd 3	100 mg de cd/500g de sol	100 mg de cd/500g de sol
Groupe Cd 4	150 mg de cd/500g de sol	150 mg de cd/500g de sol
Groupe Zn 1	150 mg de Zn/500g de sol	150 mg de Zn/500g de sol
Groupe Zn 2	300 mg de Zn /500g de sol	300 mg de Zn /500g de sol
Groupe Zn 3	450 mg de Zn /500g de sol	450 mg de Zn /500g de sol
Groupe Zn 4	750 mg de Zn /500g de sol	750 mg de Zn /500g de sol
Groupe M 1	25 mg cd+ 150 mg Zn /500g de sol	25 mg cd+ 150 mg Zn /500g de sol
Groupe M 2	50 mg cd + 300 mg Zn /500g de sol	50 mg cd + 300 mg Zn /500g de sol
Groupe M 3	100 mg cd +450 mg Zn /500g de sol	100 mg cd +450 mg Zn /500g de sol
Groupe M 4	150 mg cd +750 mg Zn /500g de sol	150 cd +750 mg Zn /500g de sol

Tableau 6: Conditions expérimentales

Espèce	<i>Allolobophora caliginosa</i>
Température d'incubation	20 °C ± 2 °C
Sol naturel	sable fin et grossier : 71 % limon : 19 % terre noire : 4 % argile : 6 %
Hydratation et % humidité	80 % du taux maximal de rétention en eau Hydratation au début du test et à 7 j si nécessaire.
Luminosité	Aucune
Type de contenant de test	Contenants de 1000 ml en polyéthylène
Quantité de sol par contenant	500 g sec
Nombre de vers par contenant	6
Nombre de replica	5 pour test de croissance et de mortalité 3 pour l'étude des métabolites et le stress oxydant 1 pour l'étude histopathologie
Durée du test	7 et 14 jours
Mesures physico-chimiques	Au début du test : ph % d'humidité % humidité et pH à la fin Température de l'incubateur trois fois par semaine
Mesures biologiques	Poids moyen de 5 vers utilisés dans le témoin et les lots contaminées au début et à la fin de la durée d'exposition Mortalité et comportements anormaux au temps 7 et 14 j
Paramètres de mesure	% de mortalité par rapport au témoin taux de Croissance protéines totales (GSH, GST, CAT, MDA) Coupes histologiques
Statistiques	Test t et ANOVA

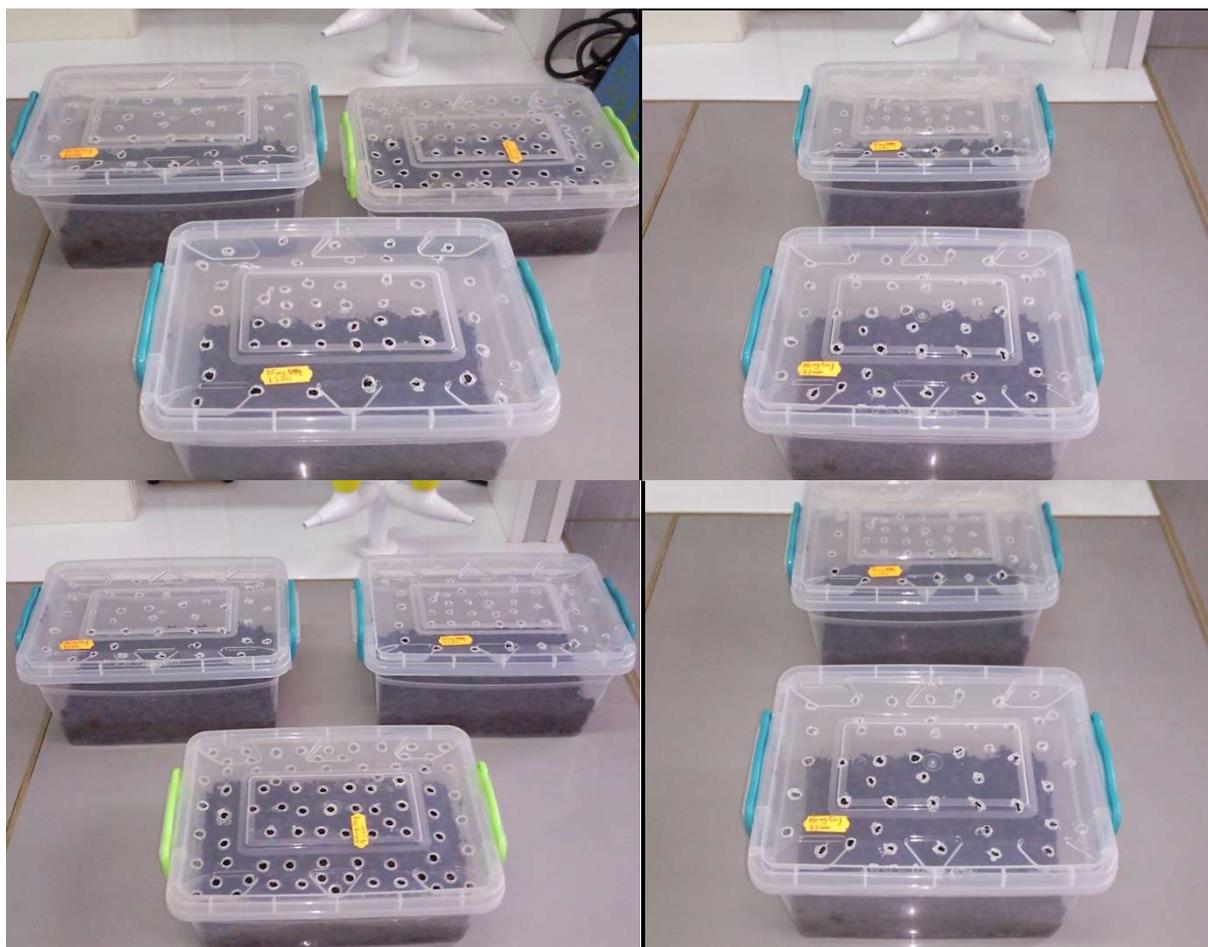


Figure 10: Dispositif expérimental de contamination des vers de terre (Otmani, 2018).

À la fin de la période de 14 jours d'exposition, les groupes tests et témoins sont retirés de la chambre environnementale. Les individus présentant des comportements anormaux et le nombre d'individus morts dans chacun des répliquats sont notés et inscrits sur la feuille de travail. Le pourcentage d'humidité et le pH sont également mesurés. La température de la chambre environnementale est également mesurée à la fin du test.

3.1.2. Dissection des vers de terre

Après 7 et 14 jours de traitement, les vers de terre sont mis à jeun pendant 48 heures afin que leur tube digestif soit vide.

Le poids de 5 vers de terre des témoins et traités est noté et la moyenne est déterminée et les pourcentages de mortalité par rapport au nombre total de vers de terre exposés pour chaque concentration est calculé.



Figure 11: Dispositif de jeun des vers de terre avant dissection (Otmani, 2018).

Après la dissection, on a prélevé 5 fragments pour les différents dosages (la teneur totale en protéines a été mesurée selon méthode de Bradford (1976). La détermination du taux de glutathion (GSH) a été réalisée selon la méthode de Weckberker et Croy (1988). La mesure de l'activité glutathion-s transférase (GST) a été réalisée selon la méthode de Habig et *al.*, (1974). La mesure de l'activité de la catalase (CAT) a été suivie selon la méthode de Regoli et Principato (1995). Le taux de malondialdéhyde (MDA) a été mesuré selon la méthode de Draper et *al.* (1990).

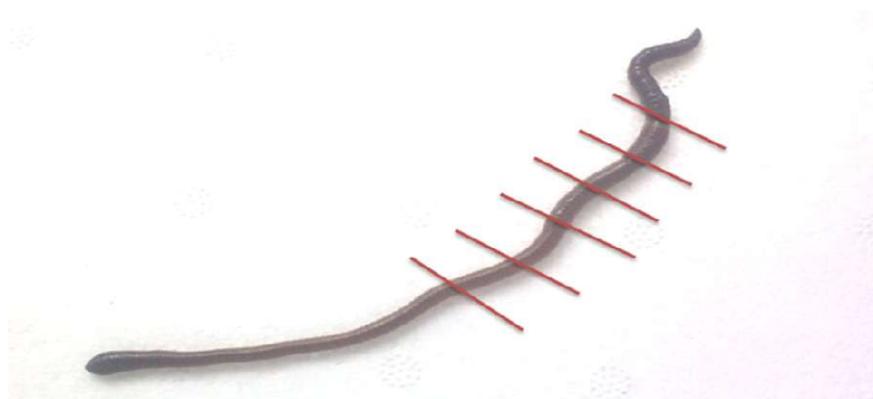


Figure 12: Préparation des vers de terre pour la dissection (Otmani, 2018).

3.2. Biomarqueurs physiologiques

3.2.1. Suivi du pourcentage de mortalité

Le taux de mortalité a été déterminé en comptant le nombre de vers de terre morts.

3.2.2. Suivi du poids des vers de terre

Le poids des vers de terre est mesuré à l'aide d'une balance de précision, de façon hebdomadaire, avant et après la durée du traitement.

3.3. Analyse statistique

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique grâce au logiciel Minitab (Version 14.0). Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart type ($m \pm SD$). Les moyennes des groupes témoins et traités ont été comparées deux à deux en utilisant le test (t) de Student, qui permet de mettre en évidence les différences entre les groupes étudiés au cours des tests effectués sur les paramètres physiologiques. Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p \leq 0,05$ (*) ; hautement significatives lorsque $p \leq 0,01$ (**) et très hautement significatives lorsque $p \leq 0,001$ (***) .

4. Résultats

Effets du Cadmium, du Zinc et de leurs mixtures sur la survie et le poids des vers de terre *Allolobophora caliginosa*

Cette partie est consacrée à l'évaluation de la toxicité potentielle des xénobiotiques testé (le cadmium, le zinc et leurs mixtures) à travers le suivi de certains biomarqueurs physiologiques tels que le pourcentage de mortalité et le taux de croissance des vers de terre.

4.1. Évaluation du pourcentage de mortalité

Le tableau (7) met en évidence l'effet de concentrations croissantes des métaux sur le pourcentage de mortalité des vers de terre. Notons qu'aucune mortalité n'a été observée durant la période d'exposition (7 et 14 jours) par rapport aux témoins.

Tableau 7: Pourcentage de mortalité observé chez des vers de terre adultes traités par les métaux durant la période d'exposition.

Groupes	7jours	14 jours	Mortalité %
Témoin	0	0	0 %
Groupe Cd 1	0	0	0 %
Groupe Cd 2	0	0	
Groupe Cd 3	0	0	
Groupe Cd 4	0	0	
Groupe Zn 1	0	0	0 %
Groupe Zn 2	0	0	
Groupe Zn 3	0	0	
Groupe Zn 4	0	0	
Groupe M 1	0	0	0 %
Groupe M 2	0	0	
Groupe M 3	0	0	
Groupe M 4	0	0	

4.2. Évaluation du poids des vers de terre

➤ Effet du Cadmium

La figure (13) illustre l'évolution du poids moyen des vers de terre sous l'effet du cadmium, durant les deux semaines de traitement.

Ainsi, le poids moyen des vers traités au cadmium a tendance à diminuer sous l'effet des quatre concentrations, durant la première semaine de traitement et ceux de façon non significative. Au bout de quatorze jours d'exposition, il y a une diminution significative ($p \leq 0.01$) du poids moyen à la concentration 50 mg/500g de sol, par rapport à celui des vers témoins. Les données sont la moyenne \pm SD de trois répliqués.

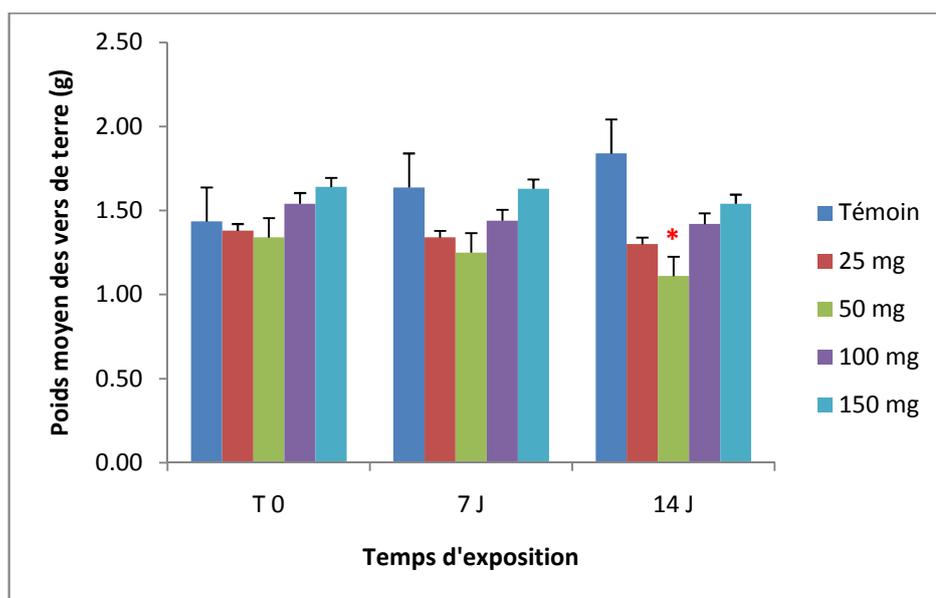


Figure 13: Effet du Cadmium sur le poids moyen des vers de terre adultes *Allolobophora caliginosa* pendant une période de sept et quatorze jours.

➤ **Effet du Zinc :**

Les variations du poids moyen chez les vers de terre témoins et traités par les concentrations croissantes de Zinc sont représentées dans la figure (14).

Nous constatons une diminution dose dépendante du poids moyen chez les vers traités par rapport aux témoins durant la période de 7 jours et de 14 jours. Ainsi, cette diminution du poids est significative ($p \leq 0.01$) à la concentration 150 mg/500g de sol, par rapport à celui des vers témoins. Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

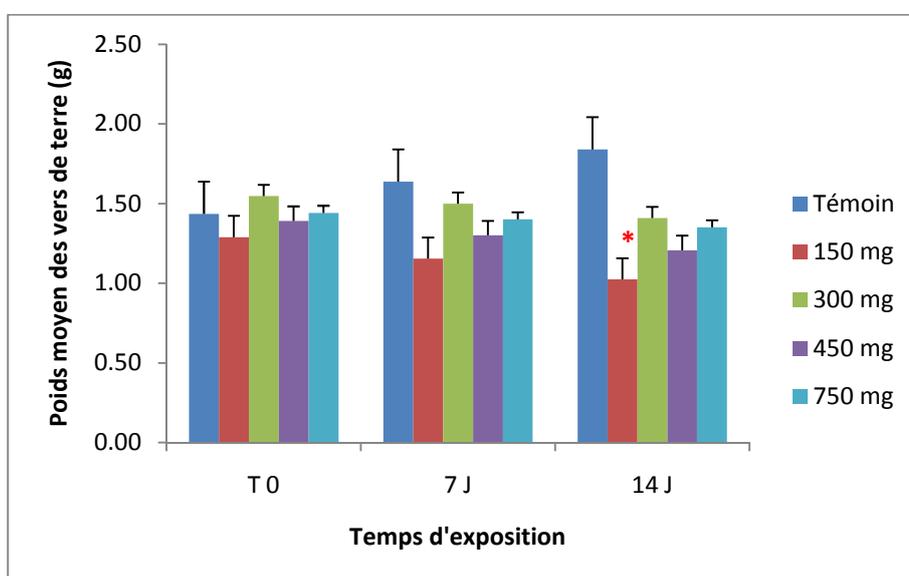


Figure 14: Effet du Zinc sur le poids moyen des vers de terre adultes *Allolobophora caliginosa* pendant une période de sept et quatorze jours.

➤ **Effet des mixtures de cadmium et de zinc :**

La figure (15) met en évidence l'évolution du poids moyen des vers de terre en fonction du temps et en présence de concentrations croissantes des mixtures de cadmium et de zinc. Ainsi, nous remarquons que chez les vers de terre témoins, le poids moyen à augmenter en fonction du temps mais chez les vers traités. Ce taux tend à diminuer d'une manière dose dépendante et non significative. Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

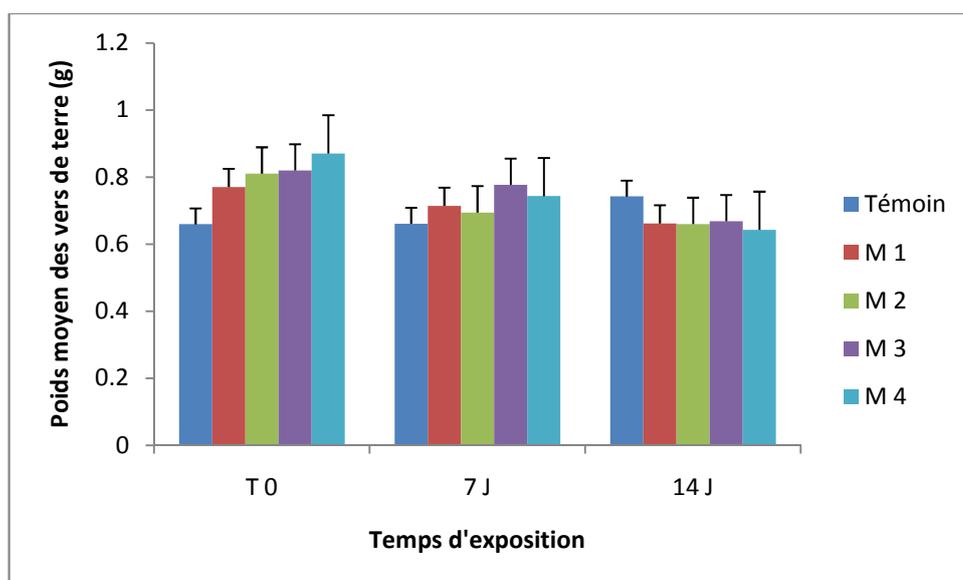


Figure 15: Effet des mixtures de Cadmium et de Zinc sur le poids moyen des vers de terre adultes *Allolobophora caliginosa* pendant une période de sept et quatorze jours.

4. Discussion

La recherche sur l'évaluation de la sécurité écologique et l'avertissement du sol contaminé est très appréciée dans le monde et il est très important d'établir un système d'évaluation des risques pour alerte précoce des organismes du sol.

Au cours des dernières années, l'utilisation de biomarqueurs chez les vers de terre a reçu une attention accrue. Les vers de terre, en tant que l'une des créatures les plus anciennes de la nature, existent depuis 600 millions d'années et sont des organismes très importants pour la formation du sol et la matière organique, présents dans la plupart des environnements terrestres, avec 60% à 80% de la biomasse du sol (Eijsackers, 2011).

Darwin croyait que les vers de terre sont les «premiers ouvriers» sur terre, connus sous le nom d'«ingénieurs du sol». Les vers de terre vivent au bas de la chaîne alimentaire et ont une certaine tolérance aux polluants. En raison de leur forte interaction avec le sol et sensibilité à la plupart des polluants (Calisi et al., 2011; Tao et al., 2009), les vers de terre sont également reconnus comme organismes idéaux du sol dans les études écotoxicologiques terrestres et ont été utilisés comme animaux indicateurs des terres contaminées (Zhang et al., 2014).

La mortalité des vers de terre est le premier paramètre abordé. **Nos résultats ont montré que celui-ci n'a pas été affecté** (même aux plus fortes concentrations) par les métaux, car aucune mortalité n'a été observée au cours de la période d'exposition aux concentrations différentes des métaux lourds. Nos résultats sont en accord avec ceux de Khalil et al. (1996) ont mesuré la mortalité et la production de cocons d'*Aporrectodea caliginosa* lorsqu'il est exposé à diverses concentrations de cadmium, de sulfate de cuivre et de zinc dans un sol égyptien. Après huit semaines d'exposition à 10 mg / kg de cadmium, et 300 ppm de zinc ces concentrations étaient sans effets sur la survie des vers de terre. Aussi (Spurgeon et al., 1994) ont gardé *E. fetida* adulte pendant 8 semaines dans des sols artificiels contaminés par le cadmium, après 56 jours, le calcul de la CL₅₀ était supérieure à 300 ppm de Cd.

Dans la même optique, Ma (1982) a utilisé un sol limoneux sableux (pH 7,3, 8% de matière organique) enrichi de CdCl₂ pour déterminer les effets du Cd sur la survie du *Lumbricus rubellus* adulte. Après 12 semaines, 1000 ppm de Cd ont entraîné une diminution de 82% de la survie, tandis que 150 ppm n'ont eu aucun effet. Spurgeon et Hopkin (1995) ont étudié l'effet du zinc (sous forme de nitrate) sur la survie d'*Eisenia fetida* dans un sol artificiel, la plus faible concentration 1078 ppm, était pour la mortalité. Dans d'autres expériences de Spurgeon et Hopkin (1996a) ont montré dans une étude de toxicité du zinc (comme nitrate)

sur trois espèces de vers de terre, qu' après 21 jours, les effets sur les paramètres testés, tels que la survie, le pourcentage de cocons fertiles et le taux de production de juvéniles, se sont produits à des concentrations plus élevées que 190 ppm. En plus, van Rhee (1975) a testé les effets d'une concentration de Zn (1100 ppm) ajoutée à un sol de polder sur le poids corporel, le nombre de cocons produits par semaine, la mortalité et le développement sexuel d'*Allolobophora caliginosa*. Après 60 jours, il y a eu une perte de poids corporel de 53% et une augmentation de la mortalité de 22%; le développement du clitellum et la production de cocons étaient complètement inhibés. Cependant, les mêmes auteurs n'ont pas montré d'effets létaux chez la même espèce de vers *Allolobophora caliginosa* exposés *via* le sol contaminé jusqu'à des concentrations de 1100mg kg⁻¹ pour le zinc et 1000 mg kg⁻¹ pour le cadmium.

En effet, la mortalité des vers de terre dépend de l'espèce testée, de sa sensibilité vis-à-vis des substances testées et le temps d'exposition. Khalil et *al.* (1996), Spurgeon et Hopkin (1995) et van Rhee (1975) ont montrés que la mortalité est un paramètre moins révélateur d'une toxicité chez les vers de terre que le poids beaucoup plus sensible et ce après traitement par des métaux lourds.

Le second paramètre mesuré dans notre étude est l'évaluation du poids des vers de terre. **Il ressort de nos résultats que les vers de terre exposés au cadmium, au zinc et leurs mixtures apparaissent assez sensibles à ses deux métaux aux conditions de laboratoire après les deux semaines de traitement.** Ainsi, les fortes concentrations de métaux inhibent la prise de poids des vers à partir de la première semaine de traitement.

En effet, Van Gestel et *al.* (1991a) a évalué les effets de Cd, ajouté au sol sous forme de CdCl₂, sur la croissance et la reproduction d'*Eisenia andrei* après 21 jours, la croissance a été réduite de 44% à 100 ppm (32 ppm sans effet). Aussi Spurgeon et Hopkin (1995) ont étudié l'effet du cadmium et du zinc sur la croissance, la production de cocons et la viabilité du cocon d'*Eisenia fetida* dans un sol artificiel, la plus basse EC₅₀, 215 ppm pour le cadmium était pour la croissance et la CE₅₀ pour un effet de croissance était supérieure à 400 ppm pour le zinc. Les chercheurs ont également étudié la toxicité des sols contaminés par des métaux et un sol artificiel contaminé par plusieurs métaux. Dans la même optique, Spurgeon et Hopkin (1996a) ont effectué des tests de toxicité avec le zinc sur trois espèces de vers de terre pour déterminer si la distribution de la population de vers de terre près d'une fonderie pourrait être liée à la sensibilité des espèces aux métaux. Les tests ont été effectués dans des sols artificiels, les taux de croissance d'*Eisenia fetida* et d'*Aporrectodea rosea* ont été réduits de 69% et de 48%, respectivement, après une exposition à 190 ppm pendant 21 jours. La même

concentration a entraîné une diminution de 32% du taux de production de cocons chez *Lumbricus rubellus*.

Neuhauser *et al.* (1984) a étudié les effets de Cd ajoutés sous forme de divers sels solubles sur la croissance et la reproduction d' *E. fetida*, après 6 semaines, sur la production de cocons qui a été diminuée (25 et 100%) à la plus faible concentration testée 100 ppm de Cd. Ainsi, Van Rhee (1975) a testé les effets d'une concentration de Zn (1100 ppm) ajoutée à un sol sur le poids corporel, le nombre de cocons produits par semaine, la mortalité et le développement sexuel d'*Allolobophora caliginosa*, après 60 jours, il y a observé une perte de poids corporel de 53% et une augmentation de la mortalité de 22%; le développement du clitellum et la production de cocons étaient complètement inhibés. Cependant, Lock et Janssen (2001 a, 2001 b) ont observés une toxicité du Cd chez les invertébrés terrestres comme *E. andrei*, *Enchytraeus albidus* et *Falsarnia candida* et ont rappelés que les paramètres physiques du sol et la biodisponibilité du Cd dans ce même sol modulent la réponse de ces invertébrés. Lors d'une étude plus ancienne, Van Gestel et Van Dis (1988) avaient démontrés que la réponse des vers de terre à la toxicité d'un métal était fortement modulée par les caractéristiques du sol. Par exemple, ils ont montrés que le Cd était létal pour *E. andrei*, avec une CL₅₀ variant entre 320-560 mg Cd/kg sol sec (sol sablonneux) ou de >1000 mg Cd/kg sol sec (sol artificiel). Par la suite, Peijnenburg *et al.*, (1999) observaient l'accumulation du Cd chez *E. andrei* et sa biodisponibilité en parallèle avec l'observation minutieuse des caractéristiques des sols. Ces chercheurs parviendront aux mêmes conclusions que les études précédentes de Van Gestel (1991a), avançant que les paramètres physiques des sols sont importants lorsque l'on utilise les tests de toxicité avec *E. andrei*.

Ainsi, Spurgeon et Hopkin (1996b), suggèrent qu'une diminution du pH et / ou de la teneur en matière organique des sols conduit à une plus faible concentration toxique de zinc. De grandes concentrations en Cd peuvent affecter la densité, la viabilité, la production de cocons, la croissance et le développement sexuel de ces organismes (Bengtsson *et al.*, 1983; Spurgeon *et al.*, 1994). Brièvement, le Cd se révèle très toxique vis-à-vis des vers de terre, diminuant leur capacité de pontes et l'éclosion des cocons. Quel que soit le sol utilisé, les effets adverses du Cd sont visibles pour des concentrations relativement faibles. Ainsi, une perturbation de la composition biochimique en protéines, peut être utilisée comme biomarqueur de contamination et évaluer son impact sur des processus physiologiques tels que la croissance ou la reproduction indispensable au maintien et à la survie de l'espèce.

Chapitre 3 :

Etude du stress oxydant

1. Introduction

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles (Favier, 2003 ; Delattre et *al.*, 2005). Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique (Gueye, 2007). L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction de ROS. Le terme anti-oxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Gutteridge ; 1999). Les stratégies antioxydantes sont nombreuses et mettent en jeu des systèmes d'une remarquable variété physico-chimique, à la fois enzymatiques et non enzymatiques, dans tous les compartiments organiques (intra/ extracellulaires, mitochondriaux, membranaires). Le recours séquentiel à ces différents systèmes assure des défenses redondantes, complémentaires et synergiques, dans la prise en charge des ROS (Gueye, 2007).

L'objectif principal de ce chapitre a été de déterminer la composition biochimique des vers de terre (protéines), et de doser certains biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques les plus impliqués dans les mécanismes de défense antioxydante contre ce stress, chez *Allolobophora caliginosa* induits par la présence de cadmium, de zinc et de leurs mixtures pourrait donc fournir des informations utiles sur ses conséquences cytotoxiques.

2. Matériel et méthodes

La méthode de traitement du ver de terre *Allolobophora caliginosa* a été précédemment décrite dans le deuxième chapitre « Effets du cadmium, du zinc et de leurs mixtures sur les paramètres morphophysiques du ver de terre *Allolobophora caliginosa* ».

Après 7 et 14 jours, les vers de terre sont mis à jeun pendant 48 heures afin que leur tube digestif soit vide. Après la dissection, on prélève 5 fragments pour les différents dosages.

2.1. Dosage des protéines totales

Le taux de protéines totales est quantifié selon la méthode de Bradford (1976), et la lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 595 nm. Les teneurs en protéines sont déterminées en référence à une gamme étalon réalisée à partir d'une solution mère de BSA (1mg/ml), et les résultats sont exprimés en μM / mg de tissus.

2.2. Détermination du taux de glutathion (GSH)

Le taux de 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-nitrobénzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion. La lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 412 nm et les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines.

La teneur en GSH est déterminée par la formule suivante :

$$GSH (\mu\text{mol}/\text{mg de protéines}) = \frac{DO * 1 * 1.525}{13.1 * 0.8 * 0.5 * \text{mg de protéines}}$$

Où :

- ❖ **DO** : Densité Optique.
- ❖ **1** : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation.
- ❖ **1.525**: Volume total des solutions utilisé dans le dosage.
- ❖ **13.1** : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.
- ❖ **0.8** : Volume en ml de l'homogénat utilisé.
- ❖ **0.5** : Volume en ml du surnageant utilisé.
- ❖ **mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg.

2.3. Mesure de l'activité glutathion-S-transférase (GST)

L'activité GST est mesurée selon la méthode décrite par 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). La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm et les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

L'activité de l'enzyme est obtenue par application de la formule suivante :

$$GST (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO * Vt}{e * Vs * \text{mg de protéines}}$$

Où :

- ❖ ΔDO : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- ❖ Vt : Volume totale de la cuve (1.4 ml).
- ❖ e : Coefficient d'extinction molaire du CDNB ($9.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- ❖ Vs : Volume du surnageant (0,2 ml).
- ❖ **mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg.

2.4. Mesure de l'activité catalase (CAT)

La mesure de l'activité catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de Regoli et Principato (1995). Elle repose sur la variation de la densité optique consécutive à la disparition du H_2O_2 . La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée et la décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant 1 mn (lecture toute les 15 s) dans des cuves UV en quartz à une longueur d'onde de 240nm.

L'activité catalase (CAT) est exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines et calculée selon la formule suivante :

$$CAT (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO}{0.040 * L * \text{mg de protéines}}$$

- ❖ ΔDO : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- ❖ **0.040** : Coefficient d'extinction de l'eau oxygénée.
- ❖ **mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg.
- ❖ **L** : longueur de la cuve utilisée (1 cm).

2.5. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique est estimée par la quantification du taux de MDA selon la méthode de Draper et Hadley (1990). Cette technique est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA), qui donne un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm. Les résultats de ce paramètre sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines.

La concentration de MDA est calculée selon la formule suivante :

$$MDA (\mu\text{mol}/\text{mg de protéines}) = \frac{DO * Vt}{e * Vs * \text{mg de protéines}}$$

Où :

- ❖ **DO** : Densité Optique.
- ❖ **Vt** : Volume total de la cuve (1ml).
- ❖ **e** : Coefficient d'extinction du TBA ($156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).
- ❖ **Vs** : Volume du surnagent (0,5 ml).
- ❖ **mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg.

3. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique grâce au logiciel Minitab (Version 14.0). Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart type ($m \pm SD$). Les moyennes des groupes témoins et traités ont été comparées deux à deux en utilisant le test (t) de Student. Afin de déterminer la significativité des différences des moyennes pour l'ensemble des variables, nous avons utilisé une analyse de la variance à deux critères d'évaluation (ANOVA). Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p \leq 0,05$ (*) ; hautement significatives lorsque $p \leq 0,01$ (**) et très hautement significatives lorsque $p \leq 0,001$ (***) .

4. Résultats

4.1. Effet du PH

L'influence du pH des sols traités n'était pas significative. Comme les valeurs de pH des solutions testées et les sols sont comprises entre 5.8 et 6.48, il est probable que les effets observés sur les vers de terre sont plus dus aux substances chimiques testées qu'au faible pH.

4.2. Effets du cadmium, du zinc et de leurs mixtures sur le métabolisme biochimique chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa*

4.2.1. Effet sur l'évolution du taux de protéines totales

➤ Effet du cadmium

La figure (16) représente l'évolution du taux de protéines totales chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* par les concentrations croissantes de Cadmium.

Durant la période de 7 jours, nous constatons une augmentation significative du taux de protéines totales par rapport au témoin après l'exposition à la plus faible concentration de cadmium 25 mg / 500g de sol ($p = 0,016$) et pour les vers traités avec la plus forte concentration de cadmium 150 mg / 500g de sol ; ce taux a été très fortement augmenté à $4,47 \pm 1,59$ par rapport au témoin $2,55 \pm 0,13 \mu\text{M mg}^{-1}$ de tissus ($p = 0,001$). Cependant, les effets du cadmium étaient moins intenses aux concentrations (50 et 100 mg / 500g de sol), où il n'y avait pas de différences significatives du taux de protéines totales par rapport au témoin.

Alors qu'après une période de 14 jours d'exposition des vers au cadmium, une régulation du taux de protéines totales par rapport au témoin a été observée. Les données sont la moyenne \pm S.D. de trois réplicats.

La comparaison entre les effets des différentes concentrations par l'analyse de la variance (ANOVA), indique des différences très hautement significatives ($p = 0.002$).

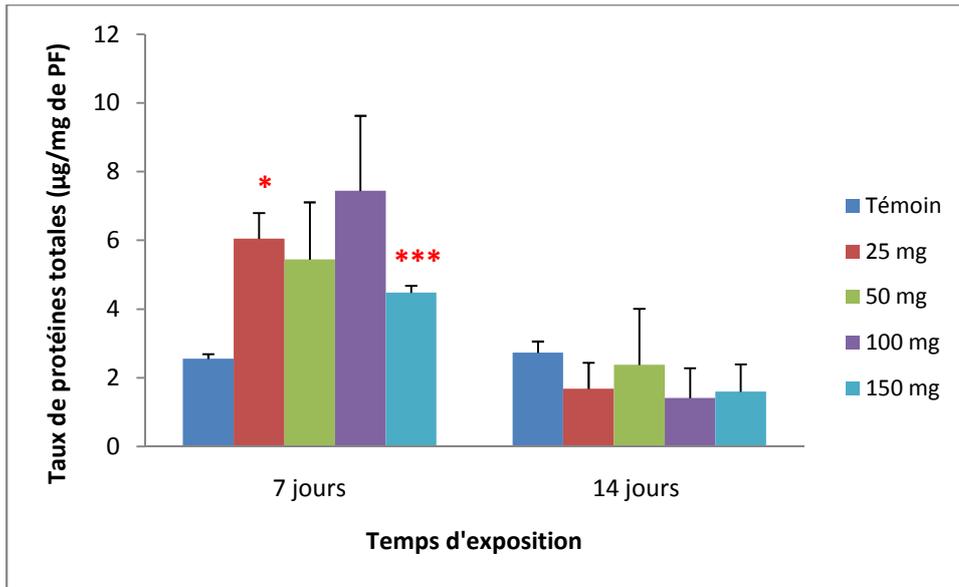


Figure 16: Effet du Cadmium sur le taux de protéines totales chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa*.

➤ **Effet du Zinc**

Les variations du taux de protéines totales chez les vers de terre témoins et traités par les concentrations croissantes de zinc sont représentées dans la figure (17).

Nous constatons une augmentation dose dépendante et non significative du taux de protéines totales chez le ver de terre traité par rapport aux témoins durant la période de 7 jours et de 14 jours. Les données sont la moyenne \pm S.D. de trois réplicats.

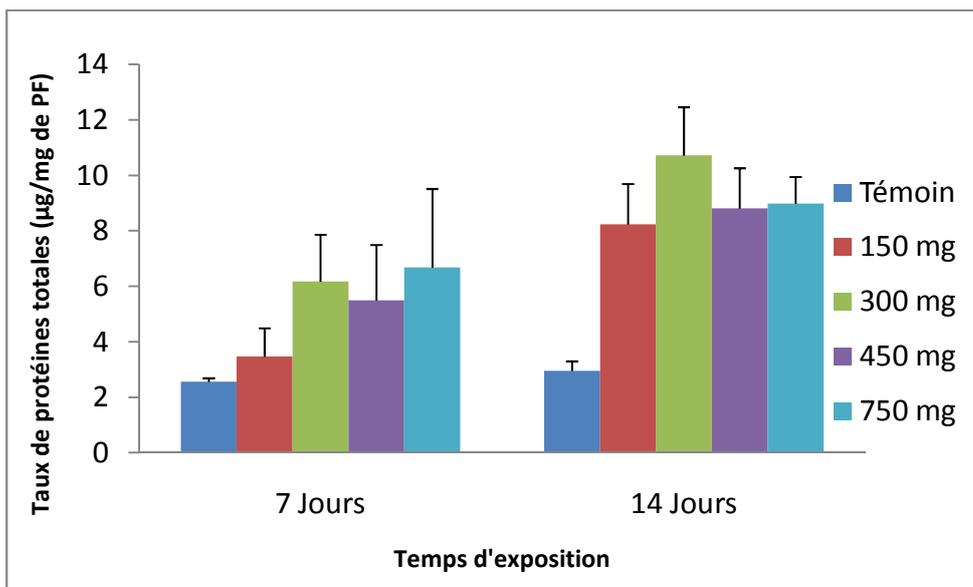


Figure 17: Effet du Zinc sur le taux de protéines totales chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa*.

➤ Effet des mixtures de cadmium et de zinc

La figure (18) met en évidence les variations de la teneur en protéines totales chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* témoin et traité par des concentrations croissantes des mixtures de cadmium et de zinc.

Nous observons une augmentation dose dépendante et non significative pour la durée de 7 jours, et une diminution dose dépendante pour la durée de 14 jours cette diminution du taux de protéines totales est hautement significative ($p \leq 0.01$) dans les concentrations (M1 et M3), tandis que pour les vers de terre exposés à la plus forte concentration M4 des mixtures de cadmium et de zinc la diminution du taux de protéines totales est très hautement significative ($p \leq 0.001$). Cette déplétion est respectivement d'environ (1.03, 0.85 et 0.79 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de PF) pour les vers traités par les concentrations M1, M3 et M4, par rapport aux témoins.

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle un effet très hautement significatif du traitement par les mixtures de cadmium et de zinc ($p = 0.001$).

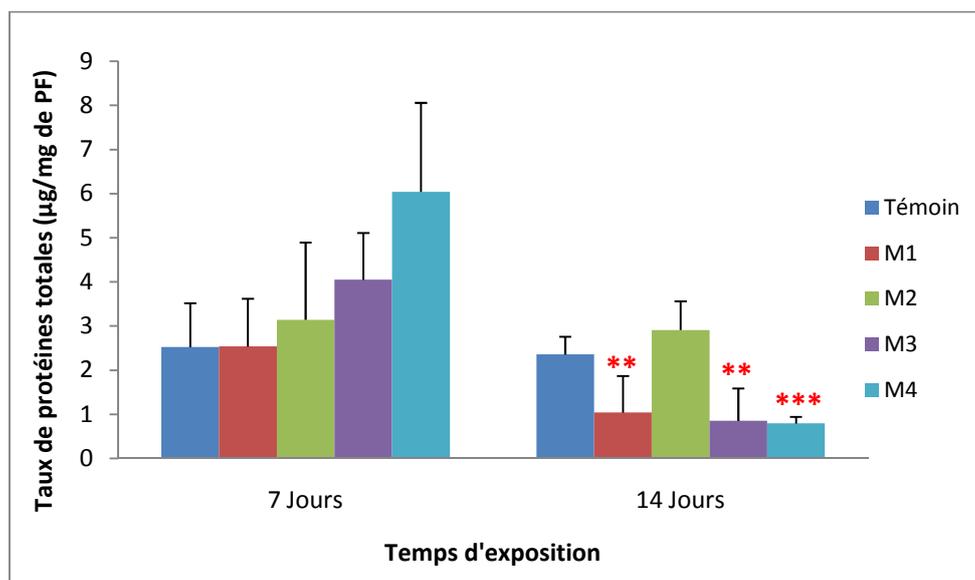


Figure 18: Effet des mixtures de Cadmium et de Zinc sur le taux de protéines totales chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa*.

4.3. Effets du Cadmium, du Zinc et de leurs mixtures sur les bioindicateurs du stress oxydant chez *Allolobophora caliginosa*

4.3.1. Effets sur l'évolution du taux de glutathion (GSH)

➤ Effet du Cadmium

La figure (19) met en évidence l'effet des concentrations croissantes de cadmium sur le taux de GSH chez *Allolobophora caliginosa*.

Une augmentation non significative du taux de GSH par rapport au témoin a été observée après une exposition à toutes les concentrations de cadmium sur une période de 7 jours. Cependant, dans la période de 14 jours, il a été constaté que le cadmium entraîne une diminution dose-dépendante du taux de GSH. Cette diminution du niveau de GSH est significative ($p = 0,031$) chez les vers de terre traités avec une concentration de 50 mg / 500g de sol avec un taux de $2,04 \pm 0,46 \mu\text{mol mg}^{-1}$ de protéine comparé au témoin ($3,60 \pm 0,16 \mu\text{mol mg}^{-1}$ de protéine). Cependant, chez les vers de terre traités avec les concentrations 100 et 150 mg / 500 g de sol, le taux de GSH a été réduit d'une manière très hautement significatives ($p = 0,001$) avec $1,22 \pm 0,26$ et $1,31 \pm 0,28 \mu\text{mol mg}^{-1}$ de protéine par rapport aux témoins ($3,60 \pm 0,16 \mu\text{mol mg}^{-1}$ de protéine). Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

L'analyse de la variance (ANOVA) montre des différences hautement significatives entre les effets des différentes concentrations ($p = 0.002$).

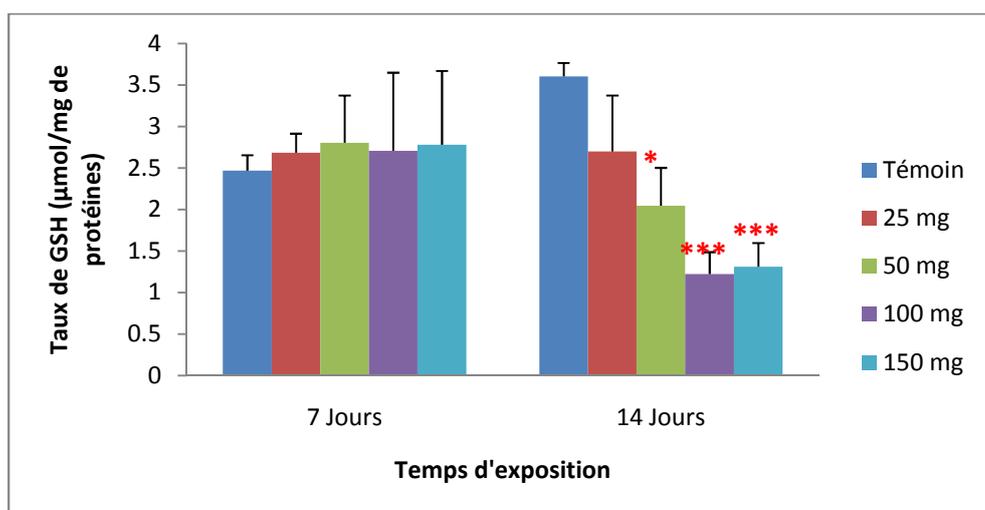


Figure 19: Variation du taux de GSH chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* exposé aux concentrations croissantes de Cadmium.

➤ **Effet du Zinc**

La figure (20) illustre l'évolution du taux de GSH chez *Allolobophora caliginosa* en fonction des concentrations croissantes de zinc.

Nos résultats montrent qu'en présence du métal, le taux de GSH tend à diminuer de manière dose dépendante pour la période de 7 jours, en revanche ce taux augmente de manière dose dépendante et non significative pour la période de 14 jours par rapport aux témoins. Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

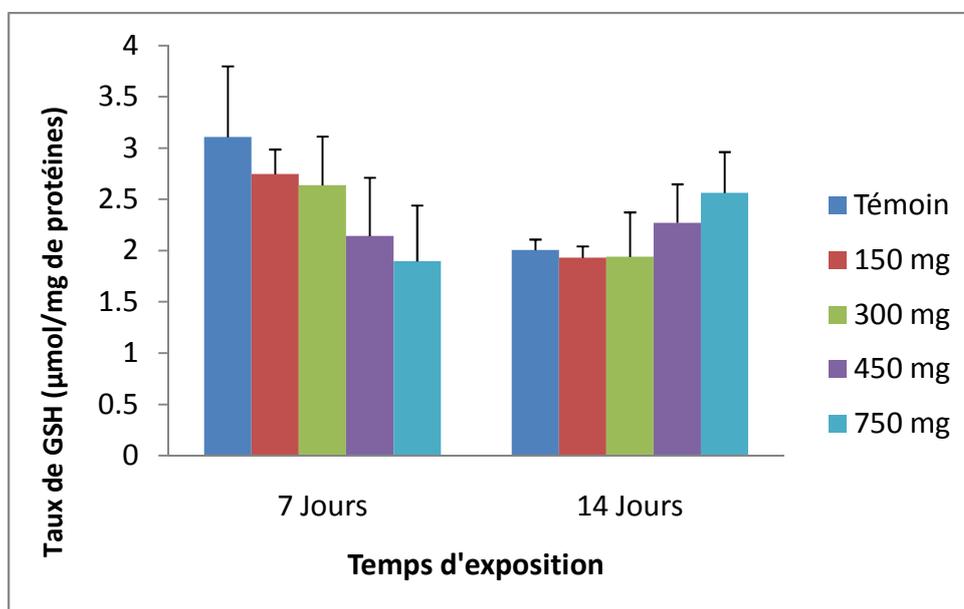


Figure 20: Variation du taux de GSH chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* exposé aux concentrations croissantes de Zinc.

➤ **Effet des mélanges de Cadmium et de Zinc**

Les variations du taux de GSH chez les vers témoins et traités par les différentes concentrations des mélanges de cadmium et de zinc sont représentées dans la figure (21).

Nous remarquons que le taux de GSH tend à augmenter de manière dose dépendante pour les vers de terre traités de 7 jours, contrairement au traités de 14 jours dont le taux de GSH tend à diminuer de manière dose dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$) pour les vers de terre traités par la plus forte dose de mixture 1.60 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines comparé aux individus témoins à 3.41 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines. Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle un effet significatif du traitement par des mélanges de cadmium et de zinc ($p = 0.04$).

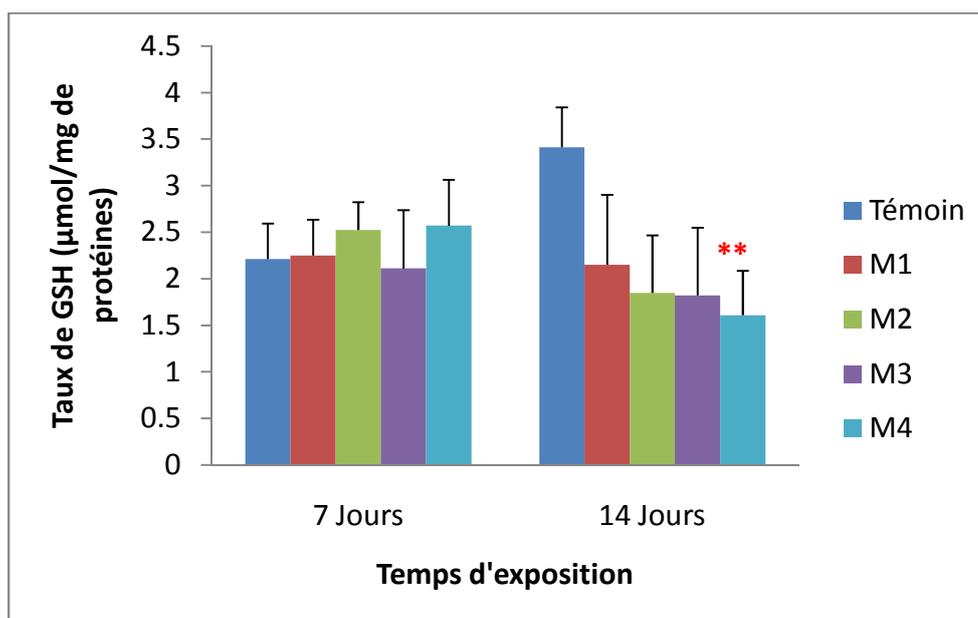


Figure 21: Variation du taux de GSH chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* exposé aux concentrations croissantes des mélanges de Cadmium et de Zinc.

4.3.2. Effets sur l'évolution de l'activité glutathion S-transférase (GST)

➤ Effet du Cadmium

L'effet du traitement par les concentrations croissantes de cadmium sur l'activité de la GST chez le ver terre *Allolobophora caliginosa* est illustré dans la figure (22).

Au cours de la période de sept jours, l'activité de la GST tend à diminuer, mais seulement significative ($P < 0,05$) avec les concentrations (50 et 150 mg / 500g de sol) avec un taux de 0,11 et 0,16 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines par rapport au témoin 0,33 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines. Pendant la période de 14 jours, l'exposition du ver de terre au cadmium a entraîné une induction de l'activité de la GST, L'activité enzymatique c'est révélée significative $p = 0,023$ avec les concentrations (25, 100 et 150 mg / 500g de sol), respectivement d'environ 0.31, 0.31 et 0.32 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines par rapport au témoin 0,18 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines. Cependant, les effets du cadmium étaient moins intenses à la concentration de 50 mg / 500g de sol, où il n'y avait pas de différences significatives dans l'activité de la GST. Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

La comparaison entre les effets des différentes concentrations par l'analyse de la variance (ANOVA), indique des différences significatives ($p = 0.01$).

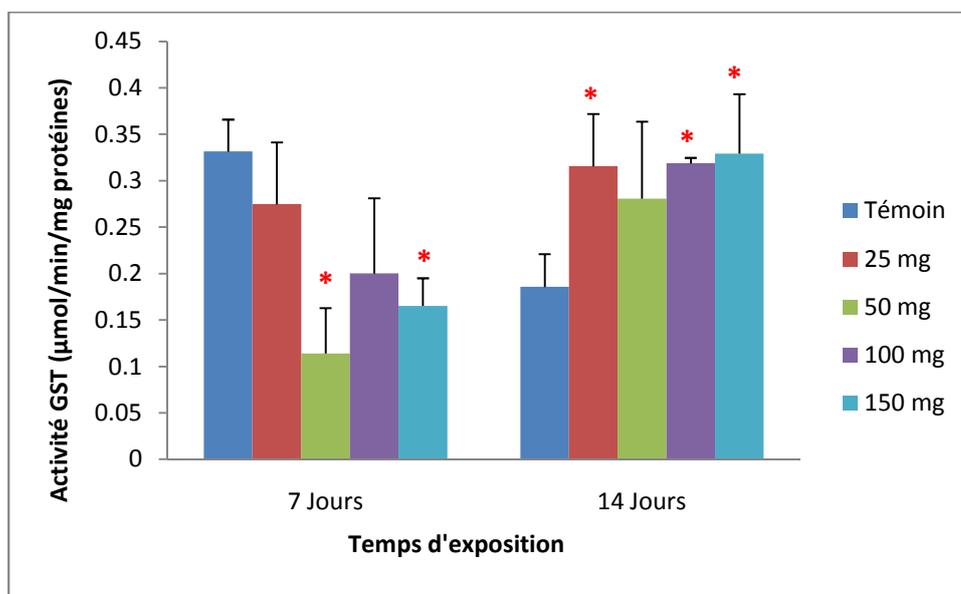


Figure 22: Evolution de l'activité GST chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* en fonction des concentrations croissantes de Cadmium.

➤ **Effet du Zinc**

La figure (23) met en évidence la variation de l'activité GST chez les vers de terre traités par les concentrations croissantes de zinc.

D'après nos résultats, nous constatons une déplétion de l'activité GST chez les vers de terre traités par les concentrations 150, 300, 450 mg / 500g de sol.

Ainsi, après 14 jours d'exposition, nous enregistrons une stimulation de l'activité GST chez les vers de terre traités par les différentes concentrations du métal comparée à celle des témoins pour la période de 14 jours.

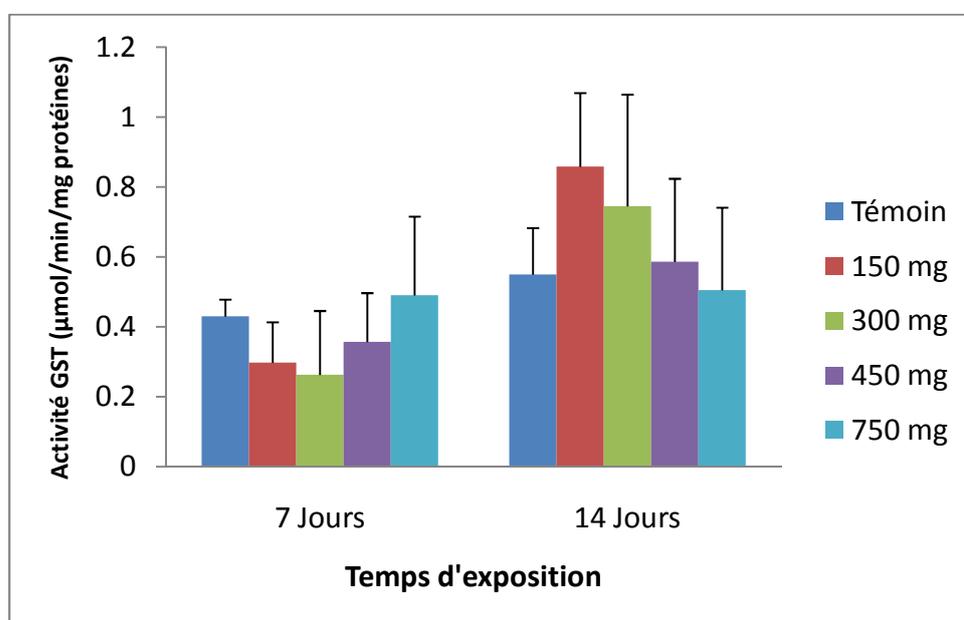


Figure 23: Evolution de l'activité GST chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* en fonction des concentrations croissantes de Zinc.

➤ **Effet des mélanges de cadmium et de zinc**

Les résultats concernant la variation de l'activité GST d'*Allolobophora caliginosa* après 7 et 14 jours d'exposition aux concentrations croissantes des mélanges de cadmium et de zinc sont représentés dans la figure (24).

D'après nos résultats, nous constatons une diminution dose dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$) de l'activité GST chez les vers de terre traités par les plus fortes concentrations (M2, M3 et M4) du métal pour la durée de 7 jours avec 0.28, 0.16 et 0.18 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines comparées au témoin 0.46 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Durant la période de 14 jours, ce taux tend à augmenter de manière dose dépendante, pour atteindre 0.42 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines dans la plus forte concentration M4 comparée à celle des témoins qui n'est que de 0.25 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

L'analyse de la variance (ANOVA) montre des différences très hautement significatives entre les effets des différentes concentrations ($p = 0.000$).

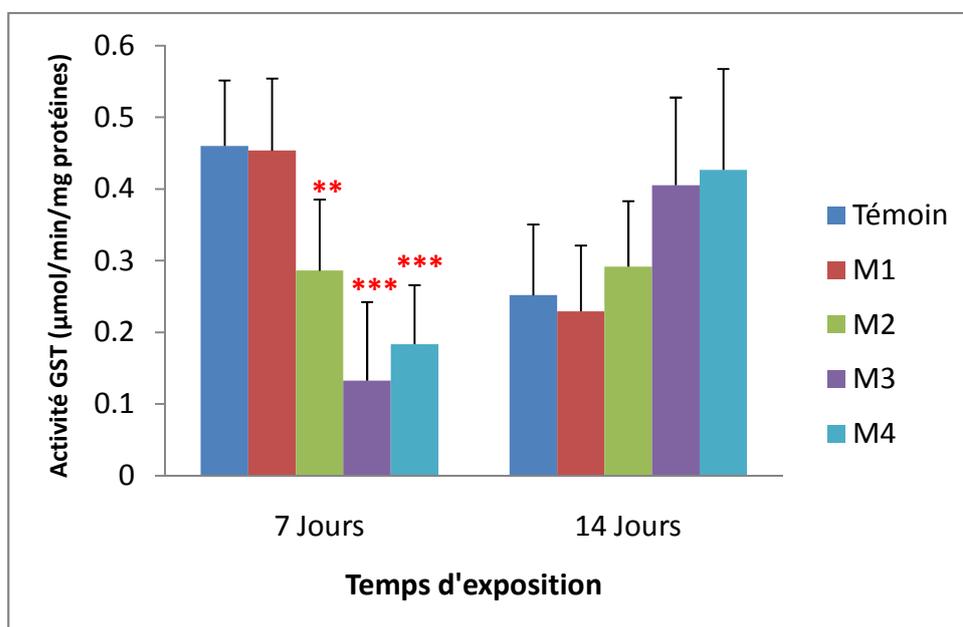


Figure 24: Evolution de l'activité GST chez le ver terre *Allolobophora caliginosa* en fonction des concentrations croissantes des mélanges de Cadmium et de Zinc.

4.3.3. Effets sur la variation de l'activité catalase (CAT)

➤ Effet du Cadmium

La figure (25) met en évidence la variation de l'activité CAT chez les vers de terre traités par les concentrations croissantes de cadmium.

Les résultats montrent une perturbation et une augmentation non significative de l'activité CAT par rapport au témoin, en présence du cadmium pour les deux périodes de traitements 7 et 14 jours. Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

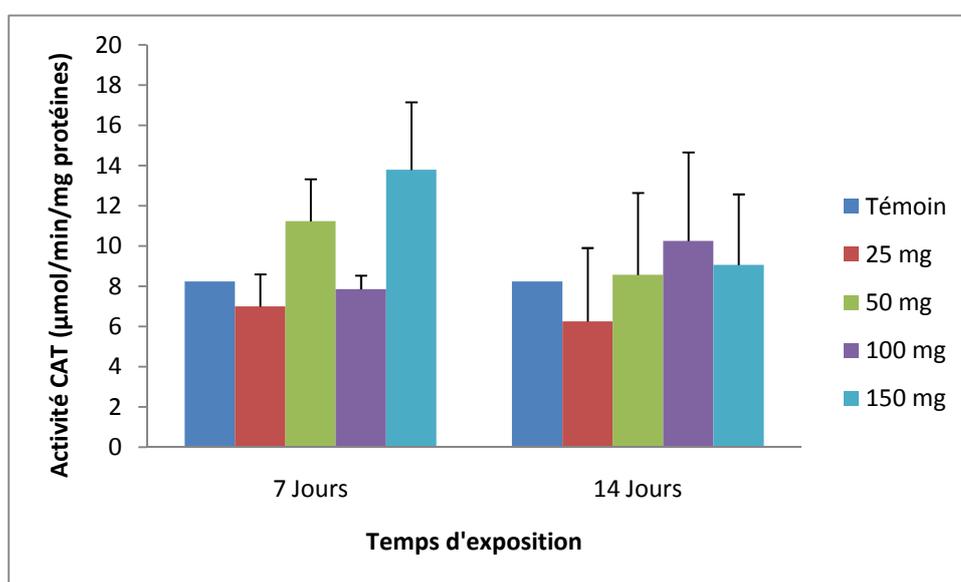


Figure 25: Effet des concentrations croissantes de Cadmium sur la variation de l'activité CAT chez le ver terre *Allolobophora caliginosa*.

➤ Effet du Zinc

D'après la Figure (26), représentative de l'évolution du taux de CAT chez les vers de terre témoins et traités par les concentrations croissantes de zinc.

Pendant la période de 7 jours, nous remarquons une augmentation dose dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$) de l'activité enzymatique chez les vers de terre traités par toutes les concentrations du zinc où nous enregistrons une valeur d'environ 24.25 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines comparativement à celle des témoins qui n'est que de 8.23 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Tandis que pendant la période de 14 jours l'augmentation du taux de CAT est dose dépendante et seulement hautement significative ($p \leq 0.01$) chez les vers de terre traités par les concentrations (300 et 750 mg / 500g de sol) avec un taux respectivement 24.09 et 26 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines comparés aux témoins avec 8.23 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Les données sont la moyenne \pm SD. de trois réplicats.

L'analyse de la variance (ANOVA) montre l'existence de différences très hautement significatives entre les effets des concentrations croissantes de zinc ($p = 0.001$), et ce pour les deux durées de traitement.

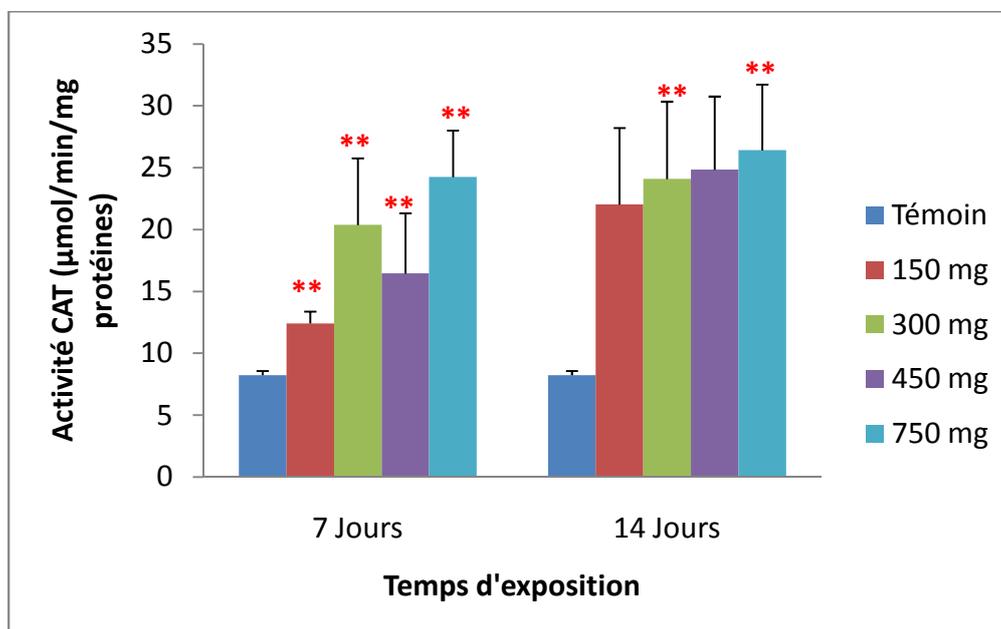


Figure 26: Effet des concentrations croissantes de Zinc sur la variation de l'activité CAT chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa*.

➤ Effet des mélanges de cadmium et de zinc

La figure (27) illustre les effets des différentes concentrations des mélanges de cadmium et de zinc sur la variation de l'activité CAT chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa*.

Selon nos résultats, durant la période de 7 jours, nous constatons une déplétion hautement significative ($p \leq 0.01$) de l'activité CAT chez les vers de terre traités par les concentrations M1, M2, M3 et M4 par rapport aux témoins. Cette diminution de l'activité CAT est également notée pendant la période de 14 jours, chez les vers de terre traités par les concentrations M1 et M2, tandis que chez les vers de terre traités par les plus fortes concentrations des mélanges M3 et M4 nous remarquons une stimulation dose dépendante de l'activité CAT et elle est significative pour les traités par la plus forte concentration M4 ou l'activité enzymatique est d'environ $10.13 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, par rapport aux témoins $6.92 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

L'analyse de la variance (ANOVA) indique des différences très hautement significatives entre les effets des différentes concentrations ($p = 0.001$), et ce pour les deux durées d'exposition.

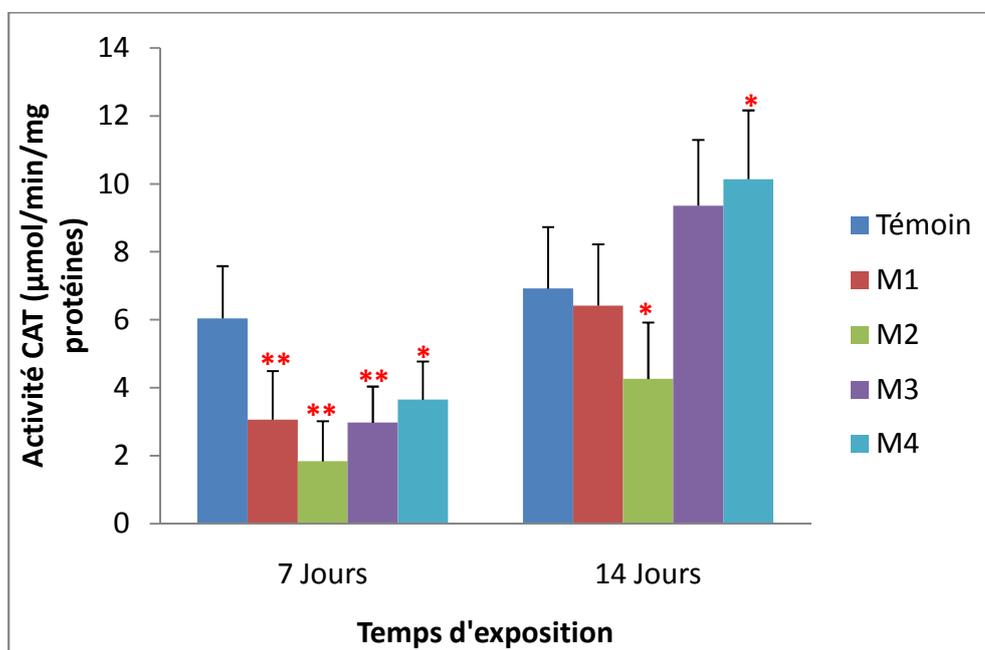


Figure 27: Effet des concentrations croissantes des mélanges de cadmium et de zinc sur la variation de l'activité CAT chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa*.

4.3.4. Effets sur la variation de la concentration de malondialdéhyde (MDA)

➤ Effet du Cadmium

Les résultats concernant l'évolution du taux de MDA chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* témoins et traités par les différentes concentrations de cadmium sont représentés dans la figure (28).

Les résultats montrent une augmentation non significative du taux de MDA par rapport au témoin, en présence du cadmium pour les deux périodes 7 et 14 jours. Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

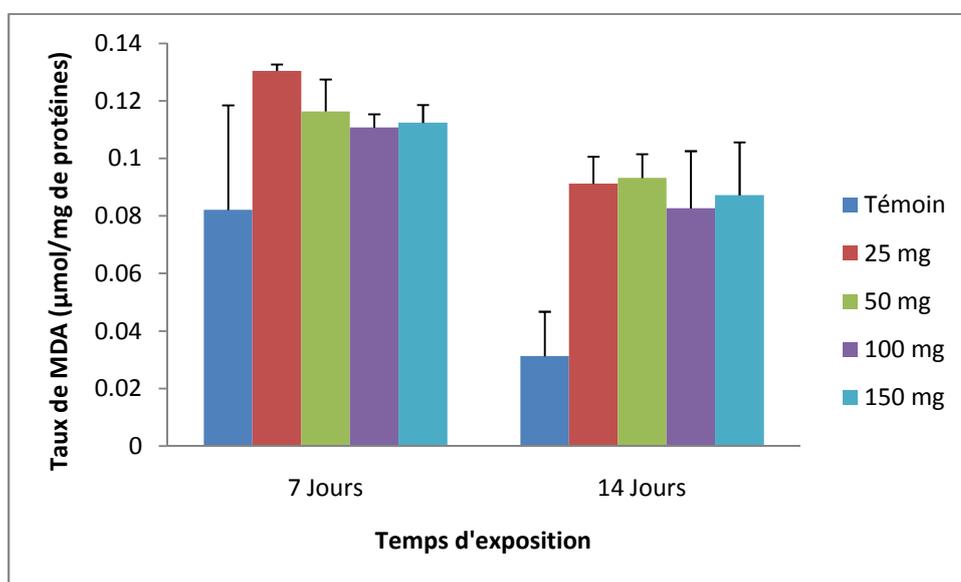


Figure 28: Evolution du taux de MDA chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* en présence des concentrations croissantes de cadmium.

➤ **Effet du Zinc**

La figure (29) met en évidence l'effet de l'exposition au zinc sur la variation de la teneur en MDA chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa*.

Nos résultats montrent qu'en présence du zinc le taux de MDA augmente de manière dose dépendante et non significative. Cette augmentation est notée pour le vers de terre traité pendant les deux périodes 7 et 14 jours. Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

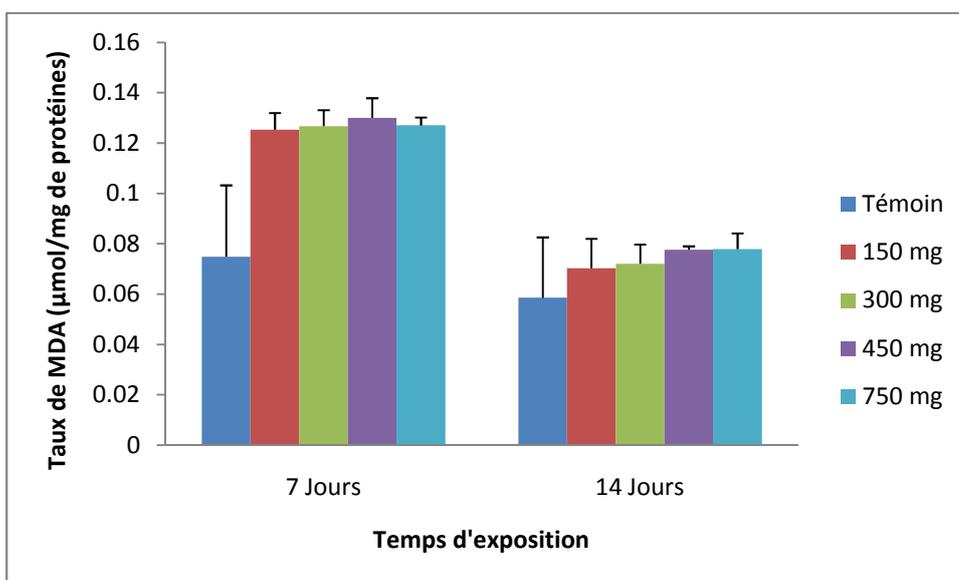


Figure 29: Evolution du taux de MDA chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* en présence des concentrations croissantes de Zinc.

➤ **Effet des mixtures de cadmium et de zinc**

La figure (30) montre l'évolution du taux de MDA chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* en présence des différentes concentrations des mixtures de cadmium et de zinc.

Selon nos résultats, durant la période de 7 jours nous constatons une déplétion du taux de MDA elle n'est significative ($p \leq 0.05$) que chez les vers de terre traités par la concentration M2 avec $0.03 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines par rapport aux témoins avec $0.07 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines.

Nous constatons que le traitement des vers de terre par les concentrations croissantes des mixtures durant la période de 14 jours, induit une stimulation dose dépendante du taux de MDA. Cette augmentation est significative ($p \leq 0.05$) pour les concentrations des mixtures (M1, M2, M3, M4) En effet, le taux de MDA est de l'ordre de $0.04 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines chez les vers de terre témoins, et augmente à l'ordre de $0.11 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines chez les vers de terre traités par la concentration M1, pour atteindre, respectivement, 0.20 et $0.16 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines chez les vers de terre traités par les 2 plus fortes concentrations M3 et M4. Les données sont la moyenne \pm SD de trois réplicats.

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle un effet très hautement significatif du traitement par des mixtures de cadmium et de zinc ($p = 0.001$), et ce pour les deux durées de traitement.

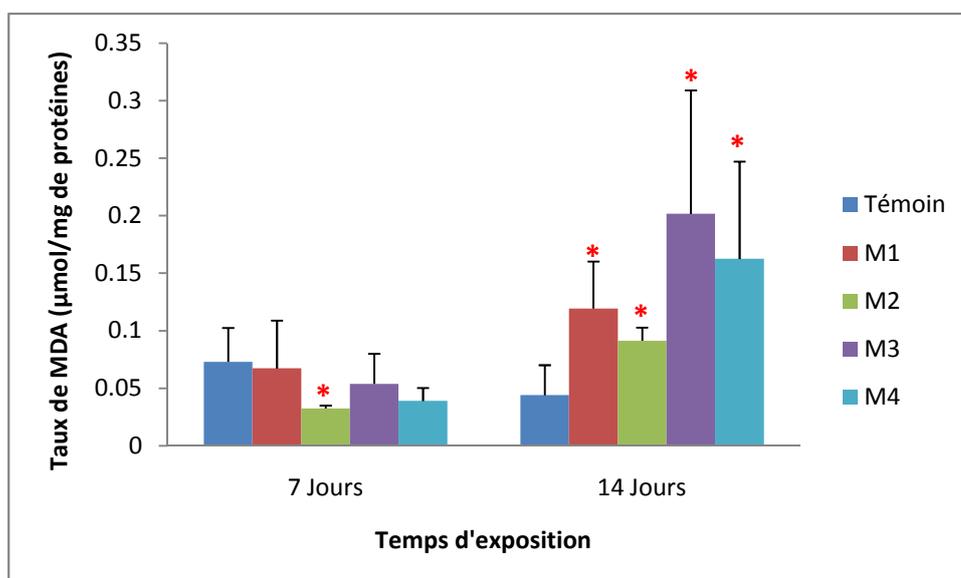


Figure 30: Evolution du taux de MDA chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* en présence des concentrations croissantes des mixtures de cadmium et de zinc.

5. Discussion

Exposés à un stress naturel ou chimique, les organismes réagissent par la mise en place d'un nouvel état physiologique afin de maintenir leur homéostasie. Si les effets du stress dépassent l'homéostasie, des dommages cellulaires peuvent avoir lieu et des mécanismes de détoxification et de réparation s'activent (Mouneyrac et *al.*, 2011). Les radicaux libres ont pour cible principale les macromolécules biologiques, parmi lesquelles les protéines et les lipides, qui jouent un rôle prépondérant dans le métabolisme énergétique (Choi et *al.*, 2001 ; Abdel-Daim et *al.*, 2015).

En plus de leur intégration dans la cellule en tant qu'éléments structuraux, les protéines sont impliquées dans diverses réactions assurant la catalyse biochimique et la régulation hormonale entre autres (Jacob et Monod ; 1961 ; Moumeni 2017). En revanche, la structure des protéines ainsi que leur fonction peuvent être altérées par les ROS produites soit par le métabolisme cellulaire ou encore par des oxydants exogènes (Djekoun, 2012). Les biomarqueurs peuvent être utilisés comme indicateur précoce de la contamination de l'environnement et des effets négatifs potentiels sur les populations (Peakall, 1994). Les biomarqueurs utilisés à l'échelle sub-individuelle, peuvent fournir des informations utiles sur les stratégies et les mécanismes moléculaires et cellulaires qu'un organisme développe pour faire face aux effets néfastes du stress induit par l'exposition aux xénobiotiques (Van der Oost et *al.*, 2003).

Afin d'élucider l'implication du stress oxydatif dans la toxicité induite par le cadmium le zinc et leurs mixtures chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa* et la capacité de ce modèle biologique à survivre et à s'acclimater à cette condition de stress, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des variations du taux des protéines et à l'étude des mécanismes antioxydants spécifiquement impliqués dans la détoxification via le suivi d'une batterie de biomarqueurs de défense et de dommage en tant que système d'alerte sensible et précoce. En effet, notre choix s'est porté sur la quantification du taux de GSH qui joue un rôle majeur dans les processus de défense antioxydants intracellulaire par piégeage et neutralisation des radicaux libres, ou encore, le suivi de la variation de quelques activités enzymatiques, en l'occurrence, la GST, enzyme impliquée dans la phase II de la métabolisation, la CAT, première ligne de défense contre le stress oxydant.

Nous avons également mesuré la teneur en MDA, utilisé comme étant un biomarqueur spécifique de la peroxydation lipidique associé à la dégradation des membranes cellulaires.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'évolution du taux de protéines totales. **Dans notre travail, nous avons constaté que l'addition de cadmium et de zinc au sol engendre une augmentation dose dépendante et significative puis une régulation de la teneur en protéines totale, tant dis que l'addition de zinc engendre une augmentation dose dépendante et non significative de la teneur en protéines totale chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa*.** Ce résultat est en accord avec les observations de Bernard et *al.* (2010) et Xiaohui et *al.* (2012), qui ont montré une augmentation du taux de protéines totales des vers de terre *Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus* et *Lumbricus terrestris* traités avec des concentrations croissantes de cadmium.

Cependant, nous avons noté une régulation du taux de protéines totales d'une manière dose dépendante sur une période de 14 jours. Ce résultat est en accord avec ceux de Spurgeon et *al.*(1994) et Matthias, (2010), qui ont montré une régulation positive significative de MT chez les espèces le ver de terre *Eisenia fetida* et *Lumbricus terrestris* exposées au cadmium. La forte tolérance des vers de terre à l'intoxication au cadmium est due probablement à la détoxification par les protéines métallothionéines dans le tube digestif postérieur (Morgan et *al.*,1989).

Irlande (1978) a constaté que le cadmium et le plomb sont particulièrement concentrés dans les cellules chloragogènes de *L. terrestris* et de *Dendrobaena rubidus*, où ils se lient sous forme de Cd-métallothionéines et de Pb-métallothionéines. Les cellules chloragogènes des vers de terre semblent accumuler des métaux lourds absorbés par l'intestin et immobiliser les métaux dans de petits chloragosomes et vésicules présents dans ces cellules (Sinha et *al.*, 2008; Usmani et Kumar; 2015). Cette diminution est probablement due au fait qu'en parallèle de ce mécanisme de séquestration protéique, le cadmium peut être dirigé vers les lysosomes et précipité sous forme de structures granuleuses, composés de phosphates de magnésium ou de calcium. Ces dernières peuvent ensuite être extrudées hors des cellules et contribuent aux mécanismes de décontamination (Brillant, 1993). De même les MT participent à la régulation des concentrations cellulaires en métaux libres essentiels (Zn^{2+} , Cu^{2+}) et jouent le rôle de réservoir à zinc (Dallinger et *al.*, 1987 ; Kagi, 1991). Lorsque les métaux essentiels sont en concentration sous-optimale, les processus ne se manifestent pas pleinement. S'il y a un excès, ces mêmes processus sont inhibés (Brillant, 1993).

La diminution significative du taux des protéines aux mixtures M1, M3 et M4 et les variations non significatives de ce même taux aux mixtures M2 peuvent s'expliquer par

une forte induction de protéines spécifiques aux mixtures M1, M3 et M4 sous l'effet du stress chimique, et la réduction possible de cette synthèse protéique, suite à une exposition intense.

D'ailleurs, les mêmes constatations ont été faites auparavant par Radwan *et al.* (2008) et Gabr *et al.* (2007). Sous l'effet des contaminants chez les invertébrés. Ainsi Padmaja et Rao (1994) ont suggéré que la diminution des protéines de l'escargot d'eau douce, *B. dissimilis*, sous l'exposition à un pesticide pourrait être due à plusieurs mécanismes, à savoir (a) la formation de lipoprotéines qui sont utilisées pour la réparation de cellules endommagées et organites tissulaires, et (b) l'utilisation directe par les cellules pour les besoins énergétiques (Radwan *et al.*, 2008). Alors Simon, (2000) suggère que l'exposition des organismes au cadmium conduit à l'induction de ces petites protéines cytosoliques. Ainsi, la forte affinité du cadmium pour les métallothionéines (la liaison Cd- α domaine de la MT est thermodynamiquement stable) entraîne le déplacement du Zn²⁺ (initialement fixé sur la MT) et perturbe l'absorption et le transport du zinc.

Chez les vers de terre, deux voies intracellulaires co-existantes responsable de l'accumulation du métal. La première implique la rétention des métaux (en particulier du Pb) en granules de phosphate insolubles appelés chlorosomes (Morgan et Morris ; 1982). La deuxième voie est l'intervention de ligands riches en soufre comme les protéines de type métallothionéine (MTLP) capable de lier les métaux (en particulier le Cd) dans les cadmosomes (Morgan et Morgan ; 1990; Morgan *et al.*, 1993). Puisque les protéines "MT" sont physiologiquement impliquées dans le transport des métaux essentiels et la régulation des ions, et fonctionnent comme des distributeurs intracellulaires de cuivre et de zinc; ils jouent également un rôle dans la régulation et la détoxification des métaux non essentiels (Klaassen, 1995; Klaassen *et al.*, 1999). Ils sont particulièrement connus pour protéger les cellules de la toxicité du Cd et stress oxydatif (Andrews, 2000). Toutes les études incluant nos résultats suggèrent que les protéines "MT" pourraient être développées comme biomarqueurs plus efficace pour déterminer les niveaux de contamination du cadmium du sol.

Dans un second temps, et après avoir élucidé les effets de cadmium de zinc et de leurs mixtures sur l'évolution du taux de protéines totale, nous avons jugé utile de suivre l'évolution du taux de GSH et les variations de l'activité GST, le glutathion considéré comme la défense de deuxième ligne vitale contre les dommages oxydatifs qui sont les principaux capteurs non enzymatiques dans les cellules animales (Moumeni *et al.*, 2016) et la glutathion-s-transférase (GST) comme une des enzymes de phase II peuvent catalyser la réaction de conjugaison du GSH et des xénobiotiques électrophiles, et contribue ainsi à l'élimination des

électrophiles réactifs. Cette enzyme joue également un rôle dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Sulata *et al.*, 2008 ; Xiaoxia Yang *et al.*, 2012). **Dans notre expérience, nous avons noté une augmentation dose-dépendante du GSH parallèle à la diminution significative de l'activité GST pour 7 jours d'exposition au xénobiotiques**, qui peut être due à une régulation de la voie de synthèse GSH qui est un mécanisme de protection contre les effets toxiques du métal indiquant que les vers de terre n'ont pas réussi à faire face au stress toxique dû à l'exposition aux métaux par leurs mécanismes détoxifiants et antioxydants pendant une courte période d'exposition (Sulata *et al.*, 2008 ; Xiaoxia Yang *et al.*, 2012).

Après 14 jours d'exposition, la présente étude démontre clairement une forte corrélation dose-réponse entre l'exposition aux métaux et l'expression de GSH. L'expression du GSH semble être sensible aux xénobiotiques: elle est fortement déclinée même à faible concentration en cadmium et les mélanges; cette déplétion pouvant être due à son utilisation massive par l'oxydation de deux molécules de GSH en une molécule de GSSG.

Le GSH récupère également les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les métaux peuvent être séquestrés par le GSH pour empêcher son interaction négative avec les biomolécules. Le GSH et d'autres thiols jouent un rôle crucial dans le nettoyage des ROS (Sulata *et al.*, 2008; Broerse *et al.*, 2012 ; Xiaoxia Yang *et al.*, 2012).

Des conclusions similaires ont été obtenues par Saint-Denis *et al.* (1999), Sulera *et al.*, (2008) et Zeriri *et al.* (2012) qui ont montré une diminution significative du taux de GSH chez *Eisenia fetida andrei* exposé à la benzo [a] pyryne et *Octodrilus complanatus* exposé à un pesticide. Ceci est en accord avec des études antérieures de Moumeni *et al.* (2016) et Amamra *et al.* (2015) qui ont élucidé un appauvrissement significatif de la teneur en GSH chez les paramécies exposées à l'insecticide, parallèlement à une augmentation significative de l'activité GST connu qu'il exerce la fonction de détoxification, habituellement l'épuisement du GSH conduit à l'activation de la GST avec une re-synthèse simultanée de GSH pour le remplacement du niveau normal. Il joue donc un rôle majeur dans la métabolisation des métaux par les organismes et fournit à la cellule un état d'équilibre et de protection contre les espèces réactives oxydées (Mofredj *et al.*, 1999).

Des études menées sur des vers de terre exposés aux métaux lourds (comme le Cd) (Saint-Denis *et al.*, 1999 ; Ribera *et al.*, 2001 ; Brown *et al.*, 2004 ; Xiaoxia Yang *et al.*, 2012) et aux pesticides (Zeriri *et al.*, 2012), et les études menées sur les paramécies exposées aux pesticides (Moumeni *et al.*, 2016) et à la cyperméthrine (Amamra *et al.*, 2015) ont montré les

mêmes résultats. D'un autre point de vue la diminution des concentrations de GSH dans la présente étude pourrait être attribuée à l'intensification d'une rotation entre le glutathion réduit et le glutathion oxydé dans les conditions qui provoquent une consommation accrue de ce peptide pour la synthèse de protéines qui se lient aux métaux lourds, comme les métallothionéines. Une diminution de la teneur en GSH dans la glande digestive semble être une réponse commune des mollusques à l'exposition aux métaux, expliquée en partie par la forte affinité de ces éléments pour la molécule de GSH (Radwan et *al.*, 2010b).

En outre, Chandran et *al.*, (2005) ont signalé que le niveau de GSH était diminué dans la glande digestive des escargots *A. fulica* traités au Zn. Dans les données actuelles, une diminution de la teneur en GSH était accompagnée d'une élévation des niveaux de la peroxydation lipidique. Le GSH est l'un des facteurs les plus importants contre les attaques oxydatives par les espèces oxygénées actives comme le LPO, car le GSH agit comme agent réducteur et trappeur des radicaux libres et est connu pour être un substrat cofacteur et / ou des enzymes apparentées au GSH (Verma et *al.*, 2007). Les métaux lourds, Pb et Cd, ont tous des affinités de partage d'électrons qui peuvent entraîner la formation d'attachements covalents (Ercal et *al.*, 2001). Ces attachements sont principalement des groupes de protéines (Quig, 1998). L'interaction des métaux toxiques avec le métabolisme du GSH est une partie essentielle de la réponse toxique de nombreux métaux (Hultberg et *al.*, 2001). Lorsque le GSH est appauvri par n'importe quel métal, les systèmes de synthèse du GSH commencent à produire plus de GSH à partir de la cystéine via le cycle g-glutamyl. GSH n'est généralement pas fourni efficacement; Cependant, si l'épuisement du GSH se poursuit en raison de l'exposition chronique aux métaux (Quig, 1998; Hultberg et *al.*, 2001).

Plusieurs enzymes dans les systèmes de défense antioxydants peuvent protéger ce déséquilibre. Malheureusement, la plupart de ces enzymes deviennent également inactives en raison de la liaison directe du métal aux sites actifs des enzymes, si les sites contiennent des groupes sulfhydryle (Ercal et *al.*, 2001). En outre, le Zn qui sert habituellement de cofacteur de nombreuses enzymes pourrait être remplacée par des métaux lourds, rendant ainsi les enzymes inactives (Ercal et *al.*, 2001).

La catalase représente un lien important dans la détoxification des ROS générés à la suite d'une toxicité, qui est considérée comme une enzyme présentant une réponse claire et précoce à la contamination. **Dans la présente étude, l'activité CAT s'est révélée être augmentée après 7 et 14 jours d'exposition au cadmium au zinc et aux mixtures.** Cette

augmentation pourrait être due à une intensification de l'activité antioxydante, pour prévenir l'accumulation des radicaux oxygénés ROS (Nahla et al., 2012). Ce résultat était en accord avec ceux de (Zhang et al., 2009b) qui ont rapporté une intensification de l'activité CAT chez le ver de terre *Eisenia fetida* suite à une exposition aux métaux lourds pendant 48 h. Selon Torres et al. (2002), ces données suggèrent que l'augmentation des défenses antioxydantes serait due à une production accrue de radicaux libres, ce qui pourrait stimuler les activités antioxydantes pour faire face à ce stress oxydatif accru et protéger les cellules contre les dommages. De plus, les études effectuées par Barata et al. (2005) ont pareillement mis en évidence une induction des activités CAT et SOD chez *Daphnia magna* en présence du cadmium et du cuivre, et concluent que ces toxiques peuvent induire différentes réponses antioxydantes/prooxydantes en fonction de leur capacité à produire des ROS.

La peroxydation lipidique est considérée comme l'une des conséquences les plus remarquables des attaques radicalaires. Elle est responsable des altérations cellulaires et de la diminution de la fluidité membranaire (Davies, 2000 ; Favier, 2003). Le malondialdéhyde (MDA) est largement utilisé comme biomarqueur de la peroxydation lipidique et plus généralement d'un stress oxydatif (Zielinski et Pörtner ; 2000 ; Viarengo et al., 2007). **Après 7 et 14 jours d'exposition au cadmium, zinc et leurs mixtures, une augmentation notable de la MDA a été observée chez les vers de terre *Allolobophora caliginosa*.** Ces résultats sont en bon accord avec ceux de Radwan et al. (2010b) qui ont enregistré une élévation significative du MDA après 48 h d'exposition chez les escargots *T. pisana* contaminés par le Cd et le Zn. Aussi Zeriri et al. (2012) ont indiqué que le niveau de MDA augmente chez les vers de terre traités avec différentes concentrations de méthomyl. Ces résultats viennent confirmer ceux rapportés antérieurement par Moumeni et al. (2016) chez *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* suite au traitement par Focus Ultra ou encore ceux de Amamra et al. (2015b) après une exposition des paramécies à la Cyperméthrine. Ces résultats étaient également en accord avec les données actuelles où l'augmentation des niveaux de Cd augmentait le niveau de la peroxydation lipidique chez les vers de terre Zhou et al. (2008) et Xue et al. (2009) suggèrent que l'un des effets les plus dommageables des ROS et de leurs produits dans les cellules est la peroxydation des lipides membranaires, qui peuvent être indiqué par la détection de MDA. Les hydroperoxydes lipidiques ainsi formés sont dégradés principalement en malondialdéhyde (MDA), produit final de la peroxydation lipidique, qui est très réactif vis à vis des macromolécules biologiques telles que les protéines, les phospholipides, l'ARN et l'ADN. Il peut former des adduits à l'ADN pouvant induire un effet

mutagène pour l'organisme, ou se complexer aux acides aminés ou encore au glutathion (Stohs et *al.*, 2000).

Chapitre 4 :

Etude histopathologique

1. Introduction

La capacité d'accumulation des métaux lourds par les vers de terre (étudiée sur quelques espèces) a été reconnue dans la littérature dès la fin du 19^{ème} siècle (Hopkin, 1989). Chez les vers de terre, les métaux lourds s'accumulent notamment dans les tissus digestifs soit par voie orale après leur ingestion, soit par voie cutanée chez les vers de terre n'ayant pas de cuticule protectrice et vivant en contact permanent avec le sol. D'autre part, les métaux peuvent également être stockés dans les cellules intestinales et éliminés par simple desquamation (Grelle, 1998). La détoxification peut se faire par stockage plus ou moins définitif des métaux dans des granules spécifiques (les chloragosomes) au sein de cellules entourant l'intestin (les chloragocytes) (Ireland et Richard ; 1981). Ces granules peuvent être larguées dans le liquide cœlomique, excrétés via les néphridies ou bien stockés de façon permanente avec d'autres déchets dans les derniers segments. Enfin, Terhivuo *et al.* (1994) ont pu montrer que les teneurs les plus élevées de métaux lourds étaient mesurées chez le ver de terre endogé *Allolobophora caliginosa*, ainsi l'étude de l'accumulation des métaux lourds dans les tissus des vers pourrait être un bon bio indicateur (biomarqueur) de disponibilité des métaux lourds dans le sol (Lanno et Mc carty ; 1997 ; Conder et Lanno ; 2000 ; Conder *et al.*, 2001 ; Oste *et al.*, 2001).

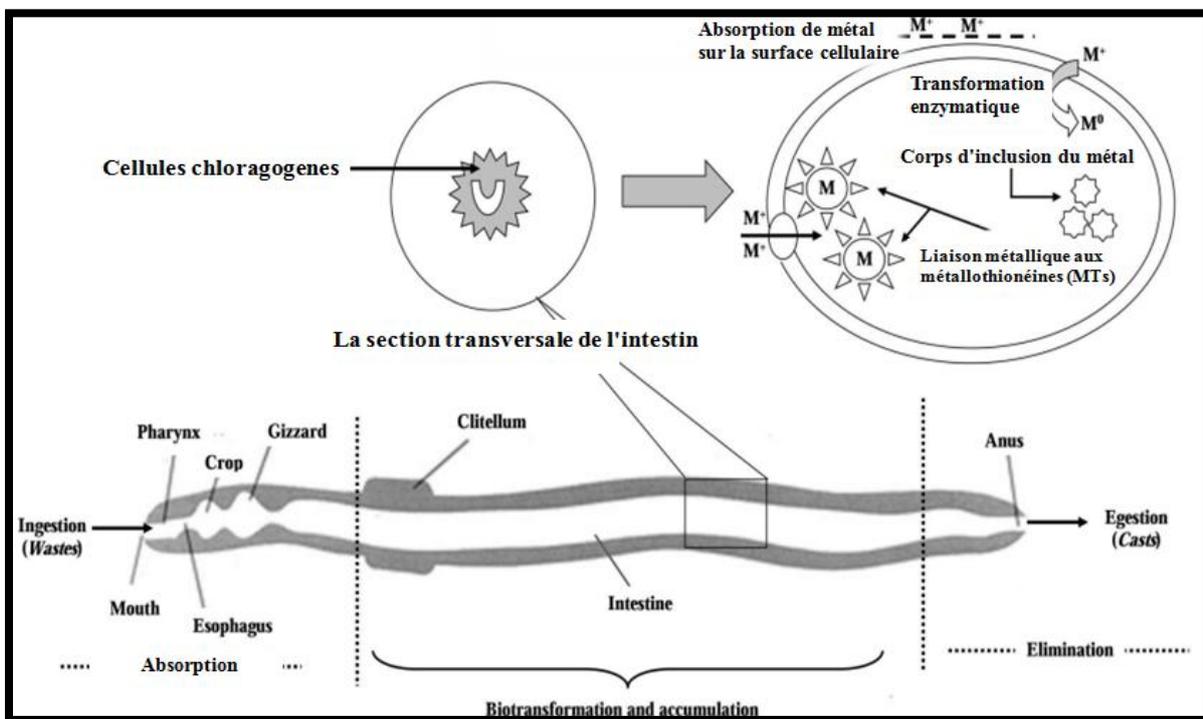


Figure 31 : Représentation schématique de l'absorption, de la biotransformation, de l'accumulation et de l'élimination des métaux dans les vers de terre au cours de l'ingestion de sol contaminé par les métaux lourds chez le ver de terre (Swati et Hait ; 2017).

La morphologie et l'anatomie interne du ver de terre sont bien décrite dans le chapitre 1 (3ème Partie : Organisme à l'étude: le ver de terre *Allolobophora caliginosa*, page 32).

2. Matériel et méthodes

2.1. Préparation des échantillons

A la fin de la période de traitement (7 et 14 jours) et après la dissection des vers de terre, 5 individus choisis au hasard au niveau des lots (témoins et traités) sont destinés aux dosages biochimiques (suscités), et parmi lesquels, 1 individu de chaque lot est destiné aux études histologiques.

2.2. Réalisation des coupes histologiques

Les échantillons (une partie des vers de terre « métamères 20 à 27 »), sont fixés dans le formol. Puis déshydratés dans l'éthanol 95° au moins deux fois. Après déshydratation, les pièces sont conservées dans du butanol. Après imprégnation dans la paraffine (3 bains de 24 h.) les pièces sont coupées (2µm) à l'aide d'un microtome Anglia scientifique 0325, étalées avec l'eau gélatinée et séchées à l'étuve (37 °C) pendant au moins 48 h. Les coupes sont par la suite déparaffinées avant d'être colorées à l'hémalum éosine (hématoxyline 1 g, iodate de sodium 0,2 g, chloral hydraté 150 g) qui permet une coloration différentielle. Les pièces sont montées à l'aide du baume de Canada (Martoja et Martoja ; 1967).

L'observation des coupes histologiques est effectuée grâce un microscope optique de type: Olympus CX22 LED avec les grossissements X40, X100 et X400.

3. Résultats

La planche (1) illustre une coupe histologique sagittale effectuée au niveau du corps des vers de terre témoins (la partie du vers située juste après le cœlome « métamères 20 à 27 »).

Nous observons une structure normale de l'épiderme (Ep) surmontée d'une cuticule, sous laquelle sont présents des muscles circulaires métamérisés (MC) et des muscles longitudinaux (ML) continus sur toute la longueur du corps.

Dans chaque métamère, les muscles circulaires et longitudinaux entourent une cavité cœlomique (CC) remplie de liquide cœlomique qui est composé de 90% d'eau mais aussi de cellules, de peptides antimicrobiens et de diverses protéines. Le cœlome correspond à l'ensemble des cavités et liquides cœlomiques de l'organisme. Elle est composée (CC) de nombreuses paires de chambres (gauche et droite) séparées par des cloisons, des dissépiements (D), ainsi qu'une couche de tissu connectif entre les deux.

L'intestin (I) du ver de terre se présente sous la forme d'un tube droit reliant la bouche et l'anus et se compose d'épithélium intestinal (EI), de tissu chloragène (TC) et de muscle. Le tissu chloragène, composé de chloragocytes, est situé entre l'épithélium intestinal et le cœlome.

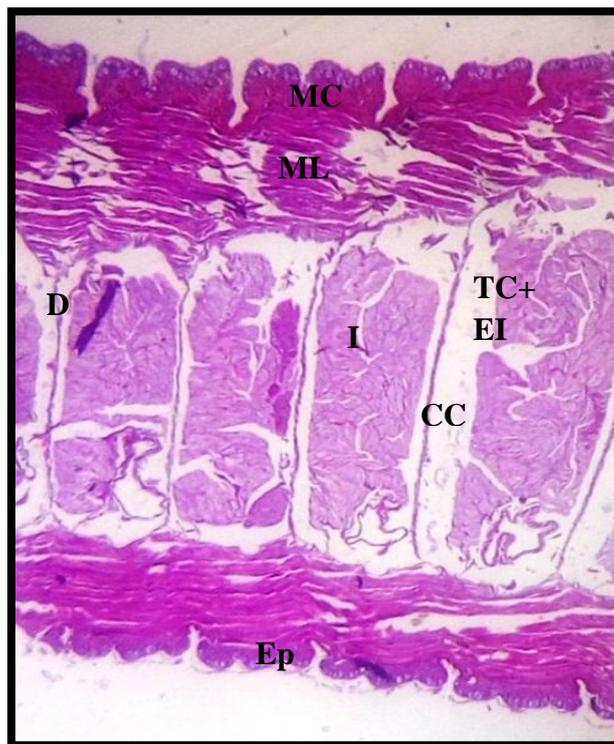


Planche 1 : Observation au microscope optique de coupes histologiques sagittales des vers de terre témoins (Coloration : Hemalun éosine ; Gr : X 40).

Les coupes histologiques sagittales des vers de terre témoins et traités pendant 14 jours par le cadmium (100 mg de cd/500g de sol) sont représentées dans la planche (2).

La planche (2.A) met en évidence l'aspect normal des tissus des vers de terre témoins avec un intestin sain et des dissépiments normaux.

Après 14 jours de traitement, nous constatons une altération de l'intestin avec des nécroses, une lyse du dissépiment et des altérations histopathologiques du tissu chlorogène et de l'épithélium intestinal (P2.B).

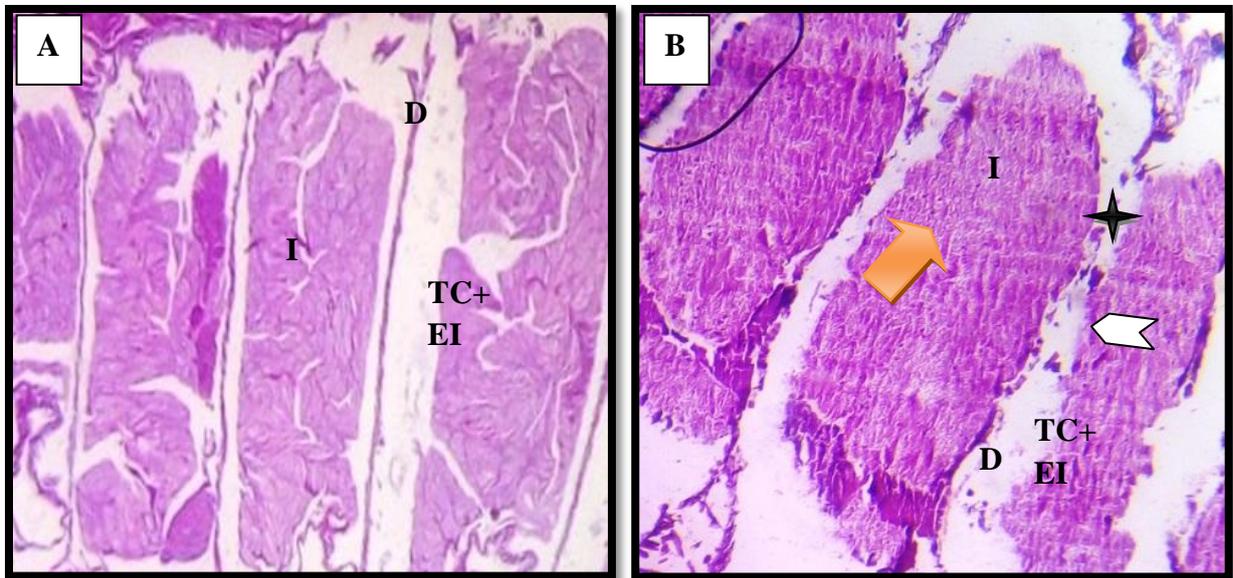


Planche 2 : Observation au microscope optique de coupes histologiques sagittales des vers de terre témoins (A) et traités par la concentration de cadmium 100 mg de cd/500g de sol après 14 jours d'exposition (B) (Coloration : Hemalun éosine ; Gr : X 40).

I : Intestin ; **D** : Dissépiment ; **TC+EI** : Tissu Chlorogène et Epithélium Intestinal ;

→ Nécrose ; **★** Lyse du Dissépiment ; **⊃** altérations histopathologiques de TC+EI

La planche (3) illustre les coupes histologiques sagittales effectuées au niveau des tissus, chez les vers de terre témoins et traités par la plus forte concentration de cadmium (150 mg de cd/500g de sol) après 14 jours d'exposition.

Comparativement aux tissus des vers de terre témoins qui présentent une structure normale avec un intestin sain et des dissépinents normaux (Planche 3.A), l'examen histologique des vers de terre traités met en évidence une sévère altération de l'intestin avec l'apparition de nécroses, avec la présence de particules sphériques, probablement des particules métalliques (P3.B).

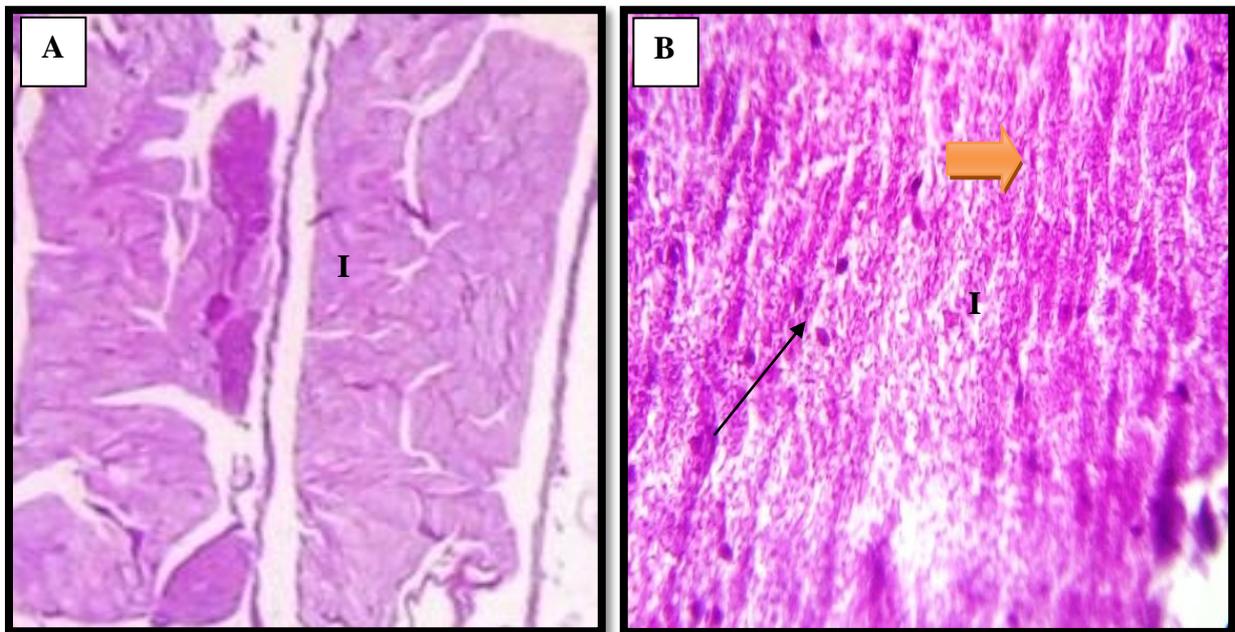


Planche 3 : Observation au microscope optique de coupes histologiques sagittales des vers de terre témoins (A) et traités par la plus forte concentration de cadmium 150 mg de cd/500g de sol après 14 jours d'exposition (B) (Coloration : Hemalun éosine ; Gr : X 100).

I : Intestin ; \longrightarrow Particules métalliques; \longrightarrow Nécrose

La planche (4) représente les coupes histologiques sagittales effectuées au niveau du tissu intestinal, chez les vers de terre témoins et traités pendant 14 jours par la plus forte concentration du cadmium (150 mg de cd/500g de sol).

La planche (4.A) illustre l'aspect du tissu intestinal des témoins, composé de cellules de grandes tailles à limites cytoplasmiques nettes, avec un petit noyau central et un cytoplasme clair contenant des grains de sécrétions éosinophiles.

Par ailleurs, l'examen histologique du tissu intestinal des vers de terre traités met en évidence l'apparition de nécroses cellulaires, un caryorrhexis (destruction ou lyse du noyau par fragmentation), un cytoplasme fortement éosinophile et des limites cytoplasmiques imprécises (P4.B).

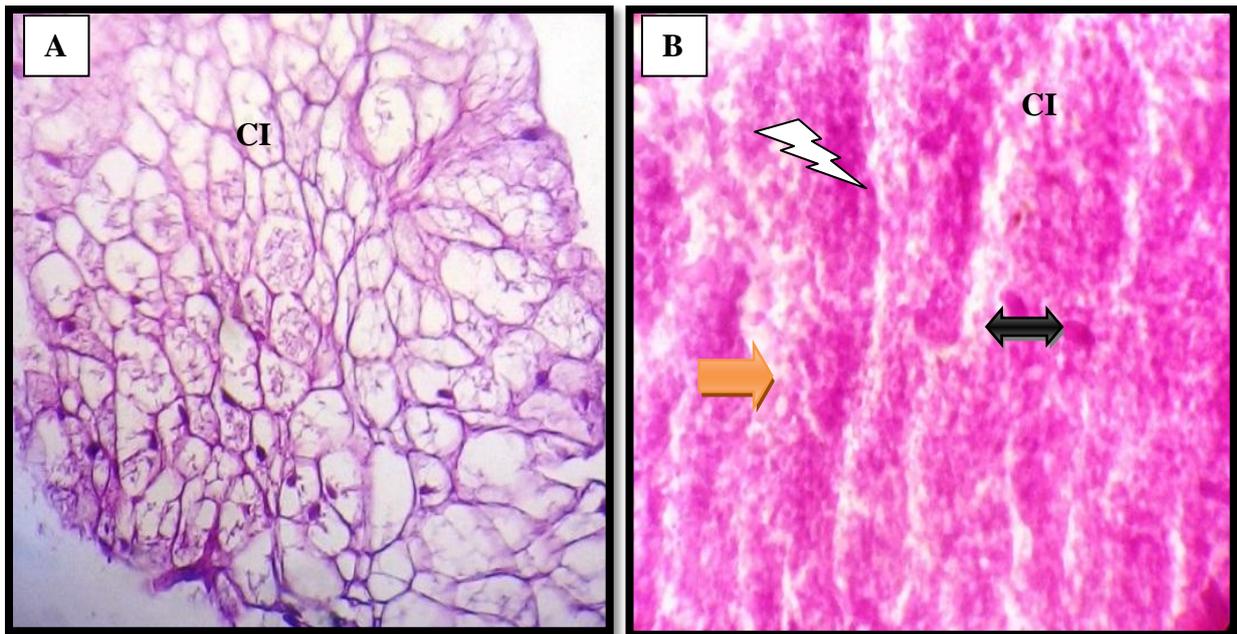


Planche 4 : Observation au microscope optique de coupes histologiques sagittales des vers de terre témoins (A) et traités par la plus forte concentration de cadmium 150 mg de cd/500g de sol après 14 jours d'exposition (B) (Coloration : Hemalun éosine ; Gr : X 400).

CI : Cellules Intestinales ;  Nécrose ;  Caryorrhexis (lyse du noyau) ;
 Limite cytoplasmique imprécise

Les coupes histologiques sagittales des vers de terre témoins et traités pendant 14 jours par les mixtures de cadmium et de zinc (M1) sont illustrées dans la planche (5).

La planche (5.A) met en évidence l'aspect des tissus des vers de terre témoins avec un intestin sain et une structure normale de l'épiderme (Ep) renfermant des Muscles circulaires (MC), et des Muscles longitudinaux (ML) normaux.

Par ailleurs, le traitement par les mixtures de cadmium et de zinc (M1) pendant 14 jours a induit une altération des Muscles longitudinaux avec l'apparition de nécroses tissulaires (P5.B).

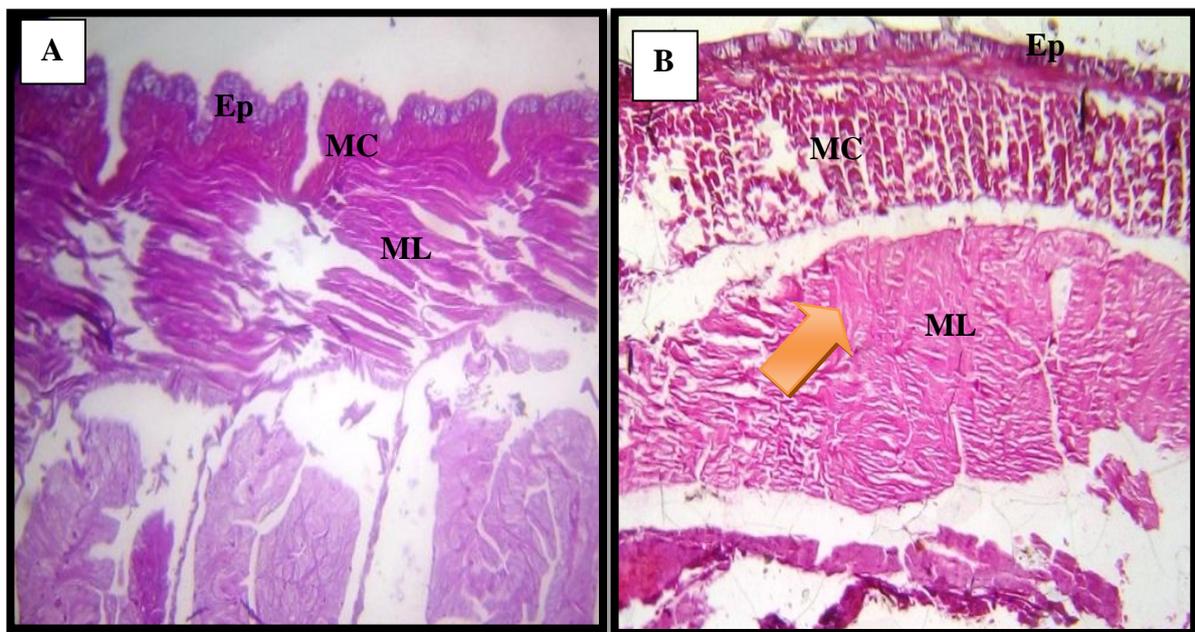


Planche 5 : Observation au microscope optique de coupes histologiques sagittales des vers de terre témoins (A), et traités pendant 14 jours par mixtures de cadmium et de zinc (M1) (B) (Coloration : Hemalun éosine ; Gr : X 400).

MC : Muscles circulaires ; ML : Muscles longitudinaux ; Ep : Epiderme ; 
Nécrose

La planche (6) illustre les coupes histologiques sagittales effectuées au niveau de l'intestin, chez les vers de terre témoins et traités pendant 14 jours par les mixtures de cadmium et de zinc (M3).

Ainsi, chez les vers témoins (P6.A), l'intestin est constitué de cellules de grandes tailles à limites cytoplasmiques nettes, avec un petit noyau central et un cytoplasme clair contenant des grains de sécrétions éosinophiles.

Cependant, l'examen histologique de l'intestin des vers de terre traités par les mixtures de cadmium et de zinc (M3) met en évidence l'apparition de nécroses tissulaires accompagnées de caryorrhexis (destruction ou lyse du noyau par fragmentation), un cytoplasme fortement éosinophile, et des limites cytoplasmiques imprécises (P6.B).

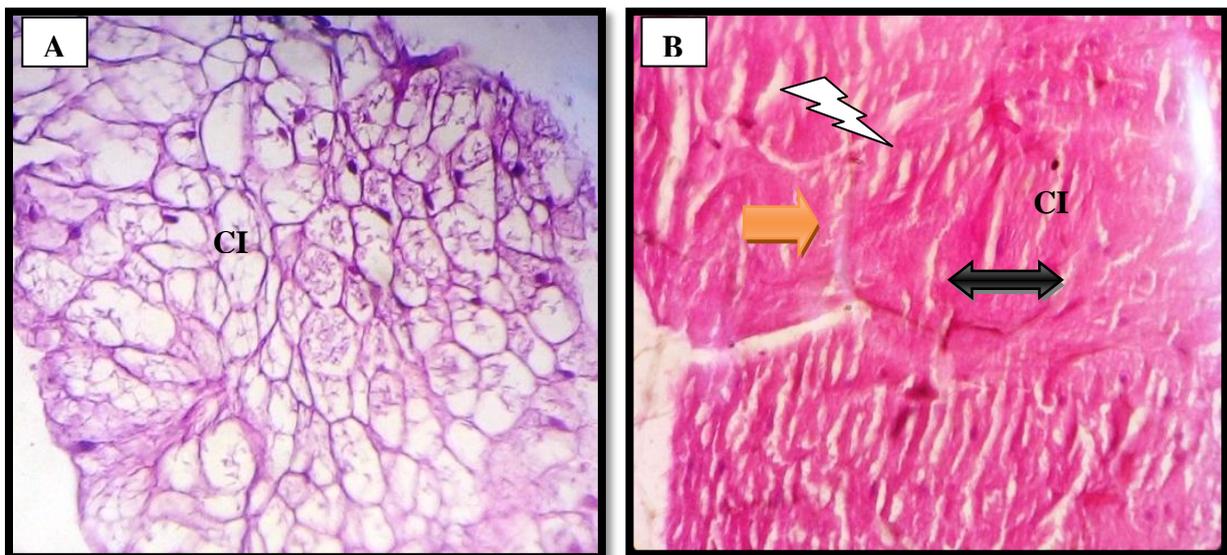


Planche 6 : Observation au microscope optique de coupes histologiques sagittales des vers de terre témoins (A), et des vers après 14 jours de traitement aux mixtures de cadmium et de zinc (M3) (B) (Coloration : Hemalun éosine ; Gr : X 400).

CI : Cellules Intestinales ;  Nécrose ;  Caryorrhexis (lyse du noyau) ;
 Limite cytoplasmique imprécise

NB : Le traitement des vers de terre par le cadmium pendant 7 jours a révélé une présence des lésions focales, pas très évidente comme les plages de nécroses observées après 14 jours de traitement.

Le traitement par le zinc était sans particularités.

4. Discussion

L'exposition aux métaux lourds peut causer des altérations cytologiques et ultra structurales très importantes au niveau des tissus des invertébrés (Frías et *al.*, 2008). Ces altérations peuvent être considérées en tant que bio-marqueurs d'exposition aux métaux (Amaral et *al.*, 2004 ; Goven et *al.*, 2005).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence des altérations cellulaires ainsi qu'une lyse du disséminé, des altérations histopathologiques du tissu chloragène et de l'épithélium intestinal, caryorrhexis (lyse du noyau), des infiltrats inflammatoires (éosinophilie), des limites cytoplasmiques imprécises et la présence de particules sphériques, probablement des particules métalliques chez les vers de terre exposés au cadmium ainsi que chez les vers traités par les mixtures.

Selon Yager et Harry (1963), les ETM détériorent la dynamique des cellules et endommagent leurs membranes. De ce fait, l'échange intercellulaire et la fluidité sont perturbés. En conséquence, la diffusion des ETM augmente dans les cellules causant ainsi des lésions cellulaires.

Selon une étude menée par Kambale et Potdar (2011) sur l'escargot d'eau douce *Bellamy Abengalensis*, les métaux s'accumulent sous forme de granules dans les néphrocytes par l'intermédiaire des protéines de liaison. Ce phénomène est observé chez plusieurs espèces telles que les bivalves *Mercenaria mercenaria* et *Mytilus edulis* exposées à un stress métallique (Regoli et *al.*, 1992). Le ver de terre *E. fetida* accumule du cadmium dans ses tissus de manière dose-dépendante pendant des temps d'exposition courts (Van Gestel et *al.*, 1993, Scaps et *al.*, 1997, Spurgeon et Hopkin ; 1999, Lanno et *al.*, 2004). En revanche, il a été suggéré que, lors de longues périodes d'exposition ou de fortes concentrations d'exposition, certains mécanismes de régulation peuvent être en contradiction avec la bioaccumulation (Yang et *al.*, 2012b). Néanmoins, l'accumulation de Cd chez *E. fetida* est nettement observée, à court et à long terme, avec une concentration de l'ordre de 2-5 mg Cd / kg de poids sec du sol (Asensio et *al.*, 2007 ; Brulle et *al.*, 2011), ce qui est en accord avec les résultats actuels où nous avons probablement détecté la présence des particules métalliques.

Plusieurs études ont rapporté des altérations histopathologiques chez les vers de terre après exposition à des polluants (Morawati, 2000 ; Muthukaruppan et *al.*, 2005, Amaral et *al.*, 2006 ; Reddy et Rao ; 2008). Le tube digestif des vers de terre se compose d'épithélium

intestinal, de tissu chloragogène et de muscle. Le tissu chloragogène, composé de chloragocytes, est situé entre l'épithélium intestinal et le cœlome et constitue un site principal d'accumulation et d'élimination des métaux (Cancio et *al.*, 1995 ; Morgan et *al.*, 2002 ; Giovanetti et *al.*, 2010). Les métaux peuvent également s'accumuler dans l'épithélium intestinal des vers de terre (Morgan et *al.*, 2002), qui subissent des altérations morphologiques remarquables à la suite d'une agression aux métaux (Amaral et *al.*, 2006 ; Lourenço et *al.*, 2011). Par conséquent, les altérations histopathologiques de l'épithélium intestinal et du tissu chloragogène chez les vers de terre sont des indicateurs précieux de la toxicité des polluants (Amaral et *al.*, 2006 ; Giovanetti et *al.*, 2010 ; Kiliç, 2011 ; Lourenço et *al.*, 2011). L'exposition aux polluants du sol entraîne une perte de l'intégrité structurale, une nécrose du tissu chloragogène et une atrophie de l'épithélium intestinal accompagnée d'une fusion des villosités, d'une sécrétion accrue de mucus et d'une désorganisation des muscles circulaires et longitudinaux associés (Amaral et *al.*, 2006 ; Kiliç, 2011 ; Lourenço et *al.*, 2011). De plus, les polluants peuvent causer des dommages à l'ADN (Di Marzio et *al.*, 2005 ; Fourie et *al.*, 2007, Sforzini et *al.*, 2011) et / ou une altération du cycle cellulaire (Bjerrengaard, 2007) .

L'amincissement de l'épithélium intestinal chez les vers de terre a été proposé comme bio marqueur du stress général dans les sols pollués, car une épaisseur réduite de l'épithélium intestinal était corrélée aux charges corporelles de zinc chez *Lumbricus terrestris* habitant les zones volcaniques (Amaral et *al.*, 2006). De même, une perte de l'intégrité structurelle de l'épithélium intestinal accompagnée d'une sécrétion accrue de mucus et d'une lésion cellulaire ont également été rapportées chez *L. terrestris* (Kiliç, 2011). En revanche, nous n'avons noté aucune sécrétion accrue de mucus après une exposition de 14 jours au cadmium et aux mixtures dans la présente étude. Cette controverse pourrait être attribuée à des traits spécifiques d'espèces. Il est donc plausible que cet effet biologique ne soit évident qu'après une exposition prolongée ou chronique.

Une épaisseur radiale réduite du tissu chloragogène et des taux apoptotiques améliorés ont également été signalés chez *L. terrestris* habitant des sols naturellement pollués dans les zones volcaniques (Amaral et Rodrigues ; 2005 ; Amaral et *al.*, 2006). Une perte d'intégrité tissulaire et une nécrose ont été également signalées dans le tissu chloragène d'*E. Fetida* exposé à des sols pollués pendant 56 jours (Asensio, 2009). Une telle perte d'intégrité dans le tissu chloragogène a été comprise comme un mécanisme de défense contre la pollution par les métaux en éliminant les métaux dans les chloragocytes extrudés (Cancio et *al.*, 1995 ; Morgan

et *al.*, 2002). En effet, le tissu chloragène constitue le principal site d'accumulation et d'élimination des métaux chez les vers de terre (Morgan et *al.*, 2002, Giovanetti et *al.*, 2010).

Le cadmium induit à la fois la mort cellulaire programmée et la prolifération cellulaire dans les cellules des vertébrés et des invertébrés (Gupta et Sundaraman, 1988, Habeebu et *al.*, 1998, Chabicoovsky et *al.*, 2003, Zaldibar et *al.*, 2007). Il peut également altérer le cycle cellulaire en raison de sa génotoxicité due aux dommages oxydatifs et de son potentiel à inhiber les mécanismes de réparation de l'ADN (Hartwig et *al.*, 2002). Il semble que dans les conditions expérimentales actuelles, la génotoxicité altère la machinerie nécessaire à la division cellulaire. **En effet , la prolifération cellulaire et la génotoxicité dans la région de l'intestin constituent un défi de recherche passionnant visant à contribuer à la compréhension des réponses biologiques des vers de terre aux polluants et au développement et à l'application d'une stratégie basée sur les bio marqueurs.**

D'autre part, on sait que le cadmium est séquestré dans une sous-population de lysosomes (cadmosomes) des chloragocytes (Morgan et Morris ; 1982 ; Cancio et *al.*, 1995, Morgan et *al.*, 2004). De plus, le cadmium s'accumule dans les tissus des vers de terre, bien qu'une certaine métabolisation ait été rapportée à de longs temps d'exposition (Asensio et *al.*, 2007 ; Sandrini et *al.*, 2008 ; Yang et *al.*, 2012a).

L'espèce *Allolobophora caliginosa*, est munie d'une cuticule rigide, et connue comme une espèce très résistante aux facteurs environnementaux, ainsi dans une invention, ils ont utilisé un extrait de l'espèce *Allolobophora caliginosa*, mélangé à des compositions pharmaceutiques et cosmétiques. Cette formule à favoriser la régénération tissulaire et la cicatrisation des plaies chez les rats et l'homme (A).

En effet l'intestin est la région cible pour l'évaluation des changements tissulaires de la toxicité chez les vers de terre et l'évaluation des effets biologiques dans les sols pollués.

*Conclusion générale
et
perspectives*

Les vers de terre sont des organismes dont le rôle est primordial, non seulement dans l'environnement en général, mais également dans l'agriculture. Plusieurs espèces de vers de terre sont devenues des organismes modèles pour la recherche en écologie, toxicologie, physiologie ou encore en biologie reproductrice.

Très peu de travaux se sont penchés sur le devenir des mixtures des métaux et leurs effets sur les vers de terres dans notre région. Dans le cadre de ce travail, nous avons fixé comme objectif principal l'évaluation du potentiel toxique de deux métaux le cadmium et le zinc et leurs mixtures, sur les vers de terre *Allobophora caliginosa*. Pour cela, nous nous sommes basé sur plusieurs approches :

- une approche biologique dans laquelle nous avons évalué le pourcentage de mortalité, le taux de croissance et l'étude d'éventuelles perturbations des niveaux des protéines totales,

- une approche analytique, dans laquelle nous avons ciblé un certain nombre de biomarqueurs de la toxicité cellulaire tels : le taux du glutathion (GSH), le taux de malondialdéhyde (MDA), et les activités enzymatiques l'activité Glutathion-s-transférase (GST) et l'activité catalase (CAT).

- enfin, une approche histologique, pour mieux étayer nos résultats, car cet aspect rend compte sur les éventuelles altérations tissulaires et cellulaires chez les vers de terre traités par les métaux lourds.

Dans un premier temps, il ressort de nos résultats que les métaux n'ont aucun effet sur le pourcentage de mortalité. En revanche, aux plus fortes concentrations du cadmium, du zinc et des mixtures (M3 et M4), nous avons noté une diminution du taux de croissance. Cette perturbation du métabolisme global s'est manifestée notamment par l'augmentation du taux de protéines totales qui est lui-même révélateur d'une perturbation du métabolisme cellulaire en général. Concernant l'étude des biomarqueurs, nos résultats mettent en évidence une diminution du taux de GSH accompagné par une augmentation de l'activité GST, parallèlement à une induction de l'activité Catalase. Toutes ces enzymes jouent un rôle essentiel dans le processus de métabolisation/détoxication et leur induction témoigne de l'ampleur de la toxicité des xénobiotiques étudiés.

Sur un autre plan, l'augmentation du taux de MDA confirme la toxicité des métaux lourds et révèle un stress radicalaire à l'origine de la peroxydation lipidique. L'étude histologique vient ainsi confirmer la sensibilité des vers de terre *Allolobophora caliginosa* vis-à-vis des métaux lourds.

En conclusion, les résultats démontrent que les vers de terre *Allolobophora caliginosa* sont sensibles à la toxicité par les métaux. De même, il nous a été possible de mettre en évidence un important stress oxydatif traduit par une activation du système de détoxification (GSH, GST), une stimulation de l'activité enzymatique oxydative: la catalase. Cet effet s'accompagne aussi d'un accroissement des protéines totales et d'une peroxydation des lipides (MDA) ainsi que des altérations tissulaires sévères. Il apparaît aussi que les vers de terre *Allolobophora caliginosa* constituent un excellent modèle bio-indicateur de pollution et de l'état environnemental.

Au cours de ce travail de recherche, nous avons tenté par des approches expérimentales d'aborder la problématique des effets des mélanges de métaux lourds. Nous avons montré que certains mélanges de métaux à de fortes doses sont capables d'exercer des effets spécifiques chez le ver de terre *Allolobophora caliginosa*. Cependant, les résultats de ces études ne peuvent pas être généralisés à d'autres Annélides. D'autres études seront donc nécessaires pour confirmer les hypothèses soulevées au cours de ce travail.

Sur la base des résultats obtenus, de nombreuses perspectives pourraient être avancées afin d'ouvrir d'autres pistes de recherches futures. Il serait donc judicieux de :

- Effectuer une étude approfondie sur les mécanismes de défense anti-radicalaire par le dosage d'autres marqueurs du stress oxydatif tels que GPX, LDH et SOD.
- Déterminer l'impact du cadmium et du zinc et de leurs mixtures sur la reproduction, la survie et la croissance des juvéniles des vers de terre à long terme.
- Étendre les tests de toxicité classiques sur plusieurs générations, pour mettre en évidence l'expression de la toxicité des xénobiotiques sur plusieurs générations (multi-générationnelles) et mieux cerner les phénomènes de sensibilité ou d'adaptation de celles-ci.

- La mise au point d'un système de dosage des ROS (H_2O_2 par exemple) semble une bonne perspective afin de déterminer leurs implications potentielles dans les effets toxiques mesurés à d'autres niveaux d'organisation biologique.
- Réaliser des frottis du liquide cœlomique ou encore une étude ultra structurale des organes cibles des vers de terre.

Références
Bibliographiques

Ademe., 1996. La faune, indicateur de la qualité des sols. Direction scientifique- Service impacts & milieux.

Adriano D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag, New York.

Aït Hamlet S., Bensoltane S., Djekoun M., Berrebbah H., Djebbar M.R., 2013. Effets de deux insecticides sur la croissance pondérale de l'escargot terrestre *Helix aspersa*. Bulletin de la Société Zoologique de France.

Alayat A., Souiki L., Grara N., Djebbar M.R., Boumedris Z.E., Benosmane S., Amamra R., and Berrebbah H., 2014. Effects of Cadmium on Water Content, Soluble Protein, Proline Changes and Some Antioxidant Enzymes in Wheat (*Triticum durum* desf.) Leaves. Annual Research & Review in Biology. 4(24): 3835-3847.

Alloway B.J., 1990. "Cadmium", In: Alloway B.J Heavy Metals in soils. Blackie & Son, Glasgow. pp 100-121.

Amamra R., Djebbar M R., Moumeni O., Azzouz Z., Zeriri I., Atailia A., Benosmane S., Berrebbah H., 2015b. Lipid peroxidation, oxidative stress and respiratory metabolism alteration in the freshwater ciliate *Paramecium tetraurelia* exposed to cypermethrin, a pyrethroid insecticide. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 6 (4),115-123.

Amaral A., da Cunha H., Rodrigues A., 2004. The connective tissue index of *Helix aspersa* as a metal biomarker. BioMetals 17: 625–629.

Amaral A., Soto M., Cunha R., Marigómez I., Rodrigues A., 2006. Bioavailability and cellular effects of metals on *Lumbricus terrestris* inhabiting volcanic soils. Environ. Pollut. 142, 103–108

Amaral A.F., Rodrigues A., 2005. Metal accumulation and apoptosis in the alimentary canal of *Lumbricus terrestris* as a metal biomarker. Biometals 18, 199–206.

Andersen, C., Laursen, J., 1982. Distribution of heavy metals in *Lumbricus terrestris*,

Aporrectodea longa and A. Rosea measured by atomic absorption and X-ray fluorescence spectrometry. *Pedobiologia*, 24: 347-356.

Andrews G. K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions". *Biochem Pharmacol.*, vol. 59, no 1, p. 95-104.

Asensio V., Kille P., Morgan A.J., Soto M., Marigomez I., 2007. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. *Eur. J. Soil Biol.* 43, 233–238.

Atailia A., Berrebbah H., Boucenna M., Alayat A., Amamra R., Grara N., and Djebbar M.R., 2016. Biomarkers Responses of Land Snails *Helix aspersa* Exposed to Chronic Metal Pollution under Field and Laboratory Conditions. *Nature Environment and Pollution Technology.* 15, 1209-1215.

Atkin MA., Gasper A., Ullegaddi R., 2005. Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma : response to antioxidants in vitro and to antioxidants supplementation. *Clin Chem*, 51, 2138-2144.

Aviram M., Fuhrman B., 2002. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 957, 146–161.

Babich H., Stotzky G., 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms, *Crit. Rev. Microbiol.* 8, 99-145.

Baize D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions, Paris, p 408.

Baize D., Tercé M., 2002. Les éléments traces métalliques dans les sols. Approches fonctionnelles et spatiales. Paris, INRA Editions.

Baker, A.J.M. and Walker, P.L. 1989. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: *Heavy metal tolerance in plants - Evolutionary aspects.* Shaw, A. (Eds). CRC Press,

155-177.

Baudrimont M., Andres S., Metivaud J., Lapaquellerie Y., Ribeyre F., Maillet N., Latouche C., Boudou A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France) - Part II: Metallothionein response to metal exposure: a field illustration of the metal spillover theory, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2472-2477.

Beaudeau J.-L., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A., Peynet J., 2006. Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. Oxidative stress in the atherosclerotic process. *Immuno-analyse et Biologiespécialisée*, 21, 144-150.

Belabed S., 2018. Contribution à l'Etude de la Pollution Métallique du Sol et de la Végétation au Niveau des Décharges publiques non Contrôlées à Mostaganem. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. 173p.

Bengtsson G., Gunnarsson T., Rundgren S., 1983. "Growth changes caused by metal uptake in a population of *Onychiurus armatus* (Collembola) feeding on metal polluted fungi." *OIKOS* 40:216- 225.

Bengtsson G., Nordstrom S., Rundgren S., 1983. "Population density and tissue metal concentration of Lumbricids in forest soils near a brass mill". *EnvironPoli.* , vol. 30, p. 87-108.

Bengtsson G., Ek H., Rudgren S., 1992. Evolutionary response of earthworms to long term metal exposure. *Oikos*, vol. 63, p. 289-297.

Bernard F., Brulle F., Douay F., Lemiere S., Demuynck S., Vanden-bulcke F., 2010. Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in *Eisenia fetida*, using an "exposure/depuration" experimental scheme with field soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5): 1034–1045.

Bhat K.P., Pezzuto J.M., 2002. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann. N.*

Y. Acad. Sci, 957, 210–29.

Bierkens J., Klein G., Corbisier P., Van Den Heuvel R., Verschaeve L., Weltens R., Schoeters G., 1998. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere* 37, 2935-2947.

Biney A.T., et Amuzou A.T., 1994. Revue de la pollution dans l'environnement aquatique africain. F.A.O. Document technique du C.P.C.A., N° 25, 37-67.

Bjerregaard H., 2007. Effects of cadmium on differentiation and cell cycle progression in cultured *Xenopus* kidney distal epithelial (A6) cells. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 35, 343–348.

Bonnard M., Eom I.-C., Morel J.-L., Vasseur P., 2009. Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia Fetida*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50, 60-67.

Booth, L. H., V. J. Heppelthwaite., K. O'Halloran., 2000. "Growth, Development and Fecundity of the earthworms *Aporrectodea caliginosa* after Exposure to two Organophosphates". *New Zealand Plant Protection*, vol. 53, p. 221-225.

Bors W., Heller W., Michel C., Satan M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging-efficiencies. *Methods Enzymol*, 186, 343–355.

Bostrom U., Lofs A., 1996. Annual population dynamics of earthworms and cocoon production by *Aporrectodea caliginosa* in a meadow fescue ley. *Pedobiologia* 40, 32-42.

Bouché M.B., 1972. Lombriciens de France. Ecologie et Systématique. *Ann. Zool. Ecol. Anima. Horssér.*, 671 pp.

Bourelrier PH., Berthelin J., 1998. Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. In : Tec Doc Lavoisier, Paris, 440 p.

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.

Brillant E., Bérubé V., Ndayibagira A., Trottier B., Robidoux p.y., 1993. Effects of cadmium-spiked sandy soil on earthworm *Eisenia andrei* reproduction and metallothionein-like protein accumulation. *Chemosphere*.

Brulle F., Mitta G., Leroux R., Lemièrre S., Leprêtre A., Vandebulcke F., 2007. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: a trade-off mechanism? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 144(4):334-41.

Broerse M., Oorsprong H., Van Gestel C., 2012. Cadmium affects toxicokinetics of pyrene in the collembolan *Folsomia candida*. *Ecotoxicology*, 21, 795–802.

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

Brown R.J., Galloway T.S., Lowe D., Browne M.A., Dissanayake A., Jones M.B., Depledge M.H., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquat. Toxicol*, 66, 267–278.

Brulle F., Lemièrre S., Waterlot C., Douay F., Vandebulcke F., 2011. Science of the total environment gene expression analysis of 4 biomarker candidates in *Eisenia fetida* exposed to an environmental metallic trace elements gradient: a microcosm study. *Sci. Total Environ*. 409, 5470–5482.

Cancio I., Gwynn A.P., Ireland M.P., Cajaraville M.P., 1995. Lysosomal origin of the chloragosomes in the chloragogenous tissue of the earthworm *Eisenia foetida*: cytochemical demonstration of acid phosphatase activity. *J. Histochem*. 27, 591–596.

Capowiez Y., Rault M., Mazzia C., Belzunces L., 2003. Earthworm behaviour as a biomarker a case study using imidacloprid. *Pedobiologia*, 47, 542-547.

Carrillo-Gonzalez R., Simunek J., Sauve S., et Adriano D. C., 2006. Mechanisms and Pathways of Trace Element Mobility in Soils. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy*. San Diego: Academic Press. (Vol. 91, pp. 111-178).

Centre D'expertise En Analyse Environnementale Du Québec., 2003. Détermination de la toxicité létale chez le ver de terre (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*) MA. 500 – VTL 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, 25 p.

CEPA (Canadian Environmental Protection Act), 1994. Priority Substances List. Assessment report. Cadmium and its compounds." Government of Canada - Environment Canada and Health Canada.

Champeau O., 2005. Biomarqueurs d'effets chez *C. fluminea* : du développement en laboratoire à l'application en mesocosme. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux 1. France, 281 p.

Citeau L., Lamy I., Elsass F., Van Oort F., 2003. Colloidal facilitated transfer of metals in soils under different land use. *Colloids and Surfaces A*, 217, 11-19.

Coeurdassier, M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Ribera D., Badot PM., 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase activity. *Environ Toxicol Chem.* 20(9):1951-7.

Cooke, A. S., P. W. Greig-Smith., S. A. Jones., 1992. Consequences for vertebrate wildlife of toxic residues in earthworm prey. In *Ecotoxicology of earthworm*, Amdover (UK): Intercept. P. 109-115

D'Adamo R., Di Stasio M., Fabbrochini A., 2008. Migratory crustaceans as biomonitors of metal pollution in their nursery areas. The Lesina lagoon (SE Italy) as a case study.

Environmental monitoring and assessment 143, 15-24.

Dajoz, R., 1985. Précis d'écologie, Ed. Gauthier-Villard. Paris, 560p.

Dallinger R., 1994. "Invertebrate organisms as biological indicators of heavy metals pollution". Appl. Biochem. Biotechnol., vol. 14, no. 2, p. 27-31.

Dallinger R., Prosi F., Segner H., Back H., 1987. Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. Oecologia, 73: 91-98.

Das P., Samantaray S., Rout R., 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. Environ Pollut, 98: 29-36.

De Oliveira T., 2012. Dynamique des communautés lombriciennes dans les parcelles conduites en Agriculture Biologique. Modélisation de la dynamique des populations d'*Aporrectodea caliginosa*. Biologie animale. AgroParisTech. Français.

Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D., 2005. Eds. Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques. 1ère édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 547 pages.

Demuyneck S., Grumiaux F., Mottier V., Schilkorski D., Lemièrre S., Leprêtre A., 2006. Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete *Eisenia fetida*. Comp. Biochem. Physiol. C, vol. 144, p. 34-36.

Den Besten P.J., Postma J.F., de Valk S., Dubbeldam M., Everaarts J.M., 2001. Environmental monitoring in the North Sea by combining biomarkers studies in the sea stars *Asterias rubens* with sediment quality assessment based on sea urchin bioassays. Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach, Garrigues Ph., Barth H., Walker CH, Narbonne J.F., editors (Amsterdam; New York: Elsevier Science), 279–330.

Derome J., Nieminen T., 1998. Metal and macronutrient fluxes in heavy-metal, 241.

Di Marzio W.D., Saenz M.E., Lemièrè S., Vasseur P., 2005. Improved single cell gel electrophoresis assay for detecting DNA damage in *Eisenia foetida*. Environ. Mol. Mutagen. 46, 246–252.

Draper H., Hadley M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods in Enzymology, 186, 241-431.

EDF., 1995. Nucleaire et environnement. Guide pratique pour le contrôle des effluents et de l'environnement. DSRE (Eds).128 p.

Edwards C. A., Bohlen P. J., 1992. "The effects of toxic chemicals on earthworms". Rev. Environ. Contam. Toxicol., vol. 125, p. 23-100.

Edwards C.A., Bohlen., P.J., 1996. Biology and Ecology of Earthworms.3rd ed. Chapman and Hall, Loondon, 426 pp.

Efroymsen R. A., Will M. E., Suter G. W. II., 1997. "Toxicological benchmarks for contaminants of potential concern for effects on soil and litter invertebrates and heterotrophic process". Rapport Es/ErfTm-126/R2. Oakridge National Laboratory, Oakridge, Tennessee, USA

Eijsackers, H., 2011. Earthworm as colonizers of natural and cultivated soil environments. Appl. Soil Ecol. 50, 1e13.

El Shenawy N S.; Mohammadden A., Al Fahmie Z H., 2012. Using the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system of the land snail *Eobania vermiculata* as biomarkers of terrestrial heavy metal pollution. Ecotoxicology and Environmental Safety 84, 347–354.

Evans A.C.G., Mcl W.J., 1948a. Studies on the relationships between earthworms and fertility, chapter IV. On the life cycles of some british lumbricidae. Applied Biology 35, 471 - 484.

Favier A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique, 108–115.

Fernandez C., Labanowski J., Cambier P., Jongmeans A. G., Van Oort, F. 2007. Fate of airborne metal pollution in soils as related to agricultural management.1. Zn and Pb distributions in soil profiles. European Journal of Soil Science, 58, 547-559.

Ferradini C., 1986. Espèces activées radicalaires de l'oxygène. Biochimie, 68, 779-785.

Fourie F., Reinecke S.A., Reinecke A.J., 2007. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. Ecotoxicol. Environ. Saf. 67, 361–368.

Franklin R.E., Duis L., Brown R., Kemp T., 2005. Trace element content of selected fertilizers and micronutrient source materials. Communications in Soil Science and Plant Analysis 36, 1591-1609.

Frías E, Abad R., Aidée C., NevárezV., Isidro L., Páez O., Lozan O., Domenico V., 2008. Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. Aquatic Toxicology .89 ,152–157.

Furst A., 2002. "My saga with earthworms". Food and chemical toxicology, vol. 40, p. 789-791.

Gabr W.M., Fatma K.K., Hussien S.S., 2007. Molluscicidal activity of some pesticides against glassy clover *Monacha obstructa*. Egypt. J. Agric. Res. 8566, 2017–2025.

Gérard Miquel., 2001. Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé, office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques; 365P8

Gilbert D. L., 1997. Oxygen and living processes. Springer-Verlaged, New York, 73–102.

Giovanetti A., Fesenko S., Cozzella M.L., Asencio L.D., Sanstone U., 2010. Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium. J. Environ. Radioact. 101, 509–516.

Godin P. M., Feinberg M.H., Ducauze C.J., 1985. Modelling of soil contamination by airborne lead and cadmium around several emission sources. Environ. pollut. 10, 97- 114.

Goven A.J., Venables B.J., Fitzpatrick L.C., 2005. Earthworms as Ecosentinel for Chemical-Induced Immunotoxicity. Investigative Immunotoxicology: Edited by Tryphonas H., Fourier M., Blakley B.R., Smits J.E.G. and Brousseau P. 7, 106-119.

Grara N., Boucenna M., Atailia A., Berrebbah H., and Djebbar M.R., 2011. Stress oxydatif des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-Est algérien) chez l'escargot *Helix aspersa*. Environ Risque Sante – Vol. 11, n8 3.

Greig-Smith P.W., Becker H., Edwards P.J. 1992. Heimbach F. Ecotoxicology of Earthworms, Intercept Ltd., 269 p.

Greig-Smith P.W., Becker H., Edwards P.J., Heimbach F., 1992. Ecotoxicology of Earthworms, Intercept Ltd., 269 p.

Grelle C., 1998. Impact des métaux lourds sur les peuplements de macro-invertébrés de la faune du sol - Influence du cadmium et du plomb sur différents aspects de la physiologie de deux modèles biologiques : *Lithobius forficatus* (Myriapode Chilopode) et *Eisenia fetida* (Annélide Oligochète) These de doctorat, Université Des Sciences Et Technologies De Lille Ufr de Biologie.181 9-20

Gueye P M., 2007. Phénotypes majeurs de l’haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l’hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge, Doctorat de l’Université Louis Pasteur, STRASBOURG I. P252.

Gupta V.K., Verma A.K., 2011. (Eds.), Perspectives in animal ecology and reproduction. Daya Publishing House, New Delhi, 4, 307-327.

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B., 1974. Glutathione S-transferases : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological chemistry*, 249, 7130-7139.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P., 2007. Le stress oxydant *Rev Med Liege*; 62 : 10 : 628-638.

Halliwell B., Gutteridge J M C., 1999. Glutathione in Metabolism In: Halliwell B, Gutteridge JM C (Eds). *In free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press. Oxford. UK. 146-150.

Hare J., 2004. Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 351, 2112-2114.

Harman D., 2002. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Science of Aging Knowledge Environment*, 37, 14.

Hartwig A., Asmuss M., Ehleben I., Herzer U., Kostelac D., Pelzer A., Schwerdtle T., Bürkle A., 2002. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ. Health Perspect.* 110 (Suppl. 5), 797–799.

Hopkin, S.P., 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier, Applied science, NY, USA, 366 p.

Hozawa A., Jacobs D., Steffes M., 2007. Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction : the Coronary Artery Risk Developpement in Young Adults (CARDIA)/ Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) Study. *Clin Chem*, 53, 1-9.

Human D., 2002. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Science of Aging Knowledge Environment*, 37, 14.

Huang C. P., Rhoads A. 1989. The Adsorption of Zn(II) onto Hydrous Aluminosilicates. J. Colloid Interface Sci, 131(3), 289-306.

Huynh T.M.D., 2009. Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ver de terre/microflore tellurique. Thèse de doctorat. Université Paris est. 169-170: 4,7.

Ireland M. P., 1975. "Distribution of lead, Zinc and calcium in *Dendrobaena rubida* (oligochaete) living in soil contaminated by base metal mining in Wales". Comp. Biochem. Physiol. B., vol. 52, p. 551-555.

Ireland M. P., 1978. "Heavy metal binding properties of earthworm chloragosomes". Acta. Biol. Acad. Sei. Hung., vol. 29, no. 4, p. 385-395.

Ireland M. P., 1983. "Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworm". In: Earthworm ecology from Darwin to vermiculter. J. E. Satchell (eds). London (UK): Chapman and Hall. p. 247-265.

Ireland M.P., Richard K.S., 1981. Metal content, after exposure to cadmium of two species of earthworms of known differing calcium metabolic activity. Environ. Pollut. 26A: 69- 78.

Jackson AP., Alloway BJ., 1992. "The transfer of Cadmium from agricultural soils to the human food chain", In: Adriano DC, Biogeochemistry of trace metals, Lewis Publishers.

Jaradat Q. M., Massadeh A. M., M.A., Z., Maitah B. M. 2006. Fractionation and sequential extraction of heavy metals in the soil of scrapyard of discarded vehicles. Environmental Monitoring and Assessment, 112, 197-210.

Jensen K.S., Holmstrup M., 1997. Estimation of earthworm cocoon development time and its use in studies of in situ reproduction rates. Applied Soil Ecology 7, 73-82.

Jouanneau JM., Boutier B., Chiffolleau JF., Latouche C., Philips I., 1990. Cadmium in the Gironde fluvioestuarine system: behavior and flow. Sci Tot Environ, 98: 465-479.

Jumarie C., Fortin C., Houde M., Campbell PGC., Denizeau F., 2001. Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of complexation by chloride, glutathione and phytochelatins. *Toxicol Appl Pharmacol*, 170 : 29-38.

Kabata-Pendias A., Pendias H., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press, London.

Kabata- Pendias A., Mukherjee AB., 2007. Trace elements from Soil to Human. Berlin : Springer- Verlag.

Loué, A. 1993. Oligo-éléments en agriculture. Ed. Nathan (ed), 45-177.

Kagi JHR., 1991. Overview of Metallothionien. In: Abelson JN et Simon MI *Methods in enzymology*, Academic Press, Inc., San Diego, pp 613-626.

Kaiser J., 2001. Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment (Enfield: Sciences publishers inc.).

Kambale N., et Potdar V., 2011. Metallic Concretions In The Nephrocytes Of fresh water Snail *Bellamya Bengalensis*. *Bionano Frontier* , Vol. 4 (2).

Key P.B., Wirth E.F., Fulton M.H., 2006. A review of grass shrimp, *Palaemonetes* spp., as a bioindicator of anthropogenic impacts. *Environ. Bioindic*, 1, 115–128.

Khalil M. A., Abdel-Lateif H. M., Bayoumi B. M., Van Straalen N. M., Van Gestel. C. A. M., 1996. Effects of metals and metal mixtures on survival and cocoon production of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Pedobiologia* 40:548-556.

Killiç G.A., 2011. Histopathological and biochemical alterations of the earthworm (*Lumbricus terrestris*) as biomarker of soil pollution along Porsuk River Basin (Turkey). *Chemosphere* 83, 1175–1180.

Kirkham M. B., 2006. Cadmium in plants on polluted soils: Effect of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, 137, 19-32.

Klaassen C. D., 1995. Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 5th edition. New York: McGraw-Hill. 912p.

Klaassen C. D., Liu J., Choudhuri S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 39, p. 267-294.

Krinsky N.I., 1989. Antioxydants function of carotenoides. *Free Radic. Biol. Med*, 7 (6), 617–635.

Kwang Wook An., Hyun Suk Shin., Cheol Young Choi., 2008. Physiological responses and expression of metallothionein (MT) and superoxide dismutase (SOD) mRNAs in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to benzo[a]pyrene. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, vol 149(3), p: 534-539.

Labrot F., Ribera D., Saint-Denis M., et Narbonne J.F., 1996. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*. Vol 1, 21-28.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., 1997. Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement. In : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F.(Eds.). *Biomarqueurs en écotoxicologie – aspects fondamentaux*. Masson, Londres, Paris, New York, pp 393–401.

Lam P.S.K., Gray J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 182-186.

Langsjoen PH., Langsjoen AM., 2003. The clinical use of HMG CoA – reductase inhibitors and the associated depletion of coenzyme Q10 - A review of animal and human publications. *Biofactors*, 18, 101-111.

Lanno R., Wells J., Conder J., Bradham K., Basta N., 2004. "The bioavailability of chemicals in soil for earthworms". *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 57, no. 1, p. 39-47.

Lapaquellerie Y., Jouanneau JM., Maillet N., Latouche C., 1995. Cadmium pollution in sediments of the Lot River France, estimate of the mass of cadmium. *Environ Technol*,16: 1145-1154.

Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001. Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.*, 30, 1076-1081.

Lentzsch P., Gollmack J., 2006. Genetic diversity of *Aporrectodea caliginosa* from agricultural sites in Northeast Brandenburg, Germany. *Pedobiologia* 50, 369-376.

Li Y., Zhou Q., Li F., Liu X., Luo Y., 2008. Effects of tetrabromobisphenol A as an emerging pollutant on wheat (*Triticum aestivum*) at biochemical levels. *Chemosphere*, 74, 119–124.

Li X., Thornton L., 2001. Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Appl. Geochem.*, 16, 1693-1706.

Lock K., Janssen C. R. 2001 a. "Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting bioavailability into account". *Ecotoxicology*, vol. 10, p. 315-322.

Lock K., Janssen C. R., 2001b. "Effects of clay and organic matter type on the ecotoxicity of Zinc and Cadmium to the potworm *Enchytraeus albidus*". *Chemosphere*, vol. 44, p. 1669-1672.

Lokke, H., Van Gestel C.A.M., 1998. Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests, John Wiley & Sons, 281 p.

Lourenço J., Silva A., Carvalho F., Oliveira J., Malta M., Mendo S., Gonçalves F.,

Pereira R., 2011. Histopathological changes in the earthworm *Eisenia andrei* associated with the exposure to metals and radionuclides. *Chemosphere* 85, 1630–1634.

Ma W.C., 1982. The influence of soil properties and worm related factor on the concentration of heavy metals in earthworms. *Pedobiologia* 30: 109-119.

Manceau A., Schlegel M. L., Musso M., Sole V. A., Gauthier C., Petit P. E., et al. 2000. Crystal chemistry of trace elements in natural and synthetic goethite. *Geochim.Cosmochim.Acta*, 64, 3643-3661.

Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister, H.G., 2003. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. *Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications*, B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors. (Oxford : Elsevier Science Limited), pp. 3-39.

Markich S.J., Jeffree A.R., 1994. Absorption of divalent trace metals as analogues of calcium by Australian freshwater bivalves: an explanation of how water hardness reduces metal toxicity. *Aquat Toxicol*, 29 : 257-290.

Mazantseva G.P., 1982. Growth-patterns in the earthworm *Nicodrilus-caliginosus* (Oligochaeta, Lumbricidae) during the 1st year of life. *Pedobiologia* 23, 272-276.

McBride M. B. 1994. *Environmental Chemistry of Soils*. New York: Oxford University Press.

Michel C., 2012. Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissena polymorpha* : indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN, Université Pierre et Marie Curie Paris VI , P192.

Michelson A. M., 1982. Oxygen radicals. Agents. Actions. *Suppl. Microtomist's Vade-Mecum* (Bolles-Lee). London, XII e ed, 11, 179-201.

Mofredj A., Cadranel J.F., Darchy B., Barbare J.C., Cazier A., Pras V., M. Biour.,

1999. Hepatotoxicity caused by Therapeutic doses of paracetamol in alcoholics. Report of 2 cases of fatal hepatitis in cirrhosis. *Annales Medecine Interne*, vol 150, p: 507-511.

Morel FMM., 1983. Principles of aquatic chemistry. Wiley-Interscience, New-York. 301p

Morgan A J., Morgan J E., Turner M., Winters C., Yarwood A., 1993. Metal relationship of earthworms. In: *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. ed Dallinger R, Rainbow PS. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl, USA, 333–358.

Morgan A. J., Morris B., 1982. The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochemistry*, vol. 75, p. 269-285.

Morgan A. J., Stürzenbaum S. R., Winters C., Kille P., 1999. "Cellular and molecular aspects of metal sequestration and toxicity in earthworms". *Invertebrate reproduction and development*, vol. 36, no. 1-3, p. 17-24.

Morgan A.J., Turner M.P., Morgan J.E., 2002. Morphological plasticity in metal sequestering earthworm chloragocytes: morphometric electron microscopy provides a biomarker of exposure in field populations. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 610–618.

Morgan J E., Morgan A J., 1990. The distribution of cadmium, copper, lead, zinc and calcium in the tissue of the earthworm *Lumbricus rubellus* sampled from one uncontaminated soil and four polluted soils. *Oecologia*, vol. 84, p. 559--566.

Morgan J E., Norey C G., Morgan A J., Kay J., 1989. A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworm *Demodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92, 15-21.

Morgan J. E., Morgan A. J., 1988. "Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils". *Environ. Pol/.*, vol. 54, p. 123-138.

Morgan J.E., Morgan A.J., 1999. The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn, and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): Implications for ecotoxicological testing. *Appl. Soil Ecol.* 13, 9–20.

Morowati M., 2000. Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm *Pheretima elongata* exposed to a field dose of the herbicide glyphosate. *Environmentalist* 20, 105–111.

Moumeni O., Berrebbah H., Azzouz Z., Amamra R., Otmani H., Alayat A., Benosmane S., Djebar M.R., 2016. Effects of Cycloxydim on Population Growth, Phagocytosis, Contractile Vacuole Activity and Antioxidant Responses in the Freshwater Ciliate (*Paramecium tetraurelia*). *Res. J. Environ. Toxicol.*, vol 10 (2): 115-125.

Munger C., Hare L., 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): implication for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ Sci Technol*, 31 : 891-895.

Muthukaruppan G., Janardhanan S., Vijayalakshmi G., 2005. Sublethal toxicity of the herbicide butachlor on the earthworm *Perionyx sansibaricus* and its histological changes. *J. Soils Sediment.* 82–86

Nahmani J., Lavelle P., 2002. Effects of heavy metal pollution on soil macrofauna in grassland of Northern France. *Eurasian Journal of Soil Biology*, 38(3-4), 297-300.

Nair G.A., Bennour S.A., 1998. Cocoons and hatchlings of *Aporrectodea caliginosa* (Savigny 1826) (Oligochaeta : Lumbricidae) in Benghazi, Libya. *Journal of Arid Environments* 40, 459-466.

Nair G.A., Premkumar K., 2007. Ecology and breeding biology of the earthworm *Allolobophora (=Aporrectodea) caliginosa trapezoides* (Savigny, 1826) (Oligochaeta: Lumbricidae) in Libya.

Nakajima K., Nakano T., Tanaka A., 2006. The oxidative modification hypothesis of

ather osclerosis : The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. Clin Chim Acta, 367, 36-47.

National Academy of Sciences (NAS) 1997. Committee on Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants: *Platinum-group Metals* (Washington, DC).

Nemery, B., 1990. Metal toxicity and the respiratory tract, *European Respiratory Journal*, vol. 3, n° 3, pp. 202-211.

Neuhauser E.F., Malecki M.R., Loehr. R.C., 1984. "Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to sublethal concentrations of metals." *Pedobiologia* 27:89-97.

Nguyen Q., Furst A., 1998. "Acute toxicity of cadmium and zinc in the earthworm (*Lumbricus terrestris*)". *Biol. Trace. Element. Research.*, vol. 18, p. 81-83.

Nieboer E., Richardson D.H.S., 1980. The replacement of the nondescript term « heavy metal » by a biologically & chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. IB*: 3-26.

Nordstrom S., 1975. Seasonal activity of lumbricids in southern Sweden. *Oikos* 26, 307-315.

Organisation mondiale de la santé (OMS), 1991. *Cadmium*, Environmental Health Criteria No. 108 (Genève).

Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), 1994: *Cadmium*, Risk Reduction Monograph No. 5 (Paris).

Padmaja R.J., Rao M.B., 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail, *Bellamya dissimilis* (Muller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 142-148.

Pannetier R., 1980. Vade-Mecum du technicien nucléaire Tome II, 2nd Ed. SCF du Bastet, Massy, France.

Peakall D. B., 1994. Biomarkers, the way forward in environmental assessment. Toxicol. Ecotoxicol. News., vol. 1, p. 55-60.

Pearson R. G.,1963. Acids and bases. Science, 191: 172-1 77.

Peijnenburg W. J. G. M., Baerselman R., Groot A. C., Jager T., Posthuma L., Van Veen R P. M., 1999. "Relating environmental availability to bioavailability: Soil-type-dependent metal accumulation in the Oligochaete *Eisenia andrei*". Ecotoxicology and Environmental Safety vol. 44, p. 294-310.

Pelletier B., Boles M., Lynch W., 2004. Change in healthrisks and work productivity over time. J Occup Environ Med, 46, 746-754

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Nutr. Clin. Métabol, 16, 233–239.

Piron D., 2008. Distribution de la drilosphère lombricienne et caractérisation bio-physique des faciès de bioturbation sous gradient de désintensification du travail mécanique des sols, thèse de doctorat, université de Rennes 1.

Postma J. F., Mol S., Larsen H., Admiraal W., 1995. "Life cycle changes and zinc shortage in cadmium-tolerant midges, *Chironomus riparius* (Diptera), reared in the absence of cadmium". Environ. Toxicol. Chem., vol. 14, no. 1, p. 117- 122.

Radwan M A., El Gendy K S., Gad A F.; 2010b. Oxidative Stress Biomarkers in the digestive Gland of *Theba pisana* exposed to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58, 828–835.

Radwan M.A., Essawy A.E., Abdelmeguid N.E., Hamed S.S., Ahmed, A.E., 2008. Biochemical and histochemical studies on the digestive gland of *Eobania vermiculata*

snails treated with carbamate pesticides. *Pest. Biochem. Phys.* 90, 154–167.

Ramade, F., 1984. *Elément d'écologie-Ecologie fondamentale*, Ed. MCGRAW, Paris, vol 2, 397p.

Ramade F., 1992. *Précis d'écotoxicologie. Collection d'écologie 22.* Ed. Masson, Paris, Milan, Barcelone, Bonn 300pp.

Ramade F., 1993. *Dictionnaire encyclopedique de l'écologie et des sciences de l'environnement.* Ediscience international, Paris 822pp.

Reddy N.C., Rao J.V., 2008. Biological response of earthworm *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 574–582.

Regoli F., Nigro M. and Orlando E., 1992. Effects of copper and cadmium on the presence of renal concretions in the bivalve *Donacilla cornea*. *Comp Biochem Physiol.* 102C, 189-192.

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

Reinecke A.J., Visser F.A., 1981. Number and size of hatchlings from cocoons of the earthworm species *Eisenia-rosea* and *Allolobophora-trapezoides* (OLIGOCHAETA). *Revue D Ecologie Et De Biologie Du Sol* 18, 473-485.

Remon E., 2006. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Université Jean Monnet, Saint Etienne.

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

Ribera D., Saint-Denis M., 1999. "Le ver *Eisenia fetida* : Intérêts et perspectives en écotoxicologie terrestre". *Écotoxicologie*, vol. 124, no. 4, p. 411-420.

Robert M., Juste C., 1999. Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. In Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris: CRIN.

Robidoux P-Y., Bardai G., Sarrazin M., Paquet L., Gong P., Hawari J., Sunahara G. I., 2000a. "Ecotoxicological risk assessment of an antitank firing range contaminated with explosives". NRCC Report #43317. National Research Council, Biotechnology Research Institute, Montreal, Québec. 64p.

Robidoux P-Y., Gong P., Sarrazin M., Bardai G., Paquet L., Hawari J., Dubois C., Sunahara G. I., 2004b. "Toxicity assessment of contaminated soils from antitank firing range". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 58, p. 300-313.

Robidoux, P. Y., Svendsen C., Sarrazin M., Thiboutot S., Ampleman G., Hawari J., Weeks J.M., Sunahara G. I., 2005. "Assessment of a 2,4,6 Trinitrotoluene Contaminated Site Using *Aporrectodea rosea* and *Eisenia andrei* in Mesocosms". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 46, p. 1-11.

Ross, M. S., 1994. Sources and form of potentially toxic metals in soil-plant systems. In M. S. Ross (Ed.), *Toxic Metals in Soil-Plant Systems* (pp. 3-25). Chichester: John Wiley.

Saad A., Virella G., Chassereau Ch., 2006. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res*, 47, 1975-1983.

Sadiq M. 1991. Solubility and speciation of Zinc in calcareous soils. *Water, Air, Soil Pollution*, 57-58, 411-421.

Saint Denis M., Narbonne J.F., Arnaud C., Thybaud E., Ribera D., 1999.

Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo (a) pyrene. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1837–1846.

Sanchez P., Tarazona J.V., 2002. Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*. *Aquat. Toxicol.* 60, 249–256.

Sandrini J.Z., Lima J.V., Regoli F., Fattorini D., Notti A., Marins L.F., Monserrat J.M., 2008. Antioxidant responses in the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after cadmium exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 115–120.

Satchell J.E., 1967. Lumbricidae. In *Soil Biology*. (Eds., A. Burges and F. Raw): 259-322. (Academic Press: London.).

Savigny J.C., 1826. In. CUVIER, G.: Analyse des Travaux de l'Academie royale des Sciences, pendant l'année 1821, partie physique. Mémoires de l'Académie des Sciences de l'Institut de France Paris, 5: 176–184.

Savigny J.C., 1826. In The Catalogue of Life Partnership 2018. Catalogue of Life. 03-02.

Scaps P., Grelle C., Descamps M., 1997. Cadmium and lead accumulation in the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) and its impacts on cholinesterase and metabolic pathway enzyme activity. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 116, 233–238.

Sekli-Belaidi F., 2011. Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4- éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique: application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin. Thèse de doctorat, Université de Toulouse III - Paul Sabatier, France, 173 p.

Seidal, K., Jörgensen, N., Elinder, C.G., Sjögren, B. et Vahter, M., 1993. Fatal cadmium-induced pneumonitis, *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, vol. 19, n° 6, pp. 429-431.

Sforzini S., Dagnino A., Oliveri L., Canesi L., Viarengo A., 2011. Effects of dioxin exposure in *Eisenia andrei*: integration of biomarker data by an Expert System to rank the development of pollutant-induced stress syndrome in earthworms. *Chemosphere* 85, 934–942.

Sies H., 1985. Oxidative stress: introductory remarks. H. Sies editor: Academic Press, London, 1-2.

Simon O., 2000. Etude des voies de contamination -directe et trophique- des organismes aquatiques continentaux par les métaux - mercure, cadmium, zinc -. Approches expérimentales au laboratoire et in situ. Université Bordeaux 1, N° 2244, 171 p.

Simon O., Ribeyre F., Boudou A., 2001. Comparative experimental study of cadmium and methylmercury trophic transfers between the Asiatic clam *Corbicula fluminea* and the crayfish *Astacus astacus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 3, 317-326.

Sims R.W., Gerard B.M., 1999. Earthworms. FSC Publications, London, 167 pp.

Sinha R K., Bharambe G., Chaudhari U., 2008. Sewage treatment by vermifiltration with synchronous treatment of sludge by earthworms: a low-cost sustainable technology over conventional systems with potential for decentralization. *Environmentalist*, 28(4), 409-428.

Sittig M., 1985. *Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*, 2^e édition (Park Ridge, New Jersey, Noyes Data Corporation).

Spark K. M., Wells J. D., Johnson B. B., 1995. Characterizing trace metal adsorption on kaolinite. *European Journal of Soil Science*, 46, 633-640.

Sposito G., 1989. The chemistry of soils. Oxford Univ. Press, 277 p.

Spurgeon D J., Hopkin S P., Jones D T., 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny):

Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*. Vol, 84, p:123-130

Spurgeon D. J., Hopkin S. P., 1995. Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology* 4:190-205.

Spurgeon D. J., Hopkin S. P., 1996. Effects of metal contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to Zinc. *Ecotox. Environ. Sare.*, vol. 35, p. 86-95.

Spurgeon D. J., Hopkin S. P., 1996a. The effects of metal contamination on earthworm populations around a smelting works: quantifying species effects. *Appl. Soil Ecol.* 4:147-160.

Spurgeon D. J., Hopkin S. P., 1996b. Effects of variations in organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia* 40:80-96.

Stahl R. S., James B. R. 1991. Zinc sorption by manganese-oxide-coated sand as a function of pH. *Soil Sci. Soc. Am.J.*, 55, 1291-1294.

Stipp S.L., Hochella M.F., Parks G.A., Leckie J.O., 1992. Cd²⁺ uptake by calcite, solid-state diffusion, and the formation of solid-solution: Interface processes observed with near-surface sensitive techniques (XPS, LEED and AES). *Geochim Cosmochim Acta*, 56: 1941-1954.

Stolt J.P., Sneller F.E.C., Bryngelsson T., Lundborg T., Schat H., 2003. Phytochelatins and cadmium accumulation in wheat. *Environ Exp Bot*, 49: 21-28.

Sulata Maity., Sonali Roy., Shibani Chaudhury., Shelley Bhattacharya., 2008. Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated. *Soil Environmental Pollution*, vol, 151, p: 1-7.

Svendsen T.S., Hansen P.E., Sommer C., Martinussen T., Grønvold J. et Holter P., 2005. Life history characteristics of *Lumbricus terrestris* and effects of the veterinary antiparasitic compounds ivermectin and fenbendazole. *Soil Biol. Biochem.* 37: 927-936.

Swati A., Hait S., 2017. Fate and bioavailability of heavy metals during vermicomposting of various organic wastes – A review. *Process Safety and Environment Protection.* 03.031
Terhivuo J., Pankakoski E., Hyvarinen H., Koivisto I., 1994. Pb uptake by ecological dissimilar earthworm (*Lumbricidae*) species near a lead smelter in south Finland. *Environ. Pollut.* 85 : 87-96.

Tessier L., Couillard Y., Campbell P.G.C., Auclair J.C., 1993. Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anadonta grandis*. *Limnol Oceanogr.* 38: 1-17.

Thun, M.J., Elinder, C.G. et Friberg, L., 1991. Scientific basis for an occupational standard for cadmium, *American Journal of Industrial Medicine*, vol. 20, no 5, pp. 629-642.

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

Tricot A., 1999. Le cadmium. *Encyclopaedia Universalis*, France.

Usmani Z., Kumar V., 2015. Role of earthworms against metal contamination: a review. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, Vol. 6, No. 1, p. 414-427.

Van Cappellen P., Charlet L., Stumm W., Wersin P., 1993. A surface complexation model of the carbonate mineral-aqueous solution interface. *Geochim Cosmochim Acta*, 57 : 3505-3518.

Van Gestel C. A M., Van Dis W. A., 1988. "The influence of soil characteristics on the

toxicity of four chemicals to the earthworm *Eisenia fetida andrei* (Oligochaeta)". Biol. Fert. Soils., vol. 6, p. 262-265.

Van Oort F., Jongmans A. G., Citeau L., Lamy I., Chevallier P., 2006. Metal transport dynamics in soils as revealed by microscale zinc and lead distribution patterns in subsurface horizons. European Journal of Soil Science, 57, 154-166.

Viard-La Rocca. B., 2004. Mise au point et validation, sur sites contaminés, (ETM-HAP) d'un test de biosurveillance en microcosme: croissance et bioaccumulation par le gasteropde terrestre *Helix aspersa*. Thèse de doctorat. Université de Metz. 266 : 22, 25.

Vijver, M. G., Vink J. P. M., Miermans C. J. H., Van Gestel C. A M., 2003. "Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal route and dermal uptake of metals in earthworms". Soil. Biol. Biochem., vol. 35, p. 125- 132.

Waalkes MP., 2000. Cadmium carcinogenesis in review. J Inorg Biochem, 79: 241-244.

Wallace WG., Lopez GR., 1997. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. MarEcol Prog Ser,147: 149-157.

Wechbeker G., Cory., 1988. Ribonucleotidereductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. Cancer letters, 40, 257-264.

Wirth D., Christians E.S., Drion P.V., Dessy-Doize C., Gustin P., 2003. Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. Ann. Med. Vet, 147 (2), 127–144.

Xiaohui M., Yuhui Q., Zhenjun S., Xiaofei S., Yang L., 2012. Molecular toxicity of earthworms induced by cadmium contaminated soil and biomarkers screening. Journal of Environmental Sciences. 24(8) 1504–1510.

Xiaoxia Y., Yufang S., Jianrong K., Xiufeng C., 2012. Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene.

Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol, 86, p: 162–167.

Xue Y., Gu X., Wang X., Sun C., Xu X., Sun J., Zhang B., 2009. The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. Ecotoxicology. 18, 693–699.

Yager C.M., Harry H.W., 1963. The uptake of radioactive zinc, cadmium and copper by the freshwater snail *Taphius glabratus*. Malacologia,1, 339-53.

Yang X., Song Y., Kai J., Cao X., 2012a. Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene. Ecotoxicol. Environ. Saf. 86, 162–167.

Zaldibar B., Cancio I., Marigómez I., 2007. Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. Aquat. Toxicol. 81, 183–196.

Zeriri I., Tadjine A., Grara N., Belhaouchet N., Berrebbah H., Djebbar M R., 2012. Potential toxicity of an insecticide of the family of carbamates on a bioindicator model of the pollution the earthworm *Octodrilus complanatus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Annals of Biological Research, 3 (11):5367-5373.

Zhang W., Liu K., Chen L., 2014. A multi-biomarker risk assessment of the impact of brominated flame retardant-decabromodiphenyl ether (BDE209) on the antioxidant system of earthworm *Eisenia fetida*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 38 (1), 297e304.

Zhang X., Xie P., Li D., Tang R., Lei H., Zhao Y., 2009. Time-Dependent Oxidative Stress Responses of Crucian Carp (*Carassius auratus*) to Intraperitoneal Injection of Extracted Microcystins. Bulletin of Environmental contamination and toxicology. Vol 82, p: 574-578.

Annexe

Annexe 1 - Clé d'identification des espèces de vers de terre (d'après Bouché, 1972)

Espèce	<i>Allolobophora caliginosa</i> (<i>Aporrectodea caliginosa</i> , <i>N.caliginosius caliginosus</i> , Bouché, 1972)
Catégorie écologique	endogé (polymorphe)
Diamètre	3,5-7 mm
Longueur	40-180 mm
Poids	180-840 mg
Nombre de segments	120-246
Pigmentation	non pigmenté corps gris-rose, partie antérieure rouge-rosée
Forme	aplatissement caudal
Soies	étroitement géminées (partie postérieure)
Prostomium	épilobique, fermé
Puberculum	31-33, forme de lunettes
Clitellum	27-34, forme de selle, gris-terne
Reproduction	obligatoirement biparentale, surtout dans sol, rarement à surface
Pore mâle	15
Pores dorsaux	(9-10) 10-11 (parfois 11-12), bien visibles

Biochemical responses of the earthworm *Allolobophora caliginosa* exposed to cadmium contaminated soil in the Northeast of Algeria.

Manuscrit reçu le 6 octobre 2017 et accepté le 12 janvier 2018

Hadjer OTMANI¹, Aicha TADJINE², Ouisssem MOUMENI¹, Ibtissem ZERIRI¹, Rima AMAMRA¹, Djekoun Bensoltane SAMIRA¹, Mohamed Reda DJEBAR¹, and Houria BERREBBAH¹.

¹ Cellular Toxicology Laboratory, Department of Biology, University of Badji Mokhtar Annaba, Algeria.

² Functional and Evolutionary Ecology Laboratory, Department of Biology, University of Chadli Bendjedid, El Tarf, Algeria.

Résumé

Les réponses de vers de terre *Allolobophora caliginosa* aux expositions sub-létales de cadmium (Cd) (25, 50, 100, 150 mg/500g d.w), ont été examinées dans cette étude. L'Enquête a été faite sur le taux de protéines totales, le stress oxydatif et la réponse antioxydante à travers un ensemble de biomarqueurs enzymatiques ((catalase (CAT), glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST) et malondialdéhyde (MDA)), qui ont été choisie pour évaluer les réponses des vers de terre dans une période jusqu'à deux semaines. Les vers de terre exposés au cadmium ont démontré différentes réponses des biomarqueurs enzymatiques. Le cadmium a augmenté le taux de protéines totales. De plus, la surveillance des biomarqueurs de stress oxydatif a montré un épuisement significatif au niveau du glutathione (GSH) accompagné d'une forte augmentation de glutathione S-transferase (GST) et de la stimulation de l'activité catalase (CAT) et malondialdéhyde (MDA). Nos résultats indiquent les effets toxiques du cadmium sur les vers de terre *Allolobophora caliginosa*.

Mots clés : Cadmium, *Allolobophora caliginosa*, protéines totales, stress oxydatif, Biomarqueurs.

Abstract

The responses of earthworms *Allolobophora caliginosa* to sub-lethal exposures of cadmium (Cd) (25, 50, 100, 150 mg/500g d.w), were investigated in this study. Investigation was done on the total proteins rate, oxidative stress, and antioxidative response through a set of enzymatic biomarkers ((catalase (CAT), glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST) and malondialdehyde (MDA)), which were selected to evaluate the responses of the earthworms in a period up to two weeks. The earthworms exposed to the cadmium stress demonstrated different responses of the enzymatic biomarkers. Cadmium stress increased the total proteins rate. Furthermore, monitoring biomarkers of oxidative stress showed a significant depletion in glutathione level (GSH) accompanied with a strong increase of glutathione S-transferase (GST) and stimulation of catalase activitie (CAT) and

malondialdehyde (MDA). Our results indicated the toxic effects of cadmium on *Allolobophora caliginosa* earthworms.

Keywords : Cadmium, *Allolobophora caliginosa*, total proteins, Oxidative stress, Biomarkers.

1. Introduction

Widely spread in the environment from anthropogenic sources, Heavy metals have caused damages to ecosystems close to emission sources (Derome and Nieminen, 1998). Although they are essential trace elements, metals above certain concentrations and exposure times are toxic to soil animals and affect the abundance, diversity, and distribution of the animals (Hopkin, 1989). In many ecosystems, earthworms play a major role in the development and maintenance of soil structure. They have a great impact on soil decomposition activity, on nutrient mineralization, and hence on primary productivity (Edwards and Bohlen, 1996). Earthworms play a key role in many soil processes and are in full contact with the soil solution, thus they are relevant indicators of environmental change and have been included in a group of five key indicators for ecotoxicological testing of industrial chemicals determined by the Organization de Cooperation et de Developpement Economiques and the European Economic Community (Capowiez *et al.*, 2003). Earthworms are more susceptible to metal pollution than many other groups of soil invertebrates (Bengtsson *et al.*, 1992). Considering their relative sensitivity, toxicity data from earthworms are important in determining safe levels for metals in soil (Spurgeon and Hopkin, 1996). This species accumulate high concentrations of metals from contaminated soil (Morgan and Morgan, 1999). Cadmium is a non-essential heavy metal is very toxic and have particularly harmful effects on organisms (CEPA, 1994). It is effectively lethal to earthworms and particularly affects earthworms growth and reproduction (Matthias, 2010). Many previous studies focused on Cd effects on earthworms *E. fetida*' survival, reproduction and even the responses of detoxification system as well. While the effects of high-level Cd on earthworms *Allolobophora caliginosa* (an abundant species in the region of Seraïdi-Annaba) are rarely reported, that's what the present work carried to investigate. The main aim of this study was to evaluate the effects of cadmium on the growth, oxidative stress, and antioxidative response through a set of enzymatic biomarkers (CAT, GSH, GST and MDA) of earthworms *Allolobophora caliginosa* upto two weeks, and to provide valuable information for ecological risk assessment of the cadmium effects at environmentally relevant levels.

2. Materials and methods

2.1. Biological material

Adult (clitellate) earthworms (*Allolobophora caliginosa*), weight subsequently found to average 1.5 g, were collected from Séraïdi region near Annaba (East of Algeria). They were randomly assigned to treatment groups, either their native substrate (soil) under laboratory conditions ($20 \pm 1^\circ\text{C}$; 12 h dark/12 h light).

2.2. Chemical material and soil amendment

Cadmium chloride (CdCl_2 pentahydrate, Fluka) was the chemical product used in our experiment. Deionized water was used as vehicle to spike soil with cadmium. Solutions were prepared to obtain the following nominal concentration in soil: 0 (control), 25, 50, 100, 150 mg/500g d.w. Soils were kept at 20°C for 14 days after spiking and before the beginning of the assays. Deionized water and Cd solutions were added to get 75 % of the soil water holding capacity (WHC).

2.3. Exposure and measurements

The worms were weighed and exposed at different concentrations of Cd-spiked soil (500 g d.w.) in terrariums, with 5 adults per terrarium and for each concentration. Humidity in terrariums was adjusted by adding deionized water if necessary (12-15 % humidity). Worms were fed with 2 grams of dried cereals, every week. After 7 and 14 days earthworms were then collected and purged during 24 h, then weighted. The worms were cut into five portions for analysis of various parameters. Total proteins content was measured according to the method of Bradford (1976). The determination of glutathione rate (GSH) was realized according to the method of Weckberker and Croy (1988). The measurement of glutathion-S-transferase (GST) activity was realized according to the method of Habig *et al.* (1974). The catalase activity measurement (CAT) was followed according to the method of Regoli and Principato (1995). The rate of malondialdehyde (MDA) was measured according to the method of Draper and Hadley (1990).

2.3. Stastical analysis

The obtained results were expressed as the Mean \pm Standard Deviation (SD) with three independent replicates. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). To look for differences by pairs between treated samples and the control, we applied the Student's t-test. Statistical analyses were performed using the Minitab software (14.0).

3. Results

3.1. Total proteins rate

Data are the mean \pm S.E. of three replicates. In the period of 7 days, a significant increase in the total proteins rate compared with the control was observed following exposure to the lowest concentration of cadmium 25 mg/500g d.w ($p=0.016$), and for worms treated with the highest concentration of cadmium 150 mg/500g d.w this rate was very highly significantly increased to be 4.47 ± 1.59 when compared to the control $2.55\pm 0.13 \mu\text{M mg}^{-1}$ of tissues ($p = 0.001$). However, the effects of cadmium were less intense in the concentrations of 50 and 100 mg/500g d.w, where there were no significant differences in the total proteins rate compared with the control. While in a period of 14 days, the exposure of worms to cadmium resulted in no significant decrease of the total proteins rate compared with the control

$p = 0.156$. Significant differences from the control are indicated as: $p \leq 0.05$ (*) and $p \leq 0,001$ (***) very highly significant (Fig.1).

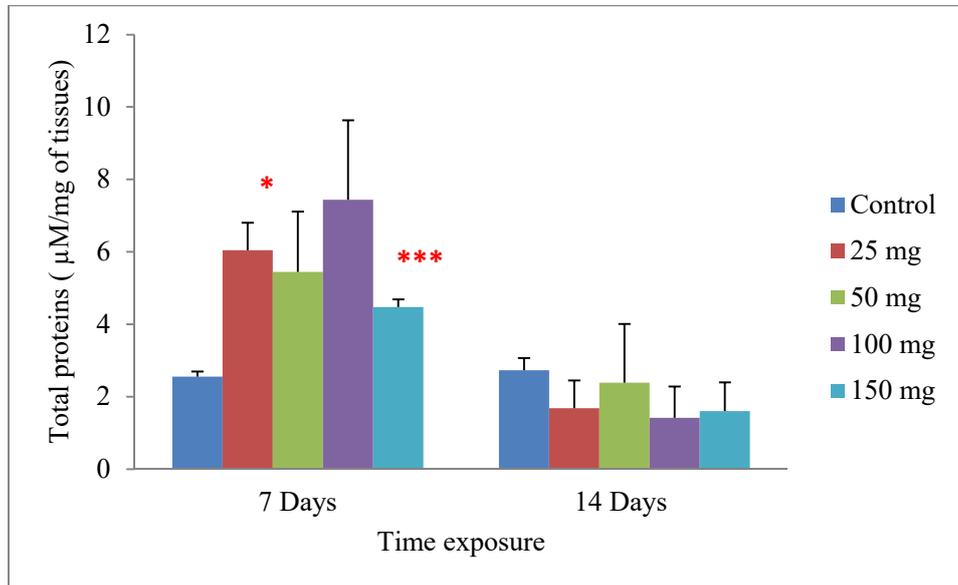


Fig.1: Effect of cadmium stress on the total proteins rate in *Allolobophora caliginosa*

3.2. GSH rate

Data are the mean \pm S.E. of three replicates. A non-significant increase in the GSH rate compared with the control was observed following exposure to all concentrations of cadmium in a period of 7 days. However in a period of 14 days, it was found that cadmium causes a dose dependent decrease in the GSH level. Compared to the control (3.60 ± 0.16), GSH level was significantly determinate to be $2.04 \pm 0.46 \mu\text{mol mg}^{-1}$ protein ($p = 0.031$) in earthworms treated with the concentration of 50 mg/500g d.w. For worms treated with 100 and 150 mg/500g d.w this rate was very highly significantly reduced to be 1.22 ± 0.26 and $1.31 \pm 0.28 \mu\text{mol mg}^{-1}$ protein ($p = 0.001$ and $p = 0.001$), respectively. Significant differences from the control are indicated as: $p \leq 0.05$ (*) and $p \leq 0,001$ (***) very highly significant. (Fig.2).

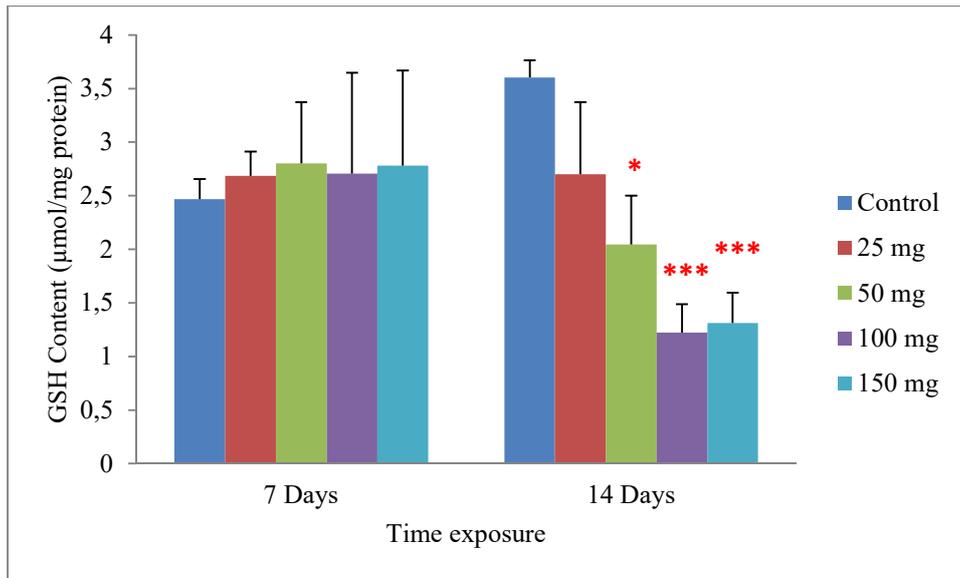


Fig. 2: Effect of cadmium stress on the GSH rate in *Allolobophora caliginosa*

3.3. GST rate

Data are the mean \pm S.E. of three replicates. In the period of 7 days, GST activity showed a tendency of decrease, but only became significant ($P < 0.05$) with concentrations 50 and 150 mg/500g d.w compared to the control. While in a period of 14 days, the exposure of worms to cadmium resulted in an induction of the GST activity. The enzymatic activity appeared with concentrations 25, 100 and 150 mg/500g d.w, which had significant increase when compared to the control ($p = 0.043$, $p = 0.023$ and $p = 0.043$), respectively. However, the effects of cadmium were less intense in the concentration 50 mg/500g d.w, where there were no significant differences in GST activity $p = 0.123$. Significant differences from the control are indicated as: $p \leq 0.05$ (*) (Fig.3).

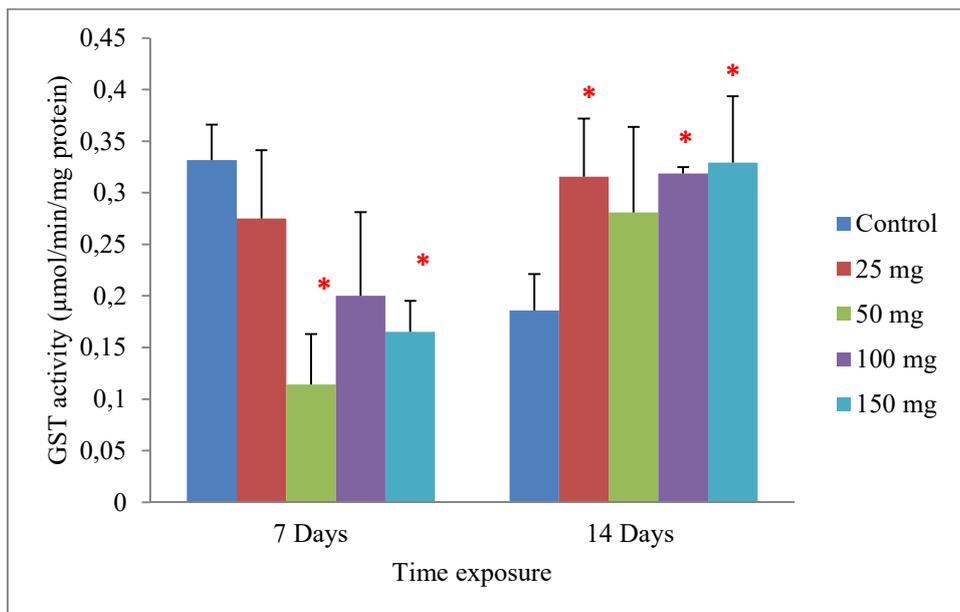


Fig.3: Effect of cadmium stress on the GST activity in *Allolobophora caliginosa*

3.4. CAT activity

Data are the mean \pm S.E. of three replicates. The results show a non-significant increase in CAT activity compared with the control, in presence of the xenobiotic (Fig.4).

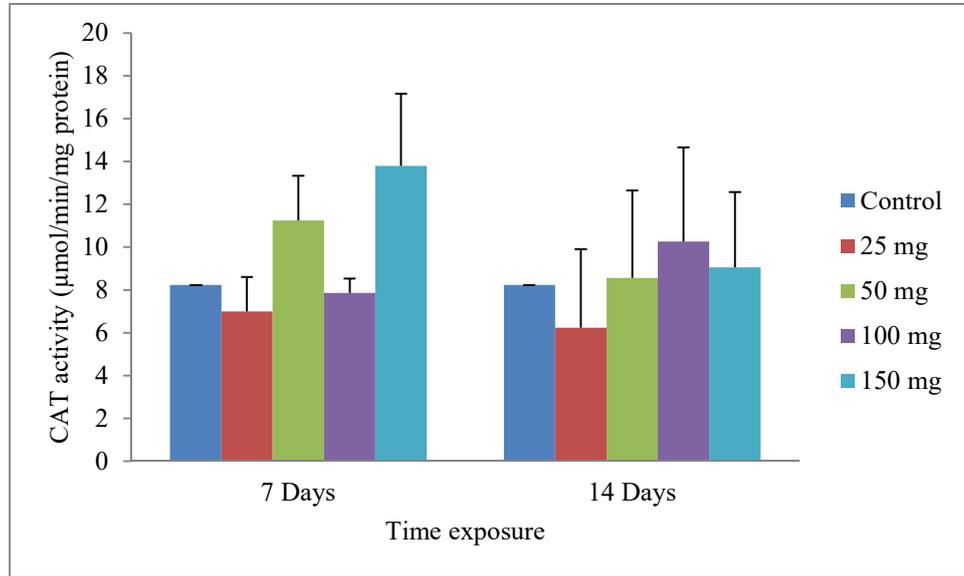


Fig.4: Effect of cadmium stress on the CAT activity in *Allolobophora caliginosa*

3.5. MDA level

Data are the mean \pm S.E. of three replicates. The results show a non-significant increase in MDA level compared with the control, in presence of the cadmium (Fig.5).

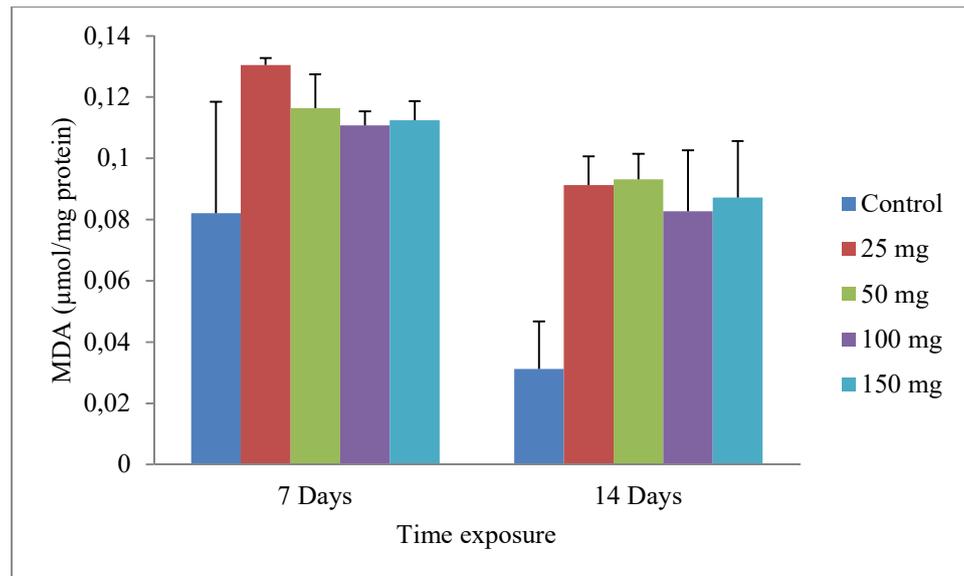


Fig.5: Effect of cadmium stress on MDA level in *Allolobophora caliginosa*

3. Discussion

In agricultural ecosystems, where animal farming and related agricultural practices are intensive, heavy metals can also reach the soil due to application of liquid and soil manure (or their derivatives, compost or sludge) or inorganic fertilizers. The presence of heavy metals in terrestrial ecosystems is of concern for their high toxicity and ability to be biomagnified through the food web, posing a threat to the Environmental health and survival of the resident organisms (El-Shenawy *et al.*, 2012). This contamination causes a stress in bioindicator organisms of pollution by distorting their physiological and biochemical capacities in different degrees (Zeriri *et al.*, 2012). Earthworms have great potential in risk assessment of contaminated land and act as an indicator for ecosystem health (Nahmani and Lavelle, 2002). The worms are capable to uptake and tolerate high levels of heavy metals, suggesting its suitability for environment monitoring (Usmani and Kumar, 2015). The Majority of studies have been conducted on toxicological effects of cadmium on earthworms *Eisenia fetida*. From this vision, the aim of the present study is to evaluate the toxicity of cadmium on earthworms rarely reported: *Allolobophora caliginosa*, by monitoring some physiological and antioxidant responses of worms exposed to a battery of high cadmium concentrations. Biomarkers can be used as early warning indicators of environmental contamination and potential adverse effects on populations (Peakall, 1994). In earthworms, two coexisting intracellular pathways are responsible for metal accumulation. The first involves retention of metals (particularly Pb) in insoluble phosphate granules called chloragosomes (Morgan and Morris, 1982). The second pathway is the intervention of sulfur-rich ligands like metallothionein-like proteins (MTLP) able to bind metals (particularly Cd) within cadmosomes (Morgan and Morgan, 1990; Morgan *et al.*, 1993). Since proteins “MTs” are physiologically involved in essential metal ions transport and regulation, and function as intracellular distributors of copper and zinc, they also play a role in non-essential metal regulation and detoxication (Klaassen, 1995; Klaassen *et al.*, 1999). They are particularly known to protect cells from Cd toxicity and oxidative stress (Andrews, 2000). In this work, we noted in the period of 7 days a significant increase in the total proteins rate of the lowest concentration of cadmium 25 mg/500g d.w, and for worms treated with the highest concentration of cadmium 150 mg/500g d.w this rate was very highly significantly increased. This finding is in agreement with those of Bernard *et al.* (2010) and Xiaohui *et al.* (2012), who showed an increase in the rate of total proteins of worms *Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus* and *Lumbricus terrestris* treated with increasing concentrations of cadmium. Similar induction of proteins after Cd exposure was already observed in aquatic organisms treated with increasing concentrations of cypermethrin which contain heavy metals (Amamra *et al.*, 2015). However, we noted a regulation of total proteins rate in a dose dependent manner in the period of 14 days, this finding is in agreement with those of Spurgeon *et al.* (1994) and Matthias (2010), who showed a significant up-regulation of MT in both species *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to cadmium, The high tolerance of earthworms to cadmium poisoning is due probably to detoxification by metallothionein proteins in the posterior alimentary canal (Morgan *et al.*, 1989). Ireland (1978) found that cadmium and lead are particularly concentrated in chloragogen cells in *L. terrestris* and *Dendrobaena rubidus*, where it bounds in the form of Cd-metallothioneins and Pb-metallothioneins. The chloragogen cells in earthworms appear to accumulate heavy metals

absorbed by the gut and immobilize the metals in small spheroidal chloragosomes and vesicles found in these cells (Sinha *et al.*, 2008; Usmani and Kumar, 2015). All the studies including our results suggest that MT could be developed as a more effective biomarker for determining soil cadmium contamination levels. The Glutathione considered as the vital second-line defenses against oxidative damage which is the major non enzymatic radical scavenger in the animal cells (Moumeni *et al.*, 2016) and Glutathione-s-transferase (GST) as one of phase II Enzymes can catalyze the conjugation reaction of GSH and electrophilic xenobiotics, and thus contribute to the removal of reactive electrophiles. This enzyme also plays a role in cellular protection against Oxidative stress (Xiaoxia Yang *et al.*, 2012; Sulata *et al.*, 2008). In the cell, there is equilibrium between the reduced and oxidized forms of glutathione which have the efficiency to provide antioxidant defenses against the heavy metal Cd on Earthworms. In our experiment, we noted a dose dependent increase in the GSH level parallel to the significant decrease of the GST activity for 7 days of exposure may be due to an up regulation of the GSH synthetic pathway and may be a protective mechanism against the toxic effects of the metal. (Sulata *et al.*, 2008; Xiaoxia Yang *et al.*, 2012) indicating the earthworms failed to cope with the toxic stress from exposure to Cd through their detoxifying and antioxidant mechanisms during a short exposure period. After 14 days of exposure, the present investigation clearly demonstrates a strong dose-response correlation between the cadmium and GSH expression. GSH expression seems to be sensitive to cadmium: it was strongly declined even at low cadmium concentration that depletion might be due to its massive utilization through the oxidation of two molecules of GSH to a molecule of GSSG. GSH also scavenges reactive oxygen species (ROS) and the Cd can be sequestered by GSH to prevent its adverse interaction with biomolecules. GSH and other thiols play a crucial role in cleaning ROS (Broerse *et al.*, 2012; Sulata *et al.*, 2008; Xiaoxia Yang *et al.*, 2012). similar conclusions was reached by Saint-Denis *et al.* (1999), Sulata *et al.* (2008), and Zeriri *et al.* (2012), who showed a significant decrease of GSH rate on *Eisenia fetida andrei* exposed to benzo [a] pyryne and *Octodrilus complanatus* exposed to pesticide. This is in agreement with earlier studies (Moumeni *et al.*, 2016; Amamra *et al.*, 2015). That elucidated a significant depletion of the GSH content in paramecia exposed to insecticide, parallel to a significant increase in GST activity known that it exert the function of detoxification, Usually the depletion of the GSH leads to GST activation with a simultaneous re-synthesis of GSH for the replacement of the normal level, so it plays a major role in the metal metabolism by organisms and provide to the cell a state of equilibrium and protection against oxidized reactive species (Mofredj *et al.*, 1999). Studies conducted on earthworms exposed to Heavy metals (such as Cd) (Brown *et al.*, 2004, Ribera *et al.*, 2001, Saint-Denis *et al.*, 1999; Xiaoxia Yang *et al.*, 2012) and to pesticide (Zeriri *et al.*, 2012), and studies conducted on paramecia exposed to pesticide (Moumeni *et al.*, 2016) and cypermethrin (Amamra *et al.*, 2015) demonstrated the same results. Catalase represents an important link in the detoxification of ROS generated as a result of a toxicity, which is regarded as an enzyme presenting a clear and early response to contamination. In the present study, CAT activity was found to be increased after 7 and 14 days of exposure. This increase might be due to up-regulation of CAT activity, which could be an adaptive mechanism to prevent the accumulation of toxic Reactive Oxygen Species ROS (El-Shenawy *et al.*, 2012). This result was in agreement with the findings of Zhang *et al.* (2009) 48 h *Eisenia fetida*. According to Torres *et al.* (2002) these data suggest

that the increase in antioxidant defenses would be due to enhanced oxygen free radicals production, which could stimulate antioxidant activities to cope with this increased oxidative stress and protect the cells from damage. LPO is a complex process in which polyunsaturated fatty acids in the biological membrane system undergo changes by chain reactions and form lipid hydroperoxides, which decompose double bonds of unsaturated fatty acids and disrupt membrane lipid (Radwan *et al.*, 2010). After 7 and 14 days of exposure, a noticeable increase in lipid peroxidation biomarker MDA was observed in *Allolobophora caliginosa* earthworms treated with different concentrations of cadmium. These findings are in good agreement with those of (Radwan *et al.*, 2010) who recorded a significant elevation in MDA after 48 h of exposure in *T. pisana* snails contaminated by Cd- and Zn. Also (Zeriri *et al.*, 2012) indicated that the level of MDA increase in earthworms treated with different concentrations of methomyl. These results were in agreement with the present data where increasing the levels of Cd elevated the LPO level in earthworms (Li *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2009) suggested that one of the most damaging effects of ROS and their products in cells is the peroxidation of membranous lipids, which can be indicated by the detection of MDA. In conclusion, the results demonstrate that *Allolobophora caliginosa* earthworms are sensitive to metal toxicity. Since it showed an important oxidative stress translated by an outbreak of a system of detoxification (GSH, GST), a stimulation of the oxidative enzyme activity: the catalase. This effect is accompanied by an up-regulation of total protein and a peroxidation of the lipids (MDA). It emerges that the *Allolobophora caliginosa* earthworms are an excellent bio-indicator model of the pollution and the state environmental. However, more research is needed for better understanding and application of results from *Allolobophora caliginosa* earthworms, such as how heavy metals interact with different soil types. Also more works are needed such as MT gene expression, cocoon reproduction etc, and a suite of biomarkers is helpful in the evaluation of heavy metals toxicity on earthworms and could be instrumental in monitoring soils contaminated with multiple pollutants.

4. References

- Amamra R., Djebbar M R., Moumeni O., Azzouz Z., Zeriri I., Atilia A., Benosmane S and Berrebbah H. (2015). Lipid peroxidation, oxidative stress and respiratory metabolism alteration in the freshwater ciliate *Paramecium tetraurelia* exposed to cypermethrin, a pyrethroid insecticide. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 6, 115-123.
- Andrews G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions". *Biochem Pharmacol.* 59, 95-104.
- Bengtsson G., Ek H and Rudgren S. (1992). Evolutionary response of earthworms to long term metal exposure. *Oikos*, 63, 289-297.
- Bernard F., Brulle F., Douay F., Lemiere S., Demuynck S and Vanden-bulcke F. (2010). Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in *Eisenia fetida*, using an "exposure/depuration" experimental scheme with field soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1034–1045.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.*, 72, 278-254.

- Broerse M., Oorsprong H. and van Gestel C. (2012). Cadmium affects toxicokinetics of pyrene in the collembolan *Folsomia candida*. *Ecotoxicology*, 21, 795–802.
- Brown P.J., Long S.M., Spurgeon D., Svendsen C. and Hankard P.K. (2004). Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 57, 1675–1681.
- Capowiez Y., Rault M., Mazzia C and Belzunces L. (2003). Earthworm behaviour as a biomarker a case study using imidacloprid. *Pedobiologia*, 47, 542-547.
- CEPA (Canadian Environmental Protection Act). (1994). Priority Substances List. Assessment report. Cadmium and its compounds." Government of Canada Environment Canada and Health Canada.
- Derome J and Nieminen T. (1998). Metal and macronutrient fluxes in heavy-metal polluted Scots pine ecosystems in SW Finland. *Environ. Pollut*, 103, 219–228.
- Draper H and Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186, 241-431.
- Edwards C.A and Bohlen P.J. (1996). *Biology and Ecology of Earthworms* 3rd Edition. Chapman & Hall, London, 426.
- El Shenawy N S., Mohammadden A and Al Fahmie Z H. (2012). Using the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system of the land snail *Eobania vermiculata* as biomarkers of terrestrial heavy metal pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 347–354.
- Habig W. H., Pabst M. J and Jakoby W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological chemistry*, 249, 7130-7139.
- Hopkin S.P. (1989). *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*. Elsevier, *Applied Science*. London UK.
- Ireland M. P. (1978). Heavy metal binding properties of earthworm chloragosomes. *Acta. Biol. Acad. Sei. Hung.*, 29, 385-395.
- Klaassen C. D. (1995). Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 5th edition. New York: McGraw-Hill, 912.
- Klaassen C. D., Liu J and Choudhuri S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *AnnuRev.Pharmacol. Toxicol.*, 39, 267-294.
- Li Y., Zhou Q., Li F., Liu X and Luo Y. (2008). Effects of tetrabromobisphenol A as an emerging pollutant on wheat (*Triticum aestivum*) at biochemical levels. *Chemosphere*, 74, 119–124.
- Matthias B. (2010). Effets de métaux (Cd et Pb) et d'une substance énergétique (hmx) sur la reproduction et sur les protéines de type métallothionéine chez *Eisenia andrei*. Mémoire, Maitrise, Université de Québec à Montréal, 89-104.
- Mofredj A., Cadranel J.F., Darchy B., Barbare J.C., Cazier A., Pras V and Biour M. (1999). Hepatotoxicity caused by Therapeutic doses of paracetamol in alcoholics. Report of 2 cases of fatal hepatitis in cirrhosis. *Annales Medecine Interne.*, 150, 507-511.
- Morgan A. J and Morris B. (1982). The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochemistry.*, 75, 269-285.

- Morgan J E., Norey C G., Morgan A J and Kay J. (1989). A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworm *Demrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol*, 92, 15-21.
- Morgan J E and Morgan A J. (1990). The distribution of cadmium, copper, lead, zinc and calcium in the tissue of the earthworm *Lumbricus rubellus* sampled from one uncontaminated soil and four polluted soils. *Oecologia.*, 84, 559-566.
- Morgan A J., Morgan J E., Turner M., Winters C., and Yarwood A. (1993). Metal relationship of earthworms. In: *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. Ed Dallinger R, Rainbow PS. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl, USA, 333–358.
- Morgan J.E and Morgan A.J. (1999). The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn, and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): Implications for ecotoxicological testing. *Appl. Soil Ecol*, 13, 9–20.
- Moumeni O., Houria B., Zoubir A., Rima A., Hadjer O., Amel A., Sana B. and Reda Djebar M., (2016). Effects of Cycloxydim on Population Growth, Phagocytosis, Contractile Vacuole Activity and Antioxidant Responses in the Freshwater Ciliate (*Paramecium tetraurelia*). *Res. J. Environ. Toxicol.*, 10, 115-125.
- Nahmani J and Lavelle P. (2002). Effects of heavy metal pollution on soil macrofauna in grassland of Northern France. *Eurasian Journal of Soil Biology*, 38, 297-300.
- Peakall D B. (1994). Biomarkers, the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News*, 1, 55-60.
- Radwan M A., El Gendy K S. and Gad A F. (2010). Oxidative Stress Biomarkers in the digestive Gland of *Theba pisana* exposed to heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 58, 828–835.
- Regoli F and Principato G. (1995). Glutathione glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31, 143-164.
- Ribera D., Narbonne J F., Arnaud C and Saint Denis M. (2001). Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biol. Biochem*, 33, 1123–1130.
- Saint Denis M., Narbonne J.F., Arnaud C., Thybaud E. and Ribera D. (1999). Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo (a) pyrene. *Soil Biol. Biochem*, 31, 1837–1846.
- Sinha R K., Bharambe G and Chaudhari U. (2008). Sewage treatment by vermifiltration with synchronous treatment of sludge by earthworms: a low cost sustainable technology over conventional systems with potential for decentralization. *Environmentalist*, 28(4), 409-428.
- Spurgeon D J., Hopkin S P and Jones D T. (1994). Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution.*, 84, 123 130
- Spurgeon D J and Hopkin S P. (1996). Effects of metal contaminated soils to the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to Zinc. *Ecotox. Environ. Sare.*, 35, 86-95.

- Sulata M., Sonali R., Shibani C. and Bhattacharya S.. (2008). Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated. *Soil Environmental Pollution.*, 151, 1-7.
- Torres M A., Testa C P., Gaspari C., Masutti M B., Panitz C M N., Curi Pedrosa R., Almeida E A., Di Mascio P and Wilhelm F D. (2002). Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island. *Braz. Mar. Pollut. Bull.*, 44, 923–932.
- Usmani Z and Kumar V. (2015). Role of earthworms against metal contamination: a review. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences.*, 6, 414-427.
- Weckbeker G and Croy. (1988). Ribonucleotidoreductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40, 257-264.
- Xiaohui M, Yuhui Q, Zhenjun S, Xiaofei S and Yang L. (2012). Molecular toxicity of earthworms induced by cadmium contaminated soil and biomarkers screening. *Journal of Environmental Sciences*, 24(8), 1504–1510.
- Xiaoxia Yang., Yufang Song., Jianrong Kai and Xiufeng Cao. (2012). Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, 86, 162–167.
- Xue Y., Gu X., Wang X., Sun C., Xu X., Sun J and Zhang B. (2009). The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. *Ecotoxicology.*, 18, 693–699.
- Zhang X., Xie P., Li D., Tang R., Lei H and Zhao Y. (2009). Time-Dependent Oxidative Stress Responses of Crucian Carp (*Carassius auratus*) to Intraperitoneal Injection of Extracted Microcystins. *Bulletin of Environmental contamination and toxicology.*, 82, 574-578.
- Zeriri I., Tadjine A., Grara N., Belhaouchet N., Berrebbah H and Djebar M R. (2012). Potential toxicity of an insecticide of the family of carbamates on a bioindicator model of the pollution the earthworm *Octodrilus complanatus* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Annals of Biological Research*, 3 (11), 5367-5373.