



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 PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité: Biologie
Option : Toxicologie

Intitulé

Toxicité potentielle de 3 pesticides (Dithiocarbamates, Triazole et une mixture de Phenylpyrrole – Triazole) et leurs impacts sur un microorganisme : Paramecium sp.

Présentée par : M^{elle} DJEKOUN Meriem

Membres de Jury:

DJEBAR Med Réda	Professeur	Président	Université de Annaba
BERREBBAH Houria	Professeur	Directrice de thèse	Université de Annaba
DJAHOUDI Abdelghani	Professeur	Examineur	Université de Annaba
SOUIKI Linda	Professeur	Examinatrice	Université de Guelma
BERREDJEM Malika	Professeur	Examinatrice	Université de Annaba

Année universitaire: 2015/2016

Table des matières

Remerciements

Liste des tableaux

Liste des figures

Acronymes

Introduction générale	1
I. Revue bibliographique	5
1. Les pesticides	5
1.1. Le devenir des pesticides	7
1.2. Toxicité des pesticides	8
1.2.1. Effets des pesticides sur la santé humaine (Épidémiologie)	9
1.2.2. Effets des pesticides sur la biodiversité (Écotoxicité)	11
1.3. Caractérisation des effets écotoxicologiques des pesticides en milieu aquatique	13
1.3.1. Principales approches expérimentales adoptées	13
2. Concept de bioindicateur / bioindication	14
3. La paramécie	16
3.1. Morphologie	16
3.2. Classification	17
3.3. Reproduction	18
3.3.1. Reproduction sexuée	18
3.3.2. Reproduction asexuée	19
3.4. Intérêt de l'utilisation des paramécies dans les études écotoxicologiques	19
4. Concept de biomarqueurs	20

5.	Les acteurs du statut oxydant cellulaire	21
5.1.	Les espèces réactives de l'oxygène : Définition et caractéristiques	21
5.2.	Le potentiel redox intracellulaire	23
5.3.	Le stress oxydant	24
II.	Matériel et Méthodes	26
1.	Matériel biologique	26
2.	Matériel chimique	26
3.	Étude de l'activité antifongique	28
3.1.	Mode de traitement	29
3.2.	Détermination des concentrations effectives médianes CE50	29
4.	Étude des effets des fongicides sur <i>Paramecium sp.</i>	30
4.1.	Mise en culture des paramécies	30
4.2.	Cinétique de croissance	31
4.3.	Détermination du nombre et du temps de génération	31
4.4.	Pourcentage de réponse	32
4.5.	Détermination des concentrations effectives médianes CE50	32
4.6.	Caractérisation des malformations	32
4.7.	Étude du métabolisme respiratoire	32
4.8.	Étude des biomarqueurs de stress oxydant	34
4.8.1.	Dosage des protéines totales	34
4.8.2.	Évaluation de l'activité Catalase (CAT)	34
4.8.3.	Dosage du taux du Glutathion (GSH)	35
4.8.4.	Évaluation de l'activité de la Glutathion S-transferase (GST)	35

4.8.5. Évaluation de l'activité de la Glutathion peroxydase (GPx)	36
4.8.6. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)	37
4.8.7. Estimation du taux des métabolites réactifs de l'oxygène (ROMs) et du potentiel biologique antioxydant (BAP)	38
5. Traitement statistique des données	39
III. Résultats	40
1. Étude de l'activité antifongique	40
1.1 Isolement et identification de la souche fongique	40
1.2 Effets des fongicides sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium sp.</i>	41
1.3 Détermination du pourcentage d'inhibition chez <i>Fusarium sp.</i>	41
1.4 Détermination des concentrations effectives médianes CE50 chez <i>Fusarium sp.</i>	43
2. Effets des fongicides sur <i>Paramecium sp.</i>	43
2.1. Effets des fongicides sur la cinétique de croissance de <i>Paramecium sp.</i>	43
2.2. Détermination du nombre et du temps de génération cellulaires	45
2.3. Pourcentage de réponse	47
2.4. Détermination des concentrations effectives médiane CE50 chez <i>Paramecium sp.</i>	49
2.5. Atteintes membranaires et structurales	50
2.6. Effets des fongicides sur l'activité respiratoire	54
2.7. Effets des fongicides sur les biomarqueurs de toxicité	56
2.7.1. Effets des fongicides sur le taux des protéines totales	56
2.7.2. Effets des fongicides sur l'activité de CAT	58

2.7.3. Effets des fongicides sur le taux du GSH	60
2.7.4. Effets des fongicides sur l'activité de GST	62
2.7.5. Effets des fongicides sur l'activité GPx	65
2.7.6. Effets des fongicides sur le taux des TBARS	67
2.7.7. Effets des fongicides sur l'état redox cellulaire	69
IV. Discussion générale	72
Conclusion générale et perspective	88
Références bibliographiques	90
Résumés	
Annexes	

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apportée leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse.

*Je tiens à remercier sincèrement mon encadreur Professeur **BERREBAH Houria** pour le temps qu'elle a consacré à m'apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche, pour ses conseils, sa présence et sa confiance et pour m'avoir laissée la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux. Merci pour ses conseils avisés et sa grande disponibilité lors de la rédaction de ce manuscrit.*

*Mes vifs remerciements vont également au Professeur **DJEBAR Mohammed Réda** pour m'avoir donnée la chance de réaliser ce projet en m'accueillant dans son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de me lancer dans cette aventure. Merci pour ses précieux conseils qui m'ont permis d'évoluer.*

*J'adresse ma gratitude et reconnaissance à Monsieur **DJAHOUDI Abdelghani**, Professeur à la faculté de médecine d'Annaba, à Madame **SOUIKI Linda**, Professeur à l'Université de Guelma et Madame **BERREDJEM Malika**, Professeur à l'université d'Annaba, qui ont accepté d'évaluer la qualité de mon travail.*

*Je tiens à remercier **Linda** et **Madina**, techniciennes du laboratoire, pour leur appui technique. Merci pour votre disponibilité et surtout pour le grand soutien moral dans les moments difficiles que j'ai pu connaître.*

*Je remercie toute l'équipe du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire pour la gentillesse et la serviabilité qu'ils m'ont témoignées durant ces quatre années. Merci à **Rym** et **Ouissem** de m'avoir appris les techniques de base de la toxicologie et de m'avoir initié à la manipulation des paramécies. Merci beaucoup chères collègues pour votre patience.*

*Je tiens évidemment à remercier **Fella** et **Nabil**, avec qui j'ai eu le plaisir de partager la paillasse. Un grand merci à Maroua et Meriem ; j'ai été ravie de travailler à vos côtés, je vous remercie de m'avoir toujours remonté le moral (surtout quand les dosages ne fonctionnent pas).*

*J'ai bientôt fait le tour de l'équipe, il ne manque plus qu'**Amina**, **Chiraz**, **Lyes**, **Housseem** et **Tayeb**, je voulais vous remercier pour les franches rigolades que nous avons partagées depuis que je vous ai connu. Merci pour vos prières et vos encouragements.*

*Un remerciement spécial à ma copine **Sarra**. Merci pour ton soutien et ton réconfort, tu as toujours su trouver les mots pour m'encourager, surtout à rédiger. Merci d'avoir supporté mon stress.*

*Mes remerciements s'adressent également à Madame **AMAMRA Nadjette**, directrice de l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) ainsi que madame **BOUDIB Moufida**, ingénieur de laboratoire du service Mycologie, de m'avoir permis de réaliser quelques manip au sein de leur l'institut.*

*Enfin un grand merci à mes chers parents, ma sœur **Manel** et mon petit frère **Ouassim**, pour leur patience et leurs encouragements, pour leur soutien inconditionnel et constant, sans eux je ne serai jamais été là où je suis aujourd'hui.*

*Te voilà **Digo** (j'ai gardé le meilleur pour la fin) quoi dire de plus que tu ne saches déjà? Merci pour TOUT...et bien plus encore. A nous l'avenir...*

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Historique de l'évolution des plus grandes familles de pesticides des années 1900 à nos jours	6
02	Les principales ERO rencontrées dans la cellule, et ainsi que leurs caractéristiques, les ERO qu'elles sont susceptibles d'engendrer, les cibles biologiques qu'elles attaquent, et leur demi-vie	22
03	Caractéristiques physico-chimiques et formules structurales des trois fongicides	27
04	Composition du milieu de culture des paramécies	30
05	Concentrations Effectives Médiannes (CE50) mesurées Chez <i>Fusarium sp.</i> après 7 jours de traitement	43
06	Effets du Thirame sur le nombre de génération (n) et le temps de génération (g) de <i>Paramecium sp.</i>	46
07	Effets du Tebuconazole sur le nombre de génération (n) et le temps de génération (g) de <i>Paramecium sp.</i>	46
08	Effets du mélange Fludioxonil – Difenoconazole sur le nombre de génération (n) et le temps de génération (g) de <i>Paramecium sp.</i>	47
09	Effets des concentrations croissantes du Thirame sur la teneur en protéines totales chez <i>Paramecium sp.</i>	56
10	Effets des concentrations croissantes du Tebuconazole sur la teneur en protéines totales chez <i>Paramecium sp.</i>	57
11	Effets des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur la teneur en protéines totales chez <i>Paramecium sp.</i>	57
12	Evolution du taux du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) et du potentiel biologique antioxydant (BAPs) chez <i>Paramecium sp.</i> exposé aux concentrations croissantes du Thirame	70
13	Evolution du taux du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) et du potentiel biologique antioxydant (BAPs) chez <i>Paramecium sp.</i> exposé aux concentrations croissantes du Tebuconazole	70
14	Evolution du taux du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) et du potentiel biologique antioxydant (BAPs) chez <i>Paramecium sp.</i> exposé aux concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole	71

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans les sols conditionnant leur disponibilité et, par conséquent, leur efficacité phytosanitaire ou la manifestation de leur caractère polluant	7
02	Synthèse des études épidémiologiques disponibles sur les effets neurologiques chroniques des pesticides	10
03	Emploi relatif des bioindicateurs	15
04	Représentation de la structure d'une paramécie	17
05	Cycles de développement des Protozoaires Ciliés	18
06	Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants	24
07	Electrode d'oxygène, Hansatech Instruments	33
08	La réaction entre le TBA et le MDA	38
09	Système d'analyse photométrique, FRAS 4	39
10	Aspect des colonies de <i>Fusarium</i> sp. sur le milieu de culture PDA après 7 jours d'incubation à 25°C	40
11	Aspect des spores de <i>Fusarium</i> sp. sous microscope optique (Gr ×40×10)	40
12	Evolution de la taille des colonies de <i>Fusarium</i> sp. exposé aux concentrations croissantes du fongicide (Cas du Tebuconazole)	41
13	Pourcentages d'inhibition chez <i>Fusarium</i> sp. exposé à (a) Thirame, (b) Tebuconazole et (c) la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole	42
14	Effets des concentrations de croissantes du Thirame sur la croissance cellulaire de <i>Paramecium</i> sp. après 96 heures de traitement	44
15	Effets des concentrations de croissantes du Tebuconazole sur la croissance cellulaire de <i>Paramecium</i> sp. après 96 heures de traitement	44
16	Effets des concentrations de croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur la croissance cellulaire de <i>Paramecium</i> sp. après 96 heures de traitement	45
17	Evolution du pourcentage de réponse chez <i>Paramecium</i> sp. exposé aux	47

	concentrations croissantes du Thirame	
18	Evolution du pourcentage de réponse chez <i>Paramecium sp.</i> exposé aux concentrations croissantes du Tebuconazole	48
19	Evolution du pourcentage de réponse chez <i>Paramecium sp.</i> exposé aux concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole	48
20	CE50 du Thirame mesurée chez <i>Paramecium sp.</i> après 4 jours de traitement	49
21	CE50 du Tebuconazole mesurée chez <i>Paramecium sp.</i> après 4 jours de traitement	49
22	CE50 de la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole mesurée chez <i>Paramecium sp.</i> après 4 jours de traitement	50
23	Morphologie d'une cellule normale de <i>Paramecium sp.</i> observé sous microscope optique	51
24	Anomalies morphologiques observées chez <i>Paramecium sp.</i> exposé aux plus fortes concentrations des 3 fongicides	52
25	Apparition de bourgeonnement au niveau de la membrane cellulaire	53
26	Formation de vésicules intracellulaires chez <i>Paramecium sp.</i>	53
27	Diffusion des constituants cellulaires	53
28	Evolution de l'activité respiratoire en fonction des différentes concentrations du Thirame	54
29	Evolution de l'activité respiratoire en fonction des différentes concentrations du Tebuconazole	55
30	Evolution de l'activité respiratoire en fonction des différentes concentrations de la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole	56
31	Effets des concentrations croissantes du Thirame sur l'évolution de l'activité Catalase chez <i>Paramecium sp.</i>	58
32	Effets des concentrations croissantes du Tebuconazole sur l'évolution de l'activité Catalase chez <i>Paramecium sp.</i>	59
33	Effets des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur l'évolution de l'activité Catalase chez <i>Paramecium sp.</i>	60
34	Effets des concentrations croissantes du Thirame sur le taux du GSH	61

	chez <i>Paramecium sp.</i>	
35	Effets des concentrations croissantes de Tebuconazole sur le taux du GSH chez <i>Paramecium sp.</i>	61
36	Effets des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur le taux du GSH chez <i>Paramecium sp.</i>	62
37	Effets des concentrations croissantes du Thirame sur l'évolution de l'activité Glutathion S-transferase chez <i>Paramecium sp.</i>	63
38	Effets des concentrations croissantes du Tebuconazole sur l'évolution de l'activité Glutathion S-transferase chez <i>Paramecium sp.</i>	63
39	Effets des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur l'évolution de l'activité Glutathion S-transferase chez <i>Paramecium sp.</i>	64
40	Effets des concentrations croissantes du Thirame sur l'évolution de l'activité Glutathion peroxydase chez <i>Paramecium sp.</i>	65
41	Effets des concentrations croissantes du Tebuconazole sur l'évolution de l'activité Glutathion peroxydase chez <i>Paramecium sp.</i>	66
42	Effets des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur l'évolution de l'activité Glutathion peroxydase chez <i>Paramecium sp.</i>	67
43	Effets des concentrations croissantes de Thirame sur le taux des TBARS chez <i>Paramecium sp.</i>	68
44	Effets des concentrations croissantes du Tebuconazole sur le taux des TBARS chez <i>Paramecium sp.</i>	68
45	Effets des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur l'évolution du taux des TBARS chez <i>Paramecium sp.</i>	69

Acronymes

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AERMC	Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse
ASC	Ascorbate
ASS	Acide sulfosalicylique
BAP	Potentiel Antioxydant Biologique
BSA	Bovin Sérum Albumine
CAS	Chemical Abstracts Service
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro 2, 4 dinitrobenzène
CE50	Concentration Effective médiane
CEr50	Median effective concentration on growth rate
CI50	Concentration inhibitrice moyenne
CL50	Concentration létale moyenne
DHA	Dehydroascorbate
DTNB	Acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque
EDTA	Ethylène Diamine Tetra-Acétique
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GPx	Glutathion Peroxydase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfure
GST	Glutathion-S-Transferase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HClO	Acide hypochlorite
KCl	Chlorure de potassium
MDDEP	Ministère du Développement Durable, de l'environnement et des Parcs
NAD(P)H	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NAD (P)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NO°	Oxyde Nitrique
NO₃-	Peroxynitrite
¹O₂	Oxygène Singulet
O₂°-	Radical Superoxyde
°OH	Radical Hydroxyl
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ROMs	Métabolites Réactifs de l'Oxygène
ROO°	Radical peroxyde
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Super Oxyde Dismutase
TBA	Acide thiobarbiturique
TBARS	Substances Réactives à l'acide Thiobarbiturique
TBS	Tris-Buffered Saline
TCA	Acide Trichloroacétique
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane, (2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3-Propanediol)
UICPA	International Union of Pure and Applied Chemistry

Introduction générale

Si l'efficacité des pesticides n'est plus à démontrer, leur utilisation pose de sérieux problèmes pour l'environnement et la santé humaine et animale. En effet, l'emploi abusif et non contrôlé des produits agrochimiques s'est accru considérablement pendant les 35 dernières années (**FAO, 2015**). L'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) a estimé que d'ici l'an 2020, la production mondiale sera de 85% supérieure à ce qu'elle était en 1995 (**OCDE, 2001**). Ces produits phytosanitaires ne sont pas sans risques pour l'Homme et son environnement (l'air, l'eau et le sol). Ils contribuent massivement à la dégradation de l'écosystème et peuvent être lessivés dans les eaux souterraines ou s'écouler dans les eaux de surface (**Maksymiec, 1997**) affectant ainsi des espèces « non-cibles » de la faune et de la flore : Féminisation de certaines espèces de poissons, croissance incontrôlée des algues, déclin de la population mondiale des amphibiens, baisse dramatique des populations d'insectes telles que les abeilles... etc. En outre, les pesticides réduisent la biodiversité et perturbent les écosystèmes.

Les diverses espèces présentes dans un écosystème naturel, sont en relation étroite les unes avec les autres et la disparition ou la diminution de la densité d'une espèce donnée peut entraîner des bouleversements importants dans l'ensemble de la biocénose. Comme la lutte chimique expose inévitablement des organismes non-cibles, des effets secondaires indésirables peuvent se manifester sur des espèces, des communautés voire des écosystèmes.

Les impacts des pesticides sur l'environnement et la biodiversité sont, cependant, difficiles à circonscrire vu le nombre élevé d'organismes vivants, leur sensibilité différente aux pesticides, la grande diversité des milieux et des pesticides employés, ainsi que la difficulté de recenser les effets engendrés. Les risques attribuables aux pesticides restent donc encore incertains et relativement méconnus.

Caractériser les risques occasionnés par ces polluants sur un écosystème revient à étudier le danger de la substance et ses effets toxiques sur les composantes de l'écosystème (**Sutter, 1993**) et constitue donc est une étape clé dans la prévention de la contamination de l'environnement. L'emploi d'un modèle de simulation semble la meilleure solution pour comprendre la vaste gamme d'effets toxiques causés par les pesticides (**Wan et al., 1994**).

C'est une démarche intéressante car elle permet d'estimer réellement l'impact environnemental d'un pesticide et se prête à la validation des résultats.

Néanmoins, le choix de telle ou telle espèce ne peut résulter que d'un compromis entre représentativité et faisabilité. Les modèles communs utilisés en toxicologie environnementale comprennent les bactéries, les algues, les daphnies, et les poisson-zèbre (**Dewez *et al.*, 2005 Lin et Janz, 2006, Sancho *et al.*, 2009, Sunil *et al.*, 2015**). Cependant, une variété d'organismes, représentative des écosystèmes aquatiques, a été introduite avec succès dans les études toxicologiques (**Miyoshi *et al.*, 2003**) : Les protozoaires.

A la différence des algues ou des bactéries, les cellules protozoaires ne possèdent pas de paroi. Ainsi, les xénobiotiques pénètrent dans la cellule plus facilement, puis interagissent directement avec les structures cellulaires et les organites, permettant de mieux élucider leurs mécanismes d'action et les atteintes provoquées.

La paramécie, largement présente dans les eaux douces, compte parmi les modèles cellulaires les plus couramment utilisés pour les études portant sur les effets toxicologiques de divers contaminants (**Miyoshi *et al.*, 2003**). Ce cilié est largement utilisé pour évaluer les effets toxiques d'une multitude de xénobiotiques aussi variés les uns que les autres : colorants alimentaires, substances cancérigènes, produits chimiques synthétiques, pesticides et autres molécules de synthèse (**Epstein *et al.*, 1963 ; Sako *et al.*, 1977 ; Edmiston *et al.*, 1984 ; Venkateswara Rao *et al.*, 2008 ; Saib *et al.*, 2014**).

C'est donc dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude des effets biologiques et/ou toxiques de 3 formulations commerciales de fongicides dont les ingrédients actifs sont : le Thirame, le Tebuconazole et la co-formulation Fludioxonil – Difenoconazole.

Le choix des substances actives étudiées a été guidé par leur mode d'action : ils agissent contre la fusariose du blé, la céréale la plus consommée en Algérie ; leur disponibilité sur le marché (en vente libre) et leur utilisation à grande échelle dans la région de Annaba, souvent incontrôlée.

Objectif du travail :

La présente étude porte essentiellement sur l'évaluation de la toxicité potentielle de ces 3 contaminants chimiques, sur un organisme eucaryote unicellulaire, *Paramecium sp.* Ce modèle d'exposition permet l'étude d'un large panel de paramètres biologiques. Des bio-essais ont été conduits afin d'évaluer le degré de sensibilité de cet organisme vis-à-vis de ces trois molécules testées et d'établir une relation entre la dose d'exposition et l'étendue des dommages au niveau cellulaire et subcellulaire.

Pour cela, un premier volet a été consacré au suivi de la croissance cellulaire de *Paramecium sp.* en présence des trois xénobiotiques et d'estimer par la suite taux de mortalité ainsi que la CE50.

Dans un second volet, nous nous sommes intéressés au suivi d'un métabolisme clé à savoir le métabolisme respiratoire à travers notamment l'évaluation de la consommation d'oxygène par les paramécies afin de mettre en évidence une implication éventuelle de la mitochondrie dont le rôle dans le déclenchement du stress oxydant et radicalaire est maintenant bien établi.

Ceci nous conduira logiquement à étudier l'effet de ces 3 fongicides sur le système antioxydant via la mesure de certains biomarqueurs : la quantification du taux de Glutathion réduit (GSH), l'activité Catalase (CAT), l'activité Glutathion S-transferase (GST), l'activité Glutathion peroxydase (GPx), le taux des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) ainsi que l'évaluation du taux des métabolites réactifs de l'oxygène (ROM) et du potentiel biologique antioxydant (BAP).

La première partie du manuscrit a été consacrée à une synthèse bibliographique sur les pesticides, en rappelant leur grande abondance dans l'environnement ainsi que leurs caractéristiques toxicologiques et écotoxicologiques. Nous avons ensuite énuméré l'essentiel des outils disponibles pour l'évaluation des risques écotoxicologiques. Cette partie regroupe les différentes techniques biologiques et biochimiques mises en œuvre tout au long de ce travail.

L'ensemble des résultats concernant l'étude de la toxicité des fongicides sur la croissance ainsi que les paramètres physiologiques et biochimiques, ont été détaillés.

Enfin, nous achèverons ce travail par une discussion de l'ensemble de nos résultats étayée par une étude bibliographique assez exhaustive avec, en sus, une conclusion générale et les perspectives sur lesquelles ce travail serait susceptible de déboucher.

Revue bibliographique

1. Les pesticides

L'utilisation des pesticides en agriculture remonte à l'antiquité. De tout temps, les êtres humains ont cherché à protéger leurs cultures des ravages de la nature. Ainsi, Homère mentionnait l'usage du Soufre comme fumigant et Pline recommandait l'Arsenic comme insecticide (**Lhoste et Grison, 1989 ; Colin, 2000**). En 1681, l'utilisation des dérivés de l'Arsenic fut conseillée pour protéger les végétaux (**Lhoste et Grison, 1989**) mais les premières tentatives de traitement chimique des cultures ne furent conduites qu'au XVIIIème siècle, lors de la première révolution agricole. L'emploi des pesticides en agriculture ne prit véritablement son essor que vers la fin du XIXème siècle et la première moitié du XXème siècle.

En effet, au XIXe siècle, la chimie minérale s'est développée pour répondre aux graves épidémies qui atteignent les productions agricoles vitales (mildiou de la pomme de terre en 1845, infestations de rouilles sur les céréales...). La chimie minérale a fourni de nombreux pesticides minéraux à base de sels de Cuivre (utilisés actuellement en agriculture biologique). Les fongicides à base de Sulfate de Cuivre se répandent, en particulier la fameuse bouillie bordelaise (mélange de Sulfate de Cuivre et de chaux) pour lutter contre les invasions fongiques de la vigne et de la pomme de terre. Des sels de Mercure sont employés à partir du début du XXème siècle pour le traitement des semences. Les insecticides tels l'Arsénite de Cuivre, l'Acétoarsénite de Cuivre, l'Arséniate de Plomb font aussi leur apparition. Le Pyrèthre, une poudre provenant de fleurs du genre *Chrysanthemum*, et la Roténone, qui est dérivé de la racine des légumes tropicaux, sont introduits comme insecticides à cette même époque (**ORP, 2016**).

L'ère des pesticides de synthèse débute vraiment dans les années 1930, profitant du développement de la chimie organique de synthèse et de la recherche sur les armes chimiques durant la Première Guerre mondiale.

La Seconde Guerre mondiale a généré, à travers les recherches engagées pour la mise au point de gaz de combat, la famille des Organochlorés qui fait son apparition dans les années 1940. Ce groupe chimique a connu un développement considérable, encore de mise aujourd'hui, et a servi de façon intensive partout en agriculture et en aménagement forestier mais aussi dans la protection des bâtiments de bois, face à une vaste gamme d'insectes

nuisibles. Des désherbants sélectifs pour les céréales, comme le Pentachlorophénol et les Xanthates 01112s, furent synthétisés. A cette époque, furent aussi découverts les premiers herbicides Auxiniques appartenant au groupe des Phénoxy-acétiques (2,4-D, 2,4,5-T et MCPA) qui conduisirent à la mise au point des premiers herbicides systémiques et sélectifs pour les dicotylédones (**Lhoste et Grison, 1989**).

Tableau 1. Historique de l'évolution des plus grandes familles de pesticides des années 1900 à nos jours (LNE, 2008).

	Herbicides	Fongicides	Insecticides
Avant 1990	Sulfate de cuivre Sulfate de fer	Soufre Sels de cuivre	Nicotine
1900 - 1920	Acide sulfurique		Sels d'arsenic
1920 - 1940	Colorants nitrés		
1940 - 1950	Phytohormones		Organochlorés Organophosphorés
1950 - 1960	Triazines, Urés Substituées Carbamates	Dithiocarbamates Phtalimides	Carbamates
1960 - 1970	Dipyridyles Toluidines	Benzimidazoles	
1970 - 1980	Amino-phosphates	Triazoles Dicarboximides Amides, Phosphites Morholines	Pyréthrinoides Benzyoyl-urées (Régulateurs de croissance)
1980 - 1990	Sulfonylurées		
1990 - 2000		Phénylpyrroles Strobilurines	

Dans les années 1950, furent identifiées les propriétés herbicides de la famille des Triazines, qui connurent un succès important auprès des agriculteurs. La gamme des pesticides disponibles s'est alors rapidement diversifiée et leur usage a connu un très fort développement au cours des décennies suivantes.

En 1950 - 1955 furent développés, aux États-Unis, les herbicides de la famille des Urées substituées (Linuron, Diuron), suivis, peu après, par les herbicides du groupe Ammonium Quaternaire. En 1966, furent découverts les fongicides du type Benzimidazole et Pyrimide, suivi par les fongicides Imidazoliques et Triazoliques dits fongicides IBS (Inhibiteurs de la Synthèse des Stéroïdes) qui représentent actuellement le plus gros marché des fongicides. Dans les années 1970 - 1980 apparaît une nouvelle classe d'insecticides, les Pyréthrinoides qui dominent pour leur part le marché des insecticides (Tableau 1). Ainsi, de 1945 à 1985, la consommation de pesticides a doublé tous les dix ans.

L'usage de ces produits a connu un très fort développement au cours des décennies passées, les rendant quasiment indispensables à la plupart des pratiques agricoles, quel que soit le niveau de développement économique des pays.

1.1. Le devenir des pesticides

Le transfert des produits phytosanitaires dans l'environnement dépend du type d'épandage pratiqué, des propriétés intrinsèques des produits épandus (solubilité, volatilité, polarité...), des doses utilisées, ainsi que des conditions pédoclimatiques caractérisant le milieu où ils sont introduits. Il est régi par divers mécanismes biotiques et abiotiques qui interfèrent, se conjuguent ou s'opposent.

Dès qu'ils ont atteint le sol ou la plante, les pesticides commencent à se dissiper selon deux processus majeurs : la dégradation (biotique et/ou abiotique pouvant conduire jusqu'à la minéralisation) et la dispersion. Les matières actives non dégradées ou leurs éventuels métabolites peuvent aussi se volatiliser, ruisseler ou être lessivées et atteindre les eaux de surface ou souterraines, être absorbés par les plantes ou les organismes du sol, ou rester dans le sol et se retrouver piégés par rétention (Figure 1). Le ruissellement emporte en moyenne 2% d'un pesticide appliqué sur le sol, rarement plus de 5 à 10% (**Leonard, 1990 ;**

(Schiavon *et al.*, 1995) ; les pertes par lessivage sont généralement moins importantes (Taylor et Spencer, 1990 ; Schiavon *et al.*, 1995). En revanche, on a parfois constaté des pertes de 80 à 90% du produit appliqué par volatilisation (Glotfelty *et al.*, 1984 ; Taylor et Spencer, 1990).

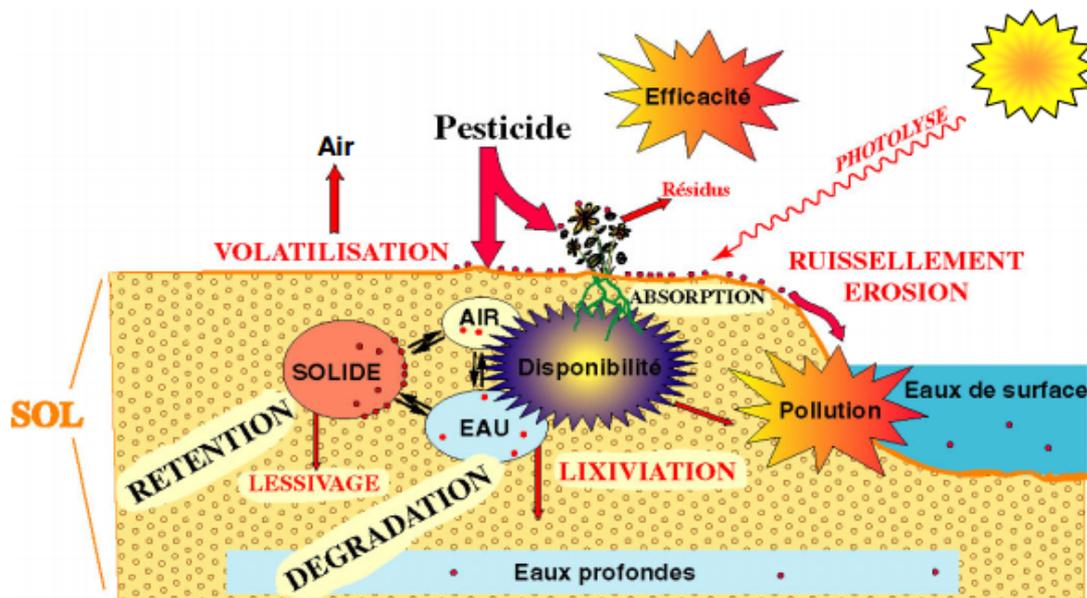


Figure 1. Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans les sols conditionnant leur disponibilité et, par conséquent, leur efficacité phytosanitaire ou la manifestation de leur caractère polluant (Barriuso *et al.*, 1996).

En France une étude de l'IFEN (2002) montre que 96 % des eaux de surface et 61 % des nappes phréatiques contiennent des pesticides et ceci après des décennies d'agriculture industrielle polluante.

1.2. Toxicité des pesticides

Les pesticides ont constitué un énorme progrès dans la maîtrise des ressources alimentaires. L'augmentation des rendements des terres agricoles a permis de limiter la déforestation ; ainsi les experts estiment que leur utilisation, en 50 ans, a permis de préserver 50% de la surface de la forêt actuelle (International Workshop on Crop Protection Chemistry, 14 - 17 février 2005, San Jose, Costa Rica.). Cependant, le revers de la médaille est apparu ; dès les années soixante, les premières accusations d'atteinte à la

santé de l'homme et à l'environnement se firent entendre. Depuis, le débat sur les risques encourus de la lutte chimique s'est prolongé. En effet, la lutte chimique expose inévitablement des organismes « non-cibles » aux effets secondaires indésirables des traitements qui peuvent se manifester sur des espèces, des communautés ou des écosystèmes entiers. Leur usage intensif et leur persistance dans l'environnement a conduit à des phénomènes de résistance chez les plantes (**Lorraine-Colwill et al., 2003 ; Holmes, 2010 ; Walker et al., 2011**), mais aussi chez les insectes (**Haubruge et Amichot, 1998**) et a engendré des troubles de la reproduction et du développement chez les animaux (**Soso et al., 2007 ; Grote et al., 2008 ; Stefanidou et al., 2009**). Ceci montre les limites et les dangers de ces substances pour l'environnement, pour les écosystèmes (**Margni et al., 2002 ; Kielak et al., 2011**) mais également pour les êtres humains (**Alavanja et al., 2004 ; Knopper et Lean, 2004 ; Kamel et al., 2007**).

1.2.1. Effets des pesticides sur la santé humaine (Epidémiologie)

De par leur capacité à se disperser au-delà de la cible visée, les pesticides constituent un risque pour les organismes non-cibles, l'Homme est évidemment concerné, et en premier lieu les utilisateurs de pesticides dans un contexte d'usage professionnel.

L'OMS (1989) estimait à 3 millions le nombre d'intoxications par les pesticides dans le monde et à 20 000 celui de cas mortels; la majorité de ces empoisonnements et 99% des décès surviennent dans le tiers monde (**Tinoco et Halperin, 1998**). Plus récemment, la Banque mondiale a déclaré que 355.000 personnes dans le monde meurent chaque année d'empoisonnement involontaire par des pesticides (**WB, 2008**).

Plus de 150 études réalisées dans 61 pays et régions du monde ont abouti à la constatation de la présence des résidus de pesticides dans les tissus adipeux, le cerveau, le sang, le lait maternel, le foie, le placenta, le sperme et le sang du cordon ombilical (**Rachel, 1962**). Aux États-Unis, une étude a montré que 99% de sujets ayant fait l'objet d'investigations sur la toxicité des Organochlorés sont déclarés contaminés en raison de la présence de DDT (ou des dérivés de cet Organochloré) dans leurs tissus adipeux (**Jensen, 1983**). Un nombre conséquent d'études épidémiologiques ont montré que les personnes exposées aux pesticides encourent plus de risque de développer de nombreuses pathologies telles que le

cancer (**Pluygers *et al.*, 1994**), les maladies neurologiques (**Jamal, 1997**), les malformations congénitales (**Bell *et al.*, 2001**) et les problèmes d’infertilité (**Greenlee *et al.*, 2003**).

Il existe par ailleurs des arguments en faveur de pathologies respiratoires, immunologiques, dermatologiques, la survenue de troubles neurologiques tels que les troubles neurocomportementaux (altérations de la mémoire, de l’attention,...), les maladies neuro-dégénératives (maladie de Parkinson, maladie d’Alzheimer, sclérose latérale amyotrophique) et les troubles anxio-dépressifs (**Baldi et Lebailly, 2013**).

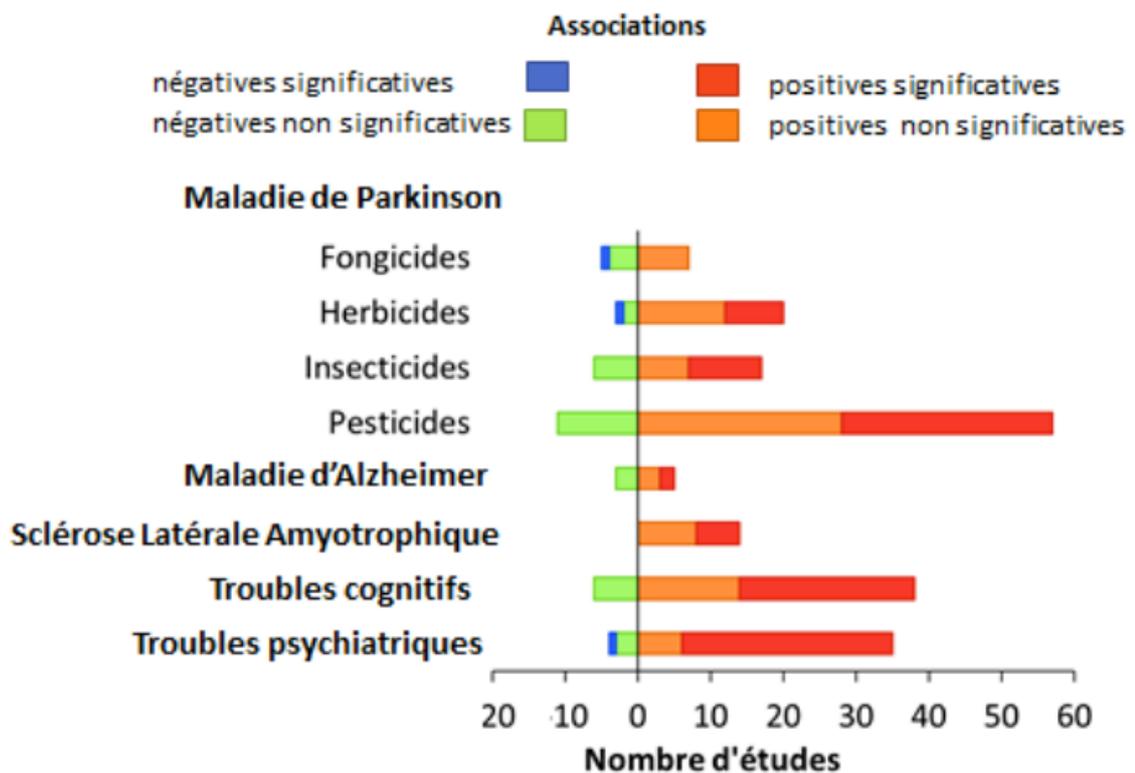


Figure 2. Synthèse des études épidémiologiques disponibles sur les effets neurologiques chroniques des pesticides (d'après Blanc-Lapierre *et al.*, 2012).

La figure 2, montre l’association positive, statistiquement significative, entre l’exposition aux pesticides et la survenue des maladies et des troubles.

1.2.2. Effets des pesticides sur la biodiversité (Écotoxicité)

C'est le manque de sélectivité des pesticides vis-à-vis de leur cible qui provoque la plupart des effets nocifs pour l'environnement. Les animaux absorbent les pesticides via la nourriture ou l'eau, via l'air respiré ou au travers leur peau ou leur cuticule. Ayant franchi diverses barrières, le toxique atteint les sites du métabolisme ou est stocké.

Pour 187 espèces d'**oiseaux** menacées dans le monde, la première menace est la pollution chimique, (**Berny et al., 1997**). Dès le début des années 50, on a rapporté des mortalités dans des champs traités au DDT ou avec d'autres produits (**Madhun et Freed, 1990**). Il s'agissait d'empoisonnements secondaires, les oiseaux ayant gobé des insectes traités par les insecticides. La pratique, à cette époque, du traitement des graines aux Organochlorés a tué un nombre important d'oiseaux granivores (**Hayo et Van Der Werf, 1997**).

La mort des **mammifères** imputable aux pesticides est généralement la conséquence de l'ingestion d'une nourriture contaminée. Les prédateurs accumulent des quantités de résidus plus élevées que les herbivores. Des études ont pu montrer que l'exposition péri- ou néonatale de mammifères à des pesticides comme l'Aldrine, l'Atrazine, le Chlordane et la Dieldrine pouvait perturber de diverses façons leur différenciation sexuelle (**Leblanc, 1995**).

Même si la plupart des traitements sont appliqués sur les parties aériennes des plantes, une bonne part du produit atteint toujours le sol, où vivent des bactéries, des champignons, des algues, des vers de terre et des insectes. Ayant passé en revue les résultats des recherches sur l'agriculture intégrée, **Holland et al. (1994)** sont arrivés à la conclusion que l'emploi massif de pesticides conduit en général à la diminution des effectifs d'**insectes** et autres **invertébrés**. Les insecticides à large spectre comme les Carbamates, les Organophosphorés et les Pyréthroïdes peuvent provoquer le déclin de population d'insectes bénéfiques tels que les abeilles, les araignées et les coléoptères. Beaucoup de ces espèces jouent un rôle important dans le réseau alimentaire ou comme ennemis naturels des insectes nuisibles. Plusieurs hypothèses relient la surmortalité des abeilles connue en Europe, depuis le début des années 2000, à l'emploi de Néonicotinoïdes. En raison de leur importance économique, la Commission Européenne a proposé aux Etats membres de

suspendre, pendant deux ans, l'utilisation de trois pesticides de la famille des Néonicotinoïdes sur les semences pour les plantations qui attirent les abeilles (colza, tournesol, maïs et coton) car selon la FAO, 71% des espèces cultivées qui fournissent 90% des aliments dans le monde, sont polinisées par des abeilles (**Arbach, 2012**).

Plusieurs études se sont intéressées aux effets nocifs des pesticides sur la **microflore du sol**. Ainsi selon **Mäder et al. (2002)**, les racines des plantes colonisées par les mycorhizes étaient 40% plus élevées dans les systèmes biologiques que dans les exploitations conventionnelles. **Boldt et Jacobsen. (2006)** ont montré aussi que les herbicides Sulfonylurées, Metsulfuron et dans une moindre mesure le Chlorsulfuron, sont à l'origine d'une réduction de la croissance des bactéries du sol du genre *Pseudomonas*. Par ailleurs, en Afrique du Sud, l'activité des organismes du sol est plus importante dans les sols des vignobles biologiques que dans ceux des sites traités conventionnellement (**Reinecke et al., 2008**). Le Captane (un fongicide) et le Glyphosate (un herbicide) est à l'origine des changements apparus au sein de la communauté bactérienne du sol (**Widenfalk et al., 2008**). Certains insecticides Organophosphorés (le Diméthoate par exemple) peuvent réduire l'activité et la biomasse des micro-organismes du sol (**Eisenhauer et al., 2009**).

Les pesticides peuvent provoquer des dégâts importants dans la **faune aquatique**, les mortalités de poissons étant les plus spectaculaires. **Pimentel et al. (1993)** estiment qu'entre 1977 et 1987, aux États-Unis, 6 à 14 millions de poissons sont morts, chaque année, à cause des pesticides. Ainsi, l'Atrazine est à l'origine d'une atteinte du système immunitaire des salamandres tigrées qui s'est traduite par la réduction du nombre de leurs leucocytes. Les urées substituées (herbicides) telles que l'Isoproturon et le Diuron contaminent souvent les rivières, les lacs et les eaux souterraines ; et la plupart des produits de décomposition du Diuron sont plus toxiques pour les micro-organismes cellulaires que la substance d'origine (**Bonnet et al., 2007**). Les fongicides à base de Cuivre sont hautement toxiques pour les organismes aquatiques. Le risque d'accumulation du Cuivre dans les poissons et certains autres organismes aquatiques peut être élevé (**EFSA, 2008**). En Californie, la population des têtards de la rainette a baissé, en raison de certaines perturbations dans leur métabolisme, entre autres la réduction de l'activité cholinestérase,

révélant une exposition aux Organophosphorés et/ou aux Carbamates (**Sparling et al., 2001**).

1.3. Caractérisation de la toxicité des pesticides en milieu aquatique

Les pesticides regroupent des substances très hétérogènes, tant au niveau des caractéristiques physico-chimiques, du devenir dans l'environnement, que des mécanismes d'action. La caractérisation des expositions environnementales à ces produits est donc un exercice intrinsèquement difficile tant au niveau qualitatif que quantitatif, en raison de l'évolution permanente du nombre de substances depuis les années 1950.

L'évaluation des effets toxiques potentiels des contaminants chimiques vis-à-vis de la flore et de la faune est en partie basée sur la réalisation, en laboratoire, d'essais de toxicité. L'objectif de ces essais est de détecter, dans des conditions expérimentales précises, l'écotoxicité potentielle d'une substance chimique ou de tout autre échantillon vis-à-vis des organismes vivants. Ces essais permettent de déterminer les concentrations induisant 10, 20, ..., 50 voire 100 % d'effet recherché ainsi que la plus forte concentration n'induisant pas d'effet délétère, et ceci en fonction de la durée d'exposition.

1.3.1. Principales approches expérimentales adoptées

L'impact d'un xénobiotique sur les organismes peut être appréhendé à différents niveaux d'organisation biologique allant de la cellule à l'ensemble de la communauté, en intégrant ou non les interactions entre les différents niveaux trophiques (**Guckert, 1996**).

A. Les tests d'écotoxicité monospécifiques : Ce sont des tests conduits en laboratoire au cours desquels des organismes d'une seule espèce sont exposés à un milieu (une substance, un produit, une solution, un rejet, voire des mélanges...). Ces essais sont menés dans des conditions contrôlées de lumière, salinité, température, milieu de culture ou support d'élevage et font l'objet de protocoles standardisés ou mieux d'une normalisation (**Taub, 1989 ; AERMC, 2002 ; Triffault-Bouchet, 2004 ; Volatier, 2004 ; Clément, 2006**). Les microorganismes représentent des modèles de choix pour la réalisation de ces essais.

B. Les tests d'écotoxicité plurispécifiques : Une validation terrain à l'aide d'études *in situ* permet de mieux appréhender les impacts en conditions réelles d'une contamination du milieu par une (ou des) substance(s) toxique(s). Ces essais, permettent d'appréhender les effets des polluants sur des communautés appartenant à un ou plusieurs niveaux trophiques dans des conditions simplifiées et contrôlées. Cependant, ces études nécessitent des équipements expérimentaux spécifiques et sont généralement très coûteuses et les résultats ne sont pas toujours évidents à exploiter car il est difficile de contrôler tous les paramètres comme pour les essais *in vitro* (Clément, 2006).

2. Concept de bioindicateur / bioindication

L'intégrité écologique d'un milieu naturel est déterminée par la combinaison de son degré d'intégrité chimique, physique et biologique. La dégradation d'une ou plusieurs de ces composantes se manifeste généralement dans la biocénose, c'est-à-dire dans les différentes communautés biologiques (MDDEP, 2011). En ce sens, les altérations morphologiques, comportementales, tissulaires ou physiologiques, ainsi que l'abondance, le succès reproductif et la mortalité des espèces animales et végétales constituent des variables observables et mesurables reflétant l'état de leur habitat (Harrag, 2012 ; Kaiser, 2001 ; Kerckhove, 2012). La bioindication réfère donc à un processus d'analyse de divers indicateurs biologiques qui s'inscrit dans la biosurveillance de la qualité des écosystèmes.

Selon Banaru et Perez (2010), un bioindicateur est un « organisme ou ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence, aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoqués ». Jebali *et al.* (2006) définissent un bioindicateur comme une espèce animales ou végétale qui, du fait de sa particularité écologique (sédentaire, benthique...) réagit à un polluant par une modification nette et spécifique de sa fonction vitale et constitue donc, l'indice précoce de modifications biotiques ou abiotiques de l'environnement.

L'utilisation des bioindicateurs est financièrement plus économique puisqu'elle permet généralement d'éviter d'employer du matériel technologique coûteux et d'économiser du temps (Markert *et al.*, 2003 ; Carignan et Villard, 2002). De plus, grâce à leur capacité de bioaccumulation, certains bioindicateurs permettent une détection précoce des polluants ou des perturbations (Kaiser, 2001). Par ailleurs, les bioindicateurs renseignent sur la biodisponibilité des polluants plutôt que sur leur concentration totale dans le milieu (Markert *et al.*, 2003). Les bioindicateurs peuvent être divisées en 3 catégories :

- **Les indicateurs biologiques** : renseignent sur la composition et la structure des écosystèmes en observant la simple présence ou absence d'espèces.
- **Les organismes tests** : utilisés dans des procédures standardisées dans les laboratoires de recherche en écotoxicologie.
- **Les organismes de surveillance** : permettent de mesurer la qualité et la quantité de substances nuisibles dans l'environnement et dans quelques cas d'en détecter les effets. Ces organismes indicateurs peuvent déjà exister dans l'écosystème (surveillance passive) ou y être introduits de façon standardisée (surveillance active) (Champeau, 2005).

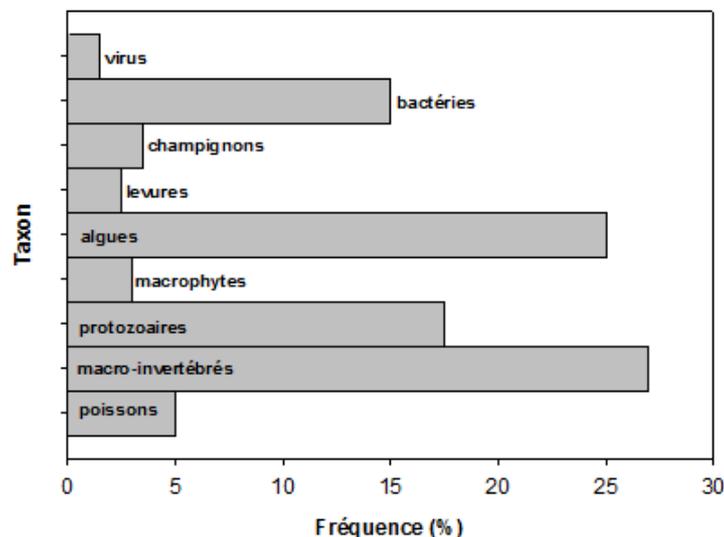


Figure 3. Emploi relatif des bioindicateurs (Pinel-Alloul, 2005).

3. La paramécie

3.1. Morphologie

La première utilisation d'organismes aquatiques pour évaluer le degré de pollution des eaux remonte au début du siècle. L'utilisation des protozoaires est devenue un outil précieux pour la détection des perturbations environnementale (Figure 3). Nous nous intéresseront, dans ce qui suit, au genre *Paramecium* et l'intérêt de son utilisation comme un modèle d'étude.

La paramécie fait partie des protozoaires les plus spécialisés et ceux qui ont la plus grande complexité structurelle. La cellule allongée présente une extrémité antérieure arrondie et une extrémité postérieure effilée. Son corps est uniformément recouvert de cils disposés en rangées régulières (Figure 4). Elle porte sur sa face ventrale une vaste dépression ciliée, qui s'élargit en un vestibule donnant accès au péristome (cavité buccale). Le cytostome s'ouvre au fond de celui-ci et débouche sur le cytopharynx. Les particules alimentaires y sont englobées au sein de vacuoles digestives qui migrent ensuite dans le cytoplasme. Durant ce transit, les aliments sont digérés, tandis que les déchets seront éliminés ultérieurement, au niveau d'une plage déterminée de la paroi : le cytoprocte (pore anal) (**Atlas de biologie animale, 2008**).

On observe dans l'endoplasme d'autres organites cellulaires importants et caractéristiques : les vacuoles pulsatiles (appelées aussi vésicules contractiles). Ces formations présentent un emplacement fixe et une activité rythmique : ils se remplissent d'eau puis ils la déversent à l'extérieur par une ouverture préexistante contribuant ainsi au contrôle de la pression osmotique de la cellule.

L'appareil nucléaire est composé de deux noyaux de tailles inégales et de fonctions complémentaires. Le macronucleus, de grande taille (35 μm x 12 μm), ovoïde, est impliqué dans la vie végétative. Le micronucleus, de petite taille (3 μm de diamètre), étroitement accolé au précédent, participe quant à lui à la vie reproductive (**Atlas de biologie animale, 2008**).

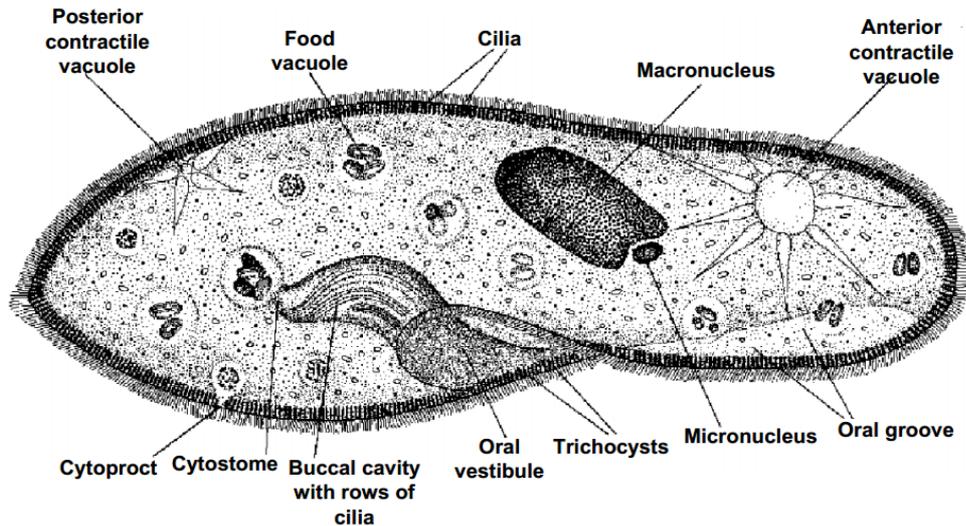


Figure 4. Représentation de la structure d'une paramécie (Anonyme).

3.2. Classification

Domaine: Eukaryota

Règne: Protozoa (Goldfuss, 1818, Rown, 1858)

Sous-règne: Biciliata

Super règne: Alveolata (Cavalier and Smith, 1991)

Embranchement: Ciliophora (Doflein, 1901, Copeland, 1956)

Sous-embranchement: Intramacronucleata (Lynn, 1996)

Classe: Oligohymenophorea (de Puytorac *et al.*, 1974)

Sous-classe: Peniculia (Fauré-Fremiet, *in* Corliss, 1956)

Ordre: Peniculida (Fauré-Fremiet, *in* Corliss, 1956)

Sous-ordre: Parameciina (Small and Lynn, 1985)

Famille: Parameciidae (Dujardin, 1840)

Genre: *Paramecium* (Müller, 1773)

3.3. Reproduction

3.3.1. Reproduction sexuée

Les paramécies se multiplient essentiellement par voie asexuée ou **division binaire transversale** (Figure 5). Cette division débute par celle de l'appareil nucléaire où le micronoyau se divise et le macronoyau se sépare en deux (par ségrégation de génomes), les organites se dupliquent ensuite le cytoplasme s'étrangle et les deux moitiés se séparent donnant naissance à 2 cellules filles, c'est la scissiparité (**Fokam, 2012**). Ce rythme de division est rapide : de deux à trois fois par jour pour un individu (**Purves et al., 2000**).

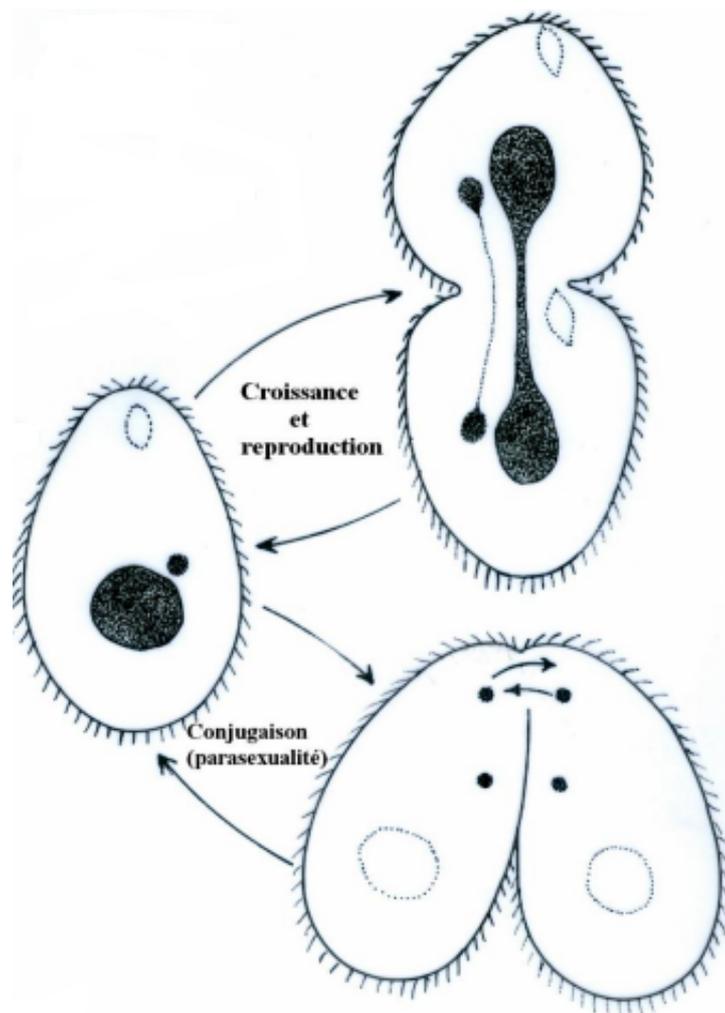


Figure 5. Cycles de développement des Protozoaires Ciliés (d'après Lynn et Small, 1989 et 2002).

3.3.2. Reproduction asexuée

Très souvent, lorsque les éléments nutritifs deviennent limités, le signal pour que les paramécies deviennent sexuellement actives est donné et ces dernières entrent en phase de **conjugaison** (Figure 5) dont le but est le brassage du patrimoine héréditaire. Deux cellules s'accolent par leur péristome, les cytoplasmes entre en communication et les deux cellules échangent leurs noyaux sexuels. Le macronoyau des deux conjugants dégénère et est éliminé tandis que les micronoyaux se divisent plusieurs fois de suite. Une des dernières mitoses est réductionnelle. Un seul micronoyau haploïde subsiste (**Fokam, 2012**).

Durant leur cycle de reproduction, et lorsque les conditions de vie deviennent nettement défavorables beaucoup de ciliés s'enkystent (ils cessent leurs déplacements, prennent une forme sphérique, perdent leurs cils, dédifférencient souvent leurs structures orales et s'enferment dans une double ou triple pellicule résistante et plus ou moins imperméable). Le kyste est une forme de résistance qui assure la dissémination des espèces (la vie ralentie dans les kystes peut durer fort longtemps). Lorsque les kystes se trouvent placés dans des conditions favorables les ciliés sortent des kystes et se redifférencient (phénomène du dékystement).

3.4. Intérêt de l'utilisation des paramécies dans les études écotoxicologiques

- ✓ L'avantage majeur d'utiliser des paramécies réside dans le fait que ce sont des eucaryotes unicellulaires possédant des systèmes biologiques comparables à ceux des organismes supérieurs, tel un noyau, une mitochondrie, un cytosquelette... etc.
- ✓ Ils se trouvent au sommet du réseau trophique microbien et occupent une place importante dans le fonctionnement des écosystèmes.
- ✓ Leur cils présentent la même structure que ceux des cellules épithéliales respiratoires des mammifères (**Gräf and Stahr, 1999**), de plus, les battements ciliaires chez les mammifères sont parfaitement comparables à ceux de la Paramécie (**Berrebbah, 1990**).

- ✓ La distribution cosmopolite, la facilité de culture et le court cycle de vie font de la paramécie un modèle attrayant pour les études toxicologiques et écotoxicologiques.
- ✓ Leurs réponses vis-à-vis des produits toxiques peuvent être similaires à celles des organismes pluricellulaires.
- ✓ La sensibilité aux changements environnementaux : l'organisation cellulaire de la paramécie expose ses récepteurs à l'environnement externe, la faisant réagir à des stimuli environnementaux (**Venkateswara, 2006**).
- ✓ Les paramécies sont relativement résistantes aux fortes concentrations des polluants (**Takahashi et al., 2005**) et elles permettent l'étude des mécanismes d'action des xénobiotiques à l'échelle cellulaire et subcellulaire.

4. Concept de biomarqueurs

Il est assez naturel de considérer la mort de l'organisme vivant comme l'effet toxique par excellence (car par nature irréversible). Les premiers bioessais de toxicité ont de ce fait, reposé sur l'observation et le comptage du nombre de décès d'organismes (poissons, invertébrés) en fonction de l'exposition aux contaminants. Ce pendant, depuis une trentaine d'années, les progrès de la biologie cellulaire ont permis une identification des mécanismes moléculaires de l'action toxique. Ces connaissances fondamentales ont ouvert la possibilité de forger de nouveaux outils d'évaluations et de surveillance basés sur les cascades d'événements moléculaires induits par l'exposition d'organismes vivants à des xénobiotiques. Ceci a donné naissance au concept de « biomarqueurs ».

C'est dans les années quatre-vingts que la notion de biomarqueurs prend forme. Une des premières définitions données aux biomarqueurs, au workshop sur les biomarqueurs organisé par la Société de Toxicologie et de Chimie de l'Environnement (**SETAC, 1989**) et celles de « *variations biochimiques, physiologiques, histologiques ou morphologiques, mesurées chez des organismes exposés à des conditions de stress liées à la présence de substances chimiques dans l'environnement* » (**Huggett, et al., 1992**). Ils représentent la réponse biologique initiale des organismes face à des perturbations ou des contaminations du milieu dans lequel ils vivent. En conséquence, ils sont en général plus sensibles que les

paramètres mesurés à un niveau supérieur d'organisation biologique tel que l'organe, l'individu ou la population (Stegeman, *et al.*, 1992).

5. Les acteurs du statut oxydant cellulaire

La cellule, et plus généralement l'organisme, ne peuvent se dispenser d'oxygène qui est un gaz indispensable à la vie et omniprésent. Les mitochondries utilisent 85% de l'O₂ présent dans l'organisme pour la production d'énergie. Cependant 3 à 5% de cet oxygène utilisé lors de l'activité métabolique normale est inévitablement à l'origine de radicaux libres, hautement toxiques (Pastre, 2005).

5.1. Les espèces réactives de l'oxygène : Définition et caractéristiques

Les Espèces réactives de l'Oxygène (ERO) sont souvent associées aux radicaux libres. Le terme de radical libre renvoie à n'importe quelle espèce capable d'une existence indépendante (d'où le terme de libre), contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur son orbitale la plus externe (Halliwell, 2006). Ainsi pour devenir plus stables elles ont tendance à compléter leur couche externe, en arrachant spontanément des électrons à d'autres molécules. D'ailleurs l'oxygène O₂ est considéré comme un radical, ou plus exactement comme un bi-radical puisqu'il possède 2 électrons non appariés. Cela explique son fort pouvoir oxydant. En outre il existe également des espèces non radicalaires ayant tout de même une réactivité accrue et qui peuvent donner, après une réaction chimique, des radicaux libres : c'est le cas du peroxyde d'hydrogène H₂O₂, de l'oxygène singulet ¹O₂ et le peroxydinitrite NO₃⁻ (Powers and Jackson 2008).

Toutes ces espèces réactives partagent la même propriété : elles sont relativement instables et ont une durée de vie ne dépassant pas quelques microfractions de secondes (Tableau 2); leur demi-vie est de 10⁻⁹ à 10⁻⁶ sec pour les plus instables, jusqu'à quelques dizaines de secondes (Tessier and Marconnet 1995). La courte durée de vie des ERO ne devrait pas leur permettre d'avoir une action majeure sur la cellule. Or cela est contrecarré par leur forte réactivité et leur capacité à produire des réactions en chaîne. En effet chaque espèce pourra générer à son tour une nouvelle espèce (Lenzi, 2011)

Tableau 2. Les principales ERO cellulaires, leurs caractéristiques ainsi que leurs cibles biologiques (Lenzi, 2011).

Catégorie	Espèce (Symbole et Nom)	Caractéristiques	ERO secondaire(s) produite(s)	Cibles biologiques	Demi-vie
ERO radicalaires	$O_2^{\circ -}$ anion superoxyde	Peu dangereux en soi car peu diffusible	H_2O_2 , NO_3^-	Acides gras polyinsaturés	Quelques sec
	HO° radical hydroxyle	ERO la plus dangereuse	ROO°	Acides gras polyinsaturés ADN Protéines	10^{-9} sec
	NO° oxyde nitrique	Gaz donc diffuse bien Peu dangereux en soi	NO_3^-		Quelques sec
	ROO° radicaux peroxydes	ERO de la «2e vague»		Acides gras polyinsaturé voisin	10^{-1} sec
ERO non radicalaires	1O_2 oxygène singulet	Très réactif	$O_2^{\circ -}$		10^{-6} sec
	H_2O_2 peroxyde d'hydrogène	Antiseptique	HO° , $HClO$		Dizaines de secondes
	NO_3^- peroxydinitrite	Très agressif		Protéines	
	$HClO$ acide hypochlorite	Diffuse bien		Protéines	
Métaux de transition	Fe, Cu, Mn fer, cuivre, manganèse	Si forme libre caractère radicalaire, Catalysent certaines réactions de formation d'ERO Mais propriétés antioxydantes importantes si forme liée			

Les radicaux libres sont toxiques au plus haut degré pour l'intégrité cellulaire, car ils ont la propriété d'attaquer et d'altérer les composants moléculaires de la cellule. Cependant, ils sont utiles à l'organisme à dose raisonnable : ils interviennent dans la signalisation et l'homéostasie cellulaire. Leur caractère toxique est contrecarré par un ensemble de systèmes de désactivation cellulaire : Enzymes anti oxydantes et les antioxydants non enzymatiques.

5.2. Le potentiel redox intracellulaire

Le potentiel redox intracellulaire, ou statut redox, est la résultante de l'état redox des couples oxydo-réducteurs présents dans la cellule. Cette notion peut s'apparenter à la notion de pH cellulaire associée aux couples acido-basiques. En pratique, les conditions redox régnant dans la cellule sont évaluées par le rapport des concentrations des formes oxydées et réduites des couples redox prépondérants, comme ceux du Glutathion et de l'Ascorbate (**Noctor, 2006**). Du fait de leurs fortes concentrations cellulaires, les deux couples GSSG/GSH et DHA/ASC agissent comme des tampons redox, à l'instar des tampons acido-basiques.

Il existe une très forte interconnexion entre les ERO et les molécules réductrices. Par exemple, le GSH et l'Ascorbate sont capables de réduire directement l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ils servent également de co-substrats aux enzymes antioxydantes détoxiquant les ERO. Ainsi, de part leur potentiel oxydant et via leurs interactions avec les couples redox majoritaires, les ERO contribuent à l'établissement du potentiel redox intracellulaire. Il résulte, de ces diverses interactions, une homéostasie redox cellulaire. Le potentiel redox cellulaire détermine les proportions relatives des espèces oxydées ou réduites de chaque couple redox. Ces proportions dépendent des potentiels redox (E°) de ces couples.

Cette fonction du potentiel redox cellulaire est particulièrement importante, car l'activité de nombreuses protéines, et en particulier de nombreux facteurs de transcription, est régulée par leur état redox (**Foyer and Noctor, 2005 ; Noctor, 2006**). Ainsi, dans des conditions normales, le cytoplasme cellulaire est un milieu très réducteur, ce qui a pour

conséquence de maintenir la grande majorité des groupements thiols à l'état réduit (**Foyer and Noctor, 2005**).

Dans les circonstances normales, les ERO sont produites en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de systèmes de défense adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents (**Favier, 2003**). Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydants/anti-oxydants est en équilibre. Cette dernière peut être rompue pour diverses raisons en faveur du système pro-oxydant et c'est l'installation d'un stress oxydant (**Gueye, 2007**).

5.3. Le stress oxydant

Le stress oxydant cellulaire apparaît comme une sorte de syndrome biochimique commun à toutes les cellules, correspondant à un dépassement des défenses antioxydantes par des molécules pro-oxydantes (**Grandjean 2005 ; Brigelius-Flohé 2009**).

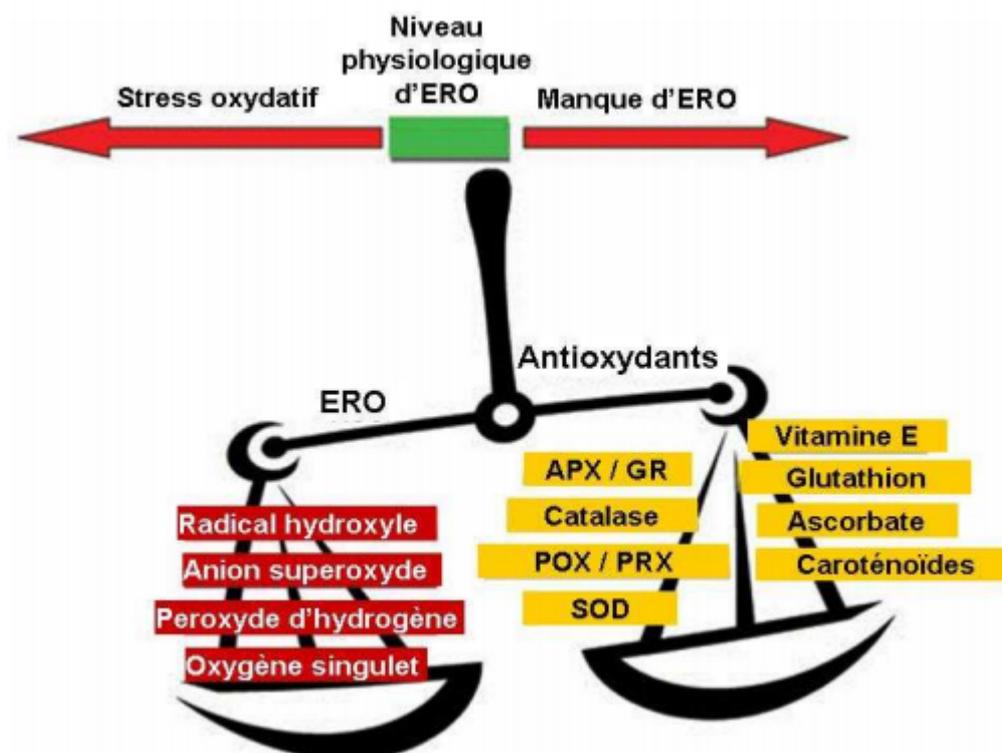


Figure 6. Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants (Pourrut, 2008)

D'un autre côté, **Jones (2006)** fait remarquer que cette définition n'a d'intérêt que si l'on peut connaître dans le détail ce déséquilibre entre espèces pro-oxydantes et antioxydantes. Il propose ainsi une autre définition plus axée sur l'équilibre redox d'une cellule : le stress oxydant correspond à un déséquilibre des voies de signalisation et de contrôle du statut redox de la cellule.

Powers (2008) reprend dans son article les 4 aspects nécessaires à la caractérisation d'un état de stress oxydant dans la cellule:

1. Formation de molécules réactives, oxydantes
2. Dommages oxydants aux composants macromoléculaires de la cellule
3. Diminution des espèces antioxydantes
4. Déséquilibre dans le statut redox

Sies (1997) définit le stress oxydatif comme une perturbation de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants, en faveur des premiers (Figure 6) conduisant à des dommages potentiels.

Matériel et Méthodes

Nous exposerons, dans ce qui suit, les différentes expérimentations réalisées avec les techniques et les protocoles adoptés. Ce chapitre s'intéresse principalement à l'étude de la réponse biologique de deux microorganismes : *Fusarium sp.* et *Paramecium sp.* ; exposés à des concentrations croissantes de trois fongicides : le Thirame, le Tebuconazole et la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole.

1. Matériel biologique

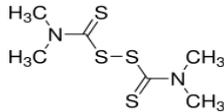
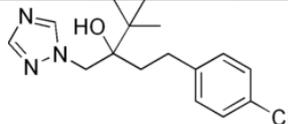
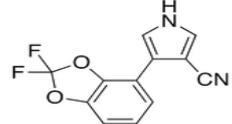
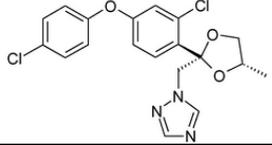
Les deux matériels biologiques utilisés au cours de nos études sont le phytopathogène *Fusarium sp.* et le protozoaire cilié *Paramecium sp.*

2. Matériel chimique

Trois fongicides sont testés sous leurs formulations commerciales : le Thirame (Sipcam Inagra), le Tebuconazole (Rivale), et la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole (Syngenta).

Les propriétés physicochimiques des 3 fongicides ainsi que la structure chimique de leurs matières actives sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques et formules structurales des trois fongicides.

Thirame	
Nom UICPA	diméthylcarbamothioylsulfanyl N,N-diméthylcarbamodithioate
N° CAS	137-26-8
Formule moléculaire	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄
Masse molaire (g/mole)	240.43 g/mole
Aspect	Poudre fine, beige clair
Structure	
Tebuconazole	
Nom UICPA	(RS)- 1-(4-Chlorophenyl)- 4,4-dimethyl-3-(1H, 1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan- 3-ol
N° CAS	107534-96-3
Formule moléculaire	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O
Masse molaire (g/mole)	307.81
Aspect	Suspension rouge
Structure	
Fludioxonil	
Nom UICPA	4-(2,2-Difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrole-3-carbonitrile
N° CAS	131341-86-1
Formule moléculaire	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O
Masse molaire (g/mole)	248.19
Aspect	Liquide, rouge clair au rouge foncé
Structure	
Difenoconazole	
Nom UICPA	1H-1,2,4-Triazole, 1-[[2-[2-chloro-4-(4-chlorophenoxy)phenyl]-4-methyl-1,3-dioxolan-2-yl]methyl]-
N° CAS	119446-68-3
Formule moléculaire	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃
Masse molaire (g/mole)	406,263
Aspect	Liquide, rouge clair au rouge foncé
Structure	

3. Étude de l'activité antifongique

Afin de vérifier l'efficacité des trois fongicides, des tests *in vitro* sont effectués sur des isolats de *Fusarium sp.* (Pathogène cible). Ce travail a été entrepris, au Laboratoire de Mycologie à l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV). Le protocole expérimental adopté met en évidence 3 étapes clés :

A. Isolement et conditions de culture

Les semences sont préalablement désinfectées par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant une minute suivi d'un rinçage abondant à l'eau distillée stérile (3 à 4 fois) afin d'éliminer toute trace d'hypochlorite de sodium. Elles sont ensuite séchées à l'aide de papier filtre stérile.

Une fois séchées, les échantillons sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé spécifique : PDA (Potato Dextrose Agar), amendé par de l'acide tartrique afin d'éviter la prolifération de colonies bactériennes. Les échantillons sont répartis à raison de 5 grains par boîte.

Les boîtes sont incubées dans une étuve bactériologique à une température de 25°C pendant 7 à 10 jours.

B. Identification de la souche fongique

L'identification se fait sur la base de certains caractères morphologiques des colonies (vitesse de croissance, aspect des colonies, pigmentation) et l'observation microscopiques des spores (forme et taille).

C. Purification de l'agent pathogène

Elle est réalisée par un repiquage successif en découpant de petits fragments sur la bordure des colonies développées sur les milieux d'isolement.

3.1. Mode de traitement

Les expériences sont réalisées en testant 5 concentrations pour chaque ingrédient actif : 0.035, 0.052, 0.105, 0.21 et 0.42 mg/l pour le Thirame ; 0.06, 1.39, 2.79, 5.58 et 11.16 mg/l pour le Tebuconazole et enfin pour la combinaison Fludioxonil - Difenconazole, 4 concentrations ont été retenues dont 0.05, 0.1, 0.5 et 1 mg/l.

L'objectif de cette expérience est d'apprécier une activité inhibitrice sur la croissance mycélienne. Pour cela, les fongicides sont incorporés aseptiquement dans le milieu de culture maintenu en surfusion (40 à 45°C). Le mélange est ensuite coulé dans les boîtes de Pétri. Des disques mycéliens de 6 mm ont été découpés sur des cultures jeunes de *Fusarium* et sont ensuite déposés au centre des boîtes de Pétri. En parallèle, des témoins sont réalisés de la même façon ou la même quantité de fongicide est remplacée par de l'eau distillée stérile.

Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C. Après 7 jours d'incubation, le diamètre moyen des colonies est estimé à partir de 2 diamètres perpendiculaires. L'expérience sera répétée 3 fois.

Le Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne sera calculé selon la formule de **Pandey *et al.* (1982)**.

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [D_0 - D_F] / D_0 \times 100$$

Où D_0 est le diamètre moyen des colonies témoins et D_F est le diamètre moyen des colonies en présence du fongicide.

3.2. Détermination des concentrations effectives médianes CE50

Elle correspond à la concentration en fongicide qui, en moyenne, produit un effet. La concentration effective médiane est estimée au moyen du logiciel REGtox® (**Vindimian *et al.*, 1983**).

4. Étude des effets des fongicides sur *Paramecium sp.*

Cette partie s'intéresse à l'étude des effets sous-jacents des trois fongicides. Les tests abordés ont été réalisés au Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Badji Mokhtar de Annaba.

4.1. Mise en Culture des paramécies

La culture est obtenue par macération de foin et de laitue sèche dans un récipient en verre contenant l'eau de pluie ou l'eau de sources, selon la méthode de **Wichterman (1953)**. Le mélange est abandonné dans un endroit sombre, tiède et bien aéré à 20°C pendant environ une semaine. La préparation est ensuite filtrée et une goutte d'eau de la macération est prélevée. Sous microscope nous observons que l'eau contient de très nombreux infusoires.

Nous avons procédé à la purification de la culture avec des repiquages périodiques. Les paramécies ont été cultivées dans un milieu de culture décrit par **Azzouz et al. (2011)**, dont la composition est détaillée dans le tableau 4. Le mélange est porté à ébullition dans 1.5 litre d'eau distillée pendant 30 min. Après filtration, le bouillon est réparti dans des flacons.

Tableau 4. Composition du milieu de culture des paramécies (Azzouz, et al., 2011).

Composition du milieu	Quantité en g
Foin	7.5
Laitue	10
Blé	7.5
Concombre	4
Pomme de terre	4
Cacahuètes	2
Levure	Une pincée

Le pH du milieu est réglé à pH 6.5 et est conservé à l'abri de la lumière à une température voisine de 25°C. Avant l'utilisation du milieu, nous avons procédé à plusieurs dilutions et choisi celle qui fournit une croissance optimale. Les cellules sont repiquées tous les trois jours pour maintenir une culture homogène.

4.2. Cinétique de croissance

Des essais de toxicité préliminaires ont été réalisés afin de déterminer les concentrations sublétales. Les concentrations utilisées pour *Fusarium sp.* (Organisme cible) se sont avérées extrêmement toxiques, voire létales, pour *Paramecium sp.* Ceci nous a incité à tester une batterie de concentrations plus faibles. Les concentrations retenues sont : 0.001, 0.002 et 0.003 mg/l pour le Thirame ; 0.002, 0.01, 0.04 et 0.08 mg/l pour le Tebuconazole et enfin 0.1, 0.5, 1 et 1.5 mg/l pour la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole.

Les cellules (Environ 6000 cellules/ml) sont cultivées dans des tubes à essai contenant 10 ml de culture, en présence des fongicides. Le tout est incubé à 28 ± 2 ° C et chaque expérience est répétée 4 fois.

L'étude de la cinétique de croissance est réalisée par un dénombrement quotidien, jusqu'au 5^{ème} jour, à l'aide d'un compteur manuel, sous un microscope optique (Leica DL 1000) grossissement x10. Afin de faciliter le comptage, les cellules sont fixées au lugol sur une lame en verre selon la méthode de **Sauvant *et al.*, (1999)**. Le comptage est répété au moins trois fois pour chaque répétition.

4.3. Détermination du nombre et du temps de génération

Le principe de calcul retenu est celui détaillé par **Dias *et al.* (2003)**. Le nombre de génération (n) ainsi que le temps requis pour chaque génération (g) sont obtenus selon les équations ci-dessous :

$$n = \text{Log } N_t - \text{Log } D_0 / \text{Log } 2$$

$$g = \frac{\text{Temps de croissance}}{\text{Nombre de génération}}$$

Où N_t est la population à un temps t et N_0 est le nombre initial des cellules.

4.4. Pourcentage de réponse

Après exposition de la population de *Paramecium sp.* aux fongicides, le pourcentage de réponse est obtenu par l'équation suivante (**Wong et al., 1999**) :

$$\text{Pourcentage de réponse} = \left[\frac{N_C - N_E}{N_C} \right] \times 100$$

Où N_C représente le nombre des cellules témoins et N_E est le nombre final des cellules traitées.

4.5. Détermination des concentrations effectives médianes CE50

Les concentrations effectives médianes sont estimées au moyen du logiciel REGtox® (**Vindimian et al., 1983**). Le nombre de cellules est porté en fonction des concentrations sous forme d'une régression non linéaire selon le modèle logistique de Hill (**Hill, 1910**).

4.6. Caractérisation des malformations

Après traitement des paramécies avec les différentes concentrations des 3 fongicides, l'évaluation des anomalies morphologiques (structurales et membranaires) est effectuée par observation microscopique (Leica DL 1000) au grossissement x20 durant les 96 heures de traitement.

4.7. Étude du métabolisme respiratoire

Une préconcentration des cellules à 10000 tours/min pendant 30 min est nécessaire. Le surnageant étant dépourvu de cellules est éliminé soigneusement. Le culot est récupéré pour le suivi de la respiration cellulaire.

L'activité respiratoire des paramécies est mesurée au moyen d'une électrode à oxygène de type Clark selon la méthode de **Djebar et Djebar (2000)**.

Les échantillons sont injectés dans l'enceinte de l'électrode qui est constituée principalement d'une cellule cylindrique à un volume réglable, entourée d'une pochette d'eau, liée à un bain marie avec un système circulaire d'eau. La cellule de réaction

renferme un agitateur magnétique assurant une homogénéité parfaite de l'échantillon (Figure 7).

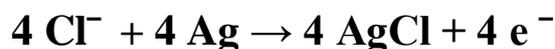


Figure 7. Electrode d'oxygène, Hansatech Instruments

Le principe de cet oxymètre à électrode (Hansatech DW1) repose sur un phénomène électrochimique. L'électrode est formée d'une cathode de platine et d'une anode d'argent, plongeant dans une solution saturée de KCl servant d'électrolyte. L'ensemble électrodes - électrolyte est séparé du milieu étudié par une membrane perméable au dioxygène mais imperméable à l'eau et aux ions. Une tension de polarisation d'environ 0.7 V est appliquée entre les deux électrodes. Sous l'influence de cette tension (potentiel redox), l'oxygène dissous dans la solution de KCl est ionisé en hydroxyle au contact de la cathode suivant la réaction :



Au contact de l'anode a lieu une autre réaction :



L'oxygène diffusant à travers la membrane est réduit en eau par les électrons libérés à la cathode. Le courant qui s'établit entre les deux électrodes est proportionnel à la concentration en oxygène. Ce courant est amplifié et mesuré.

4.8. Étude des biomarqueurs de stress oxydant

4.8.1. Dosage des protéines totales

Les protéines totales sont quantifiées selon la méthode de **Bradford (1976)**. Cette méthode mesure la concentration protéique, basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le colorant bleu de Coomassie. Après une centrifugation à 10000 tours/min pendant 20 minutes à 4°C, la lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre visible (JENWAY 6300). Les concentrations protéiques sont déterminées en utilisant une gamme étalon correspondant à différentes concentrations connues de BSA.

4.8.2. Évaluation de l'activité Catalase (CAT)

L'activité Catalase est déterminée selon la méthode décrite par **Regoli et Principato (1995)** basée sur l'hydrolyse de H₂O₂ en H₂O et O₂. La culture des paramécies est homogénéisée dans un 1 ml de tampon phosphate (Na₂HPO₄, 0.1 M, pH 7.5) à l'aide d'un broyeur à ultrasons (SONICS, Vibra cell). L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé à 15000 tours/min pendant 10 minutes. 20 µl du surnageant est récupéré dans de 780 µl de tampon phosphate (0.1 M, pH 7.5). La réaction est déclenchée par l'addition de 200 µl d'eau oxygénée (500 mM, 30V) et la lecture se fait contre un blanc préparé avec de l'eau oxygénée et du tampon phosphate. La décroissance de l'absorbance est mesurée toutes les 15 secondes pendant une minute à une longueur d'onde de 240 nm dans un spectrophotomètre (JENWAY 6300). L'activité Catalase (CAT) est exprimée en µmole d'H₂O₂ par minute et par mg de protéines, préalablement déterminée, selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do \times 10}{\varepsilon \times L \times 0.05} / mg \text{ de protéines}$$

X : Micromole de H₂O₂ consommé par minute et par mg de protéines.

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

ε : Coefficient d'extinction molaire de la Catalase égale à 0,04 mM cm⁻¹.

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

4.8.3. Dosage du Glutathion (GSH)

Le taux du Glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de **Weckbecker et Cory (1988)** dont le principe est basé sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro-5 mercapturique à 412 nm. Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml d'EDTA (0,02 M, pH 9,6). Afin de protéger les groupements thiols du Glutathion, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique. Pour cela, 0.2 ml de ASS sont ajoutés à 0,8 ml de l'homogénat. Le mélange est maintenu alors dans un bain de glace pendant 15 min, puis centrifugé à 1000 tours/min pendant 5 min. Une aliquote de 500 µl du surnageant est ajouté à 1 ml de tampon Tris / EDTA (0,02 M, pH 9,6) ainsi que 0.025 ml de DTNB. Après 5 min de repos, la lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde égale à 214 nm, contre un blanc où le surnageant est remplacé par l'eau. Le taux de Glutathion est exprimé en µmole par mg de protéines selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do}{13.1} \times \frac{Vd}{Vh} \times \frac{Vt}{Vs} / mg \text{ de protéines}$$

X : Micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM/mg de protéines).

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

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

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

Vh : Volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0,8 ml.

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

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

4.8.4. Évaluation de l'activité Glutathion S-transferase (GST)

L'activité Glutathion S-transferase est mesurée par colorimétrie selon la méthode de **Habig et al. (1974)** dont le principe est basé sur la réaction de conjugaison entre la GST et

un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le Glutathion (GSH). Les échantillons sont broyés en présence de 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6). Après centrifugation des broyats à 14000 tours/min pendant 30 mn, 200 µl de surnageant est ajouté à 1,2 ml du mélange [CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) 1mM, GSH (Glutathion réduit) 5 mM]. La variation de la densité optique est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre (JENWAY 6300) toutes les minutes pendant 5 min à une longueur d'onde de 340 nm. L'activité enzymatique est exprimée en µmole par minute et par mg de protéines.

$$X = \frac{\Delta Do \times Vt}{9.6 \times Vs} / mg \text{ de protéines}$$

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

Δ Do : Variation de la densité optique par minute.

9,6 : Coefficient d'extinction molaire du complexe GSH-CDNB.

Vt : Volume total de l'échantillon : 1,4 ml [0,2 ml de surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

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

4.8.5. Évaluation de l'activité Glutathion peroxydase (GPx)

L'activité Glutathion peroxydase est déterminée selon la méthode de **Flohé et Günzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction du peroxyde d'hydrogène en présence du Glutathion réduit (GSH). Ce dernier est transformé en Glutathion oxydé (GSSG) sous l'action de la GPx.

Le volume réactionnel contient 200 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), 400 µl de GSH (0.1 mM) et 200 µl d'extrait enzymatique. Après passage au bain marie 5 min à 25°C, 200 µl de H₂O₂ (1.3 mM) est ajouté afin de déclencher la réaction. Après 10 min, la réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml de TCA (1%). Le mélange est plongé dans un bain de glace pendant 30 min puis centrifugé durant 10 min à 3000 tours/min. Une aliquote de 500 µl du surnageant est ajoutée à 2.2 ml de la solution tampon TBS et 0.32 ml de DTNB (1mM). La lecture des absorbances s'effectue à une

longueur d'onde de 412 nm après 5 min de repos. L'activité de l'enzyme est calculée selon la formule ci-dessous, elle est exprimée en μ mole de GSH par minute et par mg de protéines.

$$X = \frac{(Do \text{ échantillon} - Do \text{ étalon}) \times 0.04}{Do \text{ étalon}} / \text{mg de protéines}$$

X : Micromole de substrat oxydé par minute et par mg de protéines.

0.04 : Concentration du substrat (GSH).

4.8.6. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

Une des substances réactives à l'acide thiobarbiturique, le dialdéhyde malonique ou malondialdéhyde (MDA) qui un des produits terminaux de la peroxydation lipidique. L'évaluation de la teneur en MDA, est estimée selon la méthode de **Draper et Hadley (1990)** dont le principe repose sur la condensation du malondialdéhyde et l'acide thiobarbiturique (TBA). Ces deux molécules donnent naissance à un produit rouge brun facilement dosable par spectrophotométrie (Figure 8).

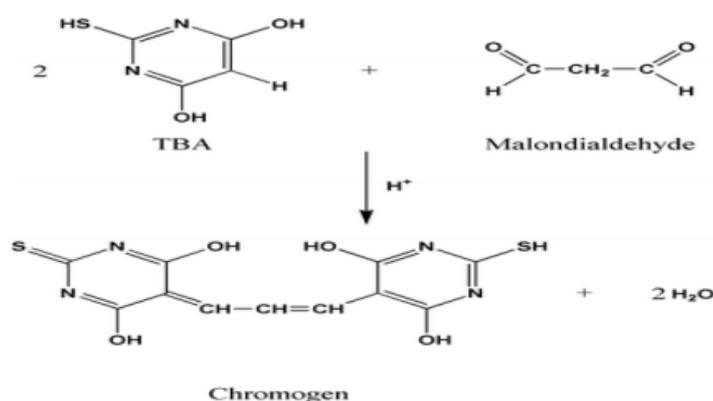


Figure 8. La réaction entre le TBA et le MDA.

Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de solution tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) suivi d'une centrifugation pendant 10 min à 10000 tours/min. 500 μ l du surnageant est additionné à 2.5 ml de TCA. Le mélange est chauffé dans un premier bain marie à 100°C pendant 15 min suivi d'un bain de glace. Après une centrifugation à 10000 tours/min

durant 10 min, une fraction aliquote de 2 ml du surnageant est additionnée à 1 ml de TBA et le tout est plongé dans un second bain marie (100°C, 15 min). Pendant cette incubation, un complexe se forme entre le TBA et les composés aldéhydiques, essentiellement le malondialdéhyde (MDA). Après refroidissement dans un bain de glace, 1.5 ml de butanol sont ajoutés et le tout est bien agité. Après une dernière centrifugation à 10000 tours/min pendant 10 min, le surnageant est récupéré et la lecture des absorbances sera effectuée à une longueur d'onde de 532 nm au spectrophotomètre (JENWAY 6300). La concentration du MDA est déterminée selon la formule suivante :

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

X : Micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines.

ΔDo : Variation de la densité optique par minute.

156 : Coefficient d'extinction molaire du TBA.

Vt : volume total dans la cuve : 1 ml [volume total du butanol récupéré renfermant les complexes TBA/MDA].

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

4.8.7. Estimation du taux des métabolites réactifs de l'oxygène (ROMs) et du potentiel biologique antioxydant (BAP)

Les métabolites réactifs de l'oxygène et le potentiel antioxydant biologique sont évalués à l'aide d'un système d'analyse photométrique, le FRAS 4 (Free Radical Analytical System) (Figure 9).

L'activité des radicaux libres est mesurée en utilisant le test d-ROM, tandis que le statut antioxydant est évalué en utilisant le test BAP.



Figure 9. Système d'analyse photométrique, FRAS 4.

➤ Principe

Le test d-ROM permet de mesurer la concentration en hydroperoxydes générés par l'oxydation de plusieurs molécules telles que des glucosides, des lipides, les protéines et des nucléotides. En présence du fer, les hydroperoxydes peuvent générer des radicaux libres et sont considérés donc comme des marqueurs spécifiques des dommages oxydatifs. Le test d-ROM est réalisé sur des prises aliquotes de 20 μ l réagissent avec un substrat chromogène contenant dans des cuves spécifiques afin de développer une couleur dérivative dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration en radicaux libres selon la loi de Lambert-Beer (Alberti *et al.*, 2000). Cette intensité de la couleur est quantifiée en utilisant le FRAS 4 et les résultats sont exprimés en unités Caratelli (U.Carr.), où une U.Carr. équivaut à 0,08 mg/100 ml de peroxyde d'hydrogène (Trotti *et al.*, 2002).

Le test BAP est un essai photométrique qui mesure le potentiel d'un échantillon à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) en Fer ferreux (Fe^{+2}). Pour cela 10 μ l d'homogénat est ajouté à une solution de chlorure ferrique et du dérivé de thiocyanate. L'intensité de la décoloration qui en résulte est proportionnelle à la capacité de la réduction des ions ferriques (Benzie et Strain, 1996). Les résultats du test sont exprimés en μ mole/l de fer réduit.

5. Traitement statistique des données

Les résultats sont présentés comme moyenne \pm écart type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Minitab 16. Les comparaisons statistiques des variables quantitatives sont réalisées au moyen de l'analyse de variance selon ANOVA et le test *t* de student. Les différences sont considérées comme significatives au seuil de $p = 0.05$.

Résultats

1. Étude de l'activité antifongique

1.1. Isolement et identification de la souche fongique

La croissance de la souche de *Fusarium sp.* sur le milieu PDA est rapide allant de 7 à 8 jours et se traduit par la production d'un mycélium dense et aérien (cotonneux). Quand la culture est jeune, le mycélium est blanc au recto et est d'une couleur jaune à fauve au verso. La couleur du verso vire au rouge carmin lorsque la culture est plus âgée (Figure 10).



Figure 10. Aspect des colonies de *Fusarium sp.* sur le milieu de culture PDA après 7 jours d'incubation à 25°C.



Figure 11. Aspect des spores de *Fusarium sp.* sous microscope optique (Gr ×40×10).

Sous microscope, les macroconidies sont fusiformes et divisées en 6 à 7 loges (Figure 11). Elles sont peu incurvées et leur face dorsale est plus incurvée que leur face ventrale. Ils peuvent avoir une extrémité terminale pointue.

1.2. Effet des fongicides sur la croissance mycélienne de *Fusarium sp.*

Nos résultats montre une diminution progressive du diamètre des colonies et ce de manière significative ($P \leq 0.001$) et dose-dépendante (Figure 12).



Figure 12. Evolution de la taille des colonies de *Fusarium sp.* exposé aux concentrations croissantes du fongicide (Cas du Tebuconazole).

Les colonies de *Fusarium* exposées à la plus forte concentration de Thirame (0.42 mg/l) présentent un diamètre de 1.60 cm comparées au diamètre des colonies témoins, qui est de l'ordre de 8.29 cm. Quant aux souches traitées avec le Tebuconazole et la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole, le diamètre des colonies est d'environ 1.70 cm pour les concentrations respectives de 11.16 et 1 mg/l comparé au témoin (8.29 cm).

1.3. Détermination du pourcentage d'inhibition chez *Fusarium sp.*

L'effet inhibiteur est dose-dépendant et proportionnel aux concentrations testées (Figure 13). L'analyse statistique révèle une inhibition significative ($P \leq 0.001$). En effet, un taux de 81% a été enregistré pour les souches exposées à la plus forte concentration de Thirame (0.42 mg/l), et ce après 7 jours de traitements (Figure 13 a). L'exposition du phytopathogène aux fortes concentrations de Tebuconazole et de la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole génère également des pourcentages d'inhibition élevés de l'ordre de 79% (Figures 13 b et c).

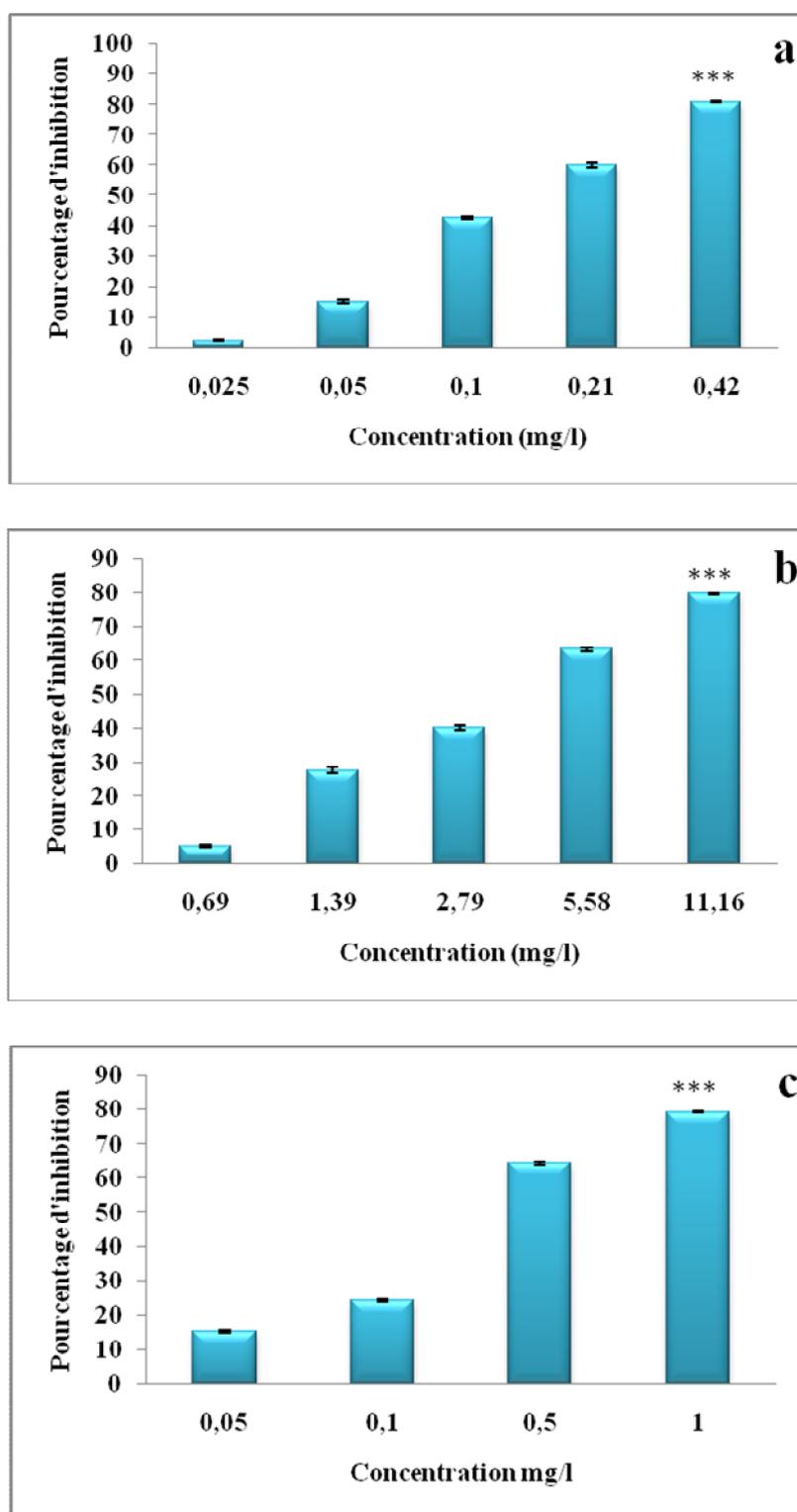


Figure 13. Pourcentages d'inhibition chez *Fusarium sp.* exposé à (a) Thirame, (b) Tebuconazole et (c) la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole.

1.4. Détermination des concentrations effectives médianes CE50 chez *Fusarium sp.*

Les concentrations effectives médianes (CE50) obtenues après 7 jours d'exposition, sont représentées dans le tableau 5.

Tableau 5. Concentrations Effectives Médianes (CE50) mesurées Chez *Fusarium sp.* après 7 jours de traitement.

Fongicide	CE50 (mg/l)
Thirame	0.15
Tebuconazole	3.79
Fludioxonil – Difenoconazole	0.27

Les valeurs de CE50 enregistrées dans cette étude montrent une sensibilité différente de *Fusarium sp.* à l'action des trois fongicides. Le Thirame et la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole s'avèrent être les molécules les plus efficaces dans l'inhibition de la croissance mycélienne, avec des valeurs respectives de 0.15 et 0.27 mg/l. En revanche, pour la molécule de Tebuconazole, la CE50 est estimée à 3.79 mg/l.

2. Effets des fongicides sur *Paramecium sp.*

2.1. Effets des fongicides sur la cinétique de croissance de *Paramecium sp.*

Les figures 14, 15 et 16 illustrent l'évolution de la courbe de croissance des paramécies en fonction du temps après traitement avec les différentes concentrations des trois fongicides. Ainsi, nous constatons que les trois xénobiotiques affectent d'une manière significative et dose-dépendante la croissance des paramécies ($p \leq 0.001$) traduisant ainsi l'effet toxique des fongicides.

- **Cas du Thirame**

Une perturbation significative de la croissance est observée chez les cellules traitées au Thirame (Figure 14). Nos résultats montrent qu'à la plus forte concentration (0.003 mg/l), la croissance de la population est affectée de manière significative ($p \leq 0.001$) après

seulement 48h de traitement et le nombre de cellules est réduit de moitié à la fin de l'expérience par rapport aux témoins.

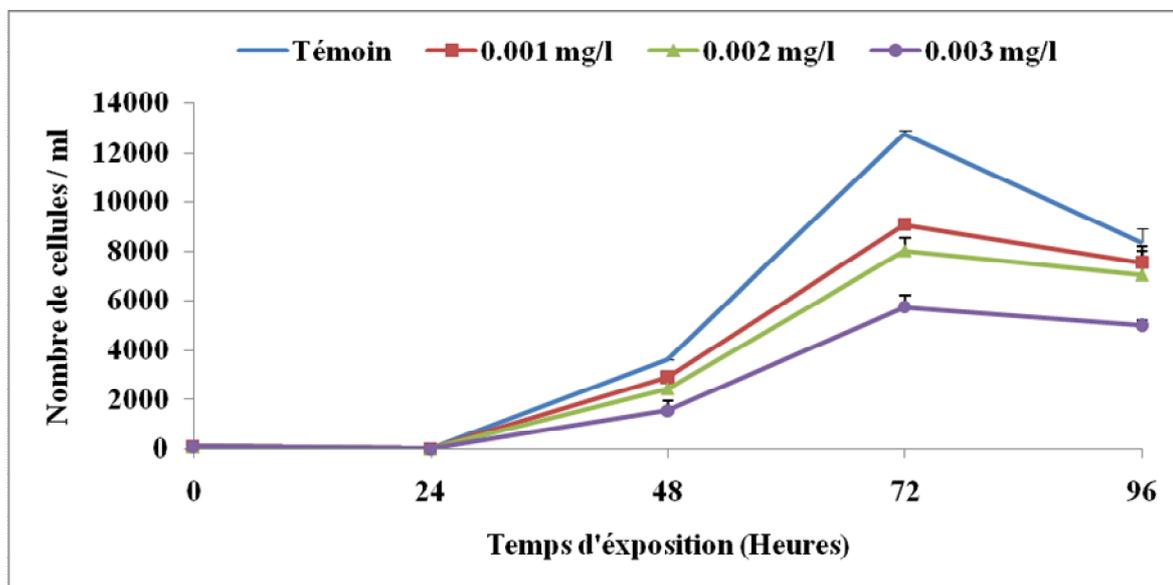


Figure 14. Effets des concentrations de croissantes du Thirame sur la croissance cellulaire de *Paramecium sp.* après 96 heures de traitement (T= 28°C, pH=6,5).

- *Cas du Tebuconazole*

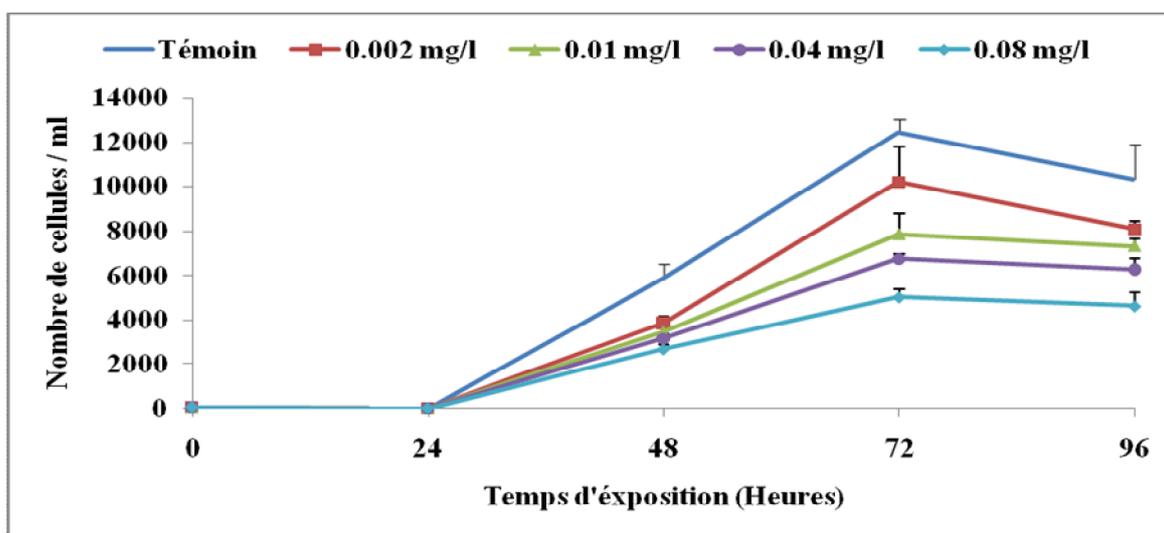


Figure 15. Effets des concentrations de croissantes du Tebuconazole sur la croissance cellulaire de *Paramecium sp.* après 96 heures de traitement (T= 28°C, pH=6,5).

Concernant l'évolution de la croissance chez les cellules exposées au Tebuconazole, nous constatons également une inhibition de la croissance dès 48h de traitement (Figure 15), cette inhibition est plus prononcée pour la plus forte concentration, à savoir 0.08 mg/l, où le nombre de cellules affiche une valeur moyenne de 4600 cellules/ml comparé aux témoins (10300 cellules/ml).

- **Cas de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole**

La croissance des cellules traitées avec la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole (Figure 16) est également inhibée avec une forte déplétion très hautement significative ($p \leq 0.001$). En effet, le nombre de cellules traitées avec la concentration 1.5 mg/l est réduit à environ 2900 cellules/ml comparé aux témoins (environ 10000 cellules/ml) après 72 heures de traitement.

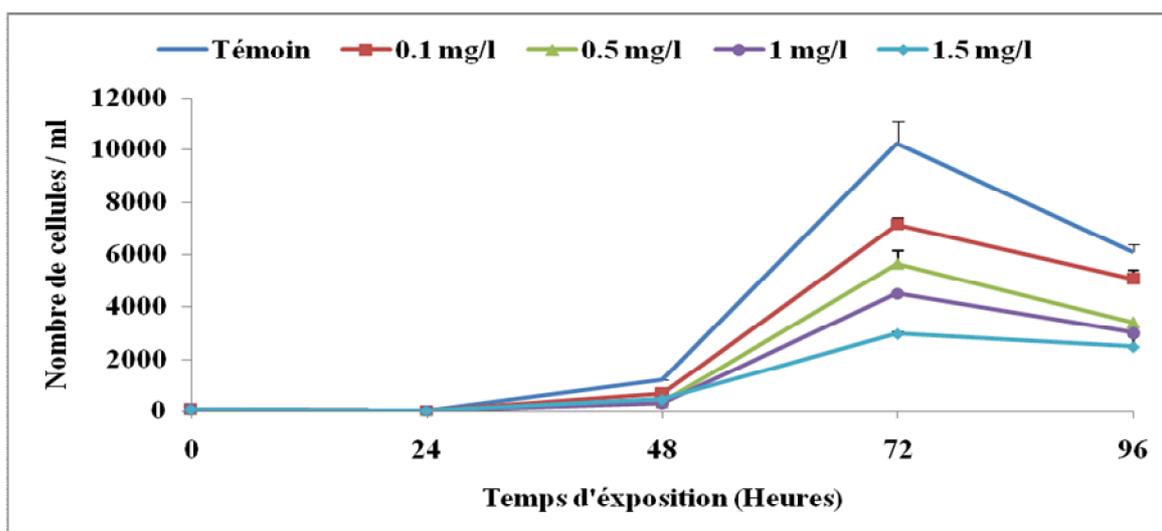


Figure 16. Effets des concentrations de croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur la croissance cellulaire de *Paramecium sp.* après 96 heures de traitement (T= 28°C, pH=6,5).

2.2. Détermination du nombre et du temps de génération cellulaires

Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 6, 7 et 8. Ainsi, le nombre de génération est inversement proportionnel aux concentrations testées. Le temps de dédoublement, quant à lui, augmente progressivement et de manière dose-dépendante pour

les trois composés testés. Cet effet est plus marqué chez les populations exposées à la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole, où le temps de génération moyen passe de 12 heures à 17 heures pour la plus forte concentration (1.5 mg/l).

Tableau 6. Effet du Thirame sur le nombre de génération (n) et le temps de génération (g) de *Paramecium sp.*

Thirame (mg/l)	Nombre de génération (n)	Temps de génération (g)
Témoin	7.14 ± 0.06	13.43 ± 0.12
0.001	6.65 ± 0.03	14.42 ± 0.07
0.002	6.47 ± 0.09	14.83 ± 0.20
0.003	5.98 ± 0.21	16.03 ± 0.32

Tableau 7. Effet du Tebuconazole sur le nombre de génération (n) et le temps de génération (g) de *Paramecium sp.*

Tebuconazole (mg/l)	Nombre de génération (n)	Temps de génération (g)
Témoin	7.95 ± 0.06	12.06 ± 0.09
0.002	7.66 ± 0.21	12.53 ± 0.35
0.01	7.29 ± 0.16	13.17 ± 0.28
0.04	7.07 ± 0.04	13.55 ± 0.08
0.08	6.65 ± 0.10	14.43 ± 0.21

Tableau 8. Effet de la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole sur le nombre de génération (n) et le temps de génération (g) de *Paramecium sp.*

Fludioxonil - Difenoconazole (mg/l)	Nombre de génération (n)	Temps de génération (g)
Témoin	7.41 ± 0.12	12.95 ± 0.21
0.1	6.98 ± 0.04	13.92 ± 0.09
0.5	6.55 ± 0.01	14.65 ± 0.03
1	6.22 ± 0.16	15.43 ± 0.40
1.5	5.62 ± 0.02	17.05 ± 0.08

2.3. Pourcentage de réponse

Le pourcentage de réponse est calculé pour chaque molécule. Les résultats obtenus confirment ceux de l'évolution de la cinétique de croissance. Ainsi, l'effet inhibiteur est dose-dépendant et proportionnel aux concentrations des xénobiotiques (Figure 17, 18 et 19).

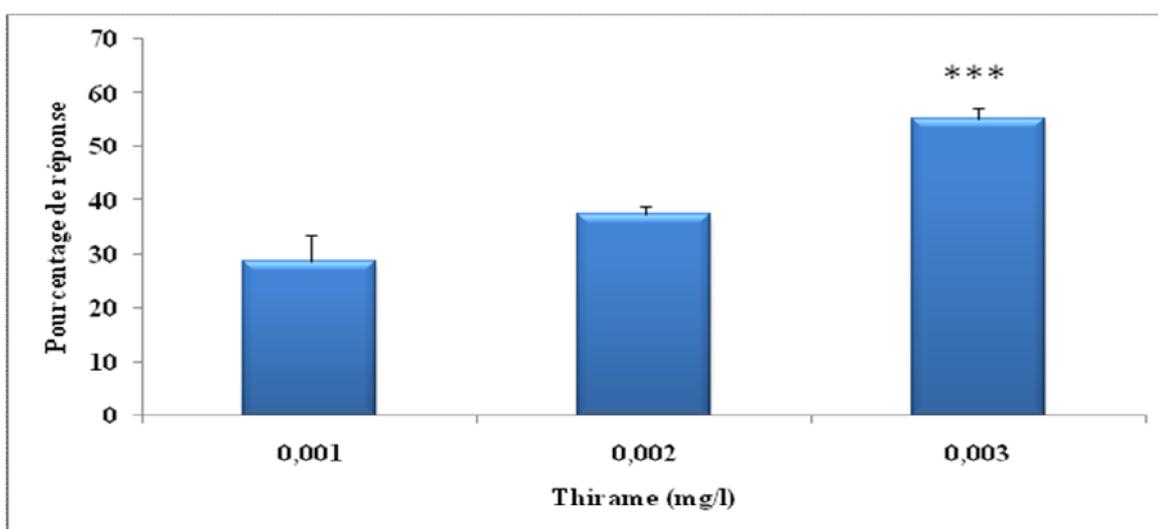


Figure 17. Evolution du pourcentage de réponse chez *Paramecium sp.* exposé aux concentrations croissantes du Thirame.

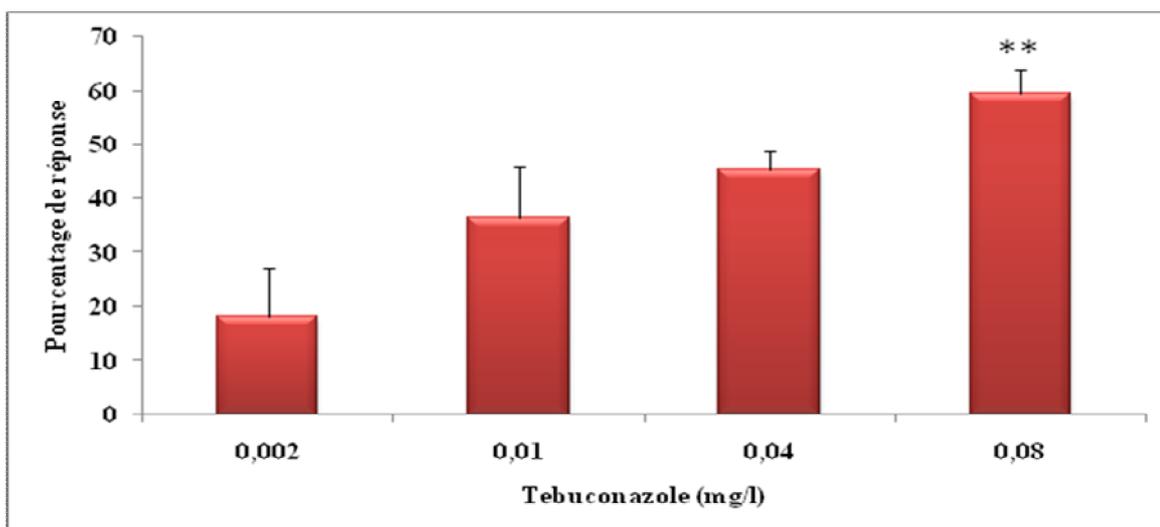


Figure 18. Evolution du pourcentage de réponse chez *Paramecium sp.* exposé aux concentrations croissantes du Tebuconazole.

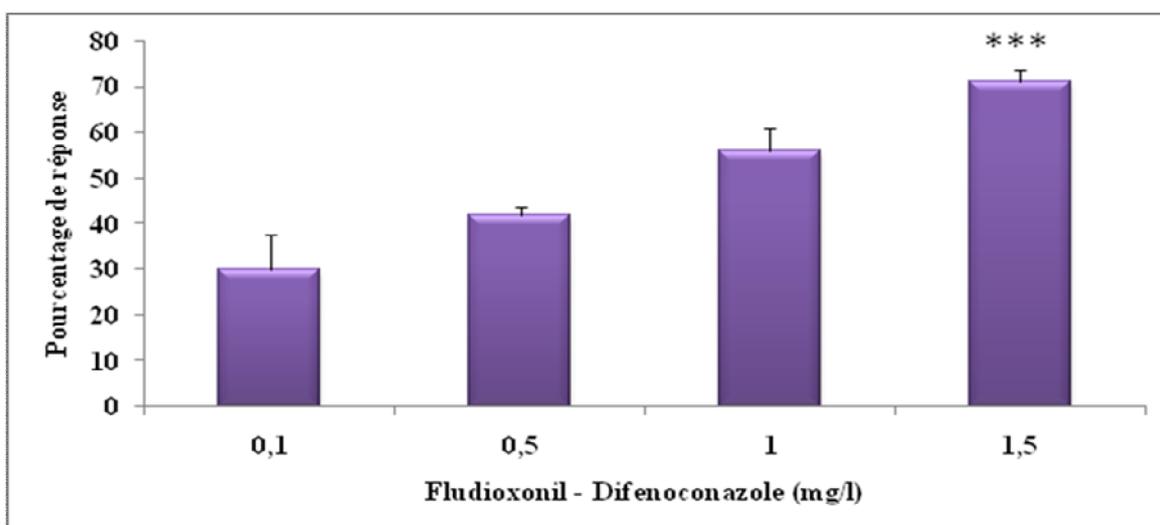


Figure 19. Evolution du pourcentage de réponse chez *Paramecium sp.* exposé aux concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole.

2.4. Détermination des concentrations effectives médianes CE50 chez *Paramecium sp.*

Les CE50 enregistrées pour *Paramecium sp.* exposé aux concentrations croissantes des fongicides sont représentées dans les figures 20, 21 et 23.

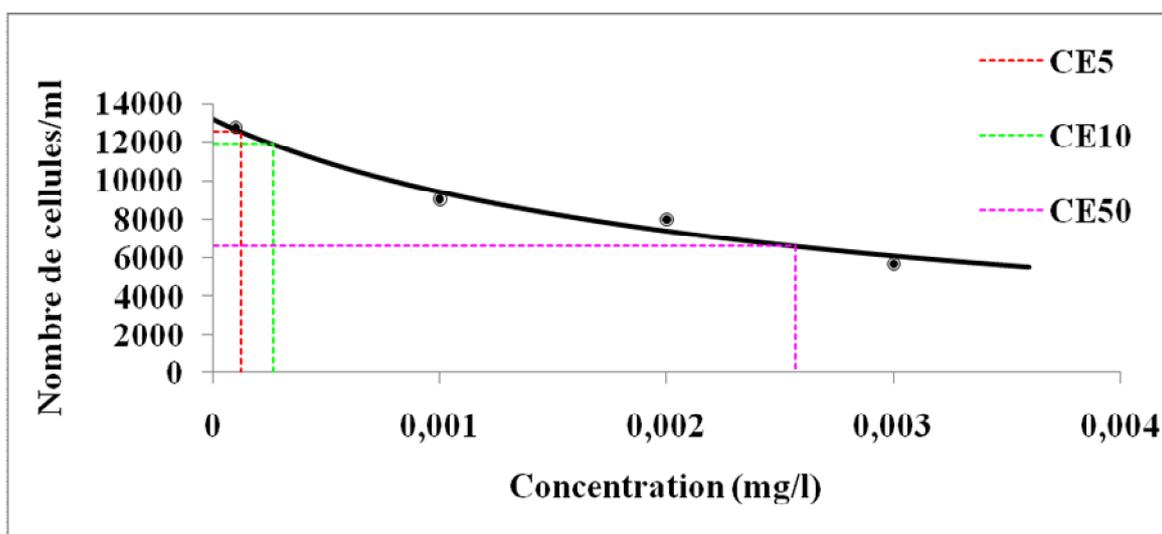


Figure 20. CE50 du Thirame mesurée chez *Paramecium sp.* après 4 jours de traitement.

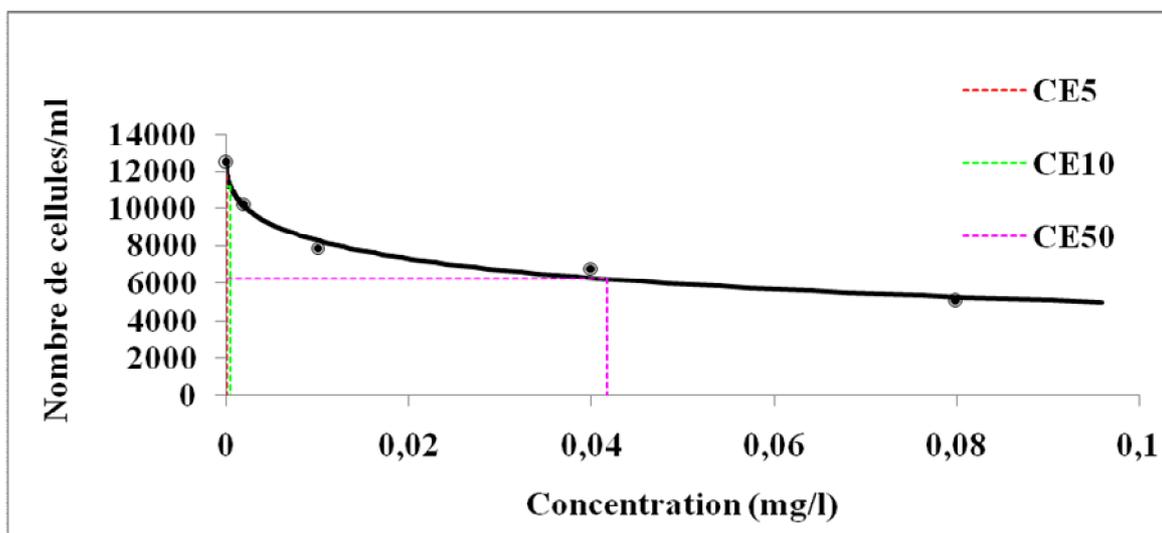


Figure 21. CE50 du Tebuconazole mesurée chez *Paramecium sp.* après 4 jours de traitement.

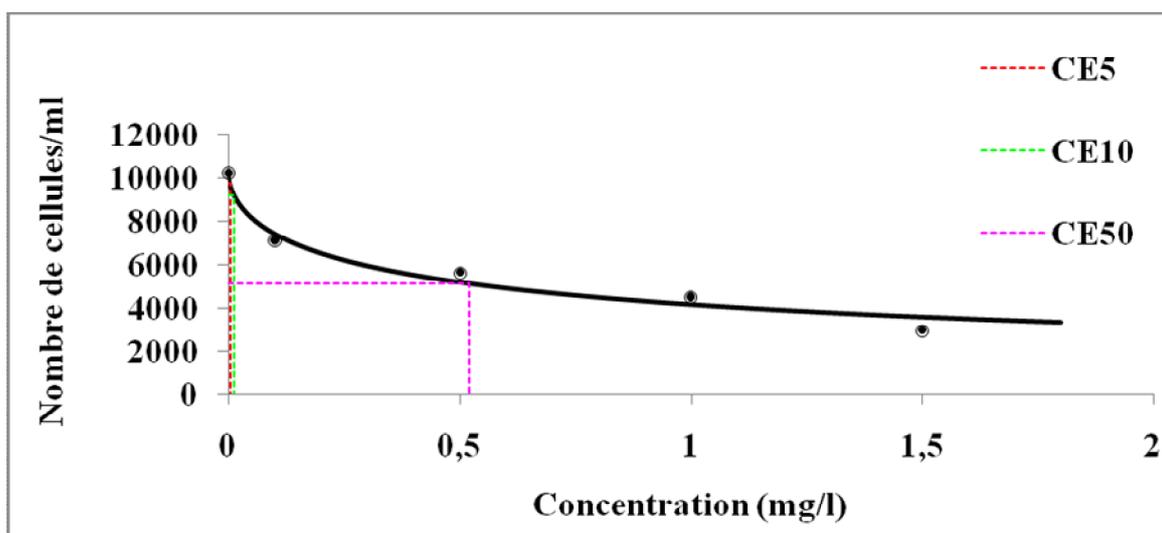


Figure 22. CE50 de la combinaison Fludioxonil – Difenconazole mesurée chez *Paramecium sp.* après 4 jours de traitement.

Les valeurs des CE50 sont de l'ordre de 0,027 mg/l pour le Thirame, 0,041 mg/l pour le Tebuconazole et enfin 0,5 mg/l pour la combinaison Fludioxonil – Difenconazole.

2.5. Atteintes membranaires et structurales

Les observations microscopiques ont révélé des cellules traitées présentant des anomalies de forme dont l'intensité augmente en fonction des concentrations testées (Figures 24, 25, 26 et 27). Ces altérations sont d'autant plus marquées pour les traitements aux Tebuconazole et la combinaison Fludioxonil – Difenconazole. Les cellules témoins, quant à elles, restent intactes et ne présentent aucune altération (Figure 23).



Figure 23. Morphologie d'une cellule normale de *Paramecium sp.* observée au microscope optique (Gr $\times 20 \times 10$).

Les malformations se caractérisent par des modifications de la forme ; les cellules deviennent arrondies et augmentent de volume (Figure 24 a, b). Les paramécies peuvent aussi présenter des formes asymétriques (Figure 24 c, d). Dans certains cas, nous avons observé une extension pouvant entraîner la rupture de la membrane cellulaire (Figure 24 e, f) et parfois, des bourgeonnements peuvent survenir à la surface de la cellule (Figure 25).

Les Figures 26 et 27 mettent en évidence les dommages internes observés chez les paramécies traitées. Nous observons ainsi, des vésicules (Figure 26) qui augmentent de volume avec le temps et finissent par éclater provoquant ainsi la diffusion des constituants cellulaires et une dissolution complète de la cellule (Figure 27).



Figure 24. Anomalies morphologiques observées chez *Paramecium sp.* exposé aux plus fortes concentrations des fongicides (Gr $\times 20 \times 10$).



Figure 25. Apparition de bourgeonnement au niveau de la membrane cellulaire (Gr $\times 20 \times 10$).

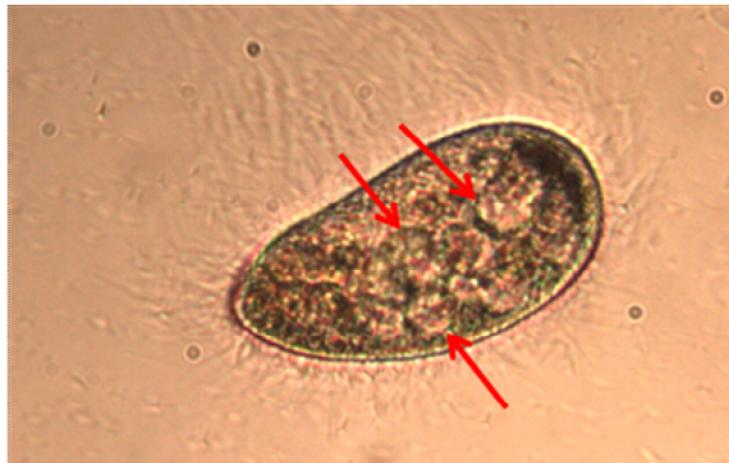


Figure 26. Formation de vésicules intracellulaires chez *Paramecium sp.* (Gr $\times 20 \times 10$).



Figure 27. Diffusion des constituants cellulaires (Gr $\times 20 \times 10$).

2.6. Effets des fongicides sur l'activité respiratoire

Les figures 28, 29 et 30 illustrent les variations de l'activité respiratoire chez les paramécies témoins et traitées avec les différentes concentrations des trois fongicides.

- *Cas du Thirame*

Nous remarquons que les paramécies traitées avec la plus faible concentration de Thirame (0.001 mg/l) présentent un taux d'oxygène quasi similaire à celui des témoins (Figure 28). En effet, le taux d'oxygène consommé chez les témoins passe de 298 nmole/ml (T0) à 18.08 nmole/ml et à 27.85 nmole/ml pour les traitées, après 4 minutes.

Parallèlement, une inhibition du métabolisme respiratoire est notée pour les paramécies traitées avec les concentrations 0.002 mg/l et 0.003 mg/l avec un taux d'oxygène respectivement de l'ordre de 65.05 nmole/ml et 148.58 nmole/ml au bout de la 4^{ème} minute.

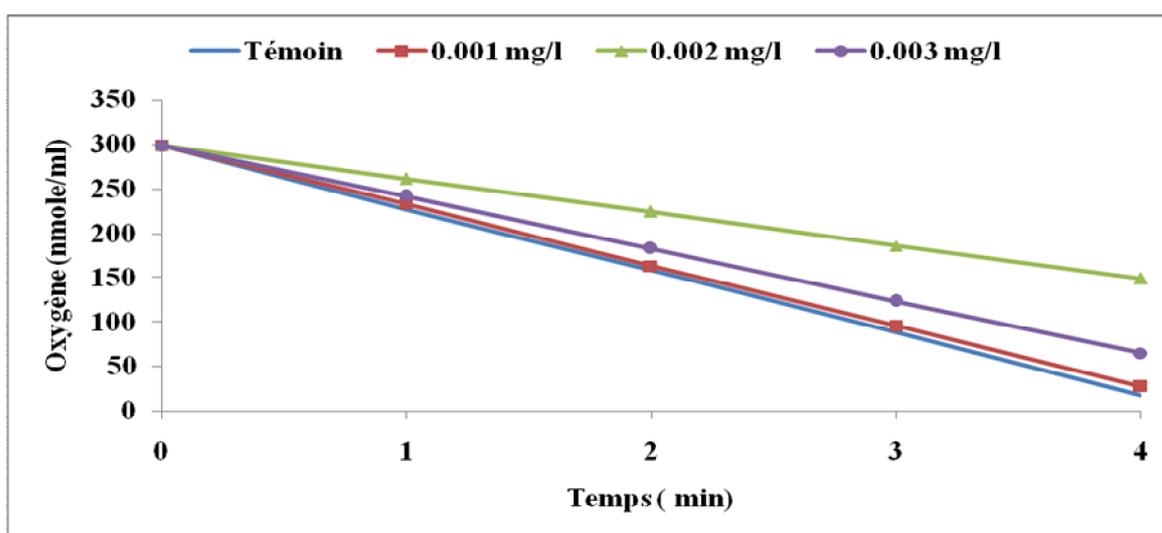


Figure 28. Evolution de l'activité respiratoire en fonction des différentes concentrations du Thirame.

- *Cas du Tebuconazole*

Chez les paramécies exposées au Tebuconazole, nous constatons une légère stimulation du métabolisme respiratoire (Figure 29). En effet, le taux d'oxygène passe de 227.14 nmole/ml à 83.42 nmole/ml et à 109.99 nmole/ml respectivement pour les concentrations 0.002 mg/l et 0.01 mg/l, comparés au témoin où la consommation d'oxygène passe de

227.14 nmole/ml à 118.57 nmole/ml. Cette stimulation de la respiration est encore plus marquée pour les cellules soumises aux fortes concentrations 0.04 mg/l et 0.08 avec respectivement 10.61 nmole/ml et 1.46 nmole/ml à la 5^{ème} minute.

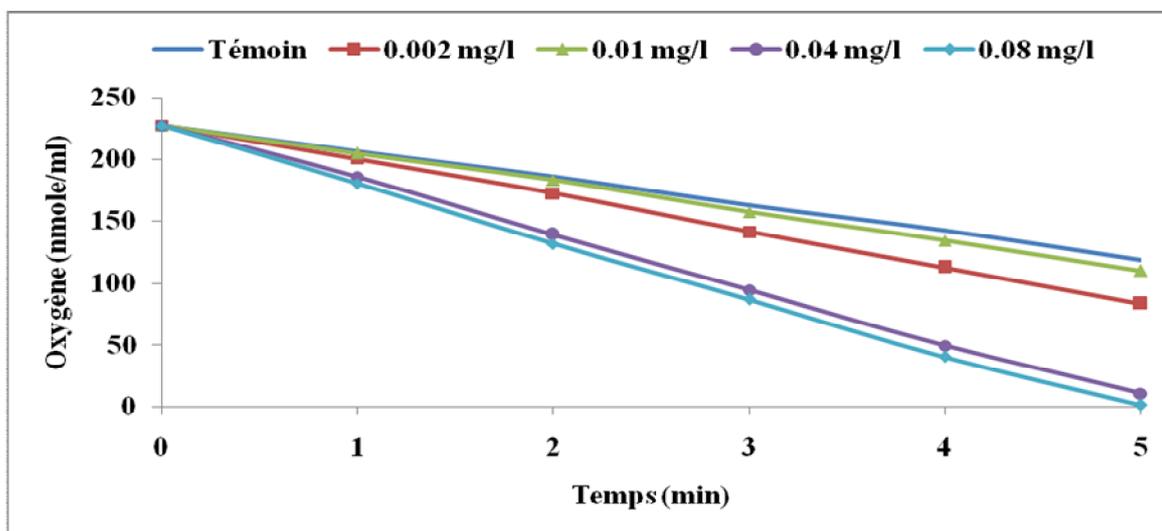


Figure 29. Evolution de l'activité respiratoire en fonction des différentes concentrations du Tebuconazole.

- *Cas de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole*

Concernant les paramécies traitées avec la combinaison des 2 matières actives aux concentrations 0.1, 0.5 et 1 mg/l, le métabolisme respiratoire est relativement stimulé (Figure 30). En effet le taux d'oxygène passe d'environ 225 nmole/ml à 50 nmole/ml au bout de 5 minutes. En revanche pour les traitées par la plus forte concentration du xénobiotique (1.5 mg/l), nous constatons une légère diminution de la consommation d'oxygène, avec un taux de l'ordre de 100 nmole/ml, après 5 minutes.

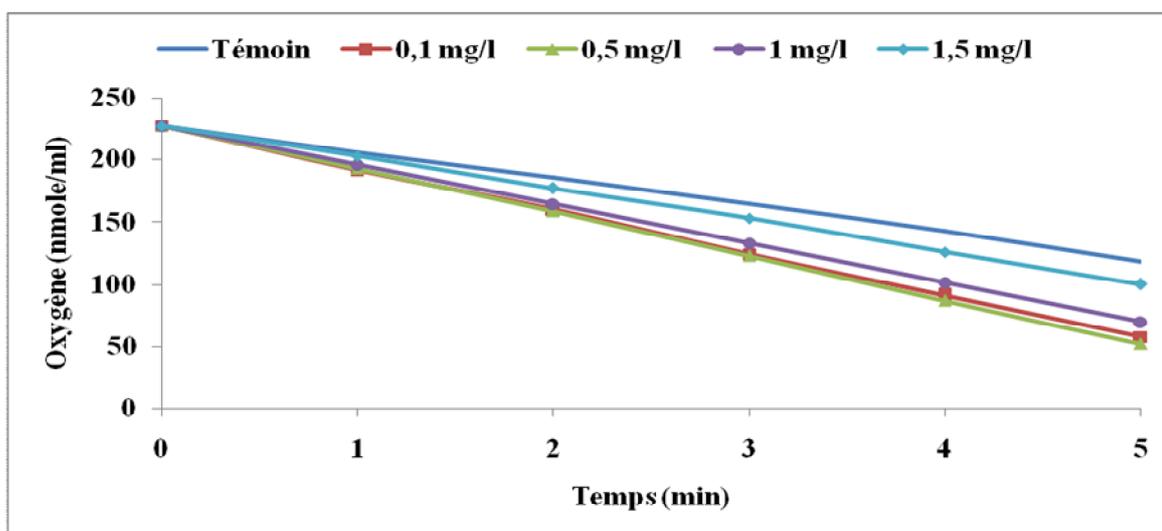


Figure 30. Evolution de l'activité respiratoire en fonction des différentes concentrations de la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole.

2.7. Effets des fongicides sur les biomarqueurs de toxicité

2.7.1. Effets des fongicides sur le taux des protéines totales

Les tableaux 9, 10 et 11 mettent en évidence l'évolution de la teneur en protéines chez les paramécies témoins et traitées.

- *Cas du Thirame*

Après traitement au Thirame par une faible concentration (0.001 mg/l), le taux protéique augmente légèrement pour atteindre une valeur moyenne de 0.99 $\mu\text{g/ml}$ puis ce taux tend à diminuer de manière significative ($p \leq 0.05$) par rapport au témoin et atteint la valeur de 0.58 $\mu\text{g/ml}$ pour la plus forte concentration (0.003 mg/l) (Tableau 9).

Tableau 9. Effets des concentrations croissantes du Thirame sur la teneur en protéines totales chez *Paramecium sp.*

	Témoin	0,001 mg/l	0,002 mg/l	0,003 mg/l
Protéines ($\mu\text{g/ml}$)	0.87 \pm 0.08	0.99 \pm 0.09	0.83 \pm 0.17	0.58 \pm 0.06 *

- *Cas du Tebuconazole*

L'élévation de la teneur protéique, déterminée par les différentes concentrations de Tebuconazole est plus importante sous traitement par une concentration de 0.08 mg/l. Elle est de l'ordre de 1 µg/ml (Tableau 10).

Tableau 10. Effets des concentrations croissantes de Tebuconazole sur la teneur en protéines totales chez *Paramecium sp.*

	Témoin	0,002 mg/l	0,01 mg/l	0,04 mg/l	0,08 mg/l
Protéines (µg/ml)	0.87± 0.08	0.75± 0.11	0.84± 0.08	0.91 ± 0.06	1.00 ± 0.05 *

- *Cas de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole*

Le traitement par 0.1 mg/l de la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole induit une nette augmentation hautement significative ($P \leq 0.01$) pour ce paramètre (Tableau 11), affichant une valeur moyenne de 1.68 µg/ml chez les cellules traitées. Pour les concentrations 0.5 et 1 mg/l, la teneur en protéines est presque identique à celles des cellules témoins (0.87 µg/ml) avec les valeurs respectives de 0.99 µg/ml et 0.85 µg/ml. Cependant, la concentration protéique diminue de manière hautement significative ($P \leq 0.01$) chez les cellules exposées à la plus forte concentration soit 1.5 mg/l. En effet ce taux passe à 0.36 µg/ml.

Tableau 11. Effets des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur la teneur en protéines totales chez *Paramecium sp.*

	Témoin	0,1 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	1,5 mg/l
Protéines (µg/ml)	0.87 ± 0.08	1.68 ± 0.14 **	0.99 ± 0.02	0.86 ± 0.02	0.36 ± 0.00 **

2.7.2. Effets des fongicides sur l'activité CAT

Les variations de l'expression de l'activité Catalase chez *Paramecium sp.* exposé aux trois fongicides, sont représentées dans les figures 31, 32 et 33. Sous l'effet des différents traitements, l'activité de l'enzyme montre des variations en fonction de la dose appliquée.

- *Cas du Thirame*

Au vu de la représentation graphique 31, nous pouvons constater qu'après traitement des cellules au Thirame, l'activité enzymatique est stimulée de manière significative, environ 3 fois plus importante que la moyenne décelée chez le témoin (0.12 μ mole/min/mg protéines). Au-delà de cette concentration, l'activité Catalase tend à diminuer mais reste néanmoins supérieure à celle des témoins, puisque pour la plus forte concentration de Thirame (0.003 mg/l), l'activité CAT est de l'ordre de 0.23 μ mole/min/mg protéines.

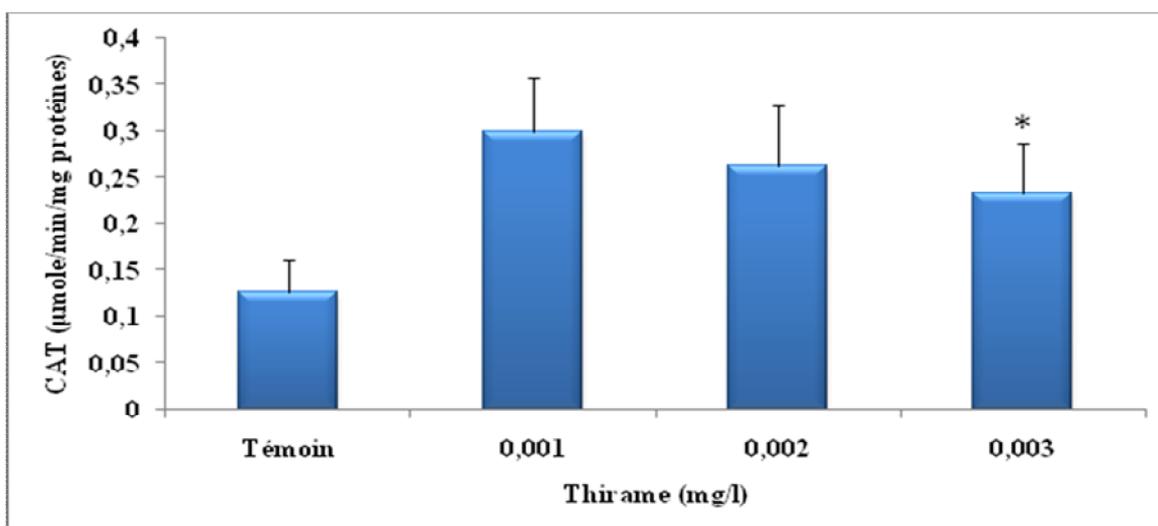


Figure 31. Effet des concentrations croissantes du Thirame sur l'évolution de l'activité Catalase chez *Paramecium sp.*

- *Cas du Tebuconazole*

L'effet d'une exposition des paramécies au Tebuconazole, révèle une hausse significative ($p \leq 0.05$) de l'activité enzymatique de la Catalase (Figure 32). L'augmentation déterminée par les différentes concentrations est plus importante sous

traitement par la plus forte concentration (0.08 mg/l), avec une valeur moyenne de 0.22 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, alors que chez le témoin, elle ne dépasse pas 0.12 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

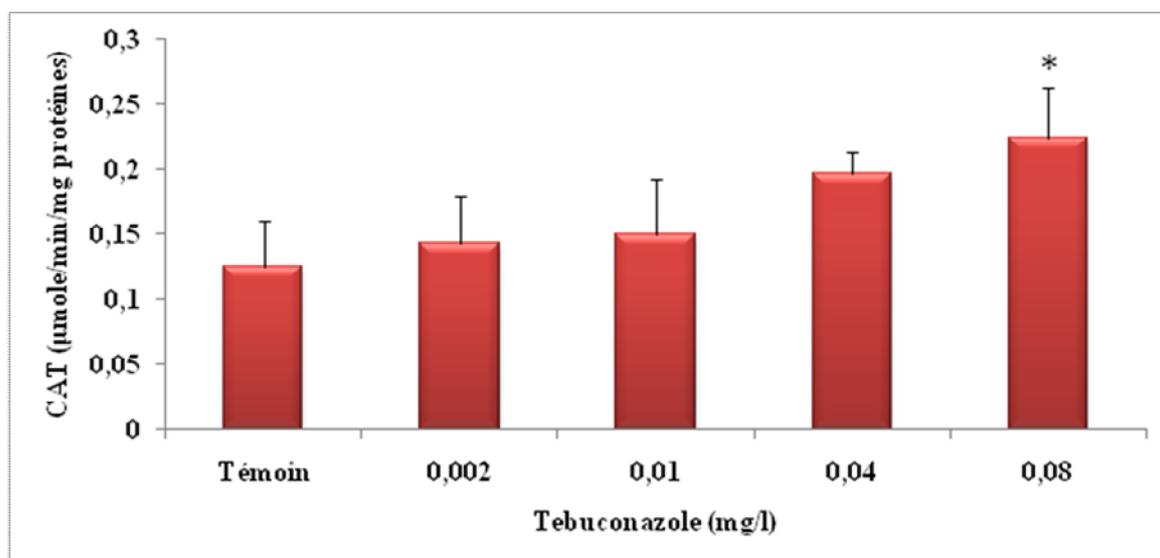


Figure 32. Effet des concentrations croissantes du Tebuconazole sur l'évolution de l'activité Catalase chez *Paramecium sp.*

- **Cas de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole**

Les résultats obtenus après traitement avec la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole montrent une induction du paramètre étudié à partir de la première concentration (0.1 mg/l) avec une valeur moyenne de 0.16 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (Figure 33). Cette caractéristique commence à être significative ($p \leq 0.05$) après exposition à une concentration de 0.5 mg/l où l'activité CAT atteint son maximum avec une moyenne de 0.18 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$. Cependant, l'activité de cette enzyme tend à diminuer à partir de la concentration 1 mg/l, jusqu'à atteindre une moyenne inférieure à celle du témoin pour la plus forte concentration (1.5 mg/l).

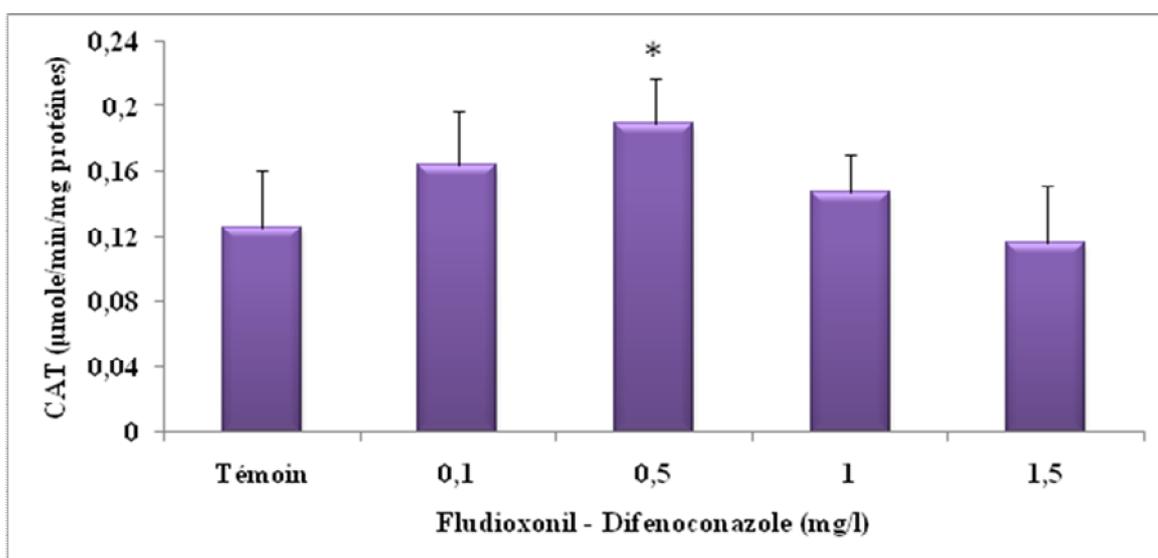


Figure 33. Effet des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur l'évolution de l'activité Catalase chez *Paramecium sp.*

2.7.3. Effets des fongicides sur le taux du GSH

La variation des teneurs en GSH chez les paramécies traitées avec les 3 fongicides par rapport à leurs témoins, est présentée dans les figures 34, 35 et 36. La dynamique du Glutathion varie significativement ($p \leq 0.05$) se traduisant par une diminution chez les cellules traitées.

- *Cas du Thirame*

Le suivi de l'effet de l'exposition des cellules au Thirame révèle un effet inhibiteur (Figure 34). Le taux de Glutathion diminue de manière significative ($p \leq 0.05$) et dose-dépendante chez les cellules traitées. Une concentration de 0.001 mg/l induit une faible diminution (0.27 nmole/mg) par rapport au témoin (0.29 nmole/mg de protéines), alors qu'une concentration de 0.003 mg/l, diminue sensiblement ce taux pour atteindre une valeur minimale de 0.19 nmole/mg de protéines.

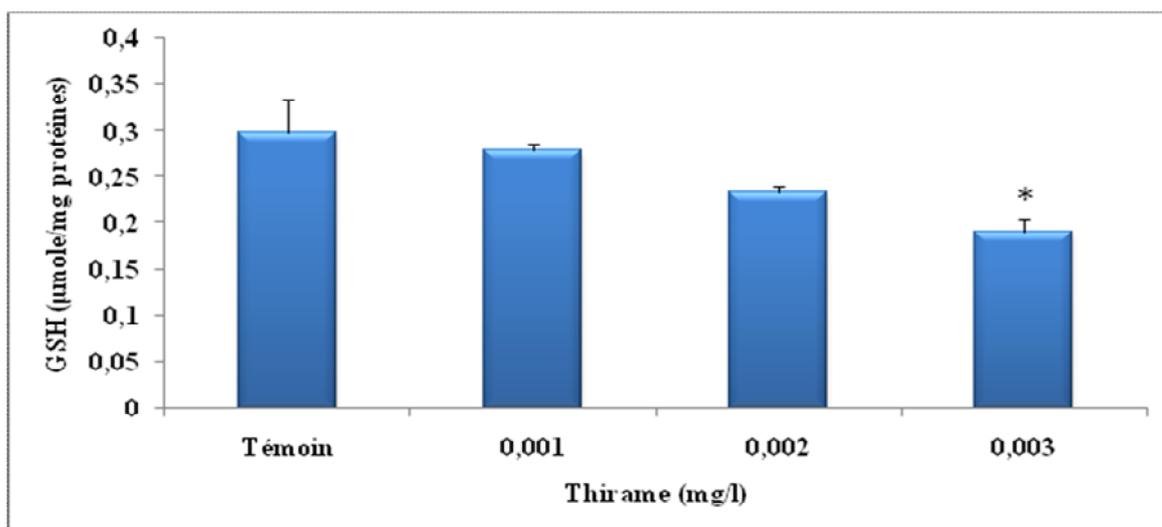


Figure 34. Effets des concentrations croissantes du Thirame sur le taux du GSH chez *Paramecium sp.*

- *Cas du Tebuconazole*

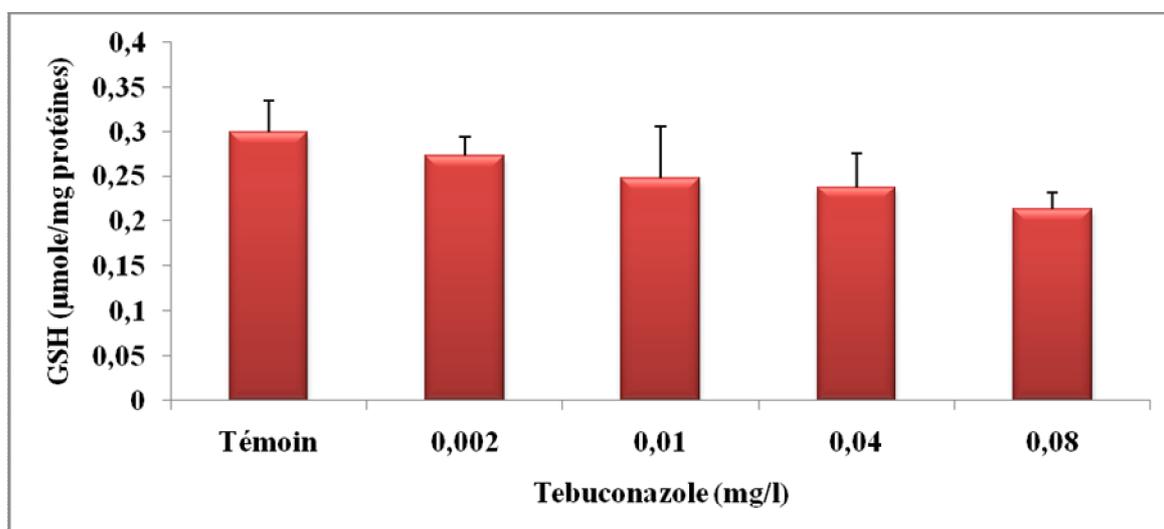


Figure 35. Effets des concentrations croissantes du Tebuconazole sur le taux du GSH chez *Paramecium sp.*

Le traitement par le Tebuconazole entraîne une diminution dose-dépendante de la teneur en GSH par rapport aux témoins. Ainsi, pour un traitement de 0.08 mg/l de Tebuconazole, la teneur en GSH demeure moins élevée chez les cellules traitées par

rapport aux cellules non traitées (0.29 nmole/mg de protéines) atteignant une moyenne de 0.21 nmole/mg de protéines (Figure 35).

- *Cas de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole*

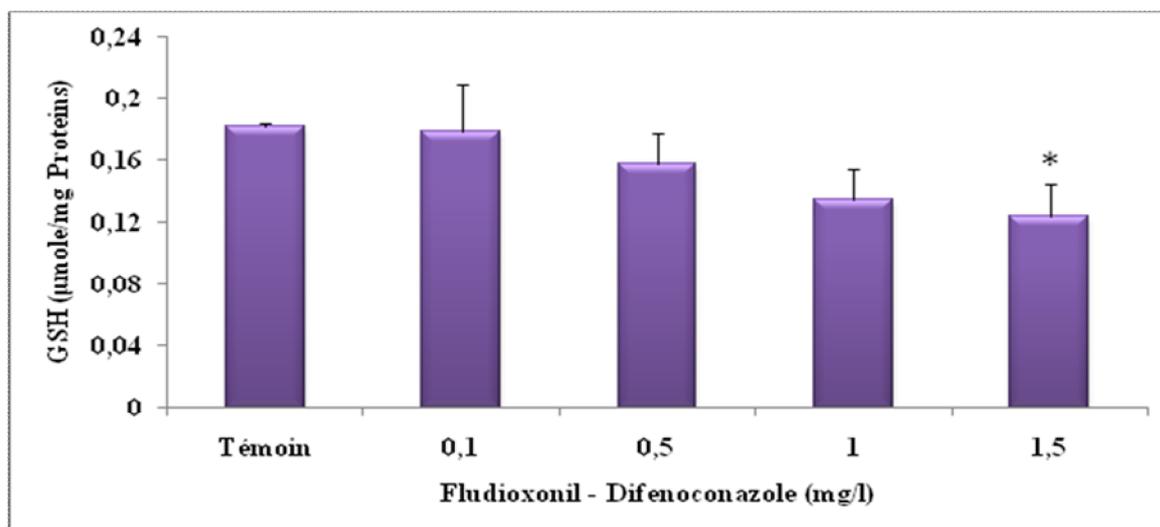


Figure 36. Effets des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur l'évolution du taux de GSH chez *Paramecium sp.*

La figure 36 illustre l'effet du traitement avec la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole. En absence de traitement avec le mélange Fludioxonil - Difenoconazole, le taux de GSH affiche une valeur moyenne de 0.18 nmole/mg de protéines. Le traitement par une forte concentration du xénobiotique (1.5 mg/l) a un effet marqué sur la teneur en GSH. En effet, nous notons une diminution significative par rapport au témoin ($p \leq 0.05$) affichant une valeur moyenne de 0.12 nmole/mg.

2.7.4. Effets des fongicides sur l'activité GST

La variation de l'expression de l'activité GST chez *Paramecium sp.* témoin et traité est représentée dans les figures 37, 38 et 39. La concentration moyenne de cette enzyme observée en absence de traitement est de l'ordre de 0.0018 µmole/min/mg de protéines.

- *Cas du Thirame*

L'analyse des effets des différentes concentrations de Thirame sur l'activité enzymatique GST chez *Paramecium sp.* montre que sous l'effet d'une concentration de

0.001 mg/l, le niveau d'expression de l'enzyme est supérieur à la valeur moyenne du témoin (0.0027 μ mole/min/mg de protéines). Toutefois, nous notons qu'à partir de la concentration 0.003 mg/l, l'activité enzymatique tend globalement à diminuer et atteint une moyenne inférieure à celle des témoins (0.0016 μ mole/min/mg de protéines).

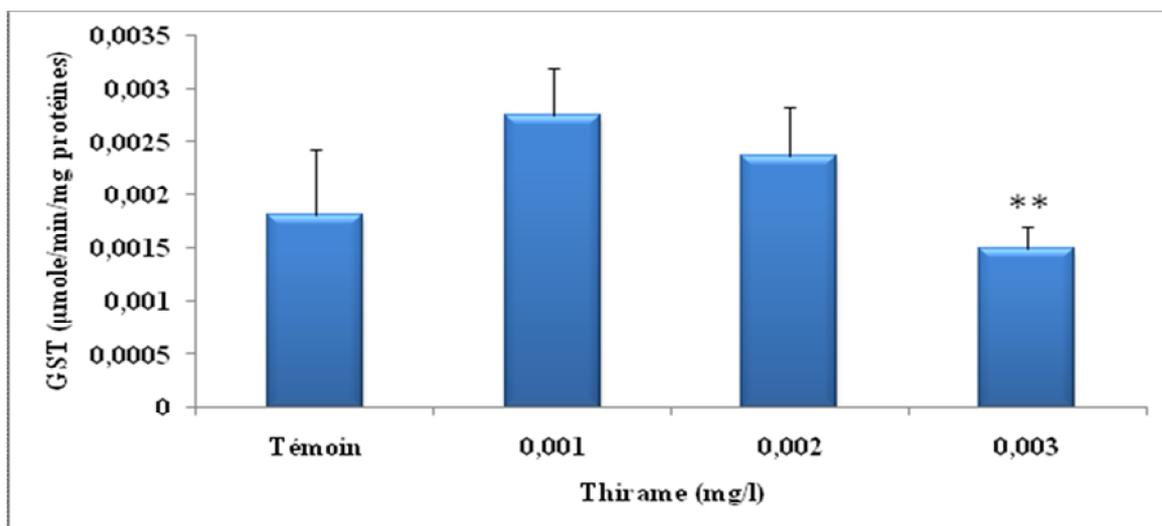


Figure 37. Effet des concentrations croissantes du Thirame sur l'évolution de l'activité Glutathion S-transferase chez *Paramecium sp.*

- *Cas du Tebuconazole*

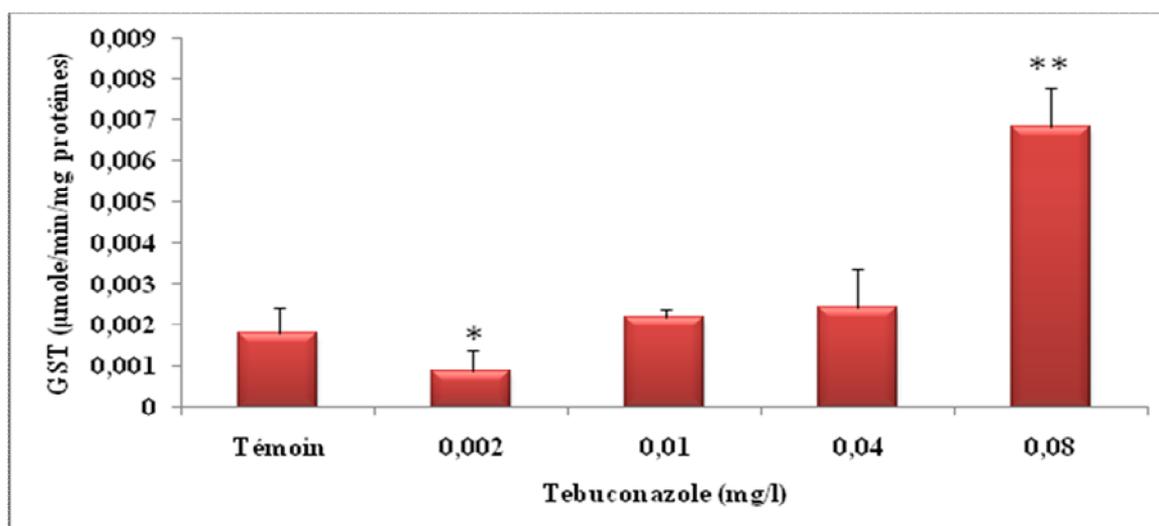


Figure 38. Effet des concentrations croissantes du Tebuconazole sur l'évolution de l'activité Glutathion S-transferase chez *Paramecium sp.*

La figure 38 met en évidence une induction dose-dépendante et hautement significative de l'activité GST ($P \leq 0.01$). Cette enzyme montre un niveau d'activité élevé par rapport au témoin chez les cellules exposées à la plus forte concentration (0.08 mg/l) affichant une valeur moyenne de 0.0068 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines comparée au témoin qui n'est que de 0.0018 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

- **Cas de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole**

L'élévation de l'activité GST chez les paramécies traitées au Fludioxonil – Difenoconazole est significative ($p \leq 0.05$) et dose-dépendante. En effet, l'activité de la GST semble être plus faible en absence de traitement comparée à son niveau d'activité chez les cellules traitées (Figure 39). L'activité maximale de cette enzyme est enregistrée pour la plus forte concentration (1.5 mg/l) où on atteint un niveau 2 fois plus élevé par rapport au témoin.

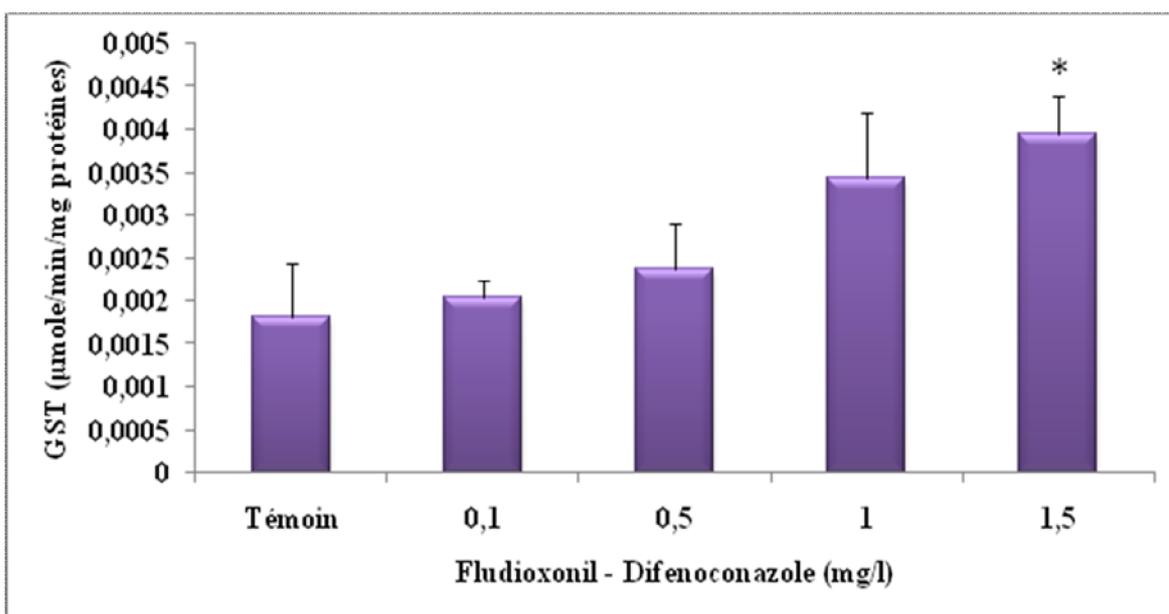


Figure 39. Effet des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur l'évolution de l'activité Glutathion S-transferase chez *Paramecium sp.*

2.7.5. Effets des fongicides sur l'activité GPx

L'analyse des effets des trois xénobiotiques sur le niveau d'activité de cette enzyme montre des variations d'expressions très hautement significative ($p \leq 0.001$), en fonction des concentrations appliquées, (Figures 40, 41 et 42).

- *Cas du Thirame*

Un traitement au Thirame montre que le niveau de la GPx diffère sensiblement d'une concentration à une autre ($p \leq 0.001$) et semble être très faible en absence de traitement (0.030 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines). Pour les concentrations 0.001 et 0.002 mg/l, des taux de réponses respectives de l'ordre de 0.080 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines et de 0.113 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines ont été enregistrés (Figure 40). Toutefois, l'induction de l'activité GPx est plus apparente par rapport aux cellules témoins, avec un pic 5 fois plus élevé, pour la plus forte concentration (0.003 mg/l).

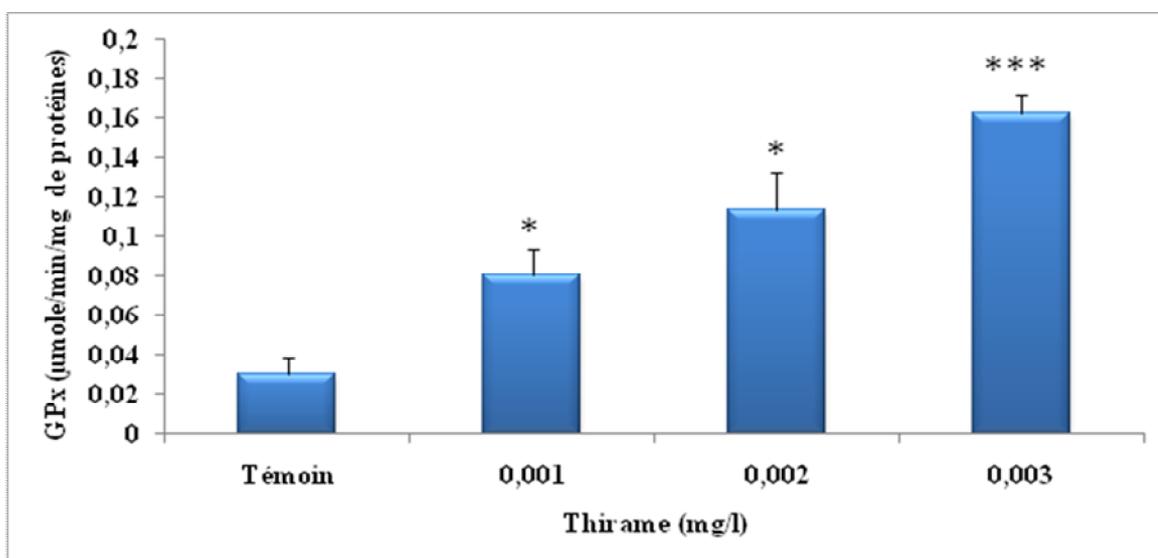


Figure 40. Effet des concentrations croissantes du Thirame sur l'évolution de l'activité Glutathion peroxydase chez *Paramecium sp.*

- *Cas du Tebuconazole*

Après exposition des paramécies au Tebuconazole, les variations enregistrées pour ce paramètre sont importantes. En effet la plus faible concentration (0.002 mg/l) induit une nette augmentation de l'activité GPx dont l'examen statistique a révélé des différences hautement significatives ($p \leq 0.001$) entre les cellules traitées et leur témoin, ce dernier affiche une moyenne de $0.547 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines ; environ 20 fois plus importante que celle des témoins qui n'est que de $0,030 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (Figure 41). Des activités importantes ($p \leq 0.001$) en GPx sont également notées pour les concentrations 0.01 et 0.04 mg/l avec des moyennes respectives de $0.255 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines et $0,184 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Cependant, nous avons enregistré une forte baisse pour ce paramètre à la plus forte concentration (0.08 mg/l) atteignant une moyenne de $0.069 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

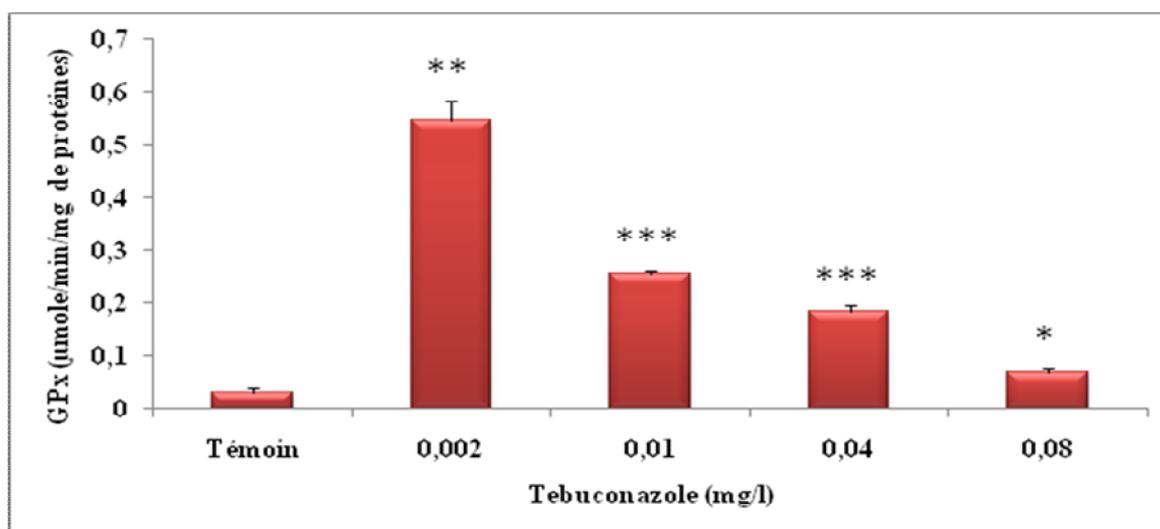


Figure 41. Effet des concentrations croissantes de Tebuconazole sur l'évolution de l'activité Glutathion peroxydase chez *Paramecium sp.*

- *Cas de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole*

Le même constat a été fait pour le traitement au Fludioxonil – Difenoconazole. Cette enzyme montre un niveau d'activité élevé et très hautement significatif ($p \leq 0.001$) par rapport au témoin, après exposition des cellules à la plus faible concentration (0.1 mg/l) où nous avons atteint une valeur moyenne de $0.261 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, environ 9

fois supérieur à celle enregistrée chez les cellules non traitées. Pour les paramécies exposées à la concentration 0.5, le degré d'activité de la GPx est d'autant plus important et significatif ($p \leq 0.05$), affichant une valeur moyennes de 0.157 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ (Figure 42). Cependant, au delà de cette concentration, l'activité GPx connaît un déclin important avec une valeur ne dépassant pas celle des cellules témoins.

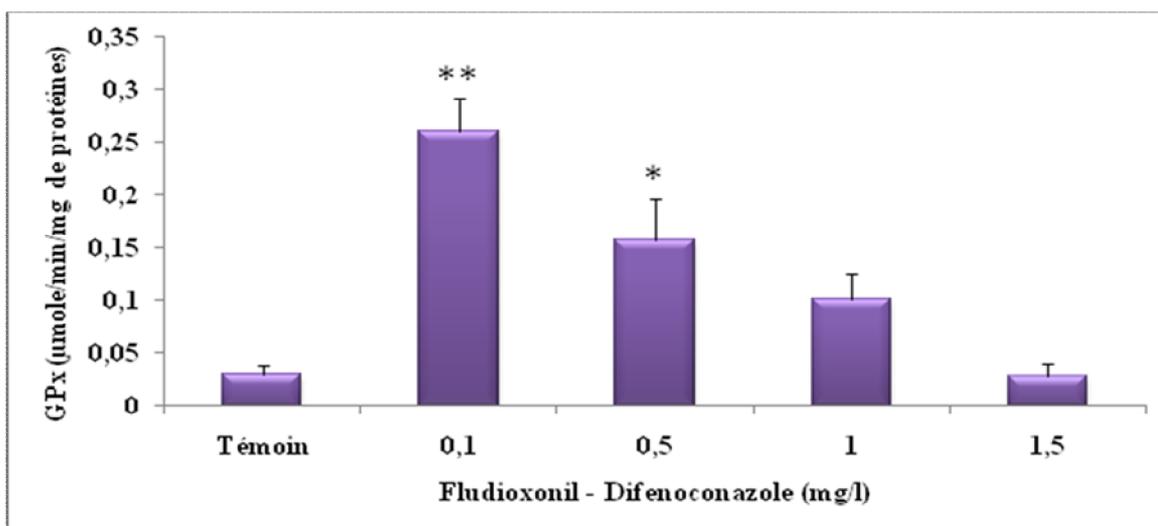


Figure 42. Effet des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur l'évolution de l'activité Glutathion peroxydase chez *Paramecium sp.*

2.7.6. Effets des fongicides sur le taux des TBARS

Les figures 43, 44 et 45 mettent en évidence l'évolution du taux des TBARS. L'ensemble des conditions investiguées semble avoir un effet inducteur enregistré chez les cellules traitées aux concentrations croissantes des trois fongicides.

- **Cas du Thirame**

La variation des teneurs des TBARS chez les paramécies cultivées en présence de Thirame est illustrée dans la figure 43. Nous constatons une augmentation dose-dépendante du taux des TBARS et ce dès la plus faible concentration du xénobiotique. Ainsi, le traitement par la plus forte concentration de Thirame (0.003 mg/l), induit une augmentation significative ($p \leq 0.05$) de ce taux avec une moyenne de 0.019 $\mu\text{mole}/\text{mg}$ de protéines, alors que celui des témoins est de l'ordre de 0.013 $\mu\text{mole}/\text{mg}$ de protéines.

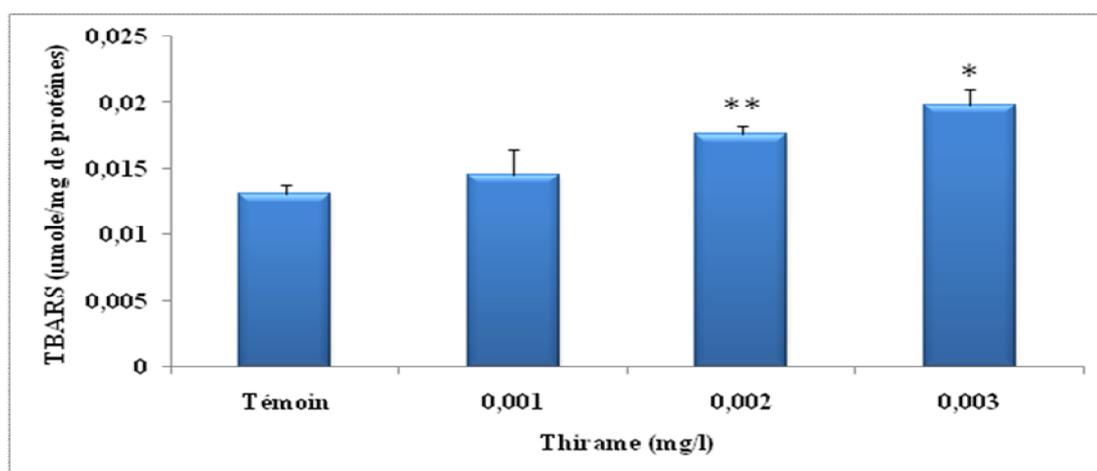


Figure 43. Effet des concentrations croissantes du Thirame sur le taux des TBARS chez *Paramecium sp.*

- *Cas du Tebuconazole*

La figure 44 met en évidence l'effet du Tebuconazole sur les variations du taux des TBARS chez les paramécies témoins et traitées. Les résultats révèlent que pour un traitement de 0.08 mg/l, la lipoperoxydation est plus élevée, comparées aux cellules témoins (0.013 µmole/mg de protéines), avec un effet très hautement significatif ($p \leq 0.001$) atteignant une moyenne 2 fois supérieure que celle enregistrée chez les témoins, soit un taux de 0.026 µmole/mg de protéines.

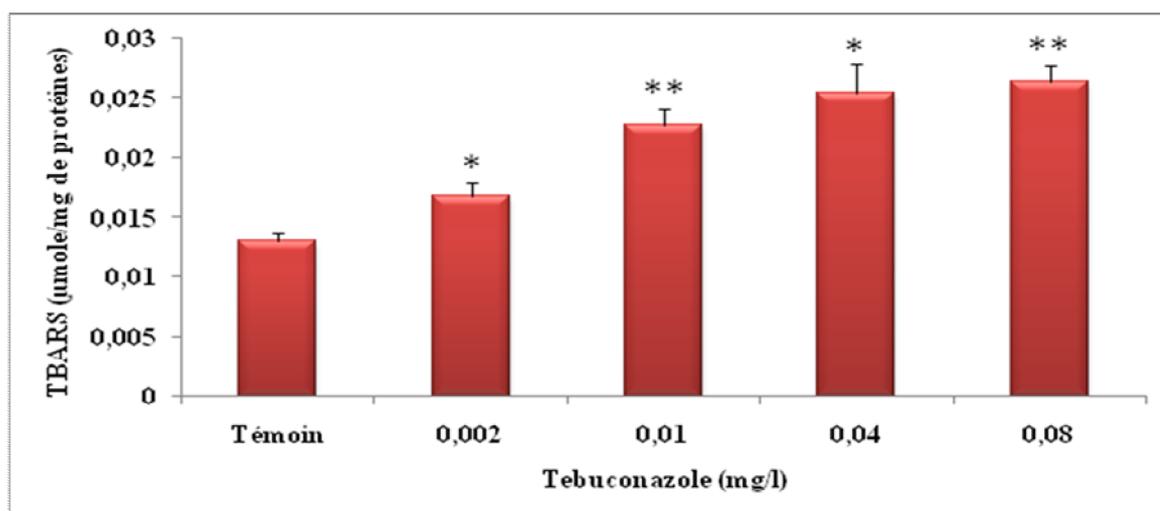


Figure 44. Effet des concentrations croissantes du Tebuconazole sur le taux des TBARS chez *Paramecium sp.*

- *Cas de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole*

Les résultats relatifs à l'effet de la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole sur l'évolution du taux des TBARS sont illustrés sur la figure 44. Ainsi, nous constatons des quantités hautement significatives ($p \leq 0.01$) observées chez l'ensemble de la population traitée. En effet, des concentrations de 1 et 1.5 mg/l du xénobiotique sont capables d'augmenter la production des TBARS de 2 jusqu'à 3 fois par rapport au témoin, ce qui met en évidence la relation dose-effet.

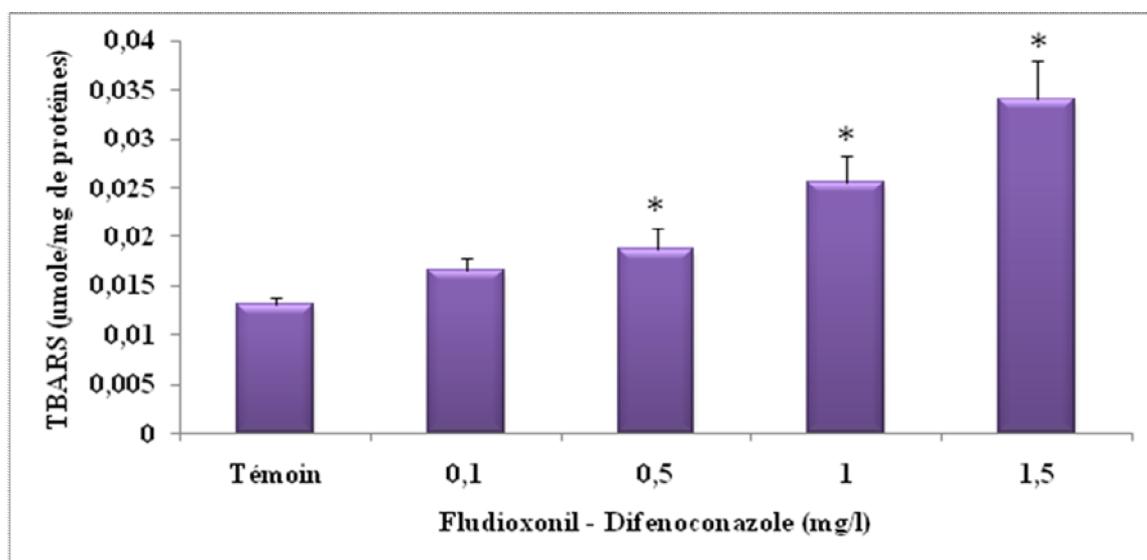


Figure 45. Effet des concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole sur le taux des TBARS chez *Paramecium sp.*

2.7.7. Effets des fongicides sur l'état redox cellulaire

Les tableaux 11, 12 et 13 illustrent les changements du taux des métabolites réactifs de l'oxygène (ROMs), exprimés en $\mu\text{mole}/\mu\text{g}$ de H_2O_2 , et du potentiel biologique antioxydant (BAPs) exprimé en $\mu\text{mole}/\text{l}$.

- *Cas du Thirame*

Le tableau 12 met en évidence l'évolution du taux des ROMs et des BAPs chez les paramécies témoins et traitées par les concentrations croissantes de Thirame. Nous constatons que ces deux paramètres augmentent de manière dose dépendante chez les Thirame (0.003 mg/l), le taux de H_2O_2 est de l'ordre de $2.4 \mu\text{mole}/\mu\text{g}$ et le taux des BAPs

est de 6966 $\mu\text{mole/l}$ alors que chez les témoins il n'est que de 0.88 $\mu\text{mole}/\mu\text{g}$ pour le H_2O_2 et 6325 $\mu\text{mole/l}$ pour les BAPs.

Tableau 12. Evolution du taux du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du potentiel biologique antioxydant (BAPs) chez *Paramecium sp.* exposé aux concentrations croissantes du Thirame.

Test	Témoin	0.001 mg/l	0.002 mg	0.003 mg/l
H_2O_2 ($\mu\text{mole}/\mu\text{g}$)	0.88	1.36	1.84	2.4
BAPs ($\mu\text{mole/l}$)	6325	6746	6812	6966

- *Cas du Tebuconazole*

Le tableau 13 illustre l'évolution du taux de H_2O_2 et des BAPs chez les paramécies témoins et traitées par des concentrations croissantes de Tebuconazole. Chez les cellules cultivées en présence de la plus forte concentration (0.08 mg/l), les résultats révèlent une augmentation dose-dépendante de ces deux paramètres avec un taux de 2.79 $\mu\text{mole}/\mu\text{g}$ pour le H_2O_2 et 7169 $\mu\text{mole/l}$ pour les BAPs, contrairement aux cellules témoins dont le taux de H_2O_2 n'est que de 0.88 $\mu\text{mole}/\mu\text{g}$ et le celui des BAPs ne dépasse pas 6325 $\mu\text{mole/l}$.

Tableau 13. Evolution du taux du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du potentiel biologique antioxydant (BAPs) chez *Paramecium sp.* exposé aux concentrations croissantes du Tebuconazole.

Test	Témoin	0.002 mg/l	0.01 mg/l	0.04 mg/l	0.08 mg/l
H_2O_2 ($\mu\text{mole}/\mu\text{g}$)	0.88	1.04	1.36	2	2.79
BAPs ($\mu\text{mole/l}$)	6325	6682	7128	6943	7169

- *Cas de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole*

Les résultats obtenus pour la combinaison des deux xénobiotiques sont détaillés dans le tableau 14. Nous constatons une augmentation dose-dépendante du taux de H₂O₂ chez les paramécies traitées (2,02 µmol/µg) par rapport aux témoins (0.88 µmol/µg) et ce pour la plus forte concentration (1.5 mg/l). Le taux de BAPs, tend à augmenter pour les deux plus faibles concentrations des xénobiotiques (0.1 et 0.5 mg/l) avec un maximum de 7128 µmole/l comparé au témoin qui n'est que de 6325 µmole/l. Au-delà de ces concentrations, ce taux de tend à diminuer pour atteindre la valeur de 6931 µmol/l chez les cellules exposées à 1.5 mg/l.

Tableau 14. Evolution du taux du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et du potentiel biologique antioxydant (BAPs) chez *Paramecium sp.* exposé aux concentrations croissantes de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole.

Test	Témoin	0.1 mg/l	0.5 mg/l	1 mg/l	1.5 mg/l
H ₂ O ₂ (µmole/µg)	0.88	1	1.36	1.6	2.02
BAPs (µmole/l)	6325	6614	7128	6966	6931

Discussion générale

L'intensification de l'agriculture a entraîné une charge accrue du sol et des eaux par les pesticides, impactant fortement les écosystèmes en menaçant la biodiversité et les organismes vivants.

Les pesticides comptent parmi les polluants majoritairement rencontrés dans le milieu aquatique car moins de 0.3% des pesticides appliqués atteignent leurs ravageurs cibles, et les 99.7% restants s'accumulent dans l'environnement et seront ensuite lessivés dans les eaux souterraines et les eaux de surface (**Pimentel et Burgess, 2011**).

La communauté scientifique a donc pris conscience des dangers de l'emploi massif des pesticides, tant pour la santé humaine que pour l'environnement. La caractérisation des risques engendrés par ces polluants est donc devenue un « enjeu écotoxicologique » majeur. L'étude des réponses biologiques chez les microorganismes soumis aux différents contaminants est considérée comme une approche alternative très efficace et représente, de ce fait, un enjeu environnemental de taille afin d'évaluer l'état de stress auquel ils sont confrontés et les dommages causés. De plus, il est connu que les microorganismes représentent l'un des liens par lesquels les contaminants pourraient être transmis à travers la chaîne alimentaire affectant ainsi les organismes de niveaux trophiques supérieurs, menant à des effets délétères sur la santé humaine.

Les protozoaires ciliés sont des modèles d'étude privilégiés des milieux aquatiques, en raison de leur petite taille, ils se multiplient à travers de courts cycles cellulaires, ce qui rend possible l'étude des effets des contaminants sur plusieurs générations (**Amanchi et Hussain, 2010**).

Pourquoi le choix des paramécies comme modèle biologique ?

L'apparente simplicité des paramécies est trompeuse. En fait, la cellule unique des paramécies est plus complexe que la cellule animale typique. Toutes les fonctions nécessaires à la vie animale sont remplies par cette cellule unique. La paramécie est un être autonome qui assure grâce à ses organites (ou organelle) toutes les fonctions physiologiques assurées par les tissus et organes des animaux les plus complexes.

Ubiquitaires dans les eaux douces, les paramécies sont de plus en plus utilisées en écotoxicologie de par leur faible coût et leur facilité de culture (**Madoni, 2000 ; Miyoshi et**

al., 2003 ; Takahashi *et al.*, 2005 ; Venkateswara *et al.*, 2008 ; Mortuza *et al.*, 2009; Amanchi et Hussain 2010 ; Shubhamsingh et Tejashree, 2014), elles se caractérisent aussi par un cycle de vie court et une multiplication rapide (Beal et Anderson, 1993).

Ce travail vise à étudier les effets de trois fongicides très utilisés en Algérie pour le traitement du blé (soit par enrobage soit par pulvérisation) sur les métabolismes essentiels de *Paramecium sp.* et à évaluer la réponse de ce dernier vis-à-vis des différentes concentrations testées.

Quels sont les effets des trois fongicides sur les paramètres physiologiques de *Paramecium sp.* ?

Nous nous sommes intéressés en premier lieu aux effets de ces trois xénobiotiques sur la croissance cellulaire qui est un paramètre clé (Sauvant *et al.*, 1999 ; Perez-Rama, 2001). La croissance a été largement utilisée comme un indicateur de stress des environnements aquatiques (Widdows *et al.*, 1982 ; Page et Widdows, 1991 ; WO *et al.*, 1999 ; Akcha, 2000 ; Amara, 2012) car elle fournit une estimation de l'impact d'un xénobiotique.

Le test de croissance consiste à mesurer la cinétique de croissance d'un microorganisme dans un milieu de culture artificiel durant une conservation dans des conditions contrôlées pendant une durée prédéfinie (Branger *et al.*, 2007). La densité cellulaire dans le milieu est mesurée quotidiennement par un comptage direct des cellules.

L'exposition des paramécies aux concentrations sublétales du Thirame, du Tebuconazole et de la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole induit une déplétion importante du nombre de cellules. Cette inhibition de la croissance est observée dès les plus faibles concentrations : 0.001 mg/l pour le Thirame, 0.002 mg/l pour le Tebuconazole et 0.1 mg/l pour la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole.

Cet effet inhibiteur et/ou perturbateur des trois xénobiotiques sur la viabilité cellulaire, est confirmé par le pourcentage de réponse (Wong *et al.*, 1999), qui apporte en amont une indication sur la toxicité des xénobiotiques.

Ainsi, la croissance cellulaire peut être considérée comme un excellent indicateur de toxicité comme le rapportent les travaux de **Rouabhi et al., (2006)** qui ont testé les effets de deux pesticides, le Flucycloxuron et le Diflubenzuron, sur la paramécie ; ou encore ceux de **Amanchi et Hussain en 2010** dont les travaux ont mis en évidence une toxicité d'un insecticide biologique, issu de la bactérie *Bacillus thuringiensis*, sur le comportement de *Paramecium caudatum* . Il en est de même concernant les travaux de **Sbartai (2012)** sur le Bifenazate et l'Indoxacarbe et de **Shubhamsingh et Tejashree (2014)** sur le Dimethoate.

Mountassif et al., (2007) expliquent cette inhibition de la croissance, par le fait que les fongicides peuvent perturber la divisions cellulaires des paramécies ainsi que leur métabolisme et par conséquent, provoquer leur mortalité.

Les travaux de **Dewez et al. (2005)** concernant l'étude des effets toxiques du Fludioxonil sur une algue largement distribuée dans les eaux douces (*Scenedesmus obliquus*), mettent en évidence une réduction de la biomasse allant jusqu'à 55% lorsque les cellules sont traitées avec 3 mg/l de Fludioxonil durant 48h. D'un autre côté, la présence de Tebuconazole dans le milieu de culture de *Daphnia magna*, est à l'origine d'une mortalité/immobilité dose-dépendante (**Sancho et al., 2009**). Il en est de même pour *Paramecium tetraurelia* traité par des concentrations croissantes de Cyproconazole (Triazole) combiné à l'Azoxystrobine (**Azzouz, 2012**).

L'exposition de la truite (*Salmo gairdneri*) au cours de son développement embryo-larvaire a révélé que les Dithiocarbamates tels que les Ethylènebisdithiocarbamates, les Dialkyldithiocarbamates, Thirame et Zirame sont des substances toxiques (puissants tératogènes) (**Van Leeuwen et al., 1986**). Les rayons X ont révélé des malformations chez les individus exposés ainsi qu'une compression et une fusion des éléments squelettiques. L'exposition semi chronique de la truite aux Dithiocarbamates (Zirame, Thiram et Dialkyldithiocarbamates) induit une diminution du stockage du glycogène hépatique. A des niveaux d'exposition élevés des nécroses des hépatocytes sont observées. Ces mêmes auteurs rapportent qu'une contamination des truites juvéniles par de faibles concentrations de Thirame (5 µg/l) suffit pour provoquer des hémorragies importantes au niveau du cerveau.

Le Thirame est extrêmement toxique, y compris, vis-à-vis d'organismes non-aquatiques. Des études menées par **Stoker et al. (1993, 2003)** ont montré que le Thirame induit des retards ovulatoires chez les rats affectant ainsi leur fécondité et inhibe la spermatogenèse chez les rats **Mishra et al., (1998)**. Nos résultats ne font que confirmer la toxicité des xénobiotiques testés.

Les résultats obtenus quant au temps de dédoublement et le nombre de génération viennent appuyer le potentiel toxique des 3 xénobiotiques. En microbiologie, le temps de génération se définit par le temps nécessaire à une population de microorganismes pour doubler son nombre. Ce temps varie en fonction de l'espèce étudiée et des conditions environnementales (**Prescott et al., 2003**), c'est ainsi que des agents physicochimiques peuvent affecter la croissance en prolongeant le temps des divisions cellulaires (**Durand, 1994**).

Le temps de génération moyen des paramécies témoins est estimé à 12.81 heures ; en revanche, chez les paramécies traitées le temps de génération varie de manière dose-dépendante et en fonction du fongicide testé. De plus, le nombre de génération diminue de manière inversement proportionnelle aux concentrations des trois fongicides.

Des valeurs du même ordre de grandeur ont été obtenues par (**Venkateswara Rao et al., 2006**) dans une étude sur les effets d'un insecticide Organophosphoré (Acephate) sur la morphologie, le comportement et le temps de génération de *Paramecium caudatum* ; il en est de même concernant les travaux de **Azzouz et al. (2011)** sur *Paramecium tetraurelia* traité par la combinaison Cyproconazole - Azoxystrobine.

Mountasif et al. (2007) ayant testé les effets cytotoxiques de trois sels métalliques : Chlorure de Cadmium (CdCl_2), Sulfate de Fer (FeSO_4) et Nitrate de chrome ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) sur le protozoaire cilié *Tetrahymena pyriformis*, soulignent la relation linéaire positive entre les concentrations testées et l'augmentation du temps de dédoublement cellulaire. Les valeurs obtenues pour *T. pyriformis* traitée par des CI50 de Chlorure de Cadmium, de Sulfate de Fer et de Nitrate de chrome sont plus élevées que celles des témoins.

La présence des trois formulations commerciales dans le milieu de culture génère des valeurs de CE50 respectives de 0.027, 0.041 et 0.5 mg/l pour le Thirame, le Tebuconazole et la combinaison Fludioxonil – Difenconazole. Le Thirame s'avère donc la molécule la plus toxique présentant la CE50 la plus faible. Cette toxicité confirmée par **Sipcam Inagra (2006)** qui déclare que cette molécule est considérée comme mutagène catégorie 3 et rapporte des valeurs de CL50 allant de 1 mg/l pour la truite arc-en-ciel (*oncorhynchus mykiss*) et 0.21 mg/l pour *Daphnia magna*.

Le Tebuconazole, quant à lui, est classé comme modérément toxique pour les organismes aquatiques mais il peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique (**Bayer CropScience, 2005**). Les données fournies, quant aux CL50 sont 3.8 mg/l chez la microalgue *Pseudokirchneriella subcapitata*, 2,79 mg/l pour *Daphnia magna* et enfin une CL50 de 141 mg/l pour *oncorhynchus mykiss* après une durée d'exposition de 96h.

La combinaison des 2 matières actives Fludioxonil – Difenconazole étant nouvellement commercialisée au niveau européen et en Algérie, on ne dispose donc que de peu d'informations. Néanmoins, **l'ANSES (2011)** classe ces deux substances actives comme très toxiques pour les organismes aquatiques. La concentration létale concernant les invertébrés aquatiques tels que *Daphnia magna* après 48h d'exposition est de l'ordre de 11 mg/l. Concernant les algues vertes *Pseudokirchneriella subcapitata*, la CE50r (Median Effective Concentration on growth rate) est de l'ordre de 15 mg/l, elle est de 6.9 mg/l. Pour la truite arc-en-ciel (**Syngenta, 2013**).

Nos résultats concernant les CE50 obtenues pour les trois fongicides, sont tous compris dans la très large gamme obtenue par **Ma et al. (2002)** dans son étude portant sur l'action de 11 fongicides de différentes classes chimiques, y compris les Triazoles et les Carbamates, sur deux algues d'eau douce *Chlorella pyrenoidosa* et *Scenedesmus obliquus*. Ces auteurs rapportent des CE50 (96 h) variant dans de grandes proportions puisqu'elles sont comprises entre 0.0525 et 137.8 mg/l.

Quels sont les effets des trois fongicides sur la morphologie de *Paramecium sp.* ?

Chez la plupart des protozoaires ciliés, la membrane plasmique est sous-tendue par un cortex protéique plurilaminaire compartimenté en unités organisées autour des cils. Chaque unité corticale comprend une alvéole constituée de deux membranes ; une externe sous la membrane plasmique et une interne en contact direct avec le squelette sous-membranaire, dont le principal élément est l'épiplasme, qui est composé d'une famille multigénique de protéines appelées épiplasmines (**Soulas, 2011**).

Un des plus importants rôles du cytosquelette est d'apporter un soutien mécanique et une certaine rigidité à la cellule (**Damaj, 2008**). Il est aussi responsable du courant cytoplasmique qui gouverne les mouvements internes dans la cellule tels que le déplacement des chromosomes et des organites cellulaires comme les mitochondries ou le noyau.

L'interaction cytosquelette-membrane contribue à la stabilisation de la morphologie cellulaire comme il permet à la cellule de changer de forme (**Soulas, 2011**). Cette interaction peut être altérée sous l'effet de certains agents physiques ou chimiques, générant des dommages structuraux au niveau de la membrane et le cytosquelette (**Stevens et Lowe, 1997**). Ces effets se traduisent par la survenue de malformations laissant apparaître des vésicules ou bourgeonnements au niveau de la membrane plasmique conduisant à la mort cellulaire (**Friedl et wolf, 2003**). Ainsi **Venkateswara Rao et al., (2006, 2007)** ont mis en évidence une corrélation entre les déformations structurales et la toxicité des pesticides pouvant être considérées, à juste titre, comme un début d'alerte d'une cytotoxicité et refléter l'état de stress de l'organisme.

Amanchi (2010) a démontré qu'un traitement à l'Azadirachtine, un métabolite secondaire à propriétés insecticides présent dans l'huile extraite des graines de neem, induit une série de malformations morphologiques chez *Paramecium caudatum*. Ces atteintes se manifestent par un gonflement, un raccourcissement longitudinal de l'axe, un noircissement du cytoplasme, un rétrécissement antérieure ou encore une vacuolisation cytoplasmique. D'autres déformations ont été enregistrées, telles que l'apparition de cellules ovales ou en forme de broche et des cellules présentant des bourgeonnements qui seront suivis par une rupture de la membrane cellulaire. Des déformations similaires ont

été observées chez la même espèce exposée à l'insecticide biologique Delfin (*Bacillus thuringiensis*) où les cellules affectées présentaient également un élargissement des vacuoles contractiles (**Amanchi et Hussain, 2008**).

Venkateswara Rao et al. (2006) rapporte que les paramécies sont significativement affectées lors d'un traitement à l'Acephate. Ce dernier est à l'origine de la rupture des membranes entourant les vacuoles alimentaires et contractiles entraînant le mélange de leurs contenus avec le protoplasme. Par la suite, le volume cellulaire augmente, pour aboutir à une désintégration du protoplasme et enfin la lyse des cellules. D'autre part, ces mêmes auteurs ont également mis en évidence des bourgeonnements au niveau de la membrane plasmique de *Paramecium caudatum* suite à une exposition au Monocrotophos et au Fenthion, conduisant à une lyse cellulaire (**Venkateswara Rao et al. 2007 ; 2008**).

La formation de bourgeonnements est un phénomène irréversible et semble être un phénomène communs chez les paramécies exposées aux xénobiotique (**Friedl et Wolf, 2003 ; Shalom et Bergmann, 2004**).

Nos résultats sont en parfait accord avec ceux cités ci-dessus, puisque nous avons mis en évidence une irrégularité du pourtour cellulaire (Bourgeonnements) ainsi que des modifications structurales (Gonflement, asymétrie, cellules en forme de crochet), ayant pour conséquence la lyse cellulaire, ce qui explique le taux de mortalité cité auparavant.

Quant aux les dommages intracellulaires, comme la formation des vésicules, certains auteurs soutiennent que leur apparition est liée à une rupture de la membrane plasmique au niveau du cytosquelette (**Fishkind et al., 1991 ; Burton et Taylor, 1997 ; Mills et al., 1998 ; Friedl, et Wolf, 2003**) et que l'augmentation de leurs volumes est due à l'écoulement du fluide intracellulaire à l'intérieur (**Cunningham, 1995**). **Harris (1990)** explique la formation de vésicules par le détachement de la membrane plasmique de la couche d'actine corticale, susceptible d'entraîner la désintégration de la membrane cellulaire. La lyse des cellules qui s'en suit est due à la dégradation des organites cellulaires et à la rupture de la membrane externe (**Venkateswara Rao et al., 2006**).

Quels sont les effets des trois fongicides sur le métabolisme respiratoire de *Paramecium sp.* ?

Dans notre travail, nous avons montré que l'action des trois fongicides sur la division cellulaire de *Paramecium sp.* s'accompagne d'une perturbation du métabolisme et plus précisément des échanges gazeux. En effet, nous avons constaté une inhibition du métabolisme respiratoire chez les cultures exposées au Thirame et à la plus forte concentration de la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole (Le Tebuconazole affectant moins la respiration cellulaire).

Des observations similaires ont été rapportées par **Amara (2012)** dans son étude sur la *Chlorella calcitrans*, cultivée en présence d'un fongicide Triazole (Epoconazole). Cette microalgue a montré une stimulation significative des échanges gazeux. Cependant, l'activité respiratoire est inhibée dès que la concentration en Epoconazole est augmentée dans le milieu de culture. L'auteur avance l'hypothèse qu'une modification de la composition en lipides membranaires survenue lors de la croissance des espèces algales entraîne une variation de l'absorption des fongicides lipophiles, tels que les Triazoles, ce qui explique les variations des échanges gazeux observées. D'autant que **Romani et Beffagna (1991) et Colombo et al. (1991)** ont démontré que les fongicides Triazoles sont capables d'altérer la perméabilité des membranes.

Nos résultats concordent aussi avec ceux d'Amara (2015) qui rapporte que sous l'effet des fortes concentrations de Cyperméthrine (un insecticide Pyréthroïde), le taux d'oxygène consommé augmente de manière significative chez les paramécies. Il semble alors plus vraisemblable que l'augmentation de la respiration puisse constituer une réponse au stress imposé par le pesticide (**Levitt, 1980**).

A travers la comparaison de nos données avec ceux précédemment cités, on peut émettre l'hypothèse qu'une fois le fongicide à l'intérieur de la cellule, le système de défense cellulaire est déclenché à travers l'induction des enzymes de détoxification, en particulier les monooxygénases à cytochrome P450 qui interviennent durant la phase I de la métabolisation des xénobiotiques par l'introduction d'un atome d'oxygène au niveau du xénobiotique pour le rendre polaire et donc faciliter son élimination. Toutefois, la contribution de cette

monooxygénase pourrait conduire à la production d'espèces intermédiaires de l'oxygène connues comme étant l'origine du stress oxydatif.

Quels sont les effets des trois fongicides sur les biomarqueurs de toxicité de *Paramecium sp.* ?

La mortalité n'est évidemment pas le seul critère à considérer. Il y a un intérêt croissant dans le développement des biomarqueurs. En effet, un biomarqueur est défini comme étant un « *changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* » (**Lagadic et al., 1997**). L'étendue des biomarqueurs est extrêmement vaste et concerne des mesures de réponses immunologiques, d'effets histopathologiques, de réserves énergétiques, ...etc (**Huggett et al., 1992**). Les marqueurs biochimiques sont utilisés pour détecter l'exposition à des contaminants aussi divers que les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs), les PolyChloroBiphényles (PCBs), les métaux ou les pesticides, à travers le suivi de certaines activités enzymatiques.

La quantification des protéines totales permet de mettre en évidence une éventuelle perturbation du métabolisme cellulaire. Ce paramètre est utilisé comme biomarqueur en amont. En effet, lorsque les contraintes environnementales sont fortes (Stress hydrique, thermique, oxydant, exposition à une pollution...), la plupart des protéines subissent une dénaturation (**Mohammadkhani et Heidari, 2008 ; John et al., 2009**).

- **Action des trois fongicides sur le taux des protéines totales**

Nos résultats montrent une diminution dose-dépendante du taux des protéines totales chez les cellules exposées aux concentrations sublétales des trois xénobiotiques. Ce résultat a été rapporté dans l'étude menée par **Sancho et al. (2009)** où il a été noté une diminution significative du taux des protéines totales chez les daphnies (*Daphnia magna*) cultivées en présence du fongicide Tebuconazole. Ces auteurs suggèrent que cette diminution est une réaction de défense précoce de l'exposition au fongicide. Pour surmonter cette situation de stress, les organismes vivants requièrent un taux d'énergie élevé qui pourrait conduire au catabolisme des protéines. D'autres auteurs rapportent qu'une déplétion du taux des

protéines totales pourrait être due à une formation de lipoprotéines qui seront utilisés pour réparer les cellules, les tissus et les organes endommagés (**Bhavan et Geraldine, 2001 ; Ribeiro et al., 2001**).

Les travaux de **Begum (2004)** montrent que lorsque le poisson d'eau douce *Clarias batrachus* est traité par le Carbofuran (insecticide) durant une période de 6 jours, le taux des protéines totales diminue de manière significative dans le tissu musculaire et le foie, suggérant une forme d'adaptation physiologique (**Vega et al., 2002**).

Si les protéines totales sont d'excellents indicateurs d'une éventuelle perturbation de l'organisme, elles ne sont pas assez spécifiques et ne peuvent à elles seules expliquer une toxicité. Aussi, est-il nécessaire de nous pencher sur certains biomarqueurs ayant un lien direct avec le métabolisme des xénobiotiques et les mécanismes de détoxification.

Quels sont les effets des trois fongicides sur le système de détoxification cellulaire de *Paramecium sp.* ?

Pour palier aux changements engendrés par la présence d'un xénobiotique, les organismes vivants déclenchent un système de défense (détoxification) qui met en jeu une batterie d'enzymes telles que les Superoxydes Dismutases (SOD), la Catalase (CAT), les Peroxydases séléno-sépendantes (GPx) et des composés non enzymatiques tels que le Glutathion (GSH), les métallothionéines (MTs).

Dans notre travail nous avons mis en évidence une forte activité enzymatique antioxydante se traduisant par une augmentation des activités CAT, GST, GPx, parallèlement à la diminution du taux de GSH. Ces réactions antioxydantes, enzymatiques et non enzymatiques, fournissent à la cellule un état d'équilibre et une protection contre les espèces réactives oxydées.

- **Action des trois fongicides sur l'activité Catalase (CAT)**

La Catalase constitue, la première ligne de défense contre le stress oxydant (**McCord et Fridovich, 1969**) son activité repose sur la transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire (O_2). Très sensible au stress oxydatif, particulièrement vis-à-vis des polluants chimiques (**Regoli et Principato, 1995 ;**

Livingstone, 2001 ; Regoli et al., 2003 ; Vlahogianni et al., 2007) elle est considérée comme un des meilleurs biomarqueurs révélant le statut redox des organismes marins (**Regoli et al., 2002 a, b**). L'importance biologique de la CAT réside dans le fait que le H_2O_2 est le principal précurseur cellulaire du radical hydroxyle ($^{\circ}OH$) qui est une forme très réactive et toxique des ERO. La suppression de H_2O_2 est une stratégie importante des organismes aquatiques adoptée lors d'un stress oxydatif (**Regoli et al., 2002 a, b**). La pollution chimique augmente fortement les activités enzymatiques antioxydantes (**Livingstone et al., 1990**) et l'induction de l'activité CAT a été signalée chez plusieurs espèces aquatiques (**Di Giulio et al., 1993 ; Stephenson et al., 2000 ; Sbartai et al., 2009 ; Benosamane, 2015**). **Dellali et al. (2001)** quant à eux parlent de fluctuations plus ou moins importantes de l'activité Catalase dépendantes de facteurs abiotiques (Température, pH, O_2 ...etc) chez des moules (*Mytilus galloprovincialis*) et des palourdes (*Ruditapes decussatus*) prélevées dans une lagune.

Dans notre travail, nous avons également mis en évidence une induction dose-dépendante de l'activité CAT chez les paramécies traitées par les trois xénobiotiques. L'induction de l'activité Catalase chez les traités par le Thirame et la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole semble être plus importante. Ce résultat est confirmé par **Azzouz (2012)** qui a mis en évidence une forte induction de l'activité CAT chez *Paramecium tetraurelia*, traitées avec deux pesticides : Amistar Xtra et le Glyphosate ; il en est de même pour les travaux de **Benbouzid (2012)** qui a aussi démontré une induction de l'activité Catalase chez ce même modèle biologique suite à un traitement avec des Phénylphosphoramidates.

Toutefois, nos résultats montrent que pour des concentrations élevées de Thirame et la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole, l'activité Catalase est inhibée. **Berova et al. (2002)** expliquent cela par une atteinte métabolique et génique de la cellule la rendant incapable de synthétiser certaines enzymes. D'autres auteurs attribuent cela au niveau accru des ERO chez les paramécies exposées à des concentrations très élevées de xénobiotiques (**Sbartai, 2011**). Dans leurs études sur les effets subchroniques suite à l'exposition de la carpe commune *Cyprinus carpio* L. à un Carbamate (Carbofuran), **Ensibi et al., (2012)** et **Clasen et al. (2014)** expliquent l'inhibition de l'activité CAT par l'accumulation des radicaux libres qui affectent considérablement l'activité enzymatique.

- **Action des trois fongicides sur la teneur du Glutathion (GSH)**

Le Glutathion est responsable du maintien du potentiel redox cellulaire ainsi que de l'intégrité fonctionnelle de la grande majorité des enzymes, il agit comme un tampon antioxydant régissant l'homéostasie intracellulaire. Dans notre travail, nous avons mis en évidence une diminution significative du taux de GSH en réponse aux traitements par les plus fortes concentrations des xénobiotiques testés. Le même constat a été fait par **Cereser et al. (2001)** dans leur étude menée sur une lignée cellulaire de fibroblastes cutanés, traités par le Thirame. Nos résultats concordent également avec ceux de **Moumeni et al. (2016)** qui rapportent une diminution significative et dose-dépendante du taux de GSH chez des cultures de *Paramecium tetraurelia* exposées à un herbicide, le Cycloxydime.

La diminution du taux de GSH est due à son utilisation directe comme antioxydant dans les réactions radicalaires initiées par les fongicides. La baisse du taux de GSH noté peut être attribuée également, à la fois, à une augmentation de l'activité de la Glutathion Peroxydase (GPx), qui consomme de grandes quantités de Glutathion, et de sa conjugaison avec les xénobiotiques catalysée par la Glutathion S-Transferase (GST). Cependant, il a été démontré que certains pesticides, notamment les Carbamates utilisent le GSH, en réaction de conjugaison, en quantité mineure par rapport aux autres pesticides tels que les Organophosphorés ou les Organochlorés (**Banerjee et al., 1999**).

- **Action des trois fongicides sur l'activité Glutathion S-transferase (GST)**

Les Glutathion S-transferase comptent parmi les enzymes les plus importantes de la phase II et sont impliquées dans les mécanismes de détoxification. Le rôle central de la GST réside dans les réactions de conjugaison du Glutathion aux xénobiotiques afin de les rendre plus hydrosolubles et faciliter ainsi leur élimination. Elle agit spécifiquement sur de nombreux substrats en offrant aux cellules, outre une fonction essentielle dans le transport intracellulaire, une protection contre les effets nocifs de nombreuses substances (**Hayes et al., 1995**) : Cette enzyme peut efficacement réduire les peroxydes exogènes ou éliminer les peroxydes d'acides gras (**Awasthi et al., 2006 ; Garcerá et al., 2006**).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une nette augmentation de l'activité Glutathion S-transferase chez les paramécies traitées par les fongicides testés. Cette

induction a également été signalée chez de nombreuses espèces aquatiques telles que les bivalves *Crassostrea gigas* et *Elliptio complanata* exposés respectivement au Carbofuran et aux effluents d'eaux usées municipales, ou encore les mollusques d'eau douce *Limnoperna fortunei* traitées au Glyphosate (**Damiens et al., 2004 ; Farcy et al., 2011 ; Iummato et al., 2013**).

- **Action des trois fongicides sur l'activité de la Glutathion Peroxydase (GPx)**

Cette enzyme est substrat-dépendante et travaille de concert avec les enzymes de la première ligne de défense. Son principal rôle est la conversion du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hydroperoxydes organiques en eau et alcool en se servant du GSH comme co-facteur.

Nos résultats montrent une forte induction de l'activité GPx chez les cellules traitées par les fongicides testés. Le degré d'activation de la GPx atteint des niveaux 20 fois supérieurs à celui des cellules témoins, particulièrement après traitement par le Tebuconazole et ce dès la plus faible concentration. Ce résultat est en accord avec celui de **Maran et al. (2009)** qui a étudié les effets de 4 Carbamates : l'Aldicarbe, l'Aldicarbe Sulfone, le Sulfoxyde d'Aldicarbe et le Propoxur, sur le système de détoxification chez la lignée CHO-K1 dérivée de cellules ovariennes de hamsters chinois. Ces auteurs ont noté une induction spectaculaire de la GPx allant de 198% pour l'Aldicarbe et 228% pour le Sulfone et le Propoxur.

Cependant dans notre travail, l'activité de cette enzyme tend à diminuer de manière significative pour les traitées par les plus fortes concentrations de Tebuconazole ainsi que chez les cellules exposées à la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole. **Blahová et al. (2013)** expliquent cela par une baisse de régulation du système de détoxification due aux fortes concentrations des pesticides. D'autres attribuent la diminution de l'activité GPx, à une surproduction des ERO par les pesticides et l'épuisement du niveau de son substrat (GSH) (**El-Gendy et al., 2009**). D'autres, affirment que la CAT et la GPx catalysent la transformation de l'hydroperoxyde (H_2O_2), elles agissent donc sur le même substrat. Ainsi, il en résulte une compétition entre les deux enzymes (**Kappus, 1985**) ce qui explique la faible activité de la GPx observée dans cette étude

Quels sont les effets des trois fongicides sur le taux des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) chez *Paramecium sp.* ?

L'oxydation des lipides est l'approche analytique la plus couramment utilisée dans le domaine des radicaux libres. En effet, de nombreux organismes, en particulier les organismes aquatiques, contiennent des quantités élevées de lipides avec des résidus d'acides gras polyinsaturés, sujets à l'oxydation (**Lushchak, 2011**). L'accumulation des produits de la peroxydation lipidique est considérée donc comme un marqueur biochimique de choix du stress oxydatif (**Chen et al., 2005**). L'évaluation du taux de malondialdéhyde (MDA) est une méthode non spécifique, du fait que l'acide thiobarbiturique est capable de réagir avec de nombreux composés, tels que les aldéhydes, les acides aminés et les glucides. Cependant, cette méthode est la plus commune pour l'évaluation de la peroxydation lipidique dans divers organismes (**Lushchak, 2011**) et fournit des résultats globaux sur la lipoperoxydation (**Lushchak et Semchyshyn, 2012**).

Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence une augmentation du taux des TBARS en réponse aux traitements par les trois fongicides. Les cellules exposées aux plus fortes concentrations de Tebuconazole et la combinaison Fludioxonil – Difenconazole affichent des teneurs 2 à 3 fois plus importantes que celles des cellules témoins.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Blahova et al. (2013)** qui ont évalué la réponse du système antioxydant chez des juvéniles de poissons zèbres *Danio rerio* exposés à des concentrations sublétales d'un herbicide systémique inhibiteur de la photosynthèse : l'Atrazine. Après 28 jours de traitement, le lot de poissons exposé à la concentration 90 µg/l, affichait un niveau de TBARS 3 fois plus élevé au lot témoin. Ces auteurs attribuent cela à la production des ERO, conduisant à une oxydation des acides gras polyinsaturés. Dans le même ordre d'idées, **Bacchetta et al. (2013)** ont testé les effets combinés de deux insecticides de synthèse : un Organochloré (Endosulfan) et un Pyréthroïde lambda-Cyhalothrine, chez le poisson d'eau douce *Piaractus mesopotamicus*. Ces auteurs ont mis en évidence une augmentation spectaculaire des TBARS au niveau des cellules hépatiques, des reins et du cerveau comparés aux branchies et aux muscles. Ainsi il semblerait que les deux insecticides affectent de manière sélective les lipides

membranaires. De plus, l'augmentation du taux des TBARS témoigne de l'installation d'un stress oxydatif au niveau de ces organes.

Cherai (2015) et **Djekoun (2012)** ont testé respectivement deux xénobiotiques, à savoir la Nifedipine et le Cadmium, sur *Saccaromyces cerevisiae*, et ont mis en évidence une augmentation des TBARS, il en est de même concernant les travaux de **Ojha et al. (2010)** qui ont testé 3 insecticides Organophosphorés (Chlorpyrifos, Méthyle Parathion et le Malathion) sur des rats Wistar.

Quels sont les effets des trois fongicides sur le taux des métabolites réactifs de l'oxygène (ROMs) et le potentiel biologique antioxydant (BAPs)?

Les données relatives au niveau du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) enregistrés chez les paramécies exposées aux trois fongicides révèlent une augmentation significative et dose-dépendante, confirmant l'installation d'un stress oxydatif ainsi que les troubles physiologiques et biochimiques précédemment observées. Beaucoup de travaux ont souligné la hausse des niveaux des ROMs suite à une exposition à divers contaminants chimiques (**Vijayavel et al., 2004 ; Valavanidis et al., 2006 ; Benosmane et al., 2015 ; Fu et al., 2015**).

Pour faire face au stress généré par les fongicides, les paramécies vont mobiliser des systèmes antioxydants qui auront pour tâche le piégeage et/ou l'élimination des métabolites toxiques. La production des ERO dans l'organisme est généralement un produit secondaire ou intermédiaire de l'activité de certaines enzymes, ainsi selon **Caro et Cederbaum (2004)** et **Zangar et al. (2004)**, l'induction de l'activité des monoxygénases à Cytochrome P450 pourrait être à l'origine de l'augmentation du taux des métabolites réactifs de l'oxygène (ROMs). Cette augmentation s'expliquerait aussi par l'induction de l'activité des peroxydases substrat-dépendantes (**Franck et al., 2009**) ou encore par le Glutathion qui génère un radical superoxyde en interceptant un radical hydroxyle (**Barillet, 2007**).

D'un autre côté, les défenses antioxydantes peuvent être réprimées en présence de fortes concentrations de xénobiotiques. Ainsi, les travaux de **Ojha et Srivastava (2014)** ont mis en évidence une augmentation très importante de la production de H_2O_2 après 4 heures de

traitement de lymphocytes de rats par le Chlorpyrifos, le Méthyle Parathion (MPT) et le Malathion (MLT) ainsi que leur mixture. Ces auteurs expliquent cela par une atteinte du système antioxydant et par conséquent une perturbation de l'équilibre redox ; d'où la forte accumulation de l'hydroperoxyde. Il en est de même pour les travaux de **Patetsini et al. (2013)** qui se sont intéressés aux capacités antioxydantes de *Mytilus galloprovincialis* face au stress généré par le Chlorpyrifos et le Penoxsulam, et qui ont mis en évidence une augmentation des taux intracellulaires d'hydroperoxyde (H_2O_2) et de l'anion superoxyde ($\bullet O_2^-$). Ces auteurs attribuent l'accumulation des 2 métabolites oxygénés par l'inhibition des enzymes antioxydantes, comme cela a été précédemment suggéré par **Ochi et al. (1987)**, **Geret et al. (2002)** et **Wang et al. (2004)**, ou par la réduction des niveaux cellulaires du Glutathion (**Waisberg et al., 2003**).

Quant aux résultats obtenus concernant la capacité antioxydante, nous avons démontré que le stress occasionné par les 3 fongicides chez *Paramecium sp.* est mieux géré dans le cas de Tebuconazole et la combinaison de Fludioxonil – Difenoconazole, où une augmentation de la capacité antioxydante a été observée comparée à celle du témoin.

Ainsi, il semblerait que les cellules exposées au Tebuconazole et à la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole, sont capables de déployer leur système de défense anti-radicalaire à travers l'augmentation des éléments antioxydants, enzymatiques et non enzymatiques, sollicités pour neutraliser les espèces radicalaires produites de manière accrue afin de rétablir le statut redox cellulaire. L'augmentation du taux de BAPs rend compte de la gestion du stress et la restauration de la balance redox (**Amamra, 2015**).

Conclusion générale

Notre travail s'est fixé pour objectif l'évaluation de la toxicité potentielle de trois fongicides largement utilisés en pratiques agricoles, le premier est un fongicide de la famille des Dithiocarbamates (Thirame) le second appartient à la classe des Triazoles (Tebuconazole) et enfin le dernier est composé de deux matières actives : Fludioxonil et Difenoconazole, dont les familles respectives sont les Phénylpyrroles et les Triazoles. Ces trois xénobiotiques sont testés sur un modèle biologique alternatif : *Paramecium sp.*

Dans la première partie nous avons mis en évidence un effet toxique des xénobiotiques à l'échelle cellulaire, à travers l'inhibition de la croissance des paramécies. L'impact des trois fongicides sur la croissance est significatif aux concentrations les plus élevées. L'exposition des paramécies aux fortes concentrations des molécules testées a eu pour conséquence des atteintes diverses sur la morphologie et la structure des cellules (Formes sphériques, asymétrie et gonflement des cellules), avec pour conséquence directe une désorganisation du contenu cytosolique conduisant, par la suite, à la rupture de la membrane et à la lyse cellulaire particulièrement pour le Tebuconazole et la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole.

La seconde partie de notre travail s'est articulée autour d'une étude polarographique effectuée sur les paramécies en présence des trois xénobiotiques. Il en ressort une forte inhibition de la consommation d'oxygène pour les fortes concentrations de Thirame et une légère stimulation chez les cellules exposées au Tebuconazole et à la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole.

Ces résultats sont complétés par le suivi de l'évolution des biomarqueurs, essentiellement ceux du stress oxydatif et des enzymes intervenant dans le processus de détoxification cellulaire, à l'instar des activités GST, GPx et CAT. Le taux de GSH est également estimé en raison de son rôle prépondérant dans la phase II de la métabolisation mais également comme piègeur de radicaux. Nous nous sommes intéressés, par la suite, aux produits de la peroxydation lipidique via le dosage du taux des TBARS. Nos résultats révèlent une induction de l'activité CAT, GST et GPx, parallèlement à la diminution de la teneur en GSH, confirmant la mise en place du processus de détoxification et leur implication dans la métabolisation des xénobiotiques testées. De plus, nous avons mis en évidence, une peroxydation lipidique suite à une augmentation spectaculaire du taux des TBARS.

Enfin le suivi de l'état redox cellulaire, à travers l'estimation du taux des ROS et des BAPs, montre une forte production des espèces réactives de l'oxygène, confirmant l'état de stress oxydatif occasionné par les 3 fongicides ; bien que le potentiel biologique antioxydant reste positif chez les cellules exposées au Thirame et au Tebuconazole, indiquant un équilibre oxydant/prooxydant. Ce n'est pas le cas pour les paramécies traitées par la combinaison Fludioxonil - Difenoconazole, dont le pouvoir antioxydant est inhibé, à partir d'une concentration de 1 mg/l, traduisant le dépassement des capacités de gestion de stress.

Tous ces résultats plaident donc pour un effet délétère des trois fongicides testés, en l'occurrence, le Thirame, le Tebuconazole ainsi que la combinaison des 2 matières actives Fludioxonil et Difenoconazole, et ce au niveau physiologique et biochimique avec un effet plus prononcé pour le Thirame. Il en ressort aussi, la pertinence du modèle biologique utilisé dans cette étude, qui s'est avéré une alternative attrayante permettant d'élucider les réponses biologiques et de comprendre les mécanismes d'action des xénobiotiques ainsi que l'identification de leurs cibles.

En perspectives :

Ces travaux de thèses ouvrent un large terrain d'investigation pour répondre à d'autres interrogations, encore, non élucidées. Ainsi, il serait judicieux de :

- Tester ces molécules sous leur forme pure.
- Etudier l'effet de la mixture de ces molécules.
- Etendre le champ d'investigation à l'échelle subcellulaire, afin d'analyser l'évolution du métabolisme respiratoire des mitochondries isolées à partir des paramécies.
- Elargir la panoplie des biomarqueurs de stress oxydatif tels que les Cytochromes P450 et la SOD.
- Tester les fongicides sur des lignées cellulaires (humaines ou animales) et étudier leur effet génotoxique.

Références bibliographiques

A

AERMC, 2002. Guide technique N° 7. Pollution toxique et écotoxicologie : notion de base. Lyon : Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse. 84 p.

Akcha F. 2000. Etude de la formation d'adduits et de 8-Oxodguo A l'ADN de moule, *Mytilus sp.*: Perspectives d'utilisation dans le milieu marin en tant que biomarqueurs de génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 1, France.

Alavanja M.C.R., Hoppin J.A. and Kamel F., 2004. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health* 25, 155 - 197.

Alberti A., Bolognini L., Macciantelli D., Caratelli M., 2000. The radical cation of N,N-diethyl-para-phenylendiamine: a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res. Chem. Intermediat.* 26, 253 - 267.

Amamra A. 2015. Etude de la toxicité de composés pyréthrinoides utilisés en Algérie sur un modèle alternatif : *Paramecium tetraurelia*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

Amanchi N.R. 2010. A low cost microbiotest for screening behavioural and ecotoxicological responses of *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax* to azadirachtin. *Adv. Appl. Sci. Res.* 1 (2), 124 - 131.

Amanchi N.R. and Hussain M.M. 2008. Cytotoxic effects of delfin insecticide (*Bacillus thuringiensis*) on cell behaviour, phagocytosis, contractile vacuole activity and macronucleus in a protozoan ciliate *Paramecium caudatum*. *Afr. J. Biotechnol.* 7 (15), 2637 - 2643.

Amanchi N.R. and Hussain M.M. 2010. Cytotoxicity assessment of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. *J. Environ. Biol.* 31(5), 603 - 607.

Amara A. Evaluation de la toxicité de pesticides sur quatre niveaux trophiques marins : microalgues, échinoderme, bivalves et poisson. Thèse de Doctorat Université de Tunisie el Manar et Université de Bretagne Occidentale, France.

Anses. 2011. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché provisoire de la préparation A16283, à base de Sedaxane, Difenoconazole et Fludioxonil, de la société Syngenta Agro SAS.

Arbach, G. 2012. Library Briefing. Pesticide Legislation in the EU. Toward sustainable Use For plant protection products. European Parliament: [http://www.europarl.europa.eu/RegData/bibliotheque/briefing/2012/120291/LDM_BRI\(2012\)120291_REV1_EN.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/bibliotheque/briefing/2012/120291/LDM_BRI(2012)120291_REV1_EN.pdf).

Awasthi Y. C., Yang Y., Tiwari N. K., Patrick B., Sharma A., Li J. and Awasthi S. 2004. Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. *Free Radical. Bio. Med.* 37(5), 607 - 619.

Azzouz Z. 2012. Etude des effets toxiques d'un fongicide (AmistarXtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

Azzouz Z., Berrebbah H., Djebbar M.R. 2011. Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. *African J. Microbiol. Res.* 5(20), 3243 - 3250.

B

Bacchetta C., Rossi A., Ale A., Campana M., Parma M. J. and Cazenave, J. 2014. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecol. Indic.* 36, 532 - 538.

Baldi I., Lebailly P. 2013. Indicateurs d'exposition aux pesticides dans les études épidémiologiques : exemple de l'étude PHYTONER sur les troubles neurocomportementaux. *Innovations Agronomiques* 28, 15 - 23.

Banaru D. et Perez T. 2010. Bioindicateurs-Biomarqueurs, Notes de cours. Université de Marseille, Marseille. France. 15 p.

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

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

Barriuso E., Calvet R., Schiavon M., Soulas G. 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformations et dissipation. *Etud. Gest. Sols* 3/4, 279 - 295 (Numéro spécial).

Bayer CropScience. 2005. Fiche de données de sécurité, Tebuconazole.

- Beal D.L. and Anderson R. V. 1993. Response of zooplankton to rotenone in a small pond. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51 (4), 551 - 556.
- Begum G. 2004. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. *Aquat. Toxicol.* 6, 83 - 92.
- Bell M., Hertz-Piccioto L., Beaumont J.J. 2001. A case control study of pesticides and fetal death due to congenital anomalies. *Epidemiology* 12, 148 - 156.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239 (1), 70 - 76.
- Berny P.J., Buronfosse T., Buronfosse F., Lamarque F., Lorgue G. (1997). Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere* 35, 1817 - 1829.
- Berova M., Zlatev Z. and Stoeva, N. 2002. Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. *Bulg. J. Plant Physiol*, 28 (1-2), 75 - 84.
- Berrebah H. 1990. Etude du contrôle de la mobilité flagellaire et ciliaire par le calcium. Effet du lindane, insecticide organochloré. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VII : 144 p.
- Bhavan P.S., Geraldine P., 2001. Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pest. Biochem. Physiol.* 70, 27 - 41.
- Blahová, J., Plhalová, L., Hostovský, M., Divišová, L., Dobšíková, R., Mikulíková, I., ... and Svobodová, Z. 2013. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Food Chem. Toxicol.* 61, 82 - 85.
- Blanc-Lapierre A., Bouvier G., Garrigou A., Canal-Raffin M., Raherison C., Brochard P., Baldi I., 2012. Effets chroniques des pesticides sur le système nerveux central : état des connaissances épidémiologiques. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* 60, 389 - 400.
- Boldt T.S, Jacobsen, C.S. (2006). Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent *Pseudomonas* isolated from an agricultural soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 29 - 35.
- Bonnet J.L., Bonnemoy F., Dusser M. and Bohatier J. 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to non target cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environ. Toxicol.* 22 (1), 78 - 91.

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

Branger A., Richer M.M., Roustel S. 2007. *Microbiochimie et alimentation*. Educagri Editions. 343 p.

Brigelius-Flohé R. 2009. Commentary: oxidative stress reconsidered. *Genes Nutr.* 4, 161 - 163.

Burton K. and Taylor D.L. 1997. Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature* 385, 450 - 454.

C

Caro A.A. and Cederbaum A.I. 2004. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 27 - 42.

Cereser C., Boget S., Parvaz P., Revol A., 2001. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology* 163, 153 - 162.

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

Chen H.J.C., Wu C.F., and Huang J. L. 2005. Measurement of urinary excretion of 5-hydroxymethyluracil in human by GC/NICI/MS: Correlation with cigarette smoking, urinary TBARS and etheno DNA adduct. *Toxicol. Lett.* 155 (3), 403 - 410.

Cheraït A. 2015. Evaluation à l'échelle cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un composé de la famille des dihydropyridines sur un modèle expérimental bioindicateur de stress. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

Clasen B., Leitemperger J., Murussi C., Preto A., Menezes C., Dalabona F., Marchezan E., Adaime M., Zanella R., Loro V., 2014. Carbofuran promotes biochemical changes in carp exposed to rice field and laboratory conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 77 - 82.

Clément B., 2006. Apports des essais en microcosmes aquatiques lenticques de laboratoire à l'évaluation écotoxicologique des polluants. Mémoire d'HDR. Spécialité : Biologie et Biochimie Appliquées Villeurbanne, Lyon, Vaulx-en-Verin : INSA de Lyon et Université Lyon 1, LSE-ENTPE, 277 p.

Colin F., 2000. Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires. Cas du bassin du Sousson (Gers, France) : 152 p.

Colombo R., Cerana R. and Lado P., 1991. Effect of penconazole and flusilasol on the tonoplast of *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Sci.* 76, 167 - 174.

D

Damaj R. 2008. Squelette membranaire chez *Paramecium Tetraurelia* : analyse structurale et fonctionnelle de la famille multigénique des épiplasmines. Thèse de Doctorat de l'université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 204 p.

Damiens G., His E., Gnassia-Barelli M., Quiniou F. and Roméo M. 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicol. Pharmacol.* 138 (2), 121 - 128.

Dewez D. Geoffroy L., Vernet G. Popovic R. 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat. Toxicol.* 74, 150 - 159.

Di Giulio R.T., Habig C., Gallagher E.P., 1993. Effects of black rock harbour sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel fish. *Aquat. Toxicol.* 26, 1 - 22.

Dias N., Mortara R.A. and Lima N.; 1999: Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100. *in vitro* 1 - 9.

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

Djekoun M. 2012. Evaluation e l'effet du stress oxydatif généré par le Cadmium à l'échelle cellulaire : Cas de *Saccaromyces cervisiae*. Thèse de Doctorat, Univesité Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

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

Durand J.R. 1994. Environnement et ressources aquatiques de Côte d'Ivoire: Les milieux lagunaires. Editions de l'ORSTOM, 546 p.

E

Edmiston C. E., Goheen M., Maloney G.W, Mills W.L. 1985. Evaluation of Carbamate Toxicity: Acute Toxicity in a Culture of *Paramecium multimicronucleatum* upon Exposure to Aldicarb, Carbaryl, and Mexacarbate as Measured by Warburg Respirometry and Acute Plate Assay. *Environ. Res.* 36, 338 - 350.

Eisenhauer N. Klier M., Partsch S., Sabais A.C.W, Scherber C. Weisser W.W.S., Cheu S. 2009. Interactive effects of pesticides and plant diversity on soil microbial biomass and respiration. *Appl. Soil Ecol.* 42, 31 - 36.

El-Gendy K. S., Radwan M. A., and Gad A. F. 2009. In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. *Chemosphere* 77 (3), 339 - 344.

Ensibi C., Hernández-Moreno D., Soler Rodríguez F., Daly Yahya M.N., Míguez-Santiyán M.P., Pérez-López M., 2012. Effects of subchronic exposure to carbofuran on antioxidant defence system and malondialdehyde levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxicol. Environ. Chem.* 94, 748 - 759.

Epstein S.S., Burroughs M., Small, M. 1963. The Photodynamic effect of the Carcinogen, 3,4-Benzpyrene, on *Paramecium caudatum*, *Cancer Res.* 23, 35 - 44.

European Food Safety Authority (EFSA) 2008. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Copper (I), copper (II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper sulfate, copper (I) oxide, Bordeaux mixture, In: Summary of the EFSA Scientific Report 187, Parma, Italy.

F

FAO. 2015. Agriculture mondiale: horizon 2015/2030.

Farcy E., Gagné F., Martel L., Fortier M., Trépanier S., Brousseau P. and Fournier M. 2011. Short-term physiological effects of a xenobiotic mixture on the freshwater mussel *Elliptio complanata* exposed to municipal effluents. *Environ. Res.* 111 (8), 1096 - 1106.

Favier A. 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* 108 - 115.

Fishkind D.J., Cao L.G., Wang Y.L. 1991. Microinjection of the catalytic fragment of myosin light chain kinase into dividing cells: effects on mitosis and cytokinesis. *J. Cell. Biol.* 114, 967 - 975.

Flohe L., Gunzler. W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105, 114 - 121.

Fokam Z. 2012. Etude morphologique et phylogénie des ciliés Astomes endocommensaux d'Oligochètes terricoles de la région de Yaoundé et ses environs. Thèse de Doctorat. Université de Yaoundé I, 139 p.

Foyer C.H. and Noctor G. 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell* 17 (7), 1866 - 1875.

Franck T., Kohnen S., de la Rebière G., Deby-Dupont G., Deby C., Niesten A. and Serteyn D. 2009. Activation of equine neutrophils by phorbol myristate acetate or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces a different response in reactive oxygen species production and release of active myeloperoxidase. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130 (3), 243-250.

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

Fu J., Shi Q., Song X., Xia X., Su C., Liu Z. and Song Y. 2015. Tetrachlorobenzoquinone exhibits neurotoxicity by inducing inflammatory responses through ROS-mediated IKK/I κ B/NF- κ B signaling. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 41, 241 - 250.

G

Garcerá A., Barreto L., Piedrafita L., Tamarit J. and Herrero E. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochem. J.* 398, 187 - 196.

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

Glotfelty D.E., Taylor A.W., Turner B.C., Zoller W.H. 1984. Volatilization of surface-applied pesticides from fallow soil. *J. Agric. Food Chem.* 32, 638 - 643.

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

Grandjean D. 2005. Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien. *Le Nouv. Prat. Vét.* 22, 11 - 15.

Greenlee A.R., Arbuckle T.E., Chyou P.H. 2003. Risk Factors for Female Infertility in an Agricultural Region. *Epidemiology.* 14, 429 - 436.

Grote K., Niemann L., Selzsam B., Haider W., Gericke C., Herzler M. and Chahoud I., 2008. Epoxiconazole causes changes in testicular histology and sperm production in the japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2368 - 2374.

Guckert J.B., 1996. Toxicity assessment by community analysis. *J. Microbiol. Meth.* 25, 101 -112.

Gueye P.M. 2007. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge, Thèse de Doctorat de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg I. 252 p.

H

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

Halliwell B. 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 14, 312 - 322.

Harrag A. 2011. Bioindication: Concepts et biosurveillance, Notes de cours. Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. 7p. <http://calameo.com/read/0018058687a447e5d0152> .

Harris A.K. 1990. Protrusive activity of the cell surface and the movements of tissue cells, in: N. Akkas (Ed.), Biomechanics of active movement and division of cells NATO ASI Series. Springer. Berlin, Heidelberg. pp. 249 - 291.

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

Hayes J.D., Pulford D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Biochem. Mol. Biol.* 30, 445 - 600.

Hayo M.G. Van Der Werf. 1997. Evaluer l'impact des pesticides sur l'environnement. Courrier de l'environnement de l'INRA n°31. 22 p.

Heusser, S., and Dupuy, H. G. 2015. Atlas de biologie animale. Dunod, 3^{ème} édition . pp 5-14.

Hill A.V. 1910. The possible effects of aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol. (Lond.)* 40, IV-VII.

Hollandj M., Framptong K., Cilgy T., Wrattens D., 1994. Arable acronyms analysed - a review of integrated arable farming systems research in Western Europe. *Ann. appl. Biol.* 125, 399 - 438.

Holmes B., 2010. Weed resistance could mean herbicide is futile. *New Scientist*, 206: 12.

Hugget, A.S.G. and Nixon, D.A. 1957. Use of glucose oxidase, peroxidase and O-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *The Lancet* 2, 368 - 379.

Huggett R., Kimerle R., Mehrle P., Bergman H. 1992. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, FL. 368 p.

I

IFEN, 2002. Les pesticides dans les eaux : bilan annuel 2002. Etudes et travaux IFEN n° 36, 25 p. (<http://www.ifen.fr/publications/ET/pdf/et36.pdf>).

Iummato M. M., Di Fiori E., Sabatini S. E., Cacciatore L. C., Cochón A. C., de Molina M. D. C.R. and Juárez, Á.B. 2013. Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 123 - 129.

J

Jebali J., Banni M., Guerbej H., Almeida E. A., Bannaoui A., & Boussetta H. 2006. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. *Fish Physiol. Biochem.* 32(1), 93 - 98.

Jensena. A. 1983. Chemical contaminants in human milk. *Res. Rev.* 89, 1 - 128.

John R., Ahmad P., Gadgil K., Sharma S. 2009. Heavy metal toxicity. Effects on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *Int. J. plant. Prod.* 3, 65 - 75.

Jones D. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal* 8, 1865 - 1879.

K

Kaiser J. 2001. Bioindicators and biomarkers of environmental pollutions and risk assessment. Hartford, Science Publishers, 304 p.

Kamel F., Engel L.S., Gladen B.C., Hoppin J.A., Alavanja M.C.R. and Sandler D.P., 2007. Neurologic symptoms in licensed pesticide applicators in the agricultural health study. *Hum. Exp. Toxicol.* 26, 243 - 250.

Kappus H., 1985. In: Sies, H. (Ed.), Oxidative Stress. Academic Press, New York.

Kerckhove O. 2012. Espèces ou association d'espèces de poisons en tant que bio-indicateur de l'état de santé des récifs coralliens. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, 96 p.

Kielak E., Sempruch C., Mioduszevska H., Klocek J. and Leszczyński B., 2011. Phytotoxicity of roundup ultra 360 SL in aquatic ecosystems: biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant. *Pestic. Biochem. Physiol.* 99, 237 - 243.

Knopper L.D. and Lean D.R.S., 2004. Carcinogenic and genotoxic potential of turf pesticides commonly used on golf courses. *J. Toxicol. Environ. Health B.* 7, 267 - 279.

L

Laboratoire National de Métrologie et d'essais (LNE). 2008. Les pesticides, Paris, 1-15.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. Dans Lagadic L., Caquet., Amiard J.C., Ramade F., Biomarqueurs en écotoxicologie – Aspects fondamentaux, Masson, Paris, : 1 - 9

Leblanc G.A., 1995. Are environmental sentinels signalling? *Environ. Health Perspect.* 103, 888 - 890.

Lenzi F. 2011. Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traîneau en course de sprint. Thèse de Doctorat du campus vétérinaire de Lyon, 132 p.

Leonard R.A., 1990. Movement of pesticides into surface waters. In Pesticides in the soil environment. Soil Science Society of America Book Series, n° 2, Madison, WI, USA, 303 - 349.

Levitt J., 1980. Responses of plants to environmental stress. Vol. II, 2nd Ed. Academic Press, New York, NY. 78-85. ISBN 0-12-445502-8.

Lhoste J. and Grison P., 1989. La Phytopharmacie française chronique historique. Paris, INRA.

Lin L.L., Janz D.M. 2006. Effects of binary mixtures of xenoestrogens on gonadal development and reproduction in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 80, 382 - 395.

Livingstone D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656 - 666.

Livingstone D.R., Garcia-Martinez P., Michel X., Narbonne J.F., O'Hara S., Ribera D., Winston W., 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Ecology* 4, 415 - 424.

Lorraine-Colwill D.F., Powles S.B., Hawkes S.B., Hollinshead P.H., Warner S.A.J. and Preston C., 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 74, 62 - 72.

Lushchak V., Semchyshyn H.M., 2012. Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects. In Tech., Rijeka, Croatia.

Lushchak V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13 - 30.

Lynn D.H. and Small E. B. 2002. Phylum Ciliophora, Doflein, 1901. In J. J. Lee, G. F. Leedale, & P. C. Bradbury (Eds.), An illustrated guide to the protozoa (Vol. 1 (2000), pp. 371–656). Kansas, USA: Society of Protozoologists, Lawrence.

Lynn D.H. and Small E.B. 1989. Phylum Ciliophora. In : Margulis L, Corliss J. O., Mekonian M. and Chapman D. J. (eds) Handbook of protozoa, pp. 498-523. Boston: Jones and Bartlett Publishers.

M

Ma J., Zheng R., Xu L. and Wang S. 2002. Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 57 - 61.

Mäder P., Fliebbach A., Dubois D. Gunst L., Fried P., Niggli U. (2002). Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296, 1694 - 1697.

- Madhuny A., Freed V.H., 1990. Impact of pesticides on the environment. In Pesticides in the soil environment. Soil Science Society of America Book Series, no. 2, Madison, WI, USA, 429 - 466.
- Madoni P. 2000. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environ. Poll.* 109, 53 - 59.
- Maksymiec W., 1997. Effect of copper in higher plants. *Photosynthetica* 34, 321 - 342.
- Maran E., Fernández M., Barbieri P., Font G. and Ruiz M.J. 2009. Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (3), 922 - 930.
- Margni M., Rossier D., Crettaz P. and Jolliet O., 2002. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 93, 379 - 392.
- Markert B.A., Breure A.M., and Zechmeister H.G. 2003. Definitions, Strategies, and Principles for Bioindication/Biomonitoring of the Environment. Markert, B.A., Breure, A.M. and Zechmeister, H.G., (eds.) Elsevier, Oxford. pp. 3 - 39.
- McCord J.M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049 - 6055.
- MDDEP, 2011. Rapport annuel de gestion du Ministère du Développement Durable, de l'environnement et des Parcs. Québec, septembre 2011.
- Mishra V.K., Srivastava M.K. and Raizada R.B. 1998. Testicular toxicity in rat to repeated oral administration of tetramethylthiuram disulfide (Thiram) *Indian J. Exp. Biol.* 36, 390 - 394.
- Miyoshi N., Kawano T., Tanaka M., Kadono T., Kosaka T., Kunimoto M., Takahashi T., Hosoya H. 2003. Use of paramecium species in bioassays for environmental risk management: determination of IC50 values for water pollutants, *J. Health Sci.* 49, 429 - 435.
- Mohammadkhani N. et Heidari R. 2008. Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turk. J. Biol.* 32, 23 - 30.
- Banque Mondiale. 2008. World Development Report "Agriculture for development". *The International Bank for Reconstruction and Development.*
- Mortuza M.G., Takahashi T., Kosaka T., Hosoya H. 2010. Effect of Industrial Sludge Toxicity on the Cell Growth of Green *Paramecium*, *Paramecium bursaria*. *Glob. J. Environ. Res.* 4 (2), 101 - 105.

Moumeni O., Berrebbah H, Azzouz Z., Amamra R., Otmani H., Alayat A., Benosmane S. and Mohamed Reda Djebbar. 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 (2), 115 - 125.

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

Müller, O. F. 1773. *Vermium terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum et testaceorum non marinorum succincta historia*. Heineck et Faber.

N

Noctor G. 2006. Metabolic signaling in defense and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ.* 29, 409 - 425.

O

Ochi T., Takahashi K., Ohsawa M., 1987. Indirect evidence for the induction of a pro-oxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mutat. Res.* 180, 257 - 266.

OECD 2001. Environmental outlook for the chemicals industry. Environment Directorate, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Ojha A. and Srivastava, N. 2014. In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 761, 10 - 17.

Ojha, A., Yaduvanshi, S. K. and Srivastava, N. 2011. Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. *Pestic. Biochem. Physiol.* 99 (2), 148 - 156.

P

Page D.S., Widdows J., 1991. Temporal and spatial variation in levels of alkyltins in mussel tissues: a toxicological interpretation of field data. *Mar. Environ. Res.* 32, 113 - 129.

Pandey D.K., Tripathi N.N., Tripathi R.D. and Dixit, S.N. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*/Fungitoxische und phytotoxische Eigenschaften des ätherischen Öls von *Hyptis suaveolens*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / J. Plant Dis. Prot.* 89, 344 - 349.

Pastre, J. 2005. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de Doctorat, université Paul Sabatier, Toulouse, 114 p.

Patetsini E., Dimitriadisa V.K., Kaloyianni M. 2013. Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. *Aquat. Toxicol.* 126, 338 - 345.

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

Pesce S. Effets de pesticides sur l'activité et la diversité des communautés microbiennes d'un milieu lotique récepteur. Etudes in situ et expérimentales. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 272 p.

Pimentel D., M. Burgess. 2011. Small amounts of pesticides reaching target insects. *Environ. Dev. Sustainabil.* 14 1 - 2.

Pimentel D., Acquay H., Biltonen M., Rice P., Silva M., Nelson J., Lipner S, Giordan S., Horowitz A., D'amore M., 1993. Assessment of environmental and economic impacts of pesticide use. In: D. Pimentel and Lehman H.: *The pesticide question: environment, economics and ethics*. Routledge, Chapman and Hall, New York, pp. 47 - 84.

Pinel-Alloul B. 2005. Toxicologie de l'environnement, Notions de bioindicateurs et biomarqueurs en écotoxicologie. Université de Montréal.

Pourrut B. 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*, Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, 297 p.

Powers S. and Jackson M. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88, 1243 - 1276.

Prescott D. 1994. The DNA of ciliated Protozoa. *Microbiol. Rev.* 58, 1333 - 1367.

Purves W.K., Orians G.H., Heller H.G. et Sadava D. 2000. Le monde du vivant, Flammarion 2^{ème} édition, pp : 552 - 577.

R

Rachel C. 1962. Printemps silencieux (Boston : Houghton Mifflin), Paris: Plon.

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

Regoli F., Pellegrini D., Winston G.W., Gorbi S., Giuliani, S., Virno-Lamberti C., Bompadre S., 2002a. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediter-ranean: the relationship between antioxidant responses and suscepti-bility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar. Pollut. Bull.* 44, 912 - 922.

Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W., 2002b. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.* 54, 419 - 423.

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

Reinecke A.J., Albertus R.M.C., Reinecke S.A., Larink O. (2008). The effects of organic and conventional management practices on feeding activity of soil organisms in vineyards. *Afr. Zool.* 43, 66 - 74.

Ribeiro S., Sousa J.P., Nogueira A.J.A., Soares M.V.M., 2001. Effects of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxol. Environ. Safe.* 49, 131 - 138.

Romani G. and Beffagna N., 1991. Effect of some triazole fungicides on intracellular pH and on cell membrane permeability in leaves of *Elodea densa* (Planch.) *Casp. New Phytologist.* 117, 431-437.

S

Saib A., Berrebbah H., Berredjem M., Djebar M. R. 2014. Cytotoxic study of three derivatives amidophosphonates on alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia*. *Toxicol. Res.* 3, 395 - 399.

Sako F., Taniguchi N., Kobayashi N., Takakuwa E. 1977. Effects of food dyes on *Paramecium caudatum*: toxicity and inhibitory effects on leucine aminopeptidase and acid phosphatase activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39, 11 - 17.

Sancho E., Villarroel M.J., Andreu E., Ferrando M.D. 2009. Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. *Chemosphere* 74, 1171 - 1178.

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

Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi H., Sbartai H., Guy S. and Djebar M.R. 2009. Behavior of *Paramecium sp.*, Treated with Bifenazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *Am-Euras. J. Toxicol. Sci.* 1 (1), 13 - 18.

Sbartai I. 2012. Toxicité d'un Hydrazine carboxylate (Bifenazate) et d'un Oxadiazine (Indoxacarbe) observée chez un modèle cellulaire d'eau douce: *Paramecium sp.*

Schiavon M., Perrin-Ganier C., Portal J.M. 1995. La pollution de l'eau par les produits phytosanitaires : état et origine. *Agronomie* 15, 157 - 170.

Shalom A.L., Bergmann F. 2004. Properties and biological activity of a new peptide antibiotic (Colisan). *Biotechnol. Bioeng.* 10, 429 - 444.

Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82 (2), 291 - 295.

Sipcam Inagra. 2006. Fiche signalétique de Thiramchim.

Soso A.B., Barcellos L.J.G., Ranzani-Paiva M.J., Kreutz L.C., Quevedo M.R., Anziliero D., Limna M., Bolognesi da Silva L., Ritter F., Bedin A.C. and Finco J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 308 - 313.

Soulas J. 2011. Nombre d'Or. Bases structurelles de l'univers et de la vie. Editions Publibook. p. 254.

Sparling D.W., Fellers G. M. and McConnell L.L. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (7), 1591 - 1595.

Stefanidou M., Maravelias C. and Spiliopoulou C., 2009. Human exposure to endocrine disruptors and breast milk. *Endocrine, metabolic & immune disorders. Drug targets* 9, 269 -276.

Stegeman, J.J., Brouwer M., Di Giulio R.T., Förlin, L. Fowler B.A., Sanders B.M., Van Veld P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. in "Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress". R. Huggett, R.K., P. Mehrle and H. Bergman (Eds.). Boca Raton, FL, Lewis: 235 - 335.

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

Stevens A. et Lowe J. 1997. Anatomie pathologique générale et spéciale. De Boeck Supérieur. P 552.

Stoker T. E., Goldman J. M., and Cooper R. L. 1993. The dithiocarbamate fungicide thiram disrupts the hormonal control of ovulation in the female rat. *Reprod. Toxicol.* 7, 211 - 218.

Stoker T. E., Jeffay S. C., Zucker R. M., Cooper R.L. and Perreault S. D. 2003. Abnormal fertilization is responsible for reduced fecundity following thiram-induced ovulatory delay in the rat. *Biol. Reprod.* 68, 2142 - 2149.

Sunil S., Rashi G., Shilpi S. 2015. Effects of chemical and biological pesticides on plant growth parameters and rhizospheric bacterial community structure in *Vigna radiate*. *J. Hazard. Mater.* 291, 102 - 110.

Sutter G., Ed., 1993. Ecological Risk Assessment. Boca Raton, Lewis Pubs. 538 pp.

Syngenta. 2013. Fiche de données de sécurité, Celest Extra.

T

Takahashi T., Yoshii M., Kawano T., Kosaka T., Hosoya H. 2005. A new approach for the assessment of acrylamide toxicity using a green paramecium, *Toxicol. In Vitro* 19, 99 - 105.

Taub F.B., 1989. Standardized Aquatic Microcosm. Development and Testing. In: Boudou A., Rybeyre F., Aquatic Ecotoxicology: Fundamentals, Concepts and Methodologies. Boca Raton, Florida: CRC Press, Vol. 2. pp. 47 - 91.

Tessier, F. et Marconnet P. 1995. Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Sci Sports* 10, 1 - 13.

Tinoco-Ojanguren, R. and Halperin, D. C. 1998. Poverty, production, and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico. *Arch. Environ. Health* 53(1), 29 - 35.

Triffault-Bouchet G., 2004, Effets sur les écosystèmes aquatiques lenticques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation/élimination de déchets - Application à des mâchefers d'UIOM et à des boues de dragage de canaux. Thèse. Spécialité : Biologie et Biochimie Appliquées. Chambéry, Vaux en Velin: Université de Savoie et LSE de l'ENTPE, 309 p.

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

V

Valavanidis A., Vlahogianni T.h., Dassenakis M., Scoullou M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64 (2), 178 - 189.

Van Leeuwen C.J., Helder T. and Seinen W. 1986. Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. IV. Teratogenicity and histopathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquat. Toxicol.* 9, 147 - 159.

Vega F.C., Sancho E., Ferrando M.D., Andreu E., 2002. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. *Pest. Biochem. Physiol.* 72, 55 - 63.

Venkateswara J, Srikanth K, Arepalli S K, Gunda V G. 2006. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behavior and generation time. *Pestic. Biochem. Physiol.* 86, 131 - 137.

Venkateswara J.R., Gunda V.G., Srikanth K., Arepalli S.K. 2007. Acute toxicity bioassay using *Paramecium caudatum*, a key member to study the effects of monocrotophos on swimming behaviour, morphology and reproduction. *Toxicol. Environ. Chem.* 89, 307 - 317.

Venkateswara Rao J., Arepalli S.K., Gunda V.G., Bharat Kumar J. 2008. Assessment of cytoskeletal damage in *Paramecium caudatum*: An early warning system for apoptotic studies. *Pestic. Biochem. Phys.* 91, 75 - 80.

Vijayavel, K., Gomathi, D., Durgabhavani, K., Balasubramanian, M.P., 2004. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 429 - 433.

Vindimian E. Robaut C. and Fillion G. 1983. A method for cooperative and non cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. *J. Appl. Biochem.* 5, 261 - 268.

Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou, M.J. Valavanidis A. 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54: 1361 - 1371.

Volatier L., 2004. Réponse d'une communauté périphytique à un effluent complexe : études en bio-essais et canaux artificiels. Thèse. Spécialité : Sciences et Techniques du Déchet. Villeurbanne et Vaux-en-Velin: INSA de Lyon et LSE-ENTPE, 303p.

W

Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95 - 117.

Walker S., Bell K., Robinson G. and Widderick M., 2011. Flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis*) populations have developed glyphosate resistance in north-east Australian cropping fields. *Crop Prot.* 30, 311 - 317.

Wan M.T., Watts R.G., Moul D.J. 1994. Impact of chemigation on selected non-target aquatic organisms in cranberry bogs of British Columbia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 828 - 835.

Wang Y., Fang J., Leonard S.S., Murali K., Rao K., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Bio. Med.* 36, 1434 - 1443.

Wechbeker G, Cory J.G. 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer lett.* 40, 257 - 264.

WHO-UNEP, 1989. Public health impact of pesticides used in agriculture. World Health Organization-United Nations Environment Programme. Genève, Suisse.

Widdows J., Bakke T., Bayne B.L., Donki P., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., Evans, S.L., Moore, S.L., 1982. Responses of *Mytilus edulis* exposure to the water-accommodated fraction of North Sea oil. *Mar. Biol.* 67, 15 - 31.

Widenfalk A., Bertilsson S., Sundh I., Goedkoop W. 2008. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes – responses at various levels of microbial community organization. *Environ. Pollut.* 152, 576 - 584.

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

Wo K.T., Lam P.K.S., Wu R.S.S., 1999. A comparison of growth biomarkers for assessing sublethal effects of cadmium on a marine gastropod, *Nassarius festivus*. *Mar. Pollut. Bull.* 39, 165 - 173.

Wong C.K., Cheung and Ming-Ho Yo. 1999. Toxicological assesement of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunalliella tertiolecta*. *Environ. Pol.* 105, 175 - 183.

Z

Zangar R.C., Davydov D.R. and Verma S. 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 199 (3), 316 - 331.

Sites Web

<http://tpepesticides.e-monsite.com/pages/pesticides-infos/l-histoire-des-pesticides.html#>

Consulté le 24 janvier 2016.

<http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=61>

Consulté le 24 janvier 2016.

Résumé

Résumé

La lutte chimique expose, inévitablement, les organismes « non cibles ». Des effets secondaires indésirables peuvent se manifester sur des espèces, des communautés voire des écosystèmes entiers.

Le présent travail porte essentiellement sur l'évaluation de la toxicité potentielle de trois fongicides, le Thirame, le Tebuconazole et la combinaison Fludioxonil – Difenoconazole, sur un organisme eucaryote unicellulaire, *Paramecium sp.* Parce que ce modèle d'exposition permet l'étude d'un large panel de paramètres biologiques, des bioessais ont été conduits afin d'évaluer le degré de sensibilité de cet organisme aux trois molécules testées et d'établir une relation entre la dose d'exposition et l'étendue des dommages au niveau cellulaire et subcellulaire.

Les tests de toxicité ont permis de mettre en évidence, l'effet toxique des trois xénobiotiques, à travers l'inhibition de la croissance des paramécies et le taux de mortalité particulièrement élevé pour les fortes concentrations.

L'étude microscopique nous a permis de déceler des atteintes morphologiques et structurales, se présentant sous forme de bourgeonnements au niveau de la membrane, augmentation du volume cellulaire, désorganisation du contenu cytolitique et enfin la lyse des cellules. L'étude polarographique a mis en évidence une perturbation du métabolisme respiratoire chez les paramécies traitées.

Au terme de cette étude, le suivi des biomarqueurs a révélé d'importantes fluctuations doses dépendantes pour les trois fongicides testés. Ainsi, les résultats obtenus, mettent en évidence une induction des enzymes anti-radicalaires : la Catalase (CAT), la Glutathion S-transferase (GST) et la Glutathion peroxydase (GPx), en plus d'une diminution du taux de Glutathion (GSH). La perturbation du taux des protéines totales et l'accumulation des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) soulignent l'installation d'un stress oxydatif chez les paramécies exposées aux xénobiotiques. Cette partie a été complétée par le suivi de l'état Redox cellulaire, où une augmentation du taux des métabolites réactifs de l'oxygène (ROMs) a été enregistrée, accompagnée par des fluctuations observées au niveau du potentiel biologique antioxydant (BAP's).

Mots clés : *Paramecium sp.*, Thirame, Tebuconazole, Fludioxonil, Difenoconazole, Stress oxydatif, Biomarqueurs.

Abstract

Chemical control exposes, inevitably, the "non-target" organisms. Undesirable side effects may occur on species, communities and whole ecosystems.

This work focuses on the evaluation of the potential toxicity of three fungicides, Thiram, Tebuconazole and the combination Fludioxonil - Difenoconazole, on unicellular eukaryotic organism, *Paramecium sp.* Assays were conducted on this exposure model to evaluate the sensitivity of this organism and establish a relationship between dose exposure and the extent of damages at the cellular and subcellular level.

Toxicity tests have highlighted the toxic effect of the xenobiotics, through the inhibition of the growth of *Paramecium sp.* with an important mortality rate for the highest concentrations.

Together, the microscopic study allowed us to identify morphological and structural damages, like the budding of membrane, the increase in volume cell, the disorganization of cytolitic content and finally cell lysis. The polarographic study showed a disturbance of respiratory metabolism in treated paramecium.

The monitoring of biomarkers revealed significant dose-dependent fluctuations for the three fungicides tested. Thus, the results obtained show induction of anti-radical enzymes: Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST) and Glutathione peroxidase (GPx) in addition to a decrease in Glutathione rate (GSH). The disturbance of the total proteins level and accumulation of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) emphasizes the installation of oxidative stress in the paramecia exposed to xenobiotics. This part was completed by monitoring the cellular redox state, where an increase in the rate of Reactive Oxygen Metabolites (ROMs) was recorded accompanied by fluctuations observed in the Biological Antioxidant Potential (BAP's).

Keywords: *Paramecium sp.*, Thiram, Tebuconazole, Fludioxonil, Difenoconazole, Oxidative Stress, Biomarkers.

ملخص

تعرض المكافحة الكيميائية، لا محالة، الكائنات "غير المستهدفة" إلى آثار جانبية غير مرغوب فيها قد تمس الكائنات والمجتمعات والنظم الإيكولوجية بأكملها .

يهدف هذا العمل إلى تقييم سمية ثلاثة مبيدات فطرية، ثيرام (Thirame) ، تيبوكونازول (Tebuconazole) والخليط فلوديوكسونيل - ديفينوكونازول (Difenoconazole - Fludioxonil) ، على كائن أحادي الخلية من المياه العذبة *Paramecium sp.* . هذا النموذج يسمح بدراسة مجموعة واسعة من العوامل البيولوجية، حيث أجريت اختبارات بيولوجية لتقييم حساسية هذه الكائن إلى المبيدات وإقامة علاقة بين جرعة التعرض ومدى الضرر على المستوى الخلوي والتحت خلوي.

بينت التجارب التأثير السمي للأجسام الدخيلة وذلك عن طريق تثبيط نمو البرامسيوم ونسبة الوفيات المرتفعة خاصة بالنسبة للتراكيز العالية. من جهة أخرى سمحت الدراسة الميكروسكوبية بالكشف عن تشوهات مرفولوجية وتركيبية على شكل تبرعات على مستوى الجدار الخلوي، ارتفاع الحجم الخلوي، خلل في المحتوى الخلوي و أخيرا التحلل التام للخلية. كما أظهرت نتائج رصد الأيض التنفسي اضطرابات لدى الخلايا المعالجة.

وفي سياق هذه الدراسة، سمح تتبع المؤشرات الحيوية بالكشف عن تقلبات اثر استعمال المضادات الفطرية الثلاثة. النتائج المتحصل عليها بينت زيادة مستويات الإنزيمات المضادة للأكسدة : Catalase (CAT) ، Glutathion S-transferase ، (GST) ، Glutathion peroxydase (GPx) وكذا انخفاض في معدل Glutathion (GSH). الخلل في معدل البروتينات الإجمالي وتراكم المواد المتفاعلة مع حمض تيوباربيبيريك (TBARS) يدل عن إجهاد عند البرامسيوم المتعرض لمضادات الفطريات. هذا الجزء تمت تكملته بتتبع حالات الأكسدة والإرجاع الخلويين أين سجلنا ارتفاع في معدل نتائج الايض المتفاعل مع الأوكسجين (ROMs) مصحوبة باضطراب جلية على القدرة البيولوجية للأكسدة (BAPs).

الكلمات الدليلية: البرامسيوم، ثيرام، تيبوكونازول، فلوديوكسونيل، ديفينوكونازول، الإجهاد التأكسدي، المؤشرات الحيوية.

Annexe



Research Journal of
**Environmental
Toxicology**

ISSN 1819-3420



Academic
Journals Inc.

www.academicjournals.com



Research Article

Determination of Median Effective Inhibitory Concentration of Three Fungicides Widely Used for Treatment of Wheat on the Target Pest *Fusarium* sp.

M. Djekoun, H. Berrebbah, A. Saib and M.R. Djebbar

Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar, P.O. Box 12, 23000, Annaba, Algeria

Abstract

The pathogenic *Fusarium* species attack plants of major economic importance including wheat. Infection of cereal plants causes significant losses in crops but also the deterioration of the quality of grains and economic losses resulting are often very heavy. In the present study, the efficacy of three fungicides (thiram, tebuconazole and fludioxonil+difenoconazole) tested *in vitro* for their inhibitory activities against the target pest *Fusarium* sp., isolated from infected seed of wheat. Fungi toxicity was expressed as a percentage of inhibition of mycelial growth. The median lethal dose was calculated for each tested active ingredient. Among the chemical fungicides which were used, thiram was the most effective with EC_{50} value of 0.15 mg L^{-1} followed by the mixture fludioxonil-difenoconazole with a value equal to 0.27 mg L^{-1} and finally tebuconazole with 3.79 mg L^{-1} .

Key words: Thiram, tebuconazole, fludioxonil, difenoconazole, *Fusarium* sp., EC_{50}

Received: September 27, 2015

Accepted: November 28, 2015

Published: February 15, 2016

Citation: M. Djekoun, H. Berrebbah, A. Saib and M.R. Djebbar, 2016. Determination of median effective inhibitory concentration of three fungicides widely used for treatment of wheat on the target pest *Fusarium* sp. Res. J. Environ. Toxicol., 10: 109-114.

Corresponding Author: M. Djekoun, Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar, P.O. Box 12, 23000, Annaba, Algeria Tel: +213561501412

Copyright: © 2016 M. Djekoun *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the creative commons attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Competing Interest: The authors have declared that no competing interest exists.

Data Availability: All relevant data are within the paper and its supporting information files.

INTRODUCTION

Fusarium wilt is the most devastating disease affecting cereal crops with small grains; it can devastate a crop in a few weeks before harvest and cause significant yield losses. The causative agents include two genera of pathogenic fungi: *Microdochium* and *Fusarium* (Atanasov, 1920; Bottalico, 1998; Arseniuk *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2005). They lead to a series of symptoms that are characterized by damping and necrosis of plant tissues and ears (Bottalico and Perrone, 2002; Xu and Nicholson, 2009). Furthermore, some *Fusarium* sp., produce mycotoxins which are toxic to animals and humans (Leonard and Bushnell, 2003). In addition, some highly toxic mycotoxins have recently been reclassified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as possibly carcinogenic in humans (Dalie, 2010). Smith (1884) described the disease in the UK. It may be associated with both high yield losses (abortion and low grain weight), reduction in their germination quality and a decrease in their quality by the presence of toxins in grains.

Devastating epidemics have been reported in Europe, USA, China and South America and caused yield losses of up to 30% (Mesterhazy and Rowaished, 1977; McMullen, 1997). In 2000, a 100% rate of loss has been recorded in certain French plots (Carlier, 2001).

To control this disease, several strategies have been developed. Chemical control remains one of the most important interventions and the efficiency of culture is directly related. Several families of fungicides are used including the triazoles (Maufras *et al.*, 1994; Caron, 1995; Mielke and Weinert, 1996; Mesterhazy *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 2011). They inhibit the biosynthesis of ergosterol and are considered the most active against *Fusarium* wilt. Other fungicides classes are also used such as dithiocarbamates (Fravel *et al.*, 2005).

Therefore, the objective of the present study was (1) To assess the sensitivity, *in vitro*, of the pathogenic *Fusarium* sp., isolated from seeds of wheat, towards three fungicides including tebuconazole, thiram and the mixture fludioxonil-difenoconazole which have been introduced recently against *Fusarium* spp. and (2) to determine the median effective inhibitory concentration (EC_{50}) values for each fungicide.

MATERIALS AND METHODS

Biological material: The seed of wheat (*Triticum aestivum* L. subsp. *Aestivum*) was supplied to us by the National Institute of Plant Protection (INPV), Annaba, Algeria.

Fungal strains: The strains of *Fusarium* sp. were obtained from seed of wheat. The seeds were previously disinfected by

soaking in a solution of sodium hypochlorite 2% followed by thorough rinsing with sterile distilled water. They are then dried with sterile filter paper.

Surface disinfected seeds were plated on the PDA medium (Potato Dextrose Agar) and were usually incubated for 7-10 days at 25 °C (ISTA., 1996; Mathur and Kongsdal, 2003). The identification of the pathogen was done based on some morphological characteristics of colonies (growth rate, colony appearance, pigmentation) and microscopic observation of spores (shape and size).

Fungicides: The active ingredients used in the *in vitro* tests were: Tebuconazole (Rival), fludioxonil+difenoconazole (syngenta) and thiram (Sipcam Inagra) (Table 1). Preliminary tests were conducted for each fungicide to choose the range of concentrations to obtain a dose-effect response.

The experiments were performed by testing five concentrations for each active ingredient: 0.06, 1.39, 2.79, 5.58 and 11.16 mg L⁻¹ for tebuconazole, 0.025, 0.05, 0.1, 0.21 and 0.42 mg L⁻¹ for Thiram and finally 4 concentrations were selected for the mixture fludioxonil-difenoconazole (0.05, 0.1, 0.5 and 1 mg L⁻¹).

***In vitro* toxicity tests:** The objective of this experiment is to assess inhibitory activity on the growth of *Fusarium* cultures. Synthetic fungicides were incorporated aseptically to get desired concentration in the culture medium kept supercooled (40-45 °C). The mixture is then poured equally into three petri dishes. Mycelial disks of the pathogen (6 mm in diameter) will be cut from young cultures of *Fusarium* sp. (7 days old culture) and were then deposited in the center of petri dishes with a PDA media amended with the fungicides. Meanwhile, untreated control will be made in the same way where the same amount of fungicide is replaced by sterile distilled water. The dishes are then incubated at 25 °C. After 7 days of incubation, the mean diameter of the colonies was estimated from two perpendicular diameters. The experiment was repeated 4 times. Fungi toxicity was recorded in terms of percentage colony inhibition and calculated according to Pandey *et al.* (1982). Percentage growth inhibition was determined using the Eq. 1:

$$I(\%) = \frac{D_0 - D_f}{D_0} \times 100 \quad (1)$$

Where:

D_0 = Average diameter of fungal colony with control

D_f = Average diameter of colonies in the presence of the fungicide

Table 1: Fungicides tested on *Fusarium* strains

Fungicides	Products name	Concentrations	Groups
Fludioxonil+difenoconazole	Celest extra	25 g L ⁻¹	Phenylpyrroles+triazole
Tebuconazole	Acil	60 g L ⁻¹	Triazole
Thiram	Thiramchim	80%	Dithiocarbamates

Fig. 1: Evolution of *Fusarium* sp., colonies treated with increasing concentration (Case of tebuconazole)

EC₅₀ determination: The median effective inhibitory concentration (The concentration of fungicides which reduced the mycelial growth of *Fusarium* sp. by 50%) is calculated according to the method of Finny (1971).

The percentages of inhibition are transformed into probit values. The regression lines are drawn according to the Eq. 2:

$$y = ax + b \quad (2)$$

Where:

a = Regression coefficient

b = Constant

y = The probit

x = log₁₀ of the concentrations

Statistical analysis: The obtained data was analyzed using Minitab16 student t-test and analysis of variance (ANOVA) to detect significant differences reported for the studied parameters.

RESULTS

Isolation and identification of the pathogen: On PDA medium, strain growth results in the production of aerial and dense mycelium (cottony) of a white color on the front and yellow on the back. The color of the back turns crimson when culture is older.

Under an optical microscope (Olympus CH20), we observe macroconidia with 4-6 septate, curved in shape and may have a pointed terminal as described by Champion (1997).

Effect of fungicides on mycelium growth: The results of studying the influence of the fungicides upon the growth of

the phytopathogenic strain of *Fusarium* sp. show that the 3 molecules affected significantly the growth of parametia ($p \leq 0.001$). Indeed, for *Fusarium* strains treated with the highest concentration of thiram (0.42 mg L⁻¹), colonies displayed a diameter of about 1.60 cm compared to control colonies (8.29 cm). As to the strains treated by fludioxonil-difenoconazole and tebuconazole, the diameter of colonies is about 1.70 for the respective concentrations of 1 and 11.16 mg L⁻¹. Figure 1 shows the evolution of *Fusarium* colonies treated with increasing concentration (Case of tebuconazole).

Our results gave clear and gradual decrease of diameter of colonies in dependent dose manner (Fig. 2).

Response inhibition: Based on the acute toxicity results, a percentage of inhibition of mycelial growth was calculated. The highest percentage of inhibition was obtained with Thiram where inhibition reached 81% for the concentration of 0.42 mg L⁻¹. Fludioxonil-difenoconazole mixture and tebuconazole also showed high percentages of inhibition of about 79% for the respective concentrations of 1 and 11.16 mg L⁻¹ (Fig. 3). It should be noted that statistical analysis revealed a significant inhibition ($p \leq 0.001$) of mycelial growth of *Fusarium* sp., treated with fludioxonil-difenoconazole mixture dice the lowest concentration (0.05 mg L⁻¹).

EC₅₀ determination: The EC₅₀ of the fungicides was calculated according to the linear relation between inhibitory probit and concentration logarithm. Table 2 shows the EC₅₀ values of the three fungicides: thiram, tebuconazole and fludioxonil-difenoconazole (0.15, 3.79 and 0.27 mg L⁻¹). Of these, thiram and the mixture fludioxonil-difenoconazole proved to be the most effective in inhibiting mycelial growth.

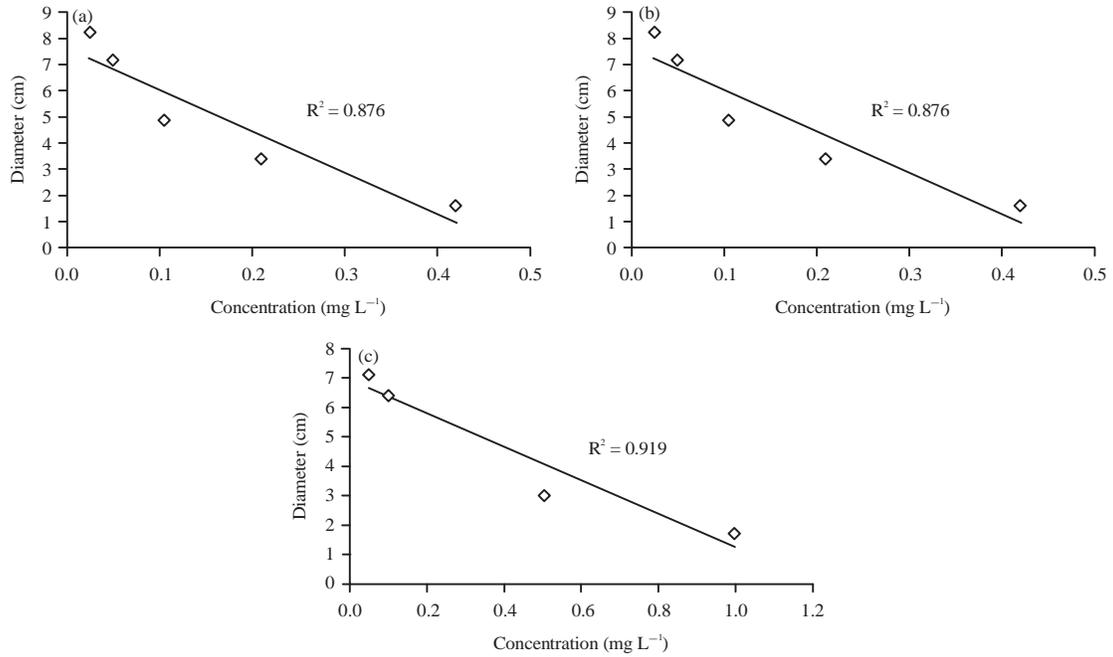


Fig.2(a-c): Effects of selected fungicides on mycelium growth of *Fusarium* sp. treated by, (a) Thiram, (b) Tebuconazole and (c) Fludioxonil-difenoconazole after 7 days of incubation at 25 °C ($p \leq 0.001$)

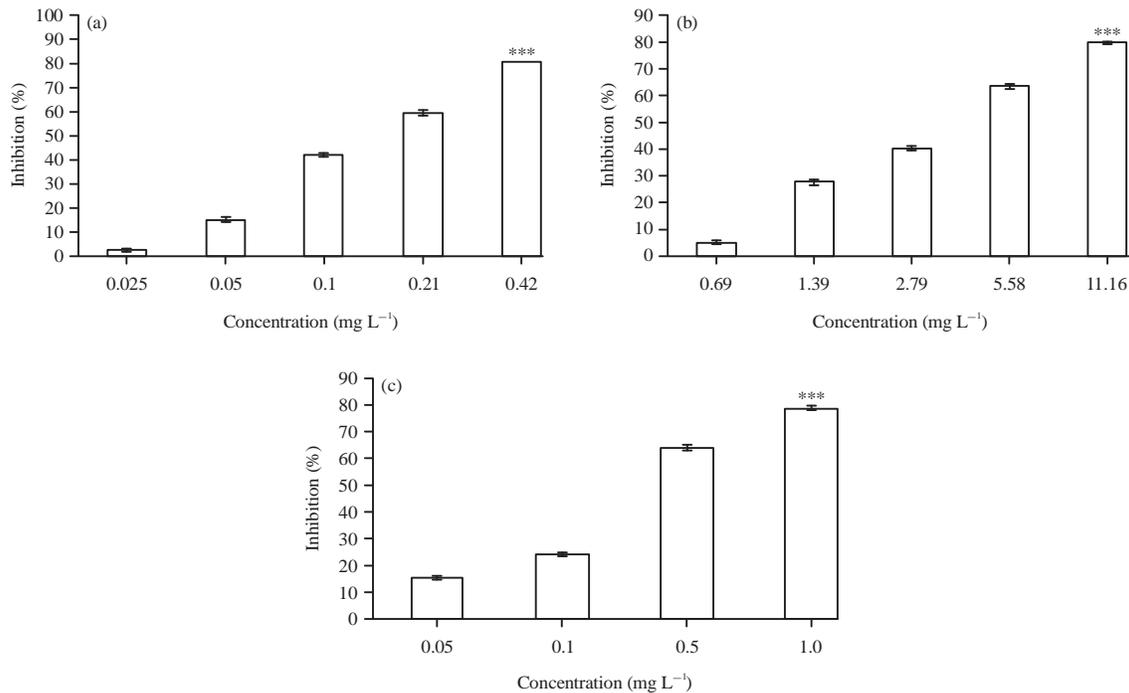


Fig.3(a-c): Inhibitory effect of (a) Thiram, (b) Tebuconazole and (c) Fludioxonil-difenoconazole, on *Fusarium* sp. Results expressed in response percentage and each value is average \pm standard error of four replicates (***) ($p < 0.001$)

DISCUSSION

Fusarium wilt is regarded as one of the most important diseases of wheat. The development of this disease may have

serious consequences on both crop yields and grain quality (Pirgozliev *et al.*, 2003). Several synthetic antifungal agents have been developed (Prasad *et al.*, 2010) but fungicide application still the key factor in the control of fungal diseases.

Table 2: Values of EC₅₀ for the three fungicides screened *in vitro* on *Fusarium* sp.

Fungicides	Percentage of inhibition 1 week after treatment (%)	EC ₅₀ (mg L ⁻¹)
Thiram	81.05	0.15
Tebuconazole	79.76	3.79
Fludioxonil-difenoconazole	79.41	0.27

In this study we focused first on evaluating the efficiency of three fungicides from different chemical classes. We noticed that the selected fungicides reduced the mycelial growth of *Fusarium* in dose-dependent manner. At the concentrations tested in the *in vitro* experiments, thiram reduced significantly the mycelium growth and final colony size of *Fusarium* sp. at the concentration of 0.42 mg L⁻¹ compared to growth on unamended thiram medium. Similar observation was done by Fravel *et al.* (2005) when studying the effects of thiram on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* strain CS-20.

As shown reported in literature, triazoles proved to be the most active molecules against *Fusarium* species (Edwards *et al.*, 2001; Matthies and Buchenauer, 2000; Menniti *et al.*, 2003; Blandino *et al.*, 2006, 2012). These types of fungicides interfere with the metabolism of fungal pathogens, mainly by inhibition of ergosterol biosynthesis (Ragsdale, 1977; Hewitt, 1998) and often cause striking morphological malformations of cell wall. This confirms the strong decrease of colony sizes observed in strains exposed to tebuconazole and difenoconazole+fludioxonil. Indeed, the diameter of the colonies decreases significantly until it reaches a value of about 1.7 cm compared to the control (8 cm).

On the other hand, the response percentages confirm the toxic effects of the increasing concentrations tested. Indeed, for the higher concentrations of tebuconazole, the inhibition rate has reached a value of 79.76%. These results correlated well with the recent data on the effects of tebuconazole on growth and production of toxins by *Fusarium langstthiae* (Mateo *et al.*, 2011). These results also agree with previous reports (Ramirez *et al.*, 2004). These authors emphasize the great efficiency of triazoles, against the pathogenic species of *Fusarium graminearum* and report that none of the isolates of *F. graminearum* were able to grow in the presence of any active triazole substance at concentrations >15 mg mL⁻¹.

The strain treated with a mixture of triazoles and phenylpyrroles (Fludioxonil) led to a significant inhibition (79.41%), as great as that obtained with triazole alone. However, concerning the median effective inhibitory concentration, the EC₅₀ value for tebuconazole was lower than fludioxonil+difenoconazole suggesting better efficacy overall of the mixture in controlling growth of *Fusarium* sp. The results obtained are in agreement with those of loos *et al.* (2005), who observed the most efficient control of

F. graminearum by mixing the triazoles and strobilurins. Mesterhazy *et al.* (2011) demonstrated that the mixture of two triazoles provide a significative higher reduction of FHB disease.

CONCLUSION

The *in vitro* exposure showed that the three selected fungicides inhibit mycelial growth of *Fusarium* sp. till 80%. Additionally, the efficiency of the combination of two or more active ingredients has been demonstrated. The EC₅₀ values vary from 0.27 mg L⁻¹ for the mixture fludioxonil-difenoconazole and 3.79 mg L⁻¹ for tebuconazole and thiram provide to be the most effective with a value of 0.15 mg L⁻¹.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank The National Institute of Plant Protection (El kous) for the monitoring of the experimental trials. Djekoun M. is also grateful to M. Boudib for her excellent technical assistance and her advices.

REFERENCES

- Arseniuk, E., E. Foremska, T. Goral and L. Chelkowski, 1999. *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. J. Phytopathol., 147: 577-590.
- Atanasov, D., 1920. Fusarium-Blight (Scab) of Wheat and Other Cereals. 1st Edn., Government Printing Office, Washington, DC., Pages: 32.
- Blandino, M., L. Minelli and A. Reyner, 2006. Strategies for the chemical control of *Fusarium* head blight: Effect on yield, alveographic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain. Eur. J. Agron., 25: 193-201.
- Blandino, M., M. Haidukowski, M. Pascale, L. Plizzari, D. Scudellari and A. Reyneri, 2012. Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. Field Crops Res., 133: 139-149.
- Bottalico, A. and G. Perrone, 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. Eur. J. Plant Pathol., 108: 611-624.

- Bottalico, A., 1998. *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. J. Plant Pathol., 80: 85-103.
- Carlier, B., 2001. Les fusarioses: Des maladies dures à combattre. J. Agric., 557: 36-38.
- Caron, D., 1995. Les fongicides contre la fusariose des épis. Pourquoi leur efficacité est elle seulement moyenne? ITCF Perspect. Agric., 198: 80-82.
- Champion, R., 1997. Identifier les Champignons Transmis par les Semences. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, pp: 166-197.
- Dalie, D.K.D., 2010. Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs. Ph.D. Thesis, School of Life Science and Health, Bordeaux 1 University, France.
- Edwards, S.G., S.R. Pirgozliev, M.C. Hare and P. Jenkinson, 2001. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. Applied Environ. Microbiol., 67: 1575-1580.
- Finny, D.J., 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, London, UK.
- Fravel, D.R., K.L. Deahl and J.R. Stommel, 2005. Compatibility of the biocontrol fungus *Fusarium oxysporum* strain CS-20 with selected fungicides. Biol. Control, 34: 165-169.
- Hewitt, A.F., 1998. Fungicides in Plant Protection. CAB International, Wallingford.
- ISTA., 1996. International rules for seed testing. Seed Sci. Technol., 24: 39-42.
- Ioos, R., A. Belhadj, M. Menez and A. Faure, 2005. The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. Crop Protect., 24: 894-902.
- Leonard, K.J. and W.R. Bushnell, 2003. *Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley. 1st Edn., APS Press, St. Paul, MA., USA., ISBN-13: 978-0890543023, Pages: 530.
- Mateo, E.M., F.M. Valle-Algarra, R. Mateo, M. Jimenez and N. Magan, 2011. Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium. Int. J. Food Microbiol., 151: 289-298.
- Mathur, S.B. and O. Kongsdal, 2003. Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi. 1st Edn., International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland, ISBN-13: 9783906549354, Pages: 425.
- Matthies, A. and H. Buchenauer, 2000. Effect of tebuconazole (Folicur®) and prochloraz (Sportale®) treatments on *Fusarium* head scab development, yield and deoxynivalenol (DON) content in grains of wheat following artificial inoculation with *Fusarium culmorum*. J. Plant Dis. Protect., 107: 33-52.
- Maufras, J.Y., C. Maumene, M.M. Bourdin and M.M. Leroux, 1994. Fongicides Cereales et Proteagineux. International Tropical Conservation Foundation, Paris, France, Pages: 144.
- McMullen, M.P., R. Jones and D. Gallenberg, 1997. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. Plant Dis., 81: 1340-1348.
- Menniti, A.M., D. Pancaldi, M. Maccaferri and L. Casalini, 2003. Effect of fungicides on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in durum wheat grain. Eur. J. Plant Pathol., 109: 109-115.
- Mesterhazy, A. and A.K. Rowaished, 1977. Analysis of symptoms caused by *Fusarium graminearum* Schwabe and its relation to powdery mildew infection in wheat. Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 12: 289-301.
- Mesterhazy, A., B. Toth, M. Varga, T. Bartok, A. Szabo-Hever, L. Farady and S. Lehoczki-Krsjak, 2011. Role of fungicides, application of nozzle types and the resistance level of wheat varieties in the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol. Toxins, 3: 1453-1483.
- Mesterhazy, A., J. Bartok and C. Lamper, 2003. Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium* and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of fusarium head blight. Plant Dis., 87: 1107-1115.
- Mielke, H. and J. Weinert, 1996. Investigations on the effect of various fungicides on the pathogen of partial head blight (*Fusarium culmorum*/WG Sm./Sacc.). Nachr. Dt. Pfl Schutzdienst, 48: 93-95.
- Pandey, D.K., N.N. Tripathi, R.D. Tripathi and S.N. Dixit, 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poir. J. Plant Dis. Prot., 89: 344-349.
- Pirgozliev, S.R., S.G. Edwards, M.C. Hare and P. Jenkinson, 2003. Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. Eur. J. Plant Pathol., 109: 731-742.
- Prasad, M.N.N., S.S. Bhat and M.Y. Sreenivasa, 2010. Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*-the causative agent of die-back disease of neem. J. Agric. Technol., 6: 127-133.
- Ragsdale, N.N., 1977. Inhibition of Fungal Ergosterol Synthesis. In: Antifungal Compounds: Interactions in Biological and Ecological Systems, Siegel, M.R. and H.D. Sisler (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA., pp: 333-363.
- Ramirez, L., S. Chulze and N. Magan, 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. Crop Protect., 23: 117-125.
- Smith, W.G., 1884. Diseases of Field and Garden Crops. Macmillan and co., London, pp: 208-213.
- Xu, X. and P. Nicholson, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. Annu. Rev. Phytopathol., 47: 83-103.
- Xu, X.M., D.W. Parry, P. Nicholson, M.A. Thomsett and D. Simpson *et al.*, 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* head blight in wheat in four European countries. Eur. J. Plant Pathol., 112: 143-154.



Scholars Research Library

Der Pharma Chemica, 2015, 7(11):197-204
(<http://derpharmachemica.com/archive.html>)



ISSN 0975-413X
CODEN (USA): PCHHAX

Growth kinetics, monitoring of biomarkers and respiratory metabolism to evaluate the combined effects of fludioxonil and difenoconazole in a freshwater ciliated protist: *Paramecium* sp.

M. Djekoun*, H. Berrebah and M. R. Djebar

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

ABSTRACT

The intensification of agriculture and uncontrolled application of agrochemicals has resulted in an increased loading of ground water with pesticides, greatly impacting ecosystems by changing the biodiversity and threatening aquatic organisms. The aim of this study is to investigate the underlying effects of the mixture Fludioxonil – Difenoconazole, a newly introduced fungicide for the treatment of seeds, on an alternative cellular model: The ciliated protist *Paramecium* sp. Exposure experiments were conducted at 28°C and various endpoints were studied. We first interested to investigate the effects of sublethal exposure to Fludioxonil – Difenoconazole on population growth. *Paramecium* cells were exposed to four concentrations of (0.1, 0.5, 1, 1.5 mg/l) and the growth kinetics was followed for 96 hours. We also measured the oxygen consumption via a polarographic study. Under the same condition, total proteins rate, Glutathione content (GSH) and enzymatic activity of Catalase (CAT) were investigated to evaluate antioxidative response to fungicide effects. After 96h of treatment, the results showed a significant decrease in growth rate of about 70% in cells treated with 1.5 mg/l. *Paramecia* exposed to different concentrations of Fludioxonil - Difenoconazole showed a strong disruption in respiratory metabolism. On another hand, the monitoring of biomarkers has demonstrated a significant decrease in total proteins rate at the highest concentration. The present finding revealed a disruption of enzymatic activity of Catalase and a depletion of GSH content in dose dependent manner. By the obtained results, we may suggest the occurrence of oxidative stress generated by the studied xenobiotic on the ciliated protozoan *Paramecium* sp.

Keywords: *Paramecium* sp., Fludioxonil, Difenoconazole, Toxicity, Growth kinetics, Respiratory metabolism, Biomarkers.

INTRODUCTION

If the beneficial effects of pesticides are well established, their use poses serious problems for the environment, human and animal health. The misuse and uncontrolled agrochemicals, has increased considerably over the last 35 years [1]. The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) has estimated that by the year 2020 global output will be 85% higher than it was in 1995 [2]. These products have a profound effect on the environment and contribute heavily to pollution when they are applied in a quantity exceeding what crops can absorb or when they are washed away by water or wind before their absorption. The excessive amounts of the constituents of pesticides (nitrogen, phosphate,...etc.) can be leached into groundwater or run off into surface waters thus affecting the “non-target” species of wildlife and flora. In addition, they reduce biodiversity and disrupt the ecosystems. Agrochemicals products received enormous attention for their toxic effects on organisms [3,4,5].

Triazole fungicides are one of the main classes of pesticides widely used for their properties, such as high chemical and photochemical stability, low biodegradability and easy transportation in the environment make them persistent in soil and water.

Difenoconazole (cis-trans-3-chloro-4-(4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-yl methyl)-1,3-dioxolan-2-yl) phenyl 4-chlorophenyl ether) inhibits fungal ergosterol biosynthesis, thus resulting in the blocking of fungal cell wall chitin synthesis [6]. Unfortunately, recent research in southern China indicated that after 11.25 g of Difenoconazole per hectare was applied (lower than the recommended dosage), the drug dosage in paddy water reached 1.98 mg/l on spraying day, with a half-life of about 6 days [7] which may lead to an exposure to organisms. In addition to paddy field, previous study showed that the detected value of difenoconazole in surface water sample of Australia reached 0.15 mg/l [8]. According to the recent publication of the European Food Safety Authority (EFSA), it has been identified that difenoconazole is very toxic to aquatic organisms in view of its high toxicity to *Daphnia magna* (chronic NOEC = 0.0056 mg active substance/l) [9].

Fludioxonil (4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrole-3-carbonitrile) belonging to the family of Phenylpyrroles, its inhibitory effect appears in the inhibition of a protein kinase involved in the regulation of cellular metabolism thereby causing an alteration in protein phosphorylation process [10]. It was found that Fludioxonil has a long persistence in aquatic environment since residues of this fungicide were present up to 5 years from its use in grape vine-yards region [11], therefore, fludioxonil may also have additional effects on non-target plant species.

Usage of non-targeted organisms in environmental toxicology is needed to understand the wide range of toxic effects caused by the pesticides on different organisms. The common model systems used in the research of the environmental toxicity include bacteria, algae, daphnia, and zebrafish [3,12,13]. However, a variety of other organisms in the aquatic environment are important to maintain the balance of ecological systems. They have been introduced successfully in toxicological investigations. Protozoan cells are often used as bioindicators of chemical pollution, especially in aqueous environment. They are composed of a single cell, but unlike single-celled algae, they do not possess a protective cell wall. Thus, chemicals enter protozoan cells more easily than bacterial and algal cells and then interact directly with the cellular structures and organelles. Among protozoans, *Paramecium spp.*, widely distributed in freshwater, are one of the ciliate models, most commonly used for laboratory research. They have been widely used to evaluate the toxic effects of carcinogens, Carbamate pesticides, and pollutants [14,15,16].

In order to study the underlying effects of a fungicide newly introduced for treatment of seeds, the mixture Fludioxonil - Difenoconazole was tested at different concentrations on the ciliate protist, *Paramecium sp.* A growth monitoring and respiratory metabolism were performed. We sought to evaluate a possible oxidative stress. Enzymatic activity of Catalase was investigated to evaluate antioxidative response of *Paramecium sp.* We also measured the levels of reduced glutathione and total proteins.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The mixture of Fludioxonil – Difenoconazole (Celest Extra, Syngenta) is a flowable concentrate containing 25 g/l (2.40% w/w) Fludioxonil and 25 g/l Difenoconazole (2.40% w/w). Stock solutions were prepared by dissolving the toxicant in distilled water.

Cell Culture

The biological material used in our work is a single-celled microorganism whose culture is obtained by simply soaking hay and lettuce in rainwater. The preparation is left in a warm place (20°C) dark and airy.

Acute toxicity test and growth kinetics

Preliminary toxicity test were conducted in our laboratory in order to determine sublethal concentrations. The experiments were performed according to [4]. *Paramecium* culture was exposed to a range of concentrations: 0.1, 0.5, 1 and 1.5 mg/l. Each test concentration was replicated 4 times. The culture was done at $28 \pm 2^\circ \text{C}$ in test tubes using 10 mL of the culture medium (about 60 cells/ tube). The growth kinetics study was realized by the daily cell counting, after fixation with formalin at under optic microscope using grooved blade. The count was repeated at least three times for each repetition.

Response rate, generation number and generation time

After 96h of exposure, changes in growth rates were examined. The number of living cells was counted and a percentage response was determinate according to the following formula:

$$\text{Response percentage} = \left[\frac{N_C - N_E}{N_C} \right] \times 100$$

Where N_C is the number control cells, N_E is the number of treated cells.

Based on the data, the number of generations and time required for each generation was calculated by the following formula:

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$$

$$g = \frac{\text{Generation time}}{\text{Number of generation}}$$

Where n is number of generation, N_t is the number of cells at 72h, N_0 is the number of cells at T_0 and is the generation time.

Respiratory metabolism

The monitoring of the respiratory metabolism of the paramecium is measured through an oxygen electrode type Hansentech according to the method of [17] adapted at the Laboratory of Cellular Toxicology for monitoring the respiratory metabolism of the microorganisms. Oxygen consumption signals are visualized in spot shape on the computer screen.

Protein determination

The proteins content were quantified by colorimetry according to the method of [18], the reading of the absorbance is made at 595nm in spectrophotometer (Jenway 6300). The calibration range is made from a standard protein, Bovine Serum Albumin (BSA).

Catalase activity

Measuring the Catalase activity (CAT) is performed according to the method of [19] based on the hydrolysis of H_2O_2 to H_2O and O_2 . For the assessment of enzymatic activity of Catalase, the samples were homogenized in phosphate buffer 1 mL (0.1M, pH 7.5) using an ultrasonic crusher (SONICS, Vibra cell). The homogenate thus obtained was centrifuged at 15 000 rpm/min for 10 minutes and the supernatant recovered serves as enzyme source. The reaction is initiated by the addition of hydrogen peroxide (500 mM, 30V). Reading is done against a blank prepared with hydrogen peroxide and phosphate buffer. The decrease in absorbance is measured every 15 seconds for one minute at 240 nm in a spectrophotometer (Jenway, 6300). Catalase activity is expressed in $\mu\text{mol } H_2O_2$ per minute per mg of protein.

Glutathione rate determination

The rate of glutathione (GSH) is quantified according to [20], whose principle is based on the colorimetric measurement of the 2-nitro-5 mercapturic acid at 412 nm. The samples are homogenized in 1 ml EDTA (0.02M, pH9.6). 0.2 mL of SSA is added to 0.8 mL of the homogenate prepared beforehand. The mixture was centrifuged at 1000 rpm / min for 5 min. An aliquot of 500 μl of the supernatant is added to 1 mL Tris / EDTA buffer. The amount of glutathione is expressed in $\mu\text{mol} / \text{mg}$ protein.

Statistical analysis

All the experiments were run in triplicate. The obtained data were analyzed using Minitab16 student t-test and analysis of variance (ANOVA) to detect significant differences reported for the studied parameters.

RESULTS

Kinetics growth

In the acute toxicity experiment, we observed that the mixture Fludioxonil - Difenconazole affected significantly the growth of paramecia ($P \leq 0.001$) in a concentration dependent manner (Fig. 1). The variation of paramecium cells number revealed the toxic effect of the fungicides. Indeed, the number of cells exposed to 1.5 mg/l is reduced by about 3600 cells compared to the control after 4 days of treatment.

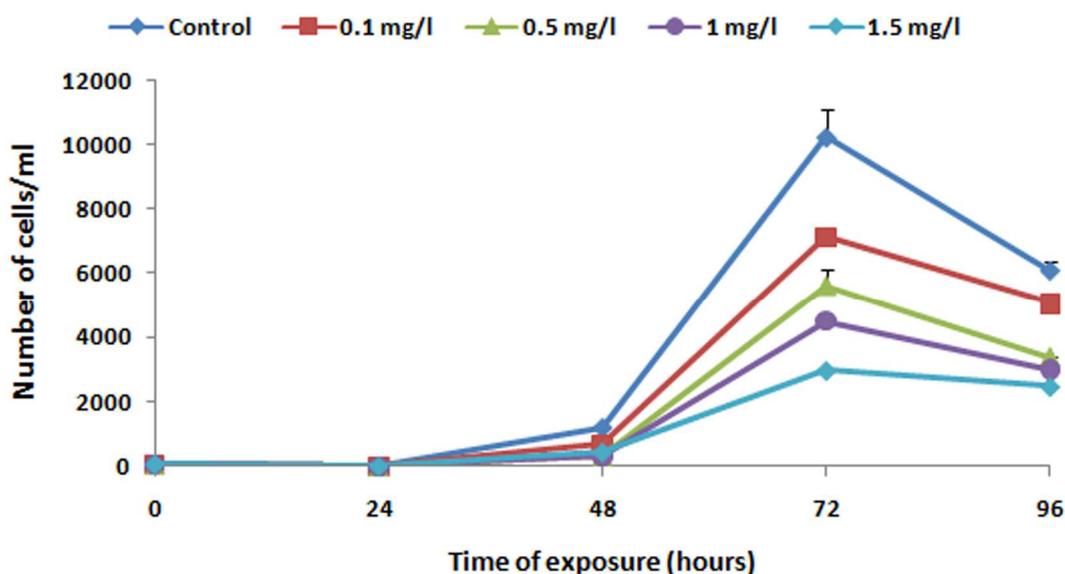


Fig. 1. Effects of increasing concentrations of the mixture Fludioxonil - Difenoconazole on the growth of *Paramecium sp.* at 28°C after 96h of treatment ($P \leq 0.001$)

Response percentage

Based on the acute toxicity results, a percentage of inhibition was calculated for the tested fungicide. In the present experiments, when *Paramecia* were exposed to Fludioxonil - Difenoconazole mixture concentrations from 0.1 to 1.5 mg/l, a very important decrease in the growth rate was noticed after 96h of treatment (Fig. 2). The highest percentage of inhibition was obtained at the concentration of 1.5 mg/l where inhibition reached 70 %.

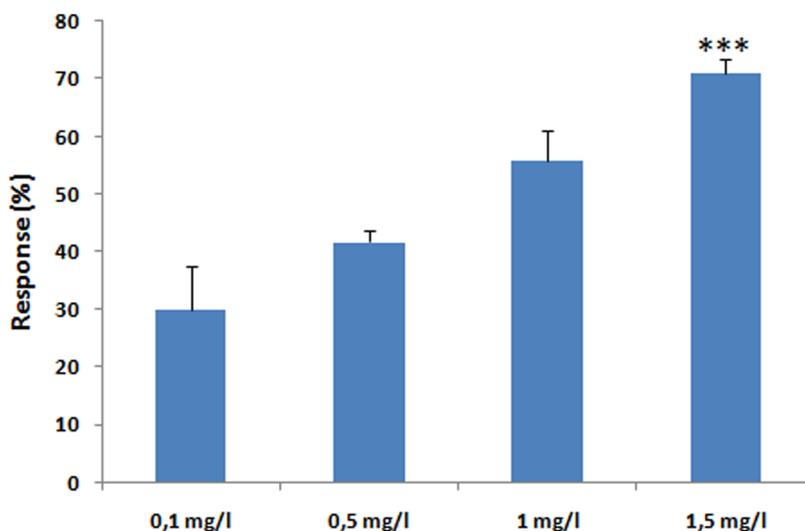


Fig. 2. Effects of increasing concentrations of the mixture Fludioxonil - Difenoconazole on the response percentage. Each value is average \pm standard error of three replicates (***) $P < 0.001$)

In addition, we could calculate the number of generation and the generation time for this fungicide. The results are represented in Table 1. In exposed *Paramecia*, the results gave clear and gradual decrease in the number of generation with the increasing concentrations.

Table 1. Effect of the mixture Fludioxonil - Difenoconazole on *Paramecium sp.* generation number and generation time

Fludioxonil – Difenoconazole (mg/l)	Number of generations	Generation time (hours)
Control	7.41	12.95
0.1	6.89	13.93
0.5	6.55	14.65
1	6.22	15.43
1.5	5.62	17.08

Protein content

In exposed paramecia, protein content was significantly lower than that of the controls for the highest concentrations tested; the results are represented in Figure 3. The total protein rates of *Paramecium sp.* exposed to the mixture reached 0.36 mg/ml for the concentrations of 1.5 mg/l.

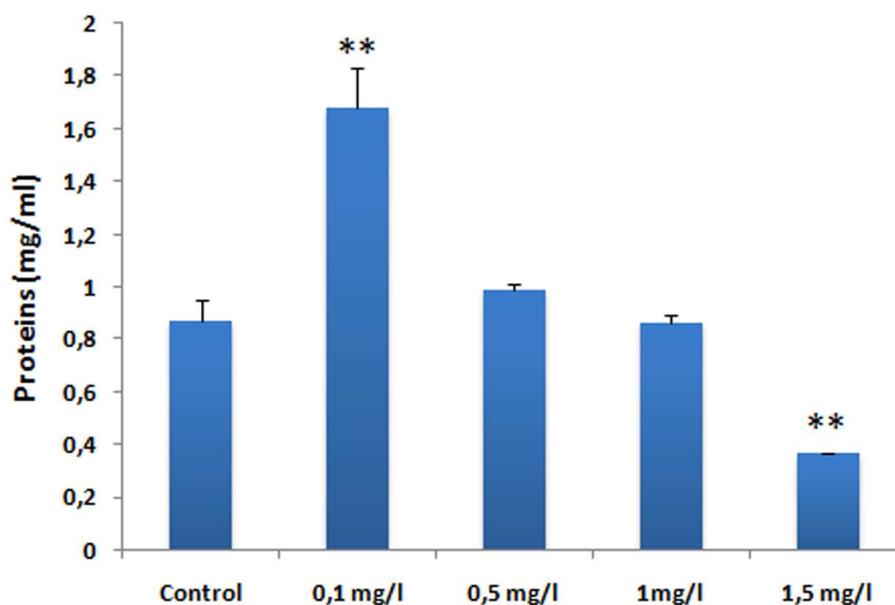


Fig. 3. Effects of Fludioxonil - Difenconazole on the rate of total proteins in *Paramecium sp.* Each value is average \pm standard error of three replicates (** P< 0.01)

Respiratory metabolism

The results reveal disturbances in the level of oxygen consumption as shown in figure 4. The amount of consumed O₂ increased at the highest concentrations (1.5 mg/l) with an oxygen consumption of the order of 100 nmol/ml at the 5th minute.

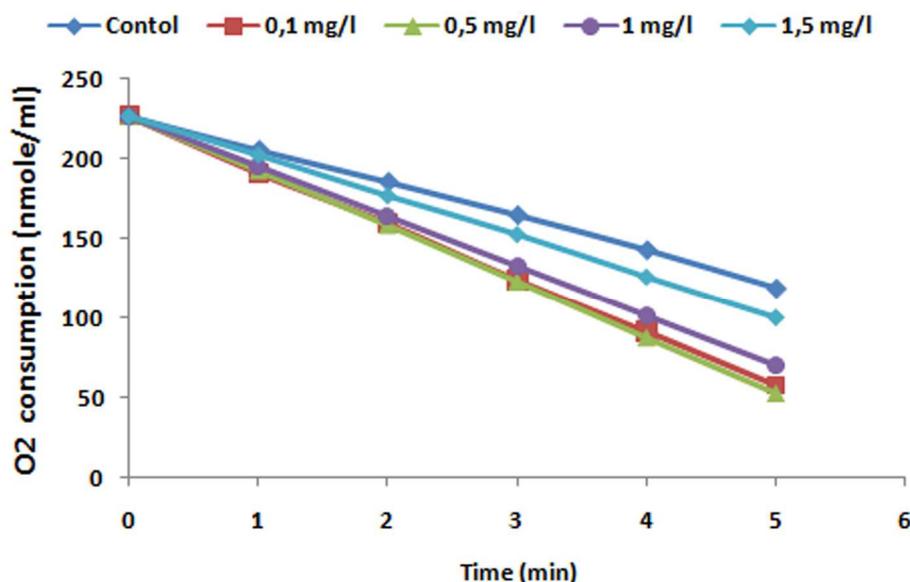


Fig. 4. Evolution of respiratory metabolism of *Paramecium sp.* exposed to increased concentrations of the mixture Fludioxonil - Difenconazole

Glutathione (GSH) rate

The mixture Fludioxonil - Difenconazole induces a decrease in the rate of glutathione from the concentration 0.5 mg/l (Fig. 5). Indeed, the rate of glutathione reached 0.124 μ mol/mg pro compared to the control (0.182 μ mol/mg pro). Therefore, the effect of the Fludioxonil - Difenconazole on GSH content was concentration dependent (P \leq 0.05).

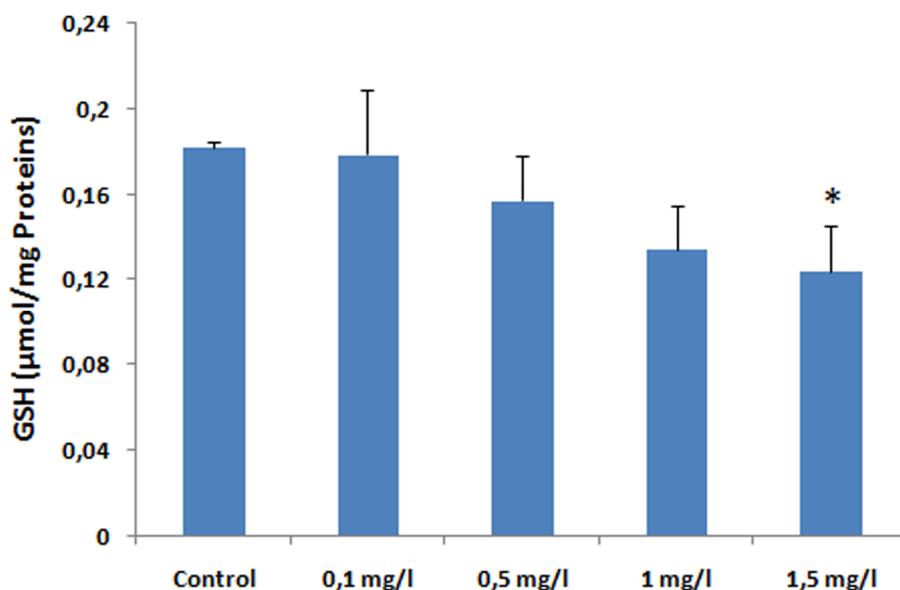


Fig. 5. Effects of the mixture Fludioxonil - Difenoconazole on the rate of GSH in *Paramecium sp.* Each value is average \pm standard error of three replicates (* P<0.05)

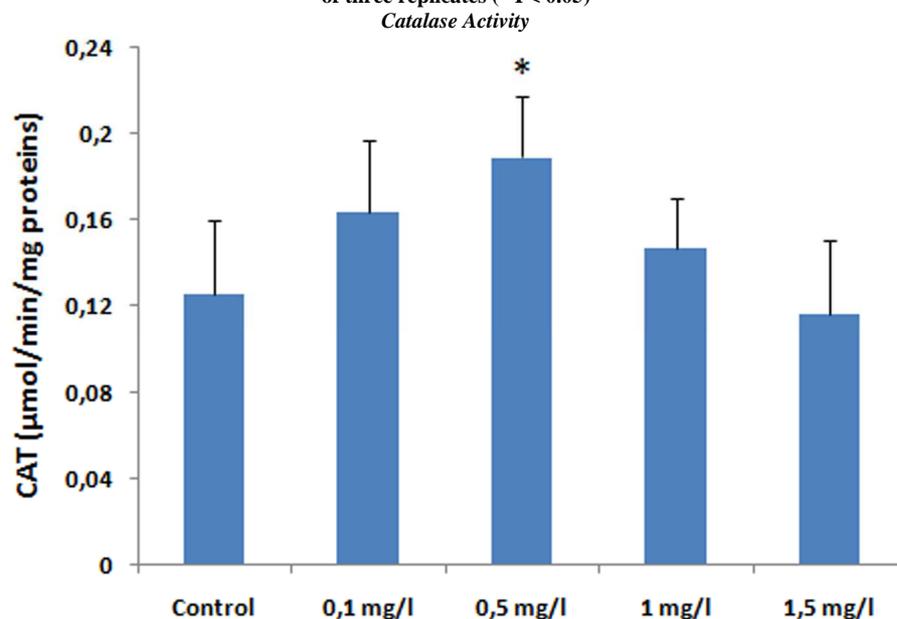


Fig. 6. Effects of the mixture Fludioxonil - Difenoconazole on the CAT activity in *Paramecium sp.* Each value is average \pm standard error of three replicates (* P<0.05)

Figure 6 illustrates the variations of CAT activity in *Paramecium sp.* exposed to increasing concentrations. Evident variations was noticed when cells were exposed to Fludioxonil – Difenoconazole. We note that the CAT activity reaches its maximum (0.182 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ pro) at the concentration 0.5 mg/l. However, the activity of the enzyme was less important at the concentrations 1 and 1.5 mg/l.

DISCUSSION

The intensification of agriculture has resulted in an increased loading of soil, surface and ground water with pesticides, greatly impacting ecosystems by changing the biodiversity and threatening aquatic organisms. Although the toxicity of pesticides has been extensively studied in many living microorganisms, very few results concern the action of this products on Protist. Due to their small size, they generally multiply through short cell cycles, making possible to study the effects of pollutants. On the other hand, it is known that microorganisms represent one of the links of which contaminants could be transmitted through the food chain leading to adverse effects on human health making them an excellent model for evaluating the toxicity of chemical compounds in aquatic life. Free living fresh water protozoan ciliates like *Paramecia* are the most commonly used ciliated and they

are considered as excellent bioindicators of toxicity stress and chemical pollution. Triazoles are the most important fungicides used in agriculture practice. Excessive amounts of such substances cause irreversible environmental damages and can indeed alter some physiological functions and biochemical parameters in organisms.

We therefore decided to evaluate the toxicity of the mixture Fludioxonil – Difenconazole on the non-target aquatic organism, *Paramecium sp.*

In the present study, we first interested to investigate the effects of sublethal Fludioxonil – Difenconazole exposure on population growth of *Paramecium sp.* We noticed that the selected concentrations affected the population growth in a dose-dependent manner inducing a strong inhibition. Furthermore, the obtained results can be compared with the previously published study who reported the effects of several groups of pesticides on the growth of *Paramecium sp.* [21,22]. This can be explained by the fact that the fungicides perturb the cellular divisions and certainly their metabolism systems and consequently cause their mortalities [23].

On the other hand, the response percentages confirm the toxic effects of the increasing concentrations. Indeed, for the higher concentrations for the mixture Fludioxonil – Difenconazole, the response rate has reached a value of 71%. Moreover, the growth rate tests revealed that increasing concentrations provokes an important decrease in the number of generations by increasing the generation time.

Concerning the respiratory metabolism, our results showed that the cells exposed to Fludioxonil – Difenconazole were affected; indeed we noticed a decrease in oxygen consumption for low concentrations which exhibited almost the same behavior. Regarding higher concentrations, a sleazy increase was detected. Other investigators reported the different changes in the respiratory activity in paramecia treated with other fungicides like Bifenazate, Phosphoramidate and Cypermethrin [22,24,5]. This can be explained by the fact that once the fungicide penetrates the cells, it will be responsible of triggering cell defense systems resulting in the induction of detoxification enzymes particularly Cytochrome P450 which participates in the metabolization of xenobiotics in rendering them hydrophilic and thus facilitating their elimination. However, the contribution of this monooxygenase could lead to the generation of reactive oxygen intermediates which are known as disruptive of respiratory metabolism.

The decreased dose – dependent of total protein rate was observed during exposure to sublethal fungicide concentrations. This is in agreement with [12] who showed a decrease in daphnids protein content when exposed to Tebuconazole (Triazoles group) and suggested that this decrease is an early defense reaction to the fungicide stress and to overcome this situation, living organisms require a high energy which lead to protein catabolism. Other authors [25,26] have reported that the decrease in protein content might be due to a lipoprotein formation, which will be used to repair damaged cells, tissues and organs.

In this work, we also investigate the effect of the fungicide on stress biomarkers. Low levels of reduced glutathione (GSH) indicate the activation of the detoxification system in cells treated with Fludioxonil – Difenconazole. This tripeptide thiol is a vital protective antioxidant against oxidative stress, which plays a key role in the capture and sequestration of free radicals but also acts as a substrate for the regeneration of other essential antioxidants [27,28,29]. Several authors have reported a decrease in GSH content in paramecia exposed to pesticides [5, 24].

Concerning the Catalase activity, the exposure of *Paramecium sp.*, shows that the fungicide exerted effects depend on the concentration and the substance tested. Our results shows that low concentrations of Fludioxonil – Difenconazole (0.1 and 0.5 mg/l) induced a significant increase on Catalase activity compared to the control. The activation was diminished when cells were exposed to 1 and 1.5 mg/l probably due to the deterioration of cellular system functions by the mixture. Our results corroborate those of [3] who reported disruption in the CAT activity of when algal cells of *Scenedesmus obliquus* were exposed to Fludioxonil.

It is known that under normal conditions, antioxidant defenses like Catalase (and other) usually prevent tissue damage caused by Reactive Oxygen Species (ROS). But when ROS overcome the defense systems of the cell, there is an alteration of the redox homeostasis, leading to oxidative stress.

CONCLUSION

Our results highlight the toxic effects of sublethal exposure to Fludioxonil – Difenconazole on *Paramecium sp.* affecting its cellular growth and respiratory metabolism. Furthermore, the fungicide is responsible of radical species production, resulting in the induction of detoxification system in the used model (*Paramecium sp.*).

Acknowledgements

The others wish to thank the Algerian Ministry of Superior Education and Scientific Research for financial support of this study.

REFERENCES

- [1] FAO Agriculture mondiale: horizon, 2015/2030, Rapport abrégé. **2015**.
- [2] OECD Environmental outlook for the chemicals industry. Environment Directorate, 2001. Paris.
- [3] D. Dewez, L. Geoffroy, G. Vernet, R. Popovic. *Aquat. Toxicol.*, **2005**. 74, 150-159.
- [4] Z. Azzouz, H. Berrebbah, M.R. Djebbar. *African J. Microbiol. Res.*, **2011**. 5(20), 3243-3250.
- [5] R. Amamra, M.R. Djebbar, N. Grara, O. Moumeni, H. Otmani, A. Alayat, H. Berrebbah. *Ann. Res. & Rev. Biol.* **2015**. 5(5), 385-399.
- [6] N.N. Ragsdale. **2**: 333-363. Inhibitors of lipid synthesis, Antifungal compounds, Siegel, M.R., Sisler, H.D. (Eds.), New York, **1977**, 2, 333-363.
- [7] Z. Zhang, D. Wang, C. Zhang, C. Wu, X. Liu. *Chin. J. R. Sci.* **2011**. 25, 339-342.
- [8] R.B. Schäfer, V. Pettigrove, G. Rose, G. Allinson, A. Wightwick, P.C. Ohe, J. Shimeta, R. Kühne, B.J. Kefford. *Environ. Sci. Tech.* **2011**. 45, 1665-1672.
- [9] EFSA. Conclusion on the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Difenconazole. **2011**. Parma, Italy.
- [10] C. Pillonel, T. Meyer. *Neurospora crassa. Pestic. Sci.* **1997**. 49, 229-236.
- [11] NRAAVC. Evaluation of the new active Fludioxonil in the product Maxim 100 FS Fungicide Seed Treatment. **2000**. Commonwealth of Australia, Canberra.
- [12] E. Sancho, M.J. Villarroel, E. Andreu, M.D. Ferrando. *Chemosphere.* **2009**. 74, 1171-1178.
- [13] S. Sunil, G. Rashi, S. Shilpi. *J. Hazard. Mater.* **2015**. 291, 102-110.
- [14] S. Epstein, M. Burroughs, M. Small, *Cancer Res.* **1963**. 23, 35-44.
- [15] C.E. Edmiston, M. Goheen, G.W. Maloney, W.L. Mills. *Environ. Res.* **1985**. 36, 338-350.
- [16] J. Venkateswara Rao, S.K. Arepalli, V.G. Gunda, J. Bharat Kumar. *Pestic. Biochem. Phys.* **2008**. 91, 75-80.
- [17] M.R. Djebbar and H. Djebbar. *Revue des sciences et technologie, Synthèse*, (Végérol Eds), Publication de l'Université de Annaba, **2000**, 103.
- [18] M.M.A. Bradford. *Anal. Biochem.* **1976**. 72, 248-254.
- [19] F. Regoli and G. Principato. *Aquat. Toxicol.* **1995**. 31, 143-164.
- [20] Wechbeker, J.G.Cory. *Cancer let.* **1988**. 40, 257-264.
- [21] R. Rouabhi, H. Berrebbah, M.R. Djebbar. *Afr. J. Biotechnol.* **2006**. 5 (1), 45-48.
- [22] I. Sbartai, H. Berrebbah, R. Rouabhi, H. Sbartai, S. Guy, and M.R. Djebbar *Am-Euras. J. Toxicol. Sci.* **2009**. 1, 13-18.
- [23] D. Mountassif, M. Kabine, R. Manar, N. Bourhim, Z. Zaroual, N. Latruffe, El M.S. Kebbaj. *Ecol. Ind.* **2007**. 7, 882-894.
- [24] H. Benbouzid, H. Berrebbah, M.R. Djebbar. *Adv. Environ. Biol.* **2015**. 9(3), 281-285.
- [25] S. Ribeiro, J.P. Sousa, A.J.A. Nogueira, M.V.M. Soares, M.V.M. *Ecotoxol. Environ. Safe.* **2001**.49, 131-138.
- [26] P.S. Bhavan, P. Geraldine.. *Pest Biochem. Physiol.* **2001**. 70, 27-41.
- [27] R. Mittler, S. Vanderawera, M. Gollery, F. Van Breusegem. *Trends Plant Sci.* **2004**. 9, 490-498.
- [28] C. Foyer, G. Noctor. *Plant Cell. Environ.* **2005**. 28, 1056-1071.
- [29] T. Bashandy, J. Guillemintot, T. Vernoux, D. Caparros-Ruiz, K. Ljung, Y. Meyer, J.P. Reichheld. *Plant Cell.* **2010**. 22, 376-391.