

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

BADJI MOKHTAR- ANNABA UNIVERSITY
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

FACULTÉ DES SCIENCES

Département de Biologie

Année: 2011/2012

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTEUR**

**Etude des effets toxiques d'un fongicide (Amistar Xtra) et d'un
herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement
de *Paramecium tetraurelia*.**

Option :

BIOLOGIE ANIMALE (Toxicologie cellulaire)

Par **AZZOUZ Zoubir**

Devant le jury :

PRÉSIDENT	: DJEBAR M.R.	Prof.	Université d'Annaba.
RAPPORTEUR	: BERREBBAH H.	Prof.	Université d'Annaba.
EXAMINATEURS	: SOUIKI L.	M.C.A.	Université de Guelma.
	ROUABHI R.	M.C.A.	Université de Tébessa.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du *Laboratoire de Toxicologie Cellulaire* à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba.

Je tiens à remercier le Professeur *DJEBAR M.R.* (Directeur du L.T.C.) de m'avoir accueilli au sein de la grande famille du laboratoire et d'avoir accepté de présider le jury d'examen. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance.

Un grand remerciement au Professeur *BERREBAH H.* d'avoir accepté d'encadrer cette thèse, de m'avoir accompagné jusqu'au bout et pour m'avoir donné les moyens de mener ce travail. Je serai toujours reconnaissant pour la confiance qu'elle m'a donnée toute cette période du travail.

Merci à *Lynda SOUIKI* et *Rachid ROUABHI*, Maîtres de conférence à l'Université de Guelma et de Tébessa respectivement, d'avoir accepté d'examiner mon travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes plus vives estimés.

Un remerciement spécial à ma famille et plus particulièrement à ma femme qui a fait tout pour que je travaille en calme, en douceur et en sérénité.

Je remercie également tous ceux qui ont permis la réalisation, de près ou de loin, de ce travail.

Mes remerciements vont pareillement à toute l'équipe du *Laboratoire de Toxicologie Cellulaire*.

A la mémoire de mon très cher Père.

A ses espoirs je suis et serai toujours fidèle.

«Que Dieu Lui accorde sa grâce et sa miséricorde»

Sommaire

<i>Liste des tableaux</i>	IV
<i>Liste des figures</i>	V
<i>Liste des abréviations</i>	VII
Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	5
1. <i>L'écosystème aquatique: dynamique et équilibre</i>	5
2. <i>Perturbation des écosystèmes aquatiques : pollution par les pesticides</i>	7
* <i>Pollution aquatique par les pesticides</i>	7
* <i>Classification des pesticides selon leur mode d'action</i>	8
* <i>Transformations et dégradation des pesticides</i>	9
3. <i>Généralités sur les herbicides et les fongicides</i>	12
3.1. <i>les herbicides</i>	12
3.2. <i>les fongicides</i>	13
4. <i>Stress oxydant</i>	15
5. <i>Les bioindicateurs</i>	17
6. <i>Les protistes ciliés</i>	18
7. <i>La paramécie : morphologie et biologie</i>	20
7.1. <i>Le cortex</i>	21
7.2. <i>Les noyaux</i>	24
7.3. <i>Reproduction</i>	25
Partie II : Matériel et Méthodes	34
1. <i>Paramecium tetraurelia</i>	34
2. Matériel chimiques	36
2.1. <i>Amistar Xtra</i>	36
2.2. <i>Glyphosate</i>	38
3. Etude de la croissance	40
3.1. <i>Culture de Paramecium tetraurelia</i>	40
3.2. <i>Suivi de la croissance</i>	40
3.3. <i>Impact du milieu de culture sur la croissance de P. tetraurelia</i>	41
3.4. <i>Effets de la température et du pH sur la croissance</i>	42
3.5. <i>Traitement par les pesticides</i>	43
4. Etude comportementale	43
4.1. <i>Test d'évitement</i>	43
4.2. <i>Suivi des trajectoires</i>	44
4.3. <i>Vitesse de déplacement</i>	44

5. Effets sur la respiration.....	45
* <i>Description de l'appareil utilisé.....</i>	45
* <i>Principe.....</i>	46
* <i>Protocole.....</i>	47
6. Dosage des paramètres biochimiques.....	48
6.1. <i>Dosage du glutathion (GSH).....</i>	48
6.2. <i>Mesure de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST).....</i>	50
6.3. <i>Mesure de l'activité catalase.....</i>	52
6.4. <i>Dosage du malonyldialdéhyde (MDA).....</i>	53
7. Analyses statistiques.....	54
Partie III : Résultats.....	55
Chapitre I : Etude de la croissance et la respiration de <i>P. tetraurelia</i>.....	55
1. <i>Etude de la croissance.....</i>	55
1.1. <i>Impact de composition du milieu de culture sur la croissance.....</i>	55
1.2. <i>Impact de la concentration du milieu de culture sur la croissance.....</i>	56
1.3. <i>Les variations de la température.....</i>	59
1.4. <i>Les variations du pH.....</i>	61
1.5. <i>Etablissement d'un modèle de croissance de <i>P. tetraurelia</i>.....</i>	63
2. <i>Discussion.....</i>	65
Chapitre II : Impact d'amistar xtra et du glyphosate sur la croissance et la respiration de <i>P. tetraurelia</i>.....	67
1. <i>Effets inhibiteurs d'Amistar Xtra et du Glyphosate sur la croissance.....</i>	67
2. <i>Impact d'Amistar Xtra et du Glyphosate sur la respiration.....</i>	74
3. <i>Discussion.....</i>	75
Chapitre III : Les malformations.....	83
1. <i>Modifications morphologiques et structurels.....</i>	84
1.1. <i>Taux de malformations.....</i>	84
1.2. <i>Malformations structurelles.....</i>	84
1.3. <i>Atteintes membranaires et éclatement cellulaire.....</i>	84
2. <i>Discussion.....</i>	91
Chapitre IV : Impact sur le comportement de la paramécie.....	93
1. <i>Comportement d'évitement.....</i>	93
2. <i>Impact sur la vitesse de déplacement des paramécies.....</i>	97
3. <i>Impact des pesticides sur les trajectoires des paramécies.....</i>	98
4. <i>Discussion.....</i>	100
Chapitre V : Mesure des biomarqueurs du stress oxydant.....	104
1. <i>Evolution du taux du glutathion (GSH).....</i>	104
2. <i>Mesure de l'activité glutathion-S-Transférase (GST).....</i>	106

3. <i>Evolution de l'activité Catalase</i>	108
4. <i>Evolution du taux du malondialdéhyde (MDA)</i>	110
5. <i>Discussion</i>	112
Conclusion générale _____	117
Résumés _____	120
Bibliographie _____	123

Liste des tableaux

	Page	
Tableau 1 :	Propriétés physicochimiques et indication générales d'Amistar Xtra	36
Tableau 2 :	Caractéristiques physico-chimiques du Glyphosate	39
Tableau 3 :	Différentes combinaisons des ingrédients composant le milieu de culture	42
Tableau 4 :	Croissance de <i>P. tetraurelia</i> en fonction de la composition du milieu de culture	56
Tableau 5 :	Comparaisons entre les effets d'Amistar Xtra sur la respiration des paramécies	74
Tableau 6 :	Comparaisons entre les effets du Glyphosate sur la respiration des paramécies	75
Tableau 7 :	Comparaisons entre les effets d'Amistar Xtra sur la teneur en Glutathion	106
Tableau 8 :	Comparaisons entre les effets du Glyphosate sur la teneur en Glutathion	106
Tableau 9 :	Comparaisons entre les effets d'amistar xtra sur l'activité de la GST	108
Tableau 10 :	Comparaisons entre les effets du glyphosate sur l'activité de la GST	108
Tableau 11 :	Comparaisons entre les effets d'Amistar Xtra sur l'activité catalase	110
Tableau 12 :	Comparaisons entre les effets du Glyphosate sur l'activité catalase	110
Tableau 13 :	Comparaisons entre les effets du glyphosate sur le taux du MDA	112

Liste des figures

	Page
Figure 1: Origines du stress oxydatif et ses conséquences	16
Figure 2: Morphologie générale d'un spécimen de <i>Paramecium</i> du groupe <i>aurelia</i>	21
Figure 3: Paramécie colorée à l'argent. Surface ventrale montrant, en flèche, le modèle des cinéties autour de la bouche	22
Figure 4: Représentation simplifiée du cortex de la paramécie	23
Figure 5: Schéma d'une coupe longitudinale d'un cil et d'un cinétosome	23
Figure 6: Coupe longitudinale d'un cil, deux cils apparaissent en coupe transversale	23
Figure 7: Localisation du trichocyste dans une partie du cortex	24
Figure 8: Mécanisme de la conjugaison chez une paramécie du groupe <i>aurelia</i>	28
Figure 9: Morphologie générale d'un spécimen du complexe <i>P. aurelia</i>	35
Figure 10: Structures chimiques des deux matières actives d'Amistar Xtra	37
Figure 11: Structure chimique du Glyphosate	38
Figure 12: Lame de comptage pour les cellules de paramécies	41
Figure 13: Représentation schématique de la lame-test utilisée pour le test d'évitement	44
Figure 14: Photo prise par le logiciel "Kinovea" montrant la mesure de la distance	45
Figure 15: Oxygraphe à électrode d'oxygène «Hansatech Instruments»	46
Figure 16: Chambre d'oxygraphie ajustable «Hansatech Instruments»	47
Figure 17: Principe de l'électrode de Clark (Hansatech Electrode)	47
Figure 18: Formule chimique du Glutathion	49
Figure 19: Réaction d'Ellman entre le glutathion et le DTNB	49
Figure 20: Conjugaison du glutathion (GSH) avec le CDNB	51
Figure 21: Principe du dosage et réaction du MDA avec l'Acide thiobarbiturique	53
Figure 22: Croissance de <i>P. tetraurelia</i> en fonction de la densité du milieu de culture	57
Figure 23: Corrélations entre la croissance et la concentration du milieu de culture pour chaque stade du cycle développement	58
Figure 24: Effets de la température sur la croissance de <i>Paramecium tetraurelia</i>	59
Figure 25: Corrélations entre la croissance et la température pour chaque stade du cycle de développement	60
Figure 26: Effets des variations du pH sur la croissance de <i>Paramecium tetraurelia</i>	61
Figure 27: Corrélations entre la croissance et les variations du pH pour chaque stade du cycle de développement	62
Figure 28: Modèle de courbe de croissance de <i>P. tetraurelia</i> avec les différentes phases	63
Figure 29: Divisions binaires de <i>P. tetraurelia</i> durant la phase exponentielle de croissance	64
Figure 30: Reproduction sexuelle (conjugaison) de <i>Paramecium tetraurelia</i> pendant la phase stationnaire de croissance	64
Figure 31: Effets inhibiteurs d'amistar Xtra sur la croissance de <i>P. tetraurelia</i>	68
Figure 32: Effets du glyphosate sur la croissance de <i>P. tetraurelia</i>	69
Figure 33: Détermination des concentrations inhibitrices moyennes (CI ₅₀) pour la croissance	70
Figure 34: Pourcentage de réponse de <i>P. tetraurelia</i> par concentration d'Amistar Xtra et du Glyphosate	71
Figure 35: Effets d'Amistar Xtra sur le temps, le nombre et la vitesse de génération	72
Figure 36: Effets du Glyphosate sur le temps, le nombre et la vitesse de génération	73
Figure 37: Effets inhibiteurs d'amistar xtra sur l'intensité respiratoire de <i>P. tetraurelia</i>	76
Figure 38: Effets inhibiteurs du glyphosate sur l'intensité respiratoire de <i>P. tetraurelia</i> .	77
Figure 39: Détermination des concentrations inhibitrices moyennes (CI ₅₀) pour la respiration	78

Figure 40:	Représentation de la chaîne respiratoire de <i>Podospora anserina</i>	82
Figure 41:	Morphologie normale d'une cellule de <i>Paramecium tetraurelia</i>	83
Figure 42:	Taux de malformations induites par Amistar Xtra et par le Glyphosate	85
Figure 43:	Anomalies morphologiques induites par Amistar xtra et le Glyphosate	86
Figure 44:	Formation des taches claires centrales après traitement par le Glyphosate	87
Figure 45:	Atteintes membranaires après traitement par le Glyphosate	88
Figure 46:	Formation de vésicules et de bourgeonnement au niveau de la membrane cellulaire	89
Figure 47:	Dissolution complète et apoptose des cellules de <i>P. tetraurelia</i>	90
Figure 48:	Anomalies lors des divisions cellulaires	90
Figure 49:	Pourcentages d'évitement enregistrés après 15 minutes d'exposition aux différentes concentrations d'Amistar Xtra et de Glyphosate	94
Figure 50:	Pourcentages d'évitement enregistrés toutes les 3 minutes pour chaque concentration d'Amistar Xtra	95
Figure 51:	Pourcentages d'évitement enregistrés toutes les 3 minutes pour chaque concentration du Glyphosate	96
Figure 52:	Vitesse de déplacement des paramécies en présence d'Amistar Xtra et de Glyphosate	97
Figure 53:	Trajectoires des paramécies observées en absence et en présence d'obstacles	98
Figure 54:	Trajectoires des paramécies induites par les fortes concentrations d'Amistar Xtra et de Glyphosate	99
Figure 55:	Teneurs en GSH en fonction des concentrations d'Amistar Xtra et de Glyphosate	105
Figure 56:	Evolution de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes d'Amistar Xtra et de Glyphosate	107
Figure 57:	Evolution de l'activité catalase en fonction des concentrations d'Amistar Xtra et de Glyphosate	109
Figure 58:	Evolution du taux du MDA en fonction des concentrations croissantes d'Amistar Xtra et de Glyphosate	112

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ASS	Acide sulfosalicylique
CAT	Catalase
CDNB	1-Chloro,2,4-Dinitrobenzène
CE_{r50}	Median effective concentration on growth rate
CI₅₀	Concentration inhibitrice moyenne
CL₅₀	Concentration létale moyenne
DO	Densité optique
DTNB	Acide 5,5'Dithiodis-2-Nitrobenzoïque
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfure
GST	Glutathion S-transférase
HCl	Chlorure d'hydrogène (Acide chlorhydrique)
KCl	Chlorure de potassium
MDA	Malondialdéhyde
PUFA	Acides gras polyinsaturés (Polyunsaturated fatty acids)
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
TBA	Acide Thiobarbiturique
TBARS	Substances réagissant avec l'acide Thio-barbiturique
TCA	Acide Trichloracétique
TNB	Acide Thionitrobenzoïque
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane, (2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3-Propanediol)

INTRODUCTION GENERALE

L'écosystème aquatique se définit par l'ensemble constitué de l'eau et des espèces qui y vivent. L'état d'équilibre résulte de toutes les interactions entre les organismes vivants eux-mêmes d'une part, et entre les différentes espèces et leur milieu de vie d'autre part. Néanmoins, cet équilibre devient de plus en plus menacé par la pollution, due essentiellement à l'homme et ses activités ([Štirn, 1982](#) ; [Conseil de l'Europe, 1992](#) ; [OCDE, 2001](#) ; [Suty, 2010](#)).

La pollution aquatique est une dégradation des qualités naturelles de l'eau qui perturbe les conditions de vie de la flore et de la faune et compromet les utilisations de l'eau et l'équilibre du milieu aquatique ([FAO, 1994](#)). Elle constitue un problème majeur tant pour la population humaine que pour les organismes vivants. Le plus souvent, les effets néfastes sur les organismes aquatiques se traduisent par une surmortalité ou des modifications comportementales qui modifieront leurs capacités physiologiques, ce qui revient, au final, à une diminution sensible des effectifs jusqu'à la disparition complète de certaines espèces sensibles ([Harrison, 2001](#) ; [Sindermann, 2006](#)).

Parmi les polluants aquatiques, les produits chimiques représentent un danger sérieux pour les organismes vivants. Ainsi, les produits phytosanitaires constituent un cas particulier parmi ces produits chimiques. Ils sont largement et le plus librement utilisés en protection des cultures pour contrôler ou détruire les insectes, les champignons, les mauvaises herbes et d'autres parasites des cultures. Ces pratiques, mises en œuvre sans précautions particulières, peuvent présenter des risques pour l'environnement par la pollution des sols et des milieux aquatiques ([Jamet, 1994](#)). De plus, l'organisme pollué peut être consommé tout au long d'une chaîne alimentaire en amplifiant les dangers sur plusieurs échelles selon le rang du consommateur ([Smith et Williamson, 1986](#) ; [Marchand et Tissier, 2006](#)).

De nombreuses études ont utilisé différentes approches par l'utilisation intégrée de marqueurs biologiques. Ces approches écotoxicologiques sont spécifiques aux problèmes environnementaux pour l'estimation des risques engendrés par la pollution des écosystèmes à travers l'utilisation de mesures biochimiques, physiologiques et chimiques ([Langlois et Lapierre,](#)

1989 ; Pellerin-Massicotte et *al.*, 1989 ; Pelletier et Pellerin-Massicotte, 1990 ; Huggett et *al.*, 1992 ; Travis, 1993).

Ainsi, l'écotoxicologie peut se définir comme l'étude des effets toxiques des polluants dans l'environnement. Son objectif essentiel est d'évaluer les modalités par lesquelles les polluants sont introduits dans les écosystèmes depuis les milieux contaminés jusqu'aux communautés vivantes (Ramade, 1992). Elle comporte plusieurs niveaux d'investigation ; à celui de l'individu, elle en étudie les perturbations fonctionnelles (écophysiological) produites par l'exposition des êtres vivants aux polluants, ainsi que les conséquences qui en résultent pour les populations affectées (niveau démo écologique). La partie la plus spécifique de l'écotoxicologie se situe au niveau synécologique, c'est-à-dire au niveau des mosaïques des écosystèmes et de la biosphère (Ramade, 1992 ; Forbes et *al.*, 1997).

Les programmes de monitoring sont donc généralement utilisés pour mesurer la réponse et le rétablissement des communautés aquatiques suite à des perturbations anthropiques, protéger la biodiversité et améliorer la compréhension des relations entre les composantes physiques, chimiques et biologiques (Gardner, 2010). L'utilisation de bioindicateurs sensibles en écotoxicologie, permet ainsi d'estimer la qualité du milieu aquatique et d'évaluer toute pression exercée par une pollution sur la santé et la structure des organismes vivants avant que toute la population ou l'écosystème ne soient perturbés (Huggett et *al.*, 1992 ; Travis, 1993 ; Forbes et *al.*, 1997 ; Bocquené et Galgani, 2004). De ce fait, plusieurs espèces représentatives des écosystèmes aquatiques ont fait l'objet de normalisation pour l'évaluation de la toxicité. Selon Blaise (1989), la réponse des organismes vivants soumis à l'agression toxique constitue le point central des stratégies de dépistage.

En dépit de leurs dimensions microscopiques, les protozoaires jouent un rôle fondamental dans la nature vivante. Les êtres unicellulaires représentent un chaînon de base dans les chaînes alimentaires des eaux douces et marines. Leur valeur est toute aussi grande sur le plan de la recherche scientifique fondamentale car de nombreux problèmes biologiques sont plus faciles à étudier sur des cellules isolées plutôt que sur des organismes multicellulaires. Facile à obtenir et à cultiver, les protozoaires sont des cellules hautement organisées sur lesquelles on peut expérimenter aisément (Dragesco, 1980).

L'importance écologique des protozoaires aquatiques se situe dans la relation trophique reliant ces organismes avec les espèces qui composent les différents rangs des chaînes

trophiques (Fenchel, 1987 ; Porter et al., 1988). Parmi ces protozoaires, les ciliés constituent un groupe d'organismes modèle pour l'étude des interactions trophiques avec les groupes fonctionnels du zooplancton tels que les cladocères et les autres copépodes (Mazumder et al., 1990 ; Jürgen, 1994 ; Marty et al., 2002).

L'utilisation d'espèces du genre *Paramecium* comme modèle d'étude a été rapportée par plusieurs auteurs ; en génétique, en raison de son génome bien connu, les chercheurs ont utilisé *P. tetraurelia* pour l'analyse génétique, l'expression des gènes et les mutations (Houten et al., 1977 ; Brygoo, 1977 ; Mayer et al., 1998 ; Haynes et al., 2000 ; Vayssié et al., 2000). En physiologie, les paramécies sont utilisées pour étudier l'organisation cellulaire, le rôle des organites et les mécanismes des différentes fonctions physiologiques. (Glaser, 1925 ; Majima et al., 1986 ; Preston et Usherwood, 1988 ; Stelly et al., 1991 ; Hemmersbach et al., 2001 ; Momayezi et al., 2004) ; en écotoxicologie, les espèces du genre *Paramecium* ont été utilisées pour étudier la qualité et la santé de l'environnement et les effets toxiques des activités industrielles, des produits chimiques agricoles et domestiques (Madoni, 2000 ; Miyoshi et al., 2003 ; Takahashi et al., 2005 ; Venkateswara et al., 2006 ; Rouabhi et al., 2006, 2009 ; Mortuza et al., 2009, Sbartaï et al, 2009 ; 2010 ; Amanchi, 2010 ; Azzouz et al., 2011).

Pour toutes ces raisons, notre choix s'est porté sur *Paramecium tetraurelia* comme bioindicateur. Ce choix est justifié par la disponibilité de l'espèce, sa taille relativement grande par rapport aux autres protozoaires et sa croissance rapide dans les infusions de végétaux. Ces conditions de vie simples rendant sa culture et son étude plus aisée.

Le présent travail a donc pour objectif d'étudier les effets de deux pesticides (Amistar Xtra et Glyphosate) sur la biologie et le comportement de la paramécie. Les deux produits phytosanitaires ont été choisis principalement en raison de leur commercialisation et leur utilisation intense et souvent incontrôlée dans les régions d'Annaba et d'El Tarf (Nord Est Algérien) et du manque de données sur leur biotransformation ainsi que leur toxicité.

Le travail s'articule autour de trois grandes parties :

- ✚ La première partie est une synthèse bibliographique présentant, en générale et de manière la plus large possible, notre thème.
- ✚ La deuxième partie concerne le matériel et les méthodes d'études utilisés pour la réalisation de ce travail.

✚ La troisième partie englobe les différents résultats et les discussions que nous avons partagées en cinq chapitres distincts :

- ✓ Le premier chapitre est consacré à l'étude de la croissance de *P. tetraurelia* sous certaines conditions physicochimiques contrôlées telles que la température, le pH, la concentration en nutriments et la composition du milieu de culture.
- ✓ Le deuxième chapitre porte sur les effets d'Amistar Xtra et du Glyphosate sur la croissance et la respiration de *P. tetraurelia*.
- ✓ Le troisième chapitre porte sur l'étude des malformations et des atteintes structurelles éventuelles que les deux pesticides pourraient provoquer chez les cellules traitées.
- ✓ Le quatrième chapitre s'intéresse aux réflexes comportementaux des paramécies en présence des deux molécules testées ; avec en l'occurrence le suivi du comportement d'évitement, la vitesse de déplacement et les effets sur les trajectoires de *P. tetraurelia*.
- ✓ Le dernier chapitre est consacré à l'évaluation biochimique de certains antioxydants afin de caractériser les réponses moléculaires témoignant de la présence d'un stress oxydant.

Enfin, nous termineront ce travail par une conclusion générale et des perspectives à prendre en compte pour les recherches ultérieures.

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'écosystème aquatique : dynamique et équilibre

Les écosystèmes aquatiques sont des systèmes complexes résultant d'un équilibre entre un milieu naturel et les êtres vivants qui y habitent. Ils abritent en effet en leur sein un nombre d'espèces vivantes très diverses qui interagissent entre elles de façons variées en établissant des relations de cohabitation, de compétition, de prédation ou de parasitisme. Un écosystème est également caractérisé par les échanges cycliques de matière qui s'établissent entre le biotope et la biocénose et qui constituent des cycles biogéochimiques dont les plus importants concernent l'eau, le carbone, l'oxygène, l'azote, le soufre et le phosphore. ([Štirn, 1982](#) ; [Ricklefs et Miller, 2005](#) ; [Beisel et Lévêque, 2010](#))

Pour croître, les êtres vivants ont besoin de l'énergie et des aliments qui leur sont fournis par le milieu extérieur constitué par l'eau, les sols et l'atmosphère. La composition des populations dépend étroitement des conditions de vie qui leur sont offertes, à savoir du courant, de la température, de l'oxygénation et de la composition chimique de l'eau, de la nature des fonds, du relief et de la végétation du bassin versant, des conditions atmosphériques.... Inversement, la composition chimique de l'eau est constamment modifiée par les espèces vivantes présentes dans le milieu surtout en ce qui concerne les teneurs en matières minérales et en gaz dissous ; ainsi, les espèces biologiques qui vivent en interdépendance étroite entre elles et avec le milieu physique environnant. ([Bodenheimer, 1955](#) ; [Piégay et al., 2003](#) ; [Ricklefs et Miller 2005](#)).

Le concept d'écosystème aquatique recouvre l'ensemble formé par le biotope (le milieu physique, et les conditions de vie) et la biocénose (ou l'ensemble des êtres vivants qui s'y développent). D'une manière schématique, un écosystème aquatique peut être divisé en trois compartiments biologiques ([Otto, 1998](#) ; [Ricklefs et Miller, 2005](#)):

Les **producteurs** : ce sont essentiellement tous les végétaux qui utilisent tous la lumière solaire comme source d'énergie pour fabriquer, par photosynthèse, les matières organiques

dont ils ont besoin pour croître ; ce faisant, les plantes aquatiques consomment le gaz carbonique dissous dans l'eau, les nutriments dissous que sont surtout l'azote, le phosphore et la silice, ainsi que divers autres constituants minéraux, et elles rejettent de l'oxygène ; les principaux producteurs sont les algues microscopiques du phytoplancton ;

Les **consommateurs** : ce sont soit des herbivores stricts, comme certaines espèces du zooplancton qui se nourrissent de phytoplancton ou certaines espèces d'invertébrés et de poissons qui se nourrissent d'algues et d'autres végétaux fixés sur le fond, soit des espèces plus omnivores consommatrices de végétaux, de zooplancton et autres invertébrés, soit enfin des espèces strictement carnivores, comme certains gros poissons qui se nourrissent des plus petits, ou encore certains oiseaux et petits mammifères ; ces animaux respirent en consommant l'oxygène produit par les plantes et en rejetant du gaz carbonique ;

Les **décomposeurs** : ce sont les micro-organismes, comme les bactéries aérobies ou les champignons, qui se repaissent de toute la matière organique morte et biodégradable présente dans le milieu aquatique, qu'elle soit produite par les autres organismes (telles les sécrétions animales) ou issue de leur décomposition, ou encore qu'elle provienne d'eaux de ruissellement, d'eaux infiltrées dans les sols ou d'eaux usées rejetées par les hommes ; pour dégrader ces matières organiques, les décomposeurs utilisent l'oxygène produit par les plantes.

Le rôle des décomposeurs, bactéries et champignons, est prépondérant car en décomposant les matières organiques, ils participent à l'épuration des écosystèmes aquatiques. En outre, en transformant les matières organiques complexes en substances minérales simples dont les producteurs, les végétaux, ont besoin. Les décomposeurs referment en quelque sorte la boucle qui, des producteurs, mène aux consommateurs puis aux décomposeurs, une boucle que l'on appelle la chaîne alimentaire, ou chaîne trophique.

Il existe une très grande variété d'écosystèmes aquatiques continentaux que l'on peut regrouper en trois grands types suivant que leurs eaux soient stagnantes, courantes ou souterraines (Suty, 2010).

Les eaux stagnantes sont les lacs, grandes étendues d'eau libre à l'intérieur des terres, les marais peu profonds et envahis par la végétation, les mares, les étangs et réservoirs créés de toute pièce par l'homme, ou encore les zones humides, les marécages, et les plaines inondables.

Les milieux aux eaux courantes sont les torrents, les ruisseaux, les rivières et les fleuves dont les eaux sont manifestement en mouvement le long des pentes.

Quant aux milieux aquatiques souterrains, ce sont le plus souvent des nappes d'eau imbibant le sous-sol. Ce sont aussi parfois de véritables cours d'eau disparaissant dans des galeries souterraines.

2. Perturbation des écosystèmes aquatiques : pollution par les pesticides

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

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

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

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

Plusieurs facteurs déterminent l'importance de la migration des pesticides vers les eaux de surface. Les principaux facteurs sont les quantités utilisées, l'importance et l'intensité des événements de pluie qui surviennent après l'application des pesticides aux champs et le délai entre l'application et la pluie (Forbes et Forbes, 1997 ; Ramade, 2007).

❖ Classification des pesticides selon leur mode d'action (Calvet, 2005)

* **Les herbicides** : destinés à limiter l'installation d'espèces végétales adventices. Peuvent être sélectifs ou totaux. Les familles de substances les plus importantes sont les acides aminophosphoriques (glyphosate), les urées (diuron, isoproturon), les triazines (atrazine, simazine).

* **Les insecticides** : destinés à tuer les insectes ou à empêcher le déroulement normal de leur cycle de vie. Les familles les plus rencontrées sont les organophosphorés (malathion), les carbamates insecticides (carbaxyl), les pyréthrinoïdes (deltaméthrine) et les organochlorés (endosulfan).

* **Les fongicides** : destinés à éliminer les champignons. On distingue trois modes d'action différents. Les multisites qui s'attaquent aux spores des champignons. Ils sont donc préventifs. Les unisites qui perturbent la perméabilité membranaire des champignons. Les antimétabolites qui bloquent la division cellulaire.

* **Les molluscicides et autres pesticides** : les molluscicides sont destinés à éliminer les escargots et les limaces. Ils sont épanchés essentiellement sous forme de granulés. Les rotenticides agissent contre les rongeurs. Les anticoagulants représentent 85% du marché. Quelques produits de gazage sont encore utilisés. Les nématicides agissent sur les nématodes.

Les principaux pesticides utilisés actuellement appartiennent à quelques grandes familles chimiques (Charbonneau, 1993):

- Les organochlorés ;
- Les organophosphorés ;
- Les pyréthrinoïdes ;
- Les carbamates, très toxiques, sont utilisés comme insecticides et fongicide
- Les phytosanitaires, qui regroupent un très grand nombre de produits de la famille des fongicides. Ces produits réagissant avec le sol lors de leur migration (piégeage, relargage, spéciation), l'évaluation de leur devenir et de leur impact se révèle difficile.

❖ Transformations et dégradation des pesticides

La molécule de pesticide peut subir un certain nombre de processus de transformation engendrant de nouvelles substances. La succession des différentes transformations peut aller jusqu'à une dégradation totale du produit (ou minéralisation). (Barriuso, 2004)

Les transformations abiotiques et biotiques des pesticides ont lieu simultanément dans l'environnement. Il est souvent supposé que les transformations biotiques contrôlent la dégradation des pesticides dans l'environnement, car la grande diversité métabolique des microorganismes du sol, leur capacité d'adaptation et de mutation leur permettent de se développer dans des conditions très variées et de dégrader pratiquement toutes les molécules (Calvet et Charnay, 2002) ; or, dans certains cas, et malgré la difficulté de dissocier *in situ* ces deux types de transformation, la prépondérance des transformations abiotiques peut être démontrée. Ainsi, les pesticides peuvent être lessivés sous la zone racinaire et ont la possibilité d'atteindre au bout d'un certain temps les eaux souterraines. Les concentrations en nutriments, le taux de matière organique et le taux de gaz échangé décroît toujours avec la profondeur, ce qui engendre une baisse la population microbienne et avec elle de la probabilité d'occurrence de la plupart des transformations biotiques. Les transformations abiotiques contrôlent alors probablement la dégradation de nombreux pesticides à des profondeurs suffisantes. Les milieux à fortes concentrations de matières toxiques, inhibant les populations microbiennes, les zones arides et très fortement irriguées seraient également des milieux favorables aux transformations abiotiques (Wolfe, 1990 ; Barriuso et al., 1996).

➤ Types de réactions

- **Réactions abiotiques**

De nombreuses transformations abiotiques ont lieu dans des phases homogènes, particulièrement dans la phase liquide. D'autres transformations se déroulent à l'interface entre les phases ; elles comprennent celles catalysées de façon hétérogène et celles qui ont lieu en solution sous l'influence des champs électriques des surfaces chargées. Dans l'eau naturelle et les sédiments, parmi les nombreuses transformations abiotiques qui peuvent avoir lieu les réactions d'hydrolyse et redox sont les plus importantes. Le terme d'hydrolyse se réfère au

clivage d'un pont de la molécule de pesticide et la formation d'un nouveau pont avec l'atome O de la molécule d'eau. Cette réaction se classe en trois catégories :

- ✓ selon l'intervention d'un catalyseur ou non, au niveau des réactions redox, les oxydations abiotiques ont généralement lieu dans les eaux de surface et les réductions dans les eaux anaérobiques et au fond des sédiments.
- ✓ Les conditions environnementales majeures qui affectent les transformations abiotiques sont le pH, la température, le taux de particules organiques dissoutes et en suspension, la présence d'ions métalliques et l'état redox.
- ✓ Dans la phase liquide des sols, les réactions abiotiques majoritaires sont généralement les mêmes que précédemment. A l'interface solide-liquide (particulièrement sur les argiles et la matière organique), les pesticides ont une probabilité à subir des transformations abiotiques beaucoup plus fortes que dans la solution présente dans les pores (Wolfe et al., 1990). Les paramètres influençant sont notamment la température, le taux d'humidité, les propriétés de la surface, la présence de cations échangeables.

La connaissance des transformations abiotiques dans la dégradation des pesticides dans l'eau et les sols est essentielle dans le développement des modèles prédictifs (Wolfe et al., 1990).

* **Photolyse**

La photolyse (ou photodégradation) est le processus dans lequel la lumière ultraviolette ou visible cause une transformation des pesticides créant des substances avec une toxicité différente (généralement inférieures). Les taux de photolyse et les produits varient considérablement dépendant du compartiment exposé à lumière solaire. Dans certains systèmes, la photolyse peut être la voie majoritaire de dégradation, mais dans d'autres, elle peut être insignifiante. (Zamy, 2004)

La photolyse des pesticides dans le compartiment eau a reçu le plus d'attention (Wolfe et al., 1990). Elle se déroule selon deux processus qualifiés de direct ou d'indirect. La photolyse directe requiert l'absorption de la lumière solaire par le pesticide, qui est alors transformé. La photolyse indirecte commence par l'absorption de la lumière par des substances autres que le pesticide. Cette absorption initie une série de réactions qui finalement amène une transformation du pesticide. Dans ce cas, l'oxydation est le processus photolytique

prédominant et un certain nombre d'oxydants ont été identifiés (notamment oxygène singulet). Bien que les produits des 2 types des réactions soient souvent les mêmes, les cinétiques sont généralement différentes et des deux, seulement la photolyse directe est modélisée avec succès dans les eaux.

Au niveau du sol, la photolyse des pesticides est partiellement comprise et peu d'études sont disponibles qui peuvent fournir une base pour les taux de photolyse estimés (Wolfe et al., 1990). Au contraire des solutions, les sols sont en effet hautement hétérogènes et non mélangés. L'illumination de celui-ci produit ainsi un léger champ difficile à définir avec précision. Au niveau des processus de photolyse, la photolyse directe dans les eaux est seulement modélisée avec succès (Wolfe et al., 1990).

- **Transformations biotiques**

Parmi les processus biologiques au sein des écosystèmes terrestres et aquatiques, le métabolisme microbien est, dans beaucoup de cas, le mécanisme clef dans la transformation ou la dégradation des pesticides (Bollag et Liu, 1990 ; Barriuso et al., 1996 ; Calvet et Charnay, 2002). En effet, la diversité et la non unicité des activités métaboliques des micro-organismes les rendent capables de se développer dans les niches écologiques inhabitables pour d'autres organismes. Cinq processus sont impliqués dans la transformation microbienne des pesticides :

- ✓ La biodégradation (ou par métabolisme) où le pesticide peut servir partiellement ou totalement de substrat pour la croissance du micro-organisme ;
- ✓ Le co-métabolisme où le pesticide est transformé par des réactions métaboliques mais ne sert pas comme source d'énergie pour le micro-organisme ;
- ✓ La polymérisation ou conjugaison, où des molécules de pesticide sont liées ensemble avec d'autres pesticides, ou avec des composés existant naturellement ;
- ✓ L'accumulation, où le pesticide est incorporé dans le micro-organisme ;
- ✓ Les effets secondaires de l'activité microbienne, où le pesticide est transformé à cause des changements de pH, de conditions redox, de produits réactifs, etc., engendrés par des micro-organismes dans l'environnement aquatique ou terrestre.

Les principales réactions biochimiques impliquées dans le métabolisme du pesticide chez les micro-organismes sont des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse et de synthèse.

3. Généralités sur les herbicides et les fongicides

Les caractéristiques des produits phytosanitaires portent sur la désignation de la matière active, le nom du produit commercial, le fabricant et éventuellement du distributeur local, la teneur de la (ou des) matières actives dans le produit, le type de formulation le mode d'emploi, la dose d'emploi et la culture cible. Le teneur en matières actives s'exprime en g/l pour les formulations liquides et en pourcentage (%) pour les formulations solides. (Lamarque, 1990)

3.1. Les herbicides

Un produit herbicide est défini comme une substance active ou une préparation ayant la propriété de tuer les végétaux. Le terme dés herbant est le synonyme d'herbicide. En protection des cultures, les herbicides sont employés pour lutter contre les adventices, ou mauvaises herbes, destinées à détruire ou à limiter la croissance des végétaux (Gauvrit, 1996).

❖ *Classification des herbicides :*

On distingue deux grands groupes d'herbicides: les herbicides sélectifs et les herbicides totaux (Union des Syndicats Agricoles Romande, 1966 ; Crafts, 1975).

➤ *Les Herbicides sélectifs :*

Employés dans les conditions normales, ils détruisent certains adventices en respectant la plante cultivée. Ils existent sous différentes formes : poudre, poudre soluble, poudre mouillable, granulés, liquide. On distingue : Les dés herbants sélectifs, les plus nombreux.

- Les débroussaillants et dés herbants totaux.
- Les défanants qui détruisent la partie aérienne des végétaux. Ils sont par exemple utilisés pour la récolte mécanique de la pomme de terre ou de la betterave.
- Les anti-germes, qui empêchent le démarrage de la végétation de, par exemple, les oignons ou pomme de terre destinés à l'alimentation.

➤ *Les herbicides totaux :*

Ce sont des produits qui détruisent la totalité des plantes, ils sont employés avec précaution dans les cours et les allées.

3.2. Les fongicides

Un fongicide est un produit phytosanitaire conçu spécifiquement pour tuer ou contenir la croissance des champignons parasites sur les végétaux ou des organismes vivants.

❖ *Classification des fongicides :*

Divers critères peuvent être choisis pour classer les fongicides. Certains classements mettent en avant les familles chimiques, d'autres les sites d'action métaboliques de ces composés, alors que d'autres vont privilégier la culture sur laquelle ils sont utilisés, etc. De ce fait, il existe dans la littérature de nombreuses classifications proposées pour ces substances actives.

➤ *Classification en fonction du site d'action*

En se basant sur leur comportement vis à vis de la plante, deux groupes principaux peuvent être distingués : les fongicides systémiques et les fongicides de contact ([Corbaz, 1990](#)).

✚ *Les fongicides de contact*

Un fongicide de contact lorsqu'il est appliqué à la surface de la plante forme une barrière protectrice qui est toxique pour la germination des spores ou pour le mycélium du champignon responsable de la maladie. Les composés chimiques ne pénètrent pas dans les tissus de la plante.

* *Familles de fongicides de contact* ([Lachuer, 2011](#))

○ *Composés inorganiques*

-Le **Soufre** : est l'un des premiers fongicides utilisés en agriculture et actuellement il est toujours utilisé de façon très large.

-Le **cuivre** : plus de 30 types de fongicides cuivrés sont maintenant disponibles.

○ *Fongicides organiques*

- Organométalliques
- Dithiocarbamates
- Trichlorométhylsulfénimides (Phtalimides)
- Dicarboximides

✚ Fongicides systémiques :

Trois types de fongicides systémiques :

Les fongicides systémiques sont ceux qui pénètrent et se déplacent dans la plante par les vaisseaux du xylème et du phloème. La plupart des nouveaux fongicides sont dans cette catégorie. Trois variations sont cependant à signaler :

- a) Les fongicides systémiques partiels ou locaux, appelés aussi fongicides pénétrants, entrent dans la plante, mais ne peuvent pas se déplacer très loin. La plupart sont limités à des mouvements translaminaires lorsqu'ils se déplacent de la face supérieure d'une feuille vers la face inférieure. Ils peuvent aussi se diffuser vers le bord des feuilles ;
- b) Les fongicides à systémie ascendante peuvent pénétrer dans la plante et se déplacer considérablement de façon ascendante dans les vaisseaux du xylème. S'ils sont appliqués au niveau des racines, ils se déplaceront vers le haut à travers toute la plante. S'ils sont appliqués sur le feuillage, ils se déplaceront vers les marges des feuilles ;
- c) Les fongicides à systémie descendante peuvent être appliqués sur les feuilles et ils descendront vers les racines. Cependant certaines molécules à systémie descendante, comme le metalaxyl ne se déplacent que légèrement vers les racines.

*** Familles de fongicides systémiques (Lachuer, 2011)**

- Organophosphates
- Ediphenphos
- Pyrazofos
- Benzimidiazoles
- Carboxanilides
- Phénylamides
- Triazoles
- Imidiazoles
- Morpholines

➤ **Classification en fonction des modes d'action sur les champignons :** (Lachuer, 2011)

L'effet d'un fongicide pourra être qualifié :

- De «**préventif**» lorsque son action se situe avant la pénétration du parasite dans les tissus de la plante.
- De «**curatif**» lorsqu'il intervient sur des filaments déjà bien installés dans les tissus avant l'apparition des premiers symptômes.
- D'«**éradicant**» lorsqu'il intervient sur des filaments déjà bien installés dans les tissus avec l'apparition des premiers signes de la maladie.

4. Le stress oxydant

Le métabolisme cellulaire normal produit en permanence des espèces oxygénées réactives (ERO). Par exemple, au cours de la respiration, chaque cellule réduit l'oxygène en eau. Parfois, une partie de cet oxygène échappe à la transformation complète et donne une forme d'oxygène très réactive : l'anion superoxyde (caractéristique des radicaux libres). D'autres radicaux libres sont générés en chaîne à partir des diverses réactions chimiques de notre organisme. Ces molécules, très agressives, sont normalement éliminées par des systèmes de défense enzymatiques ou biochimiques. En outre, il existe aussi des systèmes réparateurs chargés de corriger les effets toxiques des radicaux libres.

Les radicaux libres peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller altérer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules (Boveris *et al.*, 1972). De plus, l'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) engendre la transmission d'une cascade radicalaire, soit à l'intérieur d'une même molécule, soit à l'intérieur d'un même tissu en agissant d'une molécule à une autre. En absence d'équipement antioxydant tissulaire efficace pour stopper cet enchaînement radicalaire, le phénomène de dégradation connaît une progression rapide, qui, après interaction avec les autres systèmes tissulaires, devient très vite exponentielle. Cette transmission extrêmement rapide peut alors conduire au transfert de l'agression radicalaire sur plusieurs centimètres au sein d'un tissu en une fraction de seconde (Neuzil *et al.*, 1993).

Parfois, la production de ces molécules agressives, sous l'influence de diverses pathologies, ou de facteurs extérieurs comme la pollution, les radiations ionisantes, le stress, certaines

drogues ou le tabagisme, s'exacerbe et les systèmes naturels de défense ou de réparation sont débordés.

On assiste alors à une désorganisation des structures membranaires, à l'oxydation des lipoprotéines circulantes qui ne peuvent plus être épurées, à l'oxydation de protéines qui perdent alors leur fonction, à l'attaque et à la fragmentation de l'ADN (Fig. 1).

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

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Cette définition ne rend pas justice à la notion de stress qui est avant tout une réponse à une modification des conditions habituelles de vie cellulaire (Delattre *et al.*, 2005).

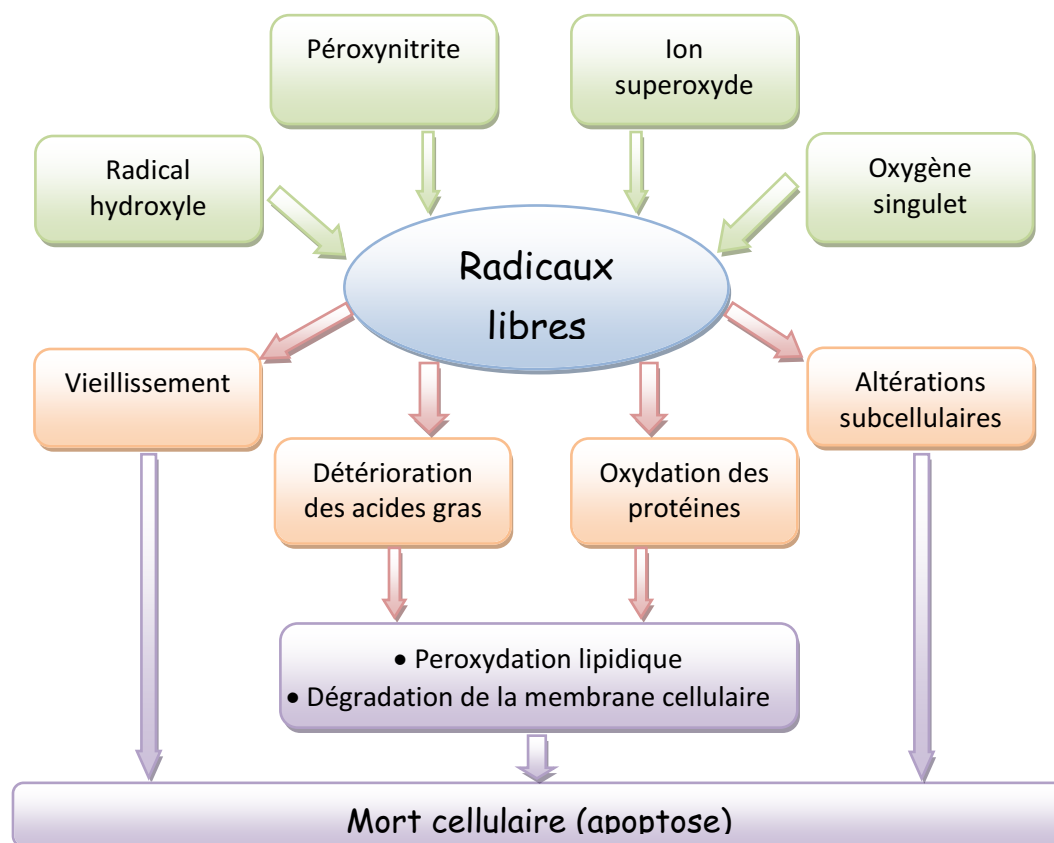


Figure 1 : Origines du stress oxydatif et ses conséquences

- **Défense antioxydante**

Lorsque des ERO commencent à s'accumuler dans la cellule, ils peuvent être neutralisés par des molécules de défense antioxydantes présentes dans la cellule comme le glutathion, les vitamines E et C, la bilirubine, l'acide lipoïque, et des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, les peroxyrédoxines... (Morel et Barouki, 1998; Delattre, 2005). Dans un premier temps, la cellule ne modifie pas ses propriétés biologiques. Si les ERO continuent à s'accumuler, une adaptation plus consistante de la cellule est nécessaire avec l'induction de gènes codant des enzymes anti oxydantes, des protéines chaperons, des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN et des protéines. On observe aussi une répression des systèmes susceptibles de libérer des ERO, notamment la chaîne respiratoire, les cytochromes P450 et la NADPH oxydase (Morel et Barouki, 1999 ; Barouki et Morel, 2001). Dans ces conditions, nous pouvons parler de stress dans la mesure où la cellule a adapté ses fonctions biologiques, notamment son expression génique, aux modifications de son environnement. Souvent, l'induction des enzymes anti-oxydantes est perçue comme le révélateur de l'existence d'un stress oxydant, même si ceci a été remis partiellement en cause dans des expériences de génomique récentes (Desaint et al., 2004). À un stade ultime, la cellule peut suivre la voie de l'apoptose ou de la sénescence. Selon cette définition, il est aisé de détecter un stress oxydant provoqué par une élévation aiguë des ERO. La situation est plus complexe lorsque l'on recherche un stress oxydant chronique au cours duquel, d'une part, les élévations des ERO sont atténuées par des boucles de régulation, et, d'autre part, les inductions des enzymes anti-oxydantes et réparatrices sont plus modestes, ces enzymes étant parfois elles-mêmes altérées par oxydation.

5. Les bioindicateurs

Les bioindicateurs sont des espèces animales ou végétales qui, en raison de leurs spécificités écologiques, jouent le rôle d'indicateurs précoces (organismes sentinelles) de modifications d'origine anthropique, biotiques ou abiotiques, de l'environnement (Burgeot, 1998).

Les bioindicateurs sont particulièrement utilisés en écotoxicologie pour la surveillance de l'environnement (monitoring). On distingue deux types : certaines espèces sont des bioindicateurs d'effets écologiques d'une catégorie de polluants. D'autres espèces sont des

bioindicateurs qui bioconcentrent les polluants, facilitant leur étude dans l'environnement. (OECD, 2002).

Les indications de la pollution peuvent être apportées par la disparition de certaines espèces plus ou moins sensibles ou, au contraire, par la survenue d'autres espèces dites résistantes. (Burgeot, 1998 ; OECD, 2002).

Parmi les autres indications fournies par les bioindicateurs, on peut parler des espèces indicatrices de contaminations diffuses ou chroniques. Il s'agit surtout d'espèces qui se révèlent de précieux auxiliaires pour mesurer ou suivre des phénomènes comme la bioaccumulation dans les chaînes alimentaires. Les organismes aquatiques filtreurs peuvent concentrer suffisamment un produit libéré à l'état de traces indécélables dans un milieu ou un rejet (Beek, 1999).

D'autres bioindicateurs peuvent servir à mesurer les pressions anthropiques sur un milieu. Certaines espèces, peuvent, par exemple, en être très affectées, d'autres au contraire, très favorisées. D'autres encore peuvent être précieuses pour le suivi de la mesure d'une pression de prédation, le suivi de la qualité des eaux, y compris la qualité microbiologique, l'efficacité d'un traitement nettoyant sur un sol ou une surface de travail en industrie agroalimentaire ou la qualité d'une stérilisation en milieu hospitalier, etc. Les indicateurs biologiques sont donc principalement un moyen de simplifier et de systématiser l'approche des caractéristiques d'un écosystème (Burgeot, 1998 ; Beek, 1999 ; OECD, 2002 ; Ricklefs et Miller, 2005).

6. Les protistes ciliés

Autrefois appelés infusoires, du fait de leur aptitude à se développer à partir de formes enkystées dans des infusions végétales, les ciliés représentent un groupe important et relativement homogène dont les cils sont implantés sur des lignes appelées cinétie.

Les ciliés possèdent deux noyaux. Le plus volumineux (macronucleus) possède plusieurs lots de $2n$ chromosomes et gère la vie végétative de la cellule. Le plus petit (micronucleus) possède $2n$ chromosomes et intervient dans la reproduction de la cellule. Les ciliés se nourrissent par phagocytose. On distingue une zone d'ingestion (cytopharynx) et une zone d'égestion (cytoprocte) (Dragesco et al., 1986).

La reproduction asexuée des ciliés se produit par étranglement transversal, alors que la reproduction sexuée est caractérisée par une conjugaison entre deux cellules, sans production de gamètes (Dragesco et al., 1986).

Les ciliés fréquentent surtout les lieux humides et sont le plus souvent carnivores et prédateurs, bactériophages, voire végétivores. Quelques-uns sont symbiotes, d'autres parasites. La classification des ciliés est assez complexe. On distingue généralement quatre lignées. (Dragesco et al., 1986).

- ✓ Les *prostomata* sont primitifs et ont une ciliature buccale peu différenciée. Ils ressemblent souvent à de petits tonneaux et peuvent être recouverts de plaques calcaires. Certains sont prédateurs (*Didinium*), d'autres commensaux (*Buetschelia* chez le cheval), symbiotes (*Entodinium* dans la panse des ruminants) ou parasites (*Balantidium coli*).
- ✓ Les *karyorelicta* sont aussi primitifs, marins pour la plupart.
- ✓ Les *polyhymenophora* possèdent un cytopharynx bordé d'une double rangée de cils et divers reliefs membranaires (membranelles). On en distingue deux classes. Les hétérotriches sont des ciliés d'eau douce et saumâtre (*Spirostomum*, *Stentor*). Les spirotriches ont souvent des cils agglutinés (cirres) sur lesquels ils " marchent " (*Stylonychia*).
- ✓ Les *hypostomata* sont caractérisés par la position ventrale de leur cytopharynx.

On distingue les nassophores capables d'ingérer des proies volumineuses (*Nassula elegans* dans les eaux chaudes), les chonotriches qui sécrètent une substance adhésive qui les fixe sur les crustacés dont ils sont commensaux (*Chilodocona* sur les crabes), les acinétiens ou *Suctorina*, fixés par un pédoncule et dotés de tentacules avec lesquels ils capturent leurs proies, les apostomes, surtout parasites des crustacés, les hyménostomes, les péniculiens dont l'espèce la plus connue est la paramécie, les pérित्रiches comme *Vorticella* et les astomes, privés de bouche, mais souvent pourvus d'organes de fixation (ventouses, crochets, épines, etc.). (Dragesco et al., 1986 ; André et Grassé, 1994).

- **Enkystement et conservation des Infusoires ciliés.**

Beaucoup d'espèces d'Infusoires possèdent la curieuse propriété de se conserver pendant plusieurs années à l'état de vie ralentie, enfermées dans une membrane résistante. Pendant la

mauvaise saison ou quand les conditions de nutrition deviennent défavorables, les cils disparaissent, la bouche s'oblitére et le corps s'entoure d'une membrane protectrice rappelant la chitine des Insectes. Ainsi enkysté, l'Infusoire peut rester à l'état de vie ralentir pendant plusieurs années à la double condition d'être au sec et d'être humecté de temps en temps. Si le vent l'entraîne quelque jour dans une eau lui offrant des conditions favorable, il se gonfle, fait éclater son kyste et reprend sa vie normale (Dragesco et al., 1986 ; André et Grassé, 1994).

7. La paramécie : morphologie et biologie

Selon Beale et Preer (2008), Une description complète de la morphologie de la paramécie est donnée par Wichterman (1985).

Les cellules de protistes appartenant au groupe *P. aurelia* sont exceptionnellement grandes (Fig. 2). Elles mesurent environ 150 µm de long et 50 µm de large. Elles varient considérablement en taille selon l'approvisionnement alimentaire et le stade du cycle de vie. Ce sont des organismes libres (non parasites), vivant dans les étangs d'eau douce, des ruisseaux et des rivières à travers le monde. La paramécie est couverte de milliers de cils, qui assurent la locomotion.

La paramécie possède un macronoyau, deux ou plusieurs micronoyaux et deux vacuoles contractiles qui se produisent sur la surface dorsale. Ces vacuoles se situent sur le premier et le dernier quart de l'organisme et vident leur contenu liquide à l'extérieur par l'intermédiaire des pores excrétoires. Sur le côté de la cellule notée "ventrale", il ya une rainure, ou l'œsophage, dans lequel la nourriture (bactéries, levures, algues, etc) est véhiculé par des cils spéciaux. Au bas de l'œsophage, la nourriture est concentrée dans des vacuoles alimentaires qui sont continuellement bourgeonnées et pénétrées dans le cytoplasme. Les résidus non digérés seront déchargés dans le milieu extérieur par un pore anal appelé cytopyge ou cytoprocte. Le cytopyge est ventrale et subterminal, et assez proche de l'extrémité postérieure du corps.

Près de la bouche il ya une structure qui apparaît au cours de la conjugaison et l'autogamie, appelé le cône paroral, nommé par Diller (1936). C'est une protubérance qui joue un rôle important dans le passage des noyaux d'un conjuguant à l'autre pendant la conjugaison.

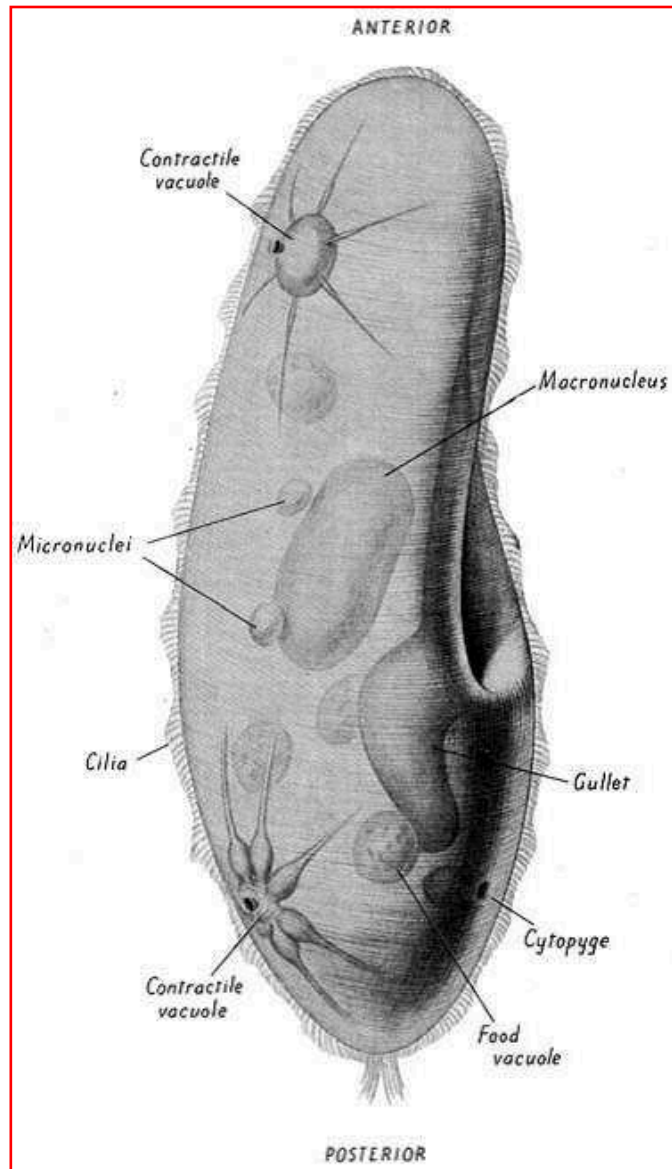


Figure 2 : Morphologie générale d'un spécimen de *Paramecium* du groupe *aurelia* (Jurand and Selman, 1969)

7.1. Le Cortex

Le cortex de la paramécie est composée d'unités corticales répétées longitudinalement le long de la surface plusieurs milliers de fois (Fig. 3). La rangée longitudinale des unités est appelé cinétie (Fig. 4). Le terme cinétosomes est utilisé généralement à la place du "corps basal" ou "granules basaux". Une seule unité corticale consiste à un cil (attaché à un cinétosome) (Fig. 5 et 6) ; à un système de fibres, notamment les fibres cinétodesmales (Fig. 7) et enfin un sac parasomal (Fig. 8).



Figure 3 : Paramécie colorée à l'argent. Surface ventrale montrant, en flèche, le modèle des cinéties autour de la bouche (Jurand and Selman 1969).

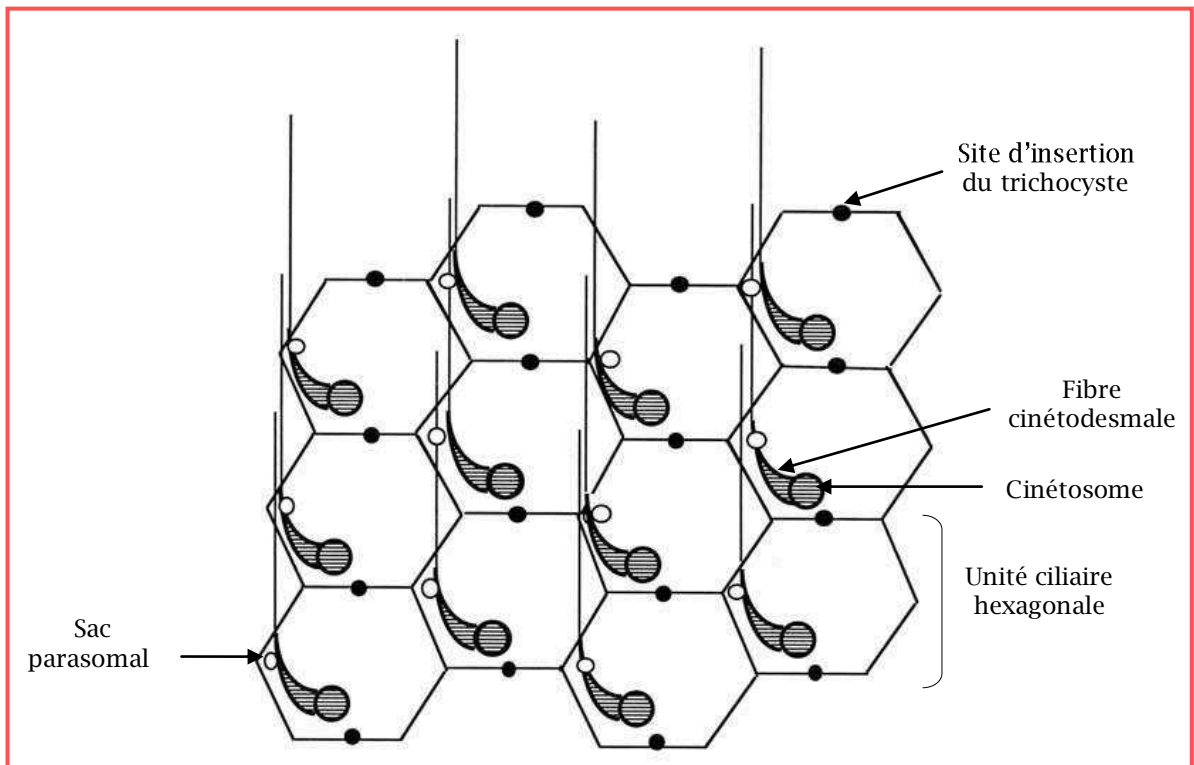


Figure 4 : Représentation simplifiée du cortex de la paramécie (Beale and Preer, 2008). Chaque colonne constitue une cinétie qui s'étend sur le long du corps de la cellule. (Ici il y a des colonnes à trois unités).

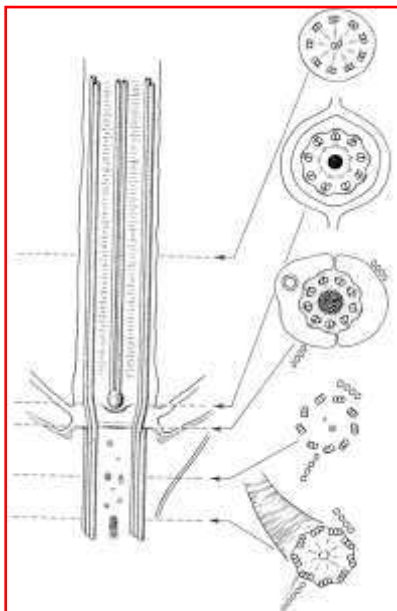


Figure 5 : Schéma d'une coupe longitudinale d'un cil et d'un cinétosome. Les différentes sections du cil sont montrées en coupes transversales à différents niveaux. (Jurand et Selman, 1969).

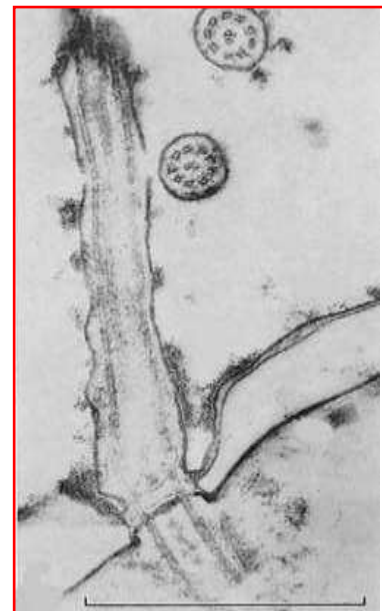


Figure 6 : Coupe longitudinale d'un cil, deux cils apparaissent en coupe transversale (Beale and Preer, 2008).

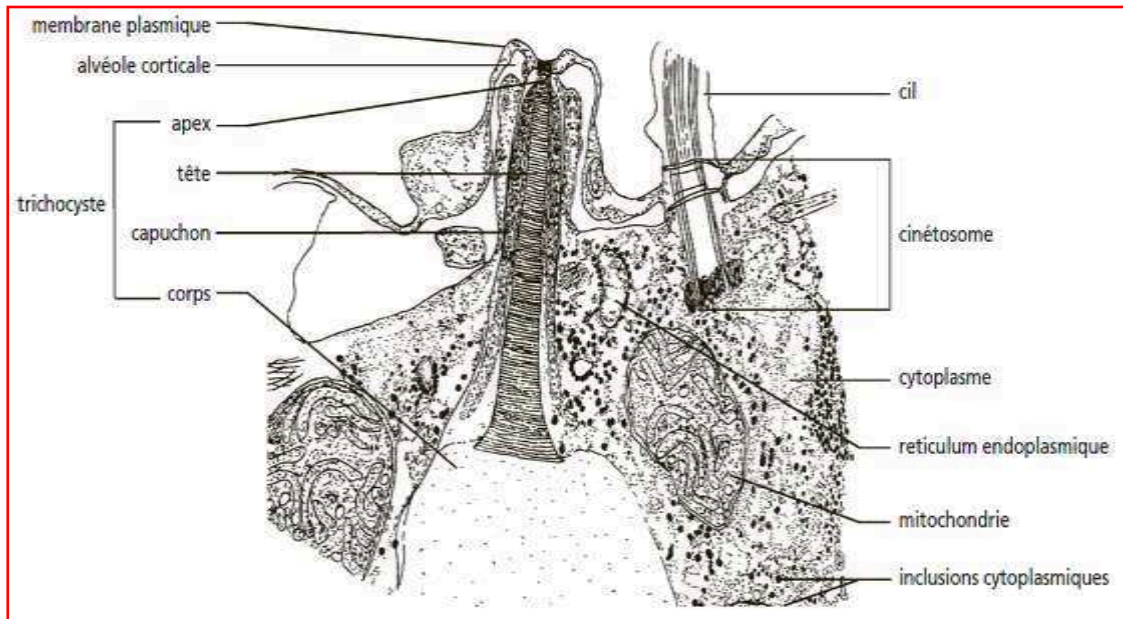


Figure 7 : localisation du trichocyste dans une partie du cortex
(Heusser et Dupuy, 2008)

Le trichocyste est habituellement inséré entre les unités qui composent une cinétie (Fig. 7). En période de stress, tels que l'exposition de la paramecie aux produits chimiques toxiques ou hostiles prédateurs, les trichocystes sont projetés dans le milieu extérieur comme longs filaments striés à bouts pointus. En 1883, Maupas a supposé que les trichocystes effectuent une fonction de protection défensive contre les prédateurs de la paramecie. Les expériences de Harumoto (1994) ont confirmé que la présence des trichocystes protège la paramecie d'être dévoré par les ciliés comme *Dileptus* et *Monodidinium*.

7.2. Les noyaux

Comme la plupart des ciliés, la paramecie présente la particularité d'avoir un appareil nucléaire en deux parties : un ou plusieurs petits noyaux «le micronucleus» et un gros noyau «le macronucleus». Le premier assure les fonctions sexuelles indispensables pour engendrer des variations génétiques alors que le second dirige les fonctions trophiques quotidiennes et la multiplication asexuée, c'est un organisme qui est diplobionte (cycle de reproduction diplobiontique).

Les noyaux sont parmi les caractéristiques les plus remarquables chez la paramecie. Les membres du complexe *aurelia* contiennent un grand macronoyau et deux petits micronoyaux vésiculaires.

Le macronucléus des espèces membres du groupe *aurelia* est d'environ 50-60 μm de long et de 20-30 μm de large, tandis que les micronoyaux mesurent environ 3 μm de diamètre. Les micronoyaux sont souvent situés dans une rainure dans le macronoyau. Rares sont les spécimens du complexe *aurelia* qui contiennent plus de deux micronoyaux. Toutefois, la paramécie ne peut pas vivre sans micronoyau. Les souches qui sont artificiellement énucléés disparaissent après un certain nombre de fissions. Les micronoyaux des membres du groupe *aurelia* contiennent entre 30 à plus de 60 paires de chromosomes au moment de la première méiose (Sonneborn, 1977). Par ailleurs, les macronoyaux ont leur copie d'ADN sous forme de petits morceaux formés à partir des micronoyaux au moment de l'autogamie et la conjugaison.

7.3. Reproduction

❖ La fission asexuelle

En présence de la nourriture, la paramécie augmente graduellement sa taille, jusqu'à l'apparition d'une constriction autour de la région centrale. Les deux moitiés se séparent ensuite en deux cellules fille éventuellement identiques. En général, dans les conditions les plus favorables et quand il ya un excès de nourriture et une température d'environ 27° C, la fission asexuée du complexe *P. aurelia* se produit à un intervalle d'environ 5 heures, mais les températures optimales pour la croissance et la fission varient considérablement en fonction du stock et des espèces, et le stade dans le cycle clonale.

Pendant la fission, les micronucleus diploïdes dans chaque spécimen subissent une mitose, le détail cytologique de ce processus habituel ne peut pas être établi clairement en raison de la petite dimension des chromosomes. Cependant, il peut être supposé que chaque micronucleus dans un *Paramecium* se divise mitotiquement une seule fois, et les produits constituent le micronucleus des deux cellules fille. D'autre part, le macronoyau forme deux nouveaux macronuclei par un processus décrit comme amitose et comme le macronoyau ne se divise pas mitotiquement, il n'ya aucune assurance que chaque "chromosome" macronucléaire est représenté équitablement dans chaque noyau fille.

❖ La conjugaison

La conjugaison de la paramécie a été étudiée depuis de nombreuses années et les détails cytologiques du processus ont été décrits depuis longtemps par Maupas (1889) et Hertwig

(1889). Mais les conséquences génétiques de la procédure ne pourraient être comprises à l'époque, parce que les lois de Mendel ne sont pas connus pour le public scientifique avant 1900, ni la théorie chromosomique de l'hérédité qui s'est développé après 1914.

Néanmoins, Hertwig pensait que la conjugaison doit être considérée essentiellement comme un mécanisme pour amener la recombinaison sexuelle des éléments héréditaires, tandis que Maupas a souligné son rôle dans le rajeunissement.

La conjugaison de la paramécie implique l'appariement de deux cellules qui peuvent, ou non, être identiques, mais doivent toujours appartenir à deux types sexuels différents. Le processus est schématisé dans la [figure \(8\)](#). Pendant la conjugaison, les cellules passent par une série compliquée de processus sexuels qui durent quelques heures ([Sonneborn, 1950](#)). A la fin de la conjugaison, les deux cellules se détachent et reprennent leurs vies séparées. Génétiquement, ils sont devenus identiques. La conjugaison est vraiment un remarquable processus survenant dans les ciliés, mais pas dans d'autres groupes d'organismes.

Lorsque les cellules de types sexuels différents sont mélangés dans des conditions culturelles appropriées, il ya une agglutination immédiate des cellules. [Sonneborn \(1950\)](#), a décrit certaines conditions environnementales nécessaires pour que ce phénomène se produise. Ils impliquent une privation partielle de la nourriture, certaines limites de température, le temps, la lumière, l'obscurité et l'âge de la culture. Certaines de ces conditions sont caractéristiques d'une espèce particulière ([Sonneborn et Dippell, 1946](#)).

Les cellules individuelles dans les couples pendant la conjugaison sont d'abord attachées à leurs extrémités antérieures puis dans la région de la bouche (cône paroral de l'union), Quand ils sont attachés dans la région de la bouche, les conjugants ne peuvent pas être séparés ([Metz, 1948](#)). Les paires de cellules nagent ensemble un peu de temps jusqu'à après l'échange de noyaux.

Au moment de la conjugaison, la bouche devient complètement fermée et éventuellement les gorges sont réduites. Par conséquent, les organismes ne se nourrissent pas pendant la conjugaison et pour cette raison, la taille des cellules devient plus réduite. Pendant ce temps, le contenu intérieur subit une réorganisation radicale. Selon [Hertwig \(1889\)](#), des nouvelles bouches et gorges sont formés par bourgeonnement pendant la conjugaison (cela se produit également lors de la fission binaire, mais la différence c'est qu'à la conjugaison la bouche et les

vieilles gorges sont complètement perdues). Cependant, Les vacuoles contractiles continuent à fonctionner normalement pendant la conjugaison (Wichterman, 1953).

Chez *P. tetraurelia*, le processus de conjugaison dure normalement entre 5 et 6 heures à 27-29 °C. Exceptionnellement, toutefois, les cellules peuvent rester attachées deux par deux pour des périodes plus longues à la région du cône paroral. En effet, parfois (rarement) la connexion cytoplasmique entre conjugants dans la région du cône paroral ne se rompt jamais, et des doublets permanents sont formés.

Les changements micronucléaires qui ont lieu pendant et après la conjugaison sont extrêmement compliquées. Le changement cytologique le plus visible survenant pendant la conjugaison est la désintégration de l'ancien macronoyau. Durant la seconde moitié de la période pendant laquelle les conjugants sont réunis, la chromatine macronucléaire s'étire dans un long écheveau, qui se décompose alors en plusieurs fragments plus ou moins arrondis, dont le nombre peut être plus de cinquante sept mais, chez *P. tetraurelia* est le plus souvent environ quarante (Fig. 8, étape 4). Ces fragments de l'ancien macronoyau sont ensuite distribués, sans multiplication. La variabilité de la durée de persistance de fragments macronucléaires dans les conjugants est probablement liée aux différences de conditions nutritionnelles.

A la prophase de la première division méiotique le micronoyau s'allonge et devient en forme de croissant. Il peut être jusqu'à 20 µm de longueur. Il est raisonnable d'inférer que les deux premières divisions micronucléaires constituent la prophase de la méiose, mais la plupart des détails cytologiques ne peuvent pas être vu clairement dans le complexe *Aurelia*.

Après ces deux divisions méiotiques de chacun des deux micronoyaux, huit noyaux vraisemblablement haploïdes sont formés dans chaque conjugant. Il est généralement considéré que sept de ces huit noyaux disparaissent et reste un seul noyau haploïde dans chaque conjugant qui se déplacera ensuite vers le cône paroral.

Le noyau haploïde dans le cône paroral subit une division mitotique, et par conséquent, deux gamètes nucléaires haploïdes, génétiquement identiques, sont formés dans le cône paroral de chaque conjugant. L'un des deux noyaux, le «mâle» dans chaque conjugant, passe maintenant dans le cône paroral de la cellule opposée (Fig. 8, étape 5). Les deux noyaux fusionnent pour former un noyau diploïde de chaque cellule.

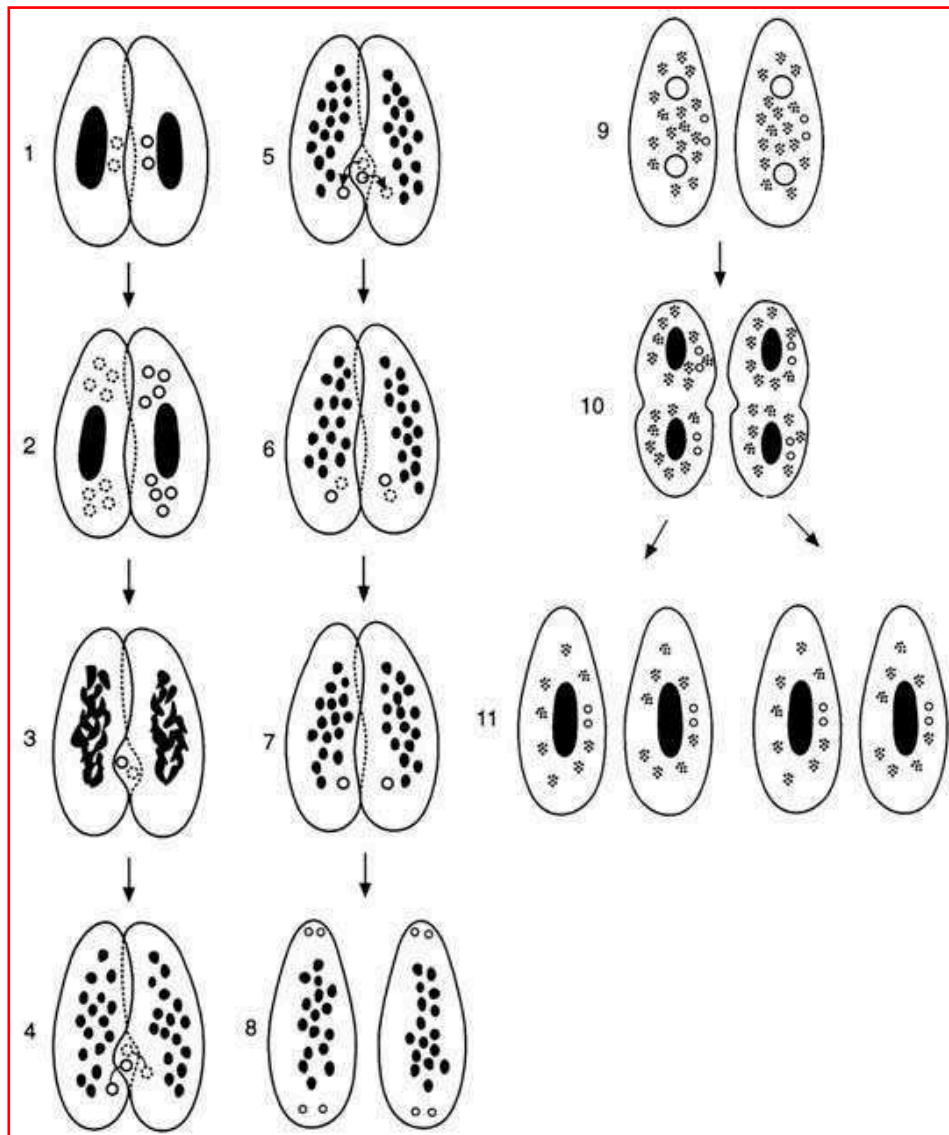


Figure 8 : Mécanisme de la conjugaison chez une paramécie du groupe *aurelia* selon Beale (1954)

(1) début de la conjugaison. **(2)** Deux divisions méiotiques des micronuclei. **(3)** chromatine macronucléaire s'étire dans un long écheveau. **(4)** Le macronoyau poursuit son processus dégénératif. **(5)** L'un des deux noyaux dans chaque cellule devient le noyau fixe et l'autre devient le noyau migrateur. **(6)** Les noyaux sont maintenant échangés pour donner deux micronoyaux haploïdes dans chaque cellule. **(7)** La fusion des deux noyaux se produit pour donner un noyau diploïde unique dans chaque cellule. **(8)** Le noyau diploïde dans chaque cellule se divise maintenant deux fois plus pour produire quatre noyaux diploïdes. Les cellules séparées. **(9)** Maintenant deux noyaux dans chaque cellule entament le processus de formation de deux ébauches macronucléaires. **(10)** Chacune des deux cellules commence la division cellulaire. **(11)** Les deux micronoyaux subissent une mitose pour maintenir leur nombre à deux par cellule, alors que les deux macronoyaux sont séparés en un à chaque cellule.

Après la fécondation, le syncaryon diploïde dans chacun des deux ex-conjugants se divise deux fois par mitose et la séparation des deux cellules filles survient généralement au même temps entre ces deux divisions. Après la deuxième division, chacun des ex-conjugants contient quatre noyaux, deux situés à la partie antérieure et deux à l'extrémité postérieure de la cellule (Fig. 8, étape 8). D'après [Maupas \(1889\)](#), deux de ces noyaux, probablement les deux antérieures, se transforment en deux nouveaux micronoyaux. Les deux autres augmentent énormément en volume et deviennent très large, presque sphérique, légèrement colorés et font environ 10 µm de diamètre (Fig. 8, étape 9). Bien que l'ADN soit répliqué durant cette période, le processus n'est pas terminé jusqu'à ce que les cellules soient divisées. Ce sont les ébauches macronucléaires caractéristiques, qui finissent par le développement normal d'un macronoyau profondément coloré. On pourrait supposer que ces deux ébauches seraient identiques, car ils résultent de la fusion du noyau. Toutefois, il a été constaté que les clones ou les caryonides, provenant de chacun sont souvent différentes. La transformation de micronoyaux en macronoyaux est effectivement un phénomène remarquable. Parfois, les exconjugants développent plus de deux ébauches macronucléaires. [Sonneborn \(1939\)](#), rapporte que pas moins de dix ébauches peuvent parfois se produire dans certaines lignes. Par la distribution du macronoyau supplémentaire aux cellules filles sans division macronucléaire, le nombre est finalement restauré à un par cellule. Il convient de souligner que le génotype micronucléaire de tous les descendants issus d'un seul couple est identique.

Les conjugants restent parfois réunis par un brin de cytoplasme après l'achèvement du processus normal de la conjugaison. [Sonneborn \(1944\)](#) pense que plus les conjugants sont restés ensemble à la région du cône paroral plus le cytoplasme a été échangé.

❖ Autogamie

En plus de la conjugaison, tous les membres du complexe *aurelia* subissent un autre processus important appelé autogamie. Les événements cytologiques de l'autogamie sont exactement comme ceux de la conjugaison, sauf qu'ils se produisent dans la même cellule. Chaque cellule produit deux ébauches autogames et deux caryonides. Comme il n'y a pas de partenaire dans l'autogamie, les deux noyaux haploïdes gamétiques produisent une simple fusion pour former un micronoyau diploïde fécondé. Ces micronoyaux formeront les nouveaux macronoyaux. A ce moment là, Les anciens macronoyaux sont perdus. Autrefois, l'autogamie a été appelée parthénogenèse ([Hertwig, 1914](#)) ou endomixie ([Woodruff et Erdmann, 1914](#)).

(endomixis est un processus dans lequel les nouveaux macronoyaux sont formés à partir des micronoyaux sans méiose).

Il est maintenant connu que l'autogamie peut être induite dans tous les stocks du complexe *aurelia* par la croissance des souches appropriées (souches qui sont à un stade clonale dans le processus de cycle de vie) dans une nourriture abondante pour une certaine période, puis en les privant de nourriture. Si la période de croissance avec l'excès de nourriture a été suffisamment longue, et ils sont à la bonne étape dans le cycle clonale près de 100% des cellules passe par autogamie lorsqu'ils sont privés de nourriture.

➤ Régénération macronucléaire

Comme décrit ci-dessus, dans le complexe *P. aurelia* la conjugaison et l'autogamie entraînent la perte du macronoyau préexistant et permettent la différenciation d'un autre à partir du micronoyau. Le nouveau macronoyau peut être génétiquement différent du macronoyau de la génération précédente. Toutefois, [Sonneborn \(1947\)](#), a montré que la formation de nouveaux macronoyaux chez des espèces du groupe *P. aurelia* pourrait également se produire en absence de la fusion nucléaire et sans participation des micronoyaux. Cela peut arriver si la nouvelle Anlagen macronucléaire n'arrive pas à se développer en un nouveau macronoyau. Dans ce cas, les anciens fragments macronucléaires prennent leur place et tendent à s'agrandir. S'ils étaient dilués à environ un par cellule, ils ont toujours la capacité de se diviser à nouveau. Sonneborn appelait ce processus la régénération macronucléaire. La régénération macronucléaire a également été rapportée chez *P. caudatum* ([Mikami et Hiwatashi, 1975](#)).

Chez *P. tetraurelia*, [Sonneborn \(1947\)](#) constatait que l'exposition des cellules à une température de 38 °C au moment de la conjugaison ou de l'autogamie, inhibe la formation normale de l'anlagen macronucléaire, induisant ainsi la régénération macronucléaire. Les descendants de la paramécie qui ont subi la régénération macronucléaire ont le même phénotype comme celui des cellules à partir desquelles les fragments macronucléaire ont été tirés. Selon [Sonneborn et Schneller \(1979\)](#), la régénération macronucléaire peut être induite dans les stocks de *P. tetraurelia* lorsque l'allèle mutant *am* (*amacronucleate*) est présent.

❖ Cytogamie

Un autre processus appelé cytogamie a été nommé par [Wichterman \(1939\)](#) observé chez *P. caudatum*. Il se produit également dans le complexe *P. aurelia*. Quand la conjugaison est échouée et les micronoyaux ne sont pas échangés, chaque partenaire subit une autogamie séparé.

❖ Hemixis

Il reste un ensemble de phénomènes dans lesquels le macronoyau occasionnellement extrude de la chromatine ou se casse en deux ou plusieurs pièces. Ces phénomènes mal compris ont été appelés hemixie ([Diller, 1936](#)). Ils semblent être des événements anormaux qui ont peu ou pas d'effets génétiques.

❖ Le cycle de vie

Le cycle de vie des ciliés a été reconnu très tôt dans l'histoire à cause des anciens travaux portés sur la paramécie. Il a été étudié par de nombreux travailleurs au cours de plusieurs années ([Sonneborn, 1954 et 1975](#) ; [Beisson et Capdeville, 1966](#) ; [Aufderheide, 1987](#) ; [Gilley et Blackburn, 1994](#) ; [Takagi, 1988](#)).

Les membres du complexe *P. aurelia*, pendant les longues périodes de croissance continue, passent à travers une succession d'étapes montrant leur aptitude à subir divers événements de reproduction, tels que la fission, la conjugaison et l'autogamie. Après la conjugaison, lorsque le taux de fission est élevé, les cellules entrent dans une phase d'immaturité. [Sonneborn \(1954\)](#) déclare que les périodes immatures de certaines espèces du complexe *P. aurelia* durent généralement de 25 à 35 divisions cellulaires, mais dans d'autres espèces telles que *P. bursaria*, l'immaturité peut durer plus de six cents fissions. Dans *P. tetraurelia* et *P. octaurelia* il n'y a pas de périodes immatures suivants la conjugaison.

Pendant la maturité, les cellules entre en autogamie si elles sont affamées. Au début du cycle, la fréquence des cellules affamées subissant l'autogamie est faible, mais elle augmente avec le temps, et une fois qu'elle démarre, elle augmente assez rapidement de 0% à 100%. Durant la maturité, les cellules répondent à une réduction des conditions nutritives par l'accouplement réactif. Si elles n'ont pas de partenaire approprié elles procéderont

ultérieurement à l'autogamie. Les cellules deviennent incapables à l'accouplement sauf que l'autogamie soit terminée. L'apparition de cette réponse à l'épuisement de la nourriture définit la fin de la maturité.

Durant la vieillesse de nombreuses anomalies sont observées. Le taux de fission diminue lentement et la mortalité augmente au moment de la conjugaison et de l'autogamie. Le pourcentage de cellules qui s'engagent et qui complètent l'autogamie peut aussi baisser (Sonneborn, 1954). Ces changements sont accompagnés par une augmentation de la fréquence des anomalies de la morphogénèse, la croissance, la division des parties de la cellule et la mitose micronucléaire (Dippell, 1955 ; Sonneborn, et Dippell, 1960). Le nombre de micronoyaux par cellule devient plus variable et la fréquence des cellules sans micronoyaux augmente, ainsi que certaines cellules qui apparaissent avec trois ou quatre micronucleus. (Dippell, 1955 ; Mitchison, 1955). Des variations importantes apparaissent dans les clones ex-autogames provenant de parents sénescents qui, au fur et à mesure, deviennent rajeunis quand ils subissent l'autogamie (Sonneborn, 1954 et 1955). La fréquence de produire de descendance non viable à partir de l'autogamie s'élève pratiquement de 0% à 100%. Ainsi, la sénescence est accompagnée par des défauts dans le macronoyau, le micronoyau et le cytoplasme. Enfin, la mort se produit finalement à toutes les lignes. Sonneborn a montré que dans le complexe *P. aurelia*, l'autogamie pourrait remplacer la conjugaison et prévenir la vieillesse et la mort. En fait, l'autogamie semble avoir les mêmes effets rajeunissant que la conjugaison, sauf qu'après l'autogamie la période immature n'existe pas. Ceci peut être lié au fait que lorsque l'autogamie est induite dans le laboratoire, elle survient habituellement vers la fin du cycle de vie, tandis que la conjugaison est généralement induite plus tôt (Siegel, 1963). Dans des conditions standard de réisolement quotidien à 27 °C, avec un excès de nourriture (ce qui supprime l'autogamie), Sonneborn (1954) a rapporté que le nombre maximum de fissions entre la fécondation et la mort était d'environ 350 chez *P. primaurelia*, 300 chez *P. biaurelia*, et 200 chez *P. tetraurelia*.

Beaucoup de chercheurs au début ont été intrigués par le problème de savoir si la paramécie peut vivre éternellement sans conjugaison, ou si la conjugaison est nécessaire pour le rajeunissement. En cherchant à répondre à ce problème, Woodruff a fait croître les paramécies par isolement de depuis de nombreuses années sans que la conjugaison soit produite.

Les causes principales de la progression de la sénescence ont été beaucoup discutées. Il a été suggéré que la vieillesse résulte à partir des changements chromosomiques du macronoyau (déséquilibre ou détérioration) ou alternativement par certains effets cytoplasmiques. [Kimball \(1953\)](#) a proposé que la détérioration pendant le vieillissement est basée sur le déséquilibre chromosomique résultant d'une distribution aléatoire des chromosomes dans les noyaux fils au cours des divisions amitotiques du macronoyau.

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

1. *Paramecium tetraurelia*

Paramecium tetraurelia est un organisme unicellulaire eucaryote appartenant au phylum des Protozoaires ciliés (*Ciliophora*).

- **Position taxonomique :**

P. tetraurelia répond à la classification suivante :

Super règne :	Eukaryotae	(Whittaker & Margulis, 1978)
Règne :	Protista	(Whittaker & Margulis, 1978)
Phylum :	Ciliophora	(Doflein, 1901)
Classe :	Oligohymenophorea	(de Puytorac et al., 1974)
S/Classe :	Peniculia	(Faur-Fremiet, in Corliss, 1956)
Ordre :	Urocentrida	(Jankowski, 1980)
S/Ordre :	Parameciina	(Jankowski, in Small et Lynn, 1985)
Famille :	Parameciidae	(Dujardin, 1840)
Genre :	<i>Paramecium</i>	(Müller, 1773)

- **Description**

Les paramécies appartenant au groupe *aurelia* sont exceptionnellement grandes (Fig. 9). Elles mesurent environ 150 µm de long et 50 µm de large (Wichterman, 1985). Elles varient considérablement en taille selon l'approvisionnement alimentaire et le stade du cycle de vie.

La cellule possède un macronoyau, deux ou plusieurs micronoyaux et deux vacuoles contractiles qui se produisent sur la surface dorsale. Ces vacuoles se situent sur le premier et le dernier quart de l'organisme et vident leur contenu liquide à l'extérieur par l'intermédiaire des pores excrétoires. Sur le côté de la cellule notée "ventrale", il ya une rainure, ou l'œsophage, dans lequel la nourriture (bactéries, levures, algues, etc) est véhiculé par des cils spéciaux. Au bas de l'œsophage, la nourriture est concentrée dans des vacuoles alimentaires qui sont continuellement bourgeonnées et pénétrées dans le cytoplasme. Les résidus non digérés seront

déchargés dans le milieu extérieur par un pore anal appelé cytopyge ou cytoprocte. Le cytopyge est ventrale et subterminal, et assez proche de l'extrémité postérieure du corps.

Les espèces du genre *Paramecium* sont des organismes libres (non parasites), vivant dans les étangs d'eau douce, des ruisseaux et des rivières à travers le monde. La cellule de la paramécie est couverte de milliers de cils, qui assurent la locomotion. (Voir la partie "Généralité" pour une description plus détaillée).

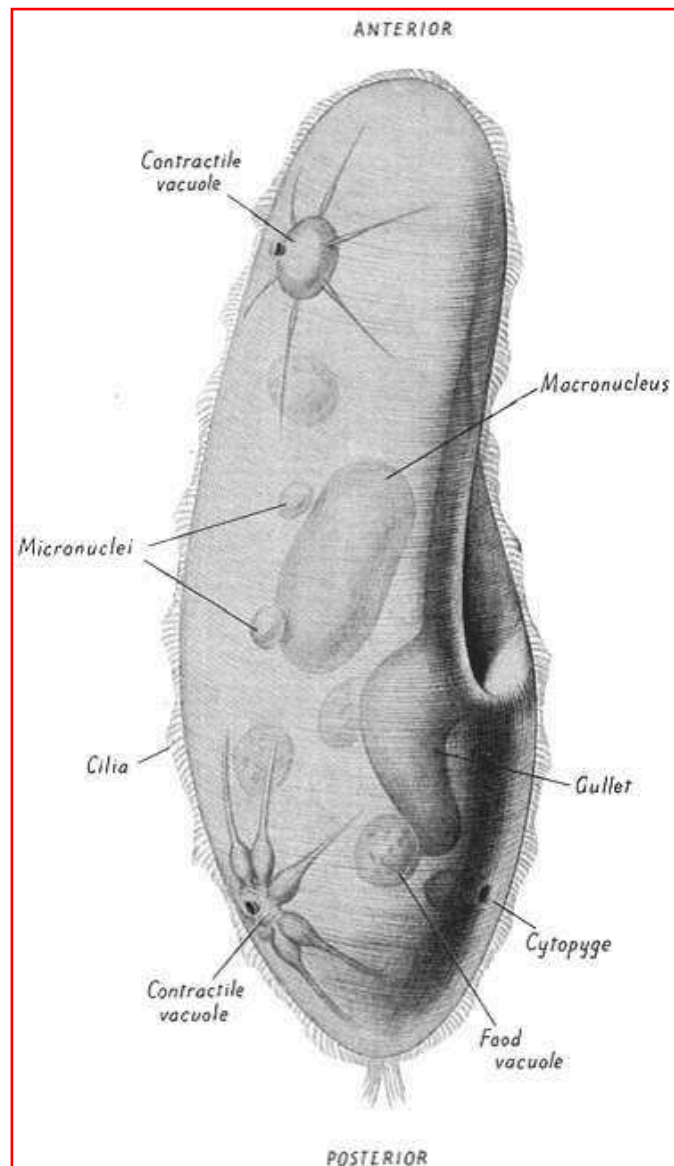


Figure 9 : Morphologie générale d'un spécimen du complexe *P. aurelia* (Jurand et Selman, 1969)

2. Matériel chimiques

2.1. Amistar Xtra

Amistar Xtra est un fongicide composé de deux matières actives complémentaires, l'azoxystrobine et le cyproconazole. L'Azoxystrobine appartient à la famille chimique des strobilurines et le Cyproconazole à celle des triazoles. L'association de ces deux substances actives confère à Amistar Xtra une action préventive et curative à haut niveau d'efficacité et une très longue persistance d'action vis à vis d'un grand nombre de maladies des feuilles et des épis des céréales (Syngenta, 2007). Les propriétés physicochimiques d'Amistar Xtra sont indiquées dans le [tableau \(1\)](#).

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques et indication générales d'Amistar Xtra (Syngenta, 2007)

Caractéristiques	Identification/valeurs
Forme	Suspension liquide
Couleur	Jaune
Odeur	Sucrée
Point d'ébullition	100°C
Point d'inflammation	> 100°C
Auto-inflammation	Le produit ne s'enflamme pas spontanément
Danger d'explosion	Le produit n'est pas explosif
Pression de vapeur à 20°C	1,013 hPa
Densité à 20°C:	1,1 g/cm ³
Solubilité dans/miscibilité avec l'eau	Entièrement miscible
Viscosité, dynamique	117 - 541 mPa.s à 20 °C 76,0 - 427 mPa.s à 40 °C
Tension de surface :	32,0 mN/m à 20 °C
valeur du pH à 20°C	5-9 (1% dans l'eau)
Propriétés comburantes	non oxydant
Produits de décomposition dangereux	La combustion ou la décomposition thermique libèrent des vapeurs toxiques et irritantes.
Réactions dangereuses	Stable dans des conditions normales.

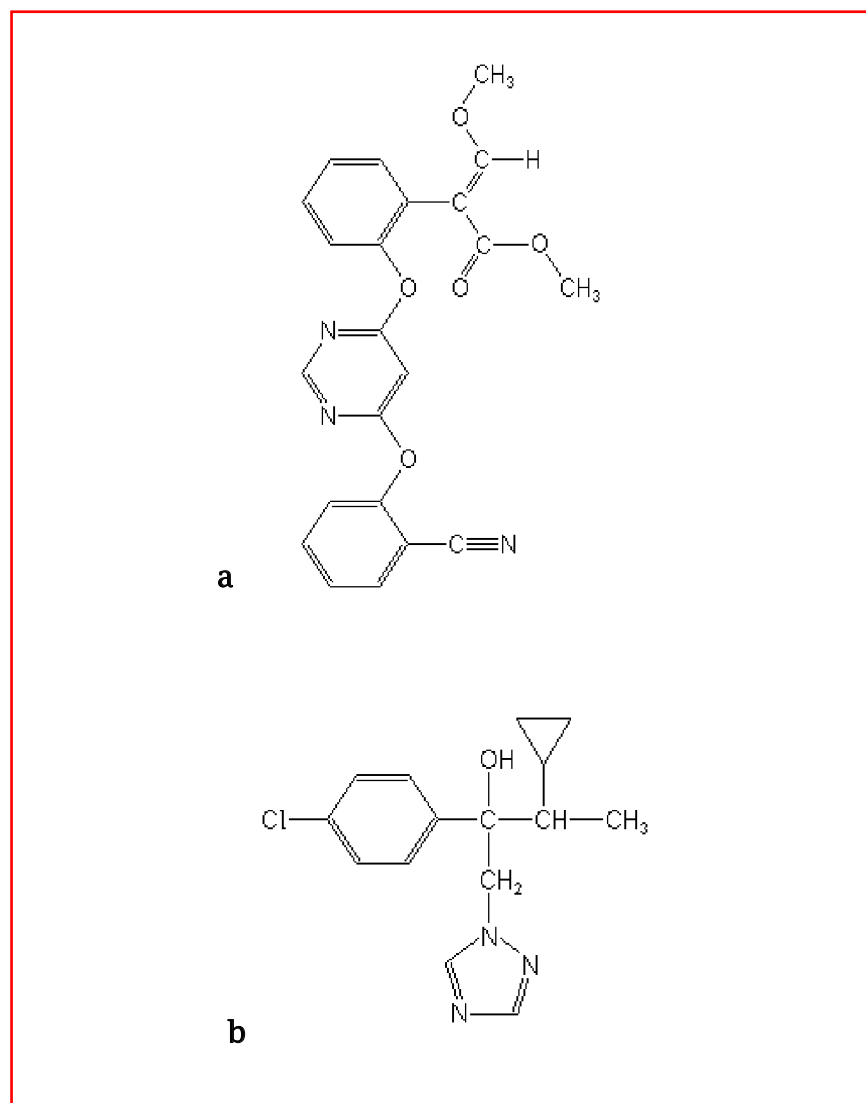


Figure 10 : Structures chimiques des deux matières actives d'Amistar Xtra
a : Azoxystrobine **b** : Cyproconazole

L'*Azoxystrobine* (Fig. 10.a) est un produit doté de propriétés systémiques. Il a un large spectre contre toutes les maladies foliaires des céréales. La matière active se répartit en direction de la pointe dans toute la feuille. Dans la cellule fongique, il empêche le transport des électrons dans les mitochondries. L'*Azoxystrobine* est hydrolytiquement stable, mais rapidement photodégradable dans les solutions aqueuses.

Le *Cyproconazole* (Fig. 10.b) bloque la synthèse de l'ergostérol, une phase vitale du métabolisme de la cellule du champignon parasite. Grâce à sa forte systémie, la matière active pénètre très rapidement dans le tissu végétal. Elle est véhiculée par la sève. Le *Cyproconazole*

agit aussi bien préventivement que curativement, c'est-à-dire que la matière active contrôle encore les agents pathogènes même après l'infection. Le Cyproconazole est chimiquement stable avec une dégradation lente dans le sol et dans l'eau.

2.2. Glyphosate

Le Glyphosate est un herbicide organophosphoré non sélectif, C'est un phytocide à action systémique utilisé en période de post-émergence pour contrôler la végétation indésirable lors de la préparation de terrain ou pour dégager la régénération forestière. Selon l'homologation, son nom chimique est (N-(phosphonométhyl)glycine) selon la nomenclature de l'union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) il est enregistré sous le numéro CAS, 107-83-6, et sa formule chimique est $C_3H_8NO_5P$ (Fig. 11). C'est un cristal blanc, inodore, dont le poids moléculaire est de 169.1 g.mol^{-1} (British Crop Protection Council, 2000).

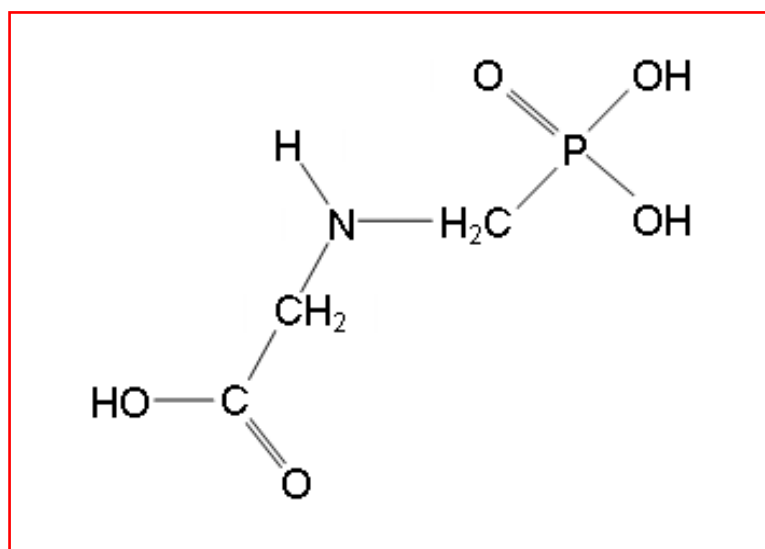


Figure 11 : Structure chimique du Glyphosate

L'activité herbicide du Glyphosate a été découverte en 1970 et a été homologuée au Canada en 1976 (Trotter et al., 1990; Franz et al., 1997). Le tableau (2) résume les propriétés physicochimiques du Glyphosate.

Utilisé en post-émergence, Le Glyphosate pulvérisé est absorbé par les feuilles. Il se déplace alors rapidement dans les tissus de la plante jusqu'aux racines, sans affecter les tissus s'il est appliqué selon les concentrations recommandées. Le Glyphosate peut aussi être injecté dans le tronc, le déplacement du produit se fera alors vers les feuilles, pour le produit atteignant le xylème, puis vers les racines. Le produit atteignant le phloème ira directement aux racines. Le Glyphosate inhibe la synthèse des acides aminés aromatiques essentiels aux plantes, provoquant un dérèglement du métabolisme, puis la mort (Franz *et al.*, 1997).

Le Glyphosate cible toutes les plantes annuelles et vivaces (Franz *et al.*, 1997). Il est utilisé pour lutter contre la végétation indésirable sur les superficies, dans les champs cultivés sans travail ou avec travail minimal de sol, en bordure des clôtures, dans les aires d'entreposage, le long des canaux d'irrigation, pour régénérer les pâturages et pour éliminer les arbustes et les arbres feuillus ainsi que d'autres plantes indésirables dans les forêts des conifères.

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques du Glyphosate (Worthing et Hance, 2000)

Caractéristiques	Identification/valeurs
Non chimique	N-(phosphonométhyl) glycine
Forme	Cristal
Couleur	Blanc
Odeur	Inodore
Formule chimique	C ₃ H ₈ NO ₅ P
Masse moléculaire (g/mole)	169.1
Densité (g/mole)	1.74
Point de fusion (°C)	200
Point d'éclair (°C)	>93 (vision)
Pression de vapeur (mm Hg à 25°C)	<7.5×10 ⁻⁸
Solubilité dans l'eau mg/l à 25°C	12000
Solubilité dans les solvants organiques	Insoluble dans la plupart des solvants organiques
Coefficient d'adsorption (K)	16.5
Constante de dissociation (pka)	< 2 ; 2,6 ; 5,6 et 10,6

3. Etude de la croissance

3.1. Culture de *Paramecium tetraurelia*

La culture habituelle de *P. tetraurelia* est réalisée selon la méthode décrite par [Azzouz et al., \(2011\)](#). Les paramécies sont cultivées dans un milieu de culture "com. 9" (la composition est détaillée dans le [tableau \(3\)](#) à pH 6.5 et une température de 25°C. L'incubation est effectuée dans une étuve de type Memmert 400.

Les cellules sont repiquées tous les trois jours pour maintenir une bonne culture. La bactérisation du milieu est effectuée à partir d'un milieu de culture contaminé auparavant.

3.2. Suivi de la croissance

Pour le suivi de la croissance, la culture de *P. tetraurelia* est placée dans des tubes à essai à une température de 30°C. Chaque tube contient 10 ml du milieu de culture, auxquels on ajoute 10 paramécies.

L'étude de la cinétique de croissance est réalisée par le comptage journalier (toutes les 24 heures) du nombre de cellules après fixation au formol à 4%. L'opération est effectuée sous microscope optique sur une lame striée ([Fig.12](#)). Le comptage est répété au moins cinq fois pour chaque tube. L'évaluation de la croissance est déterminée par les formules suivantes :

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

$$k = \frac{n}{t}$$

$$g = \frac{1}{k}$$

Où n est le nombre de génération, N_t est la population dans le temps t , N_0 est le nombre initial de cellules, k est la vélocité de la génération et g est le temps de génération (temps nécessaire pour qu'une population de cellules double en nombre).

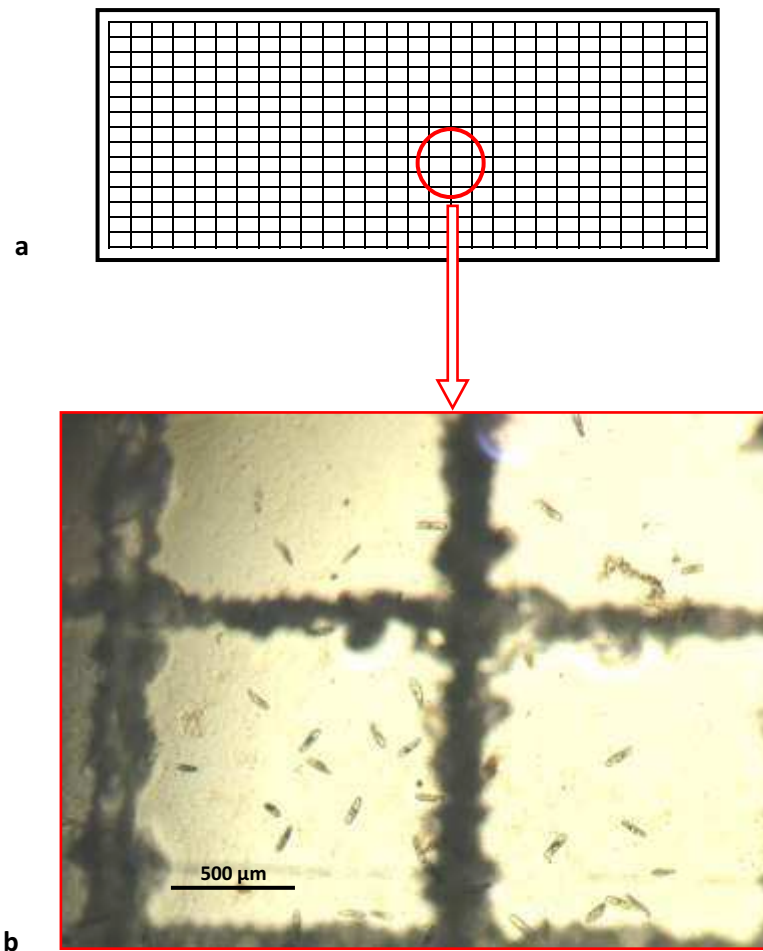


Figure 12 : lame de comptage pour les cellules de paramécies.
(a) : représentation schématique. (b) : photo sous microscope optique

3.3. Impact du milieu de culture sur la croissance de *P. tetraurelia*

Pour évaluer l'impact du milieu de culture sur la croissance des paramécies, nous avons préparé un bouillon de culture concentré à partir de plusieurs végétaux [foin 7,5 g, blé 7,5 g, laitue 10 g, concombre 5 g, pomme de terre 5 g, une pincée de levure et une source de stérol végétal (2 g de cacahuètes ou d'amandes)]. La mixture est bouillie dans 1,5 litre d'eau distillée pendant une heure. Le bouillon est filtré, stérilisé par ébullition à 100°C pendant 30 min dans un flacon thermorésistant et conservé à l'abri de la lumière.

Nous avons procédé à plusieurs dilutions pour tester la concentration qui fournit le meilleur rendement (croissance optimale). Les dilutions sont mesurées par spectrophotométrie (spectrophotomètre Jenway 6300). Les densités testées sont 0.100, 0.300, 0.500, 0.700 et 0.900 nm.

Pour tester l'intensité de la croissance de *P. tetraurelia* en fonction de la composition du milieu de culture, nous avons procédé à plusieurs combinaisons afin d'adopter la meilleure composition synthétique du milieu de culture. Les combinaisons utilisées pour cette expérience sont celles présentées dans le [tableau \(3\)](#).

Tableau 3 : Différentes combinaisons des ingrédients composant le milieu de culture (Com.: combinaison)

<i>Composition du milieu</i>	<i>Foin</i>	<i>Laitue</i>	<i>Plante de blé</i>	<i>concombre</i>	<i>potomme de terre</i>	<i>Levure</i>	<i>Cacahuète</i>
<i>Quantité (g.L⁻¹)</i>	2	2	2	1	1	0.5	0.5
Com. 1	+						
Com. 2		+					
Com. 3	+					+	+
Com. 4		+				+	+
Com. 5	+	+				+	+
Com. 6	+	+	+			+	+
Com. 7	+	+	+	+		+	+
Com. 8	+	+	+	+	+		
Com. 9	+	+	+	+	+	+	+

3.4. Effets de la température et du pH sur l'intensité de la croissance

* *La température*

Afin d'étudier les effets de la température sur la croissance de la paramécie, différentes incubations ont été réalisées à 10°C, 20°C, 25°C, 30°C et 35°C. Les cultures sont incubées dans une étuve de type Memmert 400.

* Le pH

La valeur préalable du pH du milieu de culture est de 6,8. L'ajustement du pH pour chaque expérience est réalisé à l'aide d'un pH-mètre (professionnel pH 213 Hanna) par l'addition de quelques gouttes d'HCl (1mol) et de NaOH (1mol). Les valeurs du pH testées sont 5, 6, 7, 8, et 9.

3.5. Traitement par les pesticides

Les concentrations retenues pour le traitement sont le résultat de plusieurs tests avec des gammes de concentrations d'Amistar Xtra et de Glyphosate (Voir "Chapitre II" partie "Résultats").

Le traitement par les pesticides s'effectue avant l'ensemencement des cellules. Le suivi de la croissance par le dénombrement quotidien des paramécies se poursuit jusqu'au cinquième jour (96h). Après exposition de la population de *P. tetraurelia* aux pesticides l'évaluation de la relation dose-réponse est calculée par la formule suivante :

$$\text{Réponse (\%)} = \frac{(N_C - N_E)}{N_C} * 100$$

Où N_C est le nombre de cellules témoins et N_E est le nombre de cellules traitées.

4. Etude comportementale

4.1. Test d'évitement

L'évitement est le comportement le plus visible chez les espèces de *Paramecium*. Au contact d'un obstacle (physique ou chimique), la paramécie nage à l'arrière par un mouvement rapide pendant un certain temps, puis repart en avant avec un angle de déviation, jusqu'à l'évitement total de l'obstacle.

Pour étudier l'influence des pesticides sur ce comportement nous avons adapté la méthode de Takiguchi et al., (2002). Qui a utilisé une lame (*Well-test apparatus*) creusée de deux puits de 5 mm de diamètre reliés par un fin canal d'une largeur de 1mm (Fig. 13).

La méthode d'étude repose sur l'introduction de 50 paramécies environ dans un puit en contact avec la molécule à tester pendant 15 min. L'évaluation de cette réaction se fait par le comptage, toutes les 3 minutes, du nombre de paramécies ayant quitté le premier puits qui contient le pesticide vers le deuxième qui ne contient que de l'eau distillée.

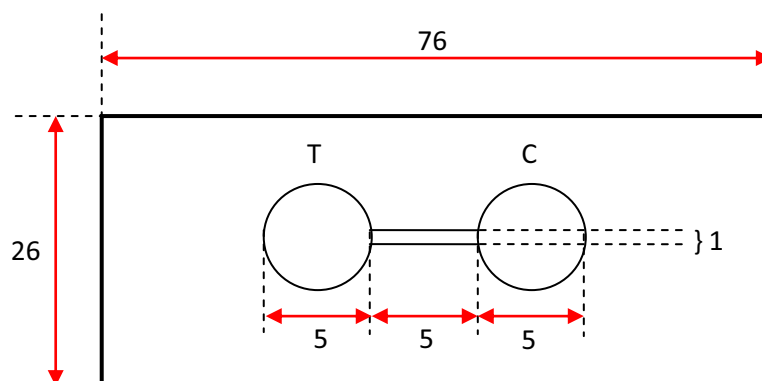


Figure 13 : Représentation schématique de la lame-test (*Well-test apparatus*) utilisée pour le test d'évitement (Takiguchi et al., 2002). (Les mensurations sont exprimées en mm).

4.2. Suivi des Trajectoires

Lors de leur déplacement, les paramécies suivent, le plus souvent, des itinéraires directs. Le changement brutal des trajectoires et les troubles de déplacement indiquent un état comportemental anormal.

Afin de caractériser l'impact des pesticides sur la direction de déplacement des paramécies, nous avons étudié leurs trajectoires en présence et en absence des molécules à tester en effectuant un enregistrement vidéo des déplacements. Après enregistrement, les vidéos sont analysées par le logiciel (Kinovea 0.8.15). Ce logiciel permet de tracer avec précision les trajectoires de déplacement des cellules (fig. 14).

4.3. Vitesse de déplacement

Dans une culture jeune, les paramécies se déplacent d'une manière active et rapide. Dans un état d'excitation physique ou chimique, les mouvements deviennent plus rapides et véloces.

Par contre, Dans un état de vieillesse ou de stress, le rythme des mouvements diminue sensiblement en fonction du temps. De ce fait, les expériences sur les vitesses de déplacement doivent être réalisées dans la phase exponentielle (3^{ème} jour) et sur des trajectoires plus ou moins droites.

Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel d'analyse vidéo "Kinovea 0.8.15" afin de calculer les vitesses de déplacement. Le logiciel calcule la distance en pixel et le temps en centième de seconde (Fig. 14).

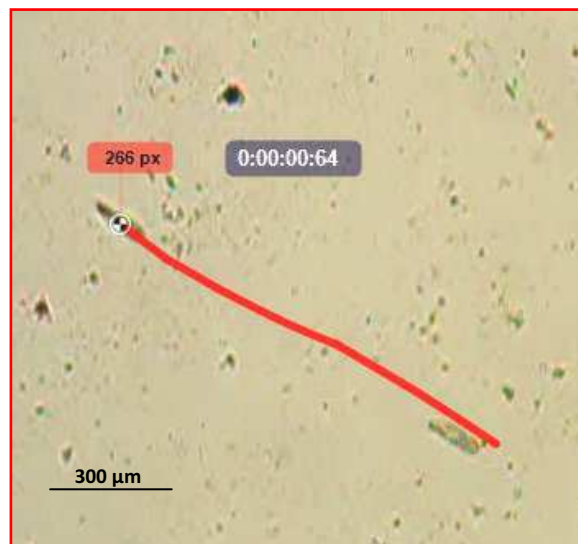


Figure 14 : Photo prise par le logiciel "Kinovea" montrant la mesure de la distance (en pixel) parcourue par une paramécie en fonction du temps (en centième de seconde)

5. Effets sur la respiration

* Description de l'appareil utilisé

L'oxygraphe à électrode d'oxygène est une unité de contrôle connectée à un ordinateur doté d'un logiciel "Oxygraphe" (Fig. 15). Il est conçu pour mesurer le taux d'oxygène lors de la respiration ou de la photosynthèse.



Figure 15 : Oxygraphe à électrode d'oxygène «Hansatech Instruments»

La chambre à oxygène fournit une solution très versatile pour les mesures d'oxygène dissous dans la phase liquide des échantillons (Fig.16). Toutefois, en raison de l'assemblage étanche au gaz, la chambre se prête particulièrement bien aux tests de respiration dans les petits volumes d'échantillons, où toute diffusion minute de l'oxygène ambiant peut causer des artefacts de mesure. La chambre à oxygène est construite à partir d'acrylique moulé offrant une visibilité claire, un bon échantillon et un éclairage uniforme. Le contrôle précis de la température de l'échantillon et le disque électrode peut être réalisé en connectant la chemise d'eau à un bain d'eau circulant thermorégulé. L'échantillon est logé dans une cuve de réaction en verre borosilicate qui a un volume d'échantillon variable entre 0,2 et 2,5 ml contrôlé par un ensemble plongeur réglable en gaz. Ce piston central a une précision alésage permettant "additions/soustractions" à partir du mélange réactionnel à l'aide d'une seringue.

*** Principe**

La consommation d'oxygène est mesurée dans un oxygraphe (Hansatech Instrument), consistant en une chambre fermée, thermostatée et agitée, munie d'une électrode de Clark (Fig. 17). L'électrode de Clark est composée d'une cathode en platine polarisée à -0,7 Volts et d'une anode en argent au contact d'une solution de KCl à demi-saturée. Elle est séparée du milieu à mesurer par une membrane en téflon perméable à l'oxygène. L'oxygène est réduit au

niveau de la cathode, créant une différence de potentiel proportionnelle à la quantité d'oxygène présente dans le milieu (Fig. 17). Il est donc possible de mesurer directement la vitesse de respiration dans différentes conditions expérimentales.

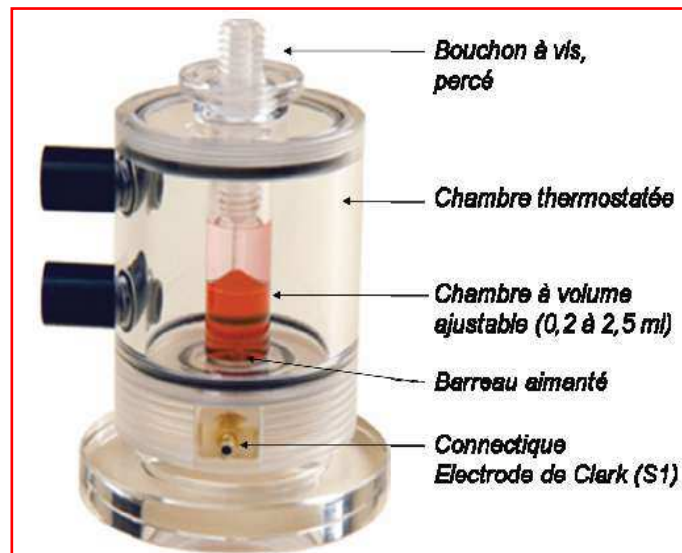


Figure 16 : Chambre d'oxygraphie ajustable «Hansatech Instruments».

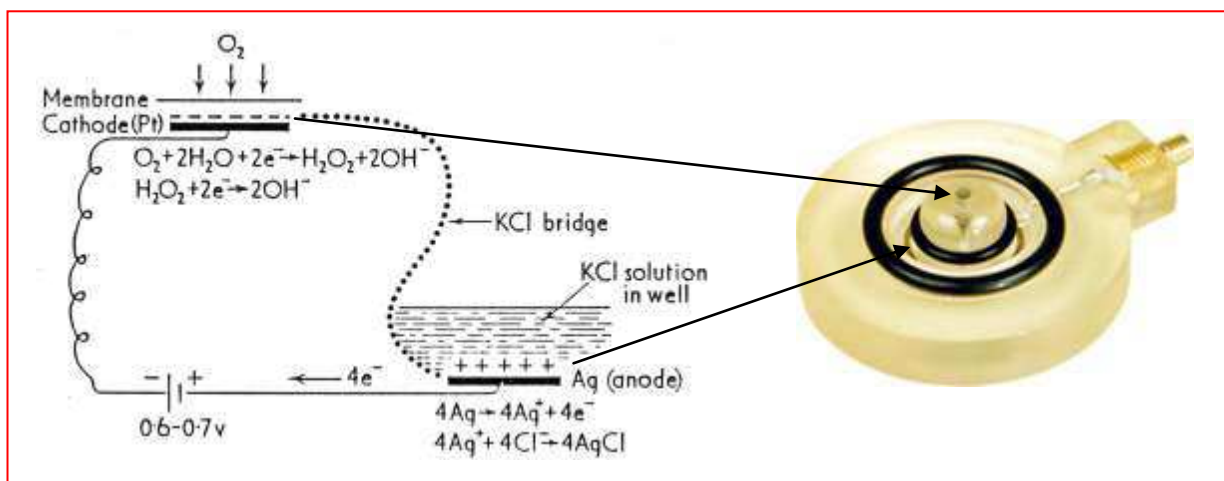


Figure 17 : Principe de l'électrode de Clark (Hansatech Electrode)

* Protocole

La consommation d'oxygène par les paramécies a été mise au point au laboratoire de toxicologie cellulaire selon la méthode décrite par [Djebar et Djebar, \(2000\)](#), elle est mesurée

dans une chambre d'oxygraphie fermée et thermostatée à 30°C. La procédure est réalisée par simple adjonction des cellules de paramécies avec leur milieu de culture à un volume final de 1,5 ml. Le traitement des paramécies se fait au 4^{ème} jour de la culture (fin de la phase exponentielle). Les signaux produits par les électrodes sont recueillis à l'aide d'un ordinateur équipé d'une carte d'acquisition et traités à l'aide du logiciel Oxygraph (Hansatech Instruments) puis exprimés en nmol d'O₂/ml.

6. Dosage des paramètres biochimiques

La réalisation des différents dosages nécessite le prélèvement d'un nombre relativement identique de cellules de paramécies. Ce pendant, Le traitement se fait au quatrième jour de la culture (fin de la phase exponentielle) pour éviter toute influence sur la croissance. Le début du dosage, pour chaque paramètre, a lieu trois heures après le traitement par les pesticides.

Une préconcentration des cellules à 1000 tours/min est nécessaire. Le surnageant dépourvu de cellules est éliminé soigneusement à l'aide d'une seringue sans entrainer les cellules concentrées. Le culot est récupéré pour servir aux dosages du taux de GSH et de MDA et pour le suivi des activités GST et catalase.

6.1. Dosage du glutathion (GSH)

Le glutathion est le principal agent responsable de la bonne santé dans l'organisme, c'est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (Fig. 18). Le GSH est requis pour l'activité de plusieurs enzymes, il est présent dans la majorité des cellules et joue un rôle principal dans la réduction de tout peroxyde organique, en présence de la glutathion peroxydase.

Le glutathion se trouve dans la cellule sous deux formes : une forme oxydée «GSSG» et une forme réduite «GSH» représentant plus de 99% de la quantité total.

* *Principe*

Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la méthode la plus employée (Ellman, 1959). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5'-dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH (Fig. 19), ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcalin (8-9) présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante :

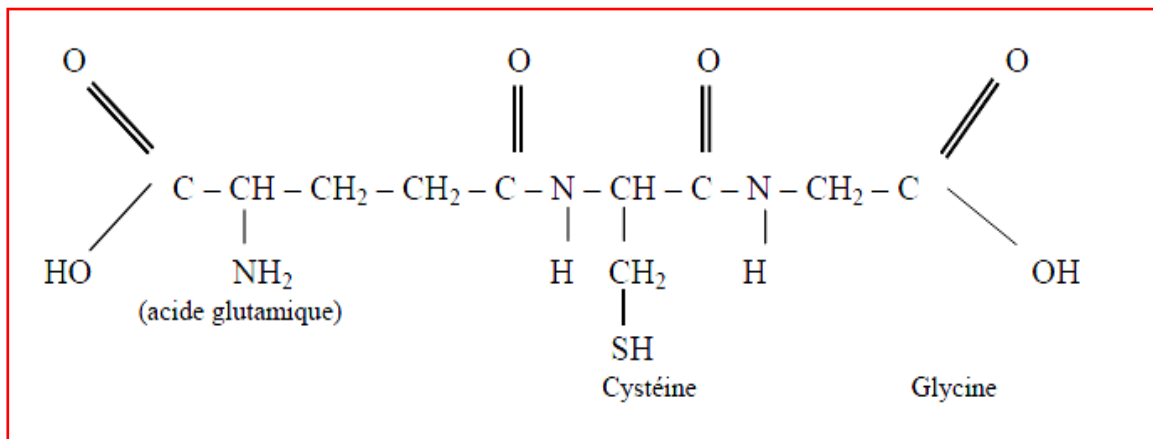


Figure 18 : Formule chimique du Glutathion.

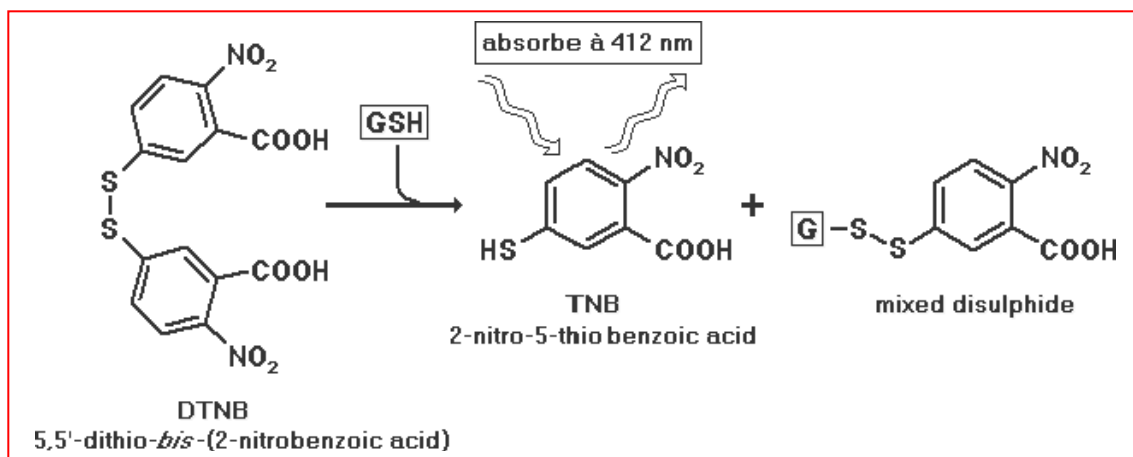


Figure 19: Réaction d'Ellman entre le glutathion et le DTNB

* Protocole

La technique de dosage retenue pour le glutathion (GSH) est celle décrite par [Weckbecker et Cory \(1998\)](#).

Un ml d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M [7,448g EDTA, 1000 ml d'eau distillée] est ajouté aux culots récupérés. Après Broyage à ultrasons (Sonifer B-30) dans un bain de glace, L'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0,25% [0,25g de ASS, 100ml d'eau distillé] où 0,2ml de ASS sont additionnés a 0.8 ml d'homogénat. Le mélange est agité au vortex puis centrifugé 5 minutes à 1000 tours.min⁻¹. A 500 µl du surnageant on ajoute 1ml du tampon tris/EDTA (0,02M, pH9,6) [63,04g Tris, 7,4448 g EDTA,

1000ml d'eau distillé] et 0,025 ml de DTNB (0,01M) [3.96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu]. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5mn de repos à une température ambiante pour la stabilisation de la couleur.

Le calcul de la concentration en glutathion est obtenu par la formule suivante :

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

Où **DO** : La densité optique. **1** : le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,2 ml ASS+ 0,8 ml homogénat). **1,525** : le volume total des solutions utilisées dans le dosage (0,025ml DTNB + 0,5 ml surnageant +1ml Tris-EDTA). **13,1** : coefficient d'absorbance (concernant le groupement -SH à 412 nm). **0,8** : le volume en ml de l' homogénat utilisé et **0,5** : le volume en ml du surnageant utilisé.

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

* Principe

Les GST sont des enzymes de métabolisation de phase II, dont la fonction est de conjuguer à une molécule de glutathion, une grande variété de substrats pour permettre leur élimination (la réaction ci-dessous) dont les pesticides et leurs métabolites.



R-X représente un substrat électrophile, c'est-à-dire un composé chimique déficient d'électrons et susceptible d'attirer ceux-ci. La réaction consiste en une attaque d'un anion ou d'une molécule présentant un doublet libre sur un atome de carbone appauvri en électron.

Les GST sont généralement solubles et présentes sous plusieurs isoformes dont certaines sont inductibles par les contaminants qu'elles détoxiquent. Cette particularité leur confère une activité intéressante en tant que marqueurs biochimiques.

Le CDNB (1-chloro,2,4-dinitrobenzène) réagit facilement avec plusieurs formes de GST et GSH ce qui permet la mesure globale des activités GST (Stein,1998). La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340 nm (Fig. 20).

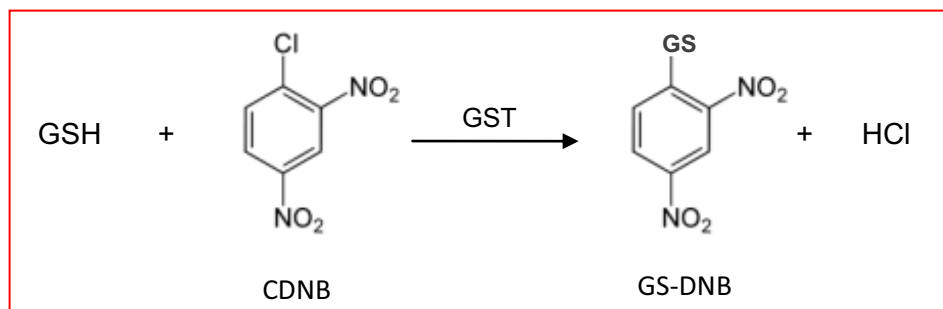


Figure 20 : Conjugaison du glutathion (GSH) avec le 1-chloro,2,4-dinitrobenzène (CDNB)

* Protocole

L'activité GST est mesurée selon la méthode de Habig *et al.* (1974). La méthode consiste à faire réagir les GSTs de l'organisme avec un mélange GSH-CDNB.

Après homogénéisation de l'échantillon à l'ultrasons (Sonifer B-30) dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH6), l'homogénat est centrifugé à 14000 rpm pendant 30 minutes.

Une aliquote de 200 µl du surnageant est mise en réaction avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM)/GSH (5mM) [20,26 mg de CDNB, 153,65 mg de GSH, 1ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0,1M pH6)]. L'activité enzymatique est mesurée à 340 nm pendant 5 min avec un intervalle de 1 min pour chaque lecture. La variation de la densité optique est due à l'apparition du complexe GS-DNB.

La concentration en GST est obtenue par la formule suivante :

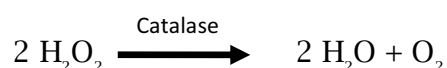
$$GST(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protéines}) = \frac{\Delta DO * V}{\epsilon * d * v * \text{mg de protéines}}$$

Où **DO** : est la densité optique, **V** : est le volume total de la cuve (1400 µl), **ε** : est le coefficient d'extinction (9,6 mµl⁻¹), **d** : est l'épaisseur de la cuve, et **v** : est le volume du surnageant.

6.3. Mesure de l'activité catalase

* *Principe*

Les catalases catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire. Ce sont des enzymes peroxysomales dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. Ces enzymes sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif au niveau des membranes cellulaires (Livingstone et al., 1993a ; Labrot et al., 1996). Bien que cette activité paraisse sensible aux facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle (Pellerin-Massicote, 1994), elle est un paramètre à surveiller dans le cas de contamination par des composés inducteurs de stress. La technique utilisée pour doser la catalase est celle décrite par Clairborne (1985).



* *Protocole*

L'activité catalase (CAT) est mesurée à 240 nm par la variation de la densité optique suite à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en faisant réagir dans 750 µl du tampon phosphate (100 Mm. pH 7,5), 200 µl de H₂O₂ (500mM) sur 50 µl d'homogénat à 25°C pendant 30 secondes avec un intervalle de 15 secondes. Il est important de mettre le même temps entre le pipetage et le moment de la lecture. Le coefficient d'extinction de l'eau oxygénée à 240 nm est de 0.040 cm⁻¹.mmole⁻¹. Les résultats sont exprimés en µmol par minute et par mg de protéines.

L'activité catalase est calculée par la formule suivante :

$$\text{Catalase } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO}{0,040 * \text{mg de protéines}}$$

Où **DO** est la densité optique et **0,040** est le coefficient d'extinction de l'eau oxygénée.

6.4. Dosage du malonyldialdéhyde (MDA)

* Principe

Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. Le dosage du malonyldialdéhyde (MDA) par la réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA) semble être la méthode la plus utilisée pour l'estimation *in vitro* de la peroxydation des lipides chez les organismes vivants. La réaction repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules de TBA, d'un complexe coloré en rose extractible par les solvants organiques comme le butanol et absorbant à 532 nm (Fig. 21).

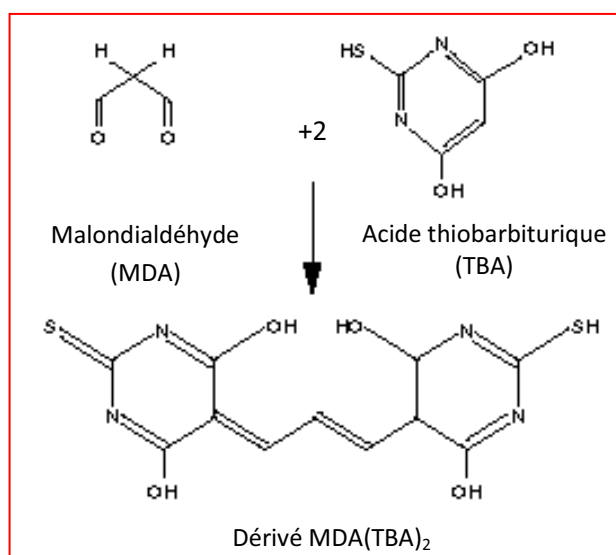


Figure 21 : Principe du dosage et réaction du malonyldialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique

* Dosage

Le dosage est effectué selon la méthode de [Draper et Hadley \(1990\)](#). Les échantillons sont broyés aux ultrasons dans 1 ml de tampon tris-HCl (50 mM, pH 7,5) [1,5137 mg tris ; 0,073g EDTA ; 42,78 sucrose ; 250 ml eau distillée]. Après homogénéisation, les échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 10000 rpm.

500 µl du surnageant sont additionnés à 2,5 ml de TCA [100 g TCA ; 100 ml eau distillée]. Après chauffage à 100 °C pendant 15 min au bain marie et refroidissement à la glace, les

échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 10000 rpm. 2 ml du surnageant sont alors prélevés auxquels on ajoute 1 ml de TBA.

A la suite d'un second chauffage pendant 15 min à 100 °C et refroidissement, 1,5 ml de butanol sont rajoutés. Après agitation, une dernière centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min est réalisée et le surnageant constitué de 1 ml de butanol renfermant les complexes TBA/MDA est récupéré. La lecture des absorbances est effectuée à 532.

Le taux de MDA est déterminé selon la formule suivante :

$$MDA (\mu\text{mol}/\text{mg de protéines}) = \frac{DO * V}{\epsilon * v * \text{mg de protéines}}$$

Où **DO** : est la densité optique, **V** : est le volume total de la cuve (1ml), **ε** : est le coefficient d'extinction du TBA (156 mM⁻¹cm⁻¹) et **v** : est le volume du surnageant (0,5).

7. Analyses statistiques

Le calcul de la concentration inhibitrice moyenne (CI₅₀), qui inhibe à 50% la capacité de la croissance dans la population de *Paramecium tetraurelia*, est basé sur l'analyse de la cinétique de croissance par l'utilisation de la régression linéaire en se basant sur la méthode des moindres carrés.

Pour étudier les effets des pesticides sur la croissance des paramécies, nous avons utilisé une analyse statistique générale basée sur "Mood's median test" et le test "Kruskal-Wallis".

Les comparaisons par paire entre les échantillons traités par les pesticides et le contrôle, ont été analysées par le teste "Mann Whitney".

Pour caractériser la relation entre les concentrations de pesticides et leurs effets inhibiteurs, nous avons utilisé l'analyse de la régression linéaire.

Le logiciel utilisé pour l'analyse statistique est le Minitab 15.0.

Chapitre I :

Etude de la croissance de *Paramecium tetraurelia*

La croissance des microorganismes n'est pas un problème concernant des individus biologiques mais des populations. Les paramètres clés permettant de la caractériser sont la vitesse de croissance, le temps de génération et le temps de latence (Branger et al., 2007).

L'étude de l'évolution des populations a des applications importantes en ce qui concerne la sécurité de l'environnement. 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). Il existe plusieurs moyens de mesurer la croissance des microorganismes. La façon la plus évidente de déterminer le nombre de cellules est de les compter directement (Lansing et al., 2003).

La croissance est considérablement influencée par la nature physique ou chimique de l'environnement. Les microorganismes doivent aussi répondre aux variations de concentration des nutriments en particulier lorsque l'un d'eux devient limitant. Une compréhension de l'influence du milieu aidera à contrôler la croissance et à étudier la distribution des microorganismes dans les milieux naturels (Lansing et al., 2003).

1. Etude de la croissance

Dans le but de réunir toutes les conditions favorables, nous avons étudié la croissance des paramécies sous l'influence de certains paramètres physicochimiques. Les paramètres étudiés sont la concentration et la composition du milieu de culture, la température, et la variation du pH.

1.1. Impact de la composition du milieu de culture sur la croissance

Le milieu de culture doit comprendre les éléments essentiels conduisant au développement normal des paramécies. De ce fait, nous avons testé plusieurs combinaisons afin d'adopter un milieu synthétique convenable à une meilleure croissance. Les variantes utilisées dans nos

expériences montrent qu'à chaque fois qu'on ajoute un constituant nous constatons une incidence directe sur le nombre de cellules dans le milieu de culture (tableau 4). La composition qui semble être la plus bénéfique est celle qui inclut tous les constituants (Com.9), d'où le nombre de cellule, au quatrième jour, excède 10^4 cellules par millilitre. Dans un milieu dépourvu en levure et en arachides, le nombre de cellule diminue considérablement en atteignant $4,5 \cdot 10^3$ cellules par millilitre.

Tableau 4 : Croissance de *P. tetraurelia* en fonction de la composition du milieu de culture

<i>Milieus de culture</i>	<i>Nombre de cellules/ml/h</i>			
	24h	48h	72h	96h
<i>Com. 1</i>	27	120	413	540
<i>Com. 2</i>	40	127	633	673
<i>Com. 3</i>	67	533	1133	1217
<i>Com. 4</i>	73	860	1183	1233
<i>Com. 5</i>	127	867	4067	4200
<i>Com. 6</i>	120	1250	5025	5117
<i>Com. 7</i>	147	1250	7500	8500
<i>Com. 8</i>	120	1250	4333	4300
<i>Com. 9</i>	167	1900	9975	10150

1.2. Impact de la concentration du milieu de culture sur la croissance

Le but de faire des dilutions à partir d'un milieu concentré est d'étudier l'influence des différentes concentrations sur la croissance des paramécies et de chercher optimiser nos conditions en vue d'une croissance maximale.

La figure (22) montre que les différentes concentrations en nutriments ont une influence certaine sur le nombre de paramécies. Ainsi, un milieu de culture très concentré a un effet négatif sur la survie des cellules. D'un autre côté, un milieu de culture à faible concentration produit une faible croissance. La concentration la plus favorable à la croissance se situe autour

de 0,700 nm, par contre, pour un milieu dont la densité se situe autour de 0,900 nm, la croissance est nulle.

Les comparaisons entre les effets des différentes densités du milieu de culture sur la croissance sont significatives ($Chi\text{-Square} = 16,00$; $DF = 4$; $P = 0,003$; $Overall\ median = 203$).

L'analyse de la corrélation entre la concentration du milieu de culture et la croissance, pour chaque stade du cycle de vie, montre que la phase exponentielle et la phase de déclin sont les plus sensibles. La concentration en nutriment dans le milieu de culture explique à 87% l'intensité de la croissance des paramécies (Fig. 23.d). En revanche, elle explique à 96% la vitesse avec laquelle la population de paramécies diminue (Fig. 23.f).

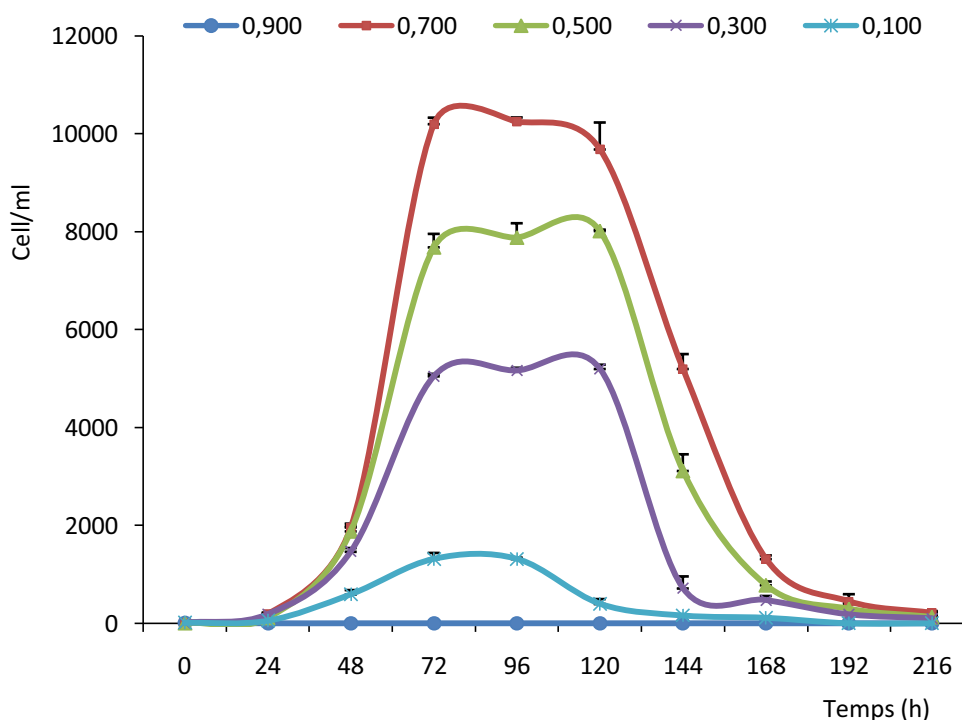


Figure 22: Croissance de *P. tetraurelia* en fonction de la densité du milieu de culture

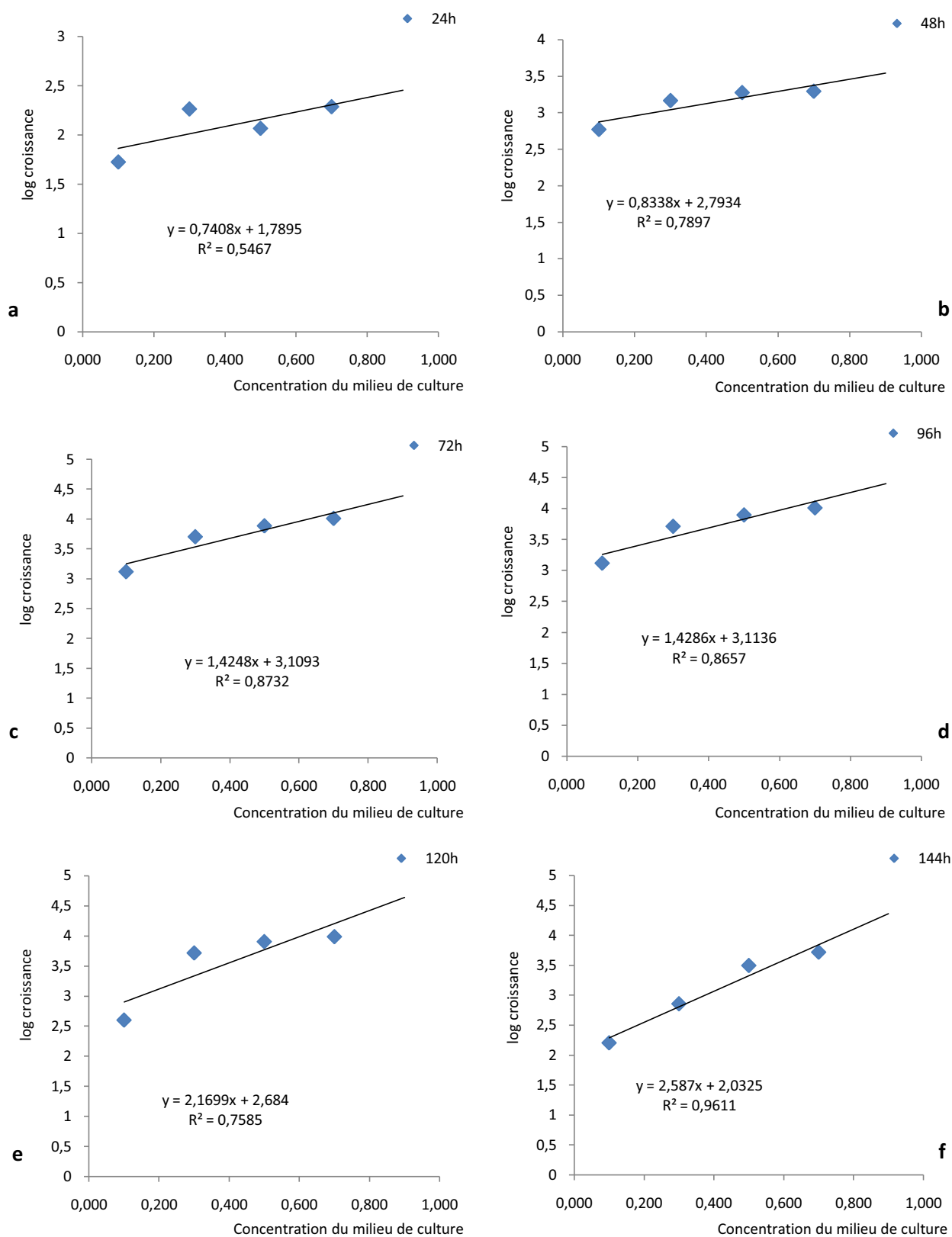


Figure 23 : Corrélations entre la croissance et la concentration du milieu de culture pour chaque stade du cycle de développement (T : 30°C ; pH : 6,5)

1.3. Les variations de la température

La croissance de *Paramecium tetraurelia* semble influencée par les variations de la température, en fonction ou la diminution de cette dernière, le nombre de cellules change. Les températures qui apparaissent plus favorables sont celles comprises entre 25°C et 30°C (fig. 24). Hors cet intervalle, le nombre de cellules diminue et l'allure de la courbe de croissance change de manière remarquable.

Sous une basse température (< 20°C), bien que le nombre de cellules soit faible (≈ 1300 cell/ml à la phase stationnaire), la croissance reste constante pour une période relativement longue ; par contre, dans une température élevée (30°C et plus), le nombre de cellules à la fin de la phase exponentielle est très important (10000 Cell/ml) et la phase stationnaire diminue de façon rapide en fonction de l'élévation de la température. L'analyse comparative montre que les cinétiques de croissance sous les différentes températures sont significatives ($\text{Chi-Square} = 8,00$; $DF = 4$; $P=0,092$; $\text{Overall median} = 908$).

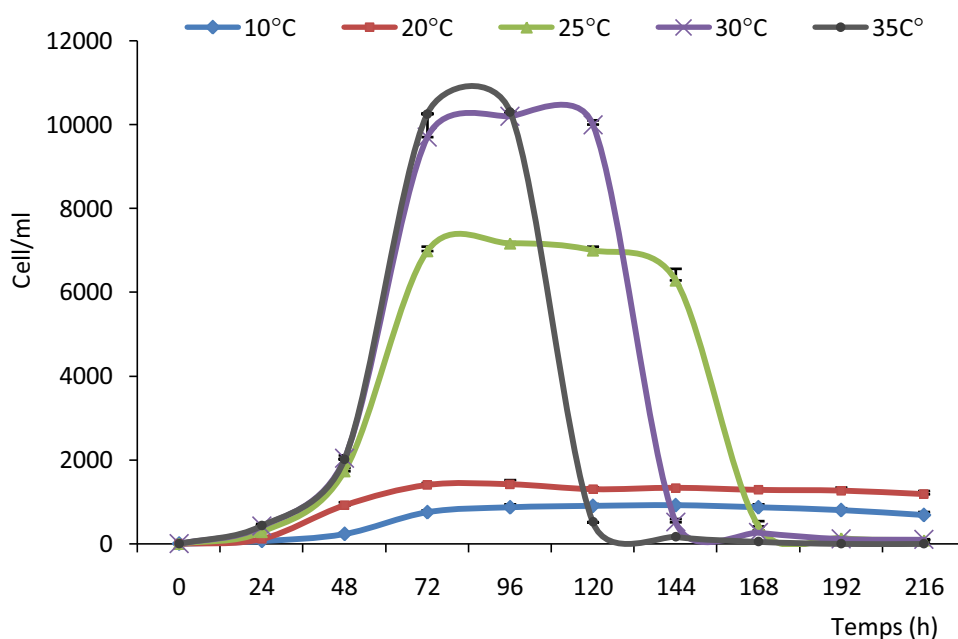


Figure 24: Effets de la température sur la croissance de *Paramecium tetraurelia*

L'étude de la corrélation montre que toutes les phases du cycle de vie sont sensibles à la température (Fig. 25). Néanmoins, et contrairement aux résultats enregistrés avec la concentration du milieu, la phase de déclin apparaît moins sensible et négativement corrélée à l'élévation de la température (Fig. 25.f.).

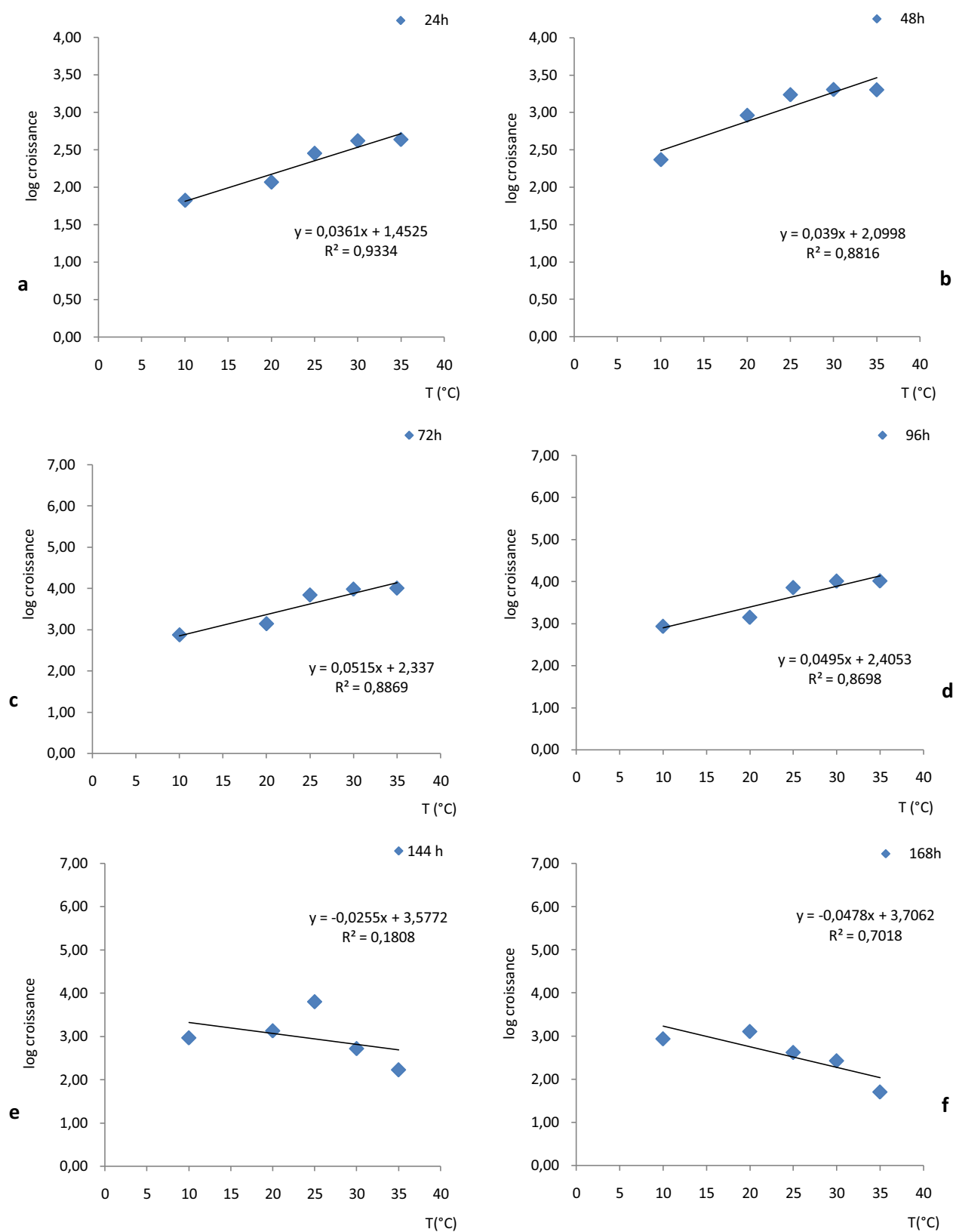


Figure 25 : Corrélation entre la croissance et la température pour chaque stade du cycle de développement (pH : 6,5 ; densité du milieu 0,700)

1.4. Les variations du pH

Les paramécies ne montrent pas une grande sensibilité aux variations du pH ; bien qu'on ait constaté une affinité pour les milieux légèrement acides (pH autour de 6) avec une croissance atteignant son maximum par rapport aux autres valeurs (fig.26).

L'analyse statistique révèle des différences significatives entre les effets des différents pH sur la croissance ($Chi\text{-Square} = 0$; $DF = 4$; $P = 1$; $Overall\ median = 4025$).

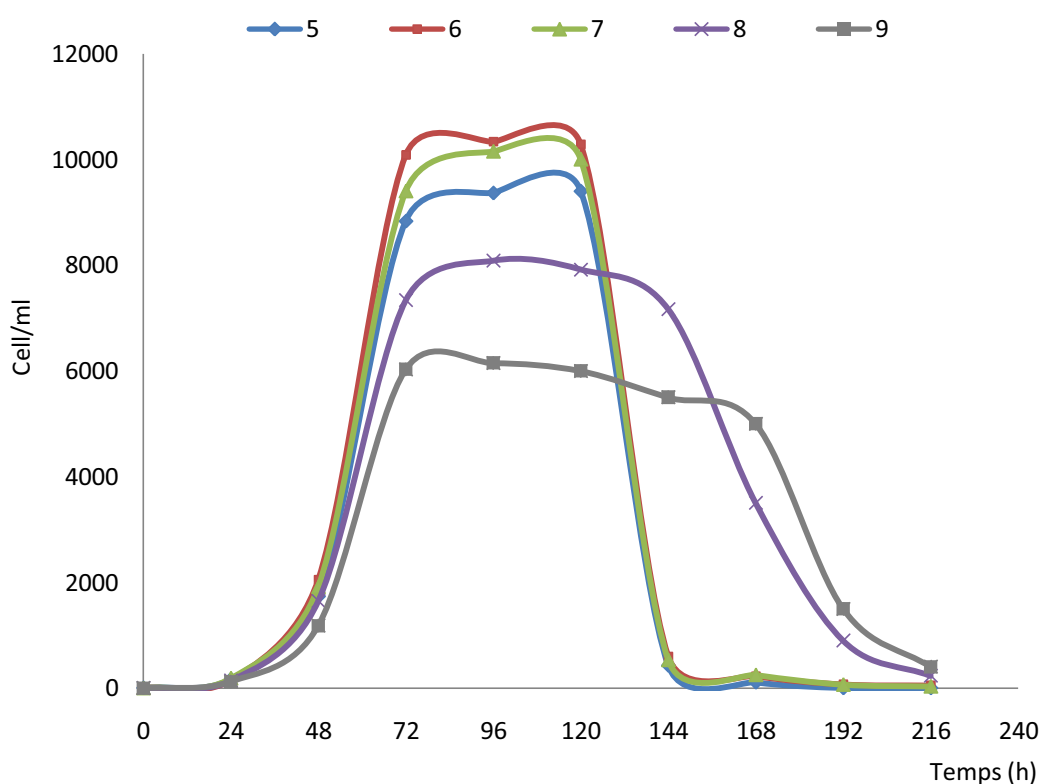


Figure 26 : Effets des variations du pH sur la croissance de *Paramecium tetraurelia* (T : 30 ; densité du milieu 0,700)

L'analyse de la corrélation montre que la croissance n'est que moyennement liée avec les variations du pH et que ce dernier n'explique que 42% à 67% l'intensité de la croissance des paramécies dans la plus part des cas (Fig. 27.a-e). Néanmoins, la phase de déclin apparaît plus sensible à ses variations, le calcul du coefficient de détermination (R^2) révèle un pourcentage de 75% (Fig. 27.f).

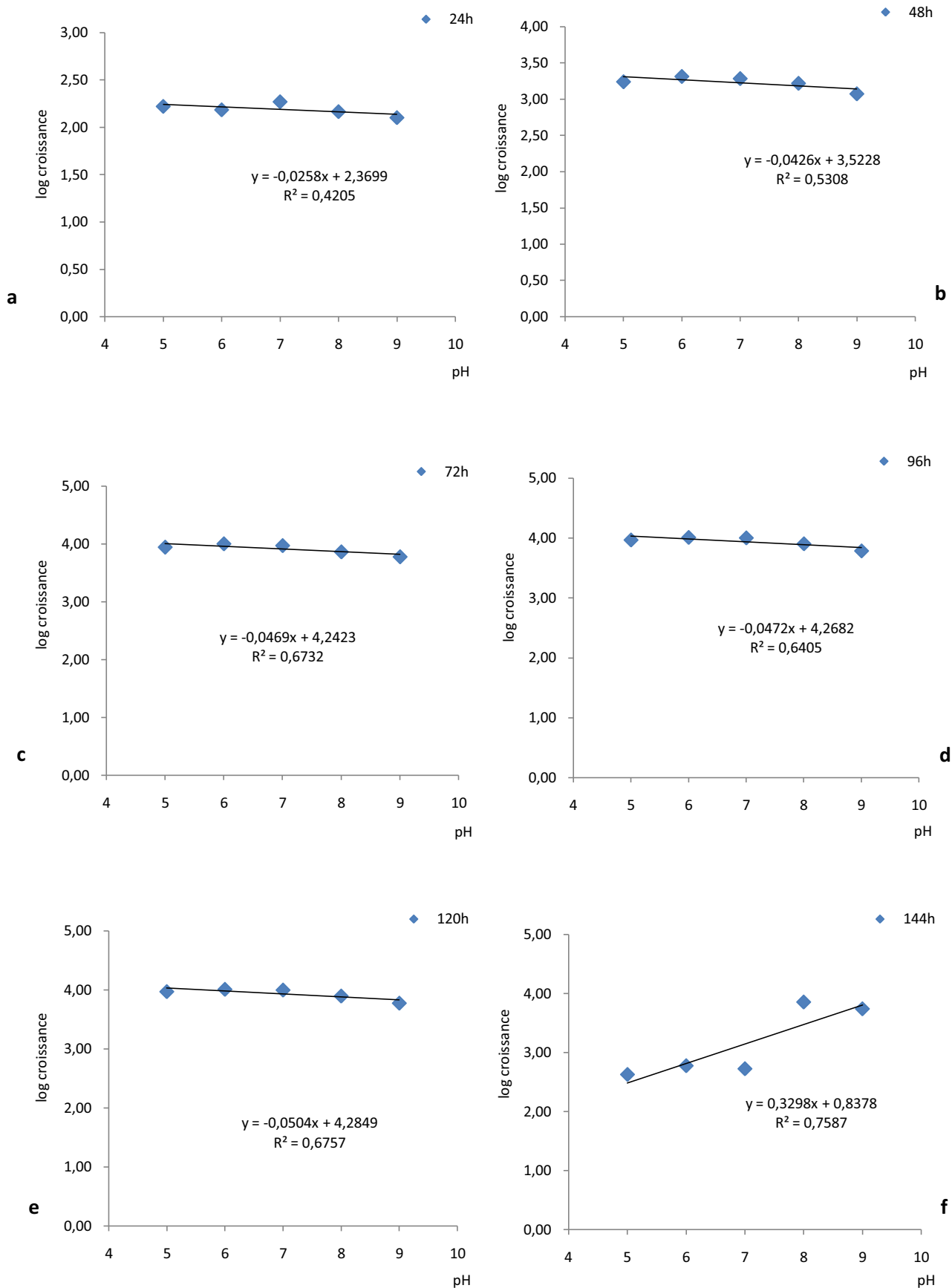


Figure 27 : Corrélations entre la croissance et les variations du pH pour chaque stade du cycle de développement (T : 30°C ; densité du milieu 0,700)

1.5. Etablissement d'un modèle de croissance de *P. tetraurelia*

A partir des résultats obtenus précédemment, il apparaît que la paramécie se développe mieux sous une température entre 25°C et 30°C, un pH légèrement acide (6 - 7) et une concentration bien définie du milieu de culture (0,700 nm). **Toutes ces conditions favorables nous ont permis de proposer un modèle de croissance spécifique à la paramécie avec un nombre maximal de cellules (Fig.28).**

Ainsi, la croissance des paramécies suit une courbe comportant quatre phases distinctes ; une première phase de latence dans laquelle la croissance est nulle, cette phase dure de 0 jusqu'à 24 heures ; une seconde phase très rapide qui dure 2 jours, caractérisée par une augmentation exponentielle du nombre de cellules avec un pic au troisième jour, cette dernière est suivie par une troisième phase de stabilité où le nombre de cellules demeure constant. La durée de cette phase dépend de la richesse du milieu de culture (densité en nutriments) et de la température. La quatrième phase, est une phase de déclin au cours de laquelle le nombre de cellules diminue progressivement jusqu'à disparition complète des paramécies. Cette phase dure environ 2 à 3 jours selon la température et la richesse en nutriments.

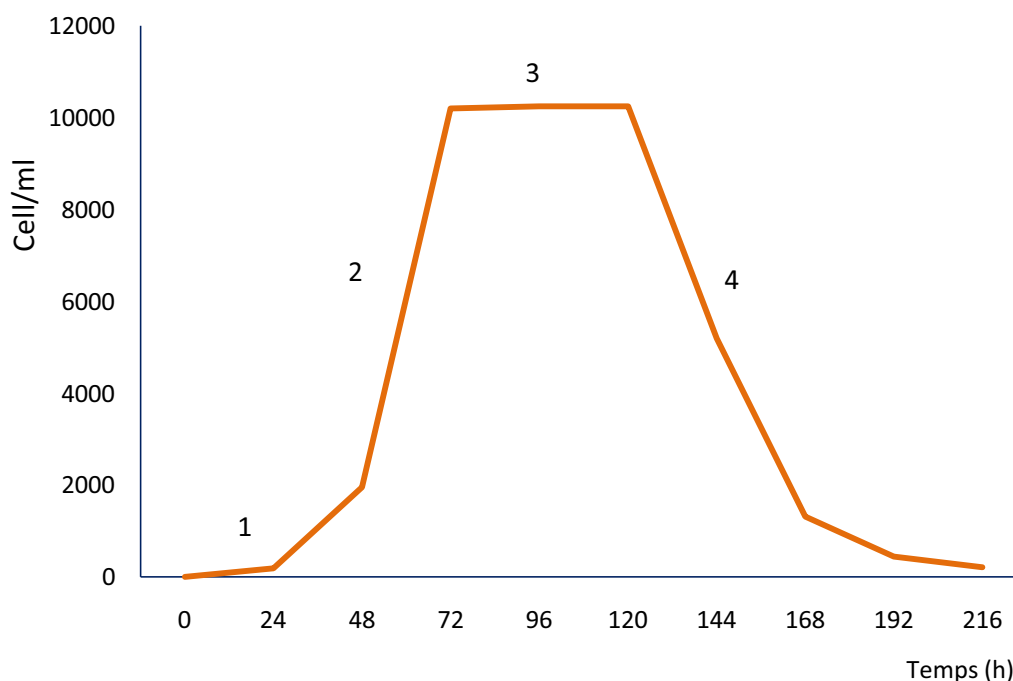


Figure 28 : Modèle de courbe de croissance de *P. tetraurelia* avec les différentes phases.

(T: 30°C; pH: 6).

La deuxième phase est caractérisée par l'intensité des divisions binaires mitotiques (Fig. 29) ; par contre, la troisième phase est caractérisée par l'apparition de la reproduction sexuelle qui s'intensifie à la fin de la phase de stabilité et au début de la phase de déclin (Fig. 30).

Le calcul du temps, le nombre et la vitesse de génération au quatrième jour (à 96h), montre que la population de paramécie double son nombre toutes les 9,6 h avec une vitesse de 0,1 g/h. le nombre de génération à 96 h est de 9,9 g/h.



Figure 29 : Divisions binaires de *P. tetraurelia* durant la phase exponentielle de croissance



Figure 30 : reproduction sexuelle (conjugaison) de *Paramecium tetraurelia* pendant la phase stationnaire de croissance

2. Discussion

L'étude de la cinétique de croissance de *Paramecium tetraurelia* vise à établir un modèle de croissance bien défini mettant en évidence avec précision les différentes étapes d'une courbe spécifique à cette espèce de protozoaires ciliés. Nous nous sommes intéressés à certains paramètres qui ont une influence directe sur l'intensité de la croissance. Ainsi, nous avons testé l'impact de la température, du pH, de la composition et la densité en nutriments dans le milieu de culture que nous avons mis au point sur le rythme général de la croissance des cellules.

L'effet du milieu de culture sur la croissance résulte des différentes interactions de ses composantes; certaines d'entre elles stimulent le processus de développement, d'autres ont une influence directe sur la croissance. L'amélioration du milieu de culture chez la paramécie semble être capitale pour les études en laboratoire pour deux raisons; d'une part, elle augmente la capacité de croissance cellulaire; et d'autre part, elle minimise les coûts des expérimentations. A partir de là, nous avons essayé, dans la présente étude, de développer un nouveau milieu de culture synthétique à partir d'une préparation simple. Les résultats ont montré que le milieu amélioré augmente le nombre des paramécies à la fin de la phase exponentielle de 10^3 cellules à plus de 10^4 cellules par millilitre.

Ainsi, il est clair que la paramécie préfère certaines conditions physico-chimiques bien définies, cependant, l'ampleur de la croissance est très importante dans des températures entre 25°C et 30°C, avec une préférence pour les températures les plus élevées ($\approx 30^\circ\text{C}$).

L'effet de la température sur la paramécie a fait l'objet de nombreuses études. Dès 1924, [Glaser](#) a étudié l'impact de la variation de la température sur les mouvements directs et la vitesse de déplacement de *Paramecium caudatum* en fonction du temps. Ses expériences ont montré que le déplacement des paramécies devient plus rapide avec l'augmentation de la température. [Lee \(1942\)](#) a étudié l'effet de la température sur les formations des vacuoles digestives, il a démontré que celles-ci étaient plus perceptibles sous les températures élevées. D'un autre côté, l'impact des variations de la température sur le type de nage de *Paramecium caudatum* a été étudiée par [Nakaoka et Oosawa \(1977\)](#) qui ont observé que les cellules changeaient leurs directions et nager vers la température optimale (25-30°C).

Ces résultats sont en accord avec ceux de [Karou et al., \(2003\)](#) qui ont montré que la température influait également sur la croissance des bactéries. Ainsi, cinq espèces de bactéries

du genre *Listeria* ont démontré une croissance lente sous une température basse et stimulée à partir de 20°C. La croissance atteint son maximum à une température de 30°C. **Tous ces travaux ainsi que nos résultats semblent confirmer l'étroit lien entre la croissance bactérienne et l'allure de la courbe de croissance des paramécies.**

Dans notre travail, nous avons montré que *Paramecium tetraurelia* ne semble pas sensible aux variations du pH ; cependant, un pH proche de 6 semble stimulant pour la croissance. Selon [Packroff \(2000\)](#), les protozoaires d'eau douce dominant sous un pH acide. Après avoir testé une large gamme de pH, [Heydarnejad \(2008\)](#) a confirmé que le pH optimal pour *Paramecium caudatum* est situé entre 4,6 et 6,7. Il a observé une immobilisation et une mortalité rapide dans un pH de 4 et 10. Selon [Mills, \(1931\)](#), sous un pH acide, les déplacements de paramécies sont accélérés et la formation des vacuoles digestives est intense.

Le rythme de la courbe de croissance dans le modèle établi par nos expériences est comparable à celui des bactéries décrites par [Prescott et al., \(2003\)](#). Les étapes de la courbe de croissance sont les mêmes dans les deux types d'organismes malgré que la croissance bactérienne est plus forte et plus rapide que celle des paramécies de point de vue nombre, vitesse et le temps de génération ([Dreidt et al., 1994](#) ; [Prescott et al., 2003](#)). Un milieu dépourvu de bactéries conduit directement à la réduction du nombre de paramécies. L'intensité de la croissance des paramécies est fortement liée à l'intensité de la croissance bactérienne dans le milieu de culture ; par conséquent, un milieu de culture qui produit plus de bactéries est un milieu très favorable pour les paramécies.

Chapitre II :

Impact d'Amistar Xtra et du Glyphosate sur la croissance et la respiration de *P. tetraurelia*

La croissance constitue avec la reproduction et la survie les critères de base qui peuvent faire d'un organisme un modèle d'étude en écotoxicologie (Flammarion et Péry, 2004). L'accroissement des micro-organismes peut être quantifié par une augmentation de la taille, du poids ou du nombre. Néanmoins, il existe plusieurs agents limitants. Le facteur limitant est celui qui conditionne la vitesse ou l'amplitude d'un phénomène qui dépend de plusieurs autres paramètres (Liebig, 1844).

Généralement, les facteurs écologiques sont utilisés pour décrire, analyser ou modéliser une fonction physiologique d'un organisme biologique. Parmi ces derniers nous on peut citer les facteurs abiotiques (physico-chimiques et pollutions) qui ont des effets directs et rapides sur le développement des organismes vivants (Wehner et Gehring, 1999 ; Branger et al., 2007). Cependant, la compréhension des effets produits par les paramètres conditionnant la croissance d'une espèce donnée semble être primordiale pour son utilisation expérimentale en écotoxicologie (Schopfer, 1935 ; Ershov et al, 1999).

En outre, sachant que de la paroi cellulaire de la paramécie est en contact direct avec le milieu externe, l'influx du xénobiotique et sa présence dans le cytoplasme peut être à l'origine d'une augmentation de radicaux libres oxygénés ou non perturbant le fonctionnement de la mitochondrie et les chaînes respiratoires (Djebar et Djebar 2000 ; Chagra, 2009).

Nous essaierons à travers ce chapitre d'étudier les effets d'Amistar Xtra et du Glyphosate sur la croissance et la respiration de *P. tetraurelia*.

1. Effets d'Amistar Xtra et du Glyphosate sur la croissance

Après avoir testé plusieurs gammes de dilutions des deux pesticides utilisés dans cette étude, nous avons maintenu les concentrations sublétales suivantes : 1, 2, 4, 6 et 8 mg/l pour Amistar Xtra et 50, 60, 70, 80, 90 et 100 mg/l pour le Glyphosate.

La figure (31) montre qu'Amistar Xtra a des effets inhibiteurs sur la croissance des paramécies. Ainsi, l'inhibition est observée dès la concentration 1 mg/l ; par contre, au dessus de 8 mg/l, la croissance des paramécies est totalement inhibée et diminue de manière dose-dépendante.

Les effets inhibiteurs du glyphosate sont également dose-dépendants. Au-delà de 100 mg/l, la croissance des paramécies est totalement inhibée (Fig.32).

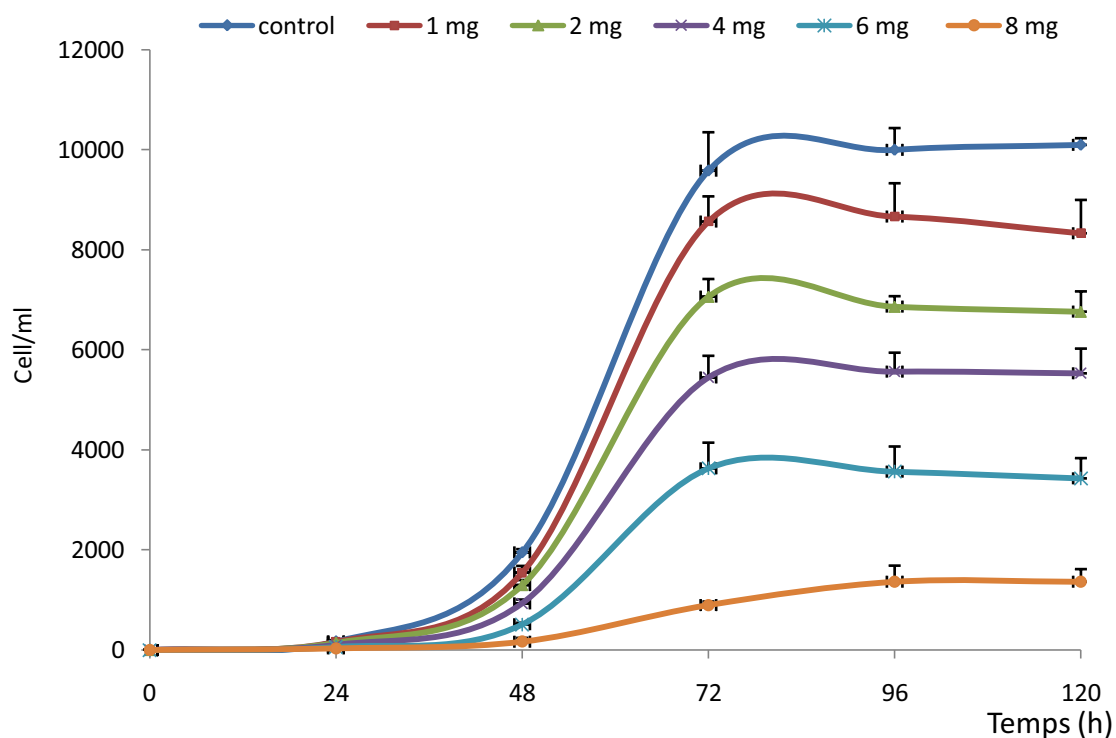


Figure 31: Effets inhibiteurs d'Amistar Xtra sur la croissance de *P. tetraurelia* (T° : 30; pH: 6,5; Densité du milieu : 0,700)

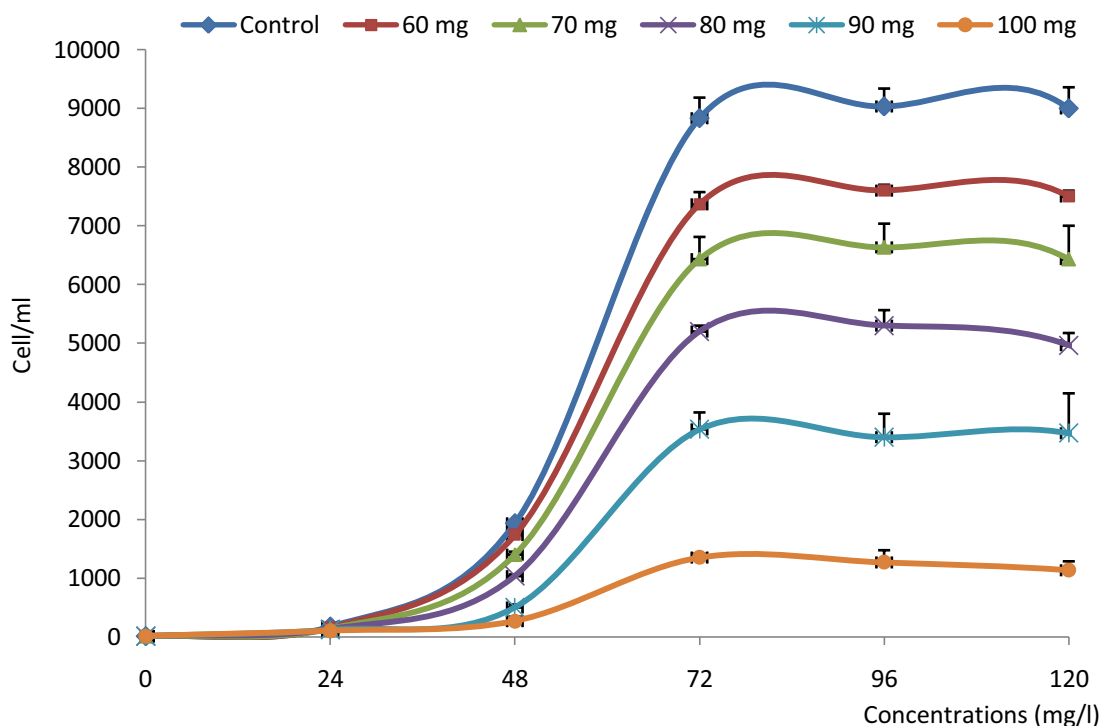


Figure 32 : Effets du glyphosate sur la croissance de *P. tetraurelia*
(T° : 30; pH : 6,5; Densité du milieu : 0,700)

➤ Calcul de la CI_{50}

Le calcul des (CI_{50}) par la méthode des moindres carrés a montré que les concentrations moyennes qui inhibent à 50% la croissance des paramécies sont de l'ordre de 2,23 mg/l pour Amistar Xtra et 91,7 mg/l pour le Glyphosate (Fig. 33).

➤ Pourcentage de réponse

Les effets sur la croissance sont présentés en pourcentage dans les figures 34 et 35. Ces pourcentages reflètent l'inhibition de la croissance chez la population de *Paramecium tetraurelia* pour chaque concentration des deux pesticides.

L'analyse statistique globale par le test *Mood's median* met en évidence des différences significatives entre la croissance des cellules témoins et celles des traitées par les différentes concentrations d'Amistar Xtra ($Chi\text{-Square} = 6,66$ $DF = 5$; $P = 0,247$; $Overall\ median = 1367$) et du Glyphosate ($Chi\text{-Square} = 4,00$ $DF = 5$ $P = 0,549$ $Overall\ median = 1417$). Les comparaisons par paires réalisées par le test *Mann Whitney* révèlent des différences significatives entre les effets des concentrations pour chaque pesticide ($P = 0,0404$).

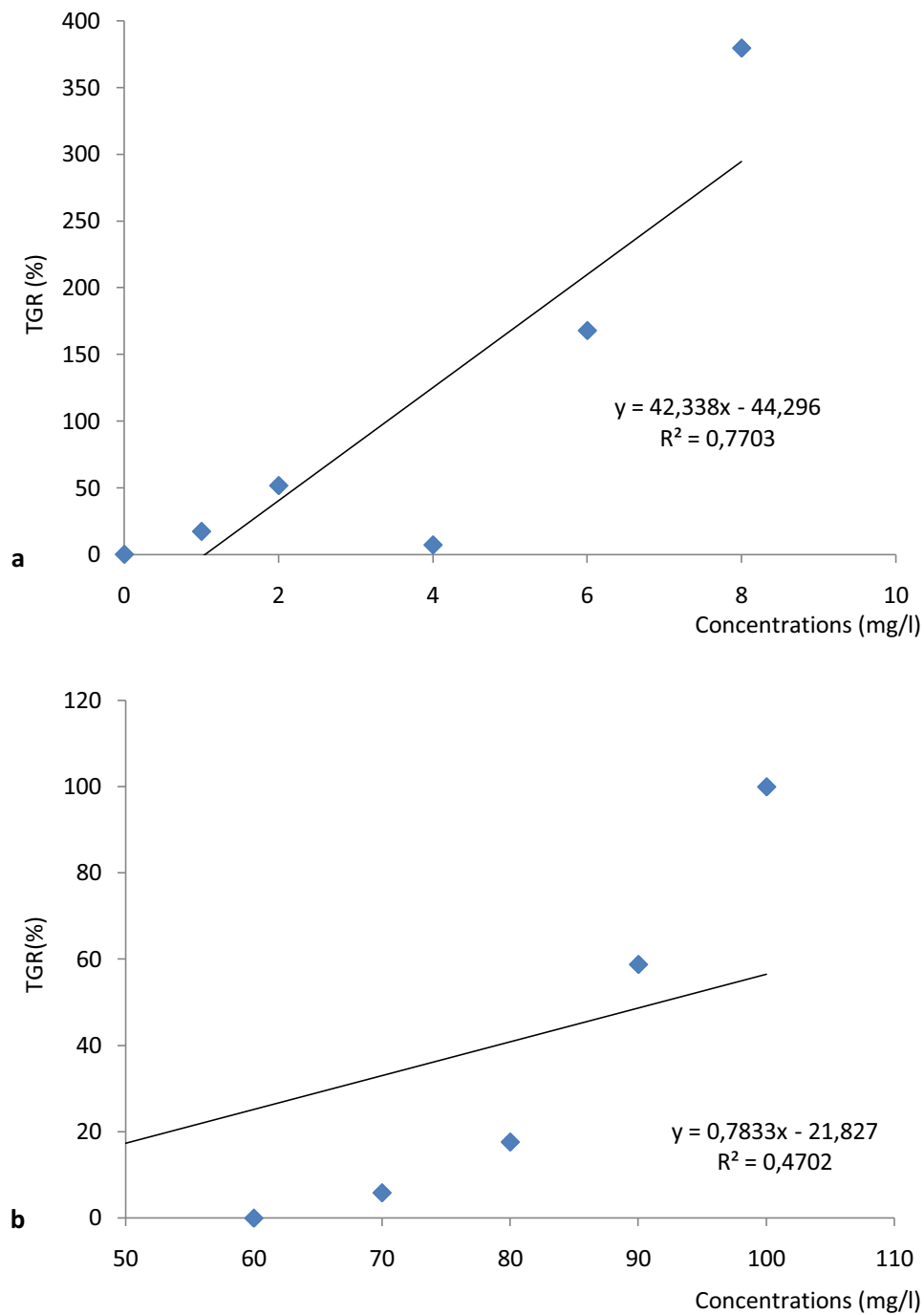


Figure 33: Détermination des concentrations inhibitrices moyennes (CI₅₀) pour la croissance.
(a) : CI₅₀ d'Amistar xtra ; **(b)** : CI₅₀ du Glyphosate

➤ Calcul du temps de génération

Le temps de génération des paramécies témoins est de l'ordre de 9,63 heures ; en revanche, chez les paramécies traitées le temps de génération varie de manière dose-dépendante en

fonction du traitement (Fig. 36 et 37). Ainsi, le temps de génération peut aller au-delà de 13 heures chez les paramécies traitées par les fortes concentrations d'Amistar xtra et du Glyphosate. De plus, la vitesse et le nombre de génération diminuent de manière inversement proportionnelle aux concentrations des xénobiotiques. Pour les faibles concentrations les effets des deux biocides sur le temps, la vitesse et le nombre de génération, semblent moindres et proches de ceux des témoins.

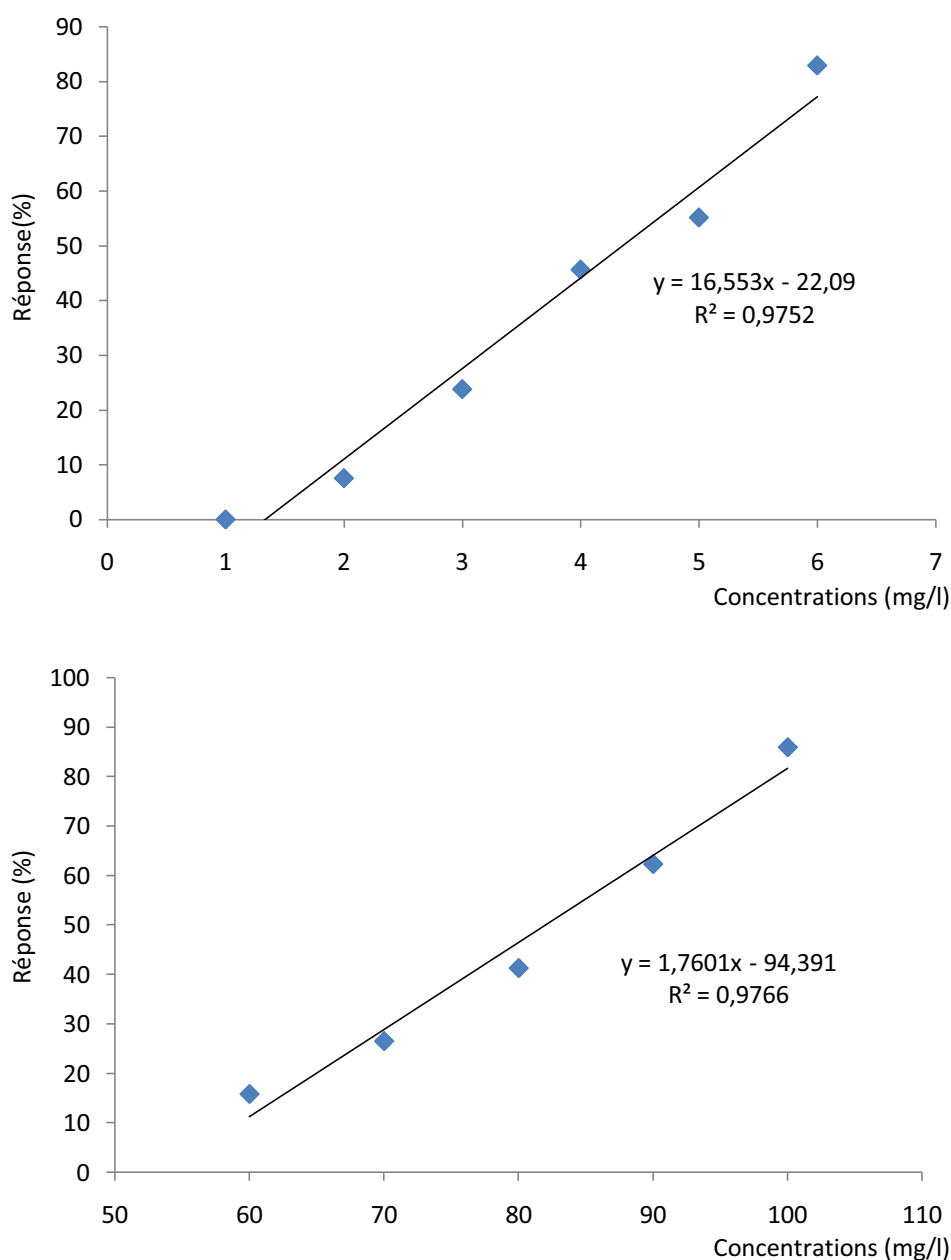


Figure 34 : Pourcentage de réponse de *P. tetraurelia* par concentration d'Amistar Xtra (a) et du Glyphosate (b).

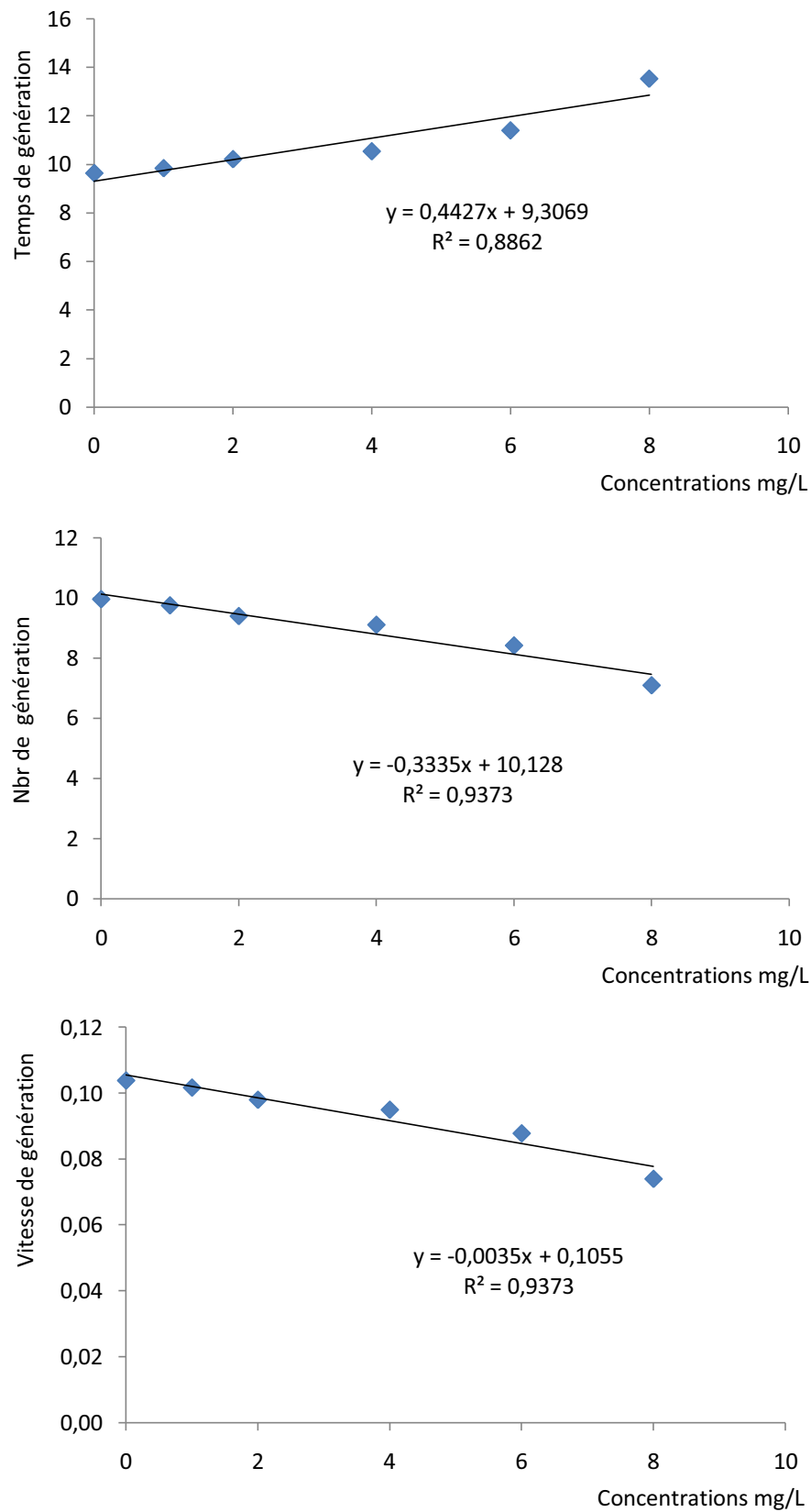


Figure 35 : Effets d'Amistar Xtra sur le temps, le nombre et la vitesse de génération de *P. tetraurelia*

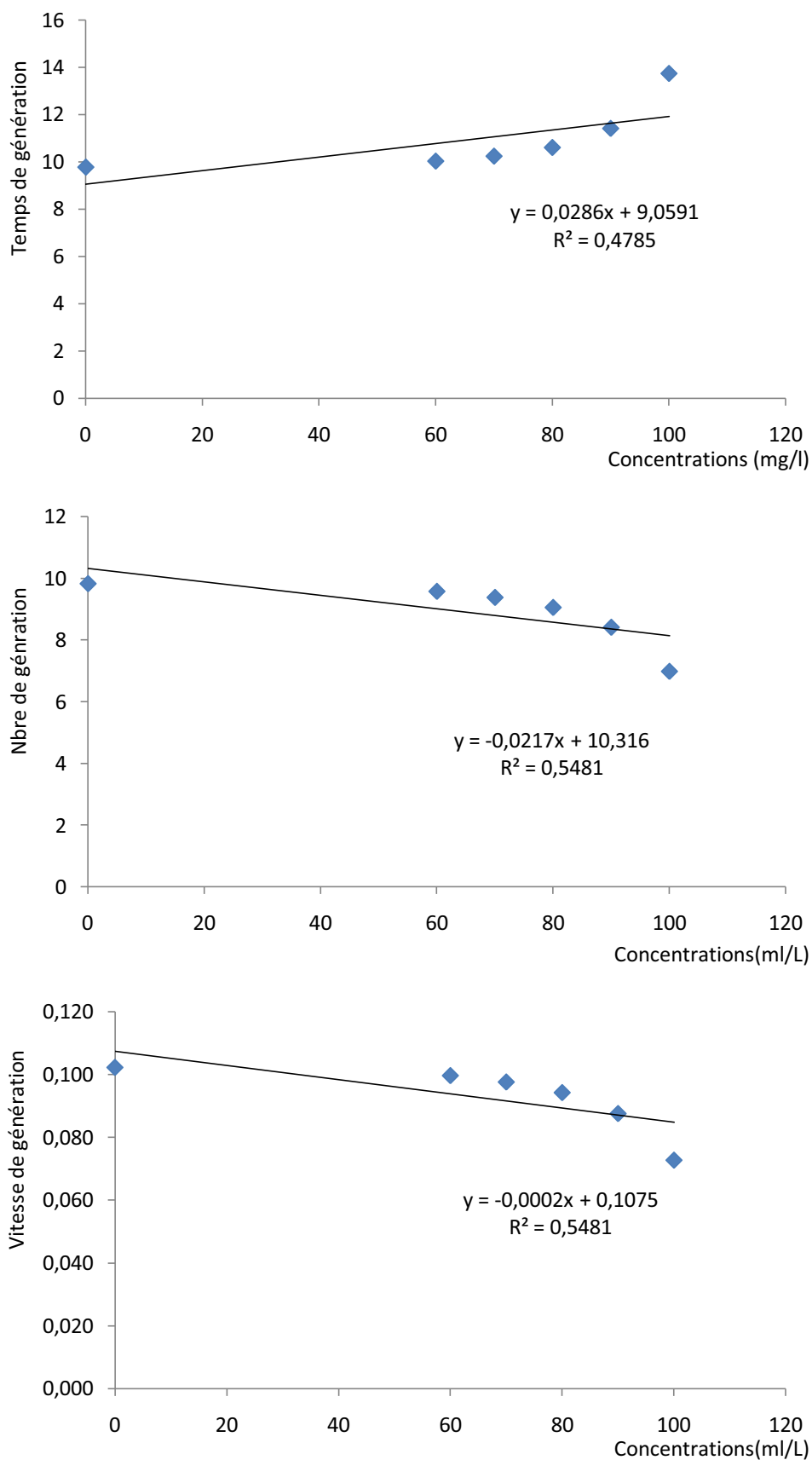


Figure 36 : Effets du Glyphosate sur le temps, le nombre et la vitesse de génération de *P. tetraurelia*

2. Impact d'Amistar xtra et du Glyphosate sur la respiration

L'étude polarographique en présence d'Amistar Xtra et du Glyphosate, a mis en évidence un effet inhibiteur de l'activité respiratoire (Fig. 37.a et 38.a). Ainsi Mis à part la stimulation de la respiration observée pour la plus faible concentration de Glyphosate (60 mg/l), nous constatons que l'inhibition est dose-dépendante et ce pour les deux molécules (Fig. 37.b et 38.b). Le calcul du pourcentage de l'intensité respiratoire à partir de la quantité d'oxygène mesurée pendant 5 minutes, montre qu'en présence d'Amistar Xtra, à la une concentration de 8 mg/l, le pourcentage de l'intensité respiratoire diminue à 54,05% (Fig. 37.b) ; cette valeur est relativement élevée si on la compare avec celle du Glyphosate qui provoque, à une concentration de 100 mg/l, une diminution de 27,69 % de l'intensité respiratoire par rapport aux témoins (Fig.38.b).

➤ Calcul de la CI_{50}

Le calcul des (CI_{50}) a montré que la concentration moyenne qui inhibe 50% de la respiration des paramécies est de l'ordre de 2,78 mg/l pour Amistar Xtra et 194,36 mg/l pour le Glyphosate (Fig. 39).

L'analyse statistique globale concernant l'inhibition de la respiration, réalisée par le test *Kruskal-Wallis* à un niveau de signification de 5% ($\alpha=0,05$), révèle des différences significatives entre les pourcentages d'inhibition par Amistar Xtra ($H = 15,77$ $DF = 5$ $P = 0,008$) et par le glyphosate ($H = 14,42$ $DF = 5$ $P = 0,013$). Les comparaisons par paires entre concentrations pour chaque pesticide sont résumées dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : Comparaisons des effets d'Amistar Xtra sur la respiration des paramécies (valeurs de "p" après comparaisons par paires par le test Mann Whitney pour un intervalle de confiance de 95 % et $\alpha = 0,05$). Les valeurs en gras ne sont pas significatives.

	1 mg/l	2 mg/l	4 mg/l	6 mg/l	8 mg/l
1 mg/l	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
2 mg/l	0,0404	-	0,1376	0,0404	0,0404
4 mg/l	0,0404	0,1376	-	0,1914	0,0404
6 mg/l	0,0404	0,0404	0,1914	-	0,0952
8 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0952	-

Tableau 6 : Comparaisons des effets du Glyphosate sur la respiration des paramécies (valeurs de "p" après comparaisons par paires par le test Mann Whitney pour un intervalle de confiance de 95 % et $\alpha = 0,05$). Les valeurs en gras ne sont pas significatives.

	60 mg/l	70 mg/l	80 mg/l	90 mg/l	100 mg/l
60 mg/l	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
70 mg/l	0,0404	-	0,1914	0,0404	0,0404
80 mg/l	0,0404	0,1914	-	0,5000	0,0404
90 mg/l	0,0404	0,0404	0,5000	-	0,1914
100 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,1914	-

3. Discussion

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 et la pollution en général peuvent affecter la croissance en prolongeant le temps des divisions cellulaires (Durand, 1994).

En effet, les espèces appartenant au genre *Paramecium* sont des organismes sensibles à la pollution (Matsubara et al., 2006 et Mortuza et al., 2010). Plusieurs études ont montré que différents types de biocides ont des effets inhibiteurs et toxiques sur les ciliés d'eau douce, ces effets sont perceptibles au niveau de la population en réduisant le nombre de cellules et au niveau cellulaire par des modifications structurelles, physiologiques et comportementales (Takiguchi, 2002 ; Garad et al., 2007 ; Venkateswara et al., 2006 ; Rouabhi et al., 2009 ; Sbartai et al., 2009).

Dans cette partie de notre travail, nous nous proposons de discuter les résultats concernant les effets des deux pesticides choisis sur la croissance et le métabolisme respiratoire des paramécies.

▪ Cas du Glyphosate

Il a été démontré que différents herbicides à base de Glyphosate ralentissaient le cycle des divisions cellulaires chez l'embryon d'oursin (Marc et al., 2004). Plusieurs études ont montré la capacité du Glyphosate à inhiber la croissance et la reproduction sexués des champignons (Coupland et Caseley, 1979 ; Gossbard, 1985 ; Lévesque et Rahe, 1987 Kawate et Kawate, 1992).

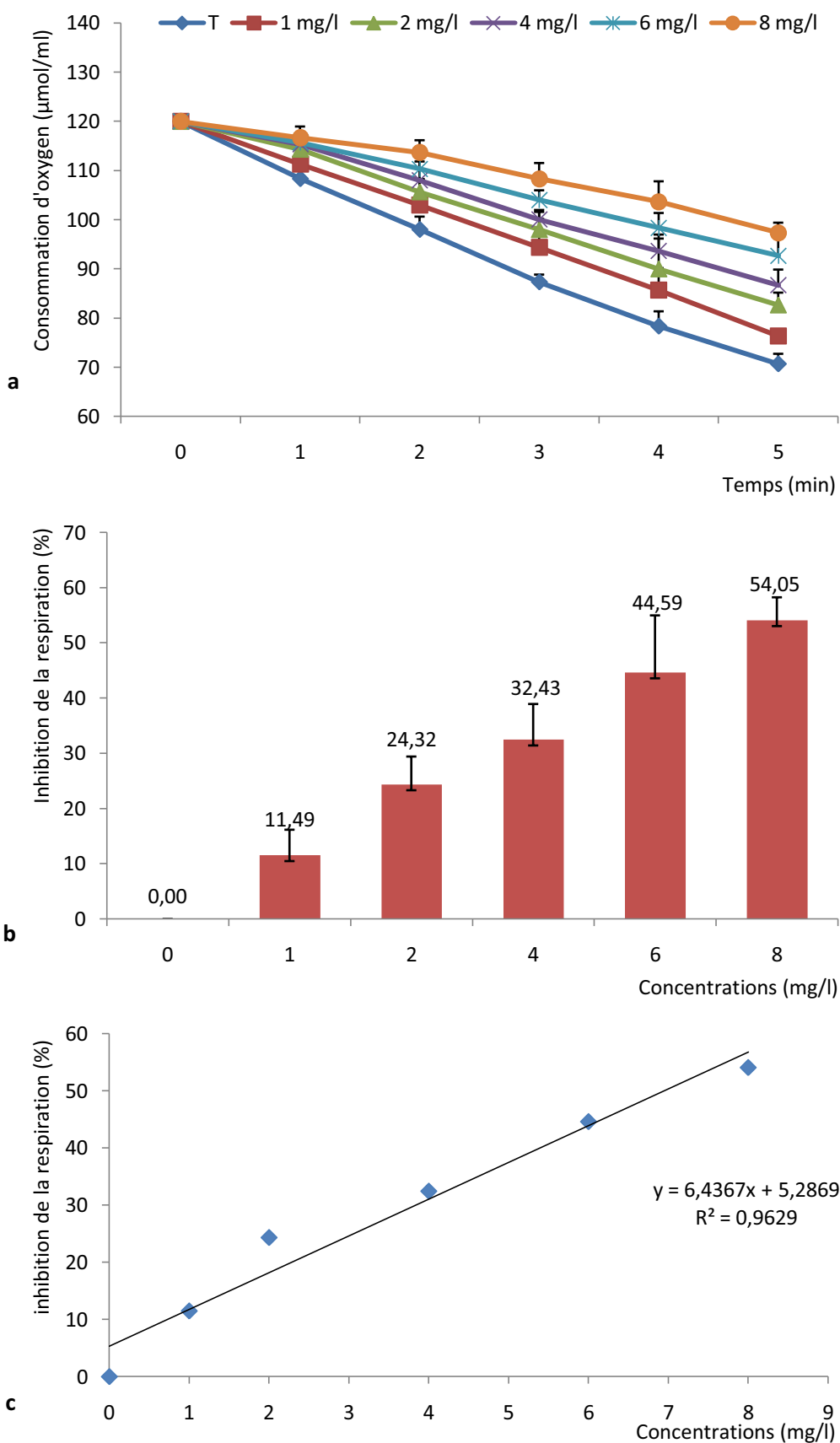


Figure 37 : Effets inhibiteurs d'Amistar Xtra sur l'intensité respiratoire de *P. tetraurelia*. (a) : consommation d'O₂, (b) : inhibition de la respiration (c) : corrélation entre le pourcentage d'inhibition et les concentrations.

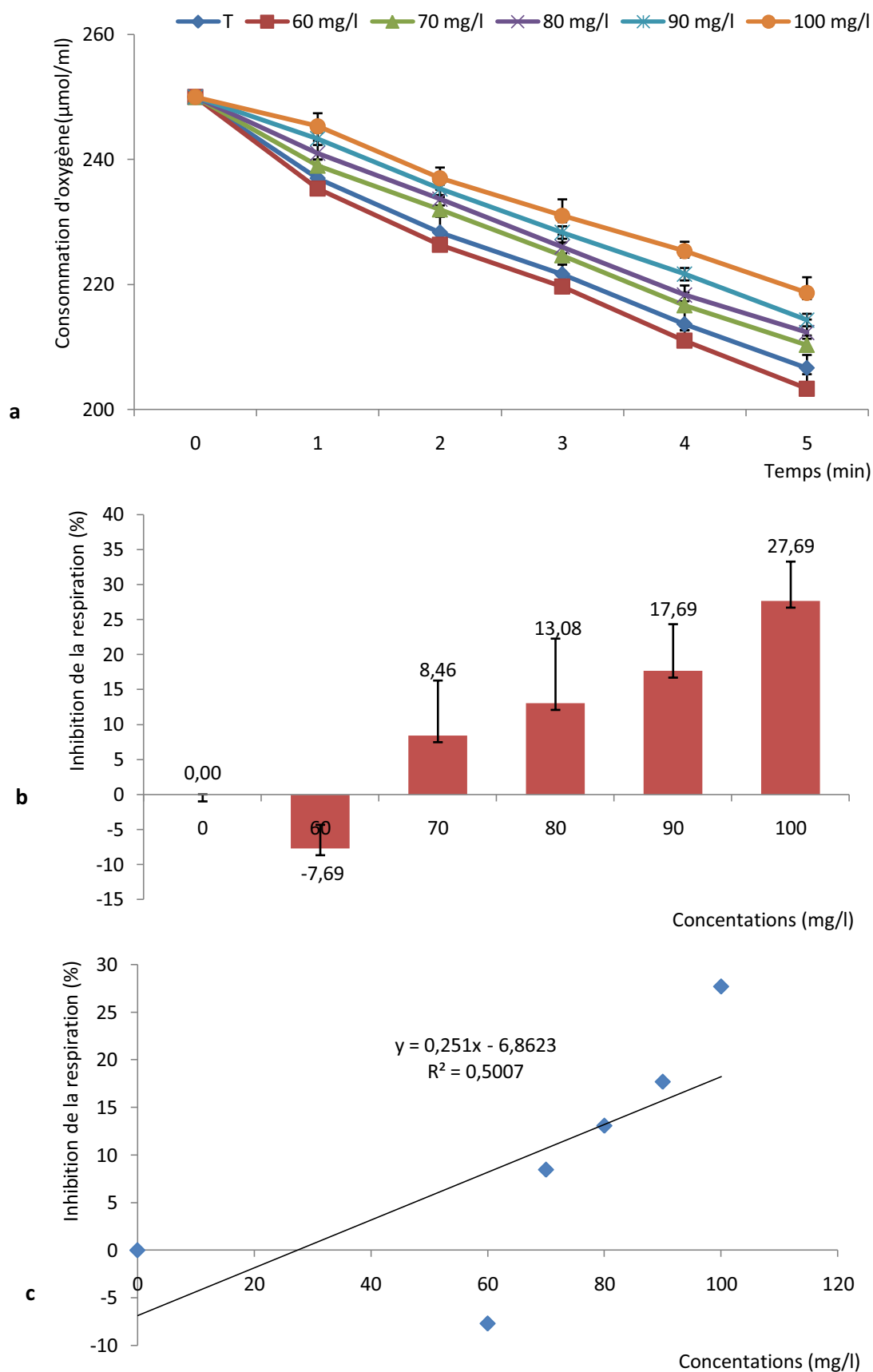


Figure 38 : Effets inhibiteurs du Glyphosate sur l'intensité respiratoire de *P. tetraurelia*. (a) : consommation d'O₂, (b) : inhibition de la respiration, (c) : corrélation entre le pourcentage d'inhibition et les concentrations.

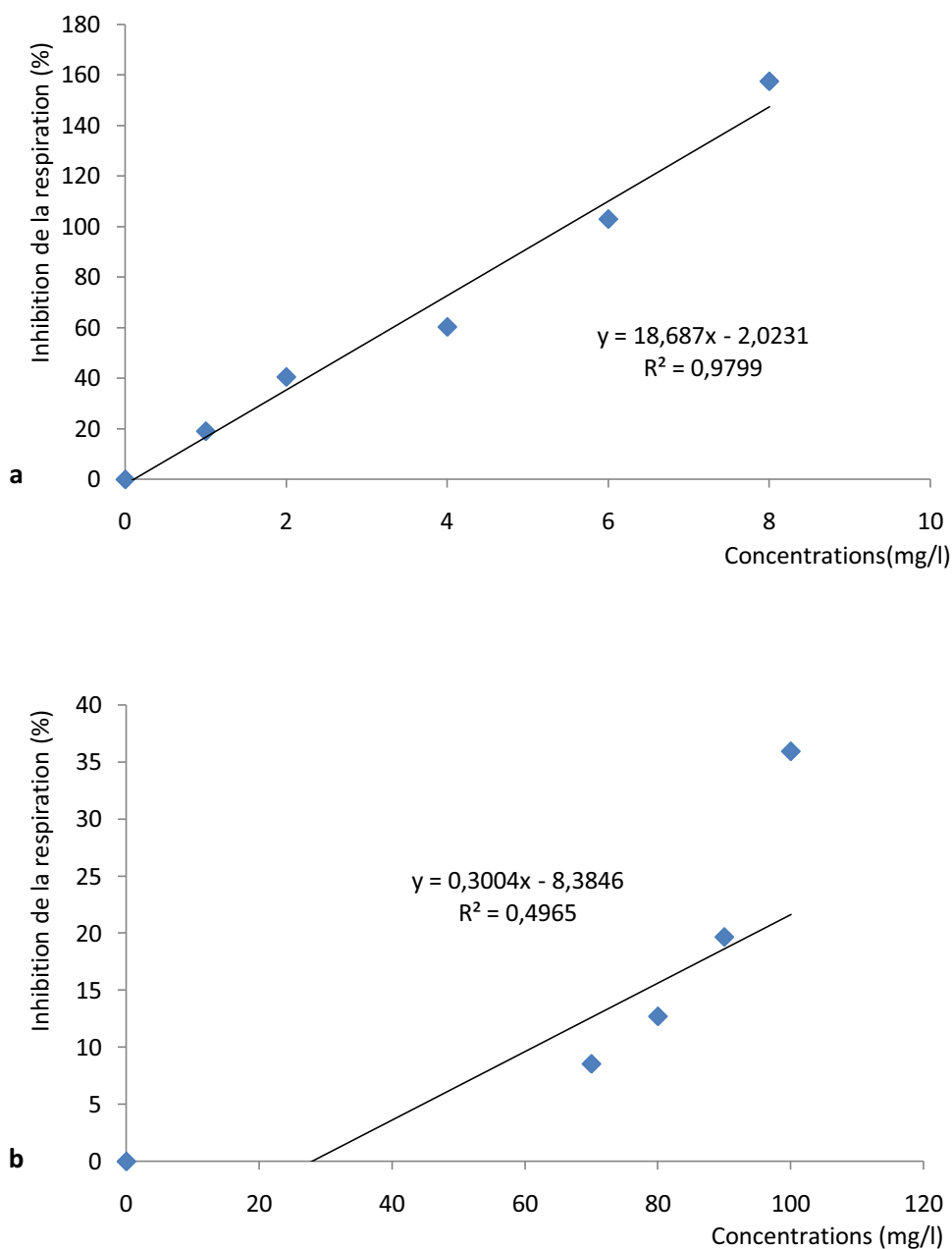


Figure 39: Détermination des concentrations inhibitrices moyennes (CI_{50}) pour la respiration.
(a) : CI_{50} d'Amistar xtra ; **(b)** : CI_{50} du Glyphosate

Les études sur la toxicité aiguë chez les rats et les lapins ont montré que le Glyphosate est pratiquement non toxique par ingestion et non irritant pour la peau mais, il peut provoquer une irritation des yeux chez le lapin et certaines formulations peuvent présenter une toxicité aiguë par inhalation (*Monsanto Company, 1985 ; Weed Science Society of America, 1994*).

Le Glyphosate est légèrement toxique pour les oiseaux sauvages (Kidd et James, 1991), non toxique pour les poissons et légèrement toxique pour les invertébrés (*Weed Science Society of America*, 1994). Chez les poissons, La CL₅₀ pendant 96 heures est estimée à 120 mg/l chez le crapet arlequin, 168 mg/l chez l'arlequin, et 86 mg/l chez la truite arc en ciel (*Weed Science Society of America*, 1994). Pour les autres groupes aquatiques, les valeurs des CL₅₀ rapportées chez les invertébrés sont plus de 10 mg/l chez les huitres, 934 mg/l chez le crabe et 281 mg/l pour les crevettes. Concernant les daphnies, la CL₅₀ après 48 h d'exposition est de 780 mg/l (*Weed Science Society of America*, 1994).

Selon une étude effectuée par Choquette (1987), le seuil d'effet retenu pour les micro-organismes du sol en général est de 50 ppm. Cette dose influence la croissance des colonies sans toutefois détruire les populations. Les essais réalisés en milieu naturel démontrent plutôt que les micro-organismes (champignons, actinomycètes et bactéries) augmentent dans les sols traités au glyphosate, suggérant ainsi son utilisation comme substrat (Quilty et Geoghegan, 1974 ; Grossbard, 1985).

Doliner (1991), montre que le Glyphosate a un impact limité sur les micro-organismes du sol. Bien qu'il ait un effet inhibiteur en laboratoire. Cet effet sélectif et variable serait dû à la dose qui serait supérieure à celle utilisée en agriculture Grossbard (1985).

Un seuil d'effet de 2 ppm a été retenu pour les microorganismes aquatiques. Les études effectuées en laboratoire ont montré que les algues par exemple ne réagissent pas toutes de la même façon. Les cyanobactéries semblent généralement plus sensibles au Glyphosate, quoique cette sensibilité varie beaucoup d'une espèce à l'autre. La croissance d'une espèce appartenant au genre *Aphanocapsa* est inhibée de 50 % en présence de 2 mg/l alors que pour obtenir une réaction analogue chez une autre espèce appartenant au même genre, il faut 100 mg/l (Hutber et al., 1979; Trotter et al., 1990).

Tooby (1985), confirme qu'il est difficile d'évaluer les risques à partir des expériences de laboratoire puisque, ils ne tiennent pas en compte de l'adsorption du produit aux sédiments qui réduisent rapidement la disponibilité biologique du Glyphosate en solution.

A travers la comparaison de nos données avec celles de la littérature, il s'est avéré que les effets du Glyphosate sont contradictoires. Les résultats, obtenus dans cette partie de notre travail, montrent que cet herbicide inhibe la croissance de *Paramecium tetraurelia*. Le

pourcentage de réponses est fortement corrélé à l'augmentation des concentrations ($R^2 = 0,97$) avec une CI_{50} de l'ordre de 91,70 mg/l. d'un autre côté, nous avons enregistré une augmentation du temps de génération et une diminution de la vitesse et du nombre de générations des paramécies.

Selon [Monsanto Company \(1985\)](#), les différences des concentrations létales moyennes chez les mêmes espèces traitées par un pesticide sont dues à certains composants et agents de surface utilisés dans la formulation.

Devant l'absence de données concernant l'effet du Glyphosate sur le métabolisme respiratoire, les travaux concernant cet aspect, ont mis en évidence une inhibition de la respiration cellulaire en présence de xénobiotiques par la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale. C'est ainsi que [Chagra et al. \(2009\)](#) a mis en évidence la perturbation de la photophosphorylation oxydative chez des mitochondries isolées de *Solanum tuberosum* traités par le cadmium. D'un autre côté, [Sbartai et al. \(2009\)](#) et [Benbouzide et al. \(2012\)](#) ont également montré une inhibition de la respiration des paramécies en présence de Bifenazate et Phosphoramidate. Tous ces travaux sont en accord avec nos résultats en effet nous avons mis en évidence une inhibition du métabolisme respiratoire des paramécies particulièrement aux fortes concentrations du Glyphosate. La concentration inhibitrice moyenne (CI_{50}) de la respiration est de 194,36 mg/l. Ce résultat rend compte d'une perturbation de l'activité respiratoire probablement via l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Ces résultats suggèrent la libération de radicaux libres au niveau mitochondrial perturbant ainsi la respiration cellulaire.

▪ **Cas d'Amistar Xtra**

Ce pesticide, nouveau et récemment introduit en Algérie, a fait l'objet de nombreuses études sur divers organismes. Il est composé de deux molécules actives à savoir l'azoxystrobine et le cyproconazole. Ainsi, Selon [Syngenta \(2007\)](#), La formule d'amistar xtra est très toxique pour les organismes aquatiques, la concentration létale concernant *Daphnia magna* après 48h d'exposition est de l'ordre de 0,83 mg/l. Concernant les algues, la CE_{50r} (median effective concentration on growth rate) est de l'ordre de 3,87 mg/l pour *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Des études écotoxicologiques ont montré que l'azoxystrobine est peu toxique pour les oiseaux, légèrement toxique pour les invertébrés terrestres et hautement toxique pour les organismes aquatiques. Il est également toxique pour les algues, les lentilles d'eau et les diatomées (Syngenta, 2007 ; Warming et al., 2009). Par contre, le cyproconazole est modérément toxique pour les oiseaux et légèrement toxique pour la faune aquatique Syngenta (2007).

Nos résultats abondent dans le même sens que ceux cités précédemment concernant les organismes aquatiques, puisque nous avons mis en évidence une inhibition de la croissance de *P. tetraurelia* avec un pourcentage de réponse fortement positif ($R^2 = 0,97$) et une CI_{50} de l'ordre de 2,23 mg/l confirmant ainsi une forte toxicité de ce pesticide.

D'un autre côté, nous avons mis en évidence une inhibition du métabolisme respiratoire des paramécies particulièrement aux fortes concentrations du pesticide avec une CI_{50} de l'ordre de 2,78mg/L. Selon Avila-Adame et Köller (2003), l'Azoxystrobine (une des deux molécules d'Amistar Xtra) est toxique à travers l'inhibition de la respiration mitochondriale. Cette inhibition serait due à un effet sur le processus de transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire provoquant la diminution du taux de production d'énergie entraînant la mort cellulaire.

Par ailleurs, la persistance de l'activité respiratoire observée chez les paramécies traitées par les deux pesticides serait peut être due à l'induction d'une voie alternative (Olaya et Kller, 1999 ; Olaya et al., 1998), permettant aux paramécies de croître à des doses élevées en fongicide. L'enzyme clef de cette voie est l'oxydase alternative (AOX) caractéristique des végétaux et qui existe chez les protistes et certains animaux (Sluse et Jarmuszkiewicz, 1998 ; McDonald et Vanlerberghe, 2004). Cette voie alternative permet le transfert directement des électrons du pool ubiquinone (Q) réduit à l'oxygène sans passer par les complexes III et IV inhibés par l'azoxystrobine (Fig. 40).

Les caractéristiques biochimiques des AOX des microorganismes sont très différentes de celles des plantes. Les Nucléotides puriques, tels que AMP, ADP, GMP et IMP, ont montré une activité stimulante de l'AOX de *Moniliella tomentosa* (Vanderleyden et al., 1980a) *Neurospora*

crassa (Vanderleyden et al., 1980b), *Paramecium tetraurelia* (Doussiere et Vignais, 1984) et *Hansenula anomala* (Sakajo et al., 1997).

Plusieurs études ont montré que l'expression des gènes de l'AOX est induite par les inhibiteurs de la respiration et les ROS tel que l' H_2O_2 et les ions des radicaux superoxydes (Minagawa et al., 1992 ; Wagner, 1995 ; Huh et Kang, 2001). L'induction des AOX par les ROS contribue à l'hypothèse qui implique les AOX dans le mécanisme de défense antioxydante par le maintien du pool ubiquinone suffisamment oxydé par l'empêchement de l'autoxydation des ubiquinones réduits et la formation ultérieure des ROS, quand le flux d'électrons à travers la voie du cytochrome devient limité (Wagner et Moore, 1997).

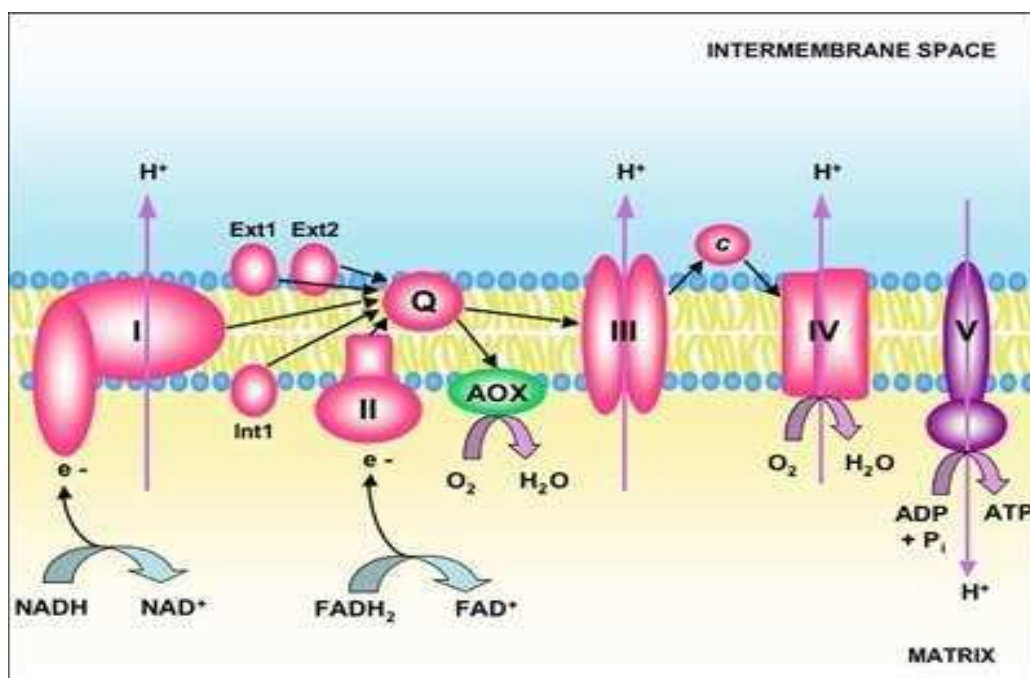


Figure 40 : Représentation de la chaîne respiratoire de *Podospora anserina*

Complex I: NADH déshydrogénase, **complex II**: succinate déshydrogénase, **complex III**: cytochrome *bc1*, **complex IV**: cytochrome *c* oxydase, **complex V**: ATPase, **Q**: pool ubiquinone, **AOX**: oxydase alternative, **c**: cytochrome *c*, **Ext1 and Ext2**: NAD(P)H déshydrogénases externes. La voie des cytochromes utilise les complexes I, II, III and IV. Le transfert d'électrons *via* les complexes I, III and IV est couplé à la sortie de protons à travers la membrane interne, de la matrice à l'espace intermembranaire. Le gradient de protons qui en résulte permet la synthèse d'ATP par le complexe V. Si le flux de protons *via* la voie des cytochromes est empêché, il est diverti vers l'oxydase alternative branchée au niveau du pool des quinones. Quand seule cette voie alternative est utilisée, il y a perte de sites potentiels de couplage.

Chapitre III :

Malformations et dommages structurels

La morphologie des paramécies (fig. 41) résulte de l'interaction spécifique de la membrane cellulaire et du cytosquelette (un réseau de fibres qui se trouve et qui parcourt le cytoplasme). Le cortex de la plupart des protozoaires ciliés contient un squelette membranaire dont le principal élément est l'épiplasme (une structure apposée à la membrane alvéolaire interne) qui est composé d'une famille multigénique de protéines appelées épiplasmiques (Soulas, 2011).

Un des plus importants rôles du cytosquelette est d'apporter un soutien mécanique à la cellule. Il est aussi responsable du courant cytoplasmique par lequel voyagent les vésicules. Le cytosquelette est constitué de trois sortes de fibres, les microtubules, les filaments intermédiaires et les microfilaments. En effet, l'interaction cytosquelette-membrane contribue à l'édification et à la stabilisation de la morphologie cellulaire comme il permet à la cellule de changer de forme (Soulas, 2011).

Cette interaction cytosquelette-membrane peut être altérée sous l'effet de certains agents physiques ou chimiques, suggérant des dommages structuraux au niveau de la membrane et le cytosquelette (Stevens et Lowe, 1997). Ces effets se traduisent par des changements de formes et par l'apparition de bourgeonnements au niveau de la membrane plasmique conduisant à la mort cellulaire (Friedl, et Wolf, 2003).



Figure 41 : Morphologie normale d'une cellule de *Paramecium tetraurelia*.
Photo prise par microscope optique (leica)

1. Modifications morphologiques et structurels

1.1. Taux de malformations

La [figure 42](#) montre que le traitement par les deux pesticides provoque un fort taux de malformations particulièrement marquées en présence du Glyphosate. L'intensité de ces malformations est dose-dépendante. Les comparaisons statistiques générales sont plus significatives pour le Glyphosate ($H = 15,97$ $DF = 5$ $P = 0,007$) que pour Amistar Xtra ($H = 14,70$ $DF = 5$ $P = 0,012$).

1.2. Malformations structurelles

Les observations microscopiques des paramécies exposées à Amistar Xtra et au Glyphosate ont mis en évidence un grand nombre de spécimens présentant des anomalies de forme ([Fig. 43](#)) dont l'intensité et le nombre augmentent en fonction des concentrations du Glyphosate (à partir du 80 mg/l) ; en revanche, en présence de l'Amistar Xtra nous n'avons noté que très peu de malformations même aux plus fortes concentrations du pesticide.

Ces malformations se caractérisent par des formes asymétriques ([Fig. 43.a,c,e](#)) et des augmentations de volume ([Fig. 43.b](#)). Dans certains cas, nous avons observé la formation d'une grande tache claire au milieu de la cellule, entourée par une bande dense à la périphérie entraînant un changement de forme des paramécies qui deviennent sphériques avec des extrémités plus pointues ([Fig. 44](#)).

De plus, nous avons également observé au cours de la phase exponentielle de croissance des divisions inégales des paramécies ([Fig. 48.b](#)), plus marquées chez les paramécies traitées par le Glyphosate et inexistantes chez les témoins.

1.3. Atteintes membranaires et éclatement cellulaire

Au niveau de la membrane cellulaire, nous avons observé des atteintes membranaires ayant entraîné des ruptures causant l'éclatement de la cellule ([Fig. 45](#)). Nous avons également observé des petites vésicules claires de tailles variables apparaissant autour de la paroi cellulaire pouvant se détacher et flotter ([Fig. 46](#)). Suite à cela, l'ectoplasme et le contenu de la cellule diffusent lentement entraînant l'éclatement des vésicules ([Fig. 46. c,e,f](#)) jusqu'à la cytolysse complète ([Fig. 47](#)). Les paramécies témoins restent intactes et ne présentent aucune altération.

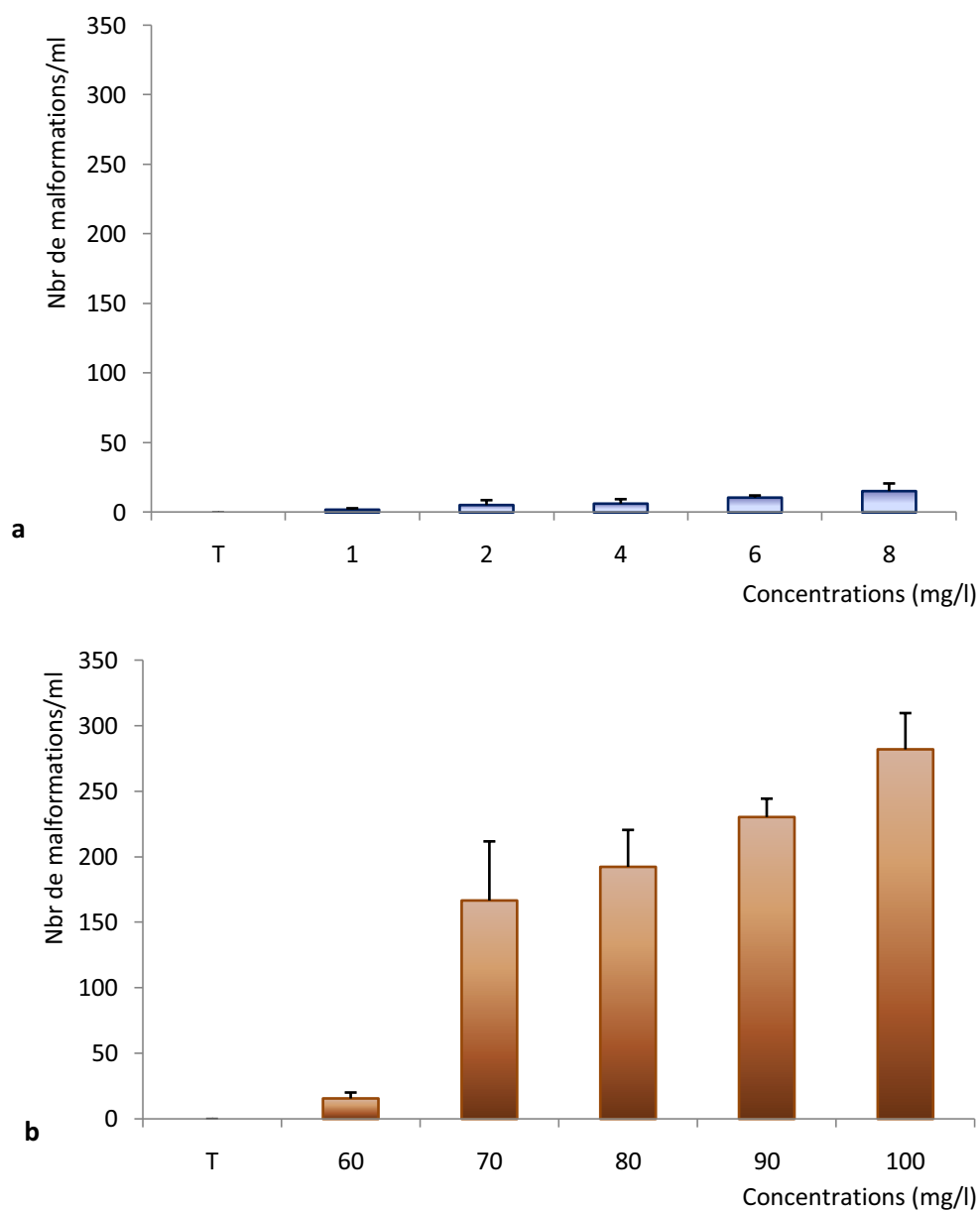


Figure 42 : Taux de malformations induites par Amistar Xtra (**a**) et par le Glyphosate (**b**)

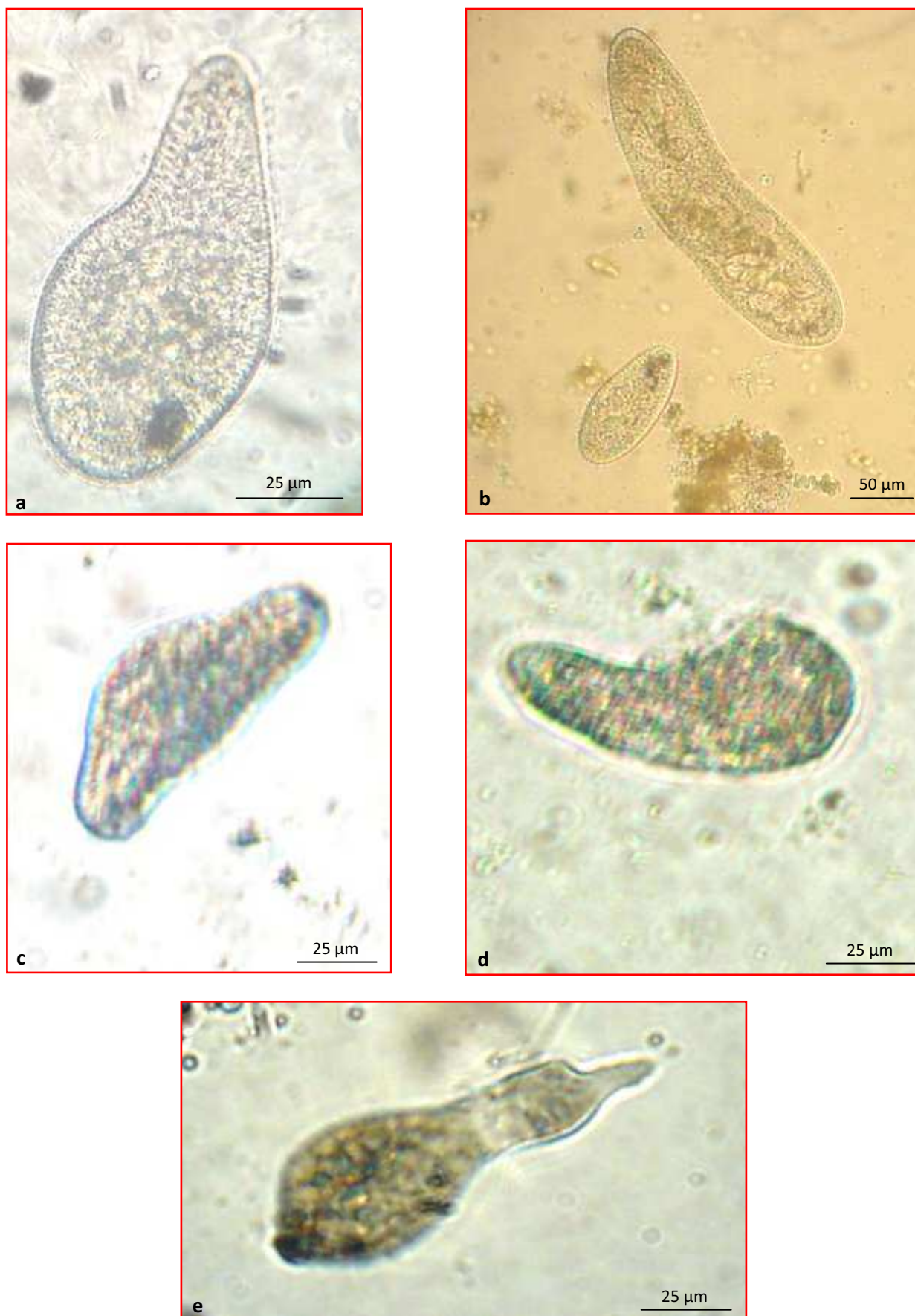


Figure 43 : Anomalies morphologiques induites par Amistar Xtra et le Glyphosate



Figure 44 : Formation des taches claires centrales après traitement par le Glyphosate. Le contenu de la cellule est excentré à la périphérie.

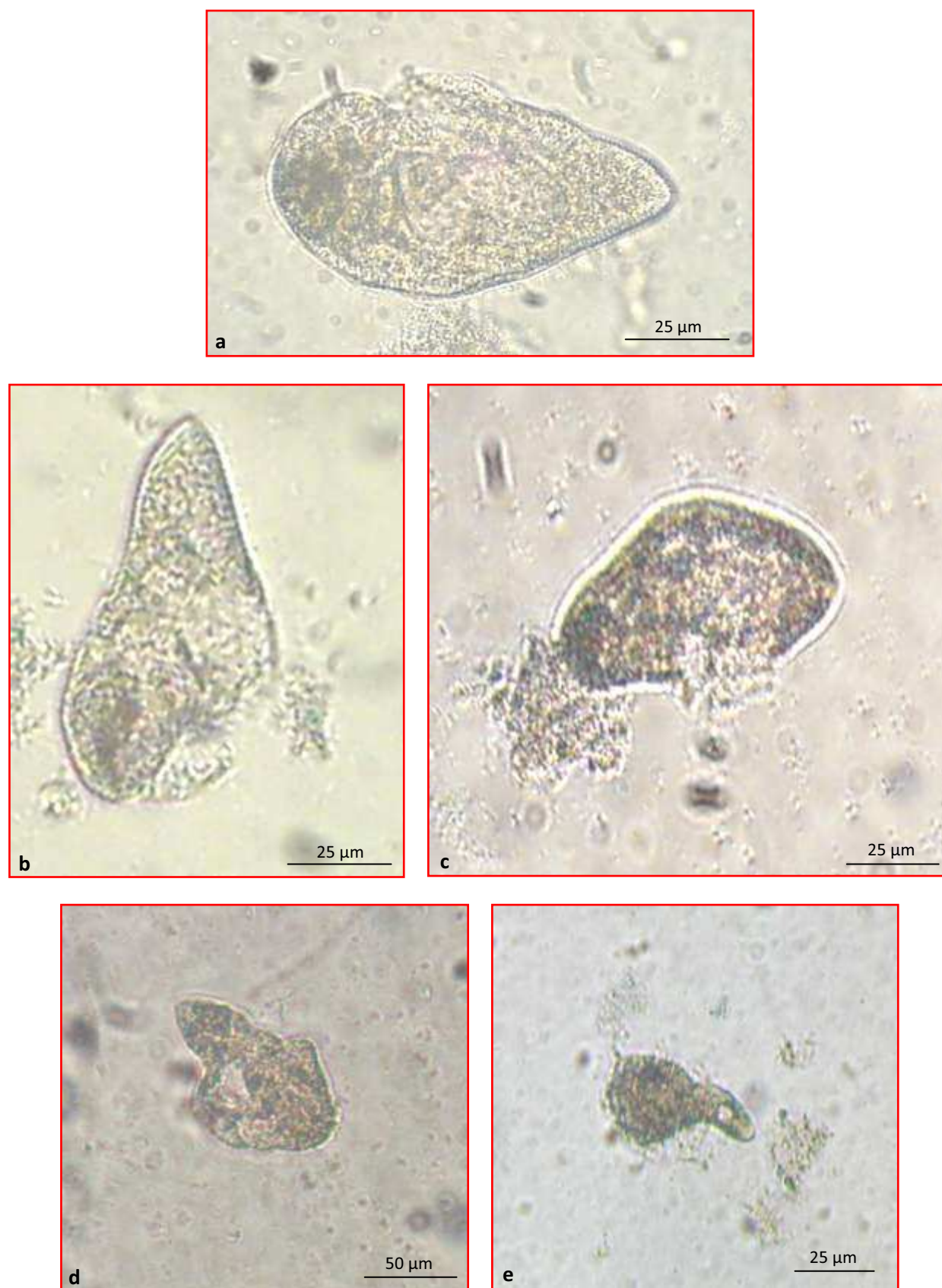


Figure 45 : Atteintes membranaires après traitement par les fortes concentrations du Glyphosate

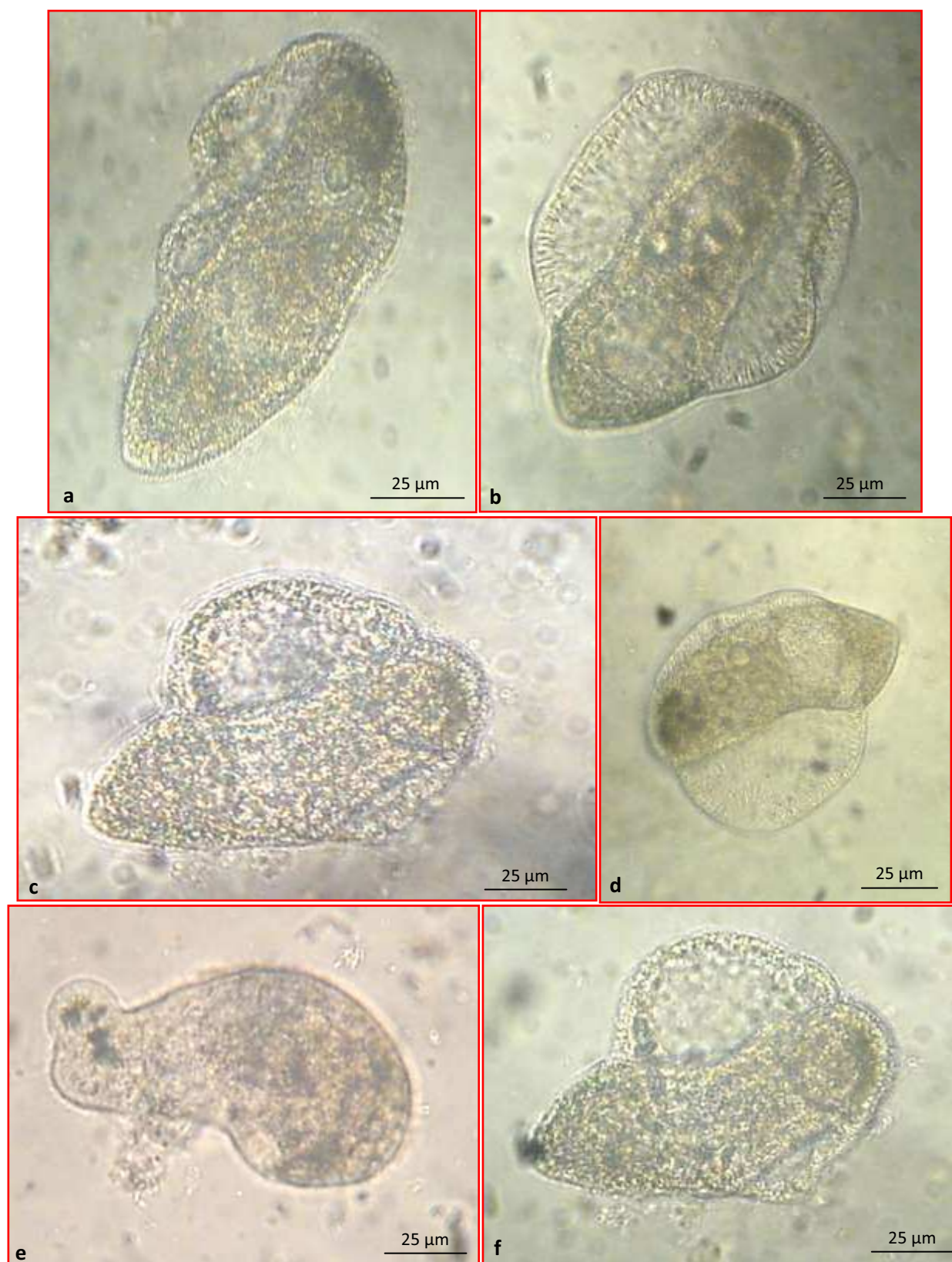


Figure 46 : Formation de vésicules et de bourgeonnement au niveau de la membrane cellulaire.

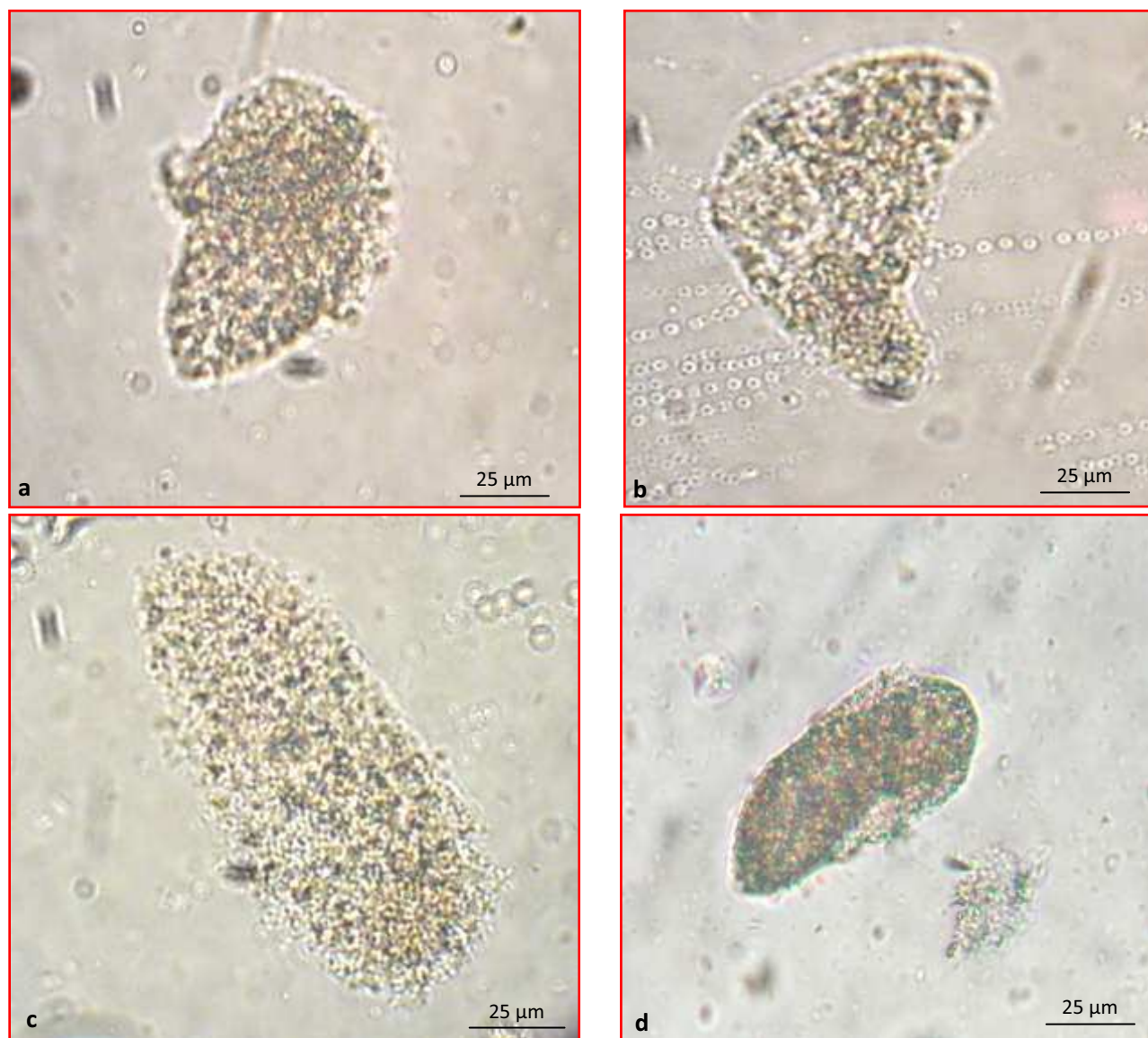


Figure 47 : Dissolution complète et apoptose des cellules de *P. tetraurelia*



Figure 48 : Anomalies lors des divisions cellulaires
a : division normale ; b : division inégale

2. Discussion

Cette partie de notre travail, traite des modifications morphologiques potentielles provoquées par la présence des deux xénobiotiques chez la paramécie. Nous avons pris en considération la forme générale des cellules ainsi que leur aspect vu par microscopie optique.

Dans un premier temps, nous avons remarqué des changements de forme de *P. tetraurelia* en présence de fortes concentrations de Glyphosate particulièrement au niveau de la membrane cellulaire (bourgeonnement) et du cytoplasme avec apparition de grandes taches claires à l'origine d'une modification de la morphologie des paramécies. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par [Venkateswara Rao et al., \(2006 ; 2007 ; 2008\)](#), ces auteurs considèrent ces effets comme un système d'alerte précédant des effets cytotoxiques.

En effet, lors de l'apoptose, la formation de vésicules et de bourgeonnements est un phénomène commun ([Fishkind et al., 1991 ; Burton et Taylor, 1997 ; Mills et al., 1998 ; Friedl, et Wolf, 2003](#)). Ces auteurs pensent que ces vésicules sont initiées par une rupture de la membrane plasmique au niveau du cytosquelette. Ces vésicules augmentent de volume du fait de l'écoulement du fluide intracellulaire à l'intérieur de ces dernières ([Cunningham, 1995](#)) raison pour laquelle, durant la formation des bourgeonnements, le volume de la cellule reste constant. ([Shalom et Bergmann, 2004 ; Charras et al., 2005](#)).

Selon [Harris \(1990\)](#), la formation de vésicules est la conséquence du détachement de la membrane plasmique de la couche d'actine corticale. D'après le même auteur, le bourgeonnement chez *P. caudatum*, est irréversible et l'actine se concentre à la base de la vésicule. Le détachement des vésicules peut entraîner une dégradation de la membrane cellulaire conduisant à la mort cellulaire. Ainsi, ce phénomène a été mis en évidence dans notre travail et rend compte d'une forte toxicité des deux pesticides.

Nos observations concernant les dommages internes et la formation de grandes taches claires au milieu de la cellule sont expliquées par [Venkateswara Rao et al., \(2006\)](#). Ces auteurs, montrent que le traitement des paramécies par l'acéphate (insecticide organophosphoré), provoque des ruptures au niveau des membranes des vacuoles digestives et contractiles entraînant le mélange de leur contenu avec le protoplasme. Selon les mêmes auteurs, le volume de la cellule augmente suite à la désintégration du protoplasme qui apparaît condensé

à la périphérie de la cellule. La lyse des cellules qui s'en suit est dûe à la dégradation des organites cellulaires et la rupture de la membrane externe (Venkateswara Rao et al., 2006).

Concernant les malformations liées aux divisions cellulaires, Il est évident que certains pesticides, sont génotoxiques sous certaines conditions (temps et concentrations) (Amanchi et Mohd Masood, 2010). De plus, Mohd Masood et al. (2008) rapportent que le traitement de *Paramecium caudatum*, par de fortes concentrations de carbofuran, provoquent 47% d'anomalies du macronoyau, ce qui explique les malformations telles que la fragmentation, la division inégale et la vacuolisation observés dans notre travail.

Chapitre IV :

Comportement de la paramécie en présence d'Amistar Xtra et du Glyphosate

Chez les animaux, l'activité comportementale dépend en premier lieu de leur degré d'organisation, que ce soit leur anatomie générale ou leur complexité physiologique (système nerveux et appareil endocrinien). Le comportement ainsi, peut être défini comme l'ensemble des mouvements, postures, vocalisations et autres manifestations corporelles (changements de couleur ou émission de phéromones...).

Contrairement aux animaux, le comportement des protozoaires est très peu étudié. Bien que ces êtres unicellulaires ne possèdent ni neurones ni muscles, les phénomènes qui ont lieu chez cette cellule assurent les mêmes fonctions que les cellules sensorielles chez les animaux évolués. Chez les organismes unicellulaires, le comportement est contrôlé par des changements du potentiel membranaire produits quand ont lieu des variations des flux ioniques à travers la membrane (Eckert et Randall, 1999).

En raison de leur taille et leur mobilité, les paramécies constituent le groupe le plus étudié parmi les protozoaires. Ces études ont été concentrées beaucoup plus sur le déplacement et le comportement d'évitement (Oosawa et Nakaoka, 1977 ; Eckert et Randall, 1999. Crenshaw et al., 2000 ; Takahashi et al., 2005).

A travers ce chapitre, nous avons étudié le comportement de *Paramecium tetraurelia* sous l'influence des différentes concentrations d'Amistar Xtra et du Glyphosate. Les aspects essentiels qui sont développés dans cette étude sont le comportement d'évitement, la vitesse de déplacement et les trajectoires.

1. Comportement d'évitement

Il a été clair à travers nos expériences que les paramécies ne tolèrent pas le stress abiotique qui leur a été imposé. Leur degré de sensibilité augmente en fonction des concentrations et du temps. La figure (49 a et b) montre que les pourcentages d'évitement les plus élevés sont induits par le Glyphosate. Les phénomènes d'évitement sont plus rapides et apparaissent dès

les concentrations les plus faibles. En revanche, ces phénomènes ne sont observés qu'aux plus fortes concentrations d'Amistar xtra. Le suivi du comportement d'évitement toutes les 3 minutes montre que, pendant les dix premières minutes, les paramécies ne présentent pas un réflexe d'évitement significatif et ce, aussi bien pour Amistar Xtra que pour le Glyphosate (Fig. 50 et 51).

L'analyse statistique générale révèle des différences hautement significatives entre les effets concentrations que se soit pour Amistar Xtra ($H = 26,46$ $DF = 5$ $P = 0,000$) ou pour le Glyphosate ($H = 24,75$ $DF = 5$ $P = 0,000$).

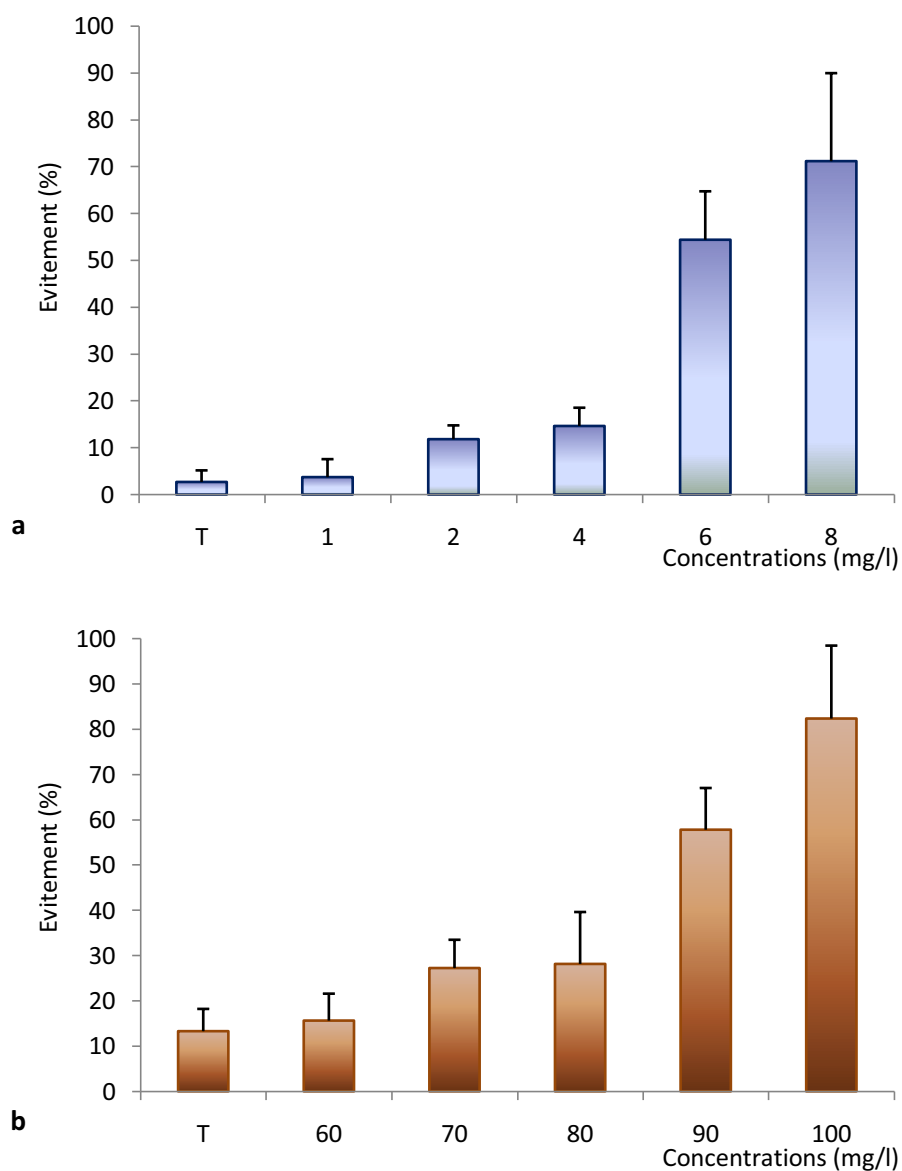


Figure 49 : Pourcentages d'évitement enregistrés après 15 minutes d'exposition aux différentes concentrations d'Amistar Xtra (a) et de Glyphosate (b).

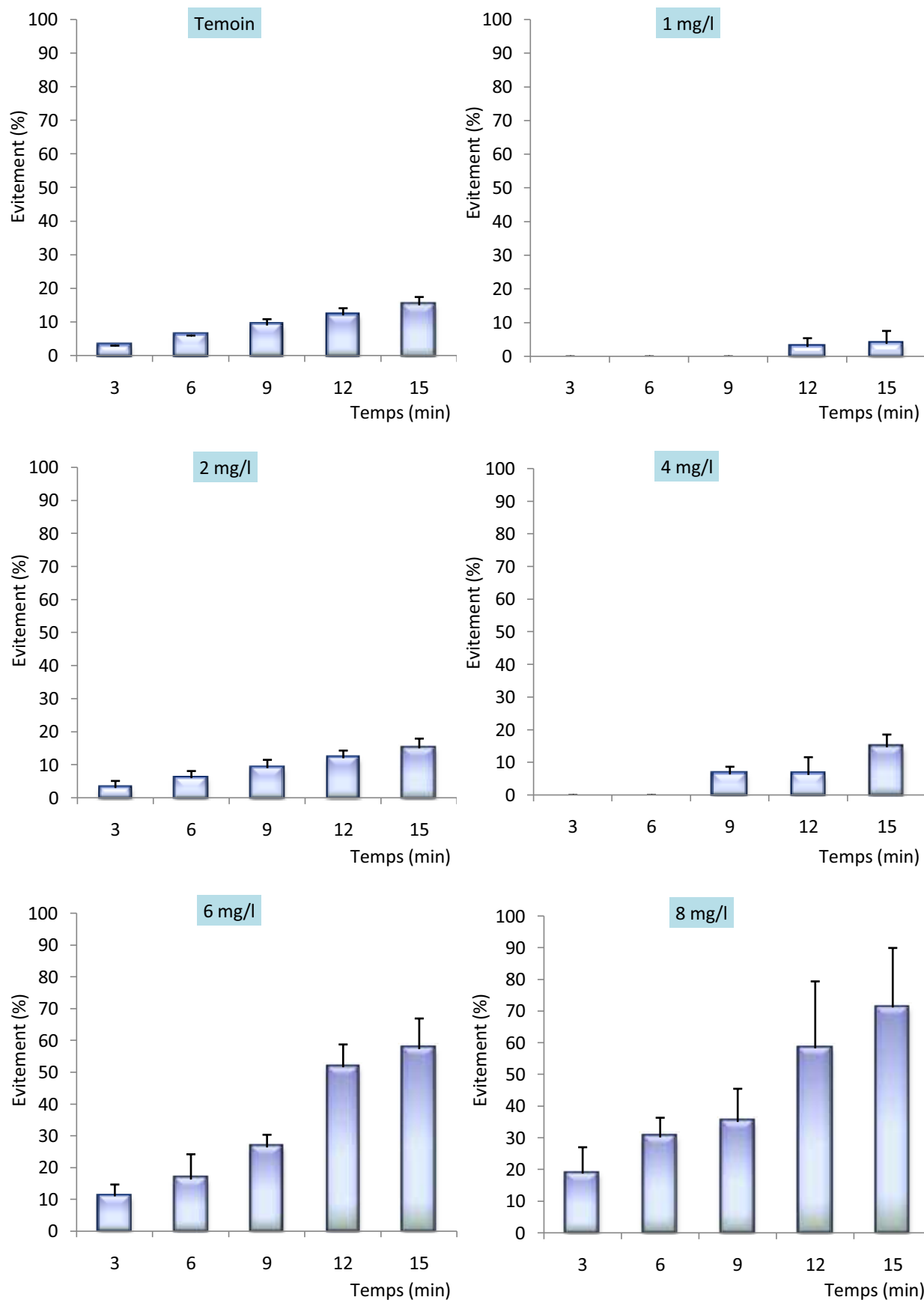


Figure 50 : Pourcentages d'évitement enregistrés toutes les 3 minutes pour chaque concentration d'Amistar Xtra

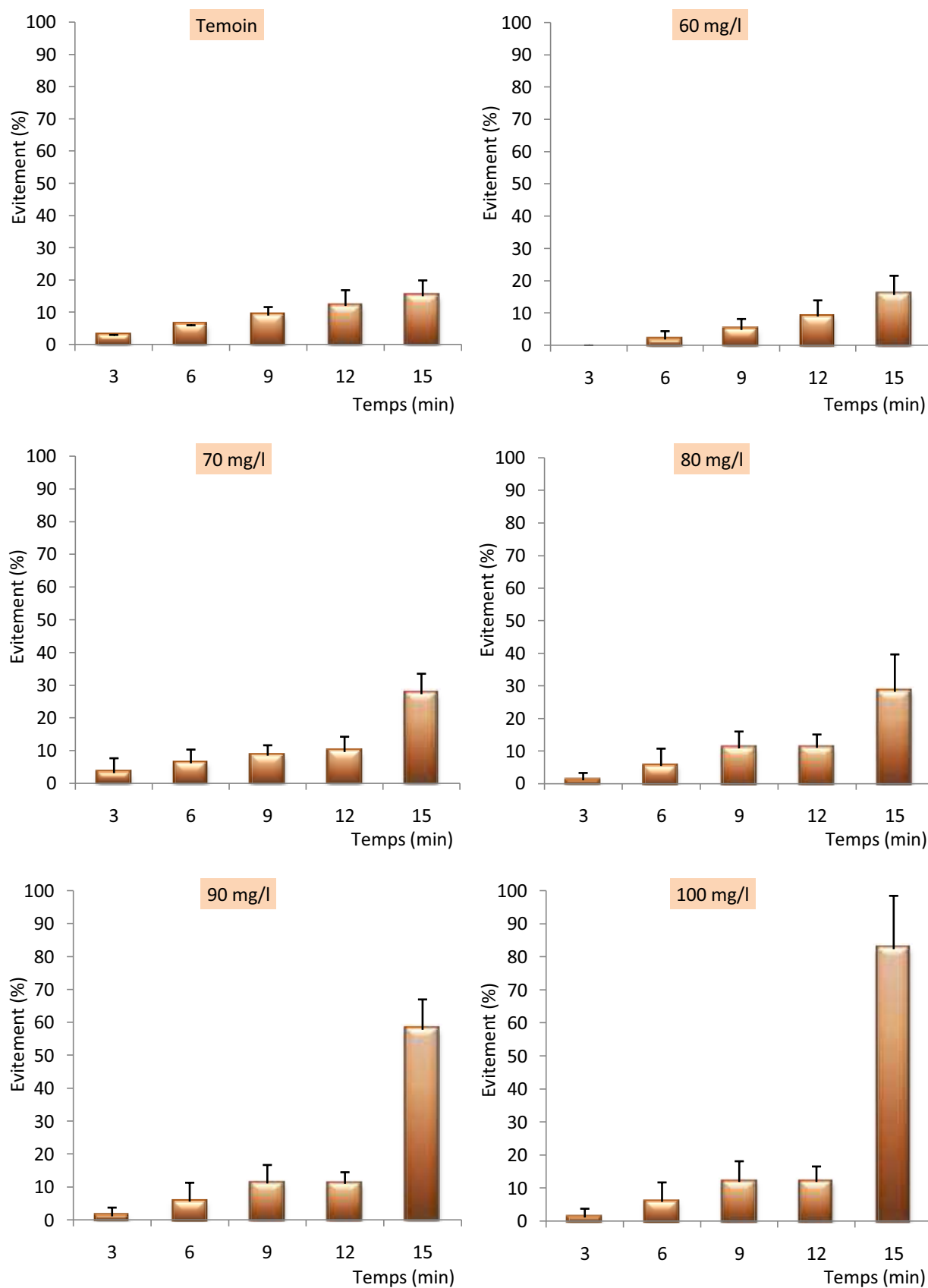


Figure 51 : Pourcentages d'évitement enregistrés toutes les 3 minutes pour chaque concentration du Glyphosate.

2. Impact sur la vitesse de déplacement des paramécies

La figure (52 b et d). montre que La vitesse de déplacement des paramécies est corrélée négativement avec l'augmentation des concentrations d'Amistar Xtra et du Glyphosate. Selon les valeurs enregistrées à partir de plusieurs tests, la vitesse d'une cellule normale de *P. tetraurelia* est de $1,15 \pm 0,002 \text{ mm.s}^{-1}$ En présence des pesticides, les paramécies sont perturbées et augmentent leur vitesse de déplacement pendant une courte période puis ralentissent leur vitesse d'une manière dose-dépendante. Les cellules traitées par le Glyphosate semblent plus sensibles que celles traitées par Amistar Xtra (Fig. 52 a et c).

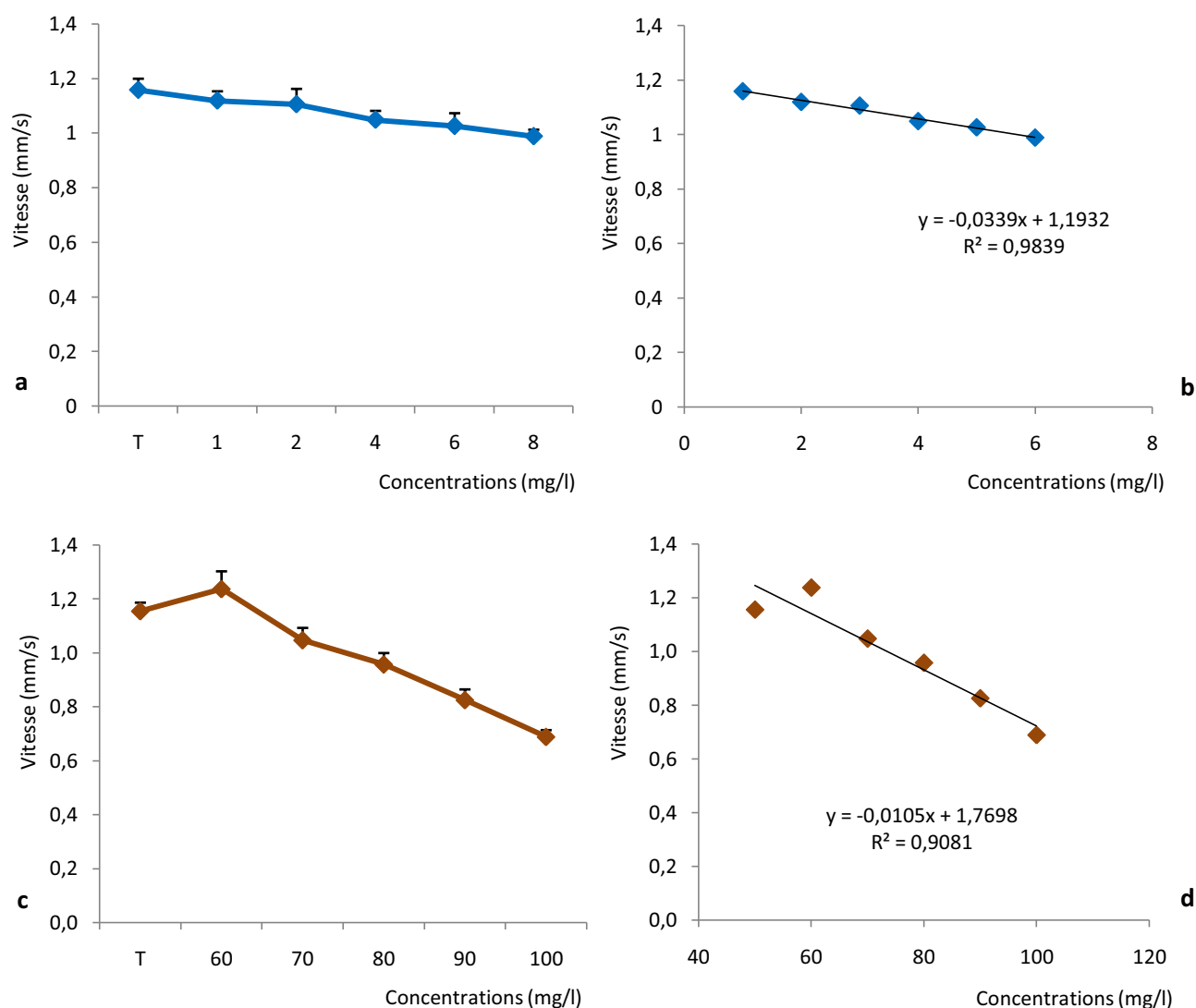


Figure 52 : Vitesse de déplacement des paramécies en présence d'Amistar Xtra (a et b) et de Glyphosate (c et d)

3. Impact des pesticides sur les trajectoires des paramécies

La progression des paramécies se fait selon une trajectoire hélicoïdale assurée par l'action de vagues successives de contractions qui courent à la surface du corps, le long des lignes d'insertion des cils. En absence d'obstacle, la paramécie nage selon une trajectoire linéaire. En cas d'obstacle la paramécie change rapidement de direction ou revient très vite en arrière (Fig. 53).

Tout changement de direction dans le mouvement indique une toxicité chez les paramécies. La figure (54) montre que les faibles concentrations ne semblent pas affecter les trajectoires. Les changements sont observés avec les concentrations les plus élevées (80, 90, 100 mg/l pour le Glyphosate et 8 mg/l pour Amistar Xtra).

Les perturbations des mouvements se manifestent par un changement brutal de la direction suivi d'une nage en zigzag. Aux plus fortes concentrations des deux pesticides, nous avons remarqué que les trajectoires perdent de leur linéarité et deviennent plus circulaires avec des rotations sur place.

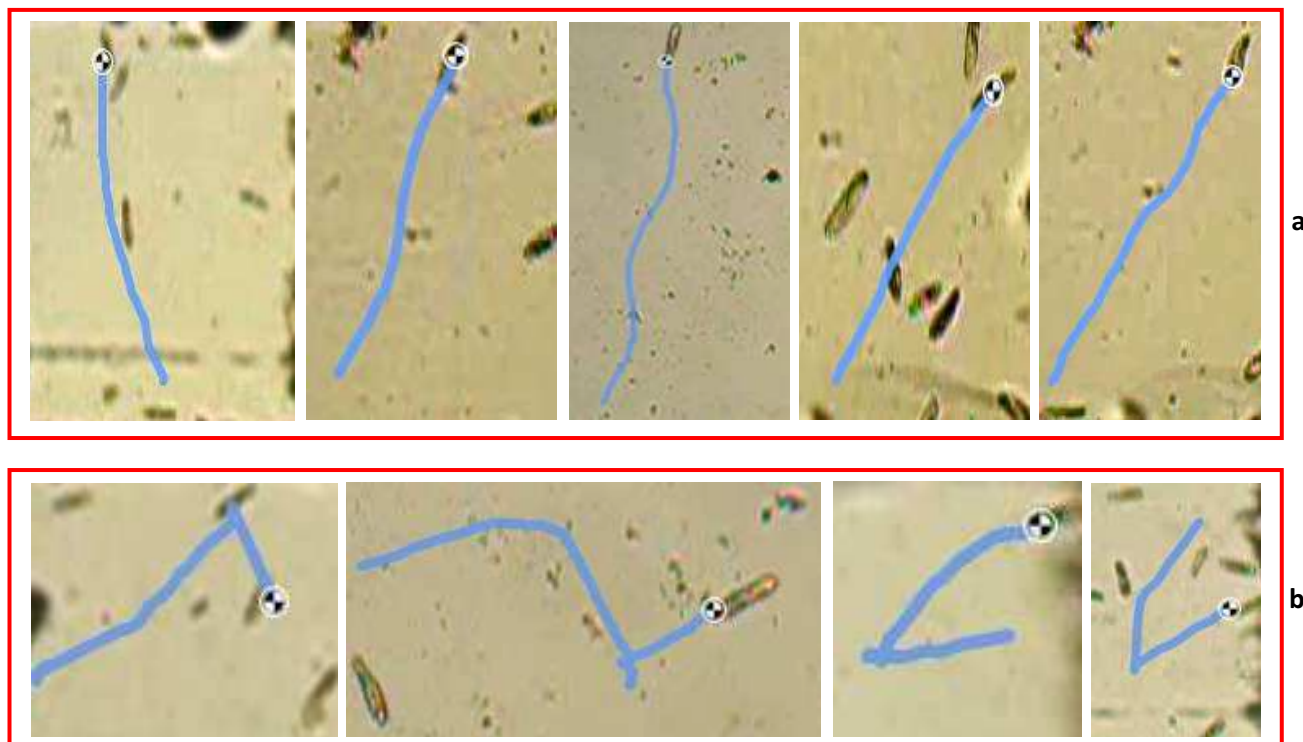


Figure 53 : Trajectoires des paramécies observées en absence (a) et en présence (b) d'obstacles.

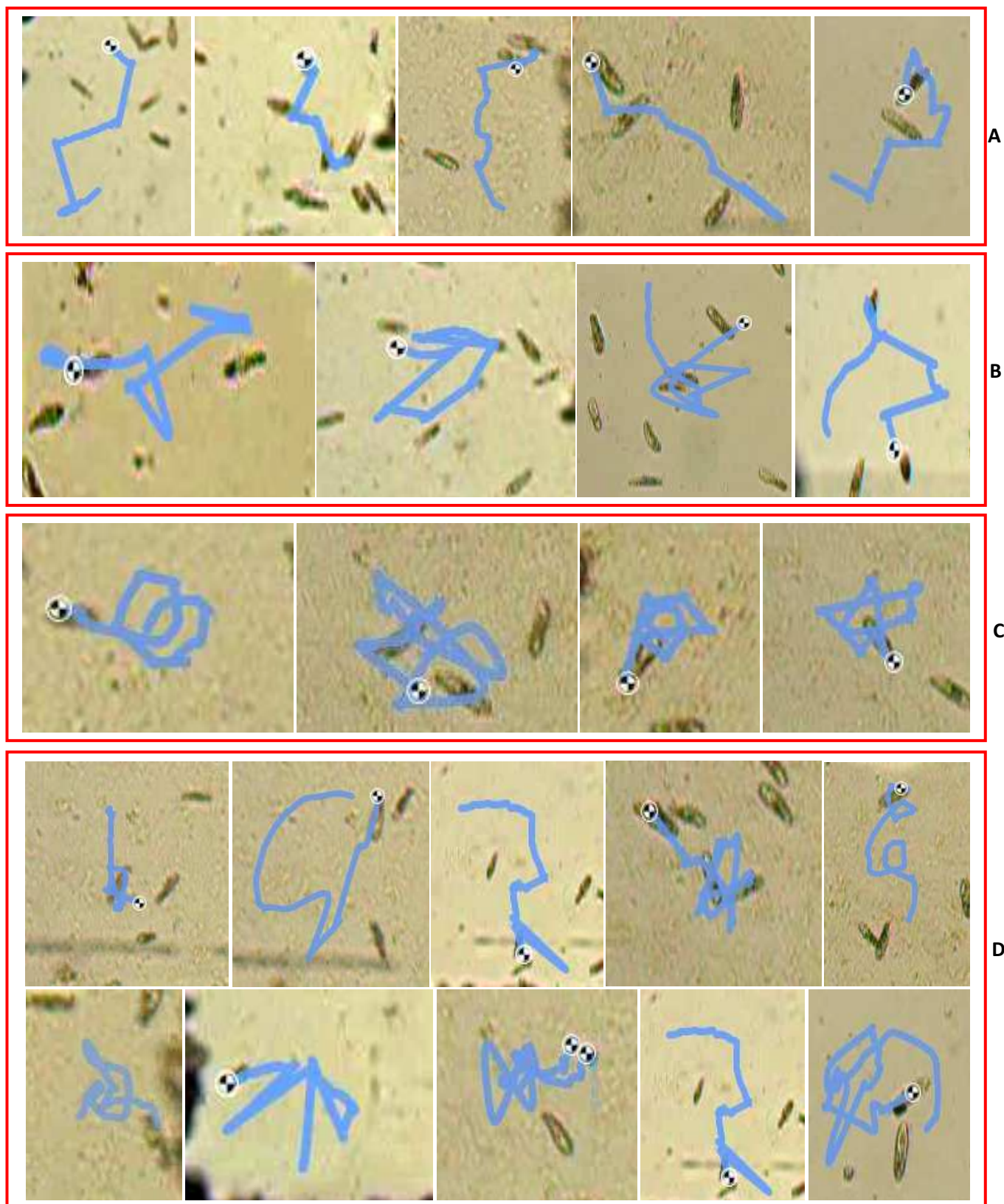


Figure 54: Trajectoires des paramécies induites par les fortes concentrations d'Amistar Xtra (8mg/l) et du Glyphosate (70, 80, 100 mg/l)

(A) : Mouvements en zigzag, (B) : Changements brutaux de directions et retours en arrière, (C) : mouvements sur place, (D) Mouvements désordonnés.

4. Discussion

Ces dernières années, les espèces du genre *Paramecium* ont fait l'objet de nombreuses recherches en éthologie (Plomin et al., 1998 ; Machemer, 2001 ; Takiguchi et al., 2002 ; Hamel et al., 2011), Ainsi, il a été démontré que la paramécie avait un comportement d'évitement quand elle est en contact avec un objet. Un contact sur l'extrémité postérieure d'un spécimen isolé le conduit à nager plus rapidement vers l'avant ; un contact sur son extrémité antérieure l'amène à changer la direction. Le changement de direction survient lorsque le sens des battements des cils s'inverse (Eckert et Randall, 1999). Les études sur le comportement chez la paramécie sont renforcées par la génétique comportementale décrite par Plomin et al. (1998). Selon ces auteurs, la paramécie a au moins 20 gènes participant au comportement d'évitement. Certains mutants appelés "Pions" ne savent pas nager à reculons (par analogie avec les pions du jeu d'échec qui ne peuvent pas reculer). Certains d'autres appelés les "paranoïaques" en raison de leur déplacement à reculons prolongés, ainsi que les "paresseux" dont les déplacements sont très limités.

Le test d'évitement qui a été décrit pour la première fois par Takiguchi et al., (2002), constitue une méthode simple et efficace pour l'évaluation de ce comportement chez les paramécies. Ces auteurs ont testé les effets de l'acide 2,4-Dichlorophenoxyacétique (herbicide) et ces analogues sur la fuite de *Paramecium caudatum*. En plus de l'inhibition des déplacements, leurs résultats ont montré un comportement d'évitement vers l'arrière causé par l'acide phénolique.

Au niveau physiologique, le comportement d'évitement peut être expliqué par la création d'un changement dans le potentiel membranaire. La dépolarisation de la membrane peut être induite suite à une stimulation par un courant (voltage-dépendant) (Naitoh, 1958; Naitoh et Eckert, 1968; Eckert et Naitoh, 1970; Machemer et Eckert, 1973), par une stimulation mécanique (Naitoh & Eckert, 1969 a, b) ou spontanément (Kinosita, 1954; Naitoh, 1966).

Nos résultats suggèrent que ces deux pesticides provoquent une dépolarisation au niveau de la membrane de *P. tetraurelia* conduisant vers un comportement d'évitement. Le pouvoir des substances chimiques d'induire une dépolarisation a été mis en évidence par plusieurs auteurs (Haga et al., 1982 ; Schultz et al., 1992 ; Takiguchi et al., 2002).

Le parallèle entre la réaction d'évitement et les processus qui se produisent dans les organismes supérieurs est frappant (Beale et Preer, 2008) ; un stimulus chez la paramécie ouvre les canaux de Ca^{2+} afin de dépolariser la membrane cellulaire, et la repolarisation se produit après l'ouverture retardée des canaux K^+ (Schultz et al., 1992) ; cependant, chez les organismes supérieurs, lorsqu'un neurone est stimulé, il ouvre les canaux Na^+ pour dépolariser la membrane cellulaire et (comme dans paramécie) le phénomène est restauré par l'ouverture des canaux K^+ (Eckert et Brehm, 1979).

Chez la paramécie, l'ouverture et la fermeture des canaux sont surveillées par un verrouillage de tension, qui est utilisé pour maintenir une tension donnée (Naitoh et Eckert, 1968; Eckert et Naitoh, 1970). Le changement temporaire de la tension ouvre très rapidement un canal de Ca^{2+} (inactivation du flux entrant) et plus tard, l'ouverture du canal K^+ , est également stimulé par la concentration croissante de Ca^{2+} , ce qui permet l'écoulement du K^+ (flux de rectification retardée) à travers la membrane vers l'extérieur (Eckert et Brehm, 1979). Le changement du Ca^{2+} est mesuré en microsecondes, tandis que le changement du K^+ est plus lent et mesuré en millisecondes. L'augmentation du Ca^{2+} induit également une inversion de la direction des battements ciliaires, permettant à la cellule de reculer (Jahn, 1962; Naitoh, 1968). La stimulation de la nage en arrière par une solution riche en potassium est corrélée avec l'amplitude du flux du calcium (Haga et al., 1982). Cette corrélation montre que le comportement de nage en arrière chez les paramécies peut être utilisé pour estimer l'activité des canaux Ca^{2+} -dépendants. Selon Oka et al. (1986), les cellules de *P. caudatum* peuvent s'adapter à ces concentrations extracellulaires du potassium en l'espace de 2h environ. A la fin des ces réactions, les potentiels de repos originaux sont restaurés et la cellule nage en avant de nouveau, le plus souvent vers une nouvelle direction (Beale et Preer, 2008).

Les expériences de Glasser (1924) concernant les effets de la température sur les mouvements directs chez *Paramecium caudatum*, ont montré que la vitesse de déplacements est fortement corrélée aux variations de la température. L'auteur a expliqué cette corrélation par le flux d'énergie produit par la stimulation des réactions chimiques à l'intérieur de la cellule. De ce fait, une température de 30°C semble être convenable pour nos expériences. Sous une température similaire à celle utilisée dans notre étude (30°C), l'auteur a enregistré une vitesse de déplacement de l'ordre de 0,89 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Cette vitesse est très proche des valeurs enregistrées dans nos expériences chez les paramécies traitées par Amistar Xtra et le Glyphosate. Alors que chez les témoins la vitesse de déplacement est de 1,15 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dans un autre côté, nous avons mis en évidence une forte excitation chez les paramécies en présence des deux pesticides. Ces résultats sont en accord avec ceux de [Offen et Roberts \(1973\)](#) concernant les effets du champ électrique sur la vitesse de déplacement de *P. caudatum*. Dans cette étude, ces chercheurs montrent que les mouvements des paramécies sont stimulés par un faible champ électrique et inhibés par les tensions élevées. Ceci indique une relation étroite entre le potentiel membranaire et la vitesse de déplacement des paramécies. De plus, la perturbation du flux de calcium et de potassium, peut induire un déséquilibre au niveau du potentiel membranaire et avoir une répercussion sur la motilité et la vitesse de déplacement chez *P. tetraurelia*.

Selon [Hamel et al. \(2011\)](#), la paramécie possède trois types de nage différents. Ainsi, suite à un faible stimulus, la nage des cellules est normale avec une vitesse de déplacement stable. Sous l'effet d'un stimulus plus important, les battements ciliaires sont plus rapides induisant une accélération de déplacement des paramécies. Enfin, lorsque le stimulus est fort et brutal, la cellule développe un système de défense qui ne dépend pas des battements ciliaires mais de la libération soudaine de trichocystes vers l'objet du stimulus provoquant ainsi un bond permettant à la paramécie d'échapper à l'agression.

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une multitude de trajectoires après traitement par Amistar Xtra et le Glyphosate. En général, Les trajectoires des paramécies sont hélicoïdales autour d'un axe rectiligne ([Machemer, 2001](#)). Mais sous l'effet de plusieurs stimuli, ces trajectoires peuvent changer. La paramécie avance tout droit lorsqu'elle ne rencontre aucun obstacle, si un objet se trouve sur son chemin, elle le contourne. Les paramécies évitent également les télescopages entre elles en déviant leurs trajectoires ([Campan et Scapini, 2002](#) ; [Ishikawa et Hota, 2006](#)). Sous l'effet d'un stimulus, les paramécies se déplacent rapidement selon une trajectoire droite (en avant ou en arrière). Si le stimulus provient de tous les côtés, la paramécie présente une nage de manière aléatoire avec des changements brutaux des directions ([Kung, 1971](#); [Hildebrand et Dryl, 1983](#) ; [Machemer, 2001](#)). Ce pendant, Les trajectoires que les paramécies adoptent sont tout à fait variables, dans la mesure où elles dépendent des conditions du milieu. La base de ce mécanisme électrophysiologique de la chimio-orientation a été analysée et a été appelé chimiokinèse ([Van Houten et Preston, 1988](#)). [Machemer \(1986 et 2001\)](#), explique le changement de la voie de déplacement par la dépolarisation au niveau de la membrane et de l'hyperpolarisation du potentiel de repos. Ainsi, nos résultats confirment cet effet du Glyphosate et d'Amistar Xtra, qui provoquent une

stimulation de la membrane conduisant à une dépolarisation et une hyperpolarisation continue pendant le traitement.

Chapitre V :

Mesure des biomarqueurs du stress oxydant

De manière générale, le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défense ou antioxydants, avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (Sies, 1991).

Dans les conditions physiologiques, l'oxygène produit en permanence au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées activées (EOA) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. Ces EOA, dont font partie les radicaux libres, sont dotées de propriétés oxydantes et peuvent entraîner l'oxydation des macromolécules telles que l'ADN, les lipides et les protéines (Vaughan, 1997). Au niveau moléculaire, les EOA peuvent aussi agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies (Sies, 1991).

La production des EOA est strictement régulée par l'organisme qui développe des systèmes de défenses antioxydants pouvant protéger la cellule contre les effets potentiellement destructeurs. Ces systèmes se composent d'enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydases...), de protéines transporteuses, de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, glucose, vitamines A, C, E, ubiquinone, caroténoïdes, flavonoïdes) et d'oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium) indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes.

Ce dernier chapitre est consacré à l'évaluation de la toxicité potentielle des deux xénobiotiques testés (Amistar Xtra et Glyphosate) à travers le suivi de l'évolution de certains biomarqueurs de la toxicité tels que le glutathion (GSH), l'activité GST, l'activité catalase et le taux de malondialdéhyde (MDA).

1. Évolution du taux du glutathion (GSH)

La figure (55) met en évidence l'évolution du taux de GSH en fonction de concentrations croissantes des deux pesticides. Ainsi, les teneurs en glutathion chez les témoins sont en moyenne de $24,9 \pm 2,37$ et $28,48 \pm 4,72$ $\mu\text{mol/mg}$ de protéines. Cependant, chez les traités par

les deux xénobiotiques, le taux de GSH tend à diminuer en fonction du temps et de manière dose-dépendante. D'un autre côté, la diminution du taux de GSH semble plus marquée chez les paramécies traitées par le Glyphosate (Fig. 55.b).

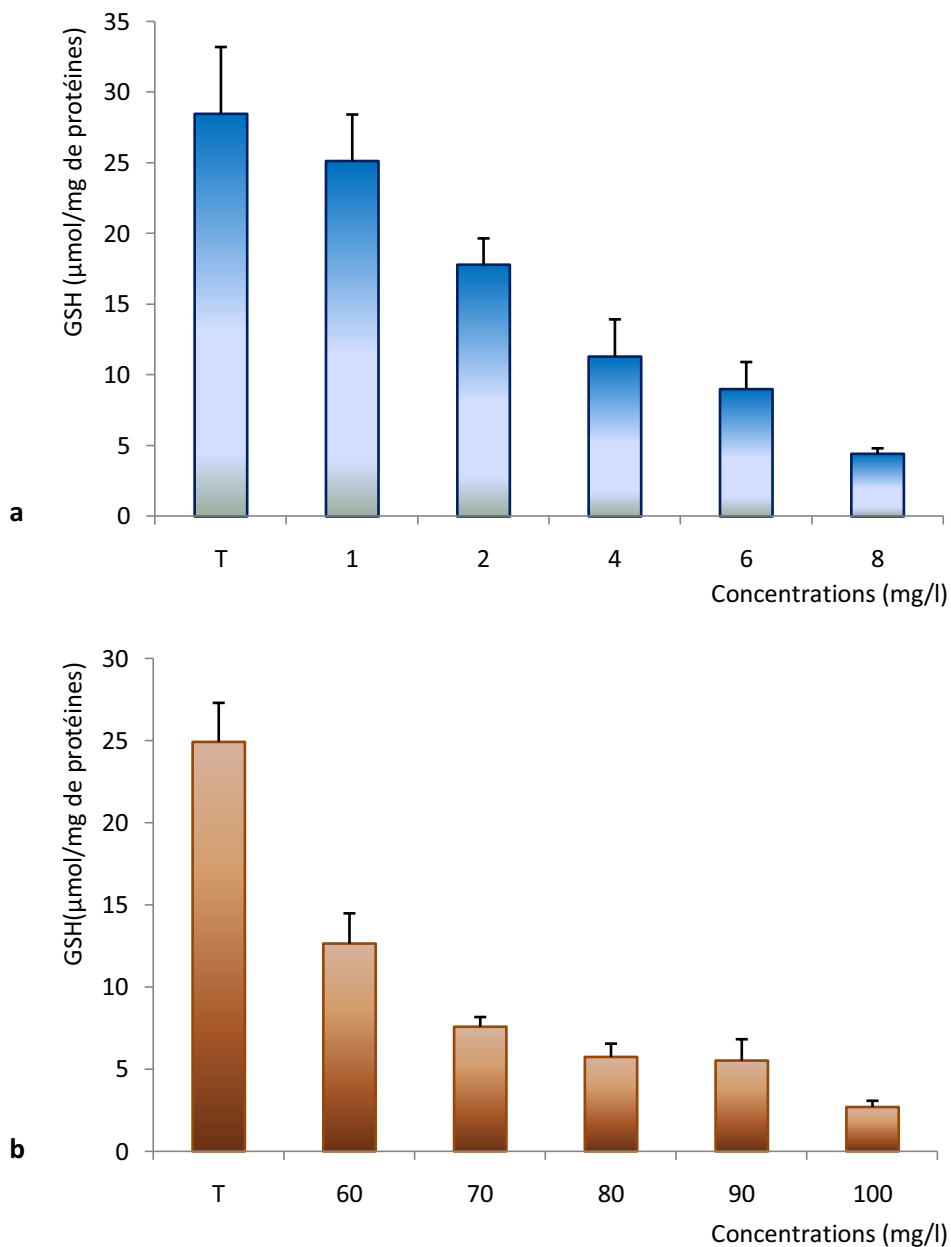


Figure 55: Teneurs en GSH en fonction des concentrations d'Amistar Xtra (a) et de Glyphosate (b).

Les différences entre les effets sur le taux de GSH sont significatives pour l'Amistar Xtra ($H = 15,78$ $DF = 5$ $P = 0,007$) et pour le Glyphosate ($H = 15,81$ $DF = 5$ $P = 0,007$). Les comparaisons

par paires ne révèlent aucune similitude des effets des concentrations des deux pesticides (Tableau 7 et 8).

Tableau 7 : Comparaisons entre les effets d'Amistar Xtra sur la teneur en Glutathion (valeurs de "p" après comparaisons par paires par le test Mann Whitney pour un intervalle de confiance de 95% et $\alpha = 0,05$). Les valeurs en gras ne sont pas significatives.

	Control	1 mg/l	2 mg/l	4 mg/l	6 mg/l	8 mg/l
Control	-	0,5000	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
1 mg/l	0,5000	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
2 mg/l	0,0404	0,0404	-	0,0404	0,0404	0,0404
4 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	-	0,1914	0,0404
6 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,1914	-	0,0404
8 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	-

Tableau 8 : Comparaisons des effets du glyphosate sur la teneur en Glutathion (valeurs de "p" après comparaisons par paires par le test Mann Whitney pour un intervalle de confiance de 95% et $\alpha = 0,05$). Les valeurs en gras ne sont pas significatives.

	Control	60 mg/l	70 mg/l	80 mg/l	90 mg/l	100 mg/l
Control	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
60 mg/l	0,0404	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
70 mg/l	0,0404	0,0404	-	0,0404	0,0404	0,0404
80 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	-	0,5000	0,0404
90 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,5000	-	0,0404
100 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	-

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

La figure (56) illustre l'évolution de l'activité GST en présence des concentrations croissantes d'Amistar Xtra et de Glyphosate. Nous constatons une augmentation progressive et dose-dépendante de l'activité GST en présence des deux xénobiotiques. L'activité GST des témoins est comprise entre $1,84 \pm 0,87$ et $1,98 \pm 0,84$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines. Chez les traités, l'activité GST est élevée particulièrement pour le glyphosate par rapport à l'Amistar Xtra.

L'analyse statistique, réalisée par le test de Kruskal-Wallis, met en évidence des différences significatives entre les traités par les concentrations croissantes d'Amistar Xtra ($H = 16,22$ $DF = 5$ $P = 0,006$) et de Glyphosate ($H = 16,18$ $DF = 5$ $P = 0,006$). L'analyse par paires, effectuée par le test de Mann Whitney, est résumée dans les [tableaux \(9 et 10\)](#).

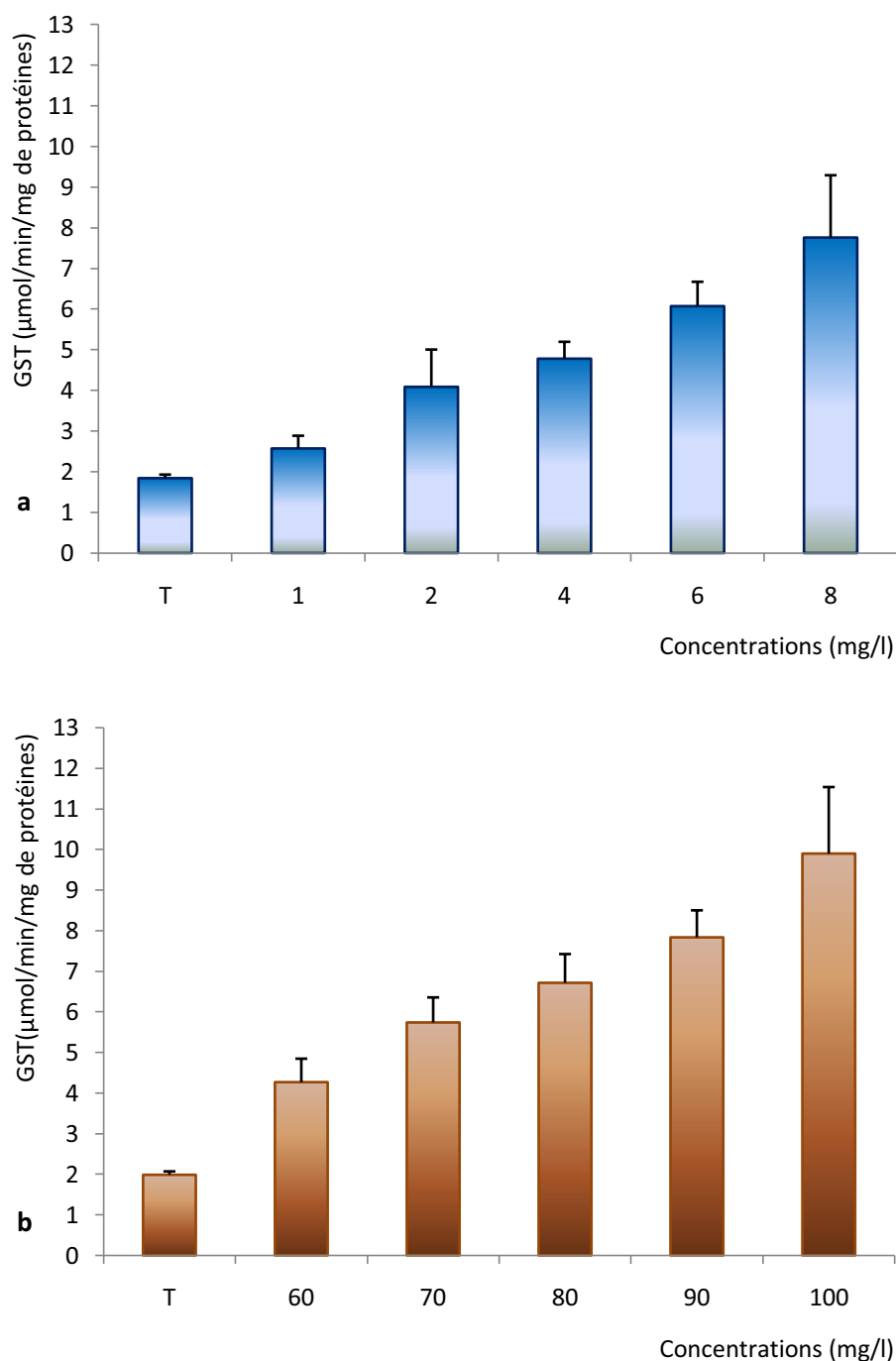


Figure 56 : Evolution de l'Activité GST en fonction des concentrations croissantes d'Amistar Xtra (a) et de Glyphosate (b).

Tableau 9 : Comparaisons entre les effets d'Amistar xtra sur l'activité GST (valeurs de "p" après comparaisons par paires par le test Mann Whitney pour un intervalle de confiance de 95% et $\alpha = 0,05$). Les valeurs en gras ne sont pas significatives.

	Control	1 mg/l	2 mg/l	4 mg/l	6 mg/l	8 mg/l
Control	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
1 mg/l	0,0404	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
2 mg/l	0,0404	0,0404	-	0,2536	0,0404	0,0404
4 mg/l	0,0404	0,0404	0,2563	-	0,0404	0,0404
6 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	-	0,0404
8 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	-

Tableau 10 : Comparaisons entre les effets du glyphosate sur l'activité GST (valeurs de "p" après comparaisons par paires par le test Mann Whitney pour un intervalle de confiance de 95% et $\alpha = 0,05$). Les valeurs en gras ne sont pas significatives.

	Control	60 mg/l	70 mg/l	80 mg/l	90 mg/l	100 mg/l
Control	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
60 mg/l	0,0404	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
70 mg/l	0,0404	0,0404	-	0,0952	0,0404	0,0404
80 mg/l	0,0404	0,0404	0,0952	-	0,0952	0,0404
90 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0952	-	0,0404
100 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	-

3. Évolution de l'activité Catalase

La [figure \(57\)](#), met en évidence l'évolution de l'activité catalase en présence de concentrations croissantes des deux pesticides. Nous constatons que cette activité enzymatique semble similaire en présence du Glyphosate et d'Amistar Xtra. Ainsi, l'activité catalase varie entre $6,45 \pm 1,12$ et $17,81 \pm 1,65$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines pour les paramécies traitées par Glyphosate et entre $5,25 \pm 0,94$ et $17,56 \pm 2,51$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines pour celles traitées par Amistar Xtra. Chez les témoins l'activité catalase n'est que de 4,25 et 5,59 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

Les analyses statistiques révèlent des différences significatives entre les traités par les concentrations croissantes d'Amistar Xtra ($H = 15,60$ $DF = 5$ $P = 0,008$) et de Glyphosate ($H = 14,94$ $DF = 5$ $P = 0,011$). Les analyses par paires sont présentées dans les [tableaux \(11 et 12\)](#).

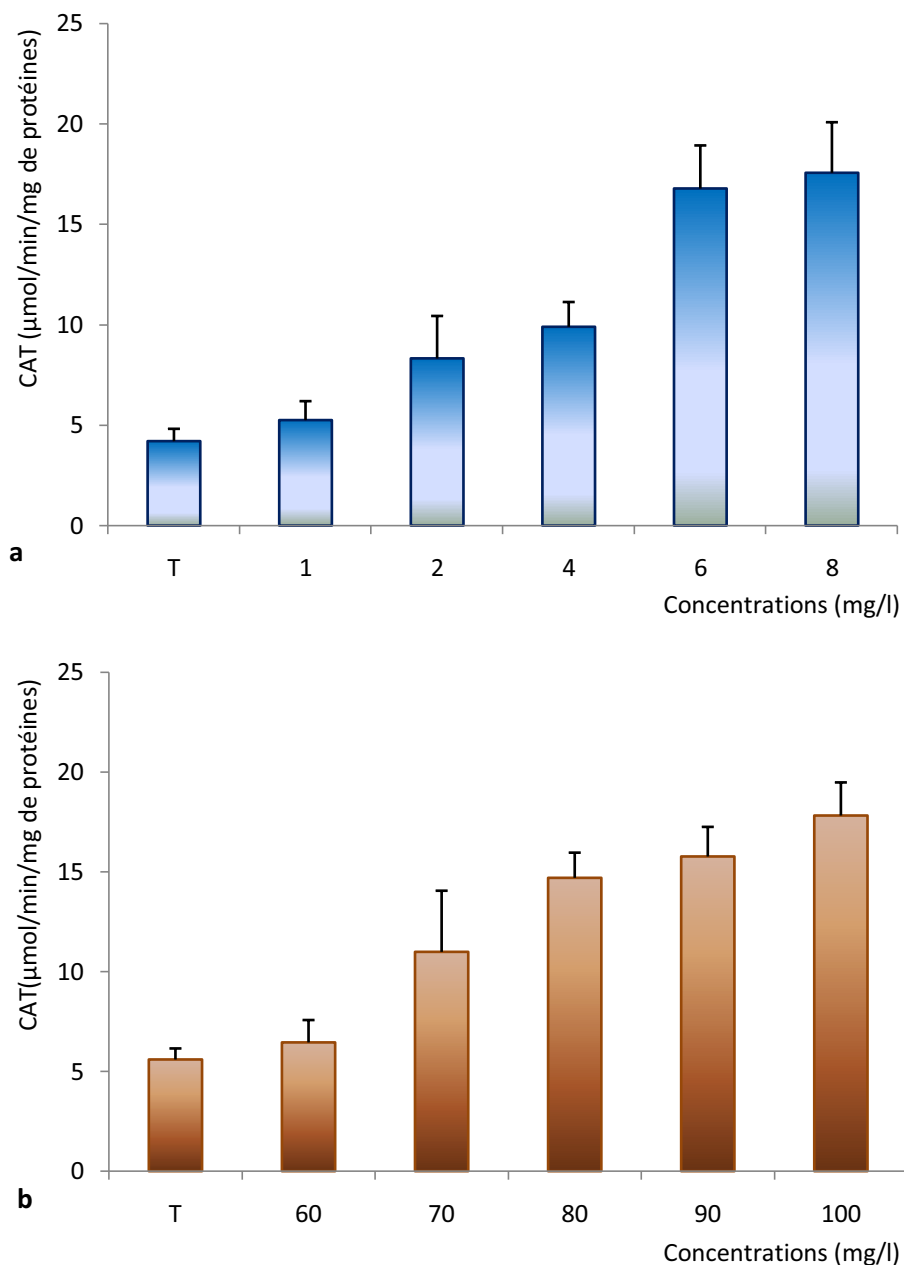


Figure 57 : Evolution de l'activité catalase en fonction des concentrations d'Amistar Xtra (a) et de Glyphosate (b).

Tableau 11 : Comparaisons entre les effets d'Amistar Xtra sur l'activité catalase (valeurs de "p" après comparaisons par paires par le test Mann Whitney pour un intervalle de confiance de 95 % et $\alpha = 0,05$). Les valeurs en gras ne sont pas significatives.

	Control	1 mg/l	2 mg/l	4 mg/l	6 mg/l	8 mg/l
Control	-	0,0952	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
1 mg/l	0,0952	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
2 mg/l	0,0404	0,0404	-	0,1914	0,0404	0,0404
4 mg/l	0,0404	0,0404	0,1914	-	0,0404	0,0404
6 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	-	0,5000
8 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,5000	-

Tableau 12 : Comparaisons entre les effets du Glyphosate sur l'activité catalase (valeurs de "p" après comparaisons par paires par le test Mann Whitney pour un intervalle de confiance de 95 % et $\alpha = 0,05$). Les valeurs en gras ne sont pas significatives.

	Control	60 mg/l	70 mg/l	80 mg/l	90 mg/l	100 mg/l
Control	-	0,1914	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
60 mg/l	0,1914	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
70 mg/l	0,0404	0,0404	-	0,0952	0,0404	0,0404
80 mg/l	0,0404	0,0404	0,0952	-	0,1914	0,0404
90 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,1914	-	0,1914
100 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,1914	-

4. Evolution du taux du malondialdéhyde (MDA)

La figure (58) met en évidence l'évolution du taux de Malondialdéhyde (MDA) en présence de concentrations croissantes de Glyphosate et d'Amistar Xtra. Nos résultats ont mis en évidence une augmentation significative des taux de MDA particulièrement chez les paramécies traitées par le glyphosate par rapport à celles traitées par Amistar Xtra dont le taux de MDA demeure proche de celui des témoins qui est de $10,39 \pm 2,4$ et $12,67 \pm 1,28$ $\mu\text{mol/mg}$ de protéines. Ainsi, pour la plus faible concentration de Glyphosate, le taux de MDA est de $25,64 \pm 6,49$ $\mu\text{mol/mg}$ de protéines par rapport aux paramécies traitées par la plus faible concentration d'Amistar Xtra dont le taux de MDA est de $12,96 \pm 4,25$ $\mu\text{mol/mg}$ de protéines.

Pour les plus fortes concentrations de Glyphosate et d'Amistar Xtra, le taux de MDA est élevé avec respectivement $220,94 \pm 47,79$ et $23,49 \pm 4,75$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines.

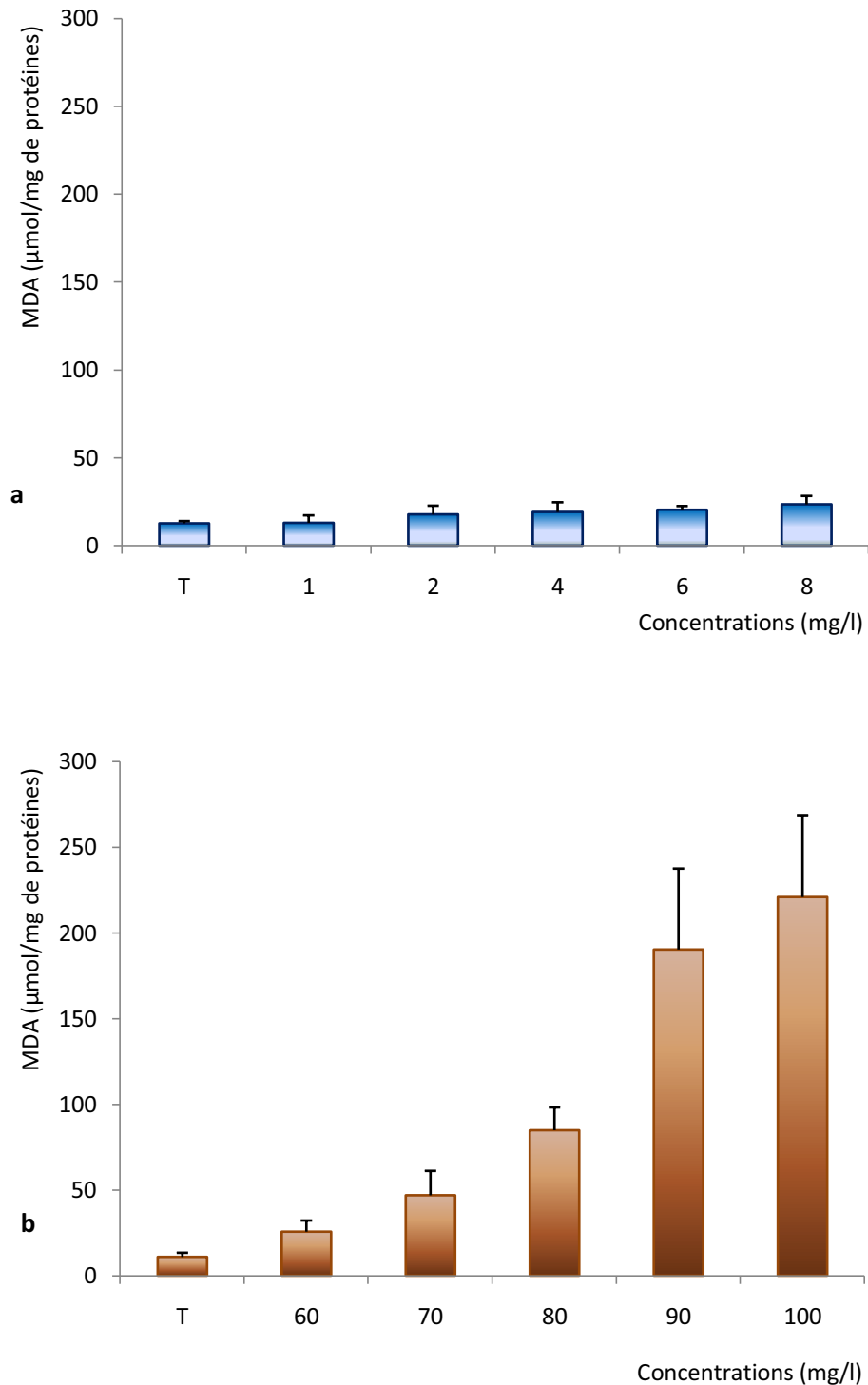


Figure 58 : Evolution du Taux du MDA en fonction des concentrations croissantes d'Amistar xtra (a) et de Glyphosate (b)

L'analyse statistique globale effectuée par le test de *Kruskal-Wallis* ne montre aucune différence significative entre les traités par les différentes concentrations d'Amistar Xtra ($H = 11,01$ $DF = 5$ $P = 0,051$) et des différences significatives entre les traités par les différentes concentrations de Glyphosate ($H = 16,20$ $DF = 5$ $P = 0,006$). Les comparaisons par paires entre les traités par les concentrations croissantes de glyphosate sont présentées dans le [tableau \(13\)](#).

Tableau 13: Comparaisons entre les effets du Glyphosate sur le taux du malondialdéhyde (MDA) (valeurs de "p" après comparaisons par paires par le test Mann Whitney pour un intervalle de confiance de 95 % et $\alpha = 0,05$). Les valeurs en gras ne sont pas significatives.

	Control	60 mg/l	70 mg/l	80 mg/l	90 mg/l	100 mg/l
Control	-	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404
60 mg/l	0,0404	-	0,0952	0,0404	0,0404	0,0404
70 mg/l	0,0404	0,0952	-	0,0404	0,0404	0,0404
80 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	-	0,0404	0,0404
90 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	-	0,0952
100 mg/l	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0952	-

5. Discussion

D'après [Syngenta \(2007\)](#), c'est l'azoxystrobine, matière active entrant dans la composition de l'Amistar Xtra, qui est la plus toxique pour les organismes aquatiques. Du point de vue moléculaire, l'azoxystrobine induit une augmentation des activités antioxydantes ([Shahina Kalim et al., 2000](#) ; [Anand, 2007](#) ; [MA et Zhao, 2008](#) ; [Kaneko et Ishii, 2009](#)). Par ailleurs, le glyphosate a fait l'objet de nombreuses études écotoxicologiques sur divers organismes aquatiques ([Who, 1994](#) ; [Sparling et al., 2006](#) ; [Cavas and Konen, 2007](#) ; [Langiano & Martinez, 2008](#) ; [Pesce et al., 2009](#) ; [Olsvik et al., 2010](#)).

Généralement le glyphosate est présenté comme pas ou peu toxique ([Monsanto, 1983](#)); il n'en demeure pas moins qu'un herbicide similaire (présentant la même molécule active), en l'occurrence le Roundup est considéré comme toxique chez le rat et le lapin ([Smith et Oehme, 1992](#); [Doliner, 1991](#)), probablement, selon ces auteurs, du fait de la présence de certains agents

de surface sur la formulation commerciale. Des travaux sur le glyphosate font état d'une peroxydation lipidique chez *Cyprinus carpio* (Mishchenko, 2011), chez *Prochilodus lineatus* (Modesto et Martinez, 2010) et chez *Lithobates catesbeiana* (Costa et al., 2008).

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à la réponse antioxydante des paramécies en présence du Glyphosate et d'Amistar Xtra. Nos résultats ont mis en évidence une forte activité enzymatique antioxydante se reflétant par une augmentation des activités catalase et GST connues pour leur rôle dans la détoxification des radicaux libres, parallèlement à la diminution du taux de GSH également excellent biomarqueur de la toxicité. Il en est de même concernant le taux de Malondialdéhyde (MDA) dont l'augmentation rend compte d'une peroxydation lipidique. Ces réactions antioxydantes, enzymatiques et non enzymatiques, fournissent à la cellule un état d'équilibre et une protection contre les espèces réactives oxydées (Uday et al., 1990 ; Van Acker et Bast, 1993).

Le glutathion est un tripeptide qu'on trouve en concentration assez élevée (2-10 mM) dans les cellules animales et végétales (Wu et al., 2004). Le glutathion se trouve dans le cytosol en concentration élevée, le reste étant localisé dans les mitochondries, le noyau et les peroxysomes (Lu, 2000). Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le glutathion a un rôle très important dans le maintien de l'état réduit de la cellule (Yu, 1994 ; Kizek et al., 2004). Cette fonction thiol peut aussi fixer des fonctions électrophiles et sert donc à la détoxification. Une déficience en GSH expose les cellules à un risque oxydatif (Drögue, 2002). En effet, le GSH élimine les xénobiotiques comme les pesticides par conjugaison. Ce processus peut faire intervenir la glutathion-S-transférase (Renneberg, 1982. Noctor et al., 2002).

La réduction du taux de GSH peut être expliquée par les réactions de réduction des espèces activées de l'oxygène et des lipides hydroperoxydés catalysées par les glutathion peroxydases et par l'utilisation massive de ce dernier par la GST dans les réactions de conjugaison. Bien que certains intermédiaires réactifs se conjuguent spontanément au GSH, la majeure partie de ces réactions est catalysée par la GST. De ce fait, la structure des conjugués est dépendante de la régio-sélectivité des GST impliquées dans la formation de ces composés (Evans et al., 2004 ; Hayes et al., 2005). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Habig et al., (1974) ; Regoli et al., (1998) ; Canesi et al., (1999) ; Ringwood et al., (1999) ; Brigelius-Flohe, (1999) ; Roche et al (2003).

La glutathion S-transférase (GST) est considérée en toxicologie comme un biomarqueur enzymatique de la toxicité par les xénobiotiques (Almar *et al.*, 1998 ; Fenet, 1998 ; Yu, 2002). La GST joue un rôle physiologique important dans la protection de l'organisme contre de nombreux toxiques ainsi que dans l'initiation de la détoxification contre des agents potentiels d'alkylation y compris les composés pharmacologiquement actifs (Booth, *et al.*, 1961 ; Boyland *et al.*, 1969, Gallageher *et al.*, 2001 ; Donham *et al.*, 2005 Quiniou *et al.*, 2007), avec les groupements (-SH) du glutathion, cette enzyme neutralise les sites électrophiles et rend les métabolites toxiques plus solubles (Booth, *et al.* 1961; Wood, 1968). Nos résultats ont mis en évidence une augmentation de l'activité GST mettant ainsi en évidence le déclenchement des mécanismes de défense enzymatiques. Les substances conjuguées au glutathion seront métabolisées par le clivage du glutamate et les résidus de glycine, puis par une acétylation du groupement amine libre résultant des résidus de cystéinyle, pour produire au final, l'acide mercapturique. Les dérivés mercapturiques seront ensuite éliminés par les organes excréteurs (Boyland *et al.*, 1969, Wood, 1970).

L'activité catalase repose sur la transformation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire (O₂). La diversité des catalases a permis de les organiser en quatre principaux groupes : les catalases monofonctionnelles (catalases typiques), bi-fonctionnelles, des catalases peroxydases non hémiques et les catalases mineures. Le type le plus répandu de la catalase est la classe monofonctionnelle, présentes dans la plupart des cellules aérobies (Nicholls, 2001).

Dans l'organisme, la production de peroxyde d'hydrogène est induite par la présence de composés exogènes. Ce pendant, la catalase constitue, avec la superoxyde dismutase (SOD), la première ligne de défense contre le stress oxydant (McCord *et Fridovich*, 1969). en effet, la catalase est considérée comme l'un des biomarqueurs les plus sensibles du stress oxydatif particulièrement vis à vis des polluants chimiques aquatiques (Regoli *et Principato*, 1995 ; Livingstone, 2001 ; Regoli *et al.*, 2003 ; Vlahogianni *et al.*, 2007). Des études effectuées sur les érythrocytes (Cohen *et Hochstein*, 1963 ; Gaetani *et al.*, 1989), les hépatocytes (Jones *et al.*, 1981) et les fibroblastes en culture (Makino *et al.*, 1994), prouvent que la catalase est efficace, à de faibles concentrations, contre les taux relativement élevés de peroxyde d'hydrogène.

Plusieurs chercheurs rapportent des résultats très variables concernant l'activité des enzymes impliquées dans la défense antioxydante en présence du Glyphosate ; les uns

montrent que cet herbicide inhibe les activités de certaines enzymes telles que la GST, la SOD, l'acétylcholinestérase et la catalase (Irmaileh et Jordan, 1978 ; Lushchak et al., 2009 ; Salbego et al., 2010 ; Lajmanovich et al., 2010) et les autres confirment au contraire que le glyphosate provoque une augmentation de l'activité des ces enzymes (Uotila et al., 1995 ; Miteva et al., 2002 Langiano et Martinez, 2008 ; Moldes, 2008). Selon Van der Oost et al., (2003), l'utilisation de l'activité catalase comme un biomarqueur exclusive de la toxicité n'est pas recommandée ; En effet, il est nécessaire de vérifier l'activité d'autres enzymes intervenant également dans les réactions antioxydantes.

Nos résultats concernant la peroxydation lipidique confirment les malformations et les dégâts structuraux engendrés par le Glyphosate au niveau de la membrane et à l'intérieure de la cellule de *P. tetraurelia* par rapport à Amistar Xtra. Selon Nelson et al., (2006), les acides gras polyinsaturés constituent une cible facile pour les oxydants. Une fois lancé, le processus de la peroxydation lipidique devient auto-producteur en chaine des radicaux libres. L'accumulation des produits de la peroxydation lipidique constitue le marqueur biochimique le plus commun du stress oxydatif. Chen (2005), précise qu'il existe une forte corrélation entre l'acide thiobarbiturique des substances réactives (TBARS) (marqueur de la peroxydation lipidique) et les produits qui causent les dommages oxydatifs sur l'ADN. L'attaque radicalaire au niveau des membranes provoquent des modifications de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (Lawton et Donaldson 1991). Il a été démontré par Recknagel et Turocy (1977) que les produits dérivés d'une fonction oxydative microsomale, qui provoque une hémolyse des érythrocytes de rat par lipoperoxydation, sont très toxiques pour les cellules de *Paramecium multimicronucleatum*, ce qui confirme que l'attaque au niveau membranaire est similaire chez toutes les cellules animales.

La réaction des MDA avec les protéines conduit à la formation de groupements carbonyles au niveau des chaînes d'acides aminés (Burcham et Kuhan, 1996). La solubilité et les propriétés des protéines sont affectées par les réactions avec les produits d'oxydation des lipides. Les liaisons contractées entre les produits d'oxydation des lipides et les protéines sont de trois types : liaison covalente, liaison ionique, liaison hydrogène entre les groupements polaires des lipides oxydés et les protéines (Pokorny, 1977).

Ces résultats nous ont permis d'expliquer la réponse moléculaire de *P. tetraurelia* vis à vis l'agression chimique causée par le Glyphosate et les matières actives d'Amistar Xtra. Ce

système de défense, qui est présent chez toutes les cellules aérobies, neutralise les réactions chimiques intermédiaires produites par voie endogène ou par le métabolisme des xénobiotiques (Kappus, 1987; Winston et Di Gittlio, 1991). L'activité du système antioxydant peut subir une augmentation ou une inhibition sous l'effet d'un stress oxydatif, ces deux types de réponse dépendent de la durée du stress d'une part et de la sensibilité de l'espèce exposée d'autre part; l'induction du système de défense antioxydante peut être considérée comme une adaptation de l'organisme à un environnement pollué (Drögue, 2002).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La problématique initiale de ce travail était l'étude des réponses physiologiques et comportementales de *Paramecium tetraurelia* vis à vis de deux pesticides largement utilisés en agriculture dans notre région, le premier est un fongicide composé de deux matières actives (l'azoxystrobine et le cyproconazole) commercialisé sous le nom d'Amistar Xtra et le deuxième est un herbicide non sélectif appelé Glyphosate.

Pour ce faire, nous avons essayé d'optimiser la croissance de *P. tetraurelia* en maîtrisant toutes les conditions physicochimiques du milieu de culture. Nos résultats ont montré que cette espèce de protozoaires suit, dans des conditions bien précises, une courbe avec quatre étapes (latence, exponentielle, constance et déclin). L'allure de cette courbe peut être influencée par plusieurs facteurs tels que la température, le pH et la composition du milieu de culture.

Ainsi, la courbe de croissance de *P. tetraurelia* atteint son maximum avec des températures allant de 25 à 30°C, un pH légèrement acide semble être plus favorable à la croissance de cette espèce, la composition du milieu de culture et sa concentration en nutriments semble avoir un effet direct sur la croissance : Un milieu très concentré en nutriments inhibe la croissance alors qu'un milieu peu concentré produit un nombre réduit de cellules. Ces résultats nous ont permis d'établir un modèle de courbe de croissance permettant d'effectuer des tests de cytotoxicité dans des conditions extrêmement favorables.

Le traitement par Amistar Xtra et par le Glyphosate a été effectué après la réalisation d'un modèle de croissance à 30°C et à un pH égal à 6,5. L'impact des deux pesticides sur la croissance est significatif, particulièrement aux concentrations les plus élevées. Les concentrations moyennes qui inhibent à 50% la croissance des paramécies (CI_{50}) sont de l'ordre de 2,23 mg/l pour Amistar Xtra et 91,70 mg/l pour le Glyphosate.

L'impact d'Amistar Xtra est plus significatif en particulier en ce qui concerne le métabolisme respiratoire. Néanmoins, le Glyphosate est plus toxique du point de vue malformations et atteintes membranaires. L'intensité des malformations est dose-dépendante.

Le traitement par les fortes concentrations du Glyphosate induit des modifications morphologiques chez les paramécies (perte de symétrie et augmentations de volume) avec un cytoplasme dont le contenu semble plus excentré entraînant des modifications de la forme de cellules qui deviennent sphériques avec des extrémités plus fines et pointues. Enfin, nous avons également mis en évidence une atteinte structurale de la membrane entraînant la mort la cellule.

L'étude comportementale nous a permis de tester trois volets différents dans le comportement de *P. tetraurelia*. Nous avons ainsi analysé le réflexe d'évitement, la vitesse de déplacement et les trajectoires. Il s'est avéré que les pesticides ont provoqué une dépolarisation au niveau membranaire qui s'est traduite par des réactions brutales, des changements de directions et des nages désordonnées. Nous avons également mis en évidence une diminution de la vitesse de déplacement des paramécies sous l'effet des deux pesticides.

Tous ces résultats ont été complétés par une étude biochimique, dans laquelle nous avons mesuré le taux de certains antioxydants tels que le glutathion (GSH), l'activité glutathion S-transférase (GST) et catalase (CAT) ainsi que le taux de malonyldialdéhyde (MDA). Nos résultats ont révélé qu'Amistar Xtra et le Glyphosate induisaient un stress oxydatif chez les paramécies traitées surtout par les concentrations les plus élevées. Ces effets se sont traduits par la diminution du taux de glutathion (GSH) et l'augmentation de l'activité glutathion S-transférase (GST) et catalase ainsi que le taux de malonyldialdéhyde (MDA).

A l'issue de ce travail nous pouvons conclure que la paramécie est un modèle cellulaire idéal pour les études en toxicologie cellulaire et écotoxicologie vue son organisation cellulaire particulière, son comportement et sa culture simple et facile au laboratoire.

En perspectives, chaque résultat obtenu dans ce travail constitue une ébauche à part entière pour entreprendre de nouvelles recherches. De ce fait, Il est judicieux :

- ✓ De tester séparément les deux molécules pures d'Amistar Xtra (l'azoxystrobine et le cyproconazole) et de comparer leur combinaison avec la formule commerciale ;

- ✓ De comparer les effets des pesticides sur d'autres ciliés proches des paramécies comme *Tetrahymena pyriformis* ;
- ✓ D'entamer une recherche pluridisciplinaire en impliquant des chimistes, afin d'étudier la toxicité des produits de dégradations des pesticides testés sur l'environnement aquatique.
- ✓ D'étudier la respiration à partir de mitochondries isolées des paramécies.

Résumé

Le but de ce travail consiste en l'étude de la toxicité d'un fongicide "Amistar Xtra" et d'un herbicide le "Glyphosate" sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. Dans un premier temps, nous avons étudié la croissance de cette espèce sous certaines conditions physicochimiques bien déterminées. Nous avons ainsi pu réaliser l'allure générale de la courbe de croissance. Les résultats du deuxième chapitre ont montré que les deux pesticides ont affecté de façon significative la croissance et la respiration de *P. tetraurelia*. Les concentrations moyennes qui inhibent à 50% la croissance des paramécies (CI₅₀) sont de l'ordre de 2,23 mg/l pour Amistar Xtra et 91,70 mg/l pour le Glyphosate. Dans le troisième chapitre, nous avons mis en évidence des atteintes et des malformations que les deux pesticides ont provoquées durant le traitement. L'impact d'Amistar Xtra s'est avéré plus fort que celui du Glyphosate en ce qui concerne la respiration. Néanmoins, le Glyphosate semble plus toxique du point de vue malformations et atteintes membranaires. Le quatrième chapitre a porté sur les reflexes comportementaux de *P. tetraurelia* vis-à-vis des deux pesticides. Il a été démontré que ces deux xénobiotiques ont provoqué une perturbation du mouvement cellulaire se traduisant par des changements de directions et une nage désordonnée. La vitesse de déplacement des paramécies a été également affectée puisque nous avons noté un ralentissement de cette dernière. En fin, dans le dernier chapitre, nous avons confirmé la toxicité des deux xénobiotiques par l'augmentation de l'activité GST et catalase et du taux de MDA ainsi que la diminution du taux de GSH.

Mots clés : *P. tetraurelia*, croissance, respiration, comportement, malformations, Amistar Xtra, Glyphosate, toxicité.

Abstract

This work aims to study the toxic and inhibitory effects of a fungicide "Amistar xtra" and the herbicide "glyphosate" on the biology and behavior of *Paramecium tetraurelia*. The study was based on five main chapters. Through the first chapter, we studied the growth of this species under certain physicochemical parameters, in this part of results we have determined, under specific conditions, the general shape of the growth curve. The results of the second chapter have shown that both pesticides have affected remarkably the growth and respiration of *P. tetraurelia*. The mean concentrations that inhibit 50% the growth of paramecia (IC₅₀) were in the range of 2.23 mg/l for Amistar Xtra and 91.70 mg/l for Glyphosate. In the third chapter we presented the types of damages that both pesticides have caused during treatment. The impact of Amistar Xtra was stronger than that of Glyphosate regarding to the respiration. However, Glyphosate was more harmful regarding to malformations and membrane damage. The fourth chapter focused on the reflex behavior of *P. tetraurelia* against the two pesticides. It has been shown that both pesticides have caused depolarization at the membrane level which was reflected in brutal reactions, changing directions and random swims. The velocity of paramecia was reduced considerably under the effect of the two pesticides. In the last chapter, we tried to characterize the degree of chemical attack caused by Amistar Xtra and Glyphosate through the study of antioxidants. The four measured antioxidants are glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA).

Keywords: *P. tetraurelia*, growth, respiration, behavior, malformations, Amistar Xtra, Glyphosate, toxicity.

الملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة التأثيرات السمية و المثبطة لمضاد الفطريات أميستار إكسترا (Amistar xtra) ومبيد الأعشاب الغليفوسات (Glyphosate) على بيولوجيا وسلوك *Paramecium tetraurelia*. استندت الدراسة على خمسة فصول رئيسية. خلال الفصل الأول قمنا بدراسة نمو البراميسيوم تحت بعض العوامل الفيزيوكيميائية ، في هذا الجزء من النتائج حددنا ، في ظل شروط دقيقة، الشكل العام لمنحنى النمو عند هذا النوع من الكائنات . وقد أظهرت نتائج الفصل الثاني أن كلا المبيدين أثرا بشكل كبير في نمو وتنفس البراميسيوم. وكان متوسط التراكيز التي تثبط 50% من نمو باراميسيا (CI₅₀) في حدود 2.23 مغ/ل لأميستار إكسترا و 91.70 مغ/ل للغليفوسات. في الفصل الثالث قدمنا أنواع التشوهات التي تسبب فيها المبيدين خلال فترة المعالجة. وكان تأثير أميستار إكسترا على التنفس أقوى من الغليفوسات . في المقابل ، كان الغليفوسات أكثر ضررا في ما يخص التشوهات وأضرار الغشاء الخلوي. الفصل الرابع ركز على سلوك البراميسيوم مع المبيدين. فقد تبين أن كلاهما تسبب في تغيير الاستقطاب على مستوى الغشاء الخلوي مما أدى إلى ردود أفعال فجائية، تغيير في الاتجاهات والسباحة العشوائية. وقد انخفضت سرعة حركة الباراميسيوم إلى حد كبير نتيجة المبيدات. في النهاية، و في الفصل الأخير، حاولنا أن نقدر درجة التأثير الكيميائي لأميستار إكسترا والغليفوسات من خلال دراسة المواد المضادة للأوكسدة.

الكلمات الرئيسية : البراميسيوم ، النمو، التنفس، السلوك، أميستار إكسترا، الغليفوسات، السمية

Références bibliographiques

- Abu-Irmaileh B.E., Jordan L.S. (1978). Some aspects of glyphosate action in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*) *Weed Science*. 26(6): 700-703.
- Acker V., Koymans L.M.H., Bast A. (1993). Molecular pharmacological importance of vitamin E, structural aspects of NADP. *Free radical. Biol. Med.* 5: 311-328.
- Almar M., Otero L., Santos C., Gonzalez Gallego J. (1998). Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *J. Environ. Sci. Health* 33(6): 769-783.
- 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., Hussain M.M. (2010). Cytotoxicity assessment of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. *J. Environ. Biol.* 31(5): 603-607.
- André J., Grassé P.P. (1994). *Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie. Infusoires ciliés. Structure, physiologie, reproduction, Vol. 2.* University of Chicago. p.821.
- Aufderheide K.J. (1987). Clonal aging in *Paramecium tetraurelia*. II. Evidence of functional changes in the macronucleus with age. *Mech. Ageing Dev.* 37: 265.
- Avila-Adame C., Köller W. (2003). Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *Magnaporthe grisea* to Qo-inhibiting fungicides. *Pest Manag. Sci.* 59(3): 303-309.
- Azouz Z., Berrebah H., Djebbar R. (2011). Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. *Afri. J. Microbiol. Res.* 5(20): 3243-3250.
- Bandyopadhyay U., Das D., Banerjee R.K. (1990). Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr. Sci.* 77: 658-666.
- Barouki R., Morel Y. (2001). Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem. Pharmacol.* 61: 511-516.
- Barriuso E. (2004). Estimation des risques environnementaux des pesticides. Editions Quae. p. 123.
- Barriuso E., Calvet R., Schiavon M., Soulas G., (1996). Les pesticides et les polluants organiques des sols - transformation et dissipation. *Étude et gestion des sols* 3-4: 279-296.
- Beale G.H. (1954). *The genetics of Paramecium aurelia.* Cambridge: Cambridge University Press.

- Beale G.H. Preer J.R. (2008). *Paramecium: genetics and epigenetics*. 1st edition. Taylor & Francis Group, Boca Raton. 191p.
- Beek B. (1999). *Bioaccumulation New Aspects and Developments*. Springer. p.284.
- Beisel J.N., Lévêque C. (2010). Introductions d'espèces dans les milieux aquatiques: Faut-il avoir peur des invasions biologiques ? Editions Quae. p. 248.
- Beisson J. Capdeville Y. (1966). Sur la nature possible des étapes de différenciation conduisant à l'autogamie chez *Paramecium aurelia*. *C. R. Acad. Sci.* 263:1258.
- Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M. Djebar M.R. (2012). Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium* sp. with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicol. Environ. Chem.* 94(3): 557-565.
- Bodenheimer F.S. (1955). *Précis d'écologie animale*. Edit. Payot. Université de Cornell. p. 315.
- Bollag J.M., Liu S.Y. (1990). Biological transformation processes of pesticides in Ed. Cheng H.H. *Pesticides in the soil environment: Processes, impacts and modelling*. SSSA Book Series. 6:169-211.
- Booth I., Boyland E., Sins P. (1961). An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. *Biochem. J.* 79: 516-524.
- Boyland E., Chasseaud, L.F. (1969). The role of glutathione and glutathione-S- transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advan. Enzymol.* 32: 172-219.
- Branger A., Richer M.M., Roustel S. (2007). *Microbiochimie et alimentation*. *Educagri Editions*. 343 p.
- Brigeius-Flohe R. (1999). Tissue-specific function of individual glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 951-965.
- British Crop Protection Council (2000). *The Pesticide Manual*. 12th edition. 1250 p.
- Brønstad J.O., Friestad H.O. (1985). Behaviour of glyphosate in the aquatic environment. In: Grossbard E. and Atkinson D. (eds). *The herbicide glyphosate*. London: Butterworths. pp.200-205.
- Brygoo Y. (1977). Genetic analysis of mating-type differentiation in *Paramecium tetraurelia*. *Genetics.* 87: 633-653.
- Burgeot T. (1998). *Bioindicateurs et biomarqueurs: des outils pour la surveillance du milieu aquatique*. Edit. Chimie et Ecologie. p. 51.
- Burton K., Taylor D.L. (1997). Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature.* 385: 450-454.

- Calvet R. (2005). Les pesticides dans le sol: Conséquences agronomiques et environnementales. France Agricole Editions. p. 637.
- Calvet R. Charnay M.P. (2002). Le devenir dans le sol des substances phytopharmaceutiques. In pesticide et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement Ed. ACTA, Paris. pp.805-833.
- Campan R., Scapini F. (2002). Ethologie: Approche systémique du comportement. Edit. De Boeck Supérieur, France. 740 p.
- Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M., Gallo G. (1999). Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46:67-76.
- Cavas T., Knen S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis.* 22: 263-268.
- Chagra A., Djebar M. R., Rouabhi R., Berrebbah H. (2009). Cadmium Induced Changes in Metabolic Function of Mitochondrial Isolated from Potato Tissue (*Solanum tuberosum* L.). *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 5(1): 35-39.
- Charbonneaux A. (1993). Synthèse bibliographique des principales familles de pesticides. p. 88.
- Charras G.T., Yarrow J., Horton M.A., Mahadevan L., Mitchison T.J. (2005). Nonequilibrium of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature* 435: 365-369.
- Chen H.J. Wu C.F., 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: 403-410.
- Choquette L. (1987). Toxicité du glyphosate sur les composantes vivantes du milieu (revue de la littérature), Québec, gouvernement du Québec, ministère de l'Énergie et des Ressources, Direction de la conservation, Service des études environnementales. 64 p.
- Cohen G., Hochstein P. (1963). Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry.* 2: 1420-1428.
- Corbaz R. (1990). Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. PPUR presses polytechniques. p.286.
- Costa M.J., Monteiro D.A., Oliveira-Neto A.L., Rantin F.T., Kalinin A.L. (2008). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicology* 17: 153–163.
- Coupland D., Caseley J.C. (1979). Presence of ¹⁴C activity in root exudates and guttation fluid from *Agropyron repens* treated with ¹⁴C labelled glyphosate. *New Phytol.* 83: 17-22.

- Crafts A.S. (1975). *Modern Weed Control*. University of California Press. p. 440.
- Crenshaw H.C., Ciampaglio C.N., McHenry M. (2000). Analysis of the threedimensional trajectories of organisms: estimates of velocity, curvature and torsion from positional information. *J. Exp. Biol.* 203: 961-982.
- Cunningham C.C. (1995). Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J. Cell. Biol.* 129: 1589-1599.
- Daniel C.S., Agarwal S., Agarwal S.S. (1986). Human red blood cell membrane damage by endosulfan. *Toxicol Lett.* 32(1-2): 113-8.
- Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques. Editions Tec & Doc. p. 549.
- Delattre J., Théron P., Bonnefont-Rousselot D. (2005). Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In: Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques*. Paris. Lavoisier. pp.281-309.
- Desaint S., Luriau S., Aude J.C., Rousselet G., Toledano M.B. (2004), Mammalian antioxidant defenses are not inducible by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 279: 31157-63.
- Diller W.F. (1936). Nuclear reorganization processes in *Paramecium aurelia*, with descriptions of autogamy and "hemixis." *J. Morph.* 59:11.
- Dippell R.V. (1955). A preliminary report on the chromosomal constitution of certain variety 4 races of *Paramecium aurelia*. *Caryologia Suppl.* 1109-1111.
- Djebar M.R., Djebar H. (2000). Bioénergétique, les mitochondries végétales. Synthèse. 8: 23-25.
- Doliner L.H. (1991). Emploi avant récolte du glyphosate (RoundupMD), Document de travail, Agriculture Canada, Direction des pesticides, 107 p.
- Donham R.T., Morin D., Jewell W.T., Burns S.A., Mitchell A.E., Lamé M.W., Segall H.J., Tjeerdema R.S. (2005). Characterization of glutathione S-transferases in juvenile white sturgeon. *Aqua. Toxicol.* 71: 203-214.
- Dragesco J., Dragesco-Kernéis A., Fryd-Versavel G. (1986). Ciliés libres de l'Afrique intertropicale: introduction à la connaissance et à l'étude des Ciliés. IRD Editions. p. 559.
- Draper H.H., Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 186: 241-431.
- Dreidt F., Romick T.L., Fleming H.P. (1994). A rapid method for the determination of bacterial growth kinetics. *J. Rap. Meth. Autom. Microbiol.* 3: 59-68.
- Drögue W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.

- Durand J.R. (1994). Environnement et ressources aquatiques de Côte d'Ivoire: Les milieux lagunaires. Editions de l'ORSTOM, 546 p.
- Eckert R., Brehm P. (1979). Ionic mechanisms of excitation in *Paramecium*. *A. Rev. Biophys. Bioeng.* 8: 353-383.
- Eckert R., Naithoh Y. (1970). Passive electrical properties of *Paramecium* and problems of ciliary coordination. *J. gen. Physiol.* 55: 467-83.
- Eckert R., Randall D. (1999). Physiologie animale: Mécanismes et adaptations. Edit. De Boeck Supérieur. 840 p.
- Ellman G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.
- Ershov Y.A., Pletneva T.V., Sinyuk T.F., Dolgopolova V.A. (1999). Evaluation of growth parameters in *Paramecium caudatum* test model for standardization of biological screening. *Bull. Exper. Biol. Med.* 127(6): 656-659.
- Evans D.C. Watt A.P., Nicoll-Griffith D.A., Baillie T.A. (2004). Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 3-16.
- FAO (1989). Revised Guidelines on environmental Criteria for the Registration of Pesticides. Food and Agriculture organisation of the United Nations, Rome.
- Fenet H., Casellas C., Bontoux J., (1998). Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in European eel and rainbow trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 40: 137-143.
- 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.
- Flammarion P., Péry A. (2004). Apports de la modélisation des effets des toxiques sur l'individu et la population en écotoxicologie aquatique. *Rev. Sci. Eau.* 17(4) : 489-502.
- Forbes V.E., Forbes T.L. (1997). Ecotoxicologie: Théorie et applications. Editions Quae. p.256.
- Foster S.S.D., Chilton P.J., Stuart Marianne E. (1991). Mechanisms of groundwater pollution by pesticides. *J.IWEM.* 5. pp. 186-193.
- Franz J.E., Mao M.K., Sikorski J.A. (1997). Glyphosate: A unique global herbicide. *Am. Chem. Soc.* Chap. 4. pp. 65-97.
- Friedl P., Wolf K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 362-374.
- Gaetani G.F., Galiano S., Canepa L., Ferraris A.M., Kirkman H.N. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood.* 73: 334-339.

- Gallagher E.P., Gross T.S., Sheehy K.M. (2001). Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in Lake Apopka brown bullheads (*Ameriurus nebulosus*). *Aquat. Toxicol.* 55: 223-227.
- Garad U., Desai S.N., Desai P.V. (2007). Toxic effects of monocrotophos on *Paramecium caudatum*. *Afr. J. Biotech.* 6(19): 2245-2250.
- Gauvrit C. (1996). Efficacité et sélectivité des herbicides. Editions Quae. p. 168.
- Gérard G. (1999). L'eau : usage et polluants. Tome II. INRA. Editions Quae. Paris p. 210.
- Gilley D., Blackburn E.H. (1994). Lack of telomere shortening during senescence in *Paramecium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 1955.
- Glaser O. (1924). Temperature and forward movement of *Paramecium*. *J. Gen. Physiol.* 7(2): 177-88.
- Glaser O. (1925). Temperature and the mechanism of locomotion in *Paramecium*. *J. Gen. Physiol.* 9(1): 115-121.
- Goldsborough L.G., Beck A.E. (1989). Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 537-544.
- Gossbard E. (1985). Effects of glyphosate on the microflora with reference to the decomposition of treated vegetation and interaction with some plant pathogens. pp. 159-185 in E. Grossbard and D. Atkinson, ed. the herbicides glyphosate. Butterworthe, London.
- Grandy N.J. (1994). Development and revision of OECD test guidelines on environment fate of pesticides and regulatory aspects. *European study Services*. pp. 24-31.
- Guo L., Kelley K., Goh K.S. (2007). Evaluation of Sources and Loading of Pesticides to the Sacramento River, California, USA, During a Storm Event of Winter 2005. *J. Environ. Toxicol. Chem.* 26(11): 2274-2281.
- Guo L., Nordmark C., Spurlock F., Johnson B., Li L.Y., Lee M., Goh K.S. (2004). Characterizing Dependence of Pesticide Load in Surface Water on Precipitation and Pesticide Use for the Sacramento River Watershed. *Environ. Sci. Technol.* 38: 3842-3852.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130-7139.
- Haga N., Forte M., Siami Y., KUNG C. (1982). Microinjection of cytoplasm as a test of complementation in *Paramecium*. *J. Cell Biol.* 96: 1072-1080.
- Hamel A., Fisch C., Combettes L., Dupuis-Williams P., Baroud C.N. (2011). Transitions between three swimming gaits in *Paramecium* escape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(18): 7290-7295.

- 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.
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005). Glutathion transferase. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 51-88.
- Haynes W.J., Ling K.Y., Preston R.R., Saimi Y., Kung C. (2000). The Cloning and Molecular Analysis of *pawn-B* in *Paramecium tetraurelia*. *Genetics* 155: 1105-1117.
- Hemmersbach R., Bromeisl B., Block I., Btiucke R., Krause M., Freiberger N., Stieber C., Wilczek M. (2001). *Paramecium* a model system for studying cellular graviperception. *Adv. Space Res.* 27(5): 893-898.
- Hertwig R. (1889). Ber die conjugation der Infusorien. *Abh. Bayer. Akad. Wiss.* 17: 150.
- Hertwig R. (1914). Ber parthenogenesis der Infusorien und die Depressionszustände der Protozoen. *Biol. Zentralbl.* 34: 557.
- Hesser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W., Holland P.T., (1988). Recommended approach to the evaluation of the environment behaviour of pesticides. IUPAC reports on pesticides (24). *Pure appl. Chem.* 60(6): 901-032.
- Heydarnejad M.S. (2008). Survival of *Paramecium caudatum* at various pH values and under normoxic and hypoxic conditions. *Pak. J. Biol. Sci.* 11(3): 392-397.
- Hildebrand E., Dryl S. (1983). Dependence of ciliary reversal in *Paramecium* on extracellular Ca²⁺ concentration. *J. Comp. Physiol.* 152: 385-394.
- Houten J.V, Chang S.Y., Kung C. (1977). Genetic analysis of paranoiac mutants of *Paramecium tetraurelia*. *Genetics* 86: 113-120.
- Hunter W., Yang W., Spurlock F., Gan J. (2008). Solid-Phase Microextraction (SPME) Methods to Measure Bioavailable Concentrations in Surface Water. p. 130-148. In: Gan, J., F. Spurlock, P. Hendley, and D. Weston (ed.) 2008. Synthetic Pyrethroids: Occurrence and Behavior in Aquatic Environments. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 991. Amer. Chem. Soc., Washington, DC.
- Hussain M.M., Amanchi N.R., Solanki V.R., Bhagavathi M. (2008). Low cost microbioassay test for assessing cytopathological and physiological responses of ciliate model *Paramecium caudatum* to carbofuran pesticide. *J. Pesti. Biochem. Physiol.* 90: 66-70.
- Hutber G.N., Rogers L.J., Smith A.J. (1979). Influence of Pesticides on the Growth of Cyanobacteria. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie.* 19: 397-402.

- Institut national de la recherche agronomique (France) 2007. Pesticides, agriculture et environnement: Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Editions Quae, 120 p.
- Ishikawa T., Hota M. (2006). Interaction of two swimming *Paramecia*. *J. Exper. Biol.* 209: 4452-4463.
- Jahn T. L. (1962). The mechanism of ciliary movement. II. Ion antagonism and ciliary reversal. *J. cell. comp. Physiol.* 60: 217-28.
- Jain M., Bhalla-Sarin N. (2001). Glyphosate-Induced Increase in Glutathione S-Transferase Activity and Glutathione Content in Groundnut (*Arachis hypogaea*). *Pest. Biochem. Physiol.* 69(3): 143–152.
- Jamet P., (1994). The COST action 66: “fate of pesticides in the soil and the environment”. Proceeding of the 5th international workshop on environment behaviour of pesticides and regulatory aspects. *European study Services*. pp. 35-42.
- Jamet P., Deleu R., (1993). Environment fate to pesticides: behaviour of pesticides in soil. *Agro-Industry High-Tech.* 4(3): 19-21.
- Johnson A.C., (1995). The use of mini-lysimeters to study the influence of rainfall intensity on pesticide transport and water pathways. BCPC Monograph N° 62: *pesticide movement to water*. 33-38.
- Jones D.P., Ekl6w L, Thor H, Orrenius S. (1981). Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 210: 505-516.
- Jurand A., Selman G.G. (1969). The anatomy of *Paramecium aurelia*. London: Macmillan. 218 p.
- Kaneko I., Ishii H. (2009). Effect of azoxystrobin on activities of antioxidant enzymes and alternative oxidase in wheat head blight pathogens *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75(5): 388-398,
- Kappus H., (1987). Oxidative stress in chemical toxicity. *Arch. Toxicol.* 60: 144-149.
- Karou T.G., Rocourt J., Dosso M., Diopoh K.J. (2003). Influence de la température du milieu de culture sur la croissance de quelques souches de *Listeria Sp.* isolées en Côte d'Ivoire. *Agronomie Africaine.* 15(1): 1-12.
- Kawate M.K., Kawate S.C., Ogg A.G, Kraft J.M. (1992). Response of *Fusarium solani f. sp. Pisi* and *Pythium ultimum* to glyphosate. *Weed Science.* 40: 497-502.
- Khopkar S.M. (2007). Environmental pollution monitoring and control. Edit. New Age International. p.494.

- Kidd H., James, D.R. (1991). The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, (As Updated).10-2.
- Kimball R.F. (1953). The structure of the macronucleus of *Paramecium aurelia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 39: 345.
- Kinosita H. (1954). Electrical potentials and ciliary response in *Opalina*. *J. Fac. Sci. Tokyo Univ.* (Sect, IV). 7: 1-14.
- Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Jelen F. (2004): Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris (2-carboxyethyl) phosphine. *Bioelectrochemistry*, 63: 19-24.
- Klobutcher L.A, Herrick G. (1997). Developmental genome reorganization in ciliated Protozoa: the transposon link. *Prog. Nucl Acid Res Mol Biol*. 56: 1-62.
- Kovacs M.F.J. (1983). EPA guidelines on environment fate. *Resid. Rev.*, Vol 85: 3-16.
- Kung C. (1971). Genic mutants with altered system of excitation in *Paramecium aurelia*. I. Phenotypes of the behavioural mutants. *Z. Vergl. Physiol*. 71: 142-164.
- Lachuer E. (2011). Les produits phytosanitaires: Distribution et application. Les différentes méthodes de lutte et le choix d'un produit en lutte chimique. Tome 1. Educagri Editions. p. 242.
- Lamarque J. (1990). Code de l'environnement. Vol. 18. Édition Dalloz, 3. p. 1546.
- Langiano V.C., Martinez C.B.R. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Bioch. Physiol. Part C. Toxicol Pharmacol*. 147(2): 222-231.
- Lawton L.J., Donaldson W.E. (1991). Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxydation. *Biol. Trace Elem. Res*. 28: 93-97.
- Lee J.W. (1942). The Effect of Temperature on Food Vacuole Formation in *Paramecium*. *Physiol. Zool*. 15(4): 453-458.
- Lévesque C.A., Rahe J.E. (1987). Effects of glyphosate on *Fusarium spp*: its influence on root colonization of weeds, propagule density in the soil, and crop emergence. *Can. J. Microbiol*. 33 : 321-324.
- Liebig J. (1844). Chimie appliquée à la physiologie végétale et à l'agriculture. Gerhardt M. (trad.), 2^{ème} ed. Fortin, Masson & Cie. 544 p.
- Ling-yun M.A., ZHAO L. (2008). Effect on peroxidase and catalase activities of muskmelon treated with azoxystrobin. *Food Sci. Tech*. 11-29.

- Livingstone D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656-666.
- Lu S.C. (2000). Regulation of glutathione synthesis. In *Current topics in Cellular Regulation*, Vol. 36. Academic Press Inc. San Diego, pp. 95-116.
- Lushchak O.V., Kubrak O.I., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*. 76(7): 932-7.
- Machemer H. (2001). The swimming cell and its world: Structures and mechanisms of orientation in protists. *Eur. J. Protistol.* 37: 3-14.
- Machemer H., Eckert R. (1973). Electrophysiological control of reversed ciliary beating in *Paramecium*. *J. Gen. Physiol.* 61(5): 572-587.
- Madoni P. (2000). The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environ. Poll.* 109: 53-59.
- Maibach H.I. (1986). Irritation, sensitization, photoirritation and photosensitization assays with a glyphosate herbicide. *Contact Derm.* 15: 152-156.
- Majima T., Hamasaki T., Arai T., (1986). Increase in cellular cyclic cGMP level by potassium stimulation in *Paramecium tetraurelia*. *Experientia*, 42: 62-64.
- Makino N., Mochizuki Y., Bannai S., Sugita Y. (1994). Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269: 1020.
- Marc J., Mulner-Lorillon O., Bellé R. (2004). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol.Cell.* 96: 245-249.
- Maupas E. (1883). Contribution à l'étude morphologique et anatomique des infusoires ciliés. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 2: 427.
- Maupas E. (1889). Le rajeunissement karyogamique chez les ciliés. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 2: 149.
- Mayer K.M., Mikami K., Forney J.D., (1998). A Mutation in *Paramecium tetraurelia* Reveals Functional and Structural Features of Developmentally Excised DNA Elements. *Genetics* 148: 139-149.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- McDonald A., Vanlerberghe G. (2004). Branched mitochondrial electron transport in the Animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUBMB Life.* 56(6): 333-341.
- Metz C.B. (1948). The nature and mode of action of the mating type substances. *Am. Nat.* 82:85.
- Mikami K. Hiwatashi K. (1975). Macronuclear regeneration and cell division in *Paramecium caudatum*. *J. Protozool.* 22: 537.

- Mills J.C., Stone N.L., Erhardt J., Pittman R.N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell. Biol.* 140: 627-636.
- Mills S.M., (1931). The Effect of the Hydrogen-ion Concentration on Protozoa, as Demonstrated by the Rate of Food Vacuole Formation in *Colpidium*. *Brit. Jour. Exp. Biol.* 8: 17.
- Mishchenko T.V. (2011). Effect of herbicide "Roundup" on characteristics of lipid peroxidation in carp. *J. Hydrobiol.* 47(5): 67-71.
- Mitchison N.A. (1955). Evidence against micronuclear mutations as the sole basis for death at fertilization in aged, and in the progeny of ultra-violet irradiated *Paramecium aurelia*. *Genetics* 40: 61.
- Miteva L., Ivanov S., Alexieva V., Karanov E. (2002). Effect of Herbicide Glyphosate on Glutathione Levels, Glutathione-S-Transferase and Glutathione Reductase Activities in Two Plant Species. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences.* 56: 1:79.
- 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.Heal. Sci.* 49(6): 429-435.
- Modesto K.A., Martinez C.B.R. (2010). Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere.* 81: 781-787.
- Moldes C.A., Medici L.O., Abrahão O.S., Tsai S.M., Azevedo R.A. (2008). Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. *Acta Physiol. Plant.* 30(4): 469-479.
- Momayezi M., Albrecht P., Plattner H., Schmidt H.J. (2004). Temperature-Induced Change of Variant Surface Antigen Expression in *Paramecium* Involves Antigen Release into the Culture Medium with Considerable Delay between Transcription and Surface Expression. *J. Memb. Biol.* 200: 15-23.
- Monsanto (1983). Acute inhalation study with rats, ML-81-201; EHL No 810093.
- Monsanto Company (1985). Toxicology of Glyphosate and Roundup Herbicide. St. Louis, MO.,10-97.
- Morel Y., Barouki R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Med. Sci.* 14: 713-21.
- Morel Y., Barouki R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* 342: 481-96.
- 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.

- Mortuza M.G., Takahashi T., Ueki T., Kosaka T., Michibata H., Hosoya H. (2009). Comparison of hexavalent chromium bioaccumulation in five strains of paramecium, *Paramecium bursaria*. *Journal of Cell and Animal Biology* Vol. 3(4): 062-066.
- Naitoh Y. (1958). Direct current stimulation of *Opalina* with intracellular microelectrode. *Amtotnes zool.jap.* 31: 59-73.
- Naitoh Y. (1966). Reversal response elicited in nonbeating cilia of *Paramecium* by membrane depolarization. *Science* 154: 660-2.
- Naitoh Y. (1968). Ionic control of the reversal response of cilia in *Paramecium caudatum*. A calcium hypothesis. *J. gen. Physiol.* 51: 85-103.
- Naitoh Y., Eckert R. (1968). Electrical properties of *Paramecium caudatum*: modification by bound and free cations. *Z. vergl. Physiol.* 61: 427-52.
- Naitoh Y., Eckert R. (1969). Ciliary orientation: controlled by cell membrane or by intracellular fibrils? *Science* 166: 1633-5.
- Nakaoka Y., Oosawa F. (1977). Temperature-Sensitive Behavior of *Paramecium caudatum*. *J. Eukar. Microbiol.* 24: 575-580.
- Nelson S.K., Bose S.K., Grunwald G.K., Myhill P., McCord J.M. (2006). The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 40(2): 341-7.
- Nicholls P., Fita I., Loewen P.C. (2001). Enzymology and structure of catalases. *Adv. Inorg. Chem.* 51: 51-106.
- Noctor G., Gomez L., Vanacker H. Foyer C.H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53(372): 1283-304.
- OECD (1981). Guidelines for testing chemicals. Method N° 106: adsorption.
- OECD (1995). Report of the OECD workshop on environment hazard risk assessment. OECD environment Monographs N° 105.
- Offen R.J., Roberts A.M. (1973). The relations between membrane potential and parameters of ciliary beat In free-swimming *Paramecium caudatum*. *J. Exp. Biol.* 59: 583-593.
- Olaya G., Zheng D., Kller W. (1998). Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Pestic. Sci.* 54(3): 230-236.
- Olaya G., Kller W. (1999). Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. *Plant Dis.* 83(3): 274-278.

- Olsvik P.A., Kroglund F., Finstad B., Kristensen T. (2010). Effects of the fungicide azoxystrobin on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Smolt. Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(8): 1852-61.
- Oosawa F., Nakaoka Y. (1977). Behavior of Micro-organisms as Particles with Internal State Variables. *J. Theor. Biol.* 66: 747-761.
- Otto H.J. (1998). *Ecologie forestière*. Edit. Forêt privée française. p. 397.
- Packroff G. (2000). Protozooplankton in acidic mining lakes with special respect to ciliates. *Hydrobiol.*, 433(1-3): 157-166.
- Pesce S., Batisson I., Bardot C., Fajon C., Portelli C., Montuelle B., Bohatier J. (2009). Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotox. Environ. Saf.* 72: 1905-1912.
- Piégay H., Pautou G., Ruffinoni C. (2003). *Les forêts riveraines des cours d'eau: Ecologie, fonctions et gestion*. Edit. Forêt privée française. p. 463.
- Plomin R., DeFries J.C., McClearn G.E., Rutter M. (1998). *Des gènes au comportement: Introduction à la génétique comportementale*. Edit. De Boeck Supérieur. 496 p.
- Prescott D. (1994). The DNA of ciliated Protozoa. *Microbiol. Rev.*; 58: 1333-67.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C.M., Dusart J. (2003). *Microbiologie*. Édit.2. *De Boeck Université*, 1164 p.
- Preston R.R. , Usherwood P.N.R. (1988). L-Glutamate- induced membrane hyperpolarization and behavioral response in *Paramecium tetraurelia*. *J. Comp. Physiol. A.* 158: 309-319.
- Quilty S.P., Geoghegan M.J. (1974). The degradation of glyphosate in peat. *Proc. Soc. Gen. Microbiol.* 3: 129.
- Quiniou F., Damiens G., Gnassia-Barelli M., Geffard A., Mouneyrac C., Budzinski H., Roméo M., (2007). Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Environ. Int.* 33: 27-33.
- Recknagel R.O., Turocy Y. (1977). Fatal susceptibility of a free-swimming paramecium to peroxidizing rat liver microsomes. *Exp. Mol. Pathol.* 27: 93-105.
- Regoli F., Nigro M., Orlando E. (1998). Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aqua. Toxicol.* 40: 375-392.
- Regoli F., Principato G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals in different field and laboratory conditions: implications for a proper use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31: 143-164.

- 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.
- Renneberg H. (1982). Glyphosate metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochem.* 21: 2771-2781.
- Ricklefs R.E., Miller G.L. (2005). *Ecologie*. Edit. De Boeck Supérieur. Paris. p. 858.
- Ringwood A.H., Connors D.E., Keppler C.J., DiNovo A.A. (1999). Biomarker studies with juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) deployed *in situ*. *Biomarkers.* 4: 400-415.
- Roberts T.R., (1990). Environment fate of pesticides: a perspective. Chapter N°1, p1-12. *In environment fate of Pesticides*. D.H. Hustson & T.R. Roberts eds., John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Roche H., Buet A., Ramade F. (2003). Mise en évidence et validation de biomarqueurs écotoxicologiques dans la population d'anguilles d'un étang de la réserve naturelle nationale de Camargue, le Vaccarès exposée à des polluants organiques persistants. *Rev. Ecol.* 58: 127-141.
- Rouabhi R., Berrebbah H., Djebbar M.R. (2006). Toxicity evaluation of flucycloxuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium sp.* *Afr. J. Biotech.* 5(1): 045-048.
- Rouabhi R., Saci F.Z., Berrebbah H., Djebbar M.R. (2009). Toxic effects of combined molecule from novaluron and diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. *Am.Eur. J. Toxicol. Sci.* 1(2): 74-80.
- Salbego J., Pretto A., Gioda C.R., de Menezes C.C., Lazzari R., Radünz N.J, Baldisserotto B., Loro V.L. (2010). Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth, Acetylcholinesterase Activity, and Metabolic and Hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58(3): 740-745.
- Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi R., Sbartai H., Guy S., Djebbar M.R. (2009). Behavior of *Paramecium Sp.*, Treated with bifenazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *Am.Eur. J. Toxicol Sci.* 1(1): 13-18.
- Schopfer W.H. (1935). Recherches sur l'utilisation des facteurs de croissance par un microorganisme. La synthèse biologique des facteurs de croissance. *Arch. Microbiol.* 6(1-5): 196-207.

- Schultz J.E., Klumpp S., Bernz R., Schürhoff-Goetus W.J., Schmid A. (1992). Regulation of adenylate cyclises from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductive. *Science* 255: 600-603.
- Shahina Kalim Y., Luthra P., Gandhi S.K. (2000). Influence of Bavistin seed treatment on morphophysiological and biochemical parameters of cowpea roots susceptible to *Rhizoctonia* species. *J. Mycol. Plant Pathol.* 30(3): 375-379.
- Shalom A.L., Bergmann F. (2004). Properties and biological activity of a new peptide antibiotic (Colisan), *Biotechnol. Bioeng.* 10: 429-444.
- Sharma B., Rai D.K., Rai P.K., Rizvi S.I., Watal G. (2010). Determination of Erythrocyte Fragility as a Marker of Pesticide-Induced Membrane Oxidative Damage. *Meth. Mol. Biol.* 594: 123-8.
- Siegel R.W. (1963). New results on the genetics of mating types in *Paramecium bursaria*. *Genet. Res.* 4: 132.
- Sies H. (1991). Oxidative stress : introduction. In : Oxidative stress, oxidants and antioxidants. H. Sies Ed. London : London Academic Press, pp XV-XXII.
- Sluse F.E., Jarmuszkiewicz W. (1998). "Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role". *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31(6): 733-47.
- Smith E.A., Oehme F.W. (1992). The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Veter. Hum. Toxicol.* 34(6): 531-43.
- Sonneborn T.M. (1950). Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. Exp. Zool.* 113: 87.
- Sonneborn T.M. (1975). *Paramecium aurelia*. In *Handbook of genetics*, ed. R. C. King, chap. 20. Vol. 2. New York: Plenum Press.
- Sonneborn T.M. (1937). The extent of the interendomictic interval in *P. aurelia*, and some factors determining its variability. *J. Exp. Zool.* 75: 471.
- Sonneborn T.M. (1939). *Paramecium aurelia*: Mating types and groups; lethal interactions; determination and inheritance. *Am. Nat.* 73: 390.
- Sonneborn T.M. (1947). Recent advances in the genetics of *Paramecium* and *Euplotes*. *Adv. Genet.* 1: 264.
- Sonneborn T.M. (1954). Gene-controlled, aberrant nuclear behavior in *Paramecium aurelia*. *Microb. Genet. Bull.* 11: 24.

- Sonneborn T.M. (1954). The relation of autogamy to senescence and rejuvenescence in *Paramecium aurelia*. *J. Protozool.* 7: 38.
- Sonneborn T.M., Dippell R.V. (1946). Mating reactions and conjugation between varieties of *P. aurelia* in relation to conceptions of mating type and variety. *Phys. Zool.* 19: 1.
- Sonneborn T.M., Dippell R.V. (1960). Cellular changes with age in *Paramecium*. In *The biology of aging, American Institute of Biological Sciences, Symposium 6*, ed. B. L. Strehler, 285. Baltimore: Waverly Press.
- Sonneborn T.M., Schneller M.V. (1979). A genetic system for alternative stable characteristics in genomically identical homozygous clones. *Dev. Genet.* 1: 21.
- Sonneborn T.M., Schneller M.V. (1955). Genetic consequences of aging in variety 4 of *Paramecium aurelia*. *Rec. Genet. Soc. Am.* 24: 596.
- Soulas J. (2011). Nombre d'Or. Bases structurelles de l'univers et de la vie. Editions Publibook. p. 254
- Sparling D.W., Matson C., Bickham J., Doelling-Brown P. (2006). Toxicity of glyphosate as Glypro (R) and LI700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 2768-2774.
- Spurlock F., Clayton M., Troiano J. (2006). Modeling Herbicide Movement to Ground Water in Irrigated Sandy Soils of the San Joaquin Valley, California. *Water, Air, and Soil Pollution.* 176: 93-111.
- Stelly N., Mauger J.P., Claret M., Adoutte A. (1991). Cortical Alveoli of *Paramecium*: a Vast Submembranous Calcium Storage Compartment. *J. Cell Biol.* 113: 103-112.
- Stevens A., Lowe J. (1997). Anatomie pathologique générale et spéciale. De Boeck Supérieur. p. 552
- Štirn J. (1982). Manuel des methodes de recherche sur l'environnement aquatique: huitième partie - evaluation des modifications des écosystèmes marins dues à la pollution : (directives destinées au projet commun coordonné FAO(CGMP)/PNUE sur la pollution en Méditerranée). Food & Agriculture Org. p. 76.
- Sullivan J., Chen Y.G., Goh K.D. (2007). Performance Assessment and Validation of a Paramagnetic Particle-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Chlorpyrifos in Agriculture Runoff Waters. *J. Agric. Food Chem.* 55(16): 6407-6416.
- Suty L. (2010). La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. Editions Quae. p. 328.

- Syngenta (2007). Amistar Xtra. Fiche de données de sécurité conformément à la directive 2001/58/CE. Version 1. p 10.
- Takagi Y. (1988). Aging. In *Paramecium*, ed. H.-D. Grtz, chap. 9. Berlin: Springer-Verlag. Pp. 131-140.
- Takahashi T., Yoshii M., Kawano T., Kosaka T., Hosoya H. (2005). A new approach for the assessment of acrylamide toxicity using a green *Paramecium*. *Toxicology in Vitro*. 19: 99-105.
- Tooby T.E. (1985). Fate and Biological Consequences of Glyphosate in the Aquatic Environment in: The Herbicide Glyphosate, Toronto, E. Grossbard et D. Atkinson (eds), Butterworths and Co. (Publishers) Ltd, p. 206-217.
- Trotter D.M., Wong M.P., Kent R.A. (1990). Canadian Water Quality Guidelines for Glyphosate. Environment Canada. Scientific Series No. 170.
- Union des Syndicats Agricoles Romande (1966). Agriculture romande: revue mensuelle d'agriculture, de viticulture et d'arboriculture, Vol. 5-7. Université de Cornell.
- Uotila M., Gullner G., Kömives T. (1995). Induction of glutathione S-transferase activity and glutathione level in plants exposed to glyphosate. *Physiol. Plant*. 93: 689-694.
- Van der Linden A.M.A. (1994). Monitoring ground and surface waters sampling strategy and implementation in legislation. Proceedings of the 5th international workshop on environment behavior of pesticides and regulatory aspects. *European study Services*, pp. 299-305.
- Van Der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 13: 57-149.
- Van Houten J., Preston R.R. (1988). Chemokinesis. In: Görtz H. D. (ed.): *Paramecium*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 282-300.
- Vaughan M. (1997). Oxidative modification of macromolecules minireview series. *J. Biol. Chem*. 272: 1853.
- Vayssié L., Skouri F., Sperling L., Cohen J., (2000). Molecular genetics of regulated secretion in *Paramecium*. *Biochimie*. 82(4): 269-88.
- Venkateswara J.R., Arepalli S.K. , Gunda V.G., Kumar B.J.R. (2008). Assessment of cytoskeletal damage in *Paramecium caudatum*: An early warning system for apoptotic studies. *Pest. Biochem. Physiol*. 91: 75-80.
- 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 J.R., Srikanth K., Arepalli S.K., Gunda V.G. (2006). Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. *Pest. Biochem. Physiol.* 86: 131-137.
- 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.
- Warming T.P., Mulderij G., Christoffersen K.S. (2009). Clonal variation in physiological responses of *Daphnia magna* to the strobilurin fungicide azoxystrobin. *Environ. Toxicol. Chem.* 28(2): 374-380.
- Weckbecker G., Cory J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukaemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett.*, 40: 257-264.
- Weed Science Society of America (1994). *Herbicide Handbook, Seventh Edition. Champaign, IL,* 10-59.
- Wehner R., Gehring W. (1999). Biologie et physiologie animales: Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles, orientations comparée et évolutive. *De Boeck Université,* 844 p.
- WHO (1994). Glyphosate. Environmental Health Criteria No. 159. World Health Organization, Geneva 161 p.
- Wichterman, R. (1939). Cytogamy: A new sexual process in joined pairs of *Paramecium caudatum*. *Nature* 144: 123.
- Winston G.W., Di Giulio R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19: 137-161.
- Wolfe N.L., Mingelgrin U., Miller G.C. (1990). Abiotic transformations in water, sediments, and soil. In: Ed Cheng H.H. Pesticides in the soil environment : *Processes, impacts and modeling* SSSA Book series : 5: 103-168.
- Wood E., Casabe N., Melgar F., Zerba E. (1986). Distribution and properties of glutathione S-transferase from *T. infestans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 84: 607-617.
- Wood J.L. (1970). Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis (FISHMAN, W. H., ed) Vol. 2. pp. 261-299, Academic Press, New York.
- Woodruff L.L., Erdmann R. (1914). A normal periodic reorganization process without cell division in *Paramecium*. *J. Exp. Zool.* 17: 425.

- Worthing C.R., Hance R.J. (2000). *Electronic Pesticide Manual*, eleventh edition, British Crop Protection Council. London.
- Wu G.Y., Frang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. (2004). Glutathion metabolism and its implications for health. *J.Nutr.* 134: 489-492.
- Yu B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162.
- Zamy C. (2004). Contribution à l'étude de l'hydrolyse et de la photolyse de quelques pesticides organophosphorés et de type carbamate en milieu aqueux. p. 156.

Full Length Research Paper

Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole

AZZOUZ Zoubir^{1,2*}, BERREBBAH Houria² and DJEBAR Mohamed Reda²

¹Department of marine Sciences, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, Algeria.

²Laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, 23000, B.P. 12. Algeria.

Accepted 22 August, 2011

For using an organism for ecotoxicological studies, it is important to understand its model of growth under some physicochemical parameters that influence with a direct manner its development. The knowledge of the optimal parameters for the paramecia development leads to realize a model of growth with clear stages. For that, we tried to study the influence of temperature, pH, nutrient density in the culture medium and pollution on the growth of *Paramecium tetraurelia*. Obtained results showed that paramecia prefer definite conditions. However, the growth was better in temperatures included between 25 and 30°C, with preference to increased temperatures and a slightly acidic pH. The culture medium was prepared from the mixture of several vegetables which the rates were studied depending to the growth. The combined effects of azoxystrobin and cyproconazole on the growth kinetics were studied. Results showed that treatment affected the population growth, the generation time and the velocity of generation.

Key words: *Paramecium tetraurelia*, growth kinetics, physicochemical parameters, azoxystrobin, cyproconazole.

INTRODUCTION

The research for study models for different disciplines of the applied biology becomes an imperative scientific requirement. The growth constitutes the basic criteria that can make from an organism a model of survey. Growth of microorganism can be quantified by an increase of the size, the weight or the number. Nevertheless, there are several agents limiting this important criterion. The limiting factor is the one that conditions the speed or the amplitude of a phenomenon that depends on several other parameters (Liebig, 1844). Generally, we use the ecological factors to describe, analyze or model an ecosystem or a physiological function of a given species. Among the ecological conditions influencing the growth, we find abiotic or physicochemical factors; they have direct and rapid effects on the living organism

development (Wehner and Gehring, 1999; Branger et al., 2007). The knowledge of growth parameters of a given species seems to be primordial for the experimental utilization (Schopfer, 1935; Ershov et al., 1999).

P. tetraurelia is a very large (120 µm) eukaryotic cell covered with vibrating cilia. It belongs to the Ciliate phylum (Ciliophora). The use of *Paramecium* species as a model of survey has been reported by several authors in some disciplines; in ecotoxicology, *Paramecium* species were used to study environmental qualities and toxic effects of industrial, agricultural and domestic chemicals (Edmiston et al., 1985; Madoni, 2000; Miyoshi et al., 2003; Takahashi et al., 2005; Venkateswara et al., 2006; Rouabhi et al., 2006; Mortuza et al., 2009, 2010; Amanchi, 2010); in genetic, because its sequencing genome is well known, researchers used *P. tetraurelia* for genetic analysis, gene expression and mutation (Houten et al, 1977; Brygoo, 1977; Mayer et al., 1998; Haynes et al., 2000; Vayssié et al., 2000). In physiology, paramecia

*Corresponding author. E-mail: azzouzd@gmail.com.

Table 1. Different ingredient combinations of the *Paramecium* culture medium.

Quantity (g.L ⁻¹) \ Ingredient	Hay	Lettuce	Wheat plant	Cucumber rind	Potato rind	Yeast	Peanut
	2	2	2	1	1	0.5	0.5
Com. 1	+						
Com. 2		+					
Com. 3	+					+	+
Com. 4		+				+	+
Com. 5	+	+				+	+
Com. 6	+	+	+			+	+
Com. 7	+	+	+	+		+	+
Com. 8	+	+	+	+	+		
Com. 9	+	+	+	+	+	+	+

(Com.: combination).

are used in general for studying the role, the function and the cell organization. (Glaser, 1925; Majima et al., 1986; Preston and Usherwood, 1988; Stelly et al., 1991; Hemmersbach et al., 2001; Momayezi et al., 2004).

In the present study, we try to elucidate two main points; the first concerns the *P. tetraurelia* growth in a new synthetic culture medium, the second point focuses on the assessment of the *Paramecium* population responses towards combined effects of azoxystrobin and cyproconazole.

MATERIALS AND METHODS

Paramecium culture

The habitual culture of *P. tetraurelia* was done in the culture medium (com. 9) described in Table 1, at pH 6.5 and 25°C into the oven (memmert 400). Cells were transplanted each three days for keeping the youthful state of the culture. The bacterization of the medium was done with non specific manner from a culture medium contaminated previously.

Growth measurement

For growth experiments, the culture was done at 30°C in test tubes using 10 ml of the culture medium. For each tube we added 10 cells of paramecia. The growth kinetics study was realized by the daily cell counting, after fixation with formalin at 4%, under optic microscope using grooved blade. The count was repeated at least five times for each repetition. Growth assessment was determined by the following formulae:

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

$$k = \frac{n}{t}$$

$$g = \frac{1}{k}$$

Where n is the number of generation, N_t is the population in time t , N_0 the initial number of cells, k is the generation velocity, and g is the generation time (time required for a population of cells doubles in number).

Impact of the culture medium on the *Paramecium* growth

To show the impact of the culture medium density on the *Paramecium* growth, we prepared a concentrated medium by mixing several dried vegetables (hay 7.5 g, wheat plant 7.5 g, lettuce 10 g, cucumber rind 5 g, potato rind 5 g, dash of yeast and source of sterol (2 g of peanut or almond)). Mixture was boiled throughout one hour in 1.5 liters of distilled water. The broth was filtered, sterilized by boiling at 100°C during 30 min in thermo-resistant bottle and conserved to the shelter of light. The medium must undergo several dilutions to determine the one that lead to better growth. These dilutions were measured as optic densities using a spectrophotometer (Jenway 6300). The tested densities were 0.100, 0.300, 0.500, 0.700 and 0.900 nm.

To test the intensity of *P. tetraurelia* growth according to the medium composition, several ingredient combinations were made in order to adopt the best synthetic formula. The ingredients used for these experiences are presented in Table 1.

Effects of physiochemical parameters on the *Paramecium* growth

To study the temperature effect on the *Paramecium* growth, different incubations were realized at 10, 20, 25, 30 and 35°C. Cultures were made in an oven Memmert type 400.

The previously pH of the culture medium was 6.8. The adjustment of pH, for each experience, was realized with pH-meter (professional pH 213 Hanna) by adding some drops of HCl (1 mol) and NaOH (1 mol). The studied pH values were 5, 6, 7, 8, and 9.

Chemicals

Amistar Xtra is a fungicide containing 200 g.L⁻¹ azoxystrobin and 80 g.L⁻¹ cyproconazole (Figure 1). It is used for protecting plants against fungal diseases. The azoxystrobin belongs to the chemical family of strobilurins and the cyproconazole to the family of triazoles. The association of these two active ingredients gives to

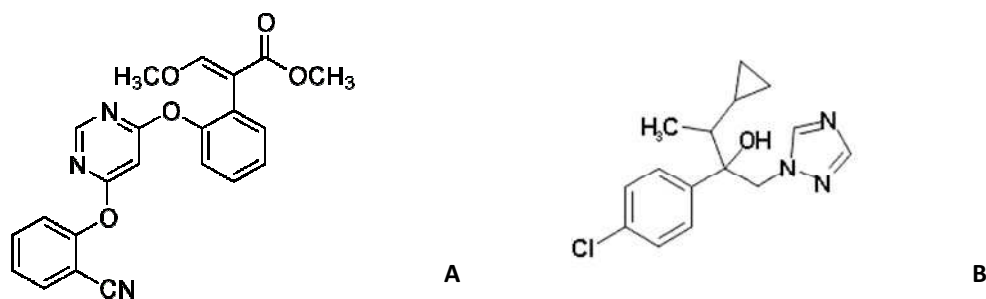


Figure 1. Chemical structure of the two active matters of Amistar Xtra. Azoxystrobin (A) and Cyproconazole (B).

Amistar Xtra a preventive and curative action, a high efficiency and a very long persistence (6 - 8 weeks) against many plant diseases (Syngenta, 2007).

Treatment with Amistar Xtra

Chosen concentrations were the result of several tests on different ranges of Amistar Xtra. The maintain concentrations were 1, 2, 4, 6 and 8 mg.L⁻¹. The treatment with fungicide was done at the beginning (at $t = 0$) before the transplantation of *Paramecium* cells. The growth monitoring lasts up to fifth day.

After exposition to the fungicide, *Paramecium* population responds in a dose-response relationship. The assessment of this response in percentage is calculated by the following formula:

$$\text{Response (\%)} = \frac{(N_C - N_E)}{N_C} * 100$$

Where N_C is the number of cells in the control treatment and N_E is the number of cell in the treatment that received the fungicide.

Statistics

The median inhibitory concentration (IC₅₀) required to reducing 50% the *Paramecium* population growth was calculated by the kinetic growth method using the linear regression analysis. To study effects of treatment on the paramecium growth, we applied a general statistical analysis based on the *Mood's median test*. To look for differences by pairs between samples treated and the control, we applied the *Mann Whitney* test. To evaluate the relationship between the concentrations of amistar Xtra and the effects on the growth we used the regression analysis. The software used for this survey was the Minitab software (15.0).

RESULTS

Growth study

Impact of the medium concentration on the *Paramecium* growth

Curves recorded in Figure 2 show that the concentration of the culture medium has an influence on the paramecia

number. A concentrated medium has a negative effect on the survival of cells, whereas a less concentrated medium produces a weak growth. The concentration that produces the maximal number of paramecia was 0.700 nm; however, in 0.900 nm the growth was null. Comparisons between densities were significantly different (Chi-Square = 16.00; DF = 4; P = 0.003; Overall median = 203).

Paramecium growth according to the culture medium composition

The combinations of culture medium ingredients led to different growth (Table 2). The medium containing all constituents (com. 9) was the more benefic, in which the number of cells at the fourth day exceeded 10⁴ cells per milliliter. Yeast and peanuts showed strong effect on *Paramecium* growth increasing it around 60%.

Influence of physicochemical parameters

The growth of *P. tetraurelia* is influenced distinctly by the temperature, if the temperature increases or decreases, the number of cells changes. According to Figure 3, temperatures that seem to be favorable were those included between 25 and 30°C. Below 25°C and more than 30°C the number of cells decreased and the growth rate changed with a remarkable manner. In low temperatures (< 20°C), although the number of cells was low, paramecia growth remained constant relatively for a long period; however, in high temperature, the number of cells was higher and the constancy phase decreased in according to the temperature variation. Statistical analysis showed significant differences between various temperatures (Chi-Square = 8.00; DF = 4; P = 0.092; overall median = 908).

Paramecia present an affinity to the slightly acidic medium where, the growth reaches a highest level with regard to the other values of pH (Figure 4). Statistical

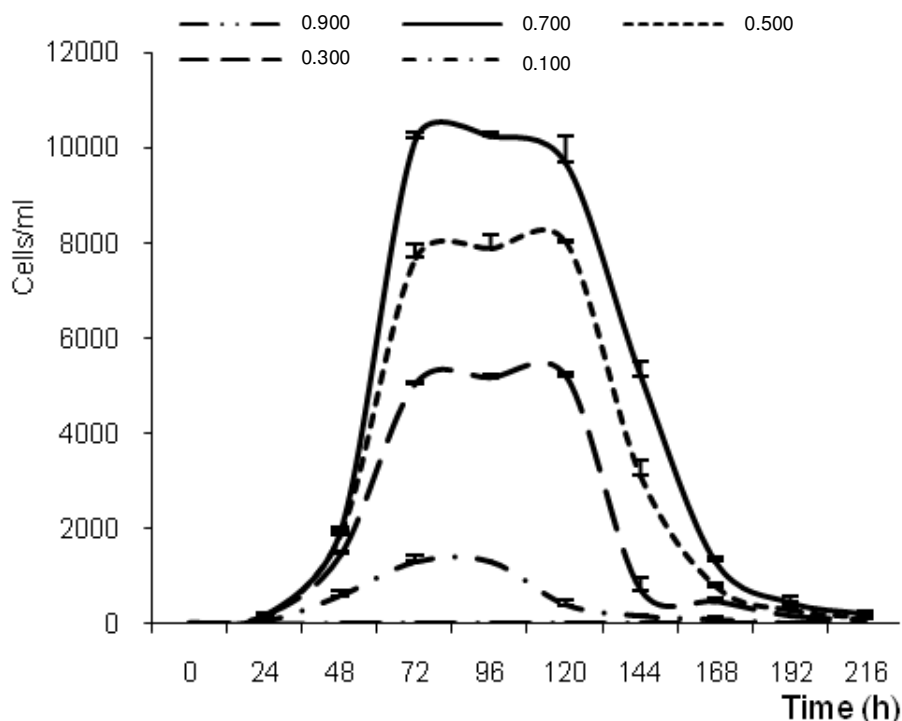


Figure 2. Impact of the culture medium concentration on the *Paramecium* growth (T°: 30°C, pH: 6.5).

Table 2. Growth of *P. tetraurelia* according to the composition of the culture medium.

Culture medium combination	Number of cells/ml/h			
	24	48	72	96
Com. 1	27	120	413	540
Com. 2	40	127	633	673
Com. 3	67	533	1133	1217
Com. 4	73	860	1183	1233
Com. 5	127	867	4067	4200
Com. 6	120	1250	5025	5117
Com. 7	147	1250	7500	8500
Com. 8	120	1250	4333	4300
Com. 9	167	1900	9975	10150

(T°: 30°C, pH: 6.5).

analysis reveals significant differences between different pH values (Chi-Square = 0; DF = 4; P = 1; Overall median = 4025). Pairwise comparisons between the growth at pH 6 and 7 have shown that the test was significant at $P = 0.63$.

From the previous results, it appeared that paramecia grow better in a temperature included between 25 and 30°C, in a slightly acidic pH (6 - 7) and in a very definite concentration of the culture medium. The meeting of all

these conditions leads to put a specific growth model with clear stages and a maximal number of cells (Figure 5).

The growth of paramecia follows a curve with four remarkable phases, a phase of latency in which the growth is hopeless; this phase lasts from 0 to 24 h; a second very fast phase which is characterized by an increase of the number of cells with an exponential manner lasts two days. The third day records the pick of the growth. The third one is a phase of constancy, in

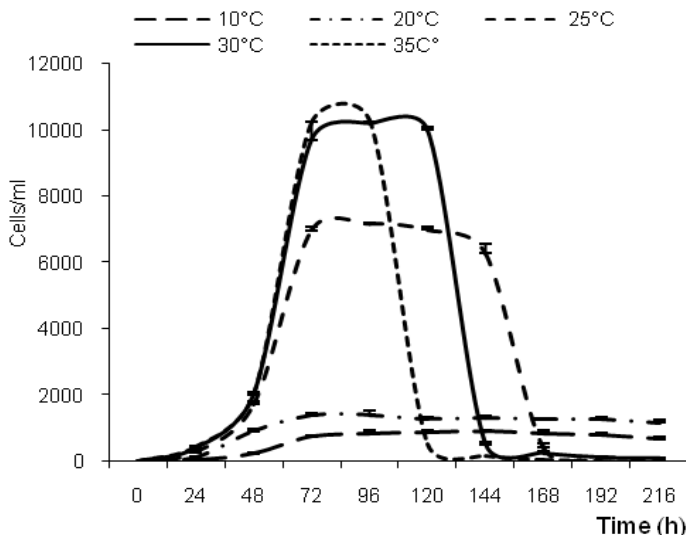


Figure 3. The effects of temperature on the *P. tetraurelia* growth (pH: 6.5; Culture medium: com. 9).

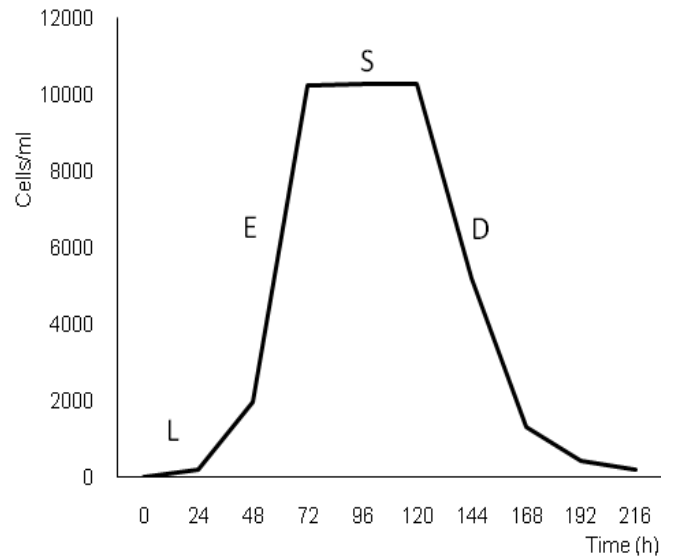


Figure 5. Different stages of the *P. tetraurelia* growth model. (T: 30°C; pH: 6.5; Culture medium: com. 9). L: latency phase, E: exponential phase, S: stationary phase, D: decline phase

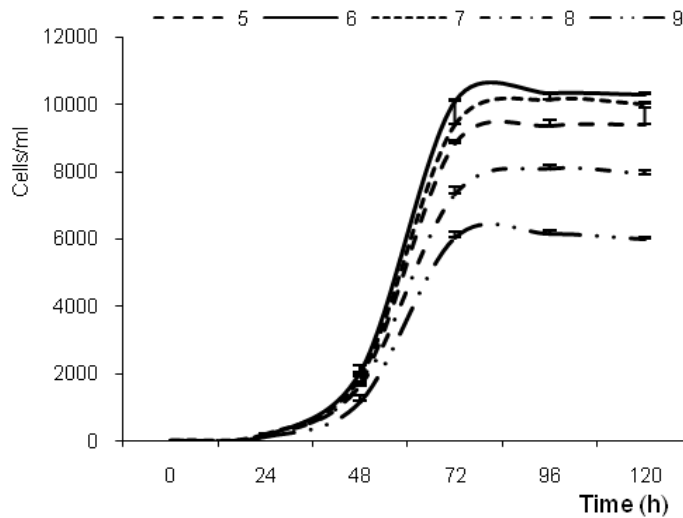


Figure 4. The effects of pH variation on the *P. tetraurelia* growth (T: 30; Culture medium: com. 9).

which the number of cells remains constant. The duration of this phase depends on the richness of the culture medium and the temperature (Figure 5). The second phase is characterized by the intensity of the binary division; however, the stationary phase is characterized by a sexual reproduction. The fourth phase is marked by a progressive reduction of the number of cells until the disappearance of paramecia. The generation time was calculated to be 9.6 h/g. The number of generation at 96 h and the generation velocity were estimated to be 9.9 generation and 0.1g/h respectively.

Treatment with Amistar Xtra

Amistar Xtra has a negative effect on the paramecia growth; in the below of 1 mg.L⁻¹ there is no effect occurs with regard to the control; however, beyond of 8 mg.L⁻¹, the growth of paramecia is null (Figure 6a). Between these two limits, growth changes depending to the concentration. The rates of the growth inhibition were from 13 to 86%. The regression analysis shows that the concentrations explain more than 98% of the growth decrease (Figure 6b). The IC₅₀ was calculated from the linear equation of $y = 42.34x - 44.29$ to be 2.23 mg.L⁻¹ (Figure 6c).

The global statistical analysis by *Mood's median* test shows that there were significant differences relating to variations between the treated cells and the control (Chi-Square = 6.66; DF = 5; P=0.247; Overall median = 1367). Paired analysis by *Mann Whitney* test shows that there were significant differences between the control and each concentration.

Impact of Amistar Xtra on the time, the number and the velocity of generation

The generation time of the control was calculated to be in order of 9.63; it can spread until more than 13 h at paramecia treated with the concentration of 8 mg.L⁻¹ (Figure 7a); consequently, the number of generation and generation velocity know a progressive decrease along with the increasing concentrations (Figures 7b and c).

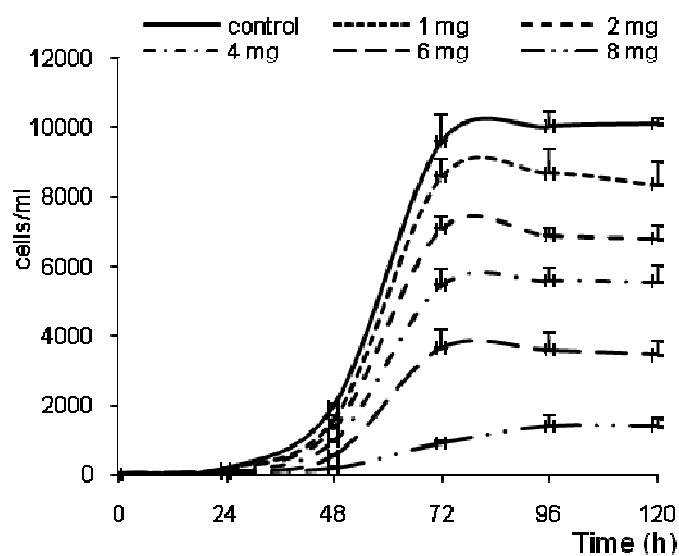


Figure 6a. Effects of Amistar Xtra on the *P. tetraurelia* population (T°: 30; pH: 6.5; culture medium: com. 9). Growth curves.

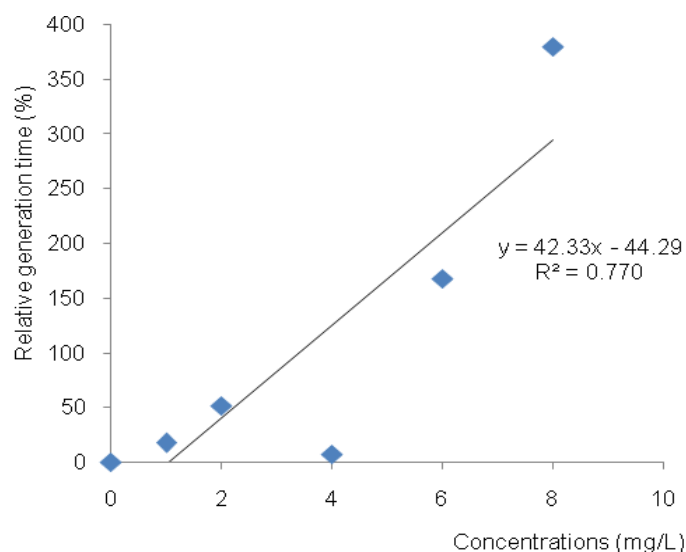


Figure 6c. Effects of Amistar Xtra on the *P. tetraurelia* population (T°: 30; pH: 6.5; culture medium: com. 9). Determination of the IC₅₀ by the kinetic growth method.

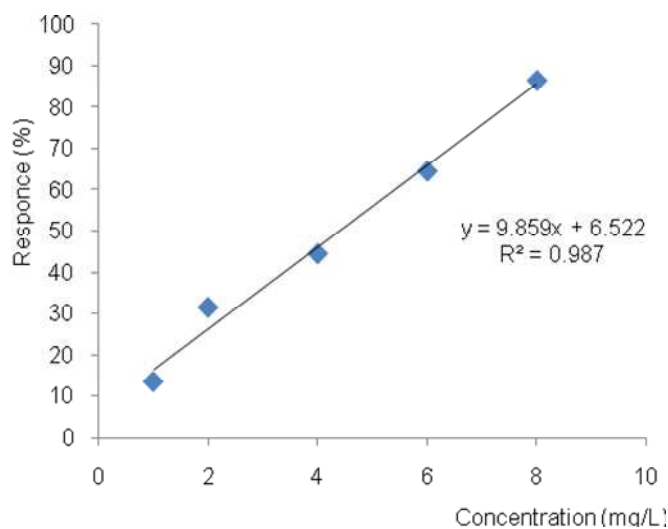


Figure 6b. Effects of Amistar Xtra on the *P. tetraurelia* population (T°: 30; pH: 6.5; culture medium: com. 9). Percentage of responses.

DISCUSSION

The effect of the culture medium on the growth results from the different interactions of its components; some of them stimulate the development process, others have an influence against the growth. The improvement of the culture medium for *Paramecium* species seems to be important for the laboratory studies for two reasons; firstly, that increases the capacity of growth compared to other media; secondly, that minimizes the experiment costs. From this vision, we tried, in the present study, to

develop a new synthetic culture medium from a simple preparation. Results showed that the improved medium increased the paramecia growth from 10^3 cells to more than 10^4 cells per milliliter.

The pace of the growth curve in the model established by our experiments is comparable with that of bacteria described by Prescott (2003). Stages of the growth curve are the same in both types of organisms. Although, bacterial growth is stronger and faster than the paramecia growth regarding to the number, the speed and the time of generation (Dreidt et al., 1994; Prescott, 2003). A lack of bacteria leads directly to the reduction of the number of paramecia. The intensity of the paramecia growth is strongly bound to the intensity of bacteria in the culture medium. As a result, a culture medium which produces more bacteria is very favorable medium for paramecia.

The effect of physicochemical parameters on *Paramecium* has been the subject of research by several authors on several levels. In 1924, Glaser studied the impact of the temperature variation (6-40°C) on the direct movements and the speed of the *Paramecium caudatum* displacement versus time. Experiences showed that the displacement of paramecia becomes faster with the temperature increase. Lee (1942) demonstrated that the digestive vacuoles formation was more important with elevated temperatures (from 25 to 40°C). The impact of the temperature change on the swimming behavior of *P. caudatum* was studied by Nakaoka and Oosawa (1977) who observed that cells change their directions and swim toward the optimal temperature. The temperature influenced also the bacteria growth in the culture

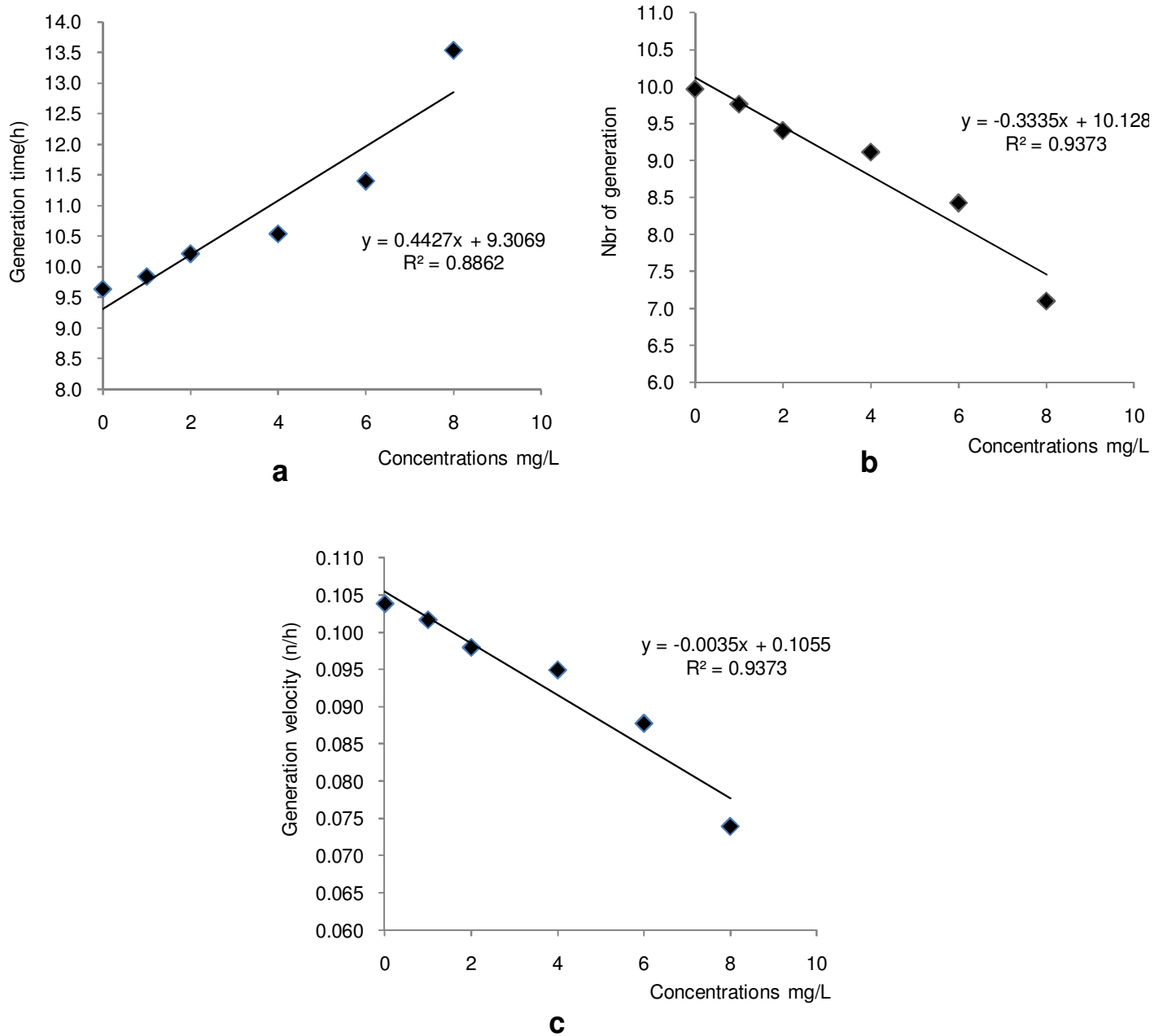


Figure 7. Effects of Amistar Xtra on the generation time (a), the number (b) and the velocity of generation(c) of *P. tetraurelia* (calculated for 96 h of growth).

medium. Karou et al. (2003) studied the influence of temperature on five species of bacteria of *Listeria* genus; they demonstrated that the growth was slow in a low temperature and that only stimulated from the 20°C. The growth reached its maximum in a temperature of 30°C. Doubtless this trend of bacterial growth explains the shape of the paramecium growth curve.

P. tetraurelia not showed high sensitivity to differences of pH values, but at pH around 6 showed better growth. According to Packroff (2000), freshwater protozoan

dominate in acidic pH. After testing a wide range of pH, Heydarnejad (2008) confirmed that the optimal pH for *P. caudatum* is located between 4.6 and 6.7. He observed an immobilization and a rapid mortality in a pH 4 and 10. In an acidic pH, displacements of paramecia are accelerated and the digestive vacuoles formation is intense (Mills, 1931).

Paramecium species are sensitive to industrial pollution (Matsubara et al., 2006; Mortuza et al., 2010). Several studies have shown that different types of biocides have

toxic effects on freshwater ciliates; these effects are perceptible at the population level by reducing the number of cells and to the cellular level by a structural, behavioral and physiological damages (Takiguchi, 2002; Garad et al., 2007; Venkateswara et al., 2006; Rouabhi et al., 2009; Sbartai et al., 2009).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Professor J. Bohatier (from *Blaise Pascal* University, Clermont-Ferrand, France) who gave us *P. tetraurelia* and Dr. J. L. Bonnet for his help.

REFERENCES

- Amanchi NR (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.
- Branger A, Richer MM, Roustel S (2007). *Microbiochimie et alimentation*. Educagri Editions. Dijon, p. 343.
- Brygoo Y (1977). Genetic analysis of mating-type differentiation in *Paramecium tetraurelia*. *Genetics*, 87: 633-653.
- Dreid F, Romick TL, Fleming HP (1994). A rapid method for the determination of bacterial growth kinetics. *J. Rapid. Meth. Autom. Microbiol.*, 3: 59-68.
- Edmiston CEJ, Goheen M, Malaney GW, Mills WL (1985). Evaluation of carbamate toxicity: acute toxicity in a culture of *Paramecium multimicronucleatum* upon exposure to aldicarb, carbaryl, and mexacarb as measured by warburg respirometry and acute plate assay. *Environ. Res.*, 36: 338-350.
- Ershov YA, Pletneva TV, Sinyuk TF, Dolgoplova VA (1999). Evaluation of growth parameters in *Paramecium caudatum* test model for standardization of biological screening. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 127(6): 656-659.
- Garad U, Desai SN, Desai PV (2007). Toxic effects of monocrotophos on *Paramecium caudatum*. *Afr. J. Biotechnol.*, 6(19): 2245-2250.
- Glaser O (1924). Temperature and forward movement of *Paramecium*. *J. Gen. Physiol.*, 7(2): 177-88.
- Glaser O (1925). Temperature and the mechanism of locomotion in *Paramecium*. *J. Gen. Physiol.*, 9(1): 115-121.
- Haynes WJ, Ling KY, Preston RR, Saimi Y, Kung C (2000). The cloning and molecular analysis of *pawn-B* in *Paramecium tetraurelia*. *Genetics*, 155: 1105-1117.
- Hemmersbach R, Bromel B, Block I, Btiucke R, Krause M, Freiberger N, Stieber C, Wilczek M (2001). *Paramecium* a model system for studying cellular graviperception. *Adv. Space Res.*, 27(5): 893-898.
- Heydarnejad MS (2008). Survival of *Paramecium caudatum* at various pH values and under normoxic and hypoxic conditions. *Pak. J. Biol. Sci.*, 11(3): 392-397.
- Houten JV, Chang SY, Kung C (1977). Genetic analysis of paranoiac mutants of *Paramecium tetraurelia*. *Genetics*, 86: 113-120.
- Karou TG, Rocourt J, Dosso M, Diopoh KJ (2003). Influence de la température du milieu de culture sur la croissance de quelques souches de *Listeria sp.* isolées en Côte d'Ivoire. *Agronomie Africaine*, 15(1): 1-12.
- Lee JW (1942). The effect of temperature on food vacuole formation in *Paramecium*. *Physiol. Zool.*, 15(4): 453-458.
- Liebig J (1844). *Chimie appliquée à la physiologie végétale et à l'agriculture*. Gerhardt M. (trad.), 2nd ed. Fortin, Masson & Cie. Université de Gant, p. 544.
- Madoni P (2000). The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environ. Pollut.*, 109: 53-59.
- Majima T, Hamasaki T, Arai T (1986). Increase in cellular cyclic cGMP level by potassium stimulation in *Paramecium tetraurelia*. *Experientia*, 42: 62-64.
- Matsubara E, Harada K, Inoue K, Koizumi A (2006). Effects of perfluorinated amphiphiles on backward swimming in *Paramecium caudatum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 339: 554-561.
- Mayer KM, Mikami K, Forney JD (1998). A mutation in *Paramecium tetraurelia* reveals functional and structural features of developmentally excised DNA elements. *Genetics*, 148: 139-149.
- Mills SM (1931). The effect of the hydrogen-ion concentration on protozoa, as demonstrated by the rate of food vacuole formation in colpidium. *Br. J. Exp. Biol.*, 8: 17-29.
- 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(6): 429-435.
- Momayezi M, Albrecht P, Plattner H, Schmidt HJ (2004). Temperature-induced change of variant surface antigen expression in *Paramecium* involves antigen release into the culture medium with considerable delay between transcription and surface expression. *J. Memb. Biol.*, 200: 15-23.
- Mortuza MG, Takahashi T, Kosaka T, Hosoya H (2010). Effect of industrial sludge toxicity on the cell growth of green *Paramecium*, *Paramecium bursaria*. *Global J. Environ. Res.*, 4(2): 101-105.
- Mortuza MG, Takahashi T, Ueki T, Kosaka T, Michibata H, Hosoya H (2009). Comparison of hexavalent chromium bioaccumulation in five strains of *paramecium*, *Paramecium bursaria*. *J. Cell. Anim. Biol.*, 3(4): 62-66.
- Nakaoka Y, Oosawa F (1977). Temperature-sensitive behavior of *Paramecium caudatum*. *J. Euk. Microbiol.*, 24: 575-580.
- Packroff G (2000). Protozooplankton in acidic mining lakes with special respect to ciliates. *Hydrobiology*, 433(1-3): 157-166.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA, Bacq-Calberg CM, Dusart J (2003). *Microbiologie*. 2^e éd. De Boeck Université, Bruxelles, p.1164.
- Preston RR, Usherwood PNR (1988). L-Glutamate- induced membrane hyperpolarization and behavioral response in *Paramecium tetraurelia*. *J. Comp. Physiol. A.*, 158: 309-319.
- Rouabhi R, Berrebbah H, Djebar MR (2006). Toxicity evaluation of flucyclohexuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium sp.* *Afr. J. Biotechnol.*, 5(1): 045-048.
- Rouabhi R, Saci FZ, Berrebbah H, Djebar MR (2009). Toxic effects of combined molecule from novaluron and diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci.*, 1(2): 74-80.
- Sbartai I, Berrebbah H, Rouabhi R, Sbartai H, Guy S, Djebar MR (2009). Behavior of *Paramecium sp.* treated with bifentazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci.* 1: 13-18.
- Schopfer WH (1935). Recherches sur l'utilisation des facteurs de croissance par un microorganisme. La synthèse biologique des facteurs de croissance. *Arch. Microbiol.*, 6(1-5): 196-207.
- Stelly N, Mauger JP, Claret M, Adoutte A (1991). Cortical alveoli of *Paramecium*: a vast submembranous calcium storage compartment. *J. Cell. Biol.*, 113(1): 103-112.
- Syngenta (2007). Amistar Xtra, Fiche de données de sécurité conformément à la directive 2001/58/CE. Version 1. 10 p.
- 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. Vitro*, 19: 99-105.
- Takiguchi N, Tajima T, Asayama K, Ikeda T, Kuroda A, Kato J, Ohtake H (2002). Behavioral responses of the ciliated protozoan *Paramecium caudatum* to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its analogues. *J. Biosci. Bioeng.*, 93(4): 416-20
- Vayssié L, Skouri F, Sperling L, Cohen J (2000). Molecular genetics of regulated secretion in *Paramecium*. *Biochimie*, 82(4): 269-88.
- Venkateswara JR, Srikanth K, Arepalli SK, Gunda VG (2006). Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. *Pest. Biochem. Physiol.*, 86: 131-137.
- Wehner R, Gehring W (1999). *Biologie et physiologie animales: Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles, orientations comparée et évolutive*. De Boeck Université, Paris, 844 p.