

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR –

ANNABA



جامعة باجي مختار

عنابة



FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE CELLULAIRE

Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat

Domaine : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : TOXICOLOGIE

Intitulé

« Effets combinés de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos
(organophosphoré) sur certains modèles alternatifs :
Paramecium sp et *Daphnia magna* ».

Présentée par : Melle. BOURAIYOU Chiraz

Directeur de thèse : BERREBBAH Houria (Pr, Université Badji Mokhtar -
Annaba)

Devant un jury composé de :

Pr. SBARTAI Hana	Président	Université Badji Mokhtar - Annaba
Pr. GRARA Nedjoud	Examineur	Université de Guelma
Pr. NASRI Hichem	Examineur	Université d'El Taref
Dr. TERFAYA Moncef	Examineur	Université Badji Mokhtar - Annaba

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Je tiens à profiter de ce manuscrit pour remercier tous ceux qui ont permis, directement ou indirectement, la réalisation de ce travail au sein du laboratoire de Toxicologie Cellulaire

*Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse Professeur **BERREBBAH Houria** pour la confiance qu'elle m'a témoignée, son encadrement de qualité, sa disponibilité, ses conseils et pour plein d'autres choses encore. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa gentillesse et sa sympathie.*

*Je remercie énormément notre professeur **DJEBAR Mohamed Réda** pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de me lancer dans cette aventure. Merci pour son aide précieuse, pour tout son dynamisme, ses approches scientifiques très élaborées. Merci pour tout ce que j'ai appris à vos côtés.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Mme **SBARTAI Hana** Professeur à l'Université d'Annaba, pour l'intérêt porté à ce travail et l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury.*

*J'adresse ma gratitude et reconnaissance à Melle **GRARA Nedjoud**, Professeur à L'Université de Guelma, à Mr **NASRI Hichem** professeur à l'Université d'EL Taref et à Mr **TERFAVA Moncef**, Maître de conférences à l'Université d'Annaba qui ont accepté d'évaluer la qualité de mon travail.*

*Je tiens également à remercier Mr **AZZOUZ Zoubir**, Maître de conférences à l'université d'Annaba, pour son aide précieuse, pour sa gentillesse et sa disponibilité.*

*Mes remerciements vont particulièrement à **Meriem Djekoun** de m'avoir initié à la manipulation des paramécies, pour son écoute, ses encouragements et ses prières.*

*Un grand merci à **BOUARRROUDJ Tayeb** pour m'avoir fourni la poudre des nanoparticules d'Oxyde de Cuivre. Merci pour ton aide.*

Je voudrais aussi remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de Toxicologie Cellulaire pour leur aide ou non mais surtout pour tous les bons moments passés en leur compagnie : Khadidja, Lyes, Amina, Housseem, Ouisssem, Imen, Meriem, Khalef, Amira, Lynda, Medina. Sans oublier mes collègues du laboratoire d'Ecophysiologie Animale Labiba et Ines, merci pour votre gentillesse et votre amabilité.

Un merci à ma famille, à tous mes amis et à ceux qui m'ont aidée de près ou de loin et que j'aime.

Dédicaces

A mes chers parents, Qu'ils trouvent ici une récompense pour tous leurs efforts, leurs sacrifices et leur soutien

A mes chères sœurs Sara, Majda et Aya

A ma grand-mère

A mon beau-frère Sofiane et à mon neveu Yacine

A ma grande famille

A mes ami(e)s

Résumé

Le développement agricole et industriel des sociétés humaines a conduit à une explosion des émissions anthropiques de substances chimiques qui se trouvent directement ou indirectement dans les écosystèmes aquatiques, Parmi ces substances, nombreuses sont celles qui présentent des effets toxiques pour les organismes vivants et sont qualifiées de polluants. Le présent travail porte essentiellement sur l'effet des Nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur deux modèles d'eau douce : *Paramecium sp* et *Daphnia magna*.

Les résultats obtenus montrent d'une part une inhibition de la croissance cellulaire de *Paramecium sp* qui se traduit par une diminution du nombre et de la vitesse de génération ainsi qu'une augmentation du temps de génération. D'autre part, une inhibition de la mobilité chez *Daphnia magna*. Parallèlement, l'étude polarographique a mis en évidence une perturbation du métabolisme respiratoire chez les deux modèles biologiques étudiés.

Le suivi des biomarqueurs du stress oxydant a révélé une induction des enzymes anti-radicalaires CAT, GST, ainsi qu'une diminution du taux de GSH provoquant une augmentation du taux de MDA ce qui traduit une peroxydation lipidique.

L'étude microscopique nous a permis de déceler des atteintes morphologiques et structurales chez *Paramecium sp* se présentant sous forme de bourgeonnements au niveau de la membrane, noircissement et condensation du cytoplasme, rupture au niveau membranaire et libération du contenu cellulaire et enfin la lyse des cellules ainsi que des anomalies de développement chez la descendance de *Daphnia magna*. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une perturbation du mouvement des paramécies et des daphnies se traduisant par une altération des trajectoires de déplacement.

Mots clés : Nanoparticules, CuO, Chlorpyrifos, *Paramecium sp*, *Daphnia magna*, stress oxydant, bioindicateurs, Mixture.

Abstract

The agricultural and industrial development of human societies has led to an explosion of anthropogenic emissions of chemical substances that are found directly or indirectly in aquatic ecosystems. The present work focuses on the effect of CuO nanoparticles, Chlorpyrifos and their mixtures on two freshwater models: *Paramecium sp* and *Daphnia magna*.

The results obtained show, on the one hand, an inhibition of the cell growth of *Paramecium sp*, which translates into a decrease in the number and speed of generation as well as an increase in the generation time. On the other hand, an inhibition of mobility in *Daphnia magna*. At the same time, the polarographic study revealed a disturbance of the respiratory metabolism in the two biological models studied.

The monitoring of oxidative stress biomarkers revealed an induction of the anti-radical enzymes CAT, GST, as well as a decrease in the GSH rate causing an increase in the MDA rate, which translates into lipid peroxidation.

The microscopic study allowed us to detect morphological and structural damage in *Paramecium sp* in the form of membrane budding, blackening and condensation of the cytoplasm, rupture of the membrane and release of the cell contents, and finally cell lysis, as well as developmental abnormalities in the offspring of *Daphnia magna*. In addition, we have highlighted a disruption of the movement of paramecia and daphnia resulting in an alteration of the trajectories of movement of the cells.

Key words: Nanoparticles, CuO, Chlorpyrifos, *Paramecium sp*, *Daphnia magna*, oxidative stress, bioindicators, Mixture.

ملخص

أدى التطور الزراعي والصناعي للمجتمعات البشرية إلى انفجار انبعاثات المواد الكيميائية البشرية المنشأ التي توجد بشكل مباشر أو غير مباشر في النظم الإيكولوجية المائية، ومن بين هذه المواد، العديد منها التي لها آثار سامة على الكائنات الحية والتي تعتبر ملوثات. يركز هذا العمل على تأثير جزيئات CuO النانوية، و Chlorpyrifos ومخاليطهم على نموذجين للمياه العذبة *Paramecium sp* و

Daphnia magna

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من ناحية تثبيط نمو خلايا *Paramecium sp* مما يؤدي إلى انخفاض في عدد وسرعة التوليد بالإضافة إلى زيادة وقت التوليد. من ناحية أخرى، تثبيط الحركة في *Daphnia magna* في الوقت نفسه، كشفت الدراسة الاستقطابية عن اضطراب التمثيل الغذائي في الجهاز التنفسي في النموذجين البيولوجيين المدروسين.

كشفت مراقبة المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي عن تحريض إنزيمات الجذور الحرة CAT ، GST ، وكذلك انخفاض في مستوى GSH مما تسبب في زيادة مستوى MDA ، مما يعكس بيروكسيد الدهون.

سمحت لنا الدراسة المجهرية باكتشاف الأضرار المورفولوجية والهيكلية في *Paramecium sp* الذي يظهر في شكل تبرعم على مستوى الغشاء، اسوداد وتكثف للسيتوبلازم، تمزق على مستوى الغشاء وتحرير محتوى الخلية وأخيراً تحلل الخلية. تشوهات النمو في نسل *Daphnia magna* بالإضافة إلى ذلك، لقد أظهرنا اضطراباً في حركة البراميسيوم والدفنيا مما أدى إلى تغيير مسارات الحركة.

الكلمات المفتاحية: الجسيمات النانوية، CuO، الكلوربيريفوس، البراميسيوم *sp*، برغوث الماء، الإجهاد التأكسدي، المؤشرات الحيوية، الخليط.

Sommaire

Liste des acronymes

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des planches

Chapitre I : Introduction générale

1. Généralités	1
2. Rappel sur les nanoparticules	2
2.1. Les nanotechnologies : Contexte économique et juridique	2
2.2. Définition	3
2.3. Origine des nanoparticules	4
2.4. Domaines d'application des nanoparticules	4
2.5. Rappel sur les nanoparticules d'Oxyde de Cuivre (CuO)	6
2.6. Voies d'exposition aux nanoparticules	6
2.7. Toxicité des nanoparticules	8
3. Rappel sur les pesticides	9
3.1. Définition	9
3.2. Classification des pesticides	10
3.2.1. Selon la nature de l'espèce à combattre	10
3.2.2. Selon la nature chimique	11
3.3. Les insecticides organophosphorés	11
3.4. Le Chlorpyrifos	12
2.5.1. Toxicité du Chlorpyrifos	12
4. Le stress oxydant	13
4.1. Définition du stress oxydant à l'échelle d'un organisme	13
4.2. Les espèces réactives de l'Oxygène	13
4.3. Cibles biologiques des espèces réactives de l'Oxygène	14
5. Le système de défense antioxydant	16
6. Rappel sur les bioindicateurs et les biomarqueurs	18
6.1. Concept de bioindication	18

6.2. Les biomarqueurs	19
7. Rappel sur <i>Daphnia magna</i>	20
7.1. Anatomie et physiologie	20
7.2. Développement	21
7.3. Cycle de vie	22
7.3.1. Reproduction asexuée	22
7.3.2. Reproduction sexuée	23
7.4. Intérêt de l'utilisation de la daphnie comme modèle d'étude	23
8. Rappel sur <i>Paramecium sp</i>	24
8.1. Généralités	24
8.2. Cycles de vie	25
8.2.1. Cycle végétatif	25
8.2.2. Processus sexuel	26
8.3. L'intérêt de l'utilisation des paramécies dans les études écotoxicologiques	28
9. Objectif de l'étude	28
Chapitre II : Etude physiologique et polarographique	
1. Introduction	30
2. Matériel et méthodes	30
2.1. Matériel biologique	30
2.2. Matériel chimique	30
2.2.1. Les nanoparticules d'oxyde de Cuivre (CuO)	30
2.2.2. Le Chlorpyrifos	31
2.3. Méthodes	32
2.3.1. Culture de <i>Paramecium sp</i>	32
2.3.1.1. Traitement des paramécies	32
2.3.1.2. Cinétique de croissance cellulaire	32
2.3.1.3. Pourcentage de réponse	32
2.3.1.4. Détermination du temps, nombre et vitesse de génération	33
2.3.2. Conditions d'élevage des daphnies	33
2.3.2.1. Test de toxicité aigüe	34

2.3.2.2. Calcul du taux d'immobilisation (24h/48h)	35
2.3.2.3. Détermination de la concentration effective (CE ₅₀)	35
2.4. Mesure de l'activité respiratoire	35
2.4.1. Principe du dosage	35
2.5. Analyses statistiques	35
3. Résultats	36
3.1. Cas de <i>Paramecium sp</i>	36
3.1.1. Effet des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons sur la cinétique de croissance de <i>Paramecium sp</i> .	36
3.1.2. Pourcentage de réponse	38
3.1.3. Détermination du nombre, temps et vitesse de génération de <i>Paramecium sp</i>	40
3.2. Cas de <i>Daphnia magna</i>	41
3.2.1. Taux d'immobilisation de <i>Daphnia magna</i> après exposition aux nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures (24/48 heures)	41
3.2.2. Détermination de la concentration effective CE ₅₀ (24/48 heures)	43
3.3. Effets des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur le métabolisme respiratoire	43
3.3.1. Chez <i>Paramecium sp</i>	43
3.3.2. Chez <i>Daphnia magna</i>	46
4. Discussion	48
5. Conclusion	51

Chapitre III : Etude du Stress oxydant

1. Introduction	52
2. Matériel et méthodes	52
2.1. Mesure de l'activité Superoxyde Dismutase (SOD)	52
2.2. Mesure de l'activité Catalase (CAT)	53
2.3. Mesure de l'activité Glutathion-S-Transférase (GST)	53
2.4. Dosage du taux de Glutathion (GSH)	54
2.5. Dosage du taux du Malondialdéhyde (MDA)	54
2.6. Analyses statistiques	55
3. Résultats	56

3.1. Effets des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons sur la variation de l'activité superoxyde Dismutase (SOD)	56
3.1.1. Chez <i>Paramecium sp</i>	56
3.1.2. Chez <i>Daphnia magna</i>	58
3.2. Effet des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons sur la variation de l'activité Catalase	61
3.2.1. Chez <i>Paramecium sp</i>	61
3.2.2. Chez <i>Daphnia magna</i>	63
3.3. Effets des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons sur la variation de l'activité Glutathion-S-Transférase (GST)	65
3.3.1. Chez <i>Paramecium sp</i>	65
3.3.2. Chez <i>Daphnia magna</i>	67
3.4. Effet des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leur combinaison sur le taux de GSH	70
3.4.1. Chez <i>Paramecium sp</i>	70
3.4.2. Chez <i>Daphnia magna</i>	71
3.5. Effets des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leur combinaison sur l'évolution du taux de MDA	73
3.5.1. Chez <i>Paramecium sp</i>	73
3.5.2. Chez <i>Daphnia magna</i>	74
4. Discussion	75
5. Conclusion	79

Chapitre IV : Comportement, embryotoxicité et atteintes structurelles et membranaires

1. Introduction	81
2. Matériel et méthodes	81
2.1. Cas de <i>Paramecium sp</i>	81
2.1.1. Caractérisation des malformations	81
2.1.2. Suivi des trajectoires de déplacement	82
2.2. Cas de <i>Daphnia magna</i>	82
2.2.1. Test d'embryotoxicité	82
2.2.2. Suivi des trajectoires de déplacement	82

3. Résultats	83
3.1. Cas de <i>Paramecium sp</i>	83
3.1.1. Anomalies structurelles et atteintes membranaires	83
3.1.2. Effet des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur les trajectoires de déplacement	87
3.2. Cas de <i>Daphnia magna</i>	90
3.2.1. Effet des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur le développement embryonnaire	90
3.2.2. Effet des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur les trajectoires de déplacement	92
4. Discussion	94
5. Conclusion	99
Chapitre V : Conclusion générale et perspectives	100
Références bibliographiques	103
Annexes	

Liste des Acronymes

ADP : Adénosine Di Phosphate

CAT : Catalase

CPF : Chlorpyrifos

CuO : Oxyde de cuivre

DTNB : Acide 5,5°-dithio-bis-2-nitrobenzoïque

EDTA : Acide Ethylène diamine tétraAcétique

ETM : Eléments traces métalliques

FAO : Food and Agricultural Organization

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion disulfide

GST : Glutathion-S-transférase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

MDA : Malondialdéhyde

MTs : Métallothionéine

NPs : Nanoparticules

OH[•] : Radical Hydroxyle

PR : Pourcentage de Réponse

ROS : Espèce réactive oxygène

SOD : Superoxyde dismutase

TBA : Acide thiobarbiturique

TiO₂ : Dioxyde de titane

ZnO : Oxyde de Zinc

WHO : World Health Organization

Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
01	Les différents domaines d'application des nanoparticules	04
02	Caractéristiques physicochimiques de l'Oxyde de Cuivre	31
03	Caractéristiques physicochimiques et structure moléculaire du Chlorpyrifos	31
04	Composition chimique de l'eau de dilution ISO/DIS 6341.2	34
05	Effets des Nanoparticules de CuO sur le nombre de génération (n), le temps de génération (g) et la vitesse de génération (k) de <i>Paramecium sp</i>	40
06	Effets du Chlorpyrifos sur le nombre de génération (n), le temps de génération (g) et la vitesse de génération (k) de <i>Paramecium sp</i>	40
07	Effets de la combinaison Chlorpyrifos/ CuO-NPs sur le nombre de génération (n), le temps de génération (g) et la vitesse de génération (k) de <i>Paramecium sp</i>	41
08	Concentrations Effectives moyennes (CE ₅₀) mesurées chez <i>Daphnia magna</i> après 24 et 48 heures de traitement	43
09	Effets des nanoparticules de CuO sur l'évolution du taux de GSH chez <i>Paramecium sp</i>	70
10	Effets du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de GSH chez <i>Paramecium sp</i>	70
11	Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et de Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de GSH chez <i>Paramecium sp</i>	71
12	Effets des Nanoparticules de CuO sur l'évolution du taux de GSH chez <i>Daphnia magna</i>	71
13	Effets du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de GSH chez <i>Daphnia magna</i>	72
14	Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et de Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de GSH chez <i>Daphnia magna</i>	72
15	Effets des Nanoparticules de CuO sur l'évolution du taux de MDA chez <i>Paramecium sp</i>	73

16	Effets du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de MDA chez <i>Paramecium sp</i>	73
17	Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de MDA chez <i>Paramecium sp</i> .	74
18	Effets des Nanoparticules de CuO sur l'évolution du taux de MDA chez <i>Daphnia magna</i>	74
19	Effets du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de MDA chez <i>Daphnia magna</i>	75
20	Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et de Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de MDA chez <i>Daphnia magna</i>	75

Liste des figures

N°	Titres	Pages
01	Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures	03
02	Sources des espèces réactives de l'Oxygène	14
03	Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène	15
04	Localisation intracellulaire des anti-oxydants enzymatiques et non enzymatiques	27
05	Anatomie de <i>Daphnia magna</i> femelle adulte	21
06	Reproduction parthénogénétique de <i>Daphnia magna</i>	23
07	Présentation de la paramécie	25
08	Cycle végétatif de la paramécie	26
09	L'autogamie ou l'autofécondation	27
10	La conjugaison	28
11	Elevage de <i>Daphnia magna</i> au laboratoire	33
12	Effets des Nanoparticules de CuO sur la croissance de <i>Paramecium sp</i>	36
13	Effets des concentrations croissantes du Chlorpyrifos sur la croissance de <i>Paramecium sp</i>	37
14	Effets de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos sur la croissance de <i>Paramecium sp</i>	37
15	Evolution du pourcentage de réponse chez <i>Paramecium sp</i> exposées aux concentrations croissantes des nanoparticules de CuO	38
16	Evolution du pourcentage de réponse chez <i>Paramecium sp</i> exposées aux concentrations croissantes du Chlorpyrifos	39
17	Evolution du pourcentage de réponse chez <i>Paramecium sp</i> exposées aux concentrations croissantes de la combinaison CuO-NPs/ Chlorpyrifos	39
18	Taux d'immobilisation enregistré chez <i>Daphnia magna</i> exposée pendant 24 et 48 heures aux concentrations croissantes de nanoparticules de CuO	42
19	Taux d'immobilisation enregistré chez <i>Daphnia magna</i> exposée pendant 24 et 48 heures aux concentrations croissantes du Chlorpyrifos	42
20	Taux d'immobilisation enregistré chez <i>Daphnia magna</i> exposée pendant 24 et 48 heures aux concentrations croissantes des mixtures CuO-NPs/Chlorpyrifos	43
21	Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes de nanoparticules de CuO chez <i>Paramecium sp</i>	44
22	Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes de Chlorpyrifos chez <i>Paramecium sp</i>	45
23	Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes des mixtures chez <i>Paramecium sp</i>	45
24	Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes de nanoparticules de CuO chez <i>Daphnia magna</i>	46
25	Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes de Chlorpyrifos chez <i>Daphnia magna</i>	47
26	Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes des mixtures chez <i>Daphnia magna</i>	47

27	La réaction entre le TBA et le MDA	55
28	Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Superoxyde Dismutase chez <i>Paramecium sp</i>	56
29	Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Superoxyde dismutase chez <i>Paramecium sp</i>	57
30	Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Superoxyde Dismutase chez <i>Paramecium sp</i>	58
31	Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Superoxyde dismutase chez <i>Daphnia magna</i>	59
32	Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Superoxyde dismutase chez <i>Daphnia magna</i>	60
33	Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Superoxyde Dismutase chez <i>Daphnia magna</i>	60
34	Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Catalase chez <i>Paramecium sp</i>	61
35	Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Catalase chez <i>Paramecium sp</i>	62
36	Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Catalase chez <i>Paramecium sp</i>	63
37	Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Catalase chez <i>Daphnia magna</i>	63
38	Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Catalase chez <i>Daphnia magna</i>	64
39	Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité CAT chez <i>Daphnia magna</i>	65
40	Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez <i>Paramecium sp</i>	66
41	Effets des concentrations croissantes du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez <i>Paramecium sp</i>	66
42	Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez <i>Paramecium sp</i>	67
43	Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez <i>Daphnia magna</i>	68
44	Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez <i>Daphnia magna</i> .	68
45	Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez <i>Daphnia magna</i>	69
46	Observation microscopique d'une cellule de <i>Paramecium sp</i> témoin avec une morphologie normale	83
47	Observation microscopique d'une néonate de <i>Daphnia magna</i> témoin	91

Liste des planches

N°	Titres	Pages
01	Anomalies morphologiques induites par les nanoparticules de CuO, le Chlorpyrifos et leurs mixtures chez <i>Paramecium sp</i>	84
02	Formation de vésicules et des bourgeonnements au niveau de la membrane cellulaire	85
03	Noircissement et condensation du cytoplasme	86
04	Rupture au niveau membranaire et libération du contenu cellulaire	87
05	Apoptose et lyse cellulaire	87
06	Trajectoires de <i>Paramecium sp</i> témoin	88
07	Trajectoires des paramécies traitées par les fortes concentrations des nanoparticules de CuO (120 mg/l), du Chlorpyrifos (1.25 et 1.5 mg/l) et de leurs combinaisons (M3 et M4)	89
08	Mouvements désordonnés et aléatoires induits chez <i>Paramecium sp</i> suite au traitement par les nanoparticules de CuO (120 mg/l), du Chlorpyrifos (1.25 et 1.5 mg/l) et de leurs combinaisons (M3 et M4)	90
09	Courbure de l'épine caudale	91
10	Absence de l'épine caudale	91
11	Raccourcissement des antennes secondaires et l'inexistence des soies	92
12	Des déformations au niveau de la carapace et de l'épine caudale	92
13	Trajectoires de mouvements enregistrées par les témoins de <i>Daphnia magna</i>	93
14	Trajectoires en zig-zag induites chez <i>Daphnia magna</i> par l'exposition aux plus fortes concentrations du Chlorpyrifos (2 et 4 µg/l) et la combinaison CuO/NPs-Chlorpyrifos (M3 et M4)	93
15	Mouvements aléatoires observés chez <i>Daphnia magna</i> exposées aux plus fortes concentrations des nanoparticules de CuO (45 et 60 mg/l), du Chlorpyrifos (2 et 4 µg/l) et de leurs mixtures (M3 et M4)	94

Chapitre I : Introduction générale

1. Généralités

Ces deux derniers siècles ont connu un développement technologique sans pareil. Les innovations tant agricoles (révolution verte), qu'industrielles (révolution industrielle), ou numériques ont permis un accroissement de la population mondiale très important. Mais face aux besoins d'une population toujours grandissante, il a fallu produire plus, et plus vite. Aujourd'hui répondre aux besoins alimentaires et matériels de la population mondiale reste ainsi un enjeu majeur (Móznér et *al.*, 2012). La conséquence de ces activités anthropiques utilisent et/ou génèrent des molécules polluantes : hydrocarbures, pesticides, éléments traces métalliques (ETM), nanoparticules et bien d'autres encore ; qui se retrouvent directement ou indirectement (via des phénomènes de ruissellement, de lessivage, d'infiltration, de volatilisation ou de déposition) dans les différents écosystèmes. La multiplicité des voies d'entrée, à la fois directes et indirectes de ces molécules, font des écosystèmes aquatiques un point de convergence de l'ensemble des différentes pollutions anthropiques. (Nuttens, 2016). Ces systèmes aquatiques sont le réceptacle final de nombreux polluants. Cependant, aujourd'hui encore, l'évaluation de la qualité de l'eau, des risques environnementaux et la mise en place de normes reposent le plus souvent sur des études portant sur la toxicité de substances isolées. Or ces travaux sont peu représentatifs du comportement des polluants dans les écosystèmes, notamment en raison des interactions possibles entre les contaminants. (Celander, 2011). Il existe aujourd'hui un nombre incalculable de « cocktails » chimiques potentiels dans l'environnement et les données qui seraient nécessaires à l'évaluation de leur toxicité sont souvent soit manquantes soit de qualité insuffisante. (Gandar, 2015).

Cette méthodologie ne permet pas de déterminer les interactions entre plusieurs substances et les effets lorsque l'écosystème est exposé à plusieurs substances simultanément. Les organismes vivants et les êtres humains sont en permanence exposés à de multiples substances différentes : médicaments, pesticides, nanoparticules Est-il possible qu'en étant exposés à plusieurs substances à la fois, certains effets imprévus à la base soient observables ? En effet, certaines substances pourraient être sans danger sur l'Homme prises individuellement, mais devenir toxiques lorsqu'elles sont mélangées à d'autres molécules.

Un bioindicateur est un « organisme ou ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet de façon pratiques et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées » (Banaru et Perez, 2010 ; Benoit-Chabot, 2014). Les bioindicateurs sont utilisés pour déceler les

changements qui surviennent dans l'environnement et la présence de pollution, mesurer les effets de ces perturbations sur l'écosystème et surveiller les améliorations de la qualité de l'environnement résultant de la prise de dispositions remédiatrices. (Harrag, 2012 ; Banaru et Perez, 2010).

La circulation des polluants dans les écosystèmes aquatiques présente de grandes variabilités spatiales et temporelles, et seule la fraction bio accumulée par les organismes cibles permet d'évaluer cette contamination. En effet, pour détecter ces polluants, il existe beaucoup d'espèces utilisées pour des tests d'écotoxicité tels que, les organismes unicellulaires (premier maillon de base des chaînes alimentaires), ou des organismes pluricellulaires. (Zaimeche, 2015).

L'évaluation des effets des produits toxiques sur les organismes aquatiques inclue des essais à court et à long terme. Plusieurs espèces sont utilisées en prenant en compte les différents niveaux trophiques (producteurs, consommateurs primaires et secondaires et décomposeurs). L'utilisation d'espèces du genre *Paramecium* et *Daphnia* comme modèles d'études sont rapportées par plusieurs auteurs (Azouz, 2012 ; Amamara, 2015 ; Moumni, 2016) en raison de leur intérêt écologique, leur large distribution géographique, leur maintien au laboratoire ainsi que leur sensibilité à une large gamme de polluants. (Berthet et *al.*, 2008 ; Tlili, 2012).

2. Rappel sur les nanoparticules

2.1. Les nanotechnologies : contexte économique et juridique

A l'échelle nanométrique, les matériaux peuvent acquérir des propriétés (physiques, chimiques, mécaniques...) différentes de celles observées pour les mêmes matériaux à des échelles supérieures, et pouvant présenter un intérêt particulier notamment d'un point de vue industriel. L'avènement des nanotechnologies est lié à l'exploitation de ces propriétés nouvelles afin de répondre à certains enjeux majeurs du XXI^{ème} siècle, tels que le stockage de l'énergie, la lutte contre la pollution de l'eau et du sol, la prévention des maladies infectieuses, ou encore la diminution de consommation de matière première (développement durable).

Considéré comme une véritable révolution industrielle, le développement des nanotechnologies a aujourd'hui un impact considérable sur l'économie mondiale actuelle, notamment du fait du nombre et de la diversité des secteurs industriels concernés. Les principaux secteurs concernés sont la santé, les technologies de l'information et de la

communication (en particulier l'électronique), et le développement et la production de nouveaux nanomatériaux, représentant à eux seuls plus de 30 % du marché. (Triboulet, 2013).

2.2. Définition

Les nanoparticules sont des particules ultrafines (PUF) dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nanomètres (milliardième de mètre) (Figure 1).

Cette taille leur permet d'interagir facilement avec les composants biologiques. La définition par l'échelle ne suffit cependant pas à décrire tous les aspects des nanoparticules.

En effet, leurs propriétés physico-chimiques et toxicologiques particulières sont liées en plus à leur surface spécifique qui est la surface totale de la particule normalisée par la masse. Ainsi, une nanoparticule de 10 nm de diamètre aura une surface spécifique 10 fois plus importante qu'une nanoparticule de 100 nm de diamètre. Cela représente une surface disponible 10 fois plus grande à masse égale pour interagir avec les membranes, les molécules biologiques ou les organites cellulaires et enfin leur réactivité de surface qui est également fortement liée à leur composition qui peut être très variée. On distingue par exemple les nanoparticules organiques (constituées majoritairement de polymères), métalliques (ex : nanoparticules d'or ou d'argent) d'oxydes métalliques (ex : CuO, Fe₂O₃, TiO₂, ZnO, ...) Ou encore des composites (ex : quantum dots Cd Se-ZnS). (Baratli, 2015).

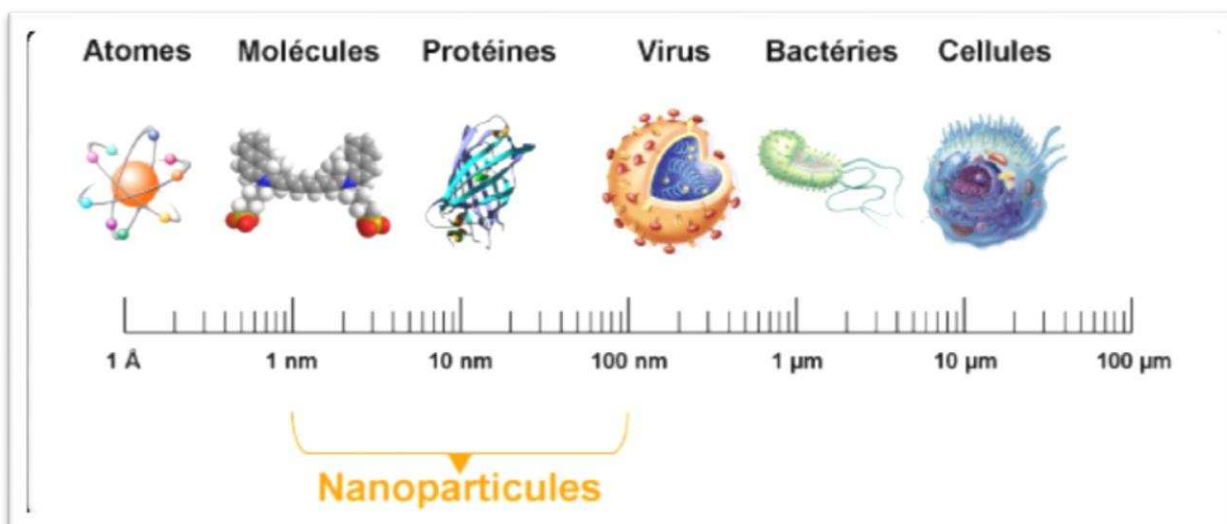


Figure 1. Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures.
(Goutayer, 2008)

2.3. Origine des Nanoparticules

Certaines nanoparticules sont émises depuis longtemps même si nous ne le réalisons pas et se trouvent en abondance dans l'environnement, car elles sont produites par de nombreux processus naturels comme certaines réactions photochimiques, les éruptions volcaniques, les incendies de forêts et l'érosion, mais aussi les aérosols marins. Il existe d'autres sources telles que les plantes et les animaux, les résidus de la peau sèche et des cheveux (Lungu 2015 ; Mejia et *al.*, 2015). On retrouve ces particules ultras fines principalement dans les fumées industrielles, la combustion de chauffage et les gaz d'échappement, soudage ou combustion des moteurs. Enfin elles peuvent provenir de nanomatériaux manufacturés qui sont fabriqués dans le cadre d'un processus industriel et qui font l'objet de nombreuses recherches technologiques. Une nanoparticule peut être organique ou inorganique. (Kendouli, 2012).

2.4. Domaines d'application des nanoparticules

L'intégration des nanomatériaux dans les produits commerciaux est en constante croissance. Selon l'inventaire du « Woodrow Wilson International Center for Scholars », on retrouve à chaque an environ 250 nouveaux produits comprenant des nanomatériaux dans leur composition. L'utilisation des nanomatériaux est particulièrement importante dans le domaine des produits de santé et de bien-être, ce qui inclut les produits d'hygiène personnelle, les vêtements et les cosmétiques. (Perrault, 2012).

Tableau 1 : les différents domaines d'application des nanoparticules (Greena et *al.*, 2011).

Domaine	Exemple d'application
Automobile et aéronautiques	Matériaux plus légers et plus résistants, peintures anti-rayures, anticorrosion.
Chimie et matériaux	Pigments, poudres céramiques, inhibiteurs de corrosion, vitres antisalissures, textiles, revêtements antibactériens,
Pharmacie, biomédical	Médicaments et agents actifs - Des pansements dits « argentiques » contiennent des nanoparticules d'argent colloïdales, adsorbées sur leur surface - les crèmes, leurs applications et retraits quotidiens sont moins douloureux pour le patient.

Chapitre I : Introduction générale

	- Des cathéters urinaires, vasculaires et péritonéaux été fabriqués à partir de polymères imprègnés d'argent sous forme métallique ou oxydée...etc. - Des masques chirurgicaux.
Cosmétiques	Crèmes solaires, pâtes dentifrice (abrasif) maquillage (meilleur tenue)
Environnement et énergie	Filtration eau de mer, analyseurs chimiques, pesticides et fertilisants plus efficace - Cellules photovoltaïques, batteries, fenêtres
Défense	Détecteurs d'agents chimiques, systèmes de surveillance miniaturisés, système de guidage, textiles auto-réparateurs
Agro-alimentaire et le traitement de l'eau	Matériaux de contact ou d'enrobage, additifs, auxiliaires de production, biodétecteurs - Des équipements en argent sont utilisés pour la manipulation d'huiles essentielles, de sirops et de jus de fruits - Des boîtes plastiques pour le stockage de denrées alimentaires - des systèmes de filtration de l'air
Autres applications : hygiène et désinfection	Vêtements et textiles : Fibres et fils, Chaussettes, tenue de sport, baskets, Serviettes de toilette, sac de couchage, matelas - Hygiène des personnes : Produits cosmétiques Spray pour chaussures, Sièges des toilettes publiques - Technologies : Ordinateurs, Combines téléphoniques, calculatrice, clavier d'ordinateurs - Désinfection des Surfaces Peintures murales, revêtements de sol, Revêtement de surfaces d'acier inoxydable pour équipements médicaux.

2.5. Rappel sur les nanoparticules d'Oxyde de Cuivre (CuO)

L'oxyde de cuivre (CuO) présente des propriétés en partie similaires à celles du cuivre. Ainsi, ses propriétés de conductivité sont différentes, et leur utilisation concerne essentiellement la catalyse industrielle et l'électrochimie (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2012 ; Site du fournisseur American Elements ; Hanagata et *al.*, 2011). De plus, le CuO est un semi-conducteur qui exprime des propriétés particulières à haute température. Les NPs de CuO sont ainsi utilisées dans les batteries ou les convertisseurs d'énergie solaire, mais dans la composition de certains fluides pour en améliorer la conductivité thermique et permettre une économie énergétique (Ren et *al.*, 2009). La stabilité du CuO et son insolubilité en solution aqueuse permettent également son utilisation dans les verres et dans les céramiques, pouvant elles-mêmes être utilisées en micro-électronique. De plus, il possède les mêmes propriétés antimicrobiennes que le Cu, et est donc aussi de plus en plus utilisé pour la fabrication de textiles, de contenants alimentaires, ou même de systèmes de contraception intra-utérins (Piret et *al.*, 2012 ; Grillo et *al.*, 2010 ; Triboulet, 2013). Ses propriétés de réactivité sont également exploitées pour des processus de dépollution. Enfin, la structure cristalline du CuO lui confère des propriétés optiques, photocatalytiques et photovoltaïques (Ren et *al.*, 2009 ; Triboulet, 2013). Malgré ses nombreuses applications, ce type de NPs est reconnu comme étant très toxique comparativement aux autres NPs d'oxydes métalliques ou de carbone (Baek et An, 2011 ; Wang et *al.*, 2011 ; Perrault, 2012). Considérant leur fort potentiel toxique, les différents effets des NPs de CuO au niveau cellulaire doivent être bien compris et caractérisés.

2.6. Voies d'exposition aux nanoparticules

Plusieurs voies d'exposition peuvent être envisagées pour l'Homme. Ainsi, l'ingestion de produits alimentaires contenant des NPs, l'inhalation de ces dernières rejetées dans l'air ou l'application cutanée directe de cosmétiques, notamment sur peaux lésées, sont des voies possibles.

Des études ont également mis en évidence l'exposition de travailleurs aux nanomatériaux au cours du processus de production de ces derniers (Bello et *al.*, 2008 ; Methner et *al.*, 2007 ; Bour, 2015).

L'utilisation de produits cosmétiques entraîne un risque de relargage dans les eaux usées et/ou dans les points d'eau naturels lors de la baignade, notamment après application de crèmes

solaires. Une étude montre ainsi que 250 tonnes de NPs provenant de crèmes solaires peuvent potentiellement pénétrer dans le milieu marin chaque année (Baker et *al.*, 2014). Le relargage des NPs dans l'environnement à partir de produits d'utilisation courante a également été montré lors du lavage en machine de textiles contenant des NPs de TiO₂ et d'Ag (Marcoux et *al.*, 2012 ; Windler et *al.*, 2012 ; Bour, 2015). Ces études montrent notamment que l'utilisation de produits blanchissants accélère grandement la dissolution de l'argent.

Il existe également un risque d'entrée des NPs dans les eaux souterraines lors de fortes pluies, par lessivage des surfaces enduites ou peintes, ou des façades autonettoyantes contenant des NPs de TiO₂. Ainsi, Kaegi et *al.* (2008) ont mesuré des concentrations en TiO₂ entre 8 et 10 µg/L dans les enduits de façades, et de 8 à 16 µg/L dans les eaux de lessivage de ces façades, mettant en évidence un relargage important des NPs. Une autre source de contamination de l'environnement est liée au transport, et notamment aux véhicules consommant du diesel. En premier lieu, l'abrasion des pneus va libérer sur les routes des particules carbonées ou de silice, qui peuvent alors être drainées vers les sols lors d'épisodes de pluies, et pénétrer dans les eaux souterraines ou de surface (Gottschalk et *al.*, 2010). L'autre source de pollution par les véhicules est le relargage atmosphérique de NPs par les gaz d'échappement (Baker et *al.*, 2014 ; Gottschalk et *al.*, 2010). Une étude montre notamment que le maximum de NPs de CeO₂ provenant des gaz d'échappement serait retrouvé sur les 20 premiers mètres en périphérie des routes, et serait de 16 µg/kg de sol, après sept années de dépôts continus. (Johnson et Park, 2012 ; Bour, 2015).

Les effluents industriels seraient également à l'origine de la présence de NPs dans l'environnement. Ainsi, Baker et *al.*, (2014) affirment que les effluents industriels et d'eaux usées contenant des NPs d'argent pourraient faire augmenter la concentration en Ag dans les rivières de 4 à 320 ng/L, et de 0,04 à 14 µg/g dans les sédiments.

Enfin, une autre source de pénétration des NPs dans l'environnement est l'épandage agricole des boues d'épuration. En effet, les NPs présentes dans les eaux usées peuvent être trouvées dans ces boues. Les particules ainsi épandues finiront à plus ou moins long terme par contaminer les eaux de surface. L'épandage de ces boues représente donc une source importante de relargage environnemental (Gottschalk et *al.*, 2010 ; Wiesner et *al.*, 2006 ; Bour, 2015).

2.7. Toxicité des nanoparticules

- **Sur l'homme**

Les nanoparticules sont capables de traverser la barrière alvéolocapillaire et de là, se distribuer dans l'organisme. Cette capacité ainsi que leur biopersistance dépendent de leurs caractéristiques physico-chimiques.

Plusieurs nanoparticules (nanotubes de carbone et dioxyde de titane) sont considérées comme génotoxique. Cette génotoxicité peut être liée à l'action directe des particules sur l'ADN ou via la production de radicaux libres. Par ailleurs, des effets cancérogènes ont été mis en évidence pour plusieurs nanoparticules.

Les nanomatériaux seraient immunomodulateurs. Certaines nanoparticules sont ainsi utilisées comme adjuvant vaccinaux. Ces effets immunomodulateurs sont susceptibles d'entraîner des réactions inflammatoires inappropriées et d'être responsables d'allergies. Des effets immunosuppresseurs ont également été rapportés. De même, l'exposition in utero et postnatale aux nanomatériaux est possible, indiquant des changements dans la plasticité synaptique, l'expression des gènes et le comportement. (Klein, 2015)

- **Sur les organismes aquatiques**

Plusieurs études relatent les effets toxiques des nanoparticules sur la moule *Mytilus* (Canesi et al., 2008 ; Tedesco et al., 2010, Larue, 2011). Chez cet organisme les nanoparticules pourraient pénétrer par la glande digestive et à partir de là, provoquer des altérations dans tout l'organisme tels que l'induction de processus inflammatoires (Canesi et al., 2008) ou l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de stress (Canesi et al., 2010a) ou encore l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes et de la peroxydation lipidique (Canesi et al., 2010b ; Tedesco et al., 2010). L'impact des NPs sur les escargots d'eau douce (Cortea et al., 2011 ; Musee et al., 2010), sur les larves de chironomes (Oberholster et al., 2011 ; Lee et al., 2009), sur les cnidaires (Yeo and Kang, 2010) et sur les polychètes (Galloway et al., 2010) a également été étudié mettant en évidence des effets toxiques à travers une diminution de l'alimentation et une augmentation du nombre des malformations, du stress oxydant, des dommages à l'ADN corrélés à une augmentation de la mortalité. (Larue, 2011)

Les amphibiens qui partagent leur vie entre milieu aquatique et terrestre ont également fait l'objet de quelques études. Les NPs de diamant provoquent des effets toxiques selon la fonctionnalisation de leur surface (Marcon et al., 2010). En effet, les effets constatés sont liés

à l'accumulation de nanotubes dans l'intestin des animaux qui limitent leur nutrition. (Mouchet et *al.*, 2007 ; Mouchet et *al.*, 2008., Larue, 2011).

De nombreuses études ont également été menées sur l'espèce *Daphnia* (microcrustacés). Les nanoparticules induisent chez cette espèce une augmentation de la mortalité, altèrent la reproduction, modifient le comportement ou encore génèrent des malformations (Dabrunz et *al.*, 2011., Zhu et *al.*, 2010., Larue, 2011), les effets physiques tels que l'obstruction du tube digestif, expliquent une partie de la toxicité des nanoparticules (Blinova et *al.*, 2010 ; Kim et *al.*, 2010 ; Zhu et *al.*, 2010). En effet, les daphnies ingurgitent de grandes quantités de nanoparticules qui viennent bloquer l'assimilation des nutriments ou qui peuvent être transférées dans l'organisme (Zhao and Wang ; 2010 ; Zhu et *al.*, 2010). De plus, des daphnies qui ingèrent des NPs de TiO₂ par exemple, ne les éliminent pas facilement et les NPs se trouvent accumulées donc dans cet organisme (Zhu et *al.*, 2010., Larue, 2011). Cette Bioaccumulation peut conduire à la bioamplification, c'est-à-dire à l'augmentation de la teneur en toxique d'un maillon de la chaîne alimentaire à l'autre.

D'autre part, des effets génotoxiques ont également été mis en évidence sur ce modèle biologique (Lee et *al.*, 2009 ; Poynton et *al.*, 2011). L'exposition des daphnies à des NPs de CeO₂ mène au fractionnement de leur ADN et par conséquent à l'augmentation de leur taux de mortalité (Lee et *al.*, 2009., Larue, 2011).

3. Rappel sur les pesticides

3.1. Définition

La Food and Agriculture Organization (FAO) définit ainsi les pesticides: « toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et autres endo ou ectoparasites.

Le terme comprend les substances destinées à être utilisées comme régulateurs de croissance des plantes, défoliants, agent de dessiccation, comme agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée des fruits, ainsi que les substances appliquées sur les

cultures, soit avant, soit après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport ». (Batsch, 2011).

3.2. Classification des pesticides

Les pesticides aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structures chimiques, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est complexe.

D'une manière générale, les substances actives peuvent être classées soit en fonction de la nature de l'espèce à combattre (1^{er} système de classification), soit en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose (2^{ème} système de classification).

3.2.1. Selon la nature de l'espèce à combattre

- **Les Herbicides**

Les herbicides sont des substances chargées de ralentir la croissance ou de détruire les plantes cibles, nommées adventices ou mauvaises herbes. Les plantes adventices sont considérées comme ennemis des cultures car elles entrent en compétition avec la culture elle-même pour la ressource organique et minérale du sol, l'eau, l'espace et la lumière. Cette définition inclue également les repousses de cultures (repousses de colza, pommes de terre, tournesols, ...) à l'endroit où elles sont indésirables, c'est à dire dans les cultures qui suivent. Les herbicides peuvent agir dans le sol au niveau des racines ou directement sur feuilles. (Batsch, 2011).

- **Les Fongicides**

Les fongicides agricoles permettent de combattre les champignons phytopathogènes susceptibles de provoquer des dégâts sur les plantes cultivées et les récoltes. Les pertes potentielles provoquées par les maladies fongiques sont estimées entre 10 et 30%. En dehors des effets quantitatifs, il existe des champignons pouvant affecter les qualités des productions végétales comme la présence de mycotoxines toxiques pour l'homme, ou des altérations organoleptiques comme la présence de *Botrytis cinerea* sur le raisin. (Batsch, 2011).

- **Les Insecticides**

Les insecticides sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction avec des effets neurotoxiques ou régulateurs de croissance. (Errami, 2012).

Également, ils permettent l'élimination des arthropodes. Ils peuvent être utilisés contre les larves et/ou les œufs (larvicides) ou encore contre les adultes. (Louat, 2013).

Certains pesticides sont spécifiquement acaricides, nématicides, molluscicides, nématocères, rodenticides, corvicides ou algicides par exemple, mais font l'objet d'un usage beaucoup plus restreint que les trois groupes précédemment cités. (Poulier, 2014).

3.2.2. Selon la nature chimique

- **Pesticides inorganiques**

Ils sont peu nombreux mais certains sont utilisés en très grande quantité comme le soufre ou le cuivre. Ce sont des pesticides très anciens dont l'emploi est apparu bien avant la chimie organique de synthèse. De cette époque ne subsistent aujourd'hui aucun insecticide, un seul herbicide employé en tant que désherbant total (chlorate de sodium) et quelques fongicides à base de soufre et cuivre comme la bouillie bordelaise ($[\text{Cu}(\text{OH})_2]_x, \text{CaSO}_4$) (Fillatre, 2011 ; Ghenabzia, 2017).

- **Pesticides organo-métalliques**

Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe fait d'un métal comme le zinc ou le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate (exemple : mancozèbe avec le zinc, manèbe avec le manganèse) (Fillatre, 2011 ; Ghenabzia, 2017).

- **Pesticides organiques**

Ils sont très nombreux et appartiennent à diverses familles chimiques (Tomlin, 2006). Il existe actuellement plus de 80 familles ou classes chimiques dont les plus connues sont : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyrèthrénoïdes, les triazines, les benzimidazoles et d'autres groupes (tels que le dérivé dipiridiniques, organe mercuriale, organocinécades, fenoxiacétiques, pyrèthrines et les dérivés triaziniques) (Bazzi, 2010 ; Ghenabzia, 2017).

3.3. Les insecticides organophosphorés

Les capacités neurotoxiques de ces substances furent découvertes d'abord chez l'Homme par le Dr. Schrader, quelques années avant la guerre 40-45, lors de l'élaboration de gaz de

combat neurotoxiques comme le sarin, le soman et le tabun (Balali-Mood and Balali- Mood, 2008., Batsch, 2011). Ce n'est que quelques années plus tard que leur action insecticide fut mise en évidence. Dès lors, de nombreux OP ont été synthétisés (Kwong, 2002). Leurs propriétés physico-chimiques ont été modifiées afin d'améliorer leur activité insecticide mais également de manière à réduire leur stabilité dans l'environnement (Lotti, 2002). Leur forte capacité insecticide associée à une toxicité aigüe considérée modérée chez les mammifères et une stabilité relativement faible dans l'environnement (par rapport aux organochlorés) ont fait des OP la principale classe d'insecticides utilisés dans le monde, et encore actuellement (Costa, 2006 ; Costa et *al.*, 2008., Batsch, 2011).

Leur principe actif repose sur la perturbation du fonctionnement du système nerveux par l'inhibition d'une enzyme essentielle à son bon fonctionnement : l'acétylcholinestérase (AChE). Cette enzyme est commune à de nombreux représentants du règne animal, ce qui ne confère aux OP qu'une relative sélectivité. C'est la raison pour laquelle leur activité ne se limite pas aux insectes. Par exemple, les OP sont très dangereux pour les écosystèmes aquatiques (invertébrés et poissons), même à de très faibles doses. (Batsch, 2011).

3.4. Le Chlorpyrifos

Le CPF est un insecticide organophosphoré à large spectre. Il est utilisé aussi bien pour tuer des moustiques que des cancrelats, des larves de scarabées, des puces, des mouches, des termites, des fourmis et des poux. Il est utilisé comme insecticide sur les graines, le coton, les fruits, les noix dans les champs et vergers, mais aussi sur des pelouses et plantes ornementales. Il est aussi répertorié comme antiparasitaire en utilisation directe sur le mouton et des dindes, mais aussi en utilisation indirecte, pour le traitement de site de cheval, des niches de chien, des logements domestiques, des bâtiments agricoles, des poubelles de stockage et des établissements commerciaux. (Braquenier, 2009).

3.5. Toxicité du Chlorpyrifos

Chez les mammifères, la toxicité aigüe est considérée comme modérée. En effet, chez les rongeurs, en fonction des sources, la DL₅₀ (dose létale pour 50 % des individus) par voie orale chez le rat va de 82 à 270 mg/kg et de 60 mg/kg chez la souris.

Chez les mammifères plus grands, la toxicité est plus modérée encore : chez le lapin, DL_{50} = 1000 mg/kg et chez le mouton 800 mg/kg.

Le CPF paraît aussi toxique chez les oiseaux de grande taille que chez les petits mammifères : DL_{50} orale chez le canard 76 mg/kg, mais très toxique chez les oiseaux de petite taille : DL_{50} oral chez le pigeon : 10 mg/kg (Batsch, 2011).

Par contre, la toxicité chez les organismes aquatiques est très élevée, tant chez les poissons que chez les invertébrés. Par exemple, après 48 heures d'exposition, la toxicité (CL_{50} ; concentration létale pour 50% des individus) survient à des doses inférieures à 1 dg/L (après 48 heures) pour les Daphnies (*Daphnia magna*) et la CL_{50} est de 0,009 mg/L (après 96 heures) pour la truite arc-en-ciel.

Une accumulation du produit a été constatée dans les sédiments de rivières et dans les tissus des organismes aquatiques (Batsch, 2011).

4. Le stress oxydant

4.1. Définition du stress oxydant à l'échelle d'un organisme

Des composés à fort potentiel oxydant, sont produits constamment en situation physiologique au sein d'un organisme. Il se met alors en place un système antioxydant. En situation normale, la balance antioxydant/prooxydant est équilibrée mais l'organisme peut être confronté à une surexposition à des composés oxydants lorsque la production endogène d'EROs devient excessive ou suite à l'exposition à un phénomène toxique exogène. Lorsqu'un déséquilibre intervient (par surproduction de composés prooxydants ou par déficit en substances antioxydantes), on parle de stress oxydatif ou stress oxydant (Favier, 2003 ; Mongens, 2013).

4.2. Les espèces réactives de l'Oxygène

Les radicaux libres sont définis comme étant des molécules ou des atomes possédant un électron non apparié sur leur couche périphérique, ce qui leur confère une grande réactivité. Ces radicaux libres auront toujours tendance à remplir leur orbitale en captant un électron. Ce sont donc pour la plupart de puissants oxydants.

Dans la cellule, ils sont notamment générés au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, la mitochondrie fournit 90% de l'énergie nécessaire à la cellule (Rolfe and Brown,

1997), et utilise 80% de la consommation d'oxygène de cette dernière. Cependant, au cours de la réduction de l'oxygène en eau (réaction 1), 1 à 2% de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Koppenol, 2001). L'anion superoxyde est le premier radical libre formé (réaction 2), ce qui conduit par la suite à la production d'autres EROs comme le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), l'acide hypochloreux (HOCl), des dérivés nitrés ($\text{NO}\bullet$). Leurs instabilités et leurs réactivités peuvent alors induire une dégradation des protéines, de l'ADN, l'oxydation des lipides, l'ensemble de ces phénomènes étant alors à l'origine de divers désordres biologiques associés à certaines maladies. (Bayrasy, 2013). La figure (2) résume les différentes sources des espèces réactives de l'Oxygène :

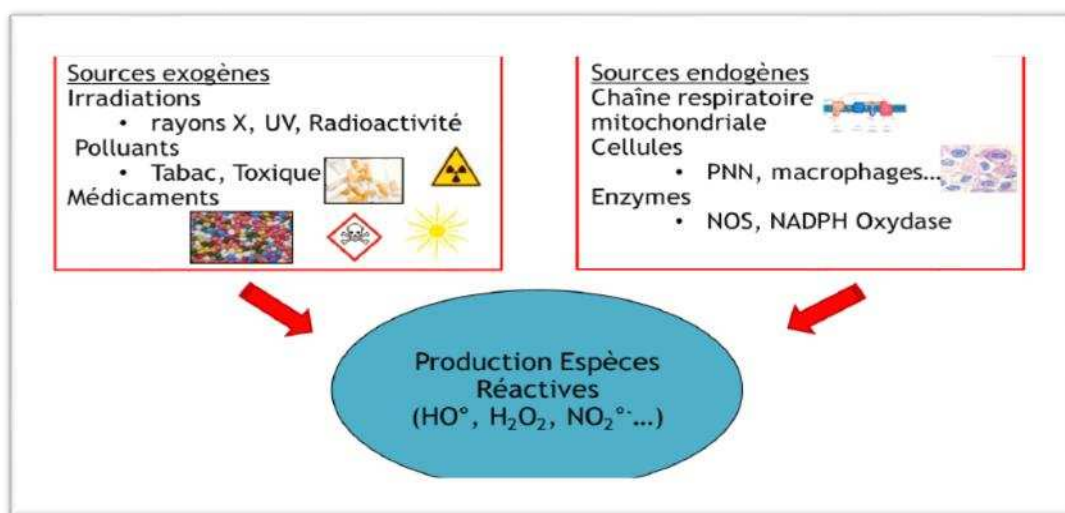


Figure 2 : Sources des espèces réactives de l'Oxygène. (Poisson, 2013)

4.3. Cibles biologiques des espèces réactives de l'Oxygène

En raison de leur grande réactivité, les EROs peuvent s'attaquer à de nombreuses cibles biologiques dont les lipides, les protéines et les acides nucléiques comme le montre la figure (3).

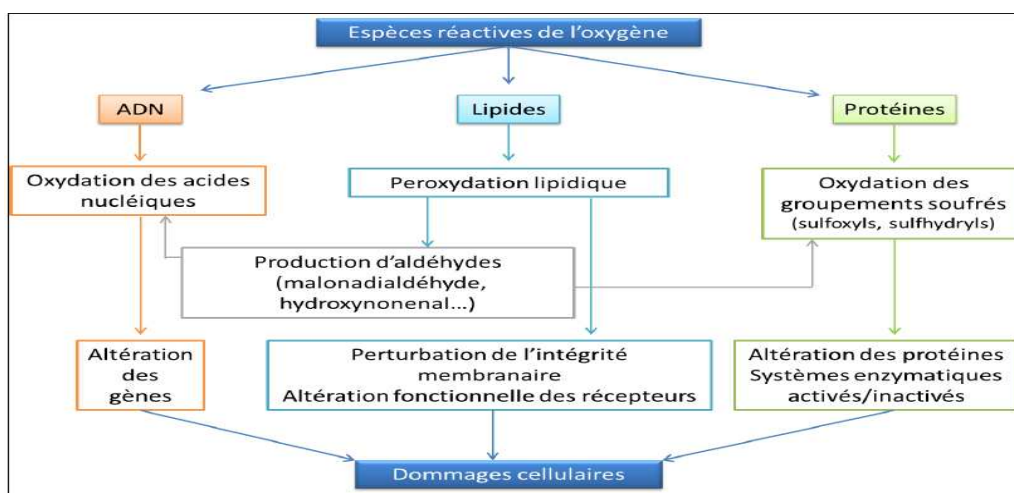


Figure 3 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (D'après Monteil et *al.*, 2004).

• L'ADN

Les EROs, et plus particulièrement le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), peuvent induire des cassures de l'ADN, des mutations ponctuelles (simple ou double brins) ou bien altérer les systèmes de réparation. Les EROs peuvent induire notamment des oxydations, des nitrations ou des méthylations des bases. Parmi les oxydations des bases, la guanine peut être oxydée par le radical hydroxyle en 8-hydroxy-Guanosine (8-OH-G) aboutissant à la formation de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) qui peut être ensuite mesuré comme marqueur de stress oxydant.

Ces modifications vont ainsi perturber la transcription et la traduction par la suite, aboutissant à la formation d'une protéine tronquée et/ou non fonctionnelle. Ces altérations sont souvent à l'origine des phénomènes de mutagenèse, carcinogénèse ou encore de vieillissement prématuré (Valko et *al.* 2006 ; Poisson, 2013).

• Les Lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical $\text{OH}^\bullet$ capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical $\text{RO}_2^\bullet$. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical $\text{RO}_2^\bullet$ formé se transforme en ROOH au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être

réduits et neutralisés par la Glutathion Peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui, par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical $RO_2^{\cdot}$, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal (HNE). (Esterbauer, 1992 ; Bennamara, 2017).

- **Les Protéines**

Les EROs provoquent une dénaturation des protéines : altération des groupements thiols, formation de ponts disulfures, accentuation du caractère hydrophobe d'où agrégation des protéines qui les rend plus résistantes à la protéolyse physiologique (Grandjean 2005a). Cela concerne en particulier les enzymes cytosoliques et les protéines de transport qui perdent leurs fonctionnalités à la suite de ces modifications délétères. (Lenzi, 2011).

5. Le système de défense antioxydant

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est effectué par des systèmes antioxydants dont le rôle principal est de neutraliser et dégrader les radicaux libres. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont définis comme des substances qui, à faible concentration, retardent ou inhibent significativement l'oxydation du substrat oxydable (Mezzetti et *al.* 1990). Ils peuvent être divisés en deux groupes selon leur mode d'action : les antioxydants enzymatiques (ou primaires) et les antioxydants non-enzymatiques (ou secondaires). (Smine, 2017). Les deux groupes semblent être complémentaires vu la différence de localisation cellulaire de leurs composants (Figure 4).

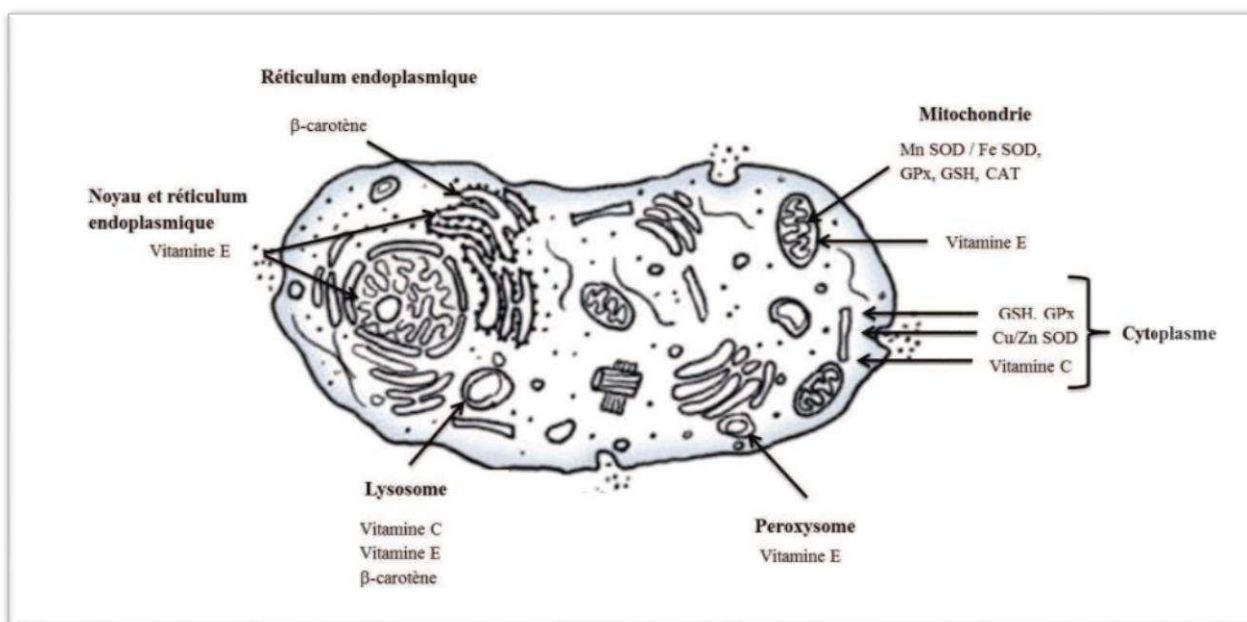


Figure 4 : Localisation intracellulaire des anti-oxydants enzymatiques et non enzymatiques (Bounedjah, 2014).

Au niveau enzymatique, les SODs constituent la première défense contre les effets toxiques de niveaux élevés en anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène est, quant à lui, pris en charge principalement par les catalases et les peroxydases. Néanmoins, il existe d'autres composantes cellulaires capables de détoxifier les EROs et/ou de limiter, voire réparer les dommages engendrés. Les hydroperoxydes d'acides gras peuvent être par exemple pris en charge dans le cytosol par des GSTs (Zhao, Singhal et *al.* 1999). Certaines de ces enzymes sont également capables de régénérer l'ascorbate. Néanmoins, l'activité GST ne se limite pas à la régulation des EROs. Ces protéines sont, en effet, fortement impliquées dans les processus de détoxification cellulaire des substances exogènes et dans le métabolisme secondaire.

Les antioxydants non-enzymatiques comprennent des molécules de petite taille comme le glutathion, l'acide urique et la bilirubine, mais aussi des composés exogènes en plus des systèmes antioxydants cellulaires tels que les vitamines (A, C, E), les flavonoïdes, les caroténoïdes, les polyphénols et les minéraux. (Münzel et *al.*, 2017 ; Bahlil, 2018).

Le glutathion constitue l'un des principaux antioxydants cellulaires, tant au niveau de sa concentration et de son pouvoir réducteur que de sa facilité à céder un électron. Les caroténoïdes et les flavonoïdes sont, par exemple, de très bons antioxydants de par leur nature phénolique et par la présence de chaînes carbonées polyinsaturées. (Lallement, 2014).

L'acide urique est considéré comme un antioxydant qui protège le système nerveux central (Bowmen et *al.*, 2010 ; Bahlil, 2018). La vitamine C est une molécule hydrosoluble localisée essentiellement dans le plasma et le cytosol. Cette molécule s'associe directement avec les EROs comme le $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$. Elle inactive également l' $^1O_2$ et le HOCl. Le métabolisme de la vitamine C permet également la régénération d'une autre molécule antioxydante, la vitamine E, qui est une molécule liposoluble. Elle est importante dans l'inhibition de la propagation de la peroxydation lipidique.

Les minéraux tels que le zinc, le cuivre et le sélénium sont essentiels dans la lutte contre l'oxydation. Bien qu'ils n'agissent pas directement sur les radicaux libres, ils permettent le fonctionnement d'enzymes antioxydantes comme la glutathion réductase ou la superoxyde dismutase. (Maurent, 2017).

6. Rappel sur les bioindicateurs et les biomarqueurs

6.1. Concept de bioindication

Pendant de nombreuses années, les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement sont basées sur les caractéristiques chimiques des pesticides mais ne permettent pas de mesurer l'impact des contaminants sur les différents organismes, populations et communautés peuplant un milieu donné. Une nouvelle méthode utilisant les paramètres biologiques, physiques et biochimiques des organismes vivants, tant à l'échelle du simple individu que des écosystèmes entiers sont venues combler les lacunes inhérentes aux analyses strictement chimiques. Certaines espèces sont plus sensibles que d'autres et nécessitent des conditions particulières pour se maintenir dans leur milieu naturel. Lorsque les conditions du milieu naturel sont altérées, par exemple dans le cas de contamination par des pesticides, ces espèces peuvent être affectées de plusieurs façons reflétant ainsi le déséquilibre des conditions initiales du milieu naturel. De telles espèces sont appelées indicateurs biologiques (ou indicateurs écologiques) en raison de leur capacité à caractériser l'état d'un écosystème soumis à un stress environnemental, ainsi ils permettent de détecter ou prévoir des changements significatifs pouvant survenir à l'intérieur de ce même écosystème (Bélanger et *al.*, 2009).

Aujourd'hui, les stratégies de surveillance de l'environnement sont de plus en plus au cœur des préoccupations de groupes d'études émanant d'instances internationales à travers les nombreux programmes scientifiques. Ces stratégies de surveillance de l'environnement ont pour

objectif d'évaluer le vivant et de décréter objectivement qu'il présente un « caractère remarquable ». Pour cela on effectue une bioévaluation (un protocole de procédures à fondements biologiques qui peuvent servir à établir de diagnostics écologiques) et donc l'obtention de système d'évaluation. (Kayalto, 2011).

Parmi ces méthodes d'évaluation, on distingue :

- Les indicateurs biologiques (bioaccumulateurs, biomarqueurs)
- Les indicateurs écologiques (IE)

6.2. Les biomarqueurs :

Les biomarqueurs sont considérés comme des outils intégrateurs qui peuvent fournir des informations complémentaires aux analyses chimiques et écologiques utilisées pour la surveillance de l'environnement *in situ* d'une part et d'améliorer le lien entre les effets biologiques observés au niveau communautaire et les concentrations chimiques mesurées dans le milieu d'autre part (Sanchez et *al.*, 2010). Ils sont considérés comme un signe d'alerte précoce qui donne de précieuses informations sur la qualité des milieux et nous permettent de prendre des mesures avant que les effets deviennent irréversibles (Hampel et Blasco, 2016 ; Sanni et *al.*, 2016 ; Habila, 2018).

Plusieurs définitions ont été attribuées au terme biomarqueur qui est utilisé pour décrire n'importe quelle mesure, chimique, physique ou biologique, qui reflète l'interaction entre le système biologique et les substances toxiques (WHO, 2006).

Les biomarqueurs sont définis comme des mesures biologiques de réponse et d'effets de polluants sur des organismes. C'est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Galloway 2006 ; Hagger et *al.* 2008).

Il existe trois catégories de biomarqueurs :

- **Biomarqueur d'exposition** : indique que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Généralement, il est le résultat d'interactions avec des molécules naturelles ou avec des liquides biologiques. C'est par exemple le cas des adduits de l'ADN. (Boumhras, 2012).

- **Biomarqueur d'effet** : indique, qu'après avoir pénétré, le polluant se répand dans les différents tissus, en exerçant des effets toxiques ou non. Les indices généraux de ce stress, dits « non spécifiques », décrivent les effets provoqués par un grand nombre de facteurs de stress. Des biomarqueurs dits « spécifiques » peuvent donner des réponses à une classe particulière de xénobiotiques. (Boumhras, 2012).
- **Biomarqueurs de susceptibilité** : incluant les capacités naturelles ou acquises qui permettent à un organisme de s'adapter et répondre à une exposition spécifique à un polluant ; comprenant les facteurs génétiques et moléculaires qui altèrent la susceptibilité d'un organisme à la pollution (Martín-Díaz et *al.*, 2004).

Les biomarqueurs peuvent être aussi regroupés selon leur spécificité vis-à-vis une classe particulière des contaminants. Il existe des biomarqueurs spécifiques adaptés à la détection d'un polluant donné et des biomarqueurs non spécifiques qui intègrent les effets des différents facteurs de stress (Iagadic et *al.*, 1997 ; Habila, 2018).

7. Rappel sur *Daphnia magna*

7.1. Anatomie et physiologie

Comme tout crustacé, *Daphnia magna* possède une carapace, à double paroi constituée de chitine et de polysaccharides. La longueur du corps varie de 0.5 mm à 6 mm, suivant le stade de développement. La daphnie possède 10 paires d'appendices, qui sont, du haut vers le bas (Figure 5) :

- Les antennules, munies d'organes sensoriels, présentant un dimorphisme sexuel ;
- Les antennes, pourvues de soies natatoires, permettant la nage ;
- Les maxillaires ;
- Les mandibules ;
- 5 appendices thoraciques foliacés (ou phyllopoies), munies d'appareils branchiaux, au niveau desquelles se font les échanges gazeux. Ces pattes thoraciques assurent aussi la filtration du plancton. A l'extrémité de l'abdomen se trouve une paire de pinces.

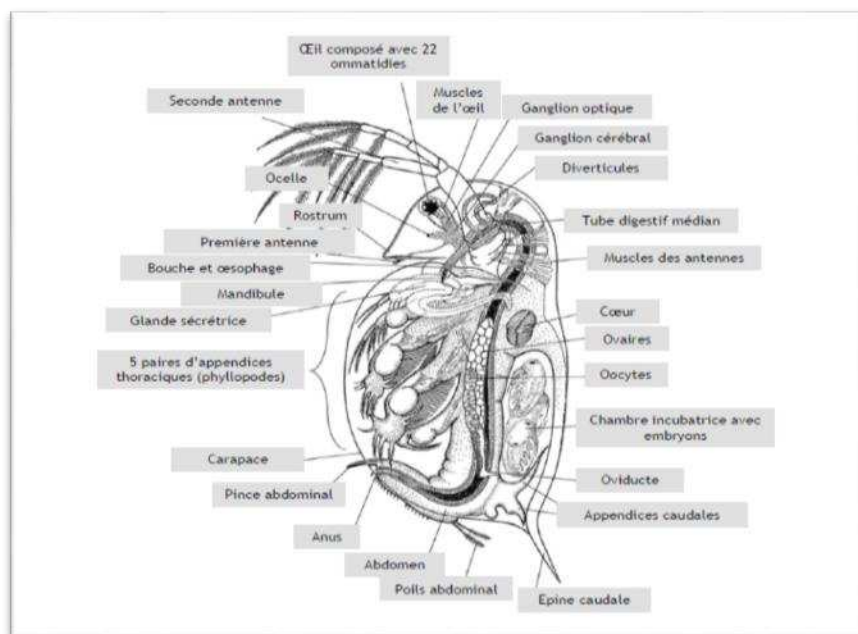


Figure 5 : Anatomie de *Daphnia magna* femelle adulte (Ebert, 2005 ; Massarin, 2010).

Il existe un dimorphisme sexuel très net chez les daphnies. En effet, Les mâles se distinguent des femelles par une taille plus petite, des antennules plus larges, et une modification des premières pattes qui sont armées d'un crochet servant à étreindre les femelles. Les embryons présentent deux ébauches d'œil brunâtres qui fusionnent pendant la dernière partie de leur développement, donnant chez les juvéniles et adultes un œil unique, composé, médian, de taille importante, mobile dans une cavité sans communication vers l'extérieur. Cet œil composé aide l'animal à s'orienter au cours de la nage. (Massarin, 2010).

7.2. Développement

- Le stade 1 ou stade de division dure entre 0 et 15h : l'embryon est sphérique.
- Le stade 2 correspond au stade de gastrulation et se déroule entre 15 et 25h. L'embryon devient asymétrique avec présence d'un blastopore en raison du début de la différenciation cellulaire.
- Le stade 3 est nommé stade de maturation embryonnaire précoce, il se déroule entre 25 et 35h et présente une différenciation de la tête et des antennes.

➤ Le stade 4 ou encore stade de maturation embryonnaire moyenne, se déroule entre 35 et 45h et correspond à la mise en place de l'œil pigmenté ainsi qu'au développement des antennes qui restent encore confinées dans la membrane embryonnaire.

➤ Le stade 5 est le stade de maturation embryonnaire tardive et se déroule entre 45 et 50h. Il y a rupture de la seconde membrane embryonnaire et par suite extension partielle des antennes A2 alors que l'épine caudale reste encore pliée contre la carapace.

➤ Le stade 6 est le dernier stade. Il correspond au développement complet de l'embryon et se déroule de 50 à 72h. A ce niveau, il y a développement complet des antennes et libération de l'épine caudale, de sorte que le nouveau-né est prêt à se déplacer. (Toumi, 2013).

7.3. Cycle de vie

Le cycle de vie des daphnies est caractérisé par deux modes de reproduction : asexué et sexué

7.3.1. Reproduction asexuée

La reproduction asexuée apparaît chez les daphnies lorsque les conditions de vie dans le milieu sont favorables. Lors de ces périodes, les populations de daphnies sont essentiellement composées de femelles. Sans aucune fécondation par l'autre sexe, les femelles adultes produisent des œufs génétiquement identiques, aussi bien entre eux qu'avec leurs mères. On parle alors de reproduction « parthénogénétique ». La première ponte d'œufs d'une femelle adulte se produit après 6-7 jours de vie, lorsqu'elle a atteint sa maturité. Les œufs sont déposés dans la chambre incubatrice des femelles, localisée dorsalement sous la cuticule. Les embryons éclosent après un jour mais restent dans la chambre incubatrice, afin de terminer leur développement. Au bout de 3-4 jours, les daphnies adultes libèrent les juvéniles par flexions ventrales. Ces juvéniles sont qualifiées de « néonates » suivant l'anglicisme « néonates », signifiant nouveau-nés. Avant de devenir à leur tour capable de se reproduire, les néonates passent successivement par plusieurs périodes développement. Ces périodes sont appelées « instars » et correspondent à la période qui sépare deux événements de mue. En conditions optimales, le cycle de vie de *Daphnia magna* est divisé en trois stades différents : embryonnaire (3 jours), juvéniles (6 jours) et adulte (jusqu'à leur mort). A 20°C, une daphnie adulte libère sa première ponte au bout de 9 jours et de nouvelles pontes sont successivement libérées tous les 2-3 jours jusqu'à leur mort (Figure 6). Ces pontes cycliques se produisent après chaque événement de mue. La taille des pontes varie de 10 à 40 œufs selon l'âge de la mère. En conditions optimales, les femelles peuvent vivre un peu plus de deux mois. Les générations

parthénogénétiques se succèdent tant que les conditions du milieu restent favorables. (Parisot, 2015).

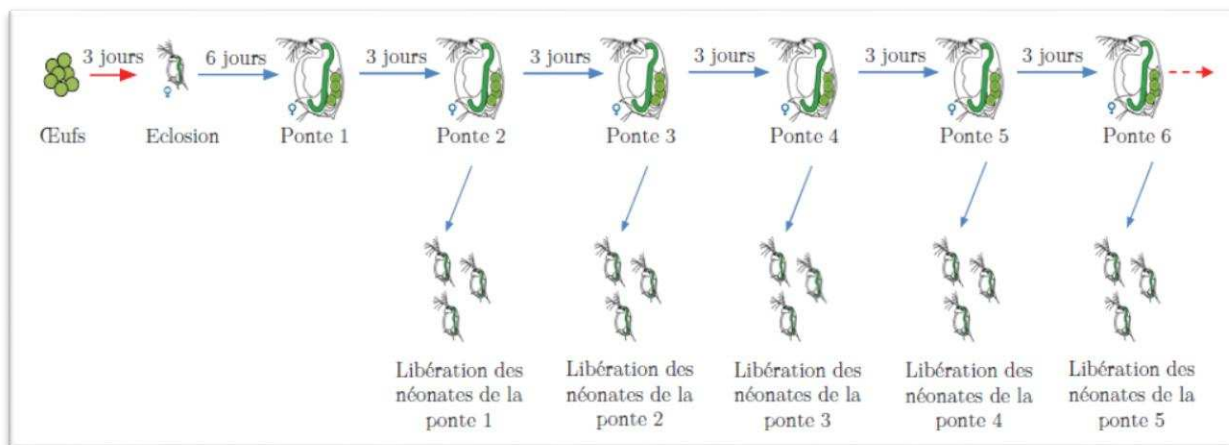


Figure 6 : Reproduction parthénogénétique de *Daphnia magna*. (Parisot, 2015).

7.3.2. Reproduction sexuée

Si les conditions deviennent défavorables (manque de nourriture, pollution chimique, densité excessive, assèchement du volume d'eau, désoxygénation sévère, abaissement de la température, etc...), les daphnies femelles donnent alors naissance à des mâles. Ils sont plus petits et reconnaissables à l'absence de poche incubatrice.

La reproduction peut alors être sexuée. Les femelles fécondées portent dans la poche incubatrice une « éphippie ». Ces œufs de résistance à membrane épaisse n'éclosent pas immédiatement. Ils restent enfermés dans leur membrane protectrice qui durcit et s'épaissit.

Ils donneront naissance, lorsque les conditions deviennent à nouveau favorables, à une population génétiquement différente des daphnies mères (Chèvre, 2000 ; Zeman, 2008).

7.4. Intérêt de l'utilisation de la daphnie comme bioindicateur de la pollution

Les connaissances biologiques et physiologiques acquises chez *Daphnia magna* ont contribué au choix de cette espèce comme modèle biologique de référence dans les domaines de la toxicologie et de l'écotoxicologie, en particulier, concernant la gestion des risques environnementaux liés aux produits chimiques. Aujourd'hui, *Daphnia magna* est recommandée en tant qu'espèce standard dans différents tests d'écotoxicité (ASTM, 1998 ; OECD, 2004, 2008).

Le choix de la daphnie tient à : (i) sa facilité de manipulation et d'élevage au laboratoire (ii) sa petite taille, son cycle de vie court ce qui permet de suivre l'effet des polluants sur plusieurs générations (iii) sa reproduction parthénogénétique (individus génétiquement identiques) (iv) sa fécondité élevée et sa sensibilité à une large gamme de produits chimiques (Colbourne et *al.*, 2011).

Toutes ces caractéristiques font de la daphnie un organisme relativement facile à maintenir en laboratoire et particulièrement adapté pour évaluer les effets toxiques et génotoxiques de divers polluants au cours de plusieurs générations. (Parisot, 2015).

8. Rappel sur *Paramecium sp*

8.1. Généralités

Dès le 19^{ème} siècle, la grande taille et la répartition géographique mondiale de la paramécie en ont fait un organisme très largement étudié par les biologistes. Des études cytologiques et physiologiques ont montré que la paramécie présente des fonctions cellulaires extrêmement complexes et diverses à tel point que l'on peut faire le rapprochement avec les organes des métazoaires (figure 7A). Ce protiste possède des cils vibratiles recouvrant la totalité de la surface cellulaire et permettant le déplacement de la cellule et la prise de nourriture ; c'est une cellule polarisée avec un pôle antérieur et un pôle postérieur, une face ventrale et une face dorsale, une gauche et une droite, reconnaissable grâce à l'agencement des corps basaux ancrés à son cortex.

La figure (7B) illustre les principaux organites présents chez ce cilié. La paramécie possède un système digestif complet : un appareil oral dans lequel vont se former les vacuoles digestives par capture de bactéries grâce à un battement ciliaire organisé. Ces bactéries vont être rejetés au niveau du cytoprocte. La paramécie possède aussi l'équivalent de « reins », que sont les vacuoles pulsatiles qui permettent l'élimination des déchets liquides et la circulation de l'eau et des minéraux, contrôlant ainsi la pression osmotique de la cellule. (Laligné, 2011).

Comme tous les ciliés, la cellule de la paramécie est couverte d'un grand nombre de cils arrangés régulièrement qui permettent le déplacement par nage, et la nutrition en attirant les nutriments en suspension dans le milieu (bactéries et autres microorganismes) au niveau de la bouche. Une autre caractéristique majeure des ciliés est la présence d'un dimorphisme nucléaire. En effet, la paramécie possède deux types de noyaux au sein d'un même cytoplasme.

Les deux micronoyaux (MIC) qui sont diploïdes et le macronoyau (MAC) qui est fortement polyploïde. (Berger, 1973 ; Marmignon, 2013).

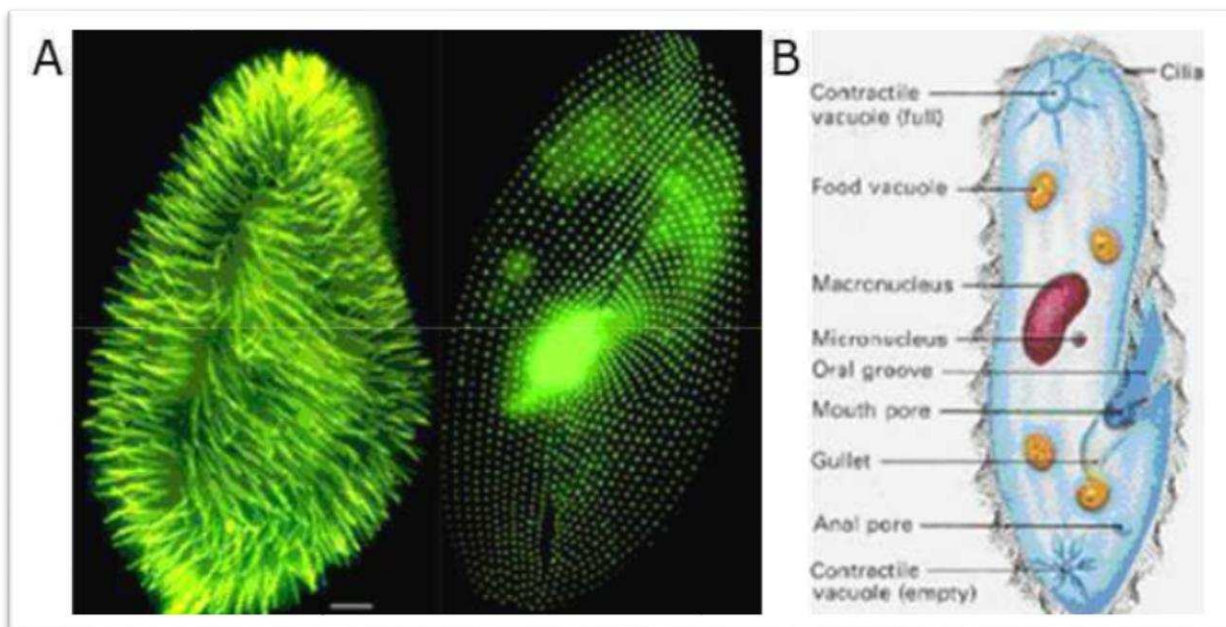


Figure 7 : Présentation de la paramécie (Gogendeau, 2005).

A- la ciliature d'une paramécie vue en immunofluorescence. B- Les principaux organites présents chez la paramécie.

8.2. Cycles de vie

8.2.1. Cycle végétatif

La paramécie vit librement dans les eaux douces et se nourrit de bactéries. Durant sa vie végétative elle se divise par fission binaire, les micronoyaux effectuant une mitose alors que le macronoyau se divise sans fuseau mitotique et de manière non équitable (figure 8). *Paramecium tetraurelia*, l'espèce la plus étudiée par des approches génétiques, moléculaires et cellulaires, est capable de se reproduire sexuellement selon deux processus : la conjugaison qui implique deux cellules de types sexuels compatibles, et l'autogamie qui est une auto fertilisation. Ces événements se déclenchent généralement lorsque l'environnement est faible en nourriture, permettant ainsi de les induire en laboratoire. (Wilkes, 2014).

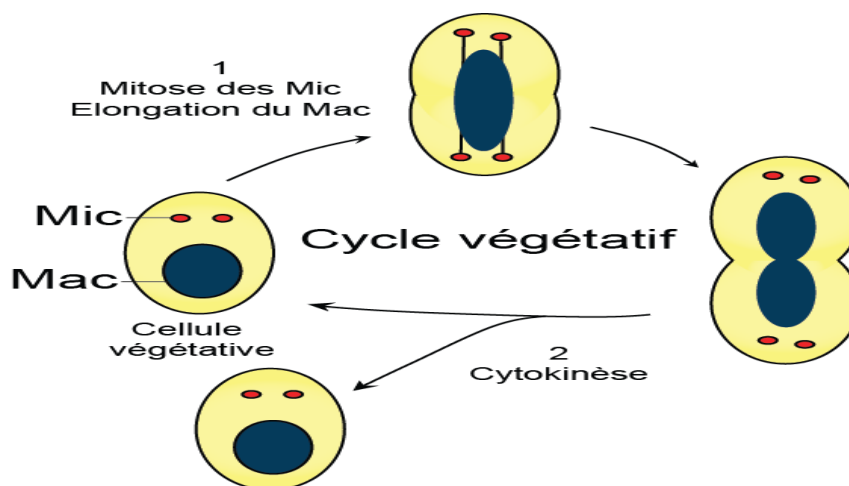


Figure 8 : Cycle végétatif de la paramécie. (Abello, 2019).

8.2.2. Processus sexuel

La paramécie possède deux types de reproduction sexuée, l'autogamie (figure 9) et la conjugaison (figure 10)

- **Autogamie ou autofécondation**

L'autogamie est une auto-fertilisation conduisant à la fusion des deux noyaux haploïdes pour former un noyau zygotique diploïde. L'individu devient donc entièrement homozygote. L'autogamie se déclenche sous deux conditions : La cellule doit être âgée d'un minimum de 20 divisions végétatives pour *Paramecium tetraurelia* (5 jours à la vitesse de croissance optimale) et doit être en carence alimentaire (dans un milieu de culture épuisé en bactéries et nutriments).

L'autogamie débute par la méiose des deux micronoyaux, ce qui produit huit produits de méiose haploïdes. En même temps, le macronoyau commence à se fragmenter. Sept des produits de méiose vont dégénérer tandis que le dernier se divise pour donner deux noyaux haploïdes identiques, les noyaux gamétiques. Ceux-ci fusionnent pour former un noyau diploïde, le noyau zygotique. Celui-ci va subir deux mitoses successives pour obtenir quatre copies du noyau zygotique. Deux d'entre eux vont migrer à l'avant de la cellule et les deux autres à l'arrière. Les deux à l'avant vont se différencier en micronoyaux tandis que les deux autres vont se différencier en macronoyaux (figure 9). Une division dite « caryonidale » va avoir lieu ; au cours de celle-ci les micronoyaux vont faire une mitose classique tandis que les macronoyaux toujours en développement vont être ségrégués dans chacune des deux cellules filles. Pendant ce processus les fragments de l'ancien macronoyau sont toujours transcrits et

assurent la vie de la cellule en attendant que les nouveaux macronoyaux prennent progressivement le relais. L'autogamie, de par son mécanisme, génère une descendance homozygote. (Marmignon, 2013).

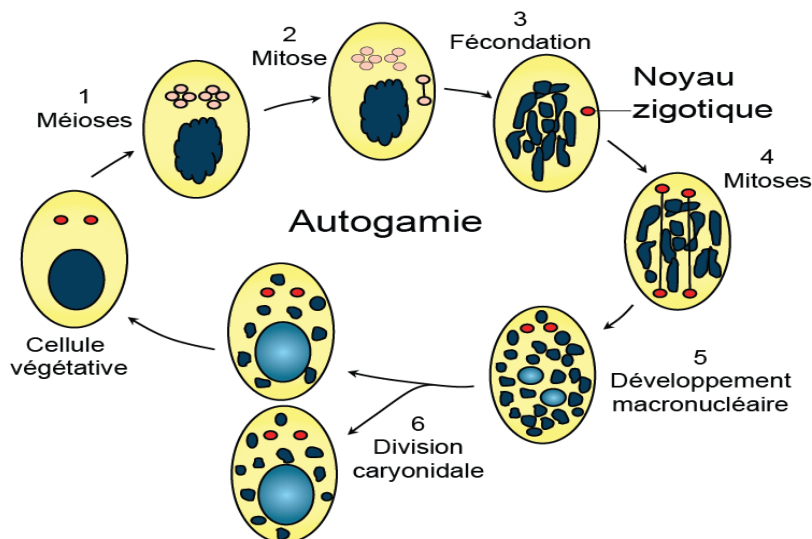


Figure 9 : L'autogamie ou l'autofécondation. (Abello, 2019).

- **Conjugaison**

L'autre mode de reproduction sexuée est la conjugaison, également induite par carence alimentaire mais impliquant des cellules ayant accumulé moins de divisions végétatives ; elles sont dites « jeunes ». (Marmignon, 2013).

La grande différence entre l'autogamie et la conjugaison est qu'il y a échange de noyaux gamétiques entre les deux cellules par un pont cytoplasmique formé au niveau des bouches. Il y a ensuite fusion entre les deux noyaux, formant un noyau zygotique diploïde non nécessairement homozygote si les deux parents possèdent des génotypes différents (figure 10). Les cellules se séparent ensuite et le reste du cycle se poursuit de manière similaire à l'autogamie. (Abello, 2019).

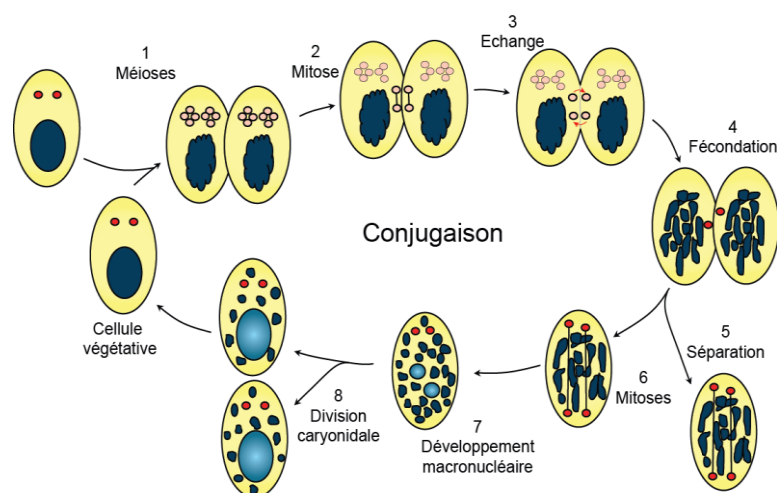


Figure 10 : La conjugaison. (Abello, 2019).

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

L'avantage majeur d'utiliser des paramécies réside dans le fait que ce sont des eucaryotes unicellulaires possédant des systèmes biologiques comparables à ceux des organismes supérieurs, tel un noyau, une mitochondrie, un cytosquelette... etc.

- Sa distribution géographique est large (Bennett et *al.*, 1992) ;
- Sa culture et sa manipulation sont simples (Taylor et *al.*, 1991)
- Leur utilisation dans le cadre de la lutte contre la pollution des milieux aquatiques puisqu'ils sont considérés comme des bio – indicateurs (Madoni, 2000 ; Dias et *al.*, 2003 ; Nola et *al.* 2003).
- Leurs cils présentent la même structure que ceux des cellules épithéliales respiratoires des mammifères (Gräf and Stahr, 1999), de plus, les battements ciliaires chez les mammifères sont parfaitement comparables à ceux de la Paramécie (Berrebbah, 1990).

9. Objectif de l'étude

L'objectif principal de cette étude est d'apporter de nouvelles connaissances relatives à la toxicité des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur deux espèces représentatives des écosystèmes aquatiques d'eau douce : *Paramecium sp* et *Daphnia magna*. A cet effet, nous avons privilégié une approche multibiomarqueurs (à différents niveaux d'organisation biologique) en étudiant les variations de plusieurs paramètres physiologiques, enzymatiques et comportementaux.

Ce manuscrit de thèse se structure en quatre chapitres. Le chapitre I est une compilation des connaissances bibliographiques sur les nanoparticules et les pesticides, le stress oxydatif et les biomarqueurs et enfin une présentation générale des deux modèles biologiques utilisés dans notre étude à savoir leur cycle de vie et leur intérêt comme modèle dans les études toxicologiques et écotoxicologiques.

Nous nous sommes focalisés dans le deuxième chapitre sur l'utilisation des deux modèles biologiques alternatifs (Paramécies et Daphnies) pour l'étude de la toxicité des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures à travers le suivi de certains paramètres physiologiques. Notre intérêt s'est porté ensuite sur un métabolisme de base chez tous les êtres vivants à savoir la respiration cellulaire en suivant le métabolisme énergétique et les modifications éventuelles pouvant survenir à la suite d'un traitement par les deux xénobiotiques et leurs combinaisons, et ce à travers la perturbation et /ou l'inhibition de la consommation d'O₂ qui est un signe avant-coureur d'un stress oxydatif.

Le troisième chapitre est consacré à l'évaluation biochimique de certains antioxydants via la mesure des principaux biomarqueurs (enzymatiques et non enzymatiques) afin de caractériser les réponses moléculaires témoignant de la présence d'un stress oxydant.

Par la suite, le quatrième chapitre présente une étude morphologique dont le but principal est la caractérisation des altérations cellulaires observées chez *Paramecium sp*, ainsi que les malformations développementales décelées chez les descendants de *Daphnia magna*, il nous a semblé crucial de s'interroger sur les effets potentiels des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur leur aspect comportemental en l'occurrence le suivi de la trajectoire de déplacement.

Enfin, le manuscrit se termine par une conclusion générale et des perspectives ayant été ouvertes par ce travail de recherche et les développements futurs à envisager.

Chapitre II : Etude physiologique et polarographique

1.Introduction

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 (Harris, 1990).

L'objectif principal de ce travail est l'étude des effets des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur la physiologie générale de deux espèces représentatives des écosystèmes aquatiques *Paramecium sp* et *Daphnia magna*.

L'autre volet de cette partie est une étude polarographique qui nous permettra de suivre les effets des deux xénobiotiques et de leurs combinaisons sur le métabolisme respiratoire qui joue un rôle clé dans la production d'énergie indispensable pour la cellule.

2.Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Les deux matériels biologiques utilisés au cours de nos études sont *Paramecium sp* et *Daphnia magna*.

2.2. Matériel chimique :

2.2.1. Les nanoparticules d'Oxyde de Cuivre (CuO) :

Le premier xénobiotique utilisé dans notre étude est l'Oxyde de Cuivre sous forme d'une poudre noire préparée et fournie par le Laboratoire de Chimie Organique des Matériaux, Université Badji Mokhtar Annaba.

Les nanoparticules d'oxyde de cuivre (CuO) sont obtenues en utilisant le broyage mécanique à haute énergie, c'est une technique très puissante pour le mélange de poudres d'éléments purs ou combinés atteignant l'échelle atomique.

Le broyage a été réalisé à partir d'une poudre élémentaire d'oxyde de cuivre (CuO) de 99.99% de pureté, en utilisant un broyeur planétaire type Pulvérisette Fritsch P7.

La vitesse de rotation utilisée du plateau est de l'ordre de 800 tr/mn. Le temps de broyage est fixé à 2 h, effectué par cycle de 30 mn suivi de 10 mn de mise au repos afin de minimiser les effets relatifs à l'augmentation de la température à l'intérieur des jarres. La valeur de la taille des nanoparticules issue de l'ajustement du diagramme de diffraction des rayons X (DRX) est de l'ordre de 20 nm.

Les caractéristiques physicochimiques sont représentées dans le tableau (2) :

Tableau 2 : Caractéristiques physicochimiques de l'Oxyde de Cuivre : (European Chemical Agency ECHA 2015)

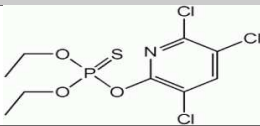
Etat physique	Solide
Apparence	Poudre cristalline
Couleur	Noire
Odeur	Aucune
pH	7
Point de fusion	1026 °C
Nom chimique	Oxyde de Cuivre
Formule brute	CuO

2.2.2. Le Chlorpyrifos

Le chlorpyrifos-éthyl O, O-diéthyl-O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate, est un insecticide non systémique, à large spectre, commercialisé par Dow AgroSciences depuis 1965. Il appartient à la famille des organophosphorés et agit au niveau du système nerveux, en inhibant l'acétylcholine estérase qui hydrolyse l'acétylcholine, neurotransmetteur majeur (Barata et *al.*, 2004 ; Buchwalter et *al.*, 2004 ; Lukaszewicz-Hussain, 2010 ; Čolović et *al.*, 2011). La formulation commerciale testée dans cette étude est le Dursban contenant 480 g/L de la molécule active.

Tableau 3 : Caractéristiques physicochimiques et structure moléculaire du Chlorpyrifos (Source : Fiche technique)

Nom chimique	(IUPAC) O, O-diéthyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate
Formule moléculaire brute	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Masse moléculaire	350,59
Solubilité dans l'eau	0,002 g/l à 20 °C.

Point de fusion	41,5 °C
La pression de vapeur du CPF	2,49 x 10 ⁻³ Pa à 25°C.
Structure moléculaire	

2.3. Méthodes

2.3.1. Culture de *Paramecium sp*

La culture de *Paramecium sp* est effectuée selon la méthode de Azzouz et *al.*, (2011). L'incubation est réalisée dans une étuve de type Memmert 400 à pH 6.5 et une température de 27±2 °C. Le repiquage des cellules est réalisé tous les trois jours afin de maintenir une bonne culture et pouvoir utiliser donc la phase exponentielle de croissance.

2.3.1.1. Traitement des paramécies

Quatre concentrations ont été choisies pour chaque xénobiotique : 30, 60, 90 et 120 mg/l pour le CuO-NPs et 0.75, 1, 1.25 et 1.5 mg/l pour le Chlorpyrifos et enfin pour la combinaison des deux xénobiotiques nous avons mixé les quatre concentrations du Chlorpyrifos (0.75, 1, 1.25, 1.5 mg/l) avec une faible concentration du CuO-NPs (30 mg/l) en utilisant cette dernière comme témoin positif.

Les tests sont conduits sur des aliquotes de 10 ml. Quatre répétitions sont maintenues pour chaque concentration en plus du témoin.

2.3.1.2. Cinétique de croissance cellulaire

La cinétique de croissance des paramécies est effectuée par comptage cellulaire quotidien jusqu'au 5^{ème} jour (120 heures) à l'aide d'un compteur manuel sous microscope optique (**Leica DM1000**) grossissement ×4.

La cinétique de croissance commence dès la mise en contact des paramécies avec les xénobiotiques.

Afin de faciliter le comptage, les cellules sont fixées au Lugol sur une lame en verre selon la méthode de Sauvant et *al.*, (1999). Le comptage est effectué au moins trois fois pour chaque répétition.

2.3.1.3. Pourcentage de réponse

Le pourcentage de réponse est obtenu selon l'équation de Wong et *al.* (1999) :

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

Où :

- N_C : Nombre des cellules témoins.
- N_E : Nombre des cellules traitées.

2.3.1.4. Détermination du temps, nombre et vitesse de génération

Le principe de calcul retenu est celui détaillé par Dias et *al.* (2003). Le temps (g), le nombre (n) et la vitesse de génération (k) sont obtenus selon les équations ci-dessous :

$$n = (\log N_t - \log N_0) / \log 2$$

$$k = n/t$$

$$g = 1/k$$

Où :

- **n** : Le nombre de génération, N_t est la population à temps t, N_0 est le nombre initial de cellules.
- **k** : Vitesse de la génération.
- **g** : Temps de génération (temps nécessaire pour qu'une population de cellule double en nombre).

2.3.2. Conditions d'élevage des daphnies

Les daphnies sont issues d'une culture continue au sein de notre laboratoire et maintenues en phase de reproduction parthénogénétique. *Daphnia magna* sont cultivées à température et photopériode constantes (20 ± 2 °C ; 16h de lumière/ 8h d'obscurité), dans un aquarium contenant environ 25L d'eau de robinet déchlorée (dureté totale : 181.8 ± 18.8 mg/L, pH 7.9 ± 0.2) (Ferrondo et *al.*, 1995). Le milieu est renouvelé deux fois par semaine et les daphnies sont nourries quotidiennement avec une mixture d'algues (*Chlorella vulgaris*) et de levures (*Saccharomyces cerevisiae*). L'oxygénation du milieu de culture est assurée par une pompe à air. (Figure 11).

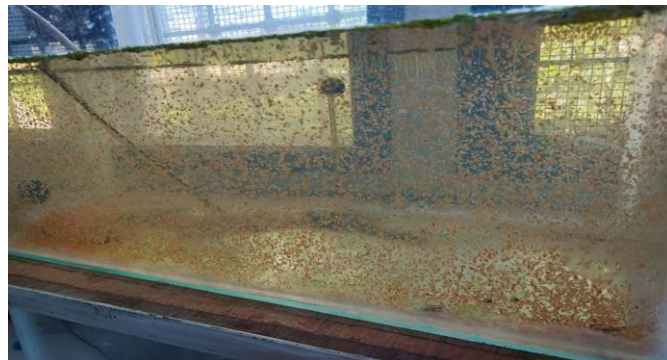


Figure 11 : Elevage de *Daphnia magna* au laboratoire

2.3.2.1. Test de toxicité aigue

Il s'agit d'un test de toxicité à court terme qui détermine la CE_{50} ou la concentration efficace qui provoque l'immobilité des jeunes daphnies (< 24 heures) au bout de 24 heures 48 heures d'exposition selon la norme ISO/DIS 6341.2 (ISO, 1996). Pour ce faire, cinq néonates moins de 24 heures sont placées dans un tube à essai contenant 10 ml de milieu ISO (Tableau 4) et la concentration de toxique voulue.

Quatre concentrations sont testées afin de cerner la concentration efficace recherchée à savoir 15, 30, 45 et 60 mg/L du CuO et 0.5, 1, 2 et 4 $\mu\text{g/L}$ du Chlorpyrifos et pour la combinaison des deux xénobiotiques nous avons mixé les quatre concentrations du Chlorpyrifos (0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{g/l}$) avec une faible concentration du CuO (15 mg/l) en utilisant cette dernière comme témoin positif. Six répétitions pour chaque concentration ainsi que pour le témoin. Durant ce test, les jeunes daphnies ne sont pas nourries et sont placées à l'abri de la lumière et elles sont considérées comme immobiles si elles ne se déplacent plus après 15 secondes suite à une légère agitation du tube, et cela même si elles agitent leurs antennes. Le test est validé si, et seulement si, le pourcentage d'immobilisation dans les témoins est inférieur ou égal à 10%.

Tableau 4 : Composition chimique de l'eau de dilution ISO/DIS 6341.2 (ISO, 1996)

	Eléments Chimiques	Quantités (g/L)
Solution 1	Chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	11,76
Solution 2	Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4,93
Solution 3	Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3)	2,59
Solution 4	Chlorure de potassium (KCl)	0,23

L'eau de dilution est constituée de 25 ml de chacune des quatre solutions 1 à 4 et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée. Ainsi, il doit être aérée jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous ait atteint la valeur de saturation dans l'air et jusqu'à stabilisation du pH ($7,8 \pm 0,2$).

2.3.2.2. Calcul du taux d'immobilisation (24h/48h)

La réponse des daphnies aux différentes concentrations de CuO, du Chlorpyrifos et de leur mixture est obtenue par le calcul du pourcentage d'inhibition de la mobilité après 24 heures et 48 heures d'exposition selon l'équation suivante :

$$IM\% = [N_0 - N_i / N_0] \times 100$$

Où :

- **IM** : Pourcentage d'inhibition de la mobilité (24h/48h) ;
- **N₀** : Nombre de daphnies mises en essai ;
- **N_i** : Nombre de daphnies immobiles en fin d'essai.

2.3.2.3. Détermination de la concentration effective (CE₅₀)

La concentration effective moyenne (CE₅₀) qui induit l'immobilisation de 50% des daphnies après 24 heures et 48 heures d'exposition à la molécule testée (CE₅₀/24 heures ; CE₅₀/48 heures) est calculée par la méthode Probit (Finney. 1978).

2.4. Mesure de l'activité respiratoire

2.4.1. Principe du dosage

La consommation d'Oxygène est mesurée au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire selon la méthode de Djebbar et Djebbar (2000) grâce à un oxygraphe à électrode (Hansatech Instrument). L'activité respiratoire est mesurée par simple adjonction d'une paramécie ou une daphnie avec leur milieu de culture à un volume total de 1.5 ml. Le traitement des paramécies se fait au 4^{ème} jour de la croissance (fin de la phase exponentielle). Les signaux enregistrés par l'électrode sont recueillis à l'aide d'un ordinateur équipé d'une carte d'acquisition et traités grâce au logiciel Oxygraphe (Hansatech Instrument). La quantité d'Oxygène consommée est exprimée en nmol d'O₂/ ml.

2.5. Analyses statistiques :

L'analyse statistiques des données est effectuée par le test *t* de Student qui sert à comparer entre deux échantillons (Témoin et traité). Ce test est réalisé à l'aide d'un logiciel d'analyse des données : Minitab (Version 16.0).

Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p \leq 0.05$ (*) ; hautement significatives lorsque $p \leq 0.01$ (**) ; très hautement significatives lorsque $p \leq 0.001$ (***) .

3. Résultats

3.1. Cas de *Paramecium sp*

3.1.1. Effets des Nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons sur la cinétique de croissance de *Paramecium sp*

Les figures 12, 13 et 14 illustrent l'évolution de la courbe de croissance des paramécies en fonction du temps après traitement avec les différentes concentrations des deux xénobiotiques et leurs combinaisons.

- Cas des Nanoparticules de CuO

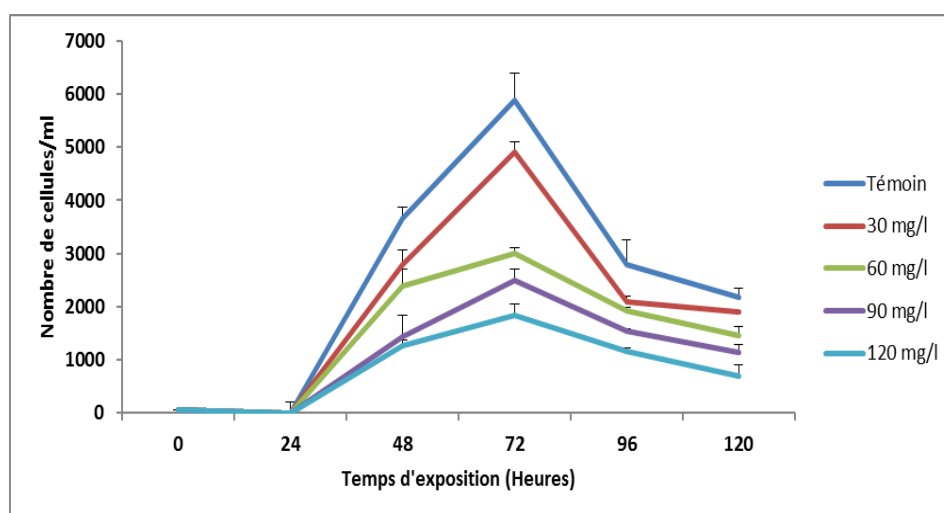


Figure 12 : Effets des Nanoparticules de CuO sur la croissance de *Paramecium sp*

Nos résultats mettent en évidence une inhibition de la croissance des cellules traitées par rapport aux cellules témoins et cela d'une manière dose-dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$) spécialement pour les deux plus fortes concentrations au cinquième jour du traitement. En effet, on note une différence de près de 1500 cellules entre les cellules témoins et celles traitées par la plus forte concentration (120 mg/l) au 5^{ème} jour de traitement.

• Cas du Chlorpyrifos

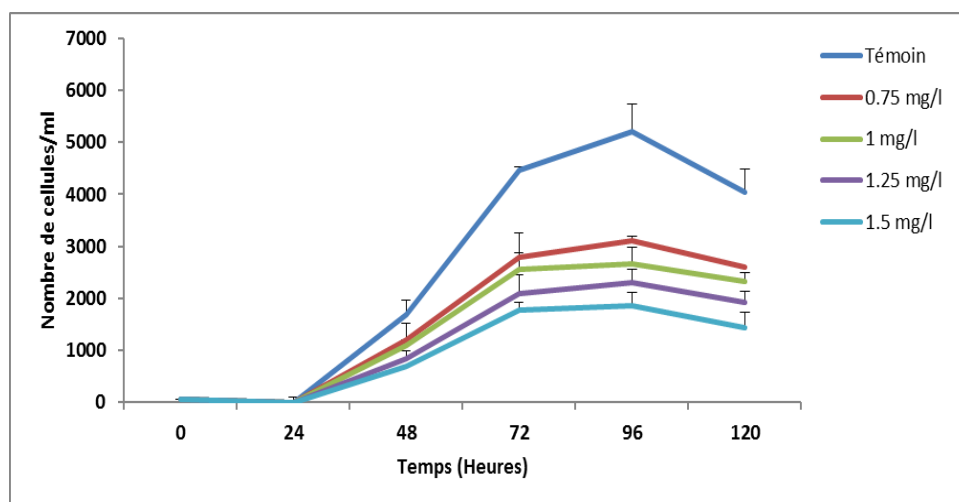


Figure 13 : Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur la croissance de *Paramecium sp*

Concernant l'évolution de la croissance chez les cellules exposées au Chlorpyrifos, nous constatons également une inhibition de la croissance dès 48h de traitement (Figure 13), cette inhibition est plus prononcée pour la plus forte concentration, à savoir 1.5 mg/l, où le nombre de cellules n'est que 700 cellules/ml comparé aux témoins (1700 cellules/ml).

➤ Cas de la combinaison CuO/Chlorpyrifos

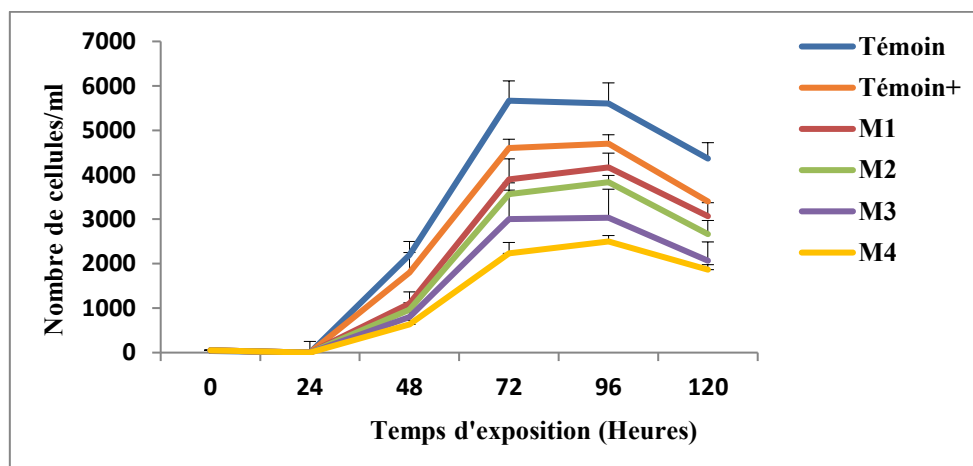


Figure 14 : Effets de la combinaison CuO/Chlorpyrifos sur la croissance de *Paramecium sp*.

La figure (14) illustre l'effet en fonction du temps et des concentrations croissantes des mixtures de CuO/Chlorpyrifos sur la cinétique de croissance de *Paramecium sp*. Ainsi, nous remarquons une inhibition significative ($p \leq 0.05$) dès 48 heures de traitement, cette inhibition

est plus prononcée pour la plus forte concentration M4 (30 mg/l CuO-NPs + 1.5 mg/l CPF) , ou le nombre de cellules n'est que de l'ordre de 640 cellules/ml comparé aux témoins (2200 cellules/ml).

3.1.2. Pourcentage de réponse

Le pourcentage de réponse est calculé pour chaque traitement. Les résultats obtenus confirment ceux de la cinétique de croissance. Ainsi, l'effet inhibiteur est dose-dépendant et proportionnel aux concentrations des xénobiotiques (Figures 15, 16 et 17).

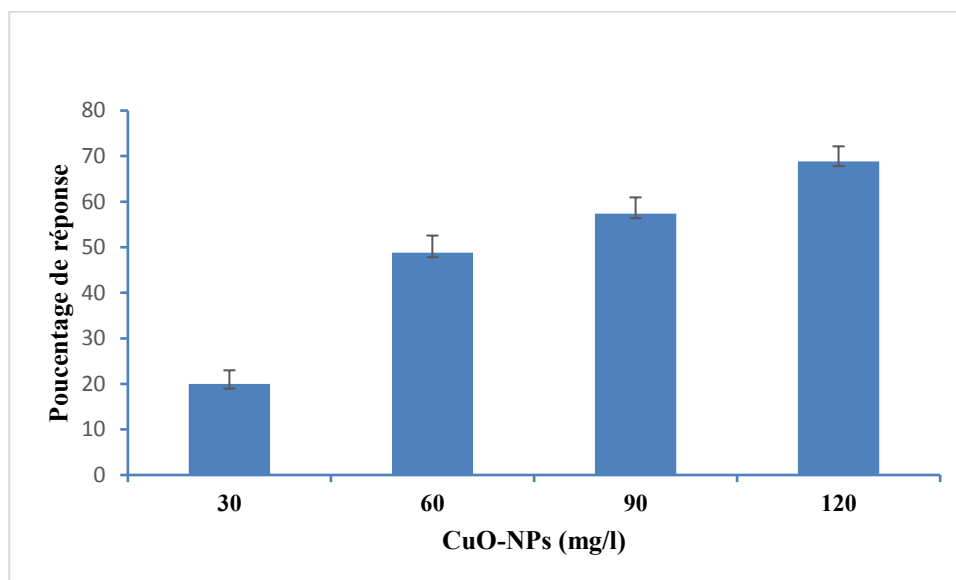


Figure 15 : Evolution du pourcentage de réponse chez *Parametium sp.* exposées aux concentrations croissantes de nanoparticules de CuO

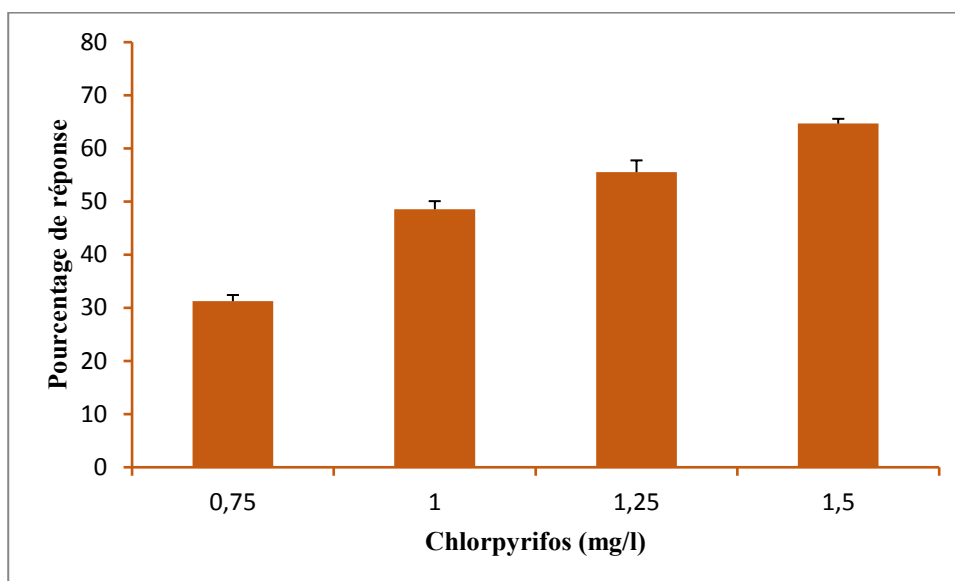


Figure 16 : Evolution du pourcentage de réponse chez *Paramecium sp* exposées aux concentrations croissantes de Chlorpyrifos.

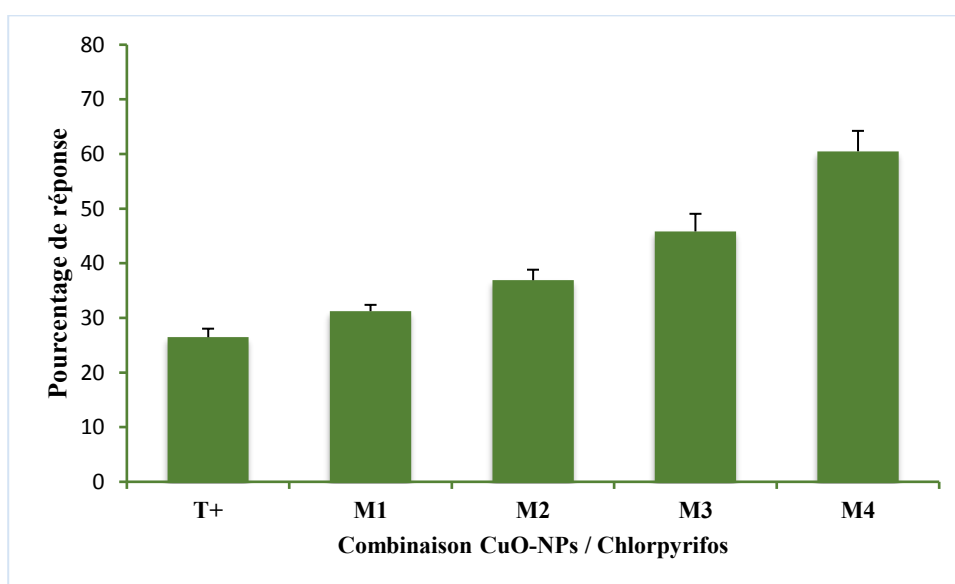


Figure 17 : Evolution du pourcentage de réponse chez *Paramecium sp* exposées aux concentrations croissantes de la combinaison CuO-NPs/ Chlorpyrifos.

3.1.3. Détermination du nombre, temps et vitesse de génération de *Paramecium sp*

Les tableaux 5, 6 et 7 regroupent les résultats relatifs au nombre, au temps et à la vitesse de génération des paramécies.

Tableau 5 : Effets de Nanoparticules de CuO sur le nombre de génération (n), le temps de génération (g) et la vitesse de génération (k) de *Paramecium sp*.

CuO-NPs mg/L	Nombre de génération (n) ± ET	Temps de génération (g) ± ET	Vitesse de génération (k) ± ET
Témoin	6.60 ± 0.08	10.90 ± 0.13	0.0917 ± 0.0011
30	6.28 ± 0.06	11.45 ± 0.12	0.0873 ± 0.0008
60	5.64 ± 0.03	12.76 ± 0.07	0.0783 ± 0.0004
90	5.37 ± 0.07	13.39 ± 0.19	0.0746 ± 0.0010
120	4.92 ± 0.12	14.64 ± 0.38	0.0683 ± 0.0017

Tableau 5 : Effets de Chlorpyrifos sur le nombre de génération (n), le temps de génération (g) et la vitesse de génération (k) de *Paramecium sp*.

Chlorpyrifos mg/L	Nombre de génération (n) ± ET	Temps de génération (g) ± ET	Vitesse de génération (k) ± ET
Témoin	7.46 ± 0.15	12.87 ± 0.27	0.0777 ± 0.0016
0.75	6.92 ± 0.12	13.88 ± 0.25	0.0720 ± 0.0013
1	6.49 ± 0.13	14.87 ± 0.30	0.0676 ± 0.0013
1.25	6.28 ± 0.11	15.28 ± 0.28	0.0654 ± 0.0012
1.5	5.97 ± 0.14	16.08 ± 0.38	0.0622 ± 0.0014

Tableau 7 : Effets de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos sur le nombre de génération (n), le temps de génération (g) et la vitesse de génération (k) de *Paramecium sp.*

CuO-NPs/CPF	Nombre de génération (n) ± ET	Temps de génération (g) ± ET	Vitesse de génération (k) ± ET
Témoin	8.13± 0.11	11.80± 0.17	0.0847 ± 0.0012
Témoin+	7.96± 0.10	12.48± 0.17	0.0801 ± 0.0011
M1	7.59± 0.12	12.64± 0.21	0.0790 ± 0.0013
M2	7.47± 0.07	12.85± 0.12	0.0778 ± 0.0007
M3	7.20± 0.22	13.35± 0.40	0.0750 ± 0.0022
M4	6.79± 0.15	14.14± 0.31	0.0707± 0.0015

Il ressort que l'évolution du nombre de génération et de la vitesse de génération sont inversement proportionnelles aux concentrations testées, Le temps de génération, quant à lui, augmente progressivement et de manière dose-dépendante par rapport aux témoins pour les trois traitements. Cet effet est plus marqué chez les populations exposées aux CuO-NPs, où le temps de génération moyen passe de 10.90 heures à 14.64 heures pour la plus forte concentration.

3.2. Cas de *Daphnia magna*

3.2.1. Taux d'immobilisation de *Daphnia magna* après exposition aux nanoparticules de CuO, au Chlorpyrifos et à leurs mixtures (24/48h)

Les résultats concernant le taux d'immobilisation de *Daphnia magna* après 24 et 48 heures d'exposition aux nanoparticules de CuO, de Chlorpyrifos et de leurs mixtures sont représentés dans les figures 18, 19 et 20.

Nous remarquons que le taux d'immobilisation des néonates tend à augmenter de manière dose dépendante pour les trois traitements, cette augmentation est :

- Très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les traitées par la plus forte concentration des nanoparticules de CuO après 48 heures d'exposition par rapport aux témoins.
- Très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les traitées par la plus forte concentration du Chlorpyrifos après 48 heures d'exposition par rapport aux témoins.

- Très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les traitées par les deux plus fortes concentrations des mixtures M3 et M4 après 48 heures d'exposition par rapport aux témoins.

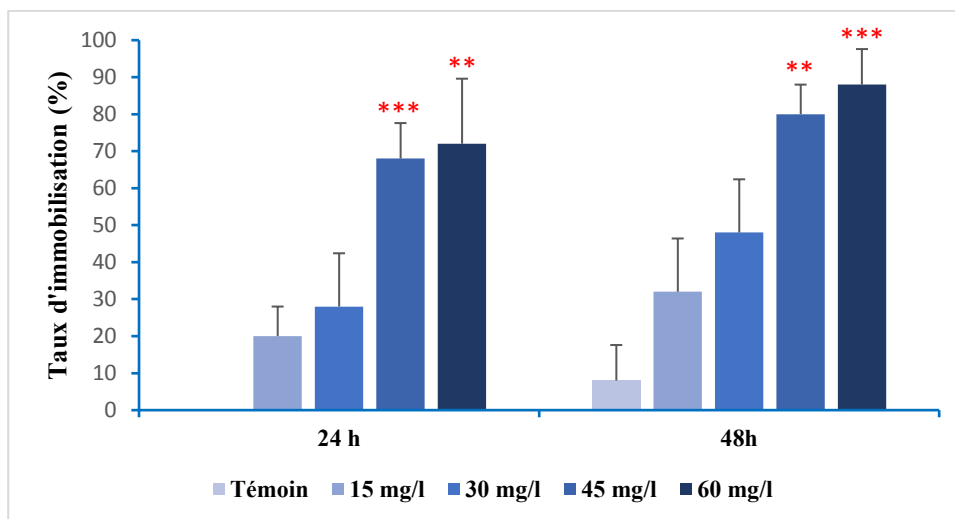


Figure 18 : Taux d'immobilisation enregistré chez *Daphnia magna* exposée pendant 24 et 48 heures aux concentrations croissantes de nanoparticules de CuO

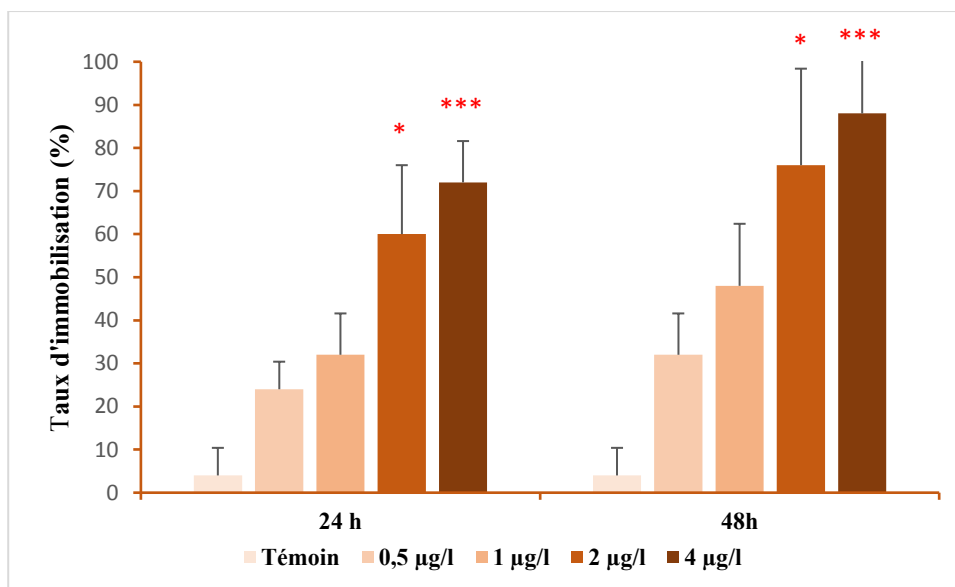


Figure 19 : Taux d'immobilisation enregistré chez *Daphnia magna* exposée pendant 24 et 48 heures aux concentrations croissantes de Chlorpyrifos

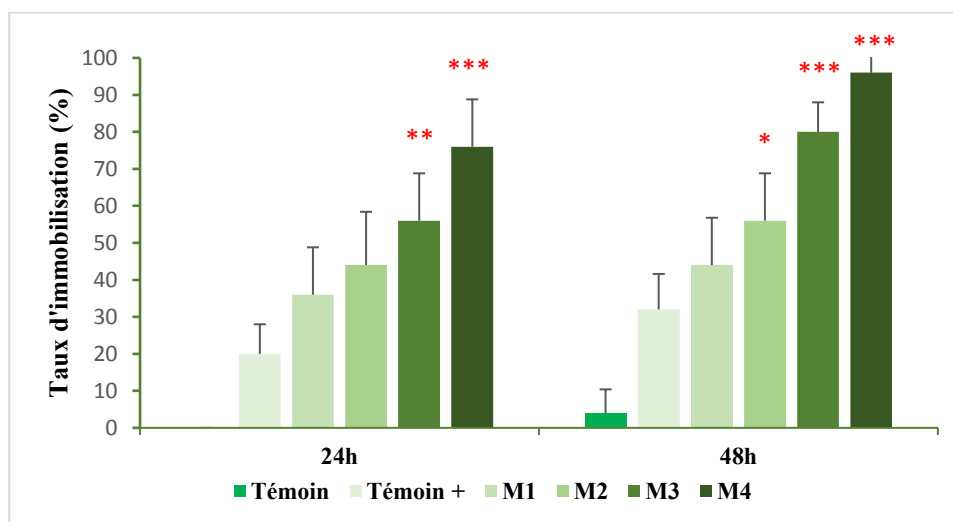


Figure 20 : Taux d'immobilisation enregistré chez *Daphnia magna* exposée pendant 24 et 48 heures aux concentrations croissantes des mixtures CuO-NPs/Chlorpyrifos.

3.2.2. Détermination de la concentration effective CE₅₀ (24/48h)

Les concentrations effectives moyennes qui causent 50% d'immobilisation des néonates (CE₅₀) ont été calculées par la méthode de Probit.

Tableau 8 : Concentrations Effectives moyennes (CE₅₀) mesurées Chez *Daphnia magna* après 24 et 48 heures de traitement.

	CE ₅₀ (24h)	CE ₅₀ (48h)
CuO-NPs	36.06 mg/l	24.47 mg/l
CPF	1.65 µg/l	0.91 µg/l

3.3. Effets des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur le métabolisme respiratoire

3.3.1. Chez *Paramecium sp*

L'effet du traitement par les concentrations croissantes de nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur le métabolisme respiratoire de *Paramecium sp* est illustré dans les figures 21, 22 et 23.

• Cas de nanoparticules de CuO

Nous constatons une stimulation du métabolisme respiratoire (Figure 21). En effet, le taux d'oxygène passe de 28 nmol/ml à 4.7 nmol/ml et à 3.4 nmol/ml respectivement pour les concentrations 90 mg/l et 120 mg/l, comparés au témoin où la consommation d'oxygène passe de 28 nmol/ml à 7.2 nmol/ml.

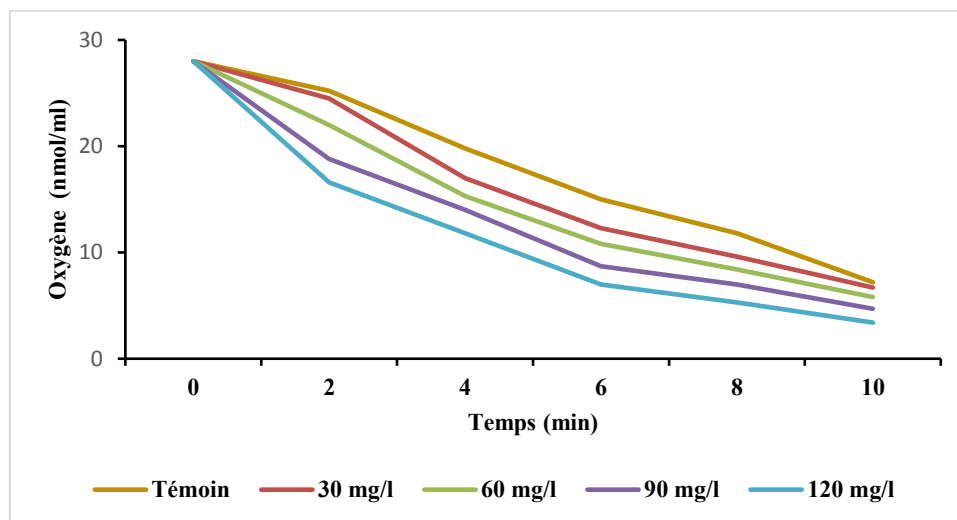


Figure 21 : Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes de nanoparticules de CuO chez *Paramecium sp.*

• Cas de Chlorpyrifos

Nous constatons que *Paramecium sp* témoin consomme l'oxygène d'une manière régulière et continue, chez les traitées par contre, nous notons une inhibition dose dépendante du métabolisme respiratoire. En effet, la consommation d'oxygène passe de 26 (nmol/ml) ($t=0$ min) à seulement 13.9 (nmol/ml) et à 20.2 (nmol/ml) ($t=10$ min) pour les paramécies exposées aux deux plus fortes concentrations de Chlorpyrifos (1.25 et 1.5 mg/l), respectivement. (Figure 22).

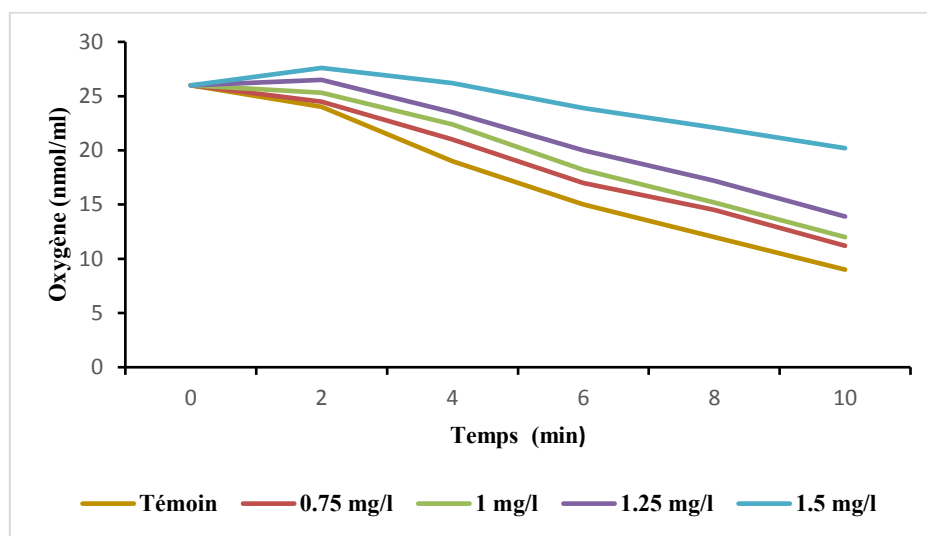


Figure 22 : Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes de Chlorpyrifos chez *Paramecium sp.*

- **Cas de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos**

Nous observons une induction dose-dépendante de l'activité respiratoire. En effet, la quantité d'oxygène consommée est élevée comparativement au témoin, spécialement à la plus forte concentration M4 où nous enregistrons un taux de l'ordre de 18.9 nmol/ml alors que chez le témoin il n'est que de 11.5 nmol/ml après 10 min. (figure 23).

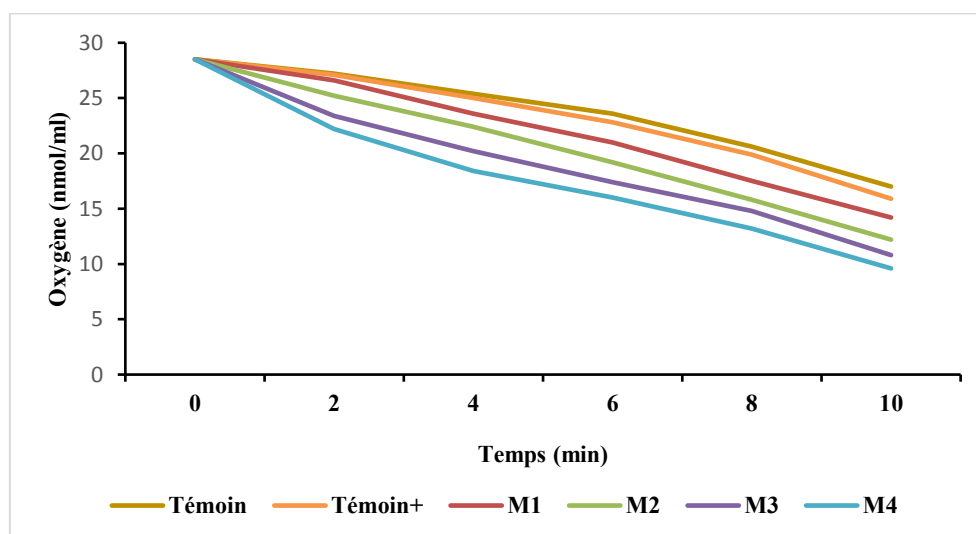


Figure 23 : Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes des mixtures chez *Paramecium sp.*

3.3.2. Chez *Daphnia magna*

Les figures 24, 25 et 26 illustrent les variations de l'activité respiratoire de *Daphnia magna* témoin et traitée avec les différentes concentrations des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures.

- **Cas de nanoparticules de CuO**

Nous notons une inhibition dose-dépendante de la consommation d'oxygène des daphnies traitées aux concentrations croissantes de nanoparticules de CuO par rapport au témoin, Ainsi, la quantité d'oxygène consommée est de 13.5 nmol/ml ($T_{0\min} - T_{8\min}$) chez le témoin alors que chez *Daphnia magna* traitée par la plus forte concentration (60 mg/l) elle n'est que de (1 nmol/ml) après 8 min. (figure 24).

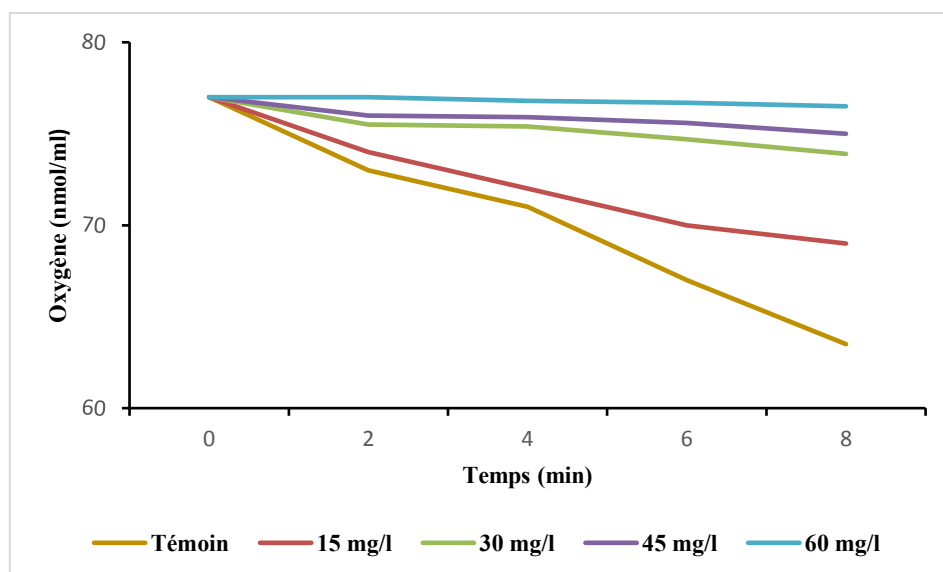


Figure 24 : Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes de nanoparticules de CuO chez *Daphnia magna*.

- **Cas de Chlorpyrifos**

Nous remarquons que le métabolisme respiratoire du témoin présente une respiration régulière avec une consommation normale d'O₂. Par contre, chez les traitées aux concentrations croissantes du Chlorpyrifos (0.5 ; 1 ; 2 et 4 µg/l) la consommation d'oxygène diminue d'une

manière dose-dépendante, elle est d'environ (4, 3, 2 et 1 nmol/ml) respectivement après 8 min. (figure 25).

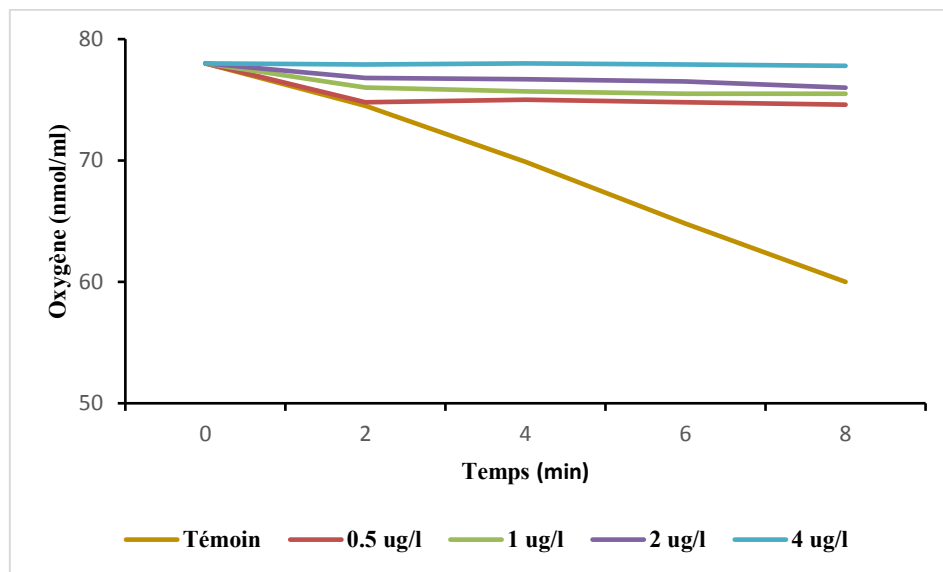


Figure 25 : Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes de Chlorpyrifos chez *Daphnia magna*.

- **Cas de la combinaison CuO/Chlorpyrifos**

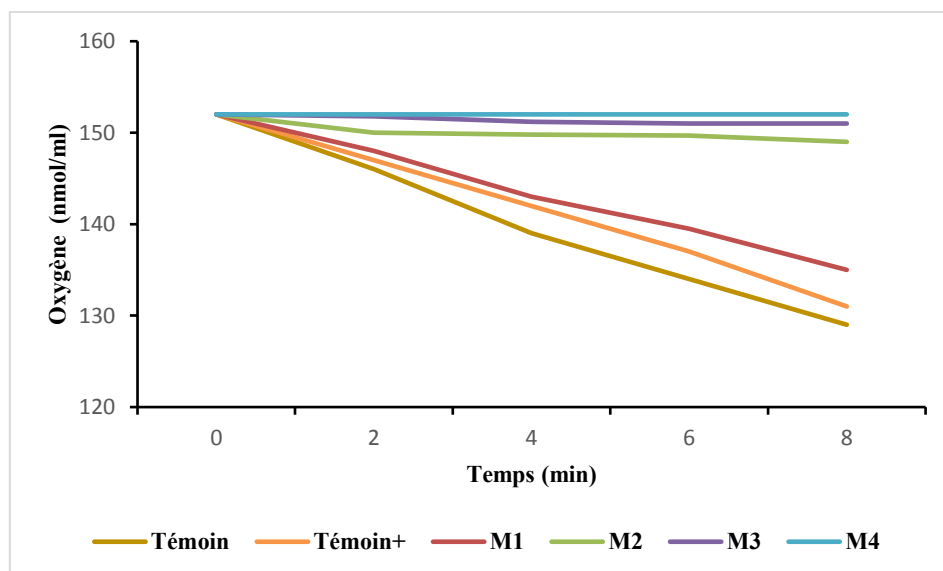


Figure 26 : Variation du métabolisme respiratoire en présence de concentrations croissantes des mixtures chez *Daphnia magna*.

Nous constatons que le métabolisme respiratoire du témoin est régulier et continu avec une consommation normale d'O₂. Chez les traités par contre, nous notons une inhibition dose

dépendante du métabolisme respiratoire. En effet, la consommation d'oxygène est quasiment nulle chez les daphnies exposées aux plus fortes concentrations M2, M3 et M4. (Figure 26).

4. Discussion

La surveillance de la contamination chimique dans un écosystème ne permet pas d'évaluer son impact sur les organismes, les populations et les communautés constitutives. La réponse des organismes à la contamination en termes d'effets sublétaux, ne peut être évaluée que par des mesures de paramètres biologiques, physiologiques ou biochimiques. (Arrab, 2004).

Pour une première appréciation de l'effet d'un xénobiotique, le suivi de la cinétique de croissance est un excellent bioindicateur d'une éventuelle toxicité. En effet, toute perturbation de la croissance (inhibition ou stimulation) reflète l'état du métabolisme de la cellule. Plusieurs travaux

L'exposition des paramécies aux concentrations sublétales des nanoparticules de CuO, de Chlorpyrifos et de leurs combinaisons induit une déplétion importante du nombre de cellules. Cette inhibition de la croissance est observée dès les plus faibles concentrations pour chaque traitement. Ceci nous amène à confirmer l'influx des xénobiotiques à l'intérieur des cellules, malgré la présence de la paroi cellulaire qui constitue une barrière contre l'entrée massive des xénobiotiques mais qui reste néanmoins perméable (Beaumont et Cassier, 1998 ; Benbouzid, 2012), et par conséquent, l'inhibition spécifique de la synthèse des acides gras, éléments essentiels pour la croissance et le fonctionnement cellulaire : il en résulte une déstabilisation de la structure cellulaire et une altération de la fluidité membranaire conduisant inévitablement à la mort de la cellule (Moumni, 2016).

Des résultats similaires ont été rapportés par Mortimer et *al.* (2010) ; Bouarroudj et *al.* (2016) qui ont mis en évidence l'effet inhibiteur des nanoparticules de CuO, SnO₂ sur la croissance et la prolifération cellulaire de *Tetrahymena termophila* et *Paramecium tetraurelia*.

Xia et *al.* (2008) ont étudié la toxicité des nanoparticules de ZnO en utilisant des cultures de cellules de mammifères et ont également confirmé que la dissolution du ZnO en ions Zn²⁺ perturbe les cellules entraînant des lésions lysosomales et mitochondriales conduisant à la fin à la mort cellulaire.

Il en est de même concernant les travaux de Sbartaï et *al.* (2012) ; Weijie et *al.* (2018) sur l'effet du Bifenazate et du Chlorpyrifos sur *Paramecium sp* et *Urostyla grandis*.

Les résultats concernant les cinétiques de croissances sont confirmés, d'une part, par la diminution du nombre de génération, le ralentissement de la vitesse de génération ainsi que l'augmentation du temps de génération ce qui signifie que la prolifération et le métabolisme cellulaire sont affectés (Mortuza et *al.*, 2003 ; Cherait et *al.*, 2013). D'autre part, les valeurs positives du pourcentage de réponse démontrent l'effet inhibiteur des deux xénobiotiques et de leurs combinaisons. En effet, ils sont capables de pénétrer dans le milieu interne de la cellule, de perturber l'orientation des phospholipides et de provoquer des changements dans la fluidité membranaire (Amamra, 2015).

Dans un second temps, nous nous sommes penchés sur l'évaluation de la toxicité aiguë des nanoparticules de CuO, de Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur le microcrustacé *Daphnia magna* à travers la détermination du taux d'immobilisation ainsi que la concentration inhibitrice de la mobilité (CE₅₀)

Dans ce travail, nous avons mis en évidence une augmentation de l'immobilisation des daphnies traitées par les concentrations croissantes de nanoparticules de CuO, de Chlorpyrifos et de leurs mixtures par rapport aux témoins. Ainsi, la CE₅₀ est de l'ordre de 36.06 mg/l et 24.47 mg/l pour les nanoparticules de CuO et 1.65 µg/l et 0.91 µg/l pour le Chlorpyrifos pour les durées d'exposition 24 et 48 heures respectivement.

Les valeurs de la CE₅₀ ont été obtenues pour les algues, crustacés, poisson, bactéries, levures, nématodes, protozoaires et lignées cellulaires de mammifères. En règle générale, les crustacés, les algues et les poissons sont les plus sensibles aux nanoparticules. Les valeurs médianes de la CE₅₀ de Ag-NPs, de CuO-NPs et de ZnO-NPs (mg/l) sont de 0,01, 2,1 et 2,3 pour les crustacés ; 0,36, 2,8 et 0,08 pour les algues ; et 1,36, 100 et 3,0 pour les poissons respectivement. De manière surprenante, les nanoparticules sont moins toxiques pour les bactéries que pour les organismes aquatiques : les valeurs de la CE₅₀ pour les bactéries étaient respectivement de 7,1, 200 et 500 mg/l pour Ag-NPs, CuO-NPs et ZnO-NPs. En comparaison, la CE₅₀ pour les cellules de mammifères étaient de 11,3, 25 et 43 mg/L. (Bondarenko et *al.*, 2013). Weijie et *al.* (2018) fixent la CL₅₀ à 24h chez *Urostylea grandis* exposée au Chlorpyrifos et au Diméthoate à 0.029 mg/l et 0,0685 mg/l respectivement. De plus, Moumni (2017) a observé que la CE₅₀ à 24 et 48 h était respectivement de 1.05 mg/l et 0.31 mg/l pour *Daphnia magna* exposée au Cycloxydime (Herbicide). Nos résultats confirme la sensibilité de *Daphnia magna* vis-à-vis des deux xénobiotiques testés.

Le métabolisme respiratoire est un excellent indicateur du fonctionnement du système respiratoire mitochondrial et un bon outil d'évaluation de la cytotoxicité. (Haubenstricker et *al.*, 1990). Nos résultats montrent que l'exposition de *Paramecium sp* et *Daphnia magna* aux concentrations croissantes de nanoparticules de CuO, de Chlorpyrifos et de leurs mixtures provoque une perturbation du métabolisme et plus précisément des échanges gazeux, en effet, nous avons constaté une perturbation du métabolisme respiratoire chez les deux modèles biologiques étudiés. Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Moumni, (2017) chez *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* exposées au Cycloxydime (herbicide), de même que pour Khene, (2020) chez *Helix aspersa* suite à une exposition aux nanoparticules de TiO₂, ou encore avec le poisson zèbre *Danio rerio* après exposition aux nanoparticules d'Argent (Dominique et *al.*, 2011).

Ces résultats témoignent d'une altération du métabolisme respiratoire. En effet, les radicaux libres générés par les xénobiotiques ont le potentiel de perturber la respiration cellulaire via la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriales et l'altération de l'activité des ATPases soit en l'intensifiant ou au contraire en la réduisant dans le cas où les xénobiotiques dénaturent leur structure et leur fonctionnement ou si le stress est intense ou prolongé ou bien simplement si les cellules réduisent leur métabolisme pour s'acclimater au stress (Amamra, 2015)

Djekoun, (2016) ; Boulassel, (2012) suggèrent l'hypothèse qu'une fois le xénobiotique à l'intérieur de la cellule, le système de défense cellulaire est déclenché à travers l'induction des enzymes de détoxification, en particulier les Monooxygénases à Cytochrome P450 qui interviennent durant la phase I de la métabolisation des xénobiotiques par l'introduction d'un atome d'oxygène au niveau du xénobiotique pour le rendre polaire et donc faciliter son élimination. Ces mécanismes se traduisent par un effet stimulateur et/ou inhibiteur du fonctionnement mitochondrial par la stimulation et/ou l'inhibition de la synthèse ou l'oxydation de l'ATP. Selon Almofti et *al.* (2003), les nanoparticules d'argent (Ag-NPs) perturbent les mitochondries par des interactions avec des groupements thiol dans sa membrane interne. Il est bien connu que la chaîne respiratoire mitochondriale elle-même est vulnérable aux dommages causés par les ROS, qui peuvent agir en oxydant des groupements sulfhydryles d'enzymes au sein de la chaîne (Adam-Visi, 2005 ; Vavarro et *al.*, 2007). De plus, les nanoparticules d'argent peuvent endommager les cellules en oxydant les groupements thiol d'importantes protéines membranaires cellulaires, ce qui modifie la perméabilité membranaire et perturbent les fonctions mitochondriales, ainsi qu'en épuisant les mécanismes de défense antioxydants, ce qui entraîne un stress oxydatif (Yacobi et *al.*, 2007 ; Costa et *al.*, 2010).

5. Conclusion

Au terme de ce chapitre, nous pouvons conclure que *Paramecium sp* et *Daphnia magna* sont sensibles à une pollution par les nanoparticules de CuO, de Chlorpyrifos et de leurs mixtures. Cette sensibilité s'est manifestée par des altérations au niveau des systèmes physiologiques des deux modèles biologiques étudiés à travers l'inhibition de la croissance de la population des paramécies et l'augmentation du taux d'immobilisation des daphnies comparativement aux témoins. Ces altérations semblent plus prononcées que ceux des deux composés seuls ce qui témoigne de la dangerosité et la toxicité des mixtures des polluants sur les organismes non cibles.

L'étude polarographique a révélé que la consommation d'oxygène semble perturbée chez les deux espèces aquatiques traités par rapport aux témoins ce qui confirme l'effet des nanoparticules de CuO et/ou le Chlorpyrifos sur la chaîne respiratoire mitochondriale.

Chapitre III : Etude du Stress Oxydant

1.Introduction

Par définition, les biomarqueurs peuvent être mesurés à différents niveaux d'organisations biologiques (molécules, cellules, individu, population), ce qui leur confère le caractère intégrateur de l'ensemble de la cascade d'évènements qui suit l'exposition à une pollution (Vasseur & Cossu-Leguille, 2003).

Les biomarqueurs utilisés à l'échelle sub-individuelle, peuvent fournir des informations sur les stratégies / mécanismes moléculaires et cellulaires qu'un organisme développe pour faire face aux effets néfastes de l'exposition aux xénobiotiques. Cet aspect préventif leur permet donc de diagnostiquer de façon précoce des dysfonctionnements physiologiques de l'individu, c'est-à-dire avant que des dommages tissulaires ou des effets néfastes sur les principales fonctions biologiques ne soient détectables (Van der Ost et *al.*, 2003). Les biomarqueurs ont été proposés par plusieurs auteurs comme un outil fiable dans les études de biosurveillance qualitative et quantitative de l'exposition à différents agents agresseurs de l'environnement (Viarengo et *al.*, 2007 ; Tlili, 2012).

L'objectif principal de ce chapitre est la mise en évidence de la toxicité des deux xénobiotiques testés et de leurs combinaisons et du rôle joué par certains paramètres biochimiques et ceci à travers le suivi des activités de biomarqueurs enzymatiques et non-enzymatiques les plus impliqués dans les mécanismes de défense antioxydante contre le stress oxydatif.

2. Matériel et méthodes

2.1. Mesure de l'activité Superoxyde dismutase (SOD)

L'activité SOD est par la méthode de Paoletti et *al.* (1986), la mesure se fait par suivi à 340 nm de la réaction d'oxydation du NADH à 25°C à pH = 7.6. Cette réaction résulte indirectement de la production de $O_2^{\cdot-}$ générés par la mise en présence de EDTA/Mn et de β -mercaptoéthanol. La réduction du β -mercaptoéthanol oxydé est associée à l'oxydation du NADH.

L'oxydation du NADH est diminuée en présence d'agents compétitifs vis-à-vis de $O_2^{\cdot-}$ comme la SOD. La concentration en SOD dans le milieu peut donc être évaluée par mesure de l'inhibition de l'oxydation du NADH.

L'activité SOD est exprimée en Unité/ mg de protéines.

2.2. Mesure de l'activité Catalase (CAT)

La mesure de l'activité Catalase est déterminée selon la méthode de Clairborne (1985). Elle repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du H₂O₂. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée et la décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant 30 secondes (lecture toutes les 15 secondes) à une longueur d'onde de 240 nm.

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

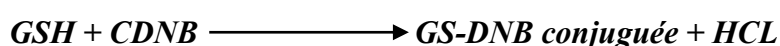
$$CAT (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO}{0.040 * \text{mg de protéines}}$$

Où :

- ΔDO : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- **0.040** : Coefficient d'extinction de l'eau oxygénée.
- **mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg.

2.3. Mesure de l'activité Glutathion-S-Transférase (GST)

La mesure de l'activité Glutathion-S-Transférase est déterminée selon la méthode de Habig et al. (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH).



La lecture d'absorbance est faite à une longueur d'onde égale à 340 nm.

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

Où :

- ΔDO : Densité optique
- V_t : Volume total de la cuve
- e : Coefficient d'extinction molaire du CDNB (9.6 mM⁻¹ cm⁻¹)
- V_s : Volume du surnageant (0.2 ml)
- **mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg

2.4. Dosage du glutathion (GSH)

Le taux du Glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de Weckberker et Cory (1988), dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5-mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5' -dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm. Les résultats sont exprimés en (μmol/mg de protéines)

La teneur en GSH est obtenue par l'équation suivante :

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

Où :

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

2.5. Dosage du taux du Malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique est estimée par la quantification du taux de MDA selon la méthode de Draper et Hadley (1990) dont le principe repose sur la condensation du Malondialdéhyde et l'acide thiobarbiturique (TBA) (Figure 27). Ces deux molécules donnent naissance à un produit rouge brun.

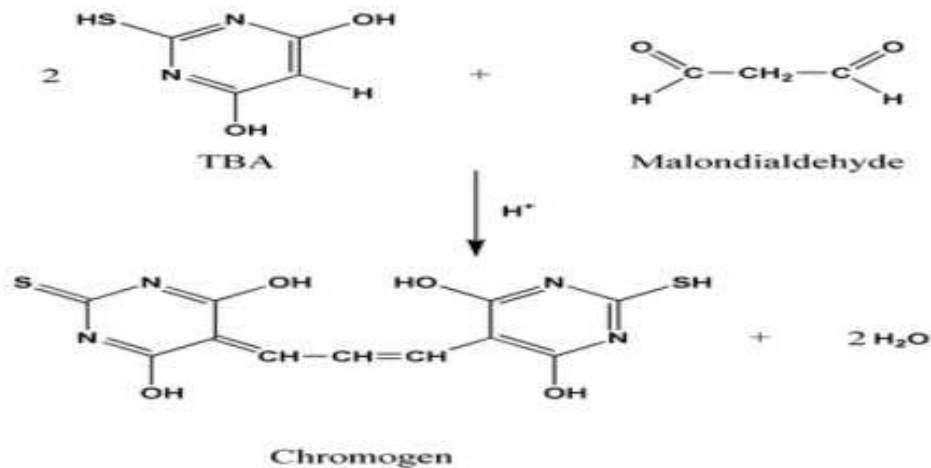


Figure 27 : La réaction entre le TBA et le MDA.

La lecture des absorbances sera effectuée à une longueur d'onde de 532 nm au spectrophotomètre (JENWAY 6300). La concentration du MDA est déterminée selon la formule suivante :

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

Où :

- **DO** : Densité Optique
- **V_t** : Volume total de la cuve (1 ml)
- **e** : Coefficient d'extinction du TBA (156 mM⁻¹ cm⁻¹)
- **V_s** : Volume du surnageant (0.5 ml)
- **mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg

2.6. Analyses statistiques

L'analyse statistique des données est effectuée par le test *t* de Student. Ce test est réalisé à l'aide d'un logiciel d'analyse des données : Minitab Version 16.0.

3. Résultats

3.1. Effets des Nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons sur la variation de l'activité Superoxyde Dismutase (SOD)

3.1.1. Chez *Paramecium sp*

- Cas des Nanoparticules de CuO

La figure (28) met en évidence une induction de l'activité SOD dès la plus faible concentration (30 mg/l), cette induction est très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les cellules traitées par la plus forte concentration (120 mg/l) par rapport aux témoins. En effet, nous notons une activité enzymatique d'environ 8.53 U/mg de protéines chez les paramécies témoins tandis que pour les traitées par la concentration 120 mg/l, elle atteint 69.56 U/mg de protéines.

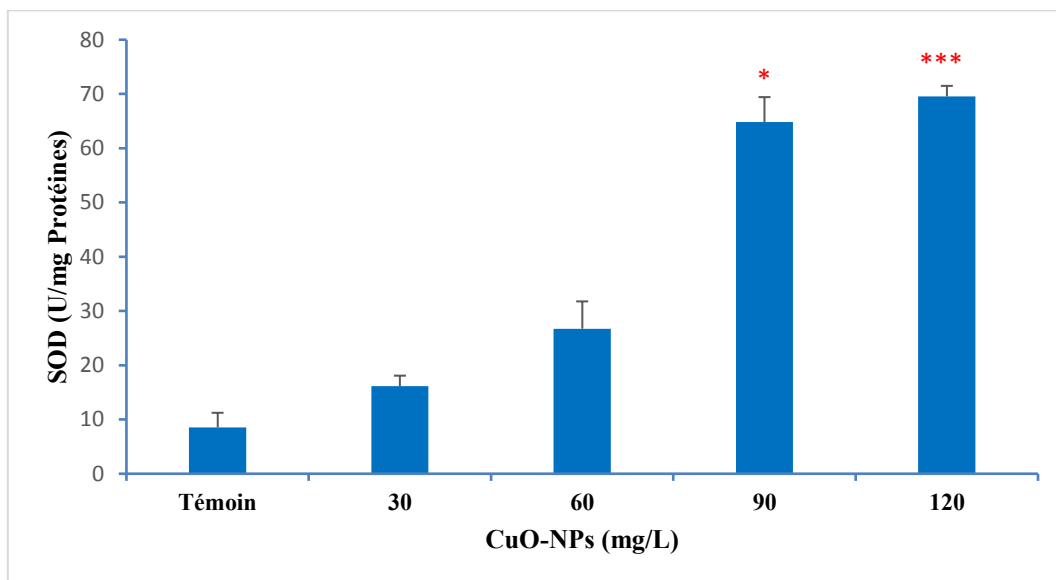


Figure 28 : Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Superoxyde dismutase chez *Paramecium sp*.

- Cas du Chlorpyrifos

La figure (29) illustre les effets des différentes concentrations du Chlorpyrifos sur la variation de l'activité Superoxyde Dismutase chez *Paramecium sp*. Nous remarquons que cette activité enzymatique augmente de manière significative ($p \leq 0.05$) et dose dépendante chez les traitées et ce dès la concentration (1 mg/l) comparativement aux témoins. Cette augmentation

est plus importante chez les cellules traitées avec la plus forte concentration (1.5 mg/l) où l'activité enzymatique est de l'ordre de 64,89 U/mg de protéines alors que chez les témoins elle ne dépasse pas 8.84 U/mg de protéines.

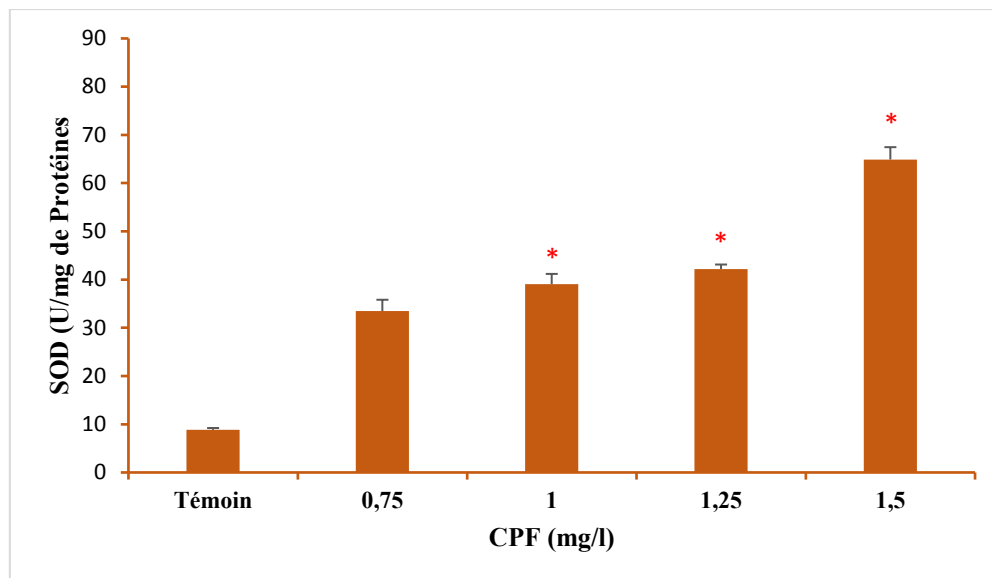


Figure 29 : Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Superoxyde dismutase chez *Parametium sp.*

- **Cas de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos**

La figure (30) met en évidence une élévation significative ($p \leq 0.05$) et dose dépendante de l'activité SOD chez les paramécies traitées par les différentes concentrations des mixtures. En effet, l'activité maximale de cette enzyme est enregistrée pour la plus forte concentration M4 (30 mg/l CuO-NPs + 1.5 mg/l CPF) avec une valeur moyenne de 80.60 U/mg de protéines, alors que chez les témoins elle n'est que 8.26 U/mg de protéines.

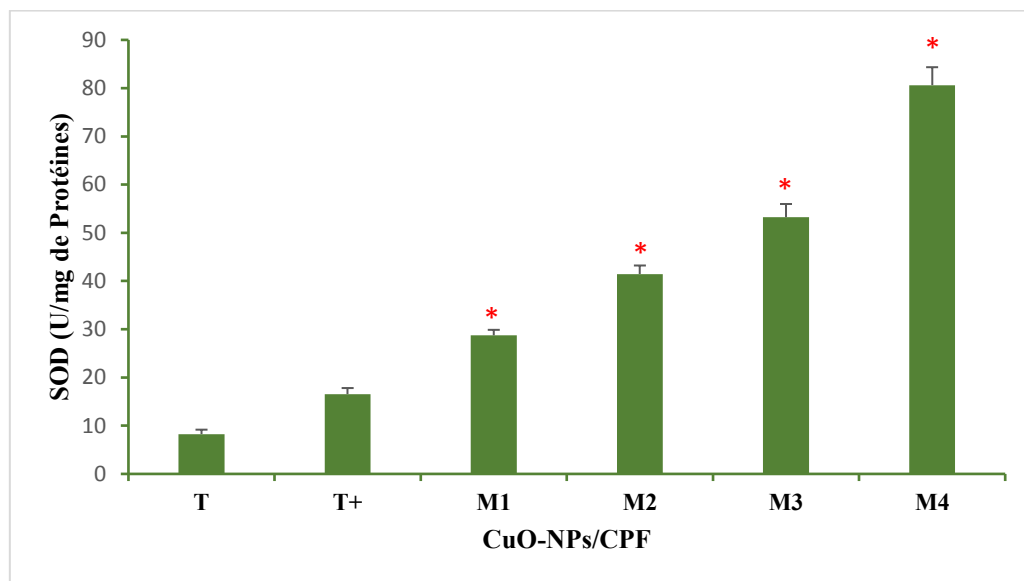


Figure 30 : Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Superoxyde Dismutase chez *Paramecium sp.*

3.1.2. Chez *Daphnia magna*

- Cas des nanoparticules de CuO

La figure (31) met en évidence les variations de l'activité Superoxyde Dismutase chez les daphnies traitées aux CuO-NPs. Nous constatons une induction significative ($p \leq 0.05$) de cette activité enzymatique à partir de la concentration 30 mg/l, cette induction se poursuit de manière progressive et dose-dépendante pour atteindre son maximum à la concentration 45 mg/l (45.31U/mg de protéines) alors que chez les témoins cette activité ne dépasse pas 13.23 U/mg de protéines.

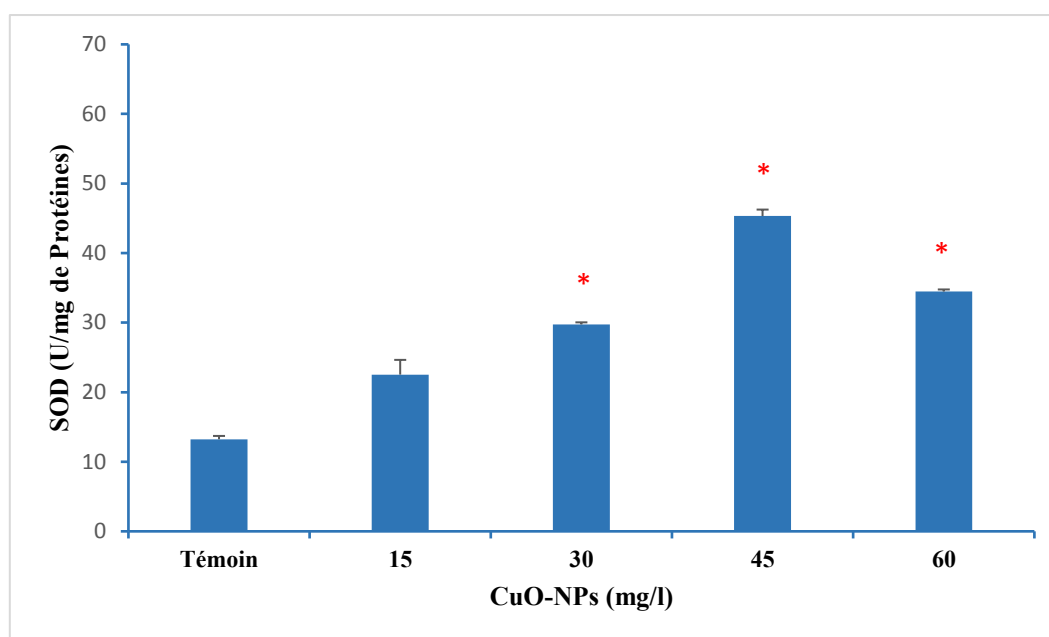


Figure 31 : Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Superoxyde dismutase chez *Daphnia magna*.

- **Cas du Chlorpyrifos**

D'après la figure (32) représentative de l'évolutions de l'activité Superoxyde Dismutase chez les daphnies témoins et traitées par les concentrations croissantes du Chlorpyrifos, nous remarquons une stimulation dose dépendante et significative ($p \leq 0.05$) de cette activité enzymatique chez les individus traités par la plus forte concentration de l'insecticide (4 $\mu\text{g/l}$) où nous enregistrons une valeur d'environ 62.49 U/mg de protéines comparativement à celle des témoins qui n'est que de 13.15 U/mg de protéines.

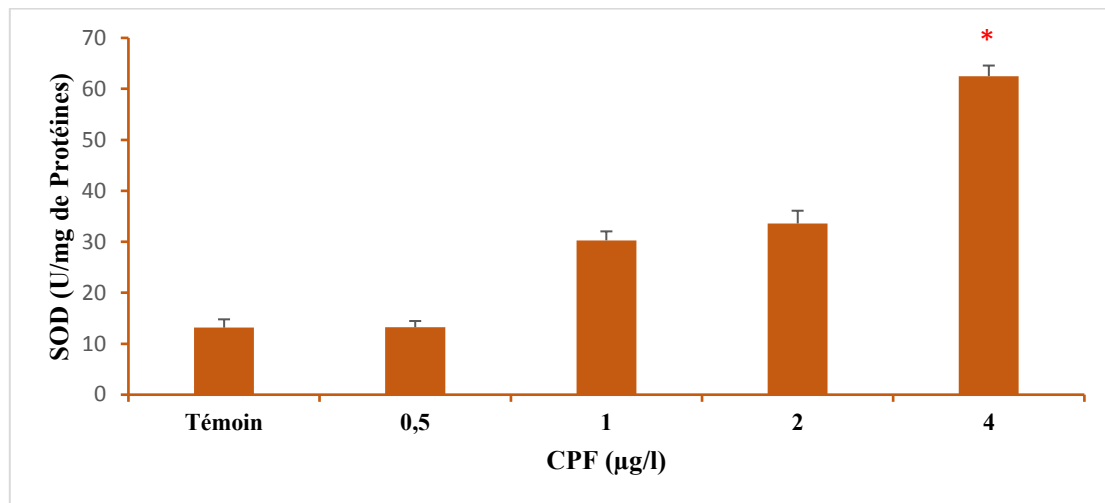


Figure 32 : Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Superoxyde dismutase chez *Daphnia magna*.

- **Cas de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos**

La figure (33) révèle une augmentation dose dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$) pour les daphnies traitées par la concentration M3 (15 mg/l CuO-NPs + 2 µg/l CPF) par rapport aux témoins. Ainsi, nous notons que l'augmentation de cette activité enzymatique est de l'ordre de 83 U/ mg de protéines chez les daphnies traitées par la concentration M4 (15 mg/l CuO-NPs + 4 µg/l CPF) alors qu'elle n'est que de l'ordre de 13.83 U/ mg de protéines chez les daphnies témoins.

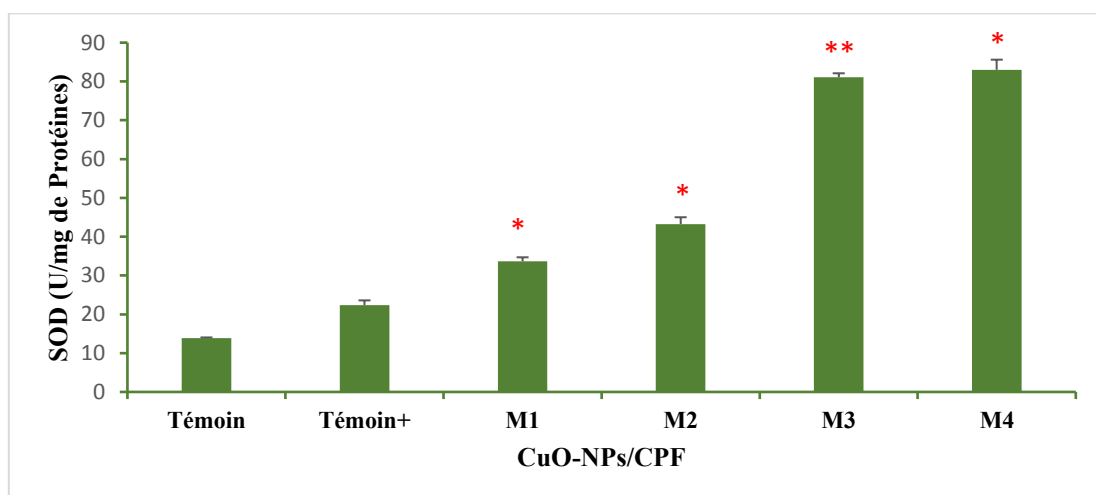


Figure 33 : Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Superoxyde Dismutase chez *Daphnia magna*.

3.2. Effets des Nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons sur la variation de l'activité Catalase

3.2.1. Chez *Paramecium sp*

- Cas des Nanoparticules de CuO

La figure (34) met en évidence une augmentation dose dépendante et significative ($p \leq 0.05$) pour les deux plus fortes concentrations (90 et 120 mg/l) chez les paramécies traitées par rapport aux témoins. Cette augmentation passe de 5.55 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les paramécies témoins à 14.64 et 15.55 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez celles exposées aux deux plus fortes concentrations (1.25 et 1.5 mg/l).

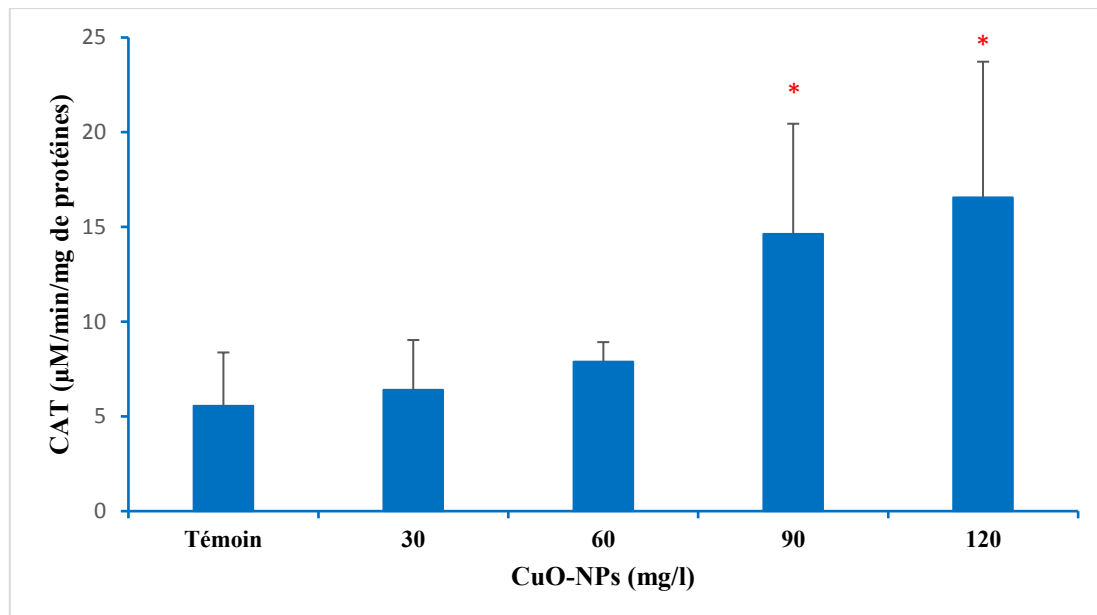


Figure 34 : Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Catalase chez *Paramecium sp*.

- Cas du Chlorpyrifos

La figure (35) met en évidence une augmentation dose dépendante de l'activité CAT chez les cellules traitées par rapport aux cellules témoins. Cette augmentation est hautement significative ($p \leq 0.01$) pour celles traitées par les concentrations (0.75 mg/l) et (1.5 mg/l). Ainsi, la valeur enregistrée chez les témoins est de 5.68 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Or, elle varie entre 11.78 et 16.17 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les paramécies traitées par les

concentrations 0.75 et 1.25 mg/l respectivement, et atteint un niveau maximal de 19.74 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les cellules traitées par la plus forte concentration (1.5 mg/l).

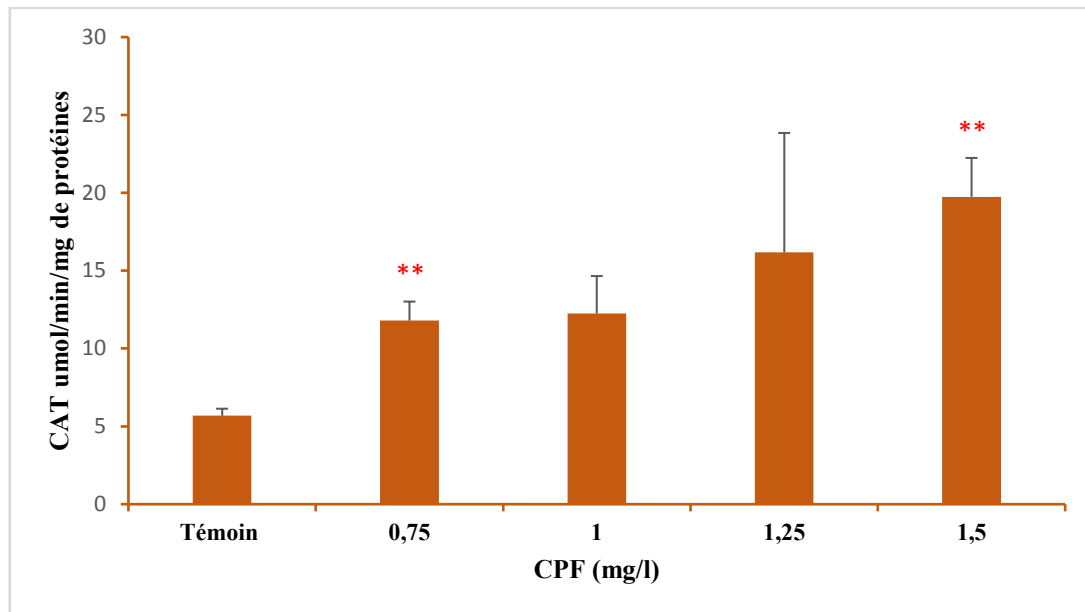


Figure 35 : Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Catalase chez *Paramecium sp.*

- **Cas de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos**

La figure (36) illustre les effets des différentes concentrations des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur de l'activité CAT chez *Paramecium sp.*

Nos résultats montrent une augmentation dose-dépendante de l'activité Catalase chez les paramécies traitées par rapport aux témoins. Cette augmentation est hautement significative pour M4 (30 mg/l CuO-NPs + 1.5 mg/l CPF).

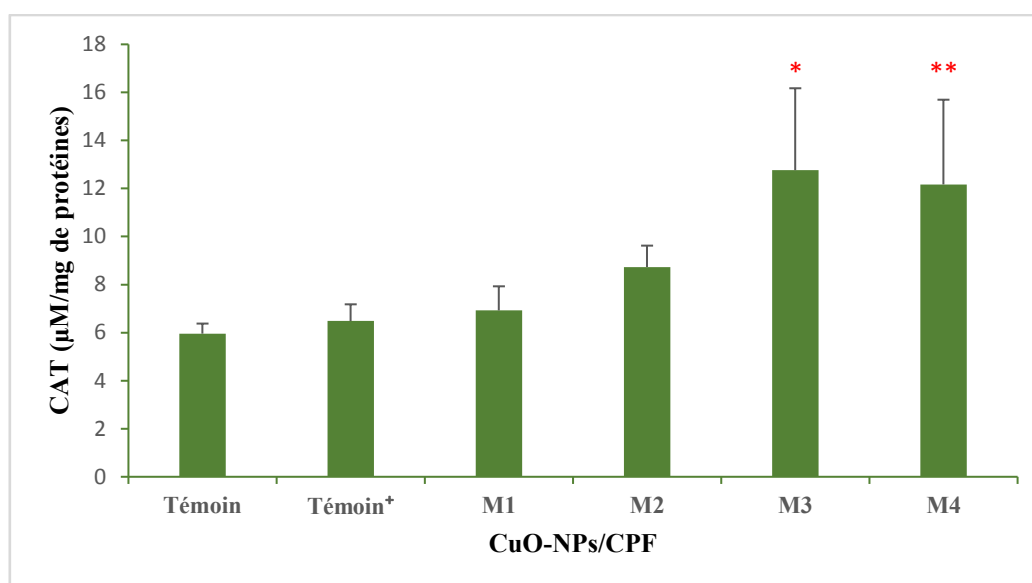


Figure 36 : Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Catalase chez *Paramecium sp.*

3.2.2. Chez *Daphnia magna*

- Cas des Nanoparticules de CuO

La figure (37) révèle une augmentation dose dépendante et significative ($p \leq 0.05$) de l'activité Catalase chez les traitées par les différentes concentrations de nanoparticules de CuO. Ainsi, à la plus forte concentration (60 mg/l), l'activité Catalase est de 18.47 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, alors que chez le témoin, elle ne dépasse pas 7.04 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

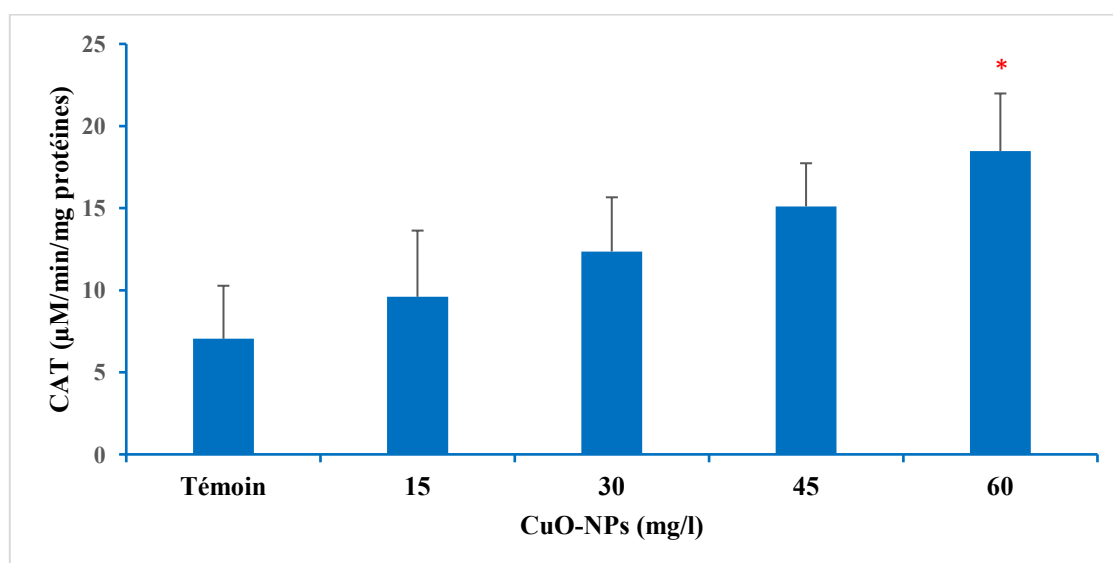


Figure 37 : Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Catalase chez *Daphnia magna*.

- **Cas du Chlorpyrifos**

La figure (38) illustre la variation de l'activité CAT chez les daphnies traitées par des concentrations croissantes du Chlorpyrifos.

Nos résultats mettent en évidence une induction dose-dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$) pour la concentration (4 $\mu\text{g/l}$). Ainsi, l'activité CAT varie de 9.32 à 18.61 $\mu\text{M/min/mg}$ de protéines chez les traitées par les concentrations (0.5 et 4 $\mu\text{g/l}$) comparé aux témoins (7.17 $\mu\text{M/min/mg}$ de protéines).

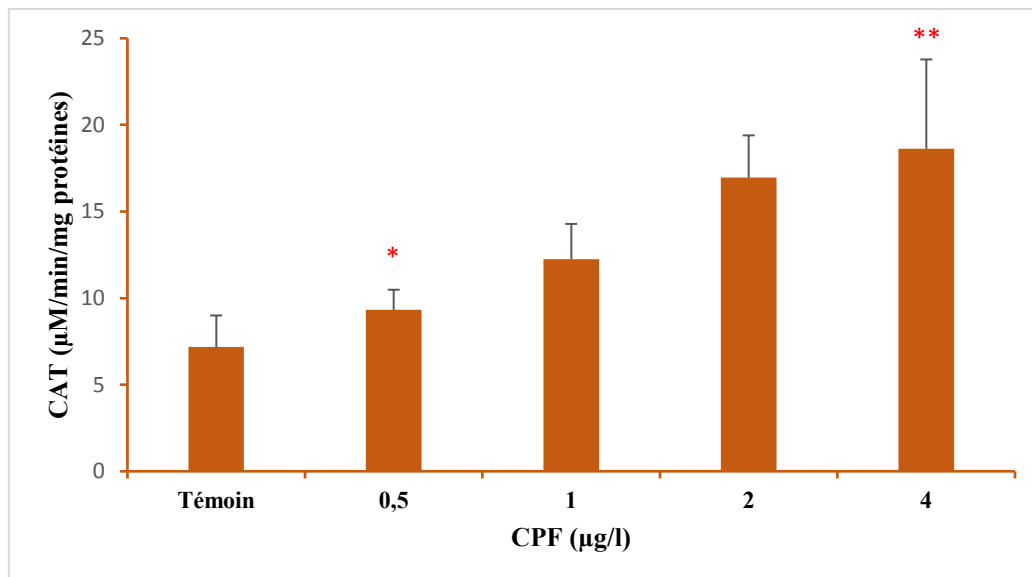


Figure 38 : Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Catalase chez *Daphnia magna*.

- **Cas de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos**

La figure (39) montre l'évolution de l'activité Catalase chez *Daphnia magna* traitées par les différentes concentrations des mixtures des nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos.

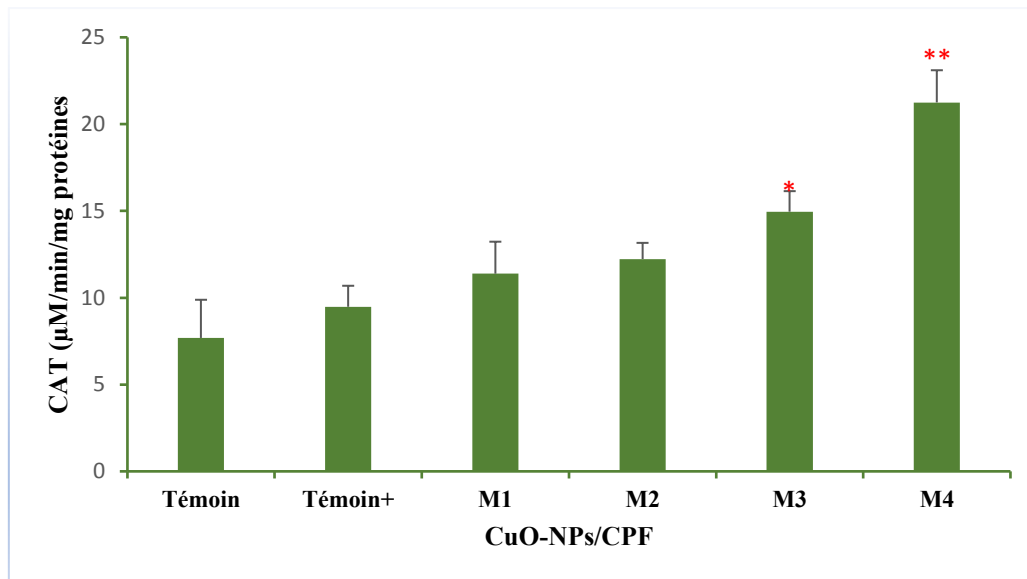


Figure 39 : Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Catalase chez *Daphnia magna*.

Nous constatons que le traitement des daphnies par les concentrations croissantes des mixtures induit une stimulation dose dépendante de l'activité Catalase. Cette augmentation est hautement significative pour la concentration M4 (15 mg/l CuO/NPs+4 μg/l CPF) par rapport aux témoins.

3.3. Effets des Nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons sur la variation de l'activité Glutathion-S-Transférase (GST)

3.3.1. Chez *Paramecium sp*

- Cas des Nanoparticules de CuO

La figure (40) met en évidence une induction dose dépendante et significative ($p \leq 0.05$) de l'activité GST chez les paramécies traitées par la plus forte concentration (120 mg/l) comparé au témoin. Ainsi, l'activité Catalase varie de 0.12 à 0.31 μmol/min/mg de protéines chez les traitées par les concentrations (30 et 120 mg/l) alors que chez le témoin n'est que de 0.11 μmol/min/mg de protéines.

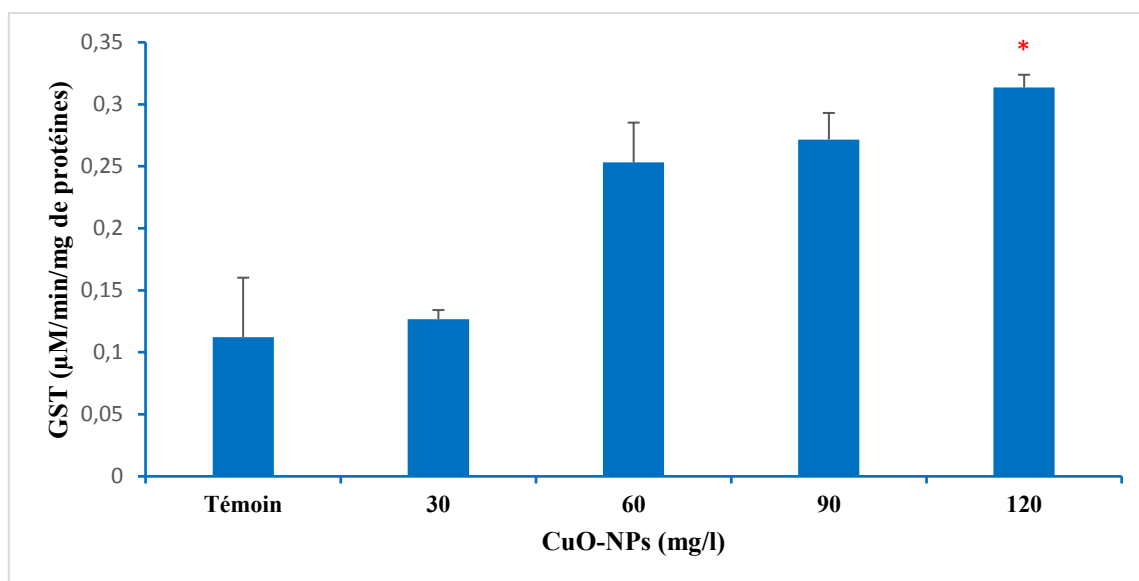


Figure 40 : Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez *Paramecium sp.*

• Cas du Chlorpyrifos

La figure (41) montre une augmentation dose dépendante de l'activité GST, cette activité est très hautement significative ($p \leq 0.001$) pour les paramécies exposées à la plus forte concentration (1.5 mg/l) où elle atteint 0.80 $\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines alors que chez les témoins, n'est que 0.11 $\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines.

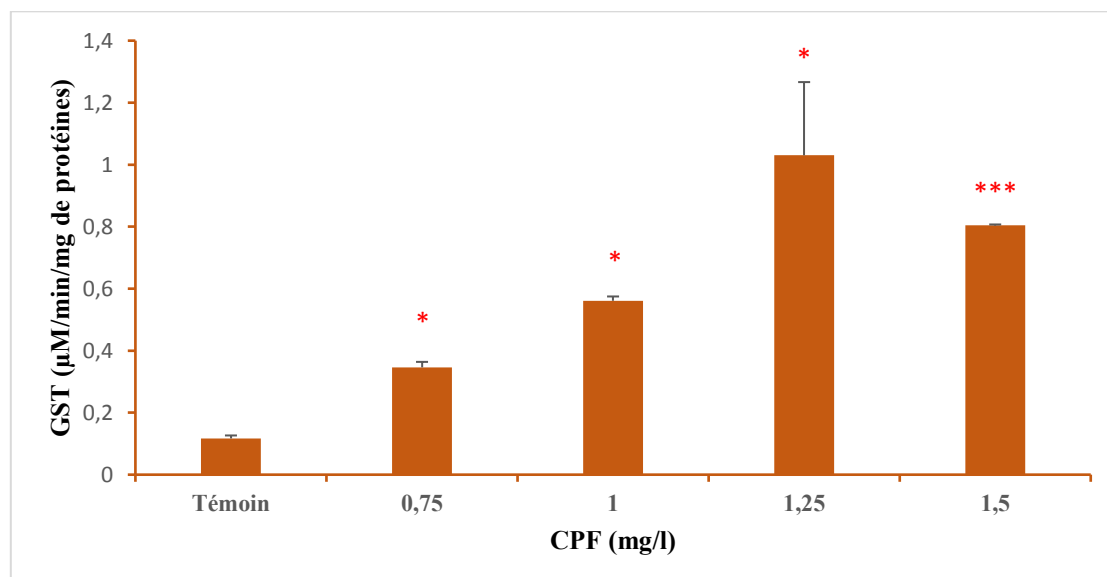


Figure 41 : Effets des concentrations croissantes du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez *Paramecium sp.*

- **Cas de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos**

La figure (42) met en évidence les effets des différentes concentrations de mixtures de nanoparticules de CuO et de Chlorpyrifos sur les variations de l'activité GST chez *Paramecium sp.* Nous constatons une augmentation dose dépendante et significative ($p \leq 0.05$) chez l'ensemble de la population traitée par rapport aux témoins. Cette activité est de l'ordre de 1.74 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les cellules traitées par la plus forte concentration M4 (30mg/l CuO-NPs + 1.5 mg/l CPF) alors qu'elle n'est que de 0.11 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les paramécies témoins.

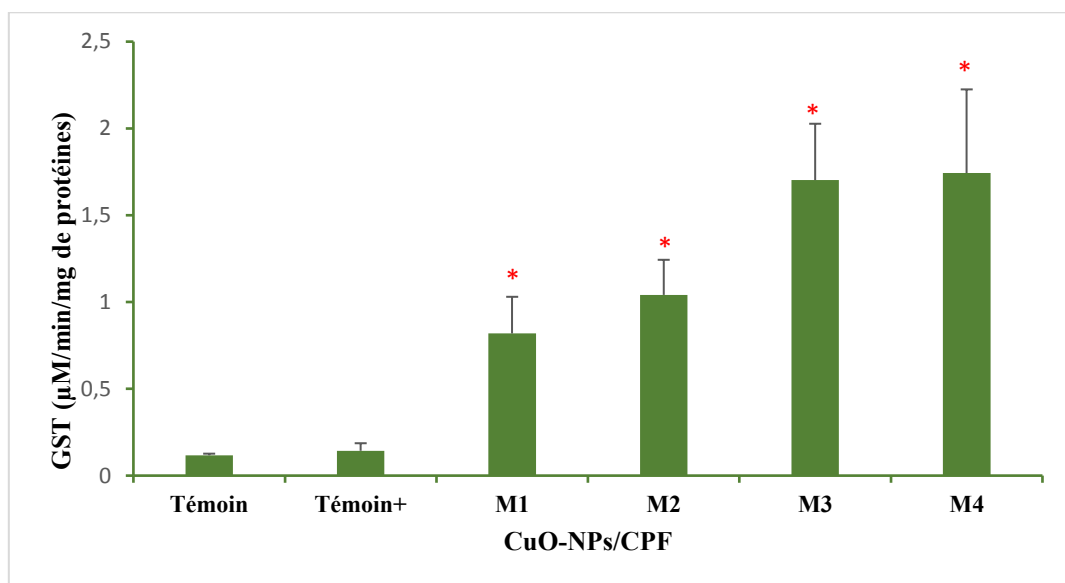


Figure 42 : Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez *Paramecium sp.*

3.3.2. Chez *Daphnia magna*

- **Cas des nanoparticules de CuO**

La figure (43) montre que le traitement par les nanoparticules de CuO entraîne une stimulation dose-dépendante et significative ($p \leq 0.05$) de l'activité GST par rapport aux témoins. Ainsi, nous constatons que chez les traitées par la plus forte concentration (60 mg/l), l'activité GST est de l'ordre de 0.40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines par rapport aux daphnies témoins (0.16 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines).

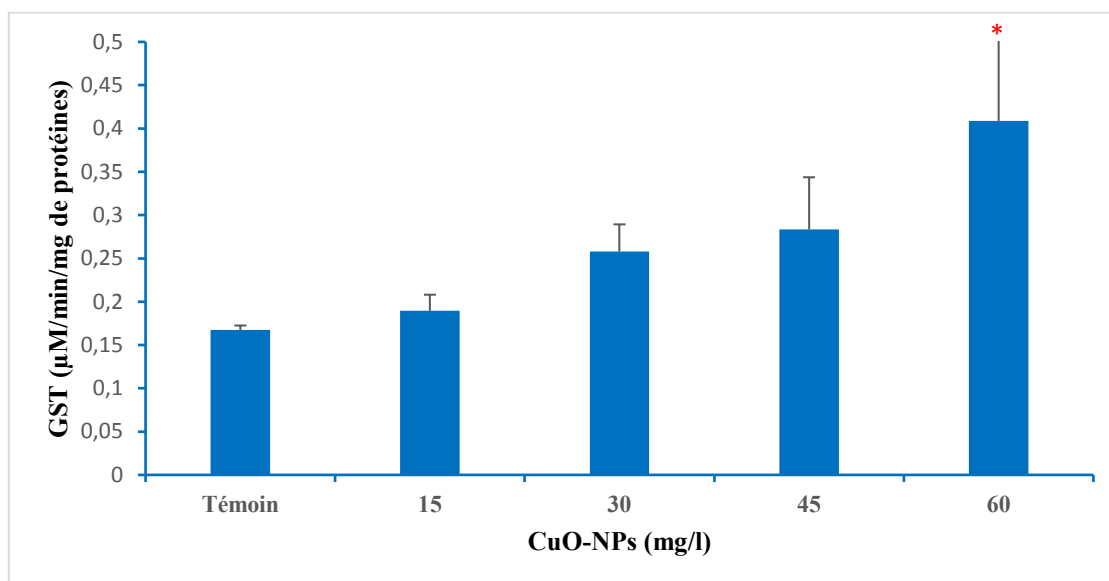


Figure 43 : Effets des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez *Daphnia magna*.

- Cas du Chlorpyrifos

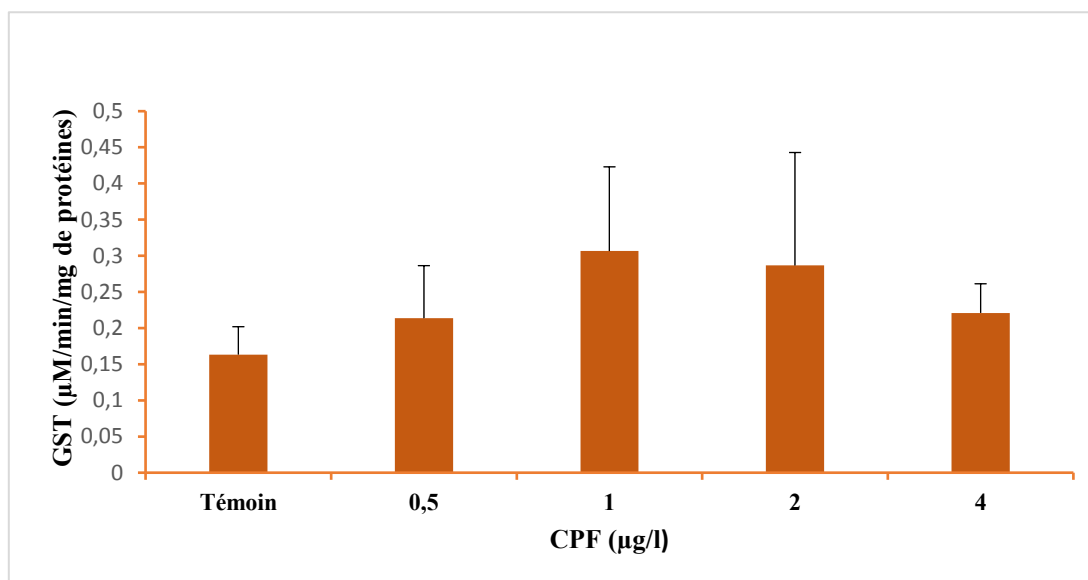


Figure 44 : Effets des concentrations croissantes de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez *Daphnia magna*.

La figure (44) montre que l'activité GST tend à augmenter chez les daphnies traitées par rapport aux témoins. En effet, elle varie de 0.21 à 0.30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines pour les

daphnies traitées par les plus faibles concentrations (0.5 et 1 $\mu\text{g/l}$) alors qu'elle n'est que de 0.16 $\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines chez les individus témoins. Toutefois, nous enregistrons une activité enzymatique plus ou moins faible chez les daphnies traitées par les deux plus fortes concentrations (2 et 4 $\mu\text{g/l}$), mais qui reste néanmoins plus élevée que celle des témoins.

- **Cas de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos**

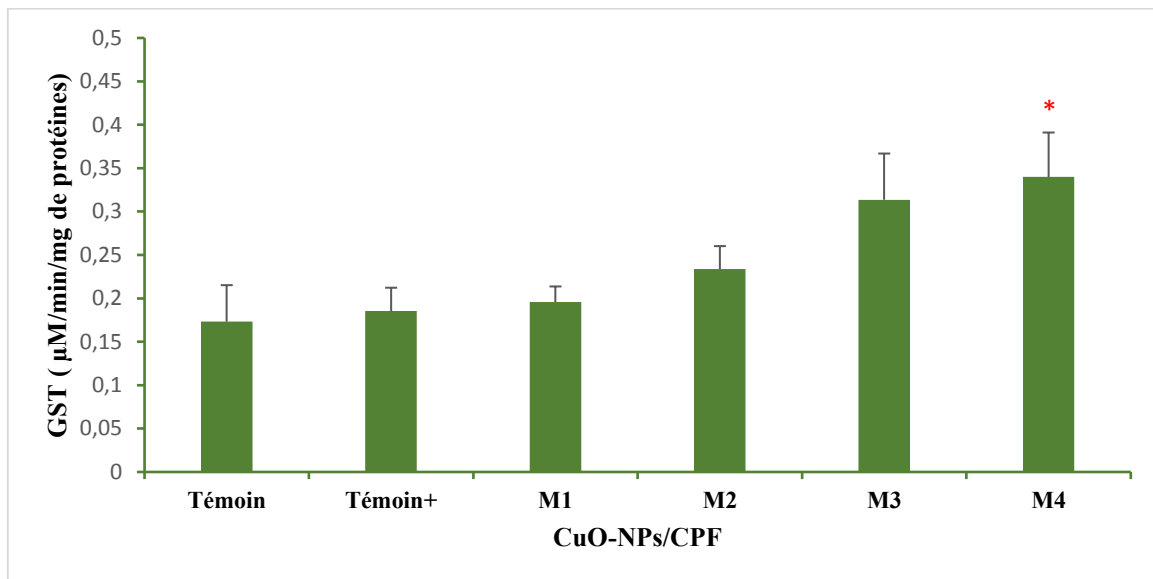


Figure 45 : Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et de Chlorpyrifos sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez *Daphnia magna*.

La figure (45) illustre l'évolution de l'activité GST chez les daphnies témoins et traitées par les concentrations croissantes des mixtures (CuO-NPs/CPF).

Nos résultats mettent en évidence une stimulation dose dépendante de l'activité GST chez les daphnies traitées par rapport aux témoins, cette stimulation est significative ($p \leq 0.05$) pour la plus forte concentration M4. Ainsi, elle passe de 0.17 $\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines chez les daphnies témoins à 0.33 $\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines pour la plus forte concentration M4 (15 mg/l CuO-NPs + 4 $\mu\text{g/l}$ CPF).

3.4. Effets des Nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons sur l'évolution du taux de GSH.

3.4.1 Chez *Paramecium sp*

Les tableaux (9), (10) et (11) mettent en évidence l'évolution du taux de GSH chez les paramécies témoins et traitées par les concentrations croissantes de nanoparticules de CuO, de Chlorpyrifos et de leurs combinaisons.

- **Cas des nanoparticules de CuO**

Nous constatons que le taux de Glutathion diminue de manière significative ($p \leq 0.05$) et dose dépendante chez les cellules traitées par la plus forte concentration 120 mg/l. Ainsi, ce taux passe de 6.10 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines chez les témoins à 2.17 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines à la plus forte concentration (120 mg/l).

Tableau 9 : Effets des nanoparticules de CuO sur l'évolution du taux de GSH chez *Paramecium sp*.

CuO-NPs	Témoin	30 mg/l	60 mg/l	90 mg/l	120 mg/l
GSH $\mu\text{mol/mg}$ de protéines	6.10 $\pm$ 1.05	4.79 $\pm$ 0.45	4.10 $\pm$ 0.54	4.15 $\pm$ 0.22	2.17 $\pm$ 0.74 *

- **Cas du Chlorpyrifos**

Nos résultats révèlent qu'en absence de traitement avec le Chlorpyrifos, le taux de GSH affiche une valeur moyenne de 6.34 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines. Le traitement par une forte concentration de l'insecticide (1.5 mg/l) a un effet marqué sur la teneur en GSH. En effet, nous notons une diminution significative par rapport au témoin ($p \leq 0.05$) affichant une valeur moyenne de 2.44 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines.

Tableau 10 : Effets du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de GSH chez *Paramecium sp*.

CPF	Témoin	0.75 mg/l	1 mg/l	1.25 mg/l	1.5 mg/l
GSH $\mu\text{mol/mg}$ de protéines	6.34 $\pm$ 0.73	4.14 $\pm$ 0.10	4.09 $\pm$ 0.42	3.09 $\pm$ 0.16	2.44 $\pm$ 0.23 *

- **Cas de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos**

Nous notons une diminution dose-dépendante du taux de GSH des paramécies traitées comparativement aux témoins. Aux plus fortes concentrations M3 (30 mg/l CuO-NPs+ 1.25 mg/l CPF) et M4 (30 mg/l CuO-NPs + 1.5 mg/l CPF), nous remarquons une déplétion significative ($p \leq 0.05$) par rapport aux témoins. En effet, les taux de GSH sont respectivement de l'ordre de 3.30 et 2.57 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines comparée à ceux des témoins dont le taux de GSH est de 6.17 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines.

Tableau 11 : Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et de Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de GSH chez *Paramecium sp.*

CuO-NPs/CPF	Témoin	Témoin+	M1	M2	M3	M4
GSH $\mu\text{mol/mg}$ de protéines	6.17 $\pm$ 0.77	4.64 $\pm$ 0.13	3.50 $\pm$ 0.35	3.02 $\pm$ 1.24	3.30 $\pm$ 0.13 *	2.57 $\pm$ 0.72 *

3.4.2. Chez *Daphnia magna*

- **Cas des nanoparticules de CuO**

Le tableau (12) met en évidence l'évolution du taux de GSH chez les daphnies témoins et traitées par les différentes concentrations des nanoparticules de CuO. Nos résultats montrent que le taux de Glutathion diminue de manière dose dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$) pour les deux plus fortes concentrations (45 et 60 mg/l) chez les daphnies traitées. Une concentration de 15 mg/l induit une diminution (5.06 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines) par rapport au témoin (7.86 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines), alors qu'une concentration de 60 mg/l, diminue sensiblement ce taux pour atteindre une valeur minimale de 2.58 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines.

Tableau 12 : Effets des Nanoparticules de CuO sur l'évolution du taux de GSH chez *Daphnia magna*

CuO-NPS	Témoin	15 mg/l	30 mg/l	45 mg/l	60 mg/l
GSH $\mu\text{mol/mg}$ de protéines	7.86 $\pm$ 0.59	5.06 $\pm$ 0.85 *	4.68 $\pm$ 1.18	2.63 $\pm$ 0.66 **	2.58 $\pm$ 0.44 **

- **Cas du Chlorpyrifos**

Les variations du taux de GSH chez les daphnies témoins et traitées par les concentrations croissantes de Chlorpyrifos sont représentés dans le tableau (13)

Nous constatons une diminution dose-dépendante et très hautement significative ($p \leq 0.001$) de la teneur en GSH par rapport aux témoins. Ainsi, ce taux est de 7.86 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines chez les daphnies témoins à 1.71 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines chez celles traitées par la plus forte concentration (4 $\mu\text{g/l}$).

Tableau 13 : Effets du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de GSH chez *Daphnia magna*.

CPF	Témoin	0.5 $\mu\text{g/l}$	1 $\mu\text{g/l}$	2 $\mu\text{g/l}$	4 $\mu\text{g/l}$
GSH $\mu\text{mol/mg}$ de protéines	7.86 $\pm$ 0.28	2.86 $\pm$ 1.07 *	2.75 $\pm$ 0.54 **	1.47 $\pm$ 0.30 ***	1.71 $\pm$ 0.23 ***

- **Cas de la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos**

Le tableau (14) illustre l'évolution du taux de GSH en fonction des concentrations des mixtures CuO-NPs/ Chlorpyrifos.

Nous observons que le taux de GSH tend à diminuer de manière significative ($p \leq 0.05$) pour les daphnies exposées aux concentrations M3 (15 mg/l CuO-NPs + 2 $\mu\text{g/l}$ CPF) et M4 (15 mg/l CuO-NPs + 4 $\mu\text{g/l}$ CPF) par rapport aux témoins. En effet, ce taux passe d'une moyenne de 7.48 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines chez les daphnies témoins à 1.86 et 1.23 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines chez celles traitées par les concentrations M3 et M4 respectivement.

Tableau 14 : Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et de Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de GSH chez *Daphnia magna*.

CuO-NPs/CPF	Témoin	Témoin+	M1	M2	M3	M4
GSH $\mu\text{mol/mg}$ de protéines	7.48 $\pm$ 1.55	5.81 $\pm$ 0.44	4.99 $\pm$ 0.40	3.00 $\pm$ 0.50	1.86 $\pm$ 0.38 *	1.23 $\pm$ 0.21 *

3.5. Effets des Nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons sur l'évolution du taux de MDA.

3.5.1. Chez *Paramecium sp*

- **Cas des nanoparticules de CuO**

Le tableau (15) met en évidence l'effet des nanoparticules de CuO sur les variations du taux de MDA chez les paramécies témoins et traitées. Les résultats révèlent que pour un traitement de 120 mg/l, la lipoperoxydation est plus élevée comparées aux cellules témoins avec une moyenne de 1.24 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines alors que celle des témoins est de l'ordre de 0.35 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines.

Tableau 15 : Effets des Nanoparticules de CuO sur l'évolution du taux de MDA chez *Paramecium sp*.

CuO-NPs	Témoin	30 mg/l	60 mg/l	90 mg/l	120 mg/l
MDA $\mu\text{mol/mg}$ de protéines	0.35 $\pm$ 0.03	0.80 $\pm$ 0.21	0.75 $\pm$ 0.16	1.13 $\pm$ 0.26	0.24 $\pm$ 0.28

- **Cas du Chlorpyrifos**

Les résultats relatifs à l'effet du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de MDA sont illustrés sur le tableau (16) Ainsi, nous constatons une augmentation dose dépendante du taux de MDA chez les cellules traitées par les différentes concentrations de l'insecticide. Cette augmentation est significative ($p \leq 0.05$) chez les paramécies traitées par les deux plus fortes concentrations (1.25 et 1.5 mg/l) comparativement aux témoins.

Tableau 16 : Effets du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de MDA chez *Paramecium sp*.

CPF	Témoin	0.75 mg/l	1 mg/l	1.25 mg/l	1.5 mg/l
MDA $\mu\text{mol/mg}$ de protéines	0.35 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.06	0.68 $\pm$ 0.13	1.16 $\pm$ 0.14 *	1.25 $\pm$ 0.17 *

- **Cas de la combinaison CuO-NPs/ Chlorpyrifos**

D'après le tableau (17) représentatif de l'évolution du taux de MDA chez les paramécies témoins et traitées par les concentrations croissantes des mixtures CuO-NPs/ Chlorpyrifos, nous constatons une augmentation dose dépendante chez les cellules traitées par les différentes concentrations des mixtures comparativement aux témoins. Cette augmentation est significative ($p \leq 0.05$) pour les concentrations M1 (30 mg/l CuO-NPs + 0.75 mg/l CPF) et M3 (30 mg/l CuO-NPs + 1.25 mg/l CPF) et hautement significative ($p \leq 0.01$) pour la plus forte concentration M4 (30 mg/l CuO-NPs + 1.5 mg/l CPF).

Tableau 17 : Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de MDA chez *Paramecium sp.*

CuO-NPs/CPF	Témoin	Témoin+	M1	M2	M3	M4
MDA μmol/mg de protéines	0.35±0.07	0.85±0.12	1.33±0.29 *	1.50±0.32	1.77±0.38 *	1.90±0.13 **

3.5.2. Chez *Daphnia magna*.

- **Cas des nanoparticules de CuO**

Le tableau (18) montre l'effet des nanoparticules de CuO sur les variations du taux de MDA chez les daphnies témoins et traitées.

Nos résultats montrent que le taux de MDA augmente de manière dose dépendante. Cette augmentation est significative ($p \leq 0.05$) pour la plus forte concentration (60 mg/l). En effet, ce taux passe de 0.05 μmol/ mg de protéines chez les individus témoins à 0.33 μmol/ mg de protéines pour ceux traités par la plus forte concentration (60 mg/l).

Tableau 18 : Effets des Nanoparticules de CuO sur l'évolution du taux de MDA chez *Daphnia magna*.

CuO-NPs	Témoin	15 mg/l	30 mg/l	45 mg/l	60 mg/l
MDA μmol/mg de protéines	0.05±0.003	0.11±0.03	0.14±0.01	0.14±0.04	0.33±0.09 *

• Cas du Chlorpyrifos

Les résultats concernant l'évolution du taux de MDA chez les daphnies témoins et traitées par les concentrations croissantes de Chlorpyrifos sont représentés dans le tableau (19).

Nous remarquons une augmentation dose dépendante et significative ($p \leq 0.05$) chez les daphnies traitées par les concentrations 0.5 et 2 $\mu\text{g/l}$ comparées à celles témoins. Ainsi, le taux de MDA est de 0.13 $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines chez les daphnies traités par la plus faible concentration (0.5 $\mu\text{g/l}$) et environ 0.32 $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines chez celles traitées par la plus forte concentration (4 $\mu\text{g/l}$) alors qu'il n'est que de 0.05 $\mu\text{mol/ mg}$ de protéines chez les daphnies témoins.

Tableau 19 : Effets du Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de MDA chez *Daphnia magna*.

CPF	Témoin	0.5 $\mu\text{g/l}$	1 $\mu\text{g/l}$	2 $\mu\text{g/l}$	4 $\mu\text{g/l}$
MDA $\mu\text{mol/mg}$ de protéines	0.05 $\pm$ 0.009	0.13 $\pm$ 0.29 *	0.16 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.03 *	0.32 $\pm$ 0.08

• Cas de la combinaison CuO-NPs/ Chlorpyrifos

Il ressort des résultats exposés au tableau (20) que le taux MDA tend à augmenter d'une manière dose dépendante chez les daphnies traitées par rapport aux témoins, cette augmentation est hautement significative pour les concentrations M1, M2 et M4. Cependant, une faible diminution est constatée chez les individus traités par la concentration M3.

Tableau 20 : Effets des mixtures de nanoparticules de CuO et de Chlorpyrifos sur l'évolution du taux de MDA chez *Daphnia magna*.

CuO-NPs/CPF	Témoin	Témoin+	M1	M2	M3	M4
MDA $\mu\text{mol/mg}$ de protéines	0.05 $\pm$ 0.008	0.11 $\pm$ 0.008	0.14 $\pm$ 0.01 **	0.13 $\pm$ 0.006 **	0.09 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.009 **

4. Discussion

L'approche « biomarqueur » peut être illustrée par une relation entre l'état de santé d'un organisme et sa réponse à des concentrations croissantes de contaminants dans son

environnement. Ainsi, dans un environnement vierge de toute influence, en supposant que toutes les ressources nécessaires à la vie soient disponibles et sans stress de contamination, un organisme est considéré en « bonne santé », dans un état d'homéostasie. Si la concentration en contaminant augmente, l'organisme subit un état de stress grandissant, jusqu'à un état où apparaissent des altérations fonctionnelles visibles pouvant entraîner la mort à plus ou moins long terme. (Champeau, 2005).

Du fait qu'un grand nombre de polluants peuvent induire la formation d'EROs, les biomarqueurs du stress oxydant sont largement employés lors d'études environnementales (Ruas et *al.*, 2008 ; Maria et *al.*, 2009). Cette surproduction d'EROs peut intervenir dans tous les organismes capables de respiration cellulaire. Les biomarqueurs du stress oxydant peuvent donc être évalués chez de nombreuses espèces. (Amiard et Amiard Triquet, 2008 ; Le Guernic, 2015).

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la réponse de *Paramecium sp* et *Daphnia magna* vis-à-vis d'un stress oxydatif via le suivi des mécanismes de défense spécifiques à ce type de toxicité ou encore le cas échéant par la mise en évidence d'un stress oxydatif au niveau cellulaire et ce à travers le suivi de l'évolution de biomarqueurs spécifiques de défense et de dommage en tant que système d'alerte sensible et précoce. En effet, notre choix s'est porté sur le suivi de la variation de quelques activités enzymatiques, en l'occurrence la SOD, la CAT et la GST. Nous avons par ailleurs déterminé le taux de GSH en tant qu'antioxydant endogène non enzymatique et le MDA, indice de peroxydation lipidique.

Nous nous sommes focalisés en premier lieu sur les effets des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leur mixture sur l'évolution de l'activité Superoxyde Dismutase (SOD), il s'agit de la première ligne de défense car elle accélère considérablement la réaction de transformation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et dioxygène O_2 .

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une induction de l'activité SOD chez les paramécies et les daphnies traitées par les nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures. Ce résultat est en accord avec ceux de Cherait (2014) et Khebbab (2014) qui ont mis en évidence une forte induction de l'activité SOD chez *Saccharomyces cerevisiae* exposée à la Nifédipine et aux nanoparticules de ZnO respectivement. Il en est de même pour les travaux de Kim et *al.* (2010) qui ont aussi démontré une induction de l'activité Superoxyde Dismutase chez *Daphnia magna* après traitement par les nanoparticules de TiO_2 . Une augmentation de l'activité SOD a également été observée chez le crustacé d'eau douce *Macrobrachium*

nipponensis traité par le Glyphosate (Hong *et al.*, 2018). La dismutation des radicaux libres oxygénés par la SOD produit du peroxyde d'hydrogène qui est plus stable que l'anion superoxyde mais qui reste potentiellement nocif. En présence de métaux tel que le Fe^{2+} , le peroxyde d'hydrogène est transformé par la réaction de Fenton, en radical Hydroxyle ($\text{OH}\bullet$) extrêmement réactif qui va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres (Lane, 2003 ; Gardès-Albert et Jore, 2005).

Le peroxyde d'hydrogène sera pris en charge par une deuxième ligne de défense, qui travaille de concert avec la première, représentée par les Catalases (CAT), les Peroxyrédoxines et les peroxydases (GPx, APX ...), capables de convertir le H_2O_2 en oxygène gazeux et en eau. La Catalase, contrairement aux autres peroxydases, n'est pas substrat dépendante et ne produit pas de radicaux libres (Deby, 2009).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une induction de l'activité Catalase chez les deux espèces d'eau douce exposées aux nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons. En effet, la Catalase est considérée comme l'un des biomarqueurs les plus sensibles au stress oxydant particulièrement vis-à-vis des polluants chimiques en milieu aquatique (Vlahogianni, 2007 ; Moumni, 2016). Cette induction a également été signalée chez de nombreuses espèces aquatiques telles que *Cyprinus carpio*, *Bellayma aeruginosa* et *Chlamydomonas reinhardtii* exposés aux nanoparticules de CuO. (Naeemi *et al.*, 2020 ; Ma *et al.*, 2016 ; Melegari *et al.*, 2013). De plus, Ellis *et al.* (2020) ont noté une induction de l'activité Catalase chez *Daphnia magna* exposée aux nanoparticules d'Argent (Ag-NPs).

Les mêmes résultats ont été enregistré par Djekoun *et al.* (2015), Azzouz (2012), Amamra *et al.* (2014) qui ont également noté une intensification de l'activité Catalase chez les paramécies après une exposition respectivement à des pesticides : Fludioxonil – Difenconazole, le Glyphosate et la Cyperméthrine.

La Glutathion-S-Transférase est une enzyme multifonctionnelle de la phase II et joue un rôle essentiel dans la conjugaison des composés électrophiles (métabolites de la phase I) d'une part et dans la défense contre les dommages oxydatifs et les produits peroxydatifs de l'ADN et des lipides (Oost *et al.*, 2003) d'autre part. L'activité GST des espèces aquatiques est fortement induite par la présence de contaminants dans l'environnement. Ainsi, une augmentation de l'activité GST dans les organismes marins indique clairement leur exposition à ces contaminants toxiques. Une concentration croissante de ROS provoque un stress oxydatif qui peut conduire à une augmentation de l'activité GST.

Nos résultats indiquent une stimulation dose dépendante de l'activité GST chez les deux espèces d'eau douce en présence des concentrations croissantes de nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures. Ce résultat est en accord avec celui de Canli et *al.* (2021) où il est noté une Stimulation de l'activité GST chez la moule d'eau douce *Unio tigridis* suite à un traitement avec des nanoparticules de Al₂O₃, CuO et TiO₂. Le même résultat est décrit par Wang et *al.* (2018) chez le cilié *Uronema marinum* exposé au Chlorpyrifos. Djekoun (2012) a également mis en évidence une induction de l'activité GST chez *Saccharomyces cerevisiae* traitée par différentes concentrations de Cadmium.

Le Glutathion est vital au niveau intracellulaire, c'est un agent de piégeage des radicaux libres et co-substrat de diverses enzymes. Le GSH est connu par son puissant pouvoir antioxydant (Giustarini et *al.*, 2017). C'est l'antioxydant le plus important dans le contrôle du statut redox (Lee et *al.*, 2018), et qui protège non seulement contre les radicaux libres, mais aussi contre les peroxydes (Giustarini et *al.*, 2018).

Dans notre étude, une diminution dose-dépendante du taux de GSH est observée chez *Paramecium sp* et *Daphnia magna* exposées aux nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons. Cette diminution est probablement due à une augmentation de l'activité de la Glutathion Peroxydase (GP_x), qui consomme de grandes quantités de Glutathion, et de sa conjugaison avec les xénobiotiques catalysée par la GST (Banerjee et *al.*, 1999).

Qu et *al.* (2013) a mis en évidence une diminution du taux de GSH chez *Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* et *Carassius auratus* suite à une exposition au Cadmium. Les mêmes résultats ont été enregistrés par Khaldi et *al.* (2016) et Lieu et *al.* (2014) chez *Paramecium sp* et *Daphnia magna* exposées aux nanoparticules de ZnO. Jin et *al.* (2015) ; Wang et *al.* (2019) ont également mis en évidence une diminution de la teneur en GSH chez le poisson zèbre après traitement par le Chlorpyrifos.

Salazar-Medina et *al.* (2010) ; Radwan et *al.* (2010) ont expliqué la diminution du taux de GSH à la fois par son utilisation pour la conjugaison des composés électrophiles par la GST pendant l'exposition aux contaminants et par son utilisation directement dans la formation de complexes de thiols spécifiques avec les ions métalliques libérés par les NPs.

Il convient de souligner enfin, que l'effet toxique des xénobiotiques et notamment les pesticides dépend du taux de GSH : des études ont montré la capacité des pesticides à induire une déplétion du taux de GSH ce qui est susceptible d'induire une lipoperoxydation (Itziou et *al.*, 2011 ; Amamra, 2015).

L'évaluation de l'oxydation des lipides est l'une des approches les plus couramment utilisées dans le domaine de la recherche sur les radicaux libres, car de nombreux organismes, notamment les animaux aquatiques, contiennent une grande quantité de lipides dont les résidus d'acides gras polyinsaturés constituent un substrat pour l'oxydation. Les lipides sont généralement oxydés par la formation de peroxydes et ce processus est connu sous le nom de peroxydation lipidique (Lushchak et Bagnyukova 2006). La mesure du taux de Malondialdéhyde (MDA), produit final de la peroxydation lipidique, est recommandée pour quantifier le niveau des substances réactives de l'acide thiobarbutirique (TBARS). Notre étude révèle une augmentation dose-dépendante du taux de Malondialdéhyde chez les paramécies et les daphnies exposées aux nanoparticules de CuO, au Chlorpyrifos et à leurs mixtures. Ce résultat est en accord avec celui de Sumi et Chitra (2017) qui ont noté une stimulation de la peroxydation lipidique chez le poisson d'eau douce *Pseudotropheus maculatus* après 72 et 96h d'exposition aux Nanoparticules de fullerène (C₆₀). Il en est de même pour Wang et al. (2015) qui indiquent une augmentation du taux de MDA au niveau de l'intestin du poisson *Epinephelus coioides* après exposition aux nanoparticules de Cu. Oruc et al. (2006) ont trouvé que la plus faible concentration de diazinon (0.0036 ppb) est à l'origine d'une augmentation de la teneur en MDA chez *Cyprinus carpio* seulement après un traitement de 5 jours. Les mêmes résultats sont obtenus par Hai et al. (1997) chez la même espèce après traitement par le Diclorovos. En effet, d'après Roy et Das (2016) Une conséquence commune du stress métallique est la formation des ROS qui peuvent réduire le système de défense antioxydante de la cellule. Les acides gras polyinsaturés présents dans la paroi cellulaire ainsi que dans l'environnement cytosolique sont très réactifs aux ROS générées par les métaux et subissent une peroxydation produisant différents types de cytotoxines comme le malondialdéhyde (MDA).

En générale, de nombreuses études mettent en avant l'importance de prendre en compte les contaminations croisées des nanoparticules et des composés organophosphorés. En effet, plusieurs auteurs ont confirmé l'existence de l'effet cheval de Troie ce qui traduit dans de nombreux cas par une toxicité accrue pour les organismes environnementaux. Par exemple, Ren et al. (2018) stipulent que les nanoparticules de TiO₂ ont la capacité d'adsorber le TDCIPP (Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate) et agissent comme vecteurs de contamination en affectant la croissance et la reproduction du poisson zèbre *Danio rerio*.

5. Conclusion

Au terme de ce chapitre, il nous a été possible de mettre en évidence un important stress oxydatif traduit par une activation du système de détoxification à travers l'induction de

l'activité SOD, CAT et GST parallèlement à la diminution de la teneur en GSH. De plus, nous avons mis en évidence, une peroxydation lipidique suite à une augmentation du taux de MDA.

Quant à la sensibilité de *Paramecium sp* et *Daphnia magna* vis-à-vis des mixtures, nos résultats ont révélé :

Chez *Paramecium sp*

- Une stimulation de l'activité SOD, synergique à M4
- Une induction de l'activité GST, synergiques à M1, M2, M3 et M4.
- Une augmentation du taux de MDA, synergique à M3 et M4.

Chez *Daphnia magna*

- Une stimulation de l'activité SOD, synergique à M3 et M4.
- Une stimulation de l'activité Catalase, synergique uniquement à M4.
- Une stimulation de l'activité GST, synergique à M3 et M4.
- Une augmentation du taux de MDA, antagoniste à M3

*Chapitre VI : Comportement,
embryotoxicité et atteintes
structurelles et membranaires*

1. Introduction

Le stress causé par les substances chimiques peut affecter l'organisme à différents niveaux cellulaire, moléculaire, endocrinien et physiologique (Burgeot et *al.*, 2020). De ce fait, la mise en évidence des effets toxiques de ces substances est beaucoup plus complexe en raison de la multiplicité de leurs modes d'action lié à diverses voies d'exposition, mais il est vraisemblable qu'elles contribuent fréquemment à l'apparition d'anomalies morphologiques et développementales qui peuvent avoir des répercussions directes et très importantes sur la croissance, la survie, et le comportement des organismes exposés (Agostini et *al.*, 2010 ; Dawar et *al.*, 2016). Ainsi, la caractérisation des atteintes morphologiques et développementales est apparue comme une bonne approche complémentaire pour évaluer les effets des contaminants sur ces organismes.

Il en est de même, les paramètres comportementaux sont de plus en plus considérés comme étant des indicateurs sensibles et précoces de toxicité chez les organismes aquatiques, ils ont ainsi l'avantage d'apporter des réponses rapides et sensibles puisque le stress chimique peut induire des réponses comportementales rapides chez les organismes exposés à des concentrations inférieures aux seuils de toxicité aiguë (Amiard-Triquet & Amiard, 2013).

Cette partie de notre travail, traite des modifications morphologiques potentielles chez *Paramecium sp* ainsi que la caractérisation des diverses malformations développementales touchant les néonates de *Daphnia magna* en présence des nanoparticules de CuO, de Chlorpyrifos et de leurs mixtures. D'autre part, nous avons suivi les trajectoires de déplacement des deux modèles biologiques, car il est connu que tout changement physiologique dû à un xénobiotique toxique peut avoir un effet sur le type de nage des organismes aquatiques.

2. Matériel et méthodes

2.1. Cas de *Paramecium sp*

2.1.1. Caractérisation des malformations

L'évaluation des anomalies morphologiques (structurales et membranaires) est effectuée par observation microscopique (Leica DM 1000) durant les cinq jours de traitement.

2.1.2. Suivi des trajectoires de déplacement

Afin d'évaluer l'impact des nanoparticules d'oxyde de cuivre, de Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur la direction de déplacement des paramécies, nous avons procédé un suivi du déplacement par enregistrement vidéo. Après enregistrement, les vidéos sont analysées par le logiciel Kinovea 0.8.15, qui permet le traçage des trajectoires de déplacement des cellules avec précision.

2.2. Cas de *Daphnia magna*

2.2.1. Test d'embryotoxicité

Le test d'embryotoxicité est effectué selon la méthode décrite par Massarin (2010), en exposant des œufs de daphnies durant leur développement embryonnaire dans la poche incubatrice des mères adultes aux concentrations croissantes de nanoparticules de CuO, de Chlorpyrifos et de leurs mixtures. Des femelles parthénogénétiques gravides sont placées individuellement pendant 3 jours, dans des béciers en verre contenant 50 ml du milieu de culture et les différentes concentrations de chaque xénobiotique. Trois répétitions sont réalisées pour chaque lot. Après libération des jeunes daphnies (néonates) dans le milieu, celles-ci sont soumises à un examen microscopique pour l'identification, la caractérisation des anomalies développementales et morphologiques. Les photos des néonates présentant des déformations sont enregistrées grâce à un système constitué d'une caméra (Leica EC3) reliée au microscope optique (Leica DM 1000) connecté à un ordinateur.

2.2.2. Suivi des trajectoires de déplacement

Les trajectoires de déplacement des daphnies sont déterminées de la même manière que pour les paramécies. Après enregistrement des vidéos de déplacements des daphnies témoins et traitées, les trajectoires sont tracées par le logiciel d'analyse Kinovea 0.8.15.

3. Résultats

3.1. Cas de *Paramecium sp*

3.1.1. Anomalies structurelles et atteintes membranaires

La planche (1) illustre les diverses anomalies morphologiques induites par l'exposition de *Paramecium sp* suite au traitement par les nanoparticules de CuO, le Chlorpyrifos et leurs mixtures.

Comparativement aux cellules témoins qui présentent une morphologie symétrique et organisée (figure 46), l'observations microscopique des paramécies exposées aux nanoparticules de CuO, au Chlorpyrifos et à leurs combinaisons ont mis en évidence un grand nombre de malformations structurelles. Ces malformations se caractérisent par des formes plus ou moins arrondies (planche 1 A, B), asymétriques (planche 1 C, D).

Au niveau de la membrane cellulaire nous avons observé des petites vésicules de tailles variables apparaissant autour de la paroi cellulaire pouvant se détacher et flotter. Nous avons également observé des bourgeonnements survenus à la surface de la cellule (planche 2).



Figure 46 : Observation microscopique d'une cellule de *Paramecium sp* témoin avec une morphologie normale (Gr $\times 20 \times 10$).



Planche 1 : Anomalies morphologiques induites par les nanoparticules de CuO, le Chlorpyrifos et leurs mixtures chez *Paramecium sp* (Gr $\times 20 \times 10$)

Chapitre IV : Comportement, embryotoxicité et atteintes structurelles et membranaires

La planche (2) met en évidence la présence de vésicules et de bourgeonnements apparaissant autour de la membrane cellulaire.

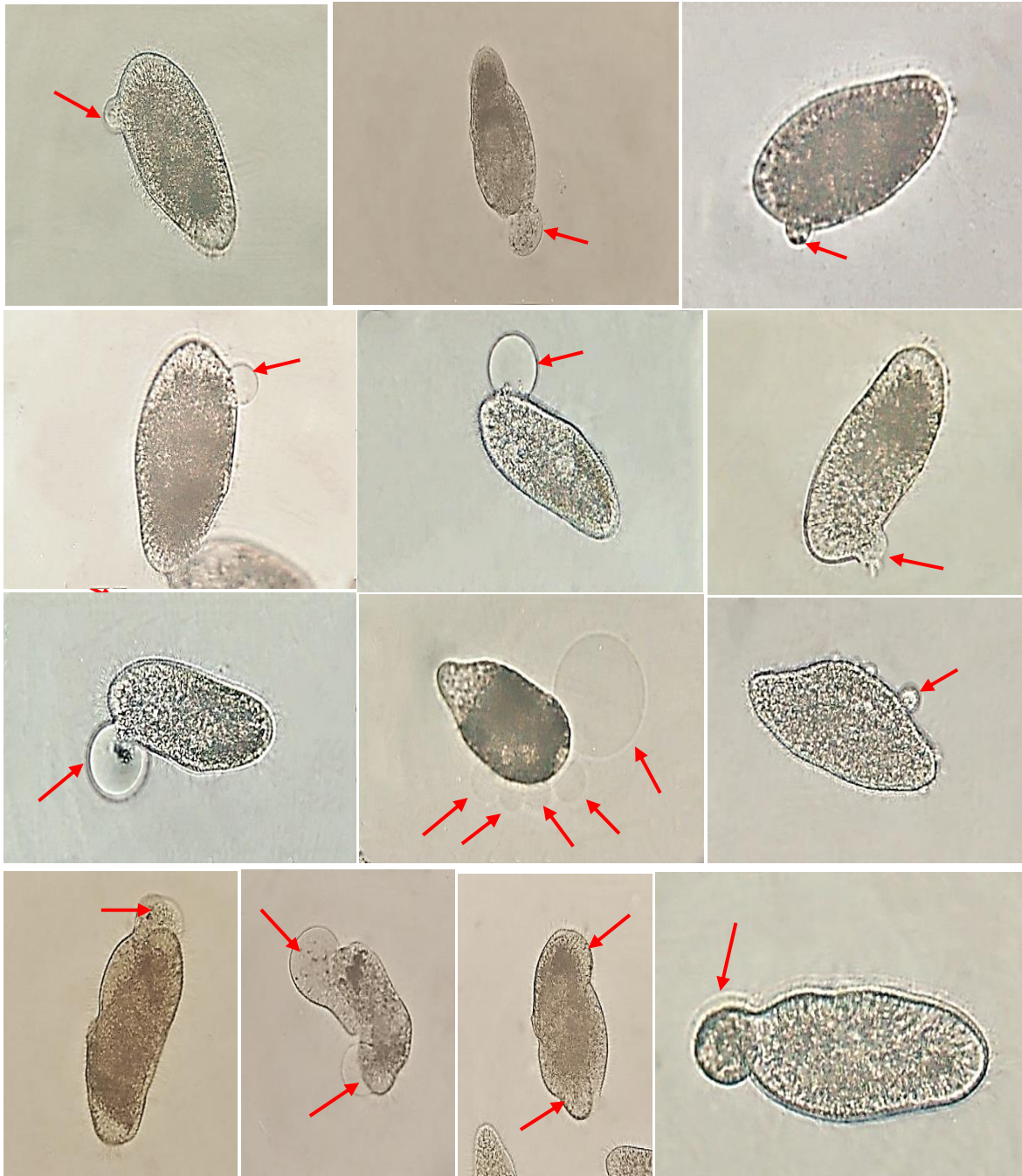


Planche 2 : Formation de vésicules et des bourgeonnements au niveau de la membrane cellulaire (Gr $\times 20 \times 10$).

Chapitre IV : Comportement, embryotoxicité et atteintes structurelles et membranaires

La planche (3) met en évidence un cytoplasme opaque et condensé suite à la rupture des vacuoles et du noyau et la diffusion de leurs contenus dans le milieu intracellulaire.

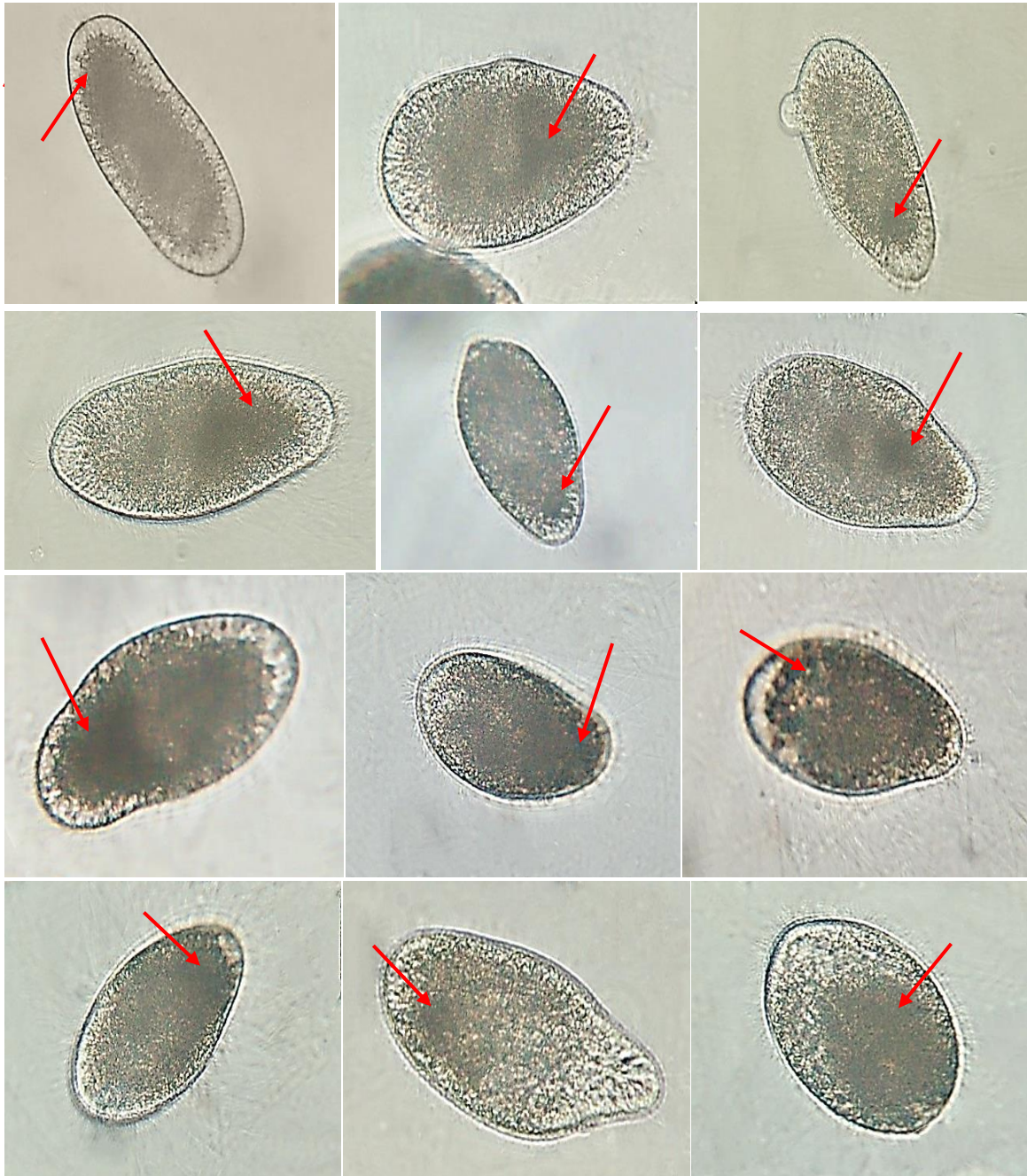


Planche 3 : Cytoplasme opaque et condensé (Gr $\times 20 \times 10$).

Chapitre IV : Comportement, embryotoxicité et atteintes structurelles et membranaires

La planche (4) montre des vésicules qui augmente de volume avec le temps et finissent par éclater provoquant ainsi la libération des constituants cellulaires et une dissolution complète de la cellule (planche 5).

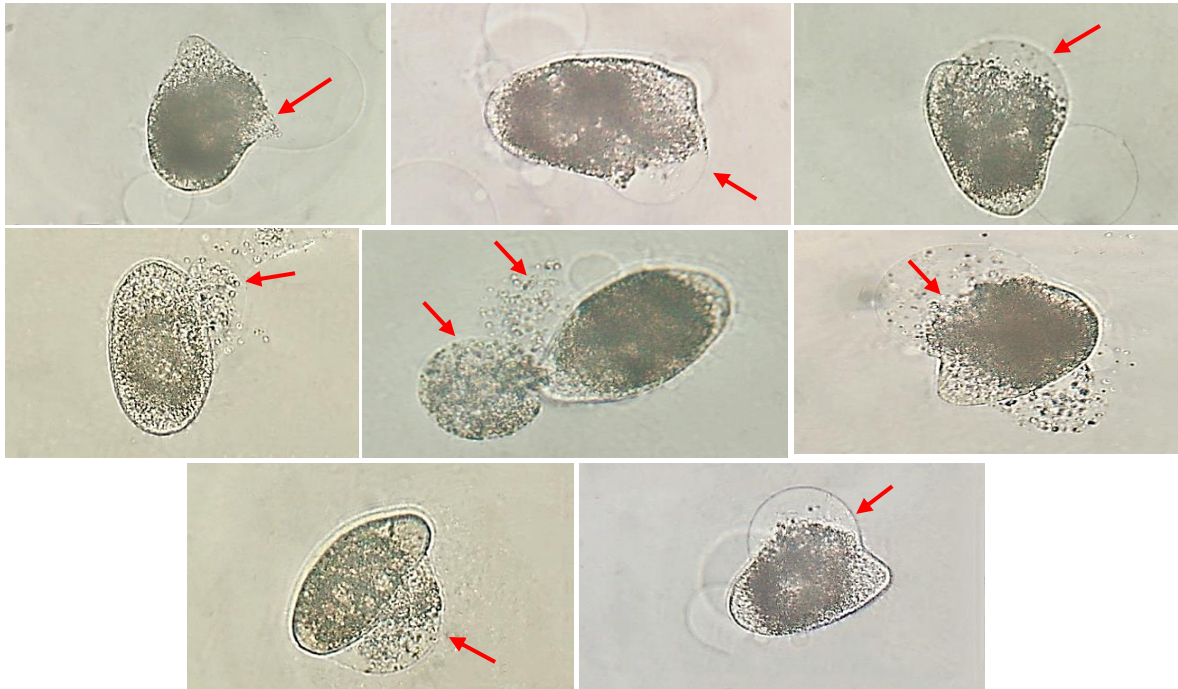


Planche 4 : Rupture au niveau membranaire et libération du contenu cellulaire (Gr $\times 20 \times 10$).

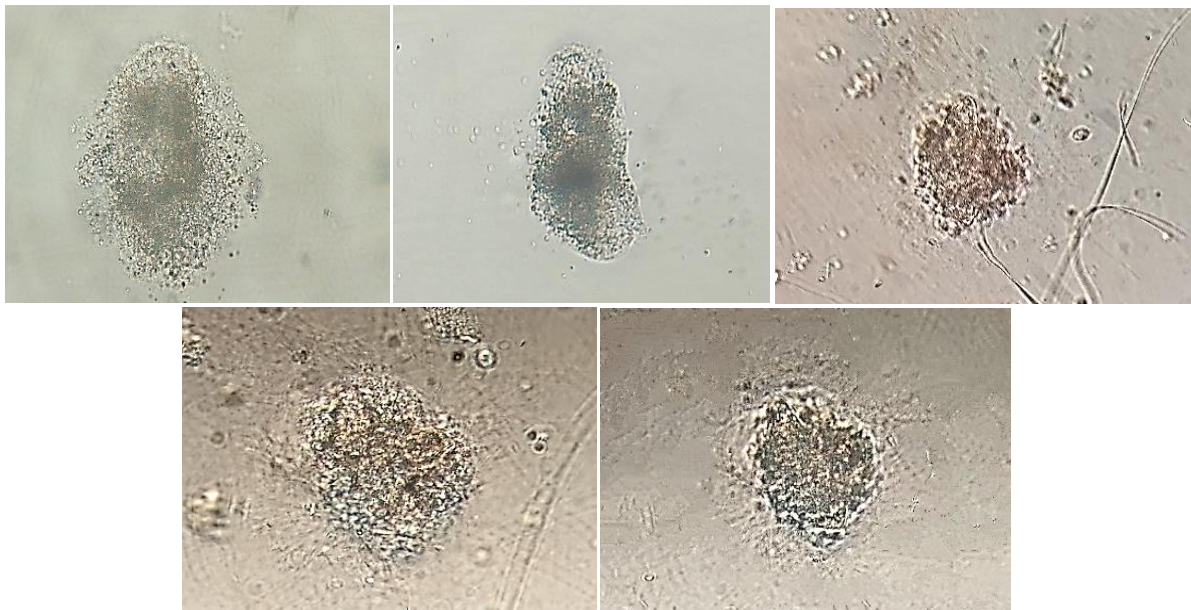


Planche 5 : Apoptose et lyse cellulaire (Gr $\times 20 \times 10$).

3.1.2. Effets des Nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur les trajectoires de déplacement.

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. (Planche 6).



Planche 6 : Trajectoires de *Paramecium sp* témoin

Tout changement de direction dans le mouvement indique une toxicité chez les paramécies. Les perturbations des mouvements se manifestent par un mouvement zig zag (planche 7A) et des changements brutaux de direction accompagnés d'une nage en arrière (backward swimming) (planche 7B). En effet, les paramécies présentent une nage impliquant divers mouvements caractérisés par des mouvements circulaires (planche 7C) et d'autres désordonnés (planche 8).

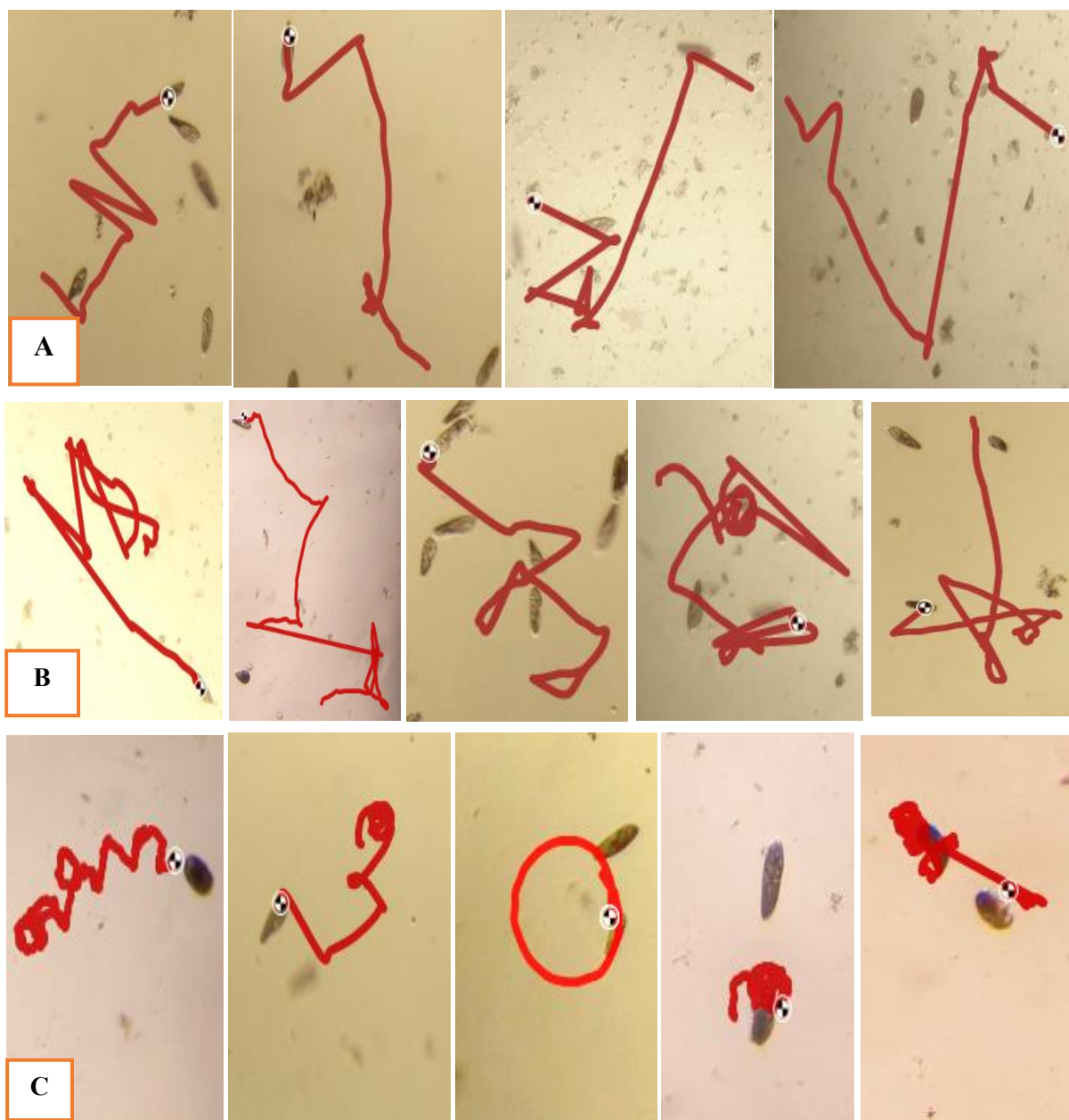


Planche 7 : Trajectoires des paramécies traitées par les fortes concentrations des nanoparticules de CuO (120 mg/l), du Chlorpyrifos (1.25 et 1.5 mg/l) et de leurs combinaisons (M3 et M4)

(A) : Mouvements en zigzag, (B) : Changements brutaux de directions et retours en arrière, (C) : mouvements circulaires.

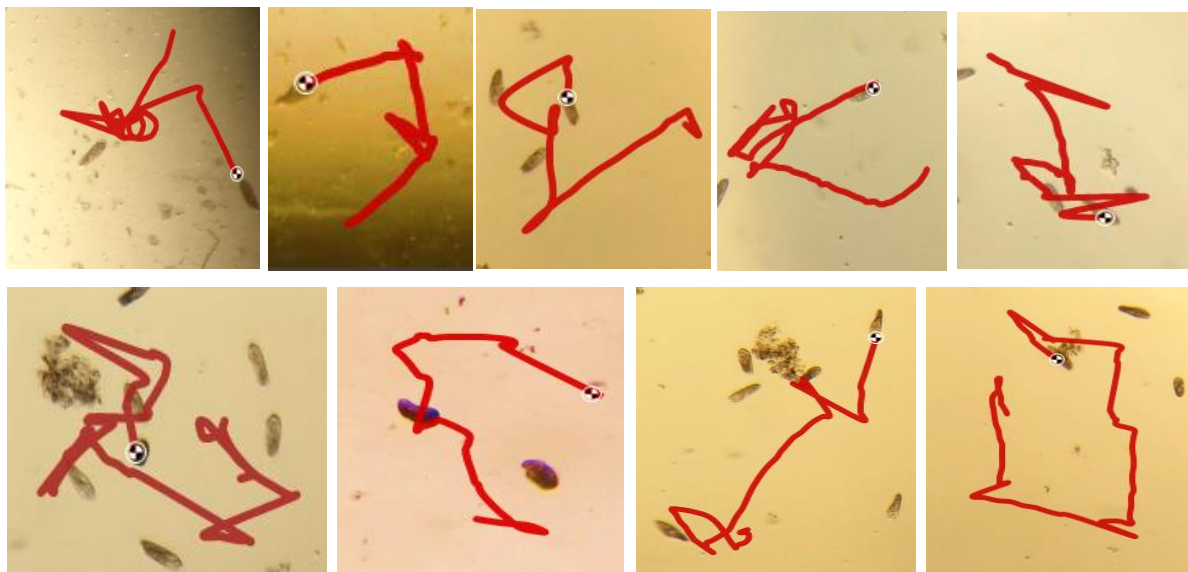


Planche 8 : Mouvements désordonnés et aléatoires induits chez *Paramecium sp* suite au traitement par les nanoparticules de CuO (120 mg/l), le Chlorpyrifos (1.25 et 1.5 mg/l) et leurs combinaisons (M3 et M4)

3.2. Cas de *Daphnia magna*

3.2.1. Effets des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur le développement embryonnaire

Les planches 9, 10 et 11 et 12 représentent les différentes anomalies développementales induites chez les nouveau-nés de *Daphnia magna* issues de mères exposées aux concentrations croissantes des nanoparticules de CuO et/ou le Chlorpyrifos.

L'exposition maternelle aux nanoparticules de CuO, au Chlorpyrifos et à leurs mixtures comprend des anomalies dans le processus d'organogénèse représentées par la courbure (planche 9) ou l'absence de l'épine caudale (planche 10), un raccourcissement des antennes secondaires et l'inexistence des soies, (planche 11). Certains individus présentent des altérations morphologiques au niveau de leurs carapace (planche 12).



Figure 47 : Observation microscopique d'une néonate de *Daphnia magna* témoin
(Gr $\times 10 \times 10$)



Planche 9 : Courbure de l'épine caudale (Gr $\times 10 \times 10$).



Planche 10 : Absence de l'épine caudale (Gr $\times 10 \times 10$)



Planche 11 : Raccourcissement des antennes secondaires et l'inexistence des soies
(Gr $\times 10 \times 10$)



Planche 12 : Des déformations au niveau de la carapace et de l'épine caudale (Gr $\times 10 \times 10$)

3.2.2. Effets des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures sur les trajectoires de déplacement

Les trajectoires enregistrées par les daphnies témoins sont représentés dans la Planche 13. Nous constatons que les daphnies témoins se déplacent par des mouvements saccadés en effectuant de lentes migrations horizontales et verticales assurés par les battements de leurs antennes secondaires.



Planche 13 : Trajectoires de mouvements enregistrées par les témoins de *Daphnia magna*.

Les planches (14) et (15) représentent les différentes trajectoires de *Daphnia magna* après l'exposition aux différentes concentrations des nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs combinaisons, nous constatons une perturbation du comportement natatoire exprimée par des mouvements en zig-zag avec des trajectoires complètement désordonnées et irrégulières (planche 14). Nous observons également des mouvements aléatoires avec des changements fréquents de direction (planche 15).

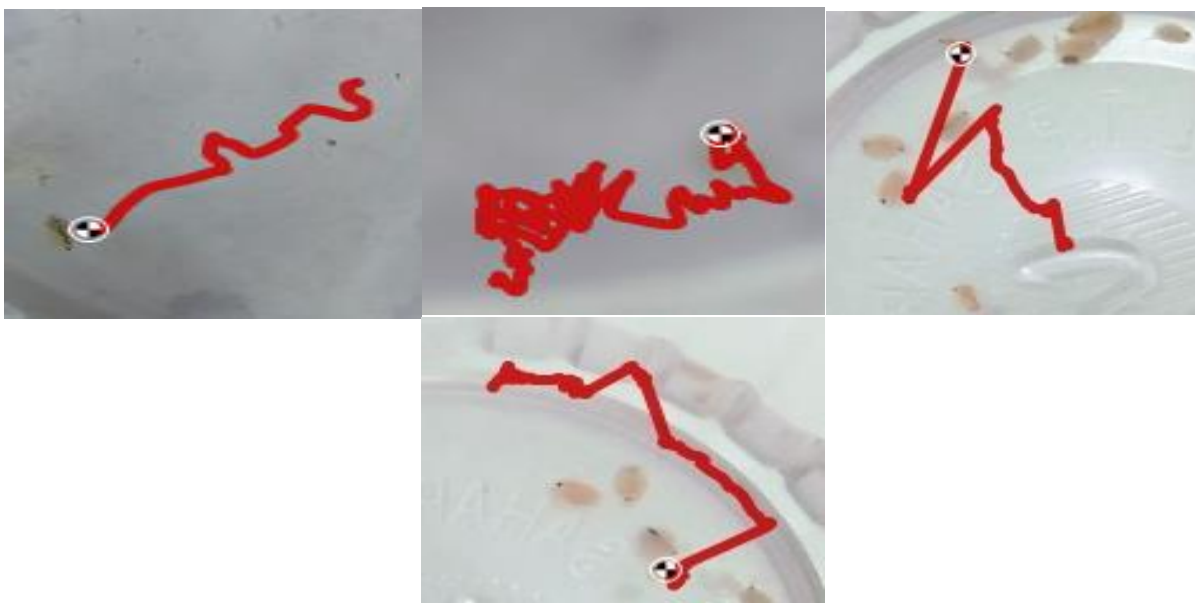


Planche 14 : Trajectoires en zig-zag induites chez *Daphnia magna* par l'exposition aux plus fortes concentrations du Chlorpyrifos (2 et 4 $\mu\text{g/l}$) et la combinaison CuO/NPs-Chlorpyrifos (M3 et M4).

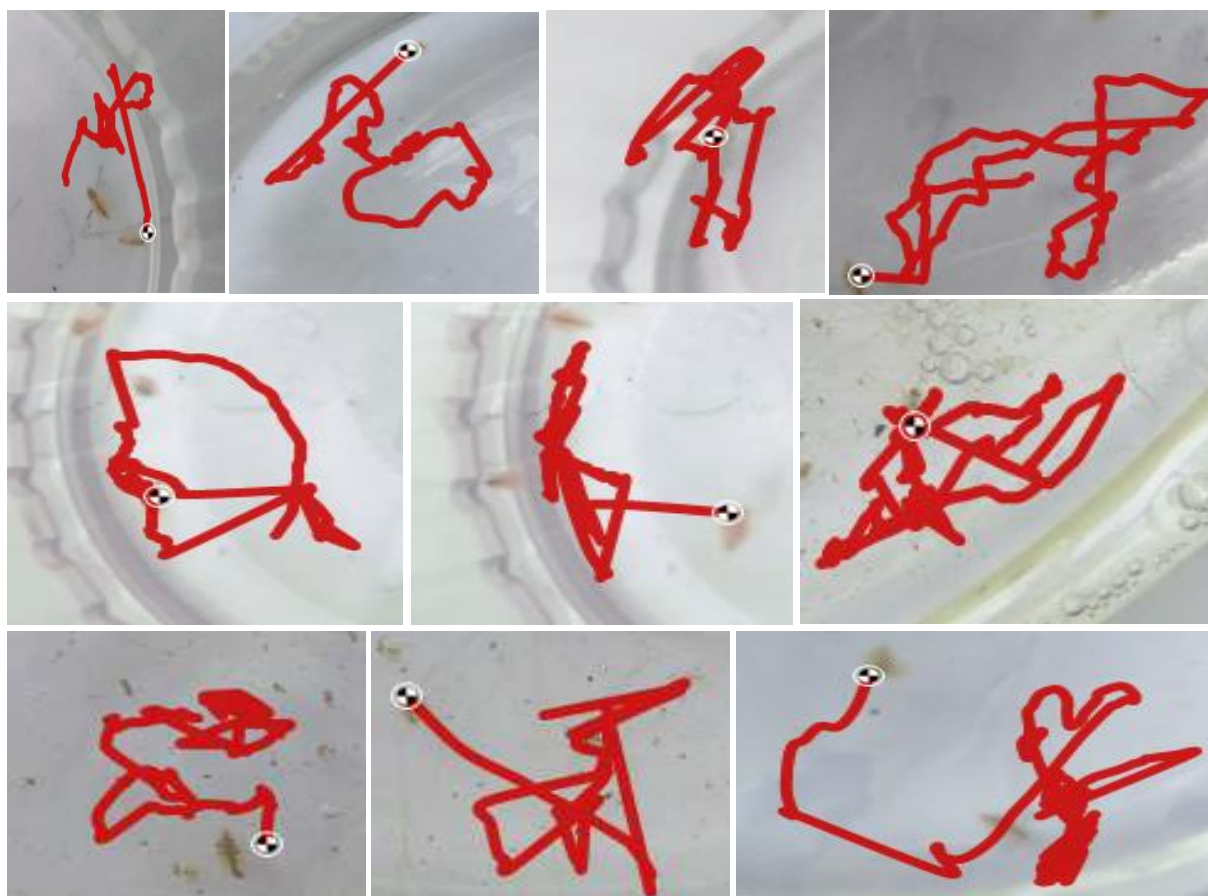


Planche 15 : Mouvements aléatoires observés chez *Daphnia magna* exposées aux plus fortes concentrations des nanoparticules de CuO (45 et 60 mg/l), du Chlorpyrifos (2 et 4 $\mu\text{g/l}$) et de leurs mixtures (M3 et M4).

4. Discussion

La morphologie des paramécies résulte de l'interaction spécifique de la membrane cellulaire et du cytosquelette. 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 épiplasmines.

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. Il

Chapitre IV : Comportement, embryotoxicité et atteintes structurales et membranaires

assure une certaine rigidité à la cellule et sert à la fixation des organites. Il gouverne les mouvements internes dans la cellule tels que le déplacement des chromosomes et des organites cellulaires comme les mitochondries ou le noyau

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 ; Azzouz, 2012). Cette interaction peut être altérée sous l'effet de certains agents physiques ou chimiques, générant des dommages structuraux au niveau de la membrane et du 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, 2003).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence des modifications morphologiques des paramécies en présence des deux xénobiotiques et de leurs combinaisons. Ces résultats corroborent ceux de Fuentes-Valencia (2020) ; Azzouz, (2012) ; Amamra, (2015) ou encore Moumni, (2017) chez les ciliés d'eau douce *Tetrahymena sp* et *Paramecium tertraurelia* après traitement respectivement par les nanoparticules d'argent (Ag-NPs), le Glyphosate, la Cyperméthrine et le Cycloxydime.

Pudpong et Chantangsi, (2015) stipulent que les métaux lourds peuvent induire des altérations membranaires, entraînant une désorganisation osmotique qui, en fin de compte conduit à la vacuolisation cellulaire (Smith, 1983). En outre, plusieurs études ont montré que les métaux lourds, tels que Cd, Cu, et Pb, ont des effets importants sur l'organisation de l'actine et de la tubuline (Eun et *al*, 2000 ; Liu et *al.*, 2009 ; Olabarrieta et *al*, 2001). Ces deux protéines sont les principaux composants du cytosquelette et fonctionnent comme des échafaudages cellulaires, maintenant la forme des cellules. En outre, peu de temps après l'exposition des organismes aux métaux lourds, une rupture cellulaire est observée pour une majorité de cellules, confirmant la toxicité sévère des métaux pour l'organisme. Cela peut être le résultat de l'accumulation des métaux sur la membrane plasmique, entraînant la destruction de leur intégrité et conduisant finalement à la lyse cellulaire (Madoni & Romeo, 2006).

Ainsi, Rao et *al.* (2006, 2007) ont mis en évidence une corrélation entre les déformations structurales et la toxicité des pesticides pouvant être considérées, à juste titre, comme un début d'alerte d'une cytotoxicité et refléter l'état de stress de l'organisme.

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). Tous 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).

Harris (1990) stipule que 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 *Paramecium 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.

Nos résultats corroborent les travaux cités ci-dessus, puisque nous avons mis en évidence une irrégularité du pourtour cellulaire (Bourgeonnements) ainsi que des modifications structurales (Gonflement, asymétrie, cellules en forme sphéroïdes), ayant pour conséquence la lyse cellulaire.

D'un autre côté, une multitude de trajectoires après traitement par les nanoparticules de CuO, le Chlorpyrifos et leurs mixtures. Nos observations concordent avec les travaux de Azzouz (2012), Moumni (2016) ou encore Sbartai. (2013) qui ont étudié l'effet du Glyphoste, le Cycloxydime et le Bifénazate sur les trajectoires de déplacement sur la paramécie. 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. Si le stimulus provient de tous les côtés, la paramécie présente une nage aléatoire avec des changements brutaux des directions (Kung, 1971 ; Hildebrand et Dryl, 1983 ; Machemer, 2001).

Zagata *et al.* (2015) ont observé après l'incubation des cellules de *Paramecium bursaria* dans le Chlorure de Nickel une diminution de la vitesse de déplacement, une nage vers l'arrière, un phénomène de pivotement, d'encerclement et un mouvement vers l'avant dans une nouvelle direction.

Selon Van Houten et Preston (1988), les paramécies détectent la présence de nombreuses substances chimiques dans leur milieu et réagissent face à ce type de stimuli en changeant leur comportement migratoire/ natatoire. L'ensemble de ces modifications des voies de migration ou des trajectoires de déplacement impliquent une augmentation et/ou une diminution de la vitesse de nage, des altérations de l'amplitude ou la fréquence de rotation et

Chapitre IV : Comportement, embryotoxicité et atteintes structurales et membranaires

des changements brusques de direction de migration. Ce mécanisme électrophysiologique de la chimio-orientation est appelé « Chemokinesis » (Chimiokinèse).

Il a été démontré que de nombreux polluants environnementaux provoquent une toxicité en perturbant le fonctionnement normal du système endocrinien chez les animaux et les humains (Guillett et Crain, 1999). Ces substances chimiques comprennent une grande variété de pesticides, de produits pharmaceutiques et de produits industriels.

De nombreux produits chimiques environnementaux peuvent avoir des effets néfastes sur la mue, la reproduction et le développement embryonnaire chez les crustacés. Ainsi, la mue est inhibée par les métaux lourds (Weis et *al.*, 1992), les polychlorobiphényles (PCB) (Fingerman et Fingerman, 1977) et le benzène (Cantelmo et *al.*, 1981). De plus, certains contaminants (4-nonylphénol, propiconazole, butoxyde de pipéronyle) sont capables d'interférer avec le développement embryonnaire des daphnies, entraînant l'arrêt de certains processus de développement (Kast-Hutcheson et *al.*, 2001, LeBlanc et *al.*, 2000).

Nos résultats ont mis en évidence que les nanoparticules de CuO, le Chlorpyrifos et leurs mixtures affectent amplement le développement embryonnaire de *Daphnia magna* en induisant l'apparition de diverses malformations consistant en un courbement de l'épine caudale, un raccourcissement des antennes secondaires et des soies, des déformations au niveau de la carapace et des atteintes au niveau du tube digestif. Des résultats similaires ont été enregistrés par Moumni (2017) et Gaete et *al.* (2013) chez les embryons de *Daphnia magna* et *Daphnia obtusa* après traitement par le Cycloxydime et le Methomyl respectivement.

L'augmentation des anomalies du développement embryonnaire peut être liée à la diminution des ecdystéroïdes dans les embryons, car ils sont essentiels au développement normal de l'embryon. (Creuzburg et *al.*, 2007 ; Mu and LeBlanc, 2004) ainsi, ce sont les principales hormones impliquées dans le contrôle du processus de d'embryogenèse. (Subramoniam 2000 ; Mu et LeBlanc 2002a).

D'après Massarin (2010). L'apparition de malformations embryonnaires impliquent que les daphnies échangent activement les fluides entre la poche incubatrice et le milieu environnant pour satisfaire la demande en oxygène des embryons. Par ce processus, les embryons peuvent être exposés à un certain nombre de contaminants perturbant leur développement.

De même, Grzesiuk et *al.*, (2020) expliquent l'apparition des malformations par la diminution de l'élasticité des membranes phospholipidiques. Les embryons de daphnies se développent rapidement, il est donc important que leurs membranes restent flexibles. De plus,

la rigidité structurale peut altérer la mobilité des protéines dans la membrane, inhiber leur fonction et endommager la cellule.

Plusieurs auteurs font état de la toxicité de différentes nanoparticules d'oxydes métalliques sur des embryons de poisson zèbre et beaucoup d'entre eux ont étudié la toxicité des nanoparticules du ZnO (Brun *et al.*, 2014 ; Bai *et al.*, 2010 ; Zhu *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2014). Bai *et al.* (2010) ont observé que les nanoparticules de ZnO entraînent la mortalité des embryons du poisson zèbre à des concentrations de 50 et 100 mg / L, tandis qu'à des concentrations plus faibles, ils réduisent la longueur du corps et l'éclosion retardée des embryons. En outre, Zhu *et al.* (2009) rapportent que ZnO-NPs affecte le taux d'éclosion du poisson zèbre *Danio rerio*.

D'après les travaux de Nations *et al.* (2011). Les nanoparticules de CuO semblent augmenter les malformations et éventuellement réduire la croissance des têtards *Xenopus laevis*. Ainsi, le CuO-NPs aurait une plus grande probabilité d'être absorbé par le tractus gastro-intestinal et transporté vers d'autres parties du corps du têtard ce qui pourrait conduire à une variété accrue de malformations.

Nos résultats ont mis en évidence des perturbations de la nage aux plus fortes concentrations des deux xénobiotiques et de leurs mixtures. Ces changements de comportements sont caractérisés par des trajectoires zig zag ainsi que des mouvements complètement désorganisés et aléatoires. Des observations similaires ont été rapportées par Moumni, (2016) qui a analysé la réponse comportementale de *Daphnia magna* en présence de différentes concentrations de Cycloxydime. Les altérations de ce paramètre peuvent suggérer des troubles du système nerveux des crustacés se manifestant par divers symptômes tels que la perte d'orientation. (Bownik, 2017).

De nombreux auteurs ont noté que divers facteurs influent sur l'activité de natation des daphnies tel que la température, les travaux de Bownik *et al.* (2014) ont montré que l'exposition de *Daphnia magna* à un stress thermique entraîne une perturbation des mouvements natatoires. En effet, à une température de 37° C, les daphnies nagent de façon erratique et rapide s'orientant dans toutes les directions, comparativement aux daphnies témoins qui se caractérisent par une homogénéité et une coordination des mouvements. Cependant, les daphnies exposées à une température de 40° C ont tendance à avoir des mouvements ralentis avec des trajectoires circulaires allant jusqu'à l'immobilisation complète à 42° C.

Une diminution de la locomotion et une augmentation de la ventilation de *Gammarus pulex* (Crustacé) exposée à des concentrations sublétales de Cuivre sont mises en évidence par

Chapitre IV : Comportement, embryotoxicité et atteintes structurelles et membranaires

Gerhardt (1995) par des études sur terrain. L'exposition de l'escargot d'eau douce *Thiara tuberculata* à une concentration de 1 mg/l de Cu a entraîné un mouvement normal pendant les 10 premiers jours et une réduction graduelle jusqu'à 20 jours. (Mule and Lomte, 1994). Roast et al. (2000a, 2000b) ont étudié le comportement natatoire de *Neomysis integer* et, après 7 jours d'exposition au Cadmium et au Chlorpyrifos, rapportent que la capacité et l'orientation des organismes sont affectées à partir de concentrations significativement plus faibles que celles provoquant la mortalité. Un résultat similaire est rapporté pour le crustacé *Palaemon serratus* exposé à différents insecticides, tels que le fénitrothion et la deltaméthrine qui inhibent leur vitesse (Oliveira et al., 2012, 2013).

5. Conclusion

La caractérisation des atteintes morphologiques et développementales est apparue comme une bonne approche complémentaire pour l'évaluation des effets des polluants sur les organismes non cibles. Nos résultats ont révélé que l'exposition de *Paramecium sp* et *Daphnia magna* aux nanoparticules de CuO et/ou le Chlorpyrifos a provoqué d'importantes anomalies au niveau morphologique et développemental. Ainsi, l'étude comportementale a montré une perturbation au niveau du comportement des paramécies et des daphnies à travers la modification de leurs trajectoires de déplacement confirmant l'effet toxique des deux composés seuls et en mélange.

Chapitre V : Conclusion générale et perspectives

Le principal objectif de notre travail est d'étudier les effets de deux xénobiotiques, les nanoparticules de CuO (CuO-NPs), le Chlorpyrifos (CPF) et leurs mixtures sur deux organismes aquatiques d'eau douce : *Paramecium sp* et *Daphnia magna*. Nous avons choisi plusieurs paramètres physiologiques et enzymatiques considérés comme d'excellents biomarqueurs de toxicité, **cependant un intérêt particulier est consacré aux modifications morphologiques, au mouvement et aux trajectoires des organismes étudiés car ils peuvent constituer d'excellents biomarqueurs de la pollution chimique dans le cadre des bioessais car ils obéissent parfaitement à la théorie des 5Rs.**

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux effets des deux xénobiotiques et leurs mixtures sur la croissance, les variations physiologiques potentielles et le métabolisme respiratoire chez les deux modèles étudiés. Nous avons mis en évidence une inhibition de la croissance de *Paramecium sp*, cette inhibition est confirmée par les différents paramètres de croissance (pourcentage de réponse positif, diminution du nombre et de la vitesse de génération ainsi qu'une augmentation du temps de génération). D'autre part, nos résultats ont montré une augmentation du taux d'immobilisation chez *Daphnia magna*, plus importante chez les individus traités par la combinaison CuO-NPs/Chlorpyrifos. L'étude polarographique a mis en évidence une perturbation du métabolisme respiratoire ce qui confirme leur effet toxique sur la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant à la génération des ROS puisque ces derniers ainsi que les radicaux libres ont la capacité de perturber cette chaîne via l'altération de l'activité ATPase.

La deuxième partie de notre travail est consacrée à l'étude du stress oxydant induit par les nanoparticules de CuO et/ou le Chlorpyrifos à travers le suivi des biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques les plus représentatifs. En effet, nous avons démontré une induction de l'activité SOD, CAT et GST parallèlement à une diminution de la teneur en GSH, confirmant dans un premier temps la mise en place du processus de détoxification. Cependant l'augmentation du taux de MDA témoigne de la survenue d'une peroxydation lipidique qui est due probablement aux effets toxiques induits par les radicaux libres produits lors de la métabolisation du Chlorpyrifos et par la présence de concentrations élevées de NPs et de leurs mixtures sachant que la présence simultanée de l'organophosphoré et des NPs est à l'origine d'un phénomène décrit par de nombreux chercheurs appelé **effet « cheval de Troie »** et qui est du à l'adsorption de l'organophosphoré sur la surface des NPs créant ainsi une nouvelle

structure chimique complexe dont la toxicité est peu connue et dont la métabolisation pourrait être à l'origine de métabolites réactifs toxiques.

Enfin, la troisième partie de notre travail a révélé que le traitement par les nanoparticules de CuO et/ou le Chlorpyrifos induit des modifications morphologiques chez les paramécies se manifestant par l'apparition de bourgeonnements et des lésions cytologiques conduisant parfois à la lyse cellulaire en raison des dommages structuraux survenus au niveau de la membrane et du cytosquelette.

Chez les daphnies, l'exposition des œufs aux deux xénobiotiques et leurs combinaisons pendant l'embryogénèse révèle la présence de différentes malformations touchant plusieurs organes des descendants, consistant en un recourbement ou une absence de l'épine caudale, un raccourcissement des antennes secondaires et une déformation de la carapace, ces perturbations indiquent un niveau de toxicité élevé.

Ces résultats laissent suggérer un effet sur tous les organismes d'un écosystème mis en contact avec ces xénobiotiques.

Le biomarqueur qui rend compte de la toxicité d'un xénobiotique et par conséquent des degrés de pollution sur la faune aquatique en un temps relativement court n'est rien d'autre que la trajectoire et le comportement locomoteur des microorganismes. Nous avons ainsi confirmé des changements dans la trajectoire des paramécies et des daphnies étroitement liés aux concentrations de xénobiotiques dans leur milieu. Ces tests sur les atteintes potentielles de la motilité et de la trajectoire sont parfaitement reproductibles fiables et rapides et confirment la toxicité des xénobiotiques testés et de leurs mixtures.

A l'issue de ce travail nous pouvons conclure que *Paramecium sp* et *Daphnia magna* sont des espèces sentinelles de choix pouvant être utilisées dans les programmes de biosurveillance des écosystèmes aquatiques et que certains biomarqueurs tels que la trajectoire peuvent constituer un premier indicateur **en amont** de la pollution du milieu aquatique ou marin. Ainsi, nous avons montré que la pollution chimique est complexe et qu'il faut l'aborder de manière plus pragmatique en tenant compte de la présence de molécules diverses et que certains mélanges de polluants comme les nanoparticules de CuO et les organophosphorés (Chlorpyrifos) sont capables d'exercer des effets spécifiques dont il faut tenir compte dans la biosurveillance des écosystèmes.

En Perspectives :

Afin de valider l'étude des effets combinés des nanoparticules et des pesticides organophosphorés, nous recommandons :

D'utiliser des mélanges plus complexes que les mélanges binaires. Cela permettrait de mettre en avant les effets combinés « multiples » qui peuvent intervenir au niveau d'un écosystème aquatique.

Réaliser une étude *in silico* qui utilise la modélisation mathématique de données toxicologiques obtenues *in vitro* et *in vivo* dans le but de prédire les effets à long terme de l'exposition aux nanoparticules de CuO, du Chlorpyrifos et de leurs mixtures.

Et enfin, procéder à des essais sur d'autres organismes tels que les bactéries, les algues ou les poissons, d'une part en raison de leur sensibilité aux mélanges nanoparticules-pesticides et d'autre part, pour une évaluation des risques écologiques plus globale.

Références Bibliographiques

A

Abello A., 2019. Spécialisation de Ku80c dans le couplage entre coupure et réparation de l'ADN lors des réarrangements programmés du génome chez *Paramecium tetraurelia*. Thèse de doctorat, Université de Paris-Saclay, 207 p.

Adam-Vizi V., 2005. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7 :1140–1149.

Agonisti M.G., Natale G.S., Ronco A.E., 2010. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hybsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology*, 19, 1545-1550.

Allaker R.P., 2010. "The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation". *J. Dent. Res*, vol. 89,1175-1186.

Almofti M.R., Ichikawa T., Yamashita K., Terada H., Shinohara Y., 2003. Silver ion induces a cyclosporine A-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome c. *Biochem J* 134:43-49.

Amamra R., 2015. Etude de la toxicité de composés des pyréthrénoïdes utilisés en Algérie sur un modèle alternatif : *Paramecium tetraurelia*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, 134 p.

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

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

Amiard J.C., Amiard Triquet C., 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier.

Amiard-Triquet C and Amiard J., 2013. Behavioral Ecotoxicology. Ecological Biomarkers - Indicators of Ecotoxicological Effects. Boca Raton, USA, CRC Press. and amphibians. Annual Book of ASTM Standards, pp 271-296.

ASTM, 1998. Standard practice for conducting toxicity tests with fishes, micro invertebrates and amphibians. Annual Book of ASTM Standards, 271-296.

Azzouz Z., 2012. Etude des effets toxiques d'un fongicide (Amistar Xtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 93 p.

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

B

Baek, Y.W et An Y.J., 2011. "Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*". Sei. Total Environ, vol. 409, 1603-1608.

Bahlil Y., 2018. Effet d'un extrait lipophilisé de *Zygophyllum album* (*Zygophyllacée*) sur l'équilibre glycémique, le profil lipidique et les statuts redox et inflammatoire, chez les rats Wistar rendus hypercholestérolémiques et diabétiques. Thèse de Doctorat, Université Ahmed Ben Bella, Oran, 166 p.

Bai W., Zhang Z., Tian W., He X., Ma Y., Zhao Y., Chai Z., 2010. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: A physicochemical study of toxicity mechanism. J. Nanopart. Res, 12, 1645-1654.

Baker T.J., Tyler C.R., Galloway T.S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 186, 257–271. doi: 10.1016/j.envpol.2013.11.014.

Balali-Mood M., and Balali-Mood K., 2008. Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements. Arch Iran Med 11, 65-89.

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

Baratli Y., 2015. Etude de la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4) chez le rat : analyses mitochondriales et du stress oxydant. Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg, 137 p.

Batsch D., 2011. L'impact des pesticides sur la santé humaine. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré - Nancy 1-Lorraine, 165 p.

Bayrasy C., 2013. Influence de la lipophilisation de l'acide rosmarinique sur ses propriétés antioxydantes. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 197 p.

Bazzi L.H., 2010. Etude de la persistance de quelques pesticides dans la culture du haricot vert dans la région de Souss Massa. Thèse de doctorat en science, Spécialité environnement Université Ibn Zohr : Ecole nationale des sciences appliquées, Agadir, 139 p.

Belanger D., 2009. Utilisation de la faune macrobenthique comme bioindicateur de la qualité de l'environnement marin côtier. Sherbrooke, Québec, Canada, 74p.

Bello D., Hart A.J., Ahn K., Hallock M., Yamamoto N., Garcia E.J., Ellenbecker M.J., Wardle B.L., 2008. Particle exposure levels during CVD growth and subsequent handling of vertically-aligned carbon nanotube films. *Carbon* 46, 974-977. doi : 10.1016/j.carbon.2008.03.003.

Benbouzid H., 2012. Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricides sur des protistes ciliés. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 87 p.

Bennamara F.Z., 2017. Stress oxydant et Pathologies Humaines. Thèse de Doctorat, Université Mohammed V-Rabat, 105 p.

Benoit-Chabot V., 2014. Les facteurs de sélection des bioindicateurs de la qualité des écosystèmes aquatiques : Elaboration d'un outil d'aide à la décision. Thèse de Doctorat, Université de Sherbrook, 104 p.

Berrebah H., 1990. Etude du contrôle de la mobilité flagellaire et ciliaire par le calcium. Effet du lindane, insecticide organochloré. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VII : 144 p.

Berthet B., 2008. Les espèces sentinelles. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, Amiard et Amiard-Triquet. Eds., Lavoisier TEC & DOC, Paris, 121-148.

Blinova I., Heinlaan M., Kahru A., 2010. Ecotoxicity of Nanoparticles of CuO and ZnO in Natural Water. *Environmental Pollution* 158(1) : 41-47.

Bnaru D et Perez T., 2010. Bioindicateurs- biomarqueurs, notes de cours. Marseille. Université de Marseille, 15p. http://www.com.univ-mrs.fr/bodouresque/Master_océanographie_Biologie_Ecologie_Marine/UE_363_PROT_1_cours_Banaru_Bioindicateurs_biomarqueurs_2010.pdf.

Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru M., 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: a critical review. *Arch Toxicol* 87,181-1200.

Bouaricha H., 2013. Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium sp.*). Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 131 p.

Bouarroudj T., Benloucif M.R., Mekki D.E., Djekoun M., Benamara M., Berrebah H., 2016. Cytotoxic effect of SnO₂ nanoparticles on alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia*. *Studia Universitatis "Vasile Goldiș", Seria Științele Vieții*, 323-330.

Boulassel A., 2014. Evaluation de la toxicité de deux médicaments : le Paracétamol et l'Ibuprofène, sur un modèle cellulaire : *Paramecium tetraurelia*. Essai à l'échelle subcellulaire. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 134 p.

Boumhras M., 2012. Evaluation de la Toxicité de Moules de 2 Sites de la Côte Atlantique Marocaine (Jorf Lasfar et Oualidia) Utilisées Comme Bioindicateurs de Contamination : Etude *In vivo* et *In vitro* sur des rats et des Cellules β -Pancréatiques Murines (MIN-6). Thèse de Doctorat, Université De Bourgogne, 157 p.

Bounedjah O., 2014. Mécanismes d'assemblage des granules de stress dans des conditions de stress oxydatif et osmotique. Thèse de Doctorat, Université d'Evry Val D'Essonne, 150 p.

Bour A., 2015. Effets écotoxicologiques de nanoparticules de dioxyde de cérium en milieu aquatique : d'une évaluation en conditions monospécifiques à l'étude de chaînes trophiques expérimentales en microcosmes. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France, 271 p.

- Bowman G.L., Shannon J., Frei B., Kaye J.A et Quinn J.F., 2010.** Uric acid as a CNS Antioxidant. *J Alzheimer Dis*, Vol 19, No 4,1331-1336.
- Bownik A., 2017.** Daphnia swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. *Science of the Total Environment* 601-602, 194-205.
- Bownik A., Stepniewska Z., Skowronski T., 2014.** Protective effects of ectoine on heat-stressed *Daphnia magna*. *J. Comp B.* 184(8). 961-976.
- Braquenier J.B., 2009.** Etude de la toxicité développementale d'insecticides organophosphorés : Analyse comportementale de la souris CD1. Thèse de Doctorat, Université de Liège, 200 p.
- Brun N.R., Lenz M., Wehrli B., Fent K., 2014.** Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: Importance of zinc ions. *Sci. Total Environ*, 476–477, 657–666.
- Burgeot T., Bustamante P., Fort J., Coutellec M.A., Azam D., Olivier G., Chaumot A., Armengaud J., Maltby L., Minier C., 2020.** Etude de la qualité des milieux aquatiques : Caractérisation des impacts écotoxiques. ISTE éditions, 70 p.
- Burton K., Taylor D.L., 1997.** Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature*, 385: 450-454.

C

- Canesi L., Betti M., Fabbri R., Canonico B., Fantinati A., Marcomini A., Pojana G., 2008.** Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environnement International* 34(8) : 1114-1119.
- Canesi L., Ciacci C., Valloto D., Gallo G., Marcomini A., Pojana G., 2010a.** In vitro Effects of Suspensions of Selected Nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. *Aquatic Toxicology* 96(2): 151-158.
- Canesi L., Fabbri R., Gallo G., Valloto D., Marcomini A., Pojana G., 2010b.** Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano Carbon Black, C60 fullerene, Nano TiO₂, Nano SiO₂). *Aquatic Toxicology* 100(2): 168-177.

- Canli E., Canli M., 2021.** Antioxidant system biomarkers of freshwater mussel (*Unio tigridis*) respond to nanoparticle (Al_2O_3 , CuO, TiO_2) exposures. *Biomarkers*, 1-9.
- Cantelmo A.C., Lazell R.J., Mantel L.H., 1981.** The effect of benzene on molting and limb regeneration in juvenile *Callinectes sapidus*. *Mar Biol Lett* (2): 333-343.
- Celander M.C., 2011.** Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquat Toxicol*, vol. 105, no. 3-4 Suppl, 72-79.
- Champeau O., 2005.** Biomarqueurs d'effets chez *C. fluminea* : du développement en laboratoire à l'application en Mesocosme. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 1, 207 p.
- Charras G.T., Yarrow J., Horton M.A., Mahadevan L., Mitchison T.J. 2005.** Non equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature* 435: 365-369.
- Chen T.H., Lin C.C., Meng P.J., 2014.** Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Hazard. Mater*, 277, 134–140.
- Cherait A., Djebbar M.R., 2013.** Evaluation of dihydropyridine calcium antagonist effects on the stress bioindicator organism *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Biological Research*, 4(10) : 40-46.
- Cherait A., 2015.** Evaluation à l'échelle cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un composé de la famille des dihydropyridines sur un modèle expérimental bioindicateur de stress. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, 152 p.
- Chevalier J., 2015.** Utilisation du comportement natatoire de *Daphnia magna* comme indicateur sensible et précoce de toxicité pour l'évaluation de la qualité de l'eau. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux, 153 p.
- Chiali FZ., 2014.** Effets métaboliques d'un régime à base de purée de pomme de terre contaminée par les pesticides chez le rat Wistar. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen Algérie, pp11.
- Colbourne J.K., Pfrender M.E., Gilbert D., Thomas W.K., Tucker A., Oakley T.H., Tokishita S., Aerts A., Arnold G.J., Basu M.K., 2011.** The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science* 331, 555-561.
- Corliss J.O., Lacy D., Palay S.O., 1961.** Fixing and staining of protozoa in the Microtome's Vade-Mecum (Bolles-Lee). London X II e ed.

Corteau M.N., Dybowska A.D., Luoma S.N., Valsami-Jones E., 2011. A novel approach reveals that Zinc Oxide Nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology* 5(1): 79-90.

Costa C.S., Ronconi J.V., Daufenbach J.F., Gonçalves C.L., Tezza Rezin G., Luiz Streck E., Silva Paula M.M., 2010. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. *Mol Cell Biochem* 342:51–56.

Costa L.G., Giordano G., Guizzetti M., and Vitalone A., 2008. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci* 13, 1240-1249.

Costa L.G., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 366, 1-13.

Creuzburg D.M., Westerlund S.A., Hoffmann K.H., 2007. Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography– mass spectrometry (LC–MS). *Gen Comp Endocrinol*, 151:66–71.

Cunningham C.C., 1995., Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface chain kinase into dividing cell surface blebbing. *J. Cell. Biol.* 129: 1589-1599.

D

Dabrunz A., Duester L., Prasse C., Seitz F., Rosenfeldt R., Schilde C., Schaumann G.E., Schulz R., 2011. Biological Surface Coating and Molting Inhibition as Mechanisms of TiO₂ Nanoparticles Toxicity in *Daphnia magna*, *Plos One* 6(5).

Dastjerdi R et Montazer M., 2010. "A review on the application of inorganic nanostructured materials in the modification of textiles: Focus on antimicrobial properties". *Colloid. Surfaces B*, vol. 79, 5-18.

Dawar F.U., Zuberi A., Azizullah A., Khan Khattaka M.N., 2016. Effects of cypermethrin on survival, morphological and biochemical aspects of rohu (*Labeo rohita*) during early development. *Chemosphere*. 144. 697-705.

Deby C., (2009). Initiation au métabolisme de l’oxygène. [www.2/ulg.ac.be/cord/initiation au met oxygene/sommaire.html](http://www.2/ulg.ac.be/cord/initiation%20au%20met%20oxygene/sommaire.html).

Delgado K., Quijada R., Palma R., Palza H., 2011. "Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent". Lett. Appl. Microbiol, vol. 53, 50-54.

Dias N., Mortara R.A., Lima N., 2003. Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the *in vitro* cytotoxicity assessment of Triton X-100. Toxicology *in vitro*, 1- 9.

Djebar M.R., Djebar H., 2000. Bioénergétique, les mitochondries végétales. Synthèse 8, 23-25.

Djekoun M., 2016. Toxicité potentielle de 3 pesticides (Dithiocarbamates, Triazole et une mixture de Phenylpyrrole – Triazole) et leurs impacts sur un microorganisme : *Paramecium sp.* Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba. 109 p.

Djekoun M., Berrebbah H., Djebar M.R., 2015. Growth kinetics, monitoring of biomarkers and respiratory metabolism to evaluate the combined effects of fludioxonil and difenoconazole in a freshwater ciliated protist: *Paramecium sp.* Der Pharma Chemica, 7(11):197-204.

Djekoun M., 2012. Evaluation e l'effet du stress oxydatif généré par le Cadmium à l'échelle cellulaire : Cas de *Saccaromyces cerivisiae*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie, 149 p.

Domonique A., Cowart Stephanie M., Guida S., Ismat Sh., Adam G., 2011. Effects of Ag nanoparticles on survival and oxygen consumption of zebra fish embryos, *Danio rerio*. Journal of Environmental Sciences and Health 46(10), 1122-1128.

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

E

Ebert D., 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia. Bethesda Ecotoxicology: Current Knowledge and Future Issues Academic Press. 121 - 165.

Errami M., 2012. Devenir atmosphérique de bupirimate et transfert de ses métabolites (les diazines) dans l'atmosphère, sa dissipation dans les fruits de tomate et sa dégradation électrochimique. Thèse de Doctorat, Université Ibn Zohr, 212 p.

Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G., 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med*, 13, p. 341.

Ellis LA., Kissane S., Hoffman E., Brown J., Valsami-Jones E., John Colbourne., Lynch I., 2020. Multigenerational Exposures of *Daphnia magna* to Pristine and Aged Silver Nanoparticles: Epigenetic Changes and Phenotypical Ageing Related Effects. *Nano micro small*, 1-15.

Eun S.O., Youn H.S., and Lee Y., 2000. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiologia plantarum* 110: 357-365.

F

FAO, 1994. Revised Guidelines on environmental Criteria for the Registration of Pesticides.

Favier A., 2003. Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, n°269-270, 108-115.

Ferrondo M.D., Sancho E., Andreu-Moliner E., 1995. Effects of lindane on *Daphnia magna* during chronic exposure. *J. Environ Sci. Health B*, 30 (6), 815-825.

Fillatre Y., 2011. Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de doctorat, spécialité chimie analytique Université ANGERS, 267 p.

Fingerman S.W., Fingerman M., 1977. Effects of a polychlorinated biphenyl and polychlorinated dibenzofuran on molting of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Bull Environ Contam Toxicol* 18: 138-142.

Finney D.J., 1978. Statistical method in biological assay. 3rd ed. Charles Griffin & Co. Ltd, London, 508 pp.

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.

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

Fuentes-Valenciaa M.A., Fajer-Ávilab E.J., Chávez-Sánchezb M.C., Martínez-Palacios C.A., Martínez-Cháveza C.C., Junqueira-Machadoc G., Larad H.H., Raggie L., Gómez-Gilb B., Pestryakovf A.A., Bogdanchikovag N., 2020. Silver nanoparticles are lethal to the ciliate model *Tetrahymena* and safe to the pike silverside *Chirostoma estor*. *Experimental Parasitology* 209, 107825.

G

Gaete H., Olivares Y., Escobar C., 2013. Assessment of the effect of a commercial formulation of Methomyl on reproduction of *Daphnia obtusa* Kürz (1874). *Aquat. Res.*, 41(5): 979-984.

Galloway T., Lewis C., Dolciotti I., Johnston B.D., Moger J., Regoli F., 2010. Sublethal Toxicity of Nano-titanium dioxide and Carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution* 158(5): 1748-1755.

Galloway T.S., 2006. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Mar Pollut Bull* 53 (10-12), 606-613.

Gandar A., 2015. Réponse aux stress multiples chez les poissons : effets croisés de la température et des cocktails de pesticides. Thèse de Doctorat, Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), 309 p.

Gardès Albert M., Jore D., 2005. Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Ed Lavoisier. Paris, 1-23.

Gerhardt A., 1995. Monitoring behavioural responses to metals in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea) with impedance conversion. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2 (1), 15–23.

Ghenabzia I., 2017. Evaluation de risques mutagènes et cancérigènes de quelques pesticides utilisés par les agriculteurs dans la région du sud algérien. Thèse de Doctorat, Université Kasdi Merbah Ouargla Algérie, 175 p.

Giustarini D., Colombo G., Garavaglia ML., Astori E., Portinaro NM., Reggiani F., Badalamanti S., Aloisi AM., Santicci A., Rossi R., Milzani A et Dalle Done I., 2017. Assesment of glutathione/ glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radic Biol Med*, Vol 112, pp 360-375.

Giustarini D., Galvagni F., Donne ID., Milzani A., Severi FM., Santucci A et Rossi A., 2018. N-acetylcysteine ethyl ester as GSH enhancer in human primary endothelial cells: a comparative study with other drugs. *Free Radical Biology and Medicine*, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.013.

Gogendeau D., Keller A.M., Yanagi A., Cohen J., Koll F., 2005. A Novel Protein with RCC1-Like Domains Involved in Exocytosis in *Paramecium tetraurelia*. *Eukaryotic Cell*; 4(12): 2129-2139.

Gottschalk., Nowack B., Gawlik B., 2010. Report on exposure scenarios and release of nanomaterials to the environment. Nanex Project (WP5).

Goutayer M., 2008. Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo*. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie. 218 p.

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

Grillo C.A., Reigosa M.A., and de Mele M.A., 2010. "Does over-exposure to copper ions released from metallic copper induce cytotoxic and genotoxic effects on mammalian cells? *Contraception* 81(4): 343-349.

Grzesiuk M., Bednarska A., Pijanowska J., Markowska M., 2020. Morphological deformation of *Daphnia magna* embryos caused by prolonged exposure to ibuprofen. *Environmental Pollution*, 114-135.

H

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

- Habila S., 2018.** Evaluation du risque écologique et sanitaire de la contamination des eaux et des sédiments du barrage Beni Haroun (Wilaya de Mila). Thèse de Doctorat, Université 8 Mai 1945 de Guelma, 177 p.
- Hai D.Q., Varga S.Z.I., Matkovics M., 1997.** Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). Comp. Biochem. Physiol. Part C 117 :83–88.
- Hagger J.A., Jones M.B., Lowe D., Leonard D.R., Owen R., and Galloway T.S., 2008.** Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. Mar Pollut Bull 56 (6):1111-1118.
- Hampel M., Blasco J., & Díaz M.L., 2016.** Biomarkers and Effects. Marine Ecotoxicology, 121-165.
- Hanagata N., Zhuang F., Connolly S., Li J., Ogawa N and Xu M., 2011.** Molecular responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis. ACS Nano 5(12) : 9326-9338.
- Harrag A., 2010.** Concept de biosurveillance. Notes de cours. Sétif, Université Ferhat Abbas, 7p. <http://fr.calameo.com/read/0018058687a447e5d0152>.
- Harris A.K., 1990.,** Protrusive activity of the cell surface and the movements of tissue cells, in: N. Akkas (Ed.). Biomechanics of active movement and division of cells NATO ASI Series. Springer. Berlin, Heidelberg, 249-291.
- Haubenstricker M.E, Meier P.G, Mancy K.H., 1990.** Rapid toxicity testing based on yeast respiratory activity. Bull. Environm. Contam. Toxicol, 44: 669-674.
- Hildebrand E., Dryl S., 1983.** Dependence of ciliary reversal in Paramecium on extracellular Ca^{2+} concentration. Journal of comparative physiology 152: 385-394.
- Hong Y., Yang X., Huang Y., 2018.** Assessment of the oxidative and genotoxic effects of the glyphosate-based herbicide roundup on the freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponensis*. Chemosphere 210:896–906. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.069.
- Huh A.J et Kwon Y.J., 2011.** "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era". J Control. Release, vol. 156, p. 128-45.

I

Itziou A., Kaloyianni M., Dimitriadis V.K., 2011. Effects of organic contaminants in reactive oxygen species, protein carbonylation and DNA damage on digestive gland and haemolymph of land snails. *Chemosphere* 85, 1101-1107.

J

Jin Y., Liu Z., Peng T., Fu Z., 2015. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behaviour. *Fish & Shellfish Immunology*, 405-414.

Johnson A.C., Park B., 2012. Predicting contamination by the fuel additive cerium oxide engineered nanoparticles within the United Kingdom and the associated risks. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 31, 2582–2587. doi:10.1002/etc.1983

K

Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B., Vonbank R., Wichser A., Zuleeg S., Simmler H., Brunner S., Vonmont H., Burkhardt M., Boller M., 2008. Synthetic TiO₂ nanoparticles emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 156, 233–239. doi: 10.1016/j.envpol.2008.08.004

Kast-Hutcheson K., Rider C.V, LeBlanc G.A., 2001. The fungicide propiconazole interferes with embryo development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 20 : 502-509.

Kayalto M., 2011. Etude bibliographique sur les bioindicateurs et biomarqueurs des effets des perturbations des écosystèmes par les pesticides. Thèse de Doctorat, Institut agronomique et vétérinaire Hassan II du Maroc, 125 p.

Kendouli S., 2012. Préparation et fonctionnalisation de quelques nanostructures sous forme de nanofibres. Mémoire de magister, Université Mentouri Constantine, Algérie, 139 p.

Khalidi F., Grara N., 2016. Anti-oxidant activity research of enzymatic biomarkers in protozoa (*Paramecium sp*) under stress by manufactured nanoparticles. Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, 51-57.

Kim K.T., Klaine S.J., Cho J., Kim S.H., Kim S., 2010. Oxidative Stress Responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ Nanoparticles According to Size Fraction. Science of The Total Environment 408(10): 2268-2272.

Kim TK., Klaine S., Cho J., Kim SH., Kim S., 2010. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. Science of Total Environment, 2268–2272.

Klein J.P., 2015. Evaluation de l'impact des nanoparticules et de L'aluminium sur la fonction de reproduction Masculine. Thèse de Doctorat, l'Université Jean Monnet–Saint-Etienne, 236 p.

Koppenol W.H., 2001. "The Haber-Weiss cycle - 70 years later. Redox Report 6(4): 229-234.

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.

Kwong T.C., 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. Ther Drug Monit 24, 144-149.

L

Lagadic L., Caquet T & Amiard, J.C., 1997. Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux, Masson, Paris, 393-401.

Laligné C., 2011. Etude de la fonction de la protéine Bug22p dans différents organismes. Thèse de doctorat. Université Paris XI, 125 p.

Lallement P.A., 2014. Caractérisation biochimique et fonctionnelle de glutathion transférases à cystéine catalytique de peuplier (*Populus trichocarpa*). Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, 268 p.

Lane N., 2003. Oxygen, the molecule that made the world. New York: Oxford University Press, 336 p.

Lange A., Ausseil O., Segner H., 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology C e Toxicology & Pharmacology* 131, 231-243.

Larue C., 2011. Impact de nanoparticules de TiO₂ et de nanotubes de carbone sur les végétaux. Thèse de Doctorat, L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech), 289 p.

Le Guernic A., 2015. Effets sublétaux d'une contamination métallique liée à des rejets miniers uranifères sur l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L). Implication dans la susceptibilité un stress biologique. Thèse de Doctorat, Université de Reims Champagne – Ardenne, 338 p.

LeBlanc G.A., Mu X., Rider C.V., 2000. Embryo toxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environ Health Perspect* 108:1133-1138.

Lee S.W., Kim S.M., Choi J., 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of Nanoparticles exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28(1): 86-91.

Lee S., Li J., Zhou X., Yin J et Yoon J., 2018. Recent progress on the development of Glutathione (GSH) selective fluorescent and colorimetric probes. *Coordination Chemistry Reviews*, Vol. 336, pp 29-68.

Lefevre G., Beljean-Leymarie M., Beyerle F., Bonnefont-Rousselot D., Cristol J.P., Therond P and Torreilles J., 1998. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann Biol Clin (Paris)* 56(3) : 305-319.

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

Liu D., Xue P., Meng Q., Zou J and Gu J., 2009. Pb/Cu effects on the organization of microtubule cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum* L. *Plant cell reports*, 28: 695-702.

Liu J., Fan D., Wang L., Shi L., Ding J., Chen Y., Shen S., 2014. Effects of ZnO, CuO, Au, and TiO₂ Nanoparticles on *Daphnia magna* and Early Life Stages of Zebrafish *Danio rerio*. Environment Protection Engineering 40: 1-11.

Lotti M., 2002. Low-level exposures to organophosphorus esters and peripheral nerve function. Muscle Nerve 25, 492-504.

Louat F., 2013. Etude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle,

Lungu M., Madalin A., Bunoiu N., Biris C., 2015. Nanoparticles Promises and Risks. Springer International Publishing, 86-95.

Lushchak V.I and Bagnyukova T.V., 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. Comparative Biochemistry and Physiology B 144: 283–289.

M

Ma T., Gong S., Tian B., 2016. Effects of sediment-associated CuO nanoparticles on Cu bioaccumulation and oxidative stress responses in freshwater snail *Bellamya aeruginosa*. Science of the Total Environment, 1-8.

Machemer H., 2001. The swimming cell and its world: Structures and mechanisms of orientation in protists. Eur. J. Protistol. 37: 3-14.

Madoni P., 2000. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. Environment pollution, 109(1): 53-59.

Madoni P and Romeo., M.G., 2006. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. Environment and pollution, 141: 1-7.

Manna P., Ghosh M., Ghosh J., Das J and Sil P.C., 2012. Contribution of nano-copper particles to in vivo liver dysfunction and cellular damage: role of I κ B α /NF- κ B, MAPKs and mitochondrial signal. Nanotoxicology 6(1): 1-21.

Marcon L., Riquet F., Vicogne D., Szunerits S., Bodart J.F., Boukherroub R., 2010. Cellular in vivo toxicity of functionalized nanodiamond in *Xenopus embryos*. Journal of Materials Chemistry 20(37): 8064-8069.

Marcoux M.A., Matias M., Olivier F., 2012. Substances émergentes, polluants émergents dans les déchets. Analyse et prospective. Ne3LS.

- Maria V., Ahmad I., Oliveira M., Serafim A., Bebianno M., Pacheco M., Santos M., 2009.** Wild juvenile *Dicentrarchus labrax* L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro Lagoon, Portugal. *Ecotoxicol Environ Saf* 72, 1861-1870.
- Marmignon A., 2013.** Couplage entre introduction et réparation des cassures double brin pendant les réarrangements programmés du génome chez *Paramecium tetraurelia*. Thèse de doctorat. Université Paris Sud XI, 310 p.
- Martín-Díaz M.L., Gagné F & Blaise C., 2009.** The use of biochemical responses to assess ecotoxicological effects of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) after injection in the mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(2), 237-242.
- Massarin S., 2010.** Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna*. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille II, Université de la Méditerranée, France, pp 32-34.
- Maurent K., 2017.** Synthèse de composés phénoliques de type diarylheptanoïde. Evaluation de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 220 p.
- Mejia J., Kestemont P., Lucas S., 2015.** État des connaissances sur les impacts des Nanoparticules sur l'environnement en wallonie. Cahier spécial des charges n° dgo3/demna/dee/vr2013-1125, Université de Namur, Namur, 92 p.
- Melegari SP., Perreault F., Costac., Popovic R., Matias WG., 2013.** Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 431-440.
- Methner MM., Birch M.E., Evans D.E., Ku B.K., Crouch K., Hoover M.D., 2007.** Identification and characterization of potential sources of worker exposure to carbon nanofibers during polymer composite laboratory operations. *J. Occup. Environ. Hyg.* 4, D125–130. doi:10.1080/15459620701683871
- Mezzetti A.C., Di Ilio A.M., Calafiore A., Aceto L., Marzio G., Frederici et Cuccurullo F., 1990.** Glutathione Peroxidase, Glutathione Reductase and Glutathione Transferase Activities in the Human Artery, Vein and Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 22 (9): 935 - 38.

- Midander K., Cronholm P., Karlsson H.L., Elihn K., Möller L., Leygraf C., Wallinder I.O., 2009.** "Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper (II) oxide particles: a cross-disciplinary study. *Small* 5(3): 389-399.
- 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.
- Mongens M., 2013.** Origine et conséquences du stress oxydant. Thèse de Doctorat, École Nationale Vétérinaire D'alfort, 113 p.
- Monteil C., Mulder P., Thuillez C., 2004.** Stress oxydant et insuffisance cardiaque : une cible thérapeutique utopique. *Médecine thérapeutique Cardiologie.* 2: 75-85.
- Mortimer M., Kasemets K., Kahru A., 2010.** Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology* 269,182-189.
- Mortuza M.G., Takahashi T., Kosaka T., Hosoya H., 2010.** Effect of industrial sludge toxicity on the cell growth of green *Paramecium bursaria*. *J cell. Anim. Biol* 3(4) : 62-66.
- Mouchet F., Landios P., Flahaut E., Pinelli E., Gauthier L., 2007.** Assessment of the potential in vivo ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWTs) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Nanotoxicology* 1(2): 149-156.
- Mouchet F., Landios P., Sarremejean E., Bernard G., Puech P., Pinelli E., Flahaut E., Gauthier L., 2008.** Characterisation and *in vivo* ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology* 87(2) : 127-137.
- Moumni O., 2017.** Etude de la toxicité d'un Cyclohexanedione (Herbicide) sur deux modèles biologiques d'eau douce : *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 171 p.
- Mózner Z., Tabi A., Csutora M., 2012.** Modifying the yield factor based on more efficient use of fertilizer—The environmental impacts of intensive and extensive agricultural practices. *Ecological Indicators* 16, 58–66. doi: 10.1016/j.ecolind.2011.06.034.
- Mu X., LeBlanc G.A., 2002a.** Environmental antiecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *J Exp Zool* 292:287–292.

Mu X, LeBlanc GA. Synergistic interaction of endocrine disrupting chemicals: model development using an ecdysone receptor antagonist and a hormone synthesis inhibitor. *Environ Toxicol Chem* 2004 23(10), 85–91.

Muhling, M., Bradford A., Readman J.W., Somerfield P.J and Handy R.D., 2009. An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. *Mar. Environ. Res.*, vol. 68, p. 278-283.

Mule M.B., Lomte V.S., 1994. Effect of heavy metals (CuSO₄ and HgCl₂) on the oxygen consumption of the freshwater snail, *Thiara tuberculata*. *J. Environ. Biol.* 15, 263–268.

Münzel T., Camici G.C., Maak C., Boneti N.R., Fuster V et Kovacic J.C., 2017. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature Part 2 of a 3-part Series. *J Am Coll Cordicol*, Vol 7 No 2, pp 212-229.

Musee N., Oberholster P.J., Sikhwivhilu L., Botha A.M., 2010. The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction and behaviour of freshwater snails, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Chemosphere* 81(10): 1196-1203.

N

Naeemi AS., Elmi F., Vaezi G., Ghorbankhah M., 2020. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress mediated apoptosis in carp (*Cyprinus carpio*) larva. *Journal Pre-proof*, 1-24.

Navarro A., Boveris A., 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:670–686.

Nola M., Njiné T., Foto S.M., Kemka N., Zébazé S.H., Nguedji J.B.T & Bouetou T.B., 2003. Utilisation des protozoaires ciliés (*Paramecium africanum*, *Colpidium uncinatum*, *Neobursaridium gigas*) pour l'épuration bactériologique des eaux polluées en microcosme. *Tropicultura*, 21, 2, 73-78.

Nuttens A., 2016. Étude des effets de l'interaction entre polluants et ressources sur *Myriophyllum spicatum* grâce à une approche couplant écotoxicologie et écologie chimique. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, 216p.

O

O'Brien N., Cummins E., 2010. Ranking initial environmental and human health risk resulting from environmentally relevant nanomaterials. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 45, 992–1007. doi:10.1080/10934521003772410

Oberholster P.J., Musee N., Botha A.M., Chelule P.K., Focke W.W., Ashton P.J., 2011. Assessment of the effects of nanomaterials on sediments-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(3): 416-423.

OECD, 2004. *Daphnia*, acute immobilisation test, 202.

OECD, 2008. **OECD 211:** *Daphnia magna* Reproduction Test.

Olabarrieta I., L'Azou B., Yuric J., Cambar J and Cajaraville., M.P., 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in vitro*, 15: 511-517.

Oliveira C., Almeida J.R., Guilhermino L., Soares A.M.V.M., Gravat C., 2012. Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaemon serratus*. *Aquat. Toxicol.* 124, 209-216.

Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.* 13: 57-149.

P

Paoletti F., Ldinucci D., Mocali A., Caparrini A., 1986. Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Superoxide Dismutase Activity in Tissue Extracts. *Analytical Biochemistry* 153, 536-541.

Parisot F., 2015. Étude mécaniste des effets transgénérationnels des radiations ionisantes alpha et gamma chez *Daphnia magna*. Thèse de doctorat. Université d'Aix-Marseille II, 237 p.

Perrault F., 2012. Toxicité des nanoparticules métalliques chez différents modèles biologiques. Thèse de Doctorat, Université de Québec, Montréal, 203 p.

Piret J.P., Jacques D., Audinot J.N., Mejia J., Boilan E., Noël F., Fransolet M., Demazy C., Lucas S., Saout C and Toussaint O., 2012. Copper (II) oxide nanoparticles penetrate into

HepG2 cells, exert cytotoxicity via oxidative stress and induce pro-inflammatory response. *Nanoscale* 4(22) : 7168-7184.

Poisson C., 2013. Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Thèse de Doctorat, Université Paris-Sud 11, 414 p.

Poulier G., 2014. Etude de l'échantillonnage intégratif passif pour l'évaluation réglementaire de la qualité des milieux aquatiques : application à la contamination en pesticides et en éléments trace métalliques des bassins versants du Trec et de l'Auvézère. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, 205 p.

Poynton H.C., Lazorchak J.M., Imellitteri C.A., Smith M.E., Rogers M., Hammer K.A., Allen H.J., Vulpe C.D., 2011. Differential Gene Expression in *Daphnia magna* Suggests Distinct Modes of Action and Bioavailability for ZnO Nanoparticles and Zn Ions. *Environmental Sciences & Technology* 45(2): 762-768.

Pudpong S., Chantangsi C.H., 2015. Effects of Four Heavy Metals on Cell Morphology and Survival Rate of the Ciliate *Bresslauides sp.* *Tropical Natural History* 15(2), 117-125.

Q

Qu R.J., Wang X.H., Feng M.B., Li Y., Liu X.H., Wang L.S., Wang Z.Y., 2013. The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95:83-90.

R

Radwan M.A., El-Gendy K.S., Gad A.F., 2010. Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of *Theba pisana* exposed to heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 58, 828-835.

Rangachari P.K., Matthews J., 1985. Effect of Ag on isolated bullfrog gastric mucosa. *Am J Physiol* 248:443–449

Ren G., Hu D., Cheng E.W., Vargas-Reus M.A., Reip P and Allaker R.P., 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents* 33(6): 587-590.

Ren X., Zhao X.S., Duan X.Y., Fang Z.W., 2018. Enhanced bio-concentration of tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate in the presence of nano-TiO₂ can lead to adverse reproductive outcomes in zebrafish. *Environ. Pollut.* 233, 612-622.

Roast S.D., Widdows J., Jones M.B., 2000a. Disruption of swimming in the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* (*Peracarida Mysidacea*) by the organophosphate pesticide chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.* 47, 227-241.

Roast S.D., Widdows J., Jones M.B., 2000b. Mysids and trace metals: disruption of swimming as a behavioral indicator of environmental contamination. *Mar. Environ. Res.* 50, 107-112.

Robinson P.D., 2009. Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs). *Canadian Journal of Fish Aquatic Science* 66: 1179-1188.

Rolfe D.F.S and Brown G.C., 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews* 77(3): 731-758.

Roy S & Das T.K., 2016. Effect of biosynthesized silver nanoparticles on the growth and some biochemical parameters of *Aspergillus foetidus*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1-23.

Ruas C.B., Carvalho Cdos S., de Araujo H.S., Espindola E.L., Fernandes M.N., 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicol Environ Saf* 71, 86-93.

S

Salazar-Medina A.S., Garcia-Rico L., Garcia-Orozco K.D., Valenzuel-Sot E., Contrera-Vergara C.C., Arreola R., Arvizu-Flores A., Sotelo-Mundo R.R., 2010. Inhibition by Cu²⁺ and Cd²⁺ of a Mu-class glutathione S-transferase from shrimp *Litopenaeus setiferus*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24 (4): 218–222.

Sanchez W and Porcher J.M. 2009. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(2), 150- 158.

Sanni S., Lyng E., Pampanin D.M & Smit M.G.D., 2016. II. Species sensitivity distributions based on biomarkers and whole organism responses for integrated impact and risk assessment criteria. *Marine environmental research*, 127, 11-23.

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

Sbartai I., Berrebbah H., Sbartai H., Djebbar M.R., 2012. Evaluation of the toxicity of hydrazine carboxylate (Bifenazate) and oxadiazine year (Indoxacarb) Observed in a unicellular eukaryote: *Paramecium sp.* *Advances in Environmental Biology*, 6(8): 2249-2258.

Shahzad K., Khan MN., Jabeen F., Kosour N., Chaudhry AS., Sohail M., 2018. Evaluating toxicity of copper (II) oxide nanoparticles (CuO-NPs) through waterborne exposure to tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by tissue accumulation, oxidative stress, histopathology, and genotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.

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

Smine S., 2017. Obésité induite par un régime riche en lipides (HFD) et effet protecteur d'un extrait polyphénolique de raisin (GSSE) : Approche protéomique. Thèse de Doctorat, Université de Rouen Normandie, Tunis, 200 p.

Smith M.A., 1983. The effect of heavy metals on the cytoplasmic fine structure of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta). *Protoplasma*, 116 : 14-23.

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

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

Subramoniam T., 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp Biochem Physiol* 125:135–156.

Sumi N & Chitra K.c., 2017. Oxidative Stress in Muscle Tissue of the Freshwater Fish, *Pseudotroplus maculatus* (Bloch 1795): A Toxic Response from Exposure to Fullerene (C₆₀) Nanoparticles. *Asian Fisheries Science* 30: 206–214.

T

Tedesco S., Doyle H., Blasco J., Remond G., Sheehan D., 2010. Oxidative Stress and Toxicity of Gold Nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 100(2): 178-186.

The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN), of The Woodrow Wilson International Center for Scholars and The PEW Charitable Trusts, <http://www.nanotechproject.org/>.

Tlili S., 2012. Approche multimarqueurs pour l'évaluation de l'état de santé du golfe de Tunis. Etude des réponses biochimiques, physiologiques et cytologiques des mollusques bivalves exposés aux effluents des oueds, Thèse de Doctorat, Université de Monastir Institut supérieur de Biotechnologie, 250 p.

Tomlin C.D.S., 2006. The Pesticide Manual, 13ème édition. British Crop Protection Council. Surrey, vol.1: 697-698.

Toumi H., 2013. Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur différentes souches de *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) : apport de la protéomique dans la recherche de nouvelles cibles cellulaires. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, 158 p.

Triboulet S., 2013. Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique. Thèse de Doctorat, Université de Grenoble, 342 p.

V

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M and Mazur., M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40.

Vlahogianni T., Dassenakis M., 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.

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

W

- Wang Y., Aker W.G., Hwang H.M., Yedjou C.G., Yu H et Tchounwou P.B., 2011.** A study of the mechanism of *in vitro* cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG₂ cells. *Sci. Total Environ.*, vol. 409, p. 4753-4762.
- Wang C., Bourland W., Mu W., Pan X., 2018.** Transcriptome analysis on chlorpyrifos detoxification in *Uronema marinum* (Ciliophora, Oligohymenophorea). *Environmental Science and Pollution Research*, 1-13.
- Wang X., Shen M., Zhou J., Jin Y., 2019.** Chlorpyrifos disturbs hepatic metabolism associated with oxidative stress and gut microbiota dysbiosis in adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 19-28.
- Wang T., Long X., Liu Z., Cheng Y., Yan S., 2015.** Effect of copper nanoparticles and copper sulphate on oxidation stress, cell apoptosis and immune responses in the intestines of juvenile *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* 44: 674-682.
- Wechbeker G., Cory J.G., 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells *in vitro*. *Cancer lett.* 40, 257 - 264.
- Weijie MU., Alan W., Xuming P., Chen Y., 2018.** Toxicity of Chlorpyrifos and Dimethoate to the Ciliate *Urostyla grandis*, with Notes on Their Effects on Cell Ultrastructure. *J. Ocean Univ. China*, 17 (3), 697-704.
- Weis J.S., Cristini A., Rao K.R., 1992.** Effects of pollutants on molting and regeneration in Crustacea. *Amer Zool* 32: 495-500.
- WHO and UNICEF 2006.** Meeting the MDG drinking water and sanitation target: the urban and rural challenge of the decade World.
- Wiesner M.R., Lowry G.V., Alvarez P., Dionysiou D., Biswas P., 2006.** Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4336–4345.
- Wilks CD., 2014.** Ciblage & élimination des transposons et de leurs vestiges lors des réarrangements programmés du génome somatique de la paramécie. Thèse de doctorat. Université Paris-Sud, 237 p.
- Windler L., Lorenz C., von Goetz N., Hungerbühler K., Amberg M., Heuberger M., Nowack B., 2012.** Release of Titanium Dioxide from Textiles during Washing. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8181–8188. doi:10.1021/es301633b

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

X

Xia T., Kovochich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J.I., Zink J.I., Nel A.E., 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. ACS Nano 2, 2121-2134.

Y

Yacobi N.R., Phuleria H.C., Demaio L., Liang C.H., Peng C., Sioutas C., Borok Z., Kim K., Crandall E.D., 2007. Nanoparticle effects on rat alveolar epithelial cell monolayer barrier properties. Toxicol In Vitro 21:1373–1381.

Yeo M.K., Kang M., 2010. The effects of nano-scale Zn-doped TiO₂ and pure TiO₂ particles on *Hydra magnipapillata*. Molecular & Cellular Toxicology 6(1): 9-17.

Z

Zagata P., Kopańska M., Greczek-Stachura M., Burnecki T., 2015. Acute toxicity of metals: Nickel and Zinc to *Paramecium bursaria* and its endosymbionts. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 128-131.

Zaimeche S., 2015. Contribution à l'étude de l'action d'agents polluants sur des végétaux bioindicateurs. Thèse de Doctorat, Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie, 173p.

Zhao CM., Wang WX., 2010. Biokinetic Uptake and Efflux of Silver Nanoparticles in *Daphnia magna*. Environmental Science & Technology 44(19): 7699-7704.

Zhao T., Singhal S.S., 1999. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. Arch Biochem Biophys 367(2): 216-224.

Zhu X., Wang J., Zhang X., Chang Y., Chen Y., 2009. The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish *Danio rerio*. Nanotechnology, 20, doi:10.1088/0957-4484/20/19/195103.

Zhu XS., Chang Y., Chen YS., 2010. Toxicity and Bioaccumulation of TiO₂ Nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. Chemosphere 78(3): V-215.

Zhu X., Zhu L., Duan Z., Qi R., Li Y., Lang Y., 2008. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. J. Environ. Sci. Health Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng., 43, 278–284.

Zcan Oruc E., Usta D., 2006. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. Environmental Toxicology and Pharmacology 23:48–55.

Annexes

GROWTH INHIBITION AND OXIDATIVE STRESS IN THE FRESHWATER CILIATE *PARAMECIUM* SP EXPOSED TO COPPER OXIDE NANOPARTICLES

Chiraz Bouraiou¹, Houria Berrebah¹, Meriem Djekoun¹, Tayeb Bouarroudj², Amina Yahyaoui¹, Lyes Khene¹, Housseem Kahli¹ and Mohamed Réda Djebar¹

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

² Laboratory of Chemistry Inorganic Materials (LCMI), Department of Chemistry, Faculty of Science, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

Abstract: Copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) are widely used in various industrial and commercial applications, but little is known about their potential hazard in freshwater ciliate. In this study we investigated the effects of CuO-NPs in an alternative model *Paramecium* sp. which is perfectly adapted with toxicological studies. *Paramecium* cells were exposed in triplicate to control, 30, 60, 90 and 120 mg CuO L⁻¹, and the growth kinetics was followed for 120 hours, enzymatic activities of Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione-S-Transferase (GST) and Glutathione content (GSH) were investigated to evaluate antioxidative response to copper oxide nanoparticles.

Our results showed a dose-dependent inhibition of cell growth, on another hand, the monitoring of biomarkers revealed induction of SOD, CAT, and GST activities, in parallel a significant decrease on GSH content compared to control.

Keywords: *Paramecium* sp, growth kinetic, oxidative stress, CuO, toxicity

INTRODUCTION

Nanotechnology utilizes nanoparticles (NPs) that are unique not only due to their minute size (smaller than 100 nm) but also because of their size-dependent characteristics. NPs are being spotlighted as a center stage phenomenon for future industry (Arnaldi, 2014, Zhang et al., 2015). The production and number of applications of engineered NPs are increasing rapidly worldwide. Current applications include the use of NPs in consumer products, construction materials, medical and pharmaceutical industries, agriculture, and information technology (Karen et al., 2009). Metal oxide NPs are an important category of manufactured NPs, accounting for about one third of the consumer products nanotechnology market. For instance, copper oxide (CuO) NPs are used in a host of uses, such as gas sensors, catalysts, superconductors, and ceramic pigments (Zhu et al., 2004; Marino et al., 2007), antifouling agents in paints (Perreault et al., 2012) for ships and offshore oil platforms and applications in antimicrobial textiles (Ren et al., 2009; Dastjerdi, 2010; Delgado et al., 2011).

Nanoparticles are also found widely in nature, and natural sources include ash, desert dusts, aerosols and metal oxide particles. Some plants synthesize NPs that are used to reduce metal uptake in contaminated soils, and anaerobic bacteria may use them in respiration (Bernhardt et al., 2010).

In recent years, a growing number of toxicity studies provide evidence about potential hazards to the human health or the environment of different nanomaterials, including metal oxides, fullerenes, and carbon nanotubes (Kahru and Dubourguier, 2010). Although the mechanisms of nanotoxicity are still

poorly understood and numerous reports attribute the toxicity of NPs to their small size, other nanomaterial characteristics such as particle morphology, particle composition, surface area, and surface chemistry have also been implicated on (Handy et al., 2008; Fubini et al., 2010).

Multiple organisms are used in ecotoxicology studies of NPs, including bacteria, fungi, algae, and crustaceans, among others (Kahru and Dubourguier, 2010). Surprisingly, freshwater protist species provide a good model for study on how environmental toxicity differs among species because of their ubiquitous global distribution and special sensitivity to environmental contaminants. Protozoa are single cell organisms that do not possess a protective cell wall. As a consequence, NPs could enter protozoan cells more easily than bacterial and algal cells and interact directly with the cellular structures and organelles (Mortimer et al., 2014; Zou et al., 2013). The ciliated protists have been widely studied by eco-toxicologists not only because of their role in the regulation of microbial populations through the ingestion and digestion of bacteria but also because of their high sensitivity to chemical materials; hence, they are often used as indicator species of environmental pollution (Bick, 1972). For all these reasons, ciliates, especially *Paramecium* species, have been exploited as excellent bioindicators of pollution or bioassays to evaluate the effects of toxic compounds. (Kozai et al., 2011; Amamra et al., 2015).

The aim of the present study was to evaluate the cytotoxic effects of copper nanoparticles CuO-NPs at different sublethal concentrations on population growth

and some biomarkers of oxidative stress of the ciliate protozoan *Paramecium* sp.

MATERIALS AND METHODS

Test Organisms

The biological model used in our study is a unicellular microorganism *Paramecium* sp. Cells were cultured in a synthetic culture medium (pH 6.5) and $28 \pm 2^\circ\text{C}$ as described previously by (Azzouz et al., 2011) (Moumni et al., 2016). The culture was maintained into the oven (memmert 400) and the cells were transplanted each three days in a new medium for keeping the youthful state of the culture.

Test Chemical

CuO nanoparticles was obtained from Laboratory of Chemistry (LCMI) Badji Mokhtar University, Annaba, had an average size of 30 nm.

Treatment

Paramecium sp were incubated with the tested Copper NPs concentrations in aliquots of 10 ml of culture medium, the retained concentrations were 30, 60, 90 and 120 mg/l.

For growth kinetics, the NPs treatment was performed before the transplantation of *paramecium* cells (at $t=0$). For the enzymatic essays, the treatment was carried at the end of the experimental growth phase ($t=96\text{H}$). (Wong, 1999., Amamra et al., 2015).

Parameter measurement

Growth kinetics

The growth kinetics study was established by the daily cell counting during five days (120h), after fixation with a Lugol solution at 1% under optic microscope type LEICA DM 1000. (Azzouz et al., 2011).

Response Percentage

The response percentage was calculated to evaluate the toxicity of xenobiotics via the inhibition of cell growth after 96H of exposure. Positive values indicate an inhibition of growth while values indicate a stimulation of growth. (Wong et al., 1999).

The assessment of the response percentage is calculated according to the following formula:

$$\text{Response Percentage} = (\text{Nc} - \text{Ne}) / \text{Nc} \times 100$$

Determination Of The Number, The Time And The Velocity Of Generation

Based on the data, the number (n), the time (k) and the velocity of generation (g) were calculated by the following formula:

$$N = (\log N_t - \log N_0) / \log 2$$

$$k = n/t$$

$$g = 1/k$$

Determination Of Superoxide Dismutase (Sod)

Superoxide Dismutase (SOD) activity was measured by the method described by Paoletti and Mocali (1990). The principle of the assay is based on the measurement of SOD activity using the auto-oxidation of β -mercaptoethanol in the presence of EDTA / MnCl_2 as a generator of superoxide anions (O_2^-) during the reaction.

These anions will cause the oxidation of NADH. The SOD then competes for the use of O_2^- -which tends to decrease in the medium thus causing the inhibition of the oxidation of NADH. It is estimated that 50% inhibition corresponds to one unit of enzyme.

0.1 ml of the enzyme extract are added to 1.3 ml of a solution composed of 0.8 ml of NADH (7.5 mM), 0.5 ml of a mixture (V / V) EDTA (200 mM) / MnCl_2 (100mM) and 1,6 ml of phosphate buffer pH 7.4.

The reaction is triggered by the addition of 0.1 ml of β -mercaptoethanol (10 mM). Absorbance is measured for 5 min after 0 and 20-min incubation at 340 nm (total SOD). The activity is expressed in Units / mg of protein.

Determination Of Catalase (Cat) Activity

Measuring the Catalase activity (CAT) is performed according to the method of Clairborne (1985) based on the hydrolysis of H_2O_2 to H_2O and O_2 . For the assessment of enzymatic activity of Catalase, the samples were homogenized in phosphate buffer 1 mL (0.1M, pH 7.5) using an ultrasonic crusher (SONICS, Vibra cell). The homogenate thus obtained was centrifuged at 15 000g for 10 minutes and the supernatant recovered serves as enzyme source. The reaction is initiated by the addition of hydrogen peroxide (500 mM, 30V). Reading is done against a blank prepared with hydrogen peroxide and phosphate buffer. The decrease in absorbance is measured every 15 seconds for one minute at 240 nm in a spectrophotometer (Jenway, 6300). Catalase activity is expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ per minute per mg of protein.

Determination Of Glutathione-S-Transférase (Gst) Activity

Determination of GST activity was performed by the method of Habig et al. (1974) by following the conjugation of GSH with CDNB. After homogenization of the sample in 1 ml of phosphate buffer (0.1M, Ph 6), homogenate was centrifugated at 14000 rpm for 30 min. 1.2 ml of the mixture CDNB (1mM)/GSH (1mM) was added to 0.2 ml of supernatant to start the reaction. The formation of S-2,4-dinitrophenyl glutathione conjugate was evaluated by recording the increase in absorbance at 340 nm for 5 min after every 1 min interval. It was expressed as $\mu\text{mol/min/mg}$.

Determination Of Glutathione Gsh Content

The rate of GSH was quantified according to the method of Weckbeker and Cory (1988). Cells were homogenized in 1 ml of EDTA (0.02M) and 0.2 ml of sulfosalicylic acid (ASS) was added to 0.8 ml of homogenate. After agitation, the homogenate was centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The reaction was initiated by adding to 0.05 ml of supernatant, 1 ml of tris/EDTA buffer (0.02 M, Ph 9.6) and 0.025 ml of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DNTB). The absorbance was measured at 412 nm and the amount of GSH was expressed as $\mu\text{mol mg}^{-1}$ of proteins.

Statistical Analysis

The obtained results are represented by the average $\pm$ Standard Error. Statistical analysis of data is performed using Minitab student t test.

RESULTS

Effect Of CuO-NPs On Growth Kinetic

The acute toxicity test on *Paramecium* sp. with increasing concentrations was performed during five

days. Fig. 1 represents the effect of CuO-NPs on the variation of *paramecium* cells number (control and treated) versus time.

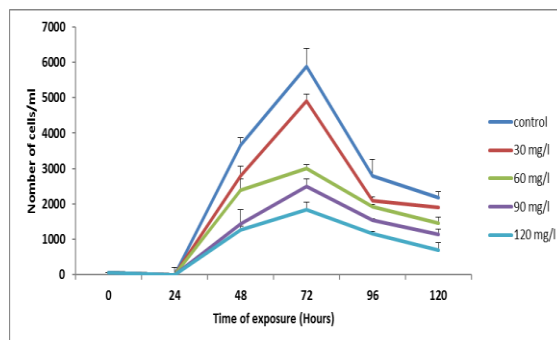


Fig. 1. Effect of CuO-NPs on the growth of *Paramecium* sp.

The selected concentrations inhibited the population growth in a dose-dependent manner especially for the highest concentration (120 mg/l).

In the fifth day of treatment, we denote a difference of nearly 1400 cells between the control and the highest concentration (120 mg/l).

Response Percentage

Response percentage measurement results are presented in Fig. 2.

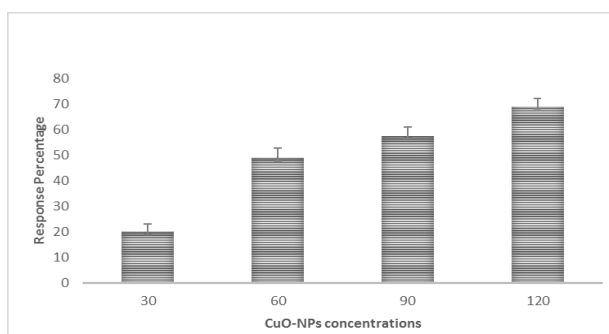


Fig. 2. Effect of CuO-NPs on the response percentage at 96H.

Response percentage is positive in all tested concentrations, it varies from 19% to 68% for 30 mg/l and 120 mg/l.

Therefore, the response percentage confirms the kinetics of growth of the paramecia previously observed.

Table 1.
Effect of CuO-NPs on *Paramecium* sp. generation number, generation time and velocity of generation.

CuO-NPs concentrations (mg/L)	Generation Number (n) ± SE	Generation Time (g) ± SE	Velocity of generation (k) ± SE
0	6.60 ± 0.08	10.90 ± 0.13	0.091 ± 0.01
30	6.28 ± 0.06	11.45 ± 0.11	0.087 ± 0.08
60	5.64 ± 0.03	12.76 ± 0.07	0.078 ± 0.04
90	5.37 ± 0.07	13.39 ± 0.19	0.074 ± 0.01
120	4.92 ± 0.1	14.64 ± 0.38	0.068 ± 0.01

Table 1 illustrates the effect of copper nanoparticles on the number, the velocity and the time of generation.

Exposure to increasing concentrations of CuO-NPs caused a decrease of number and velocity of generation in a dose dependant manner.

However; the generation time gradually increased with increasing concentrations of CuO-NPs.

Superoxide Dismutase (Sod) Activity

The results concerning the variation of SOD activity are represented in Fig 6, exposure of *Paramecium* sp to CuO-NPs revealed a strong induction of the SOD activity appeared with concentrations (90 and 120 mg/L), which had significant ($p \leq 0.05$) and very highly significant ($p \leq 0.001$) increase when compared to the control.

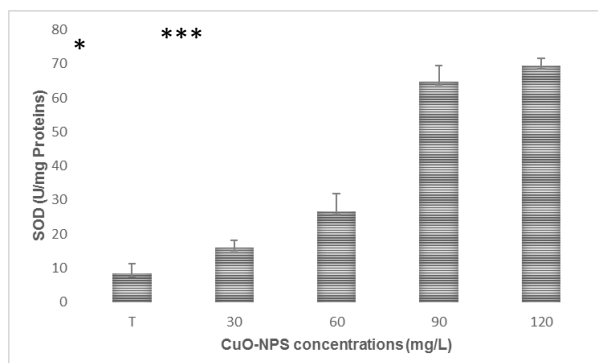


Fig. 3. Effects of CuO-NPs on the SOD activity in *Paramecium* sp. Each value is average $\pm$ standard error of three replicates (* $P \leq 0.05$ *** $P \leq 0.001$).

Catalase (Cat) Activity

The results concerning the variation of CAT activity is represented in Fig 3. After 4 hours of treatment, a significant dose-dependent manner

induction of Catalase activity compared with the control ($p \leq 0.05$), it increased from 5.5544 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteins in control to 16.5522 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteins for the highest concentration.

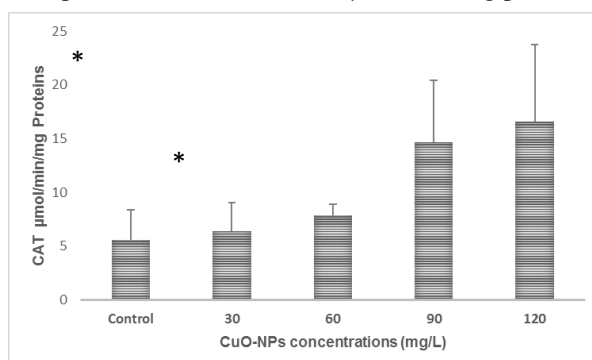


Fig. 4. Effect of CuO-NPs on the CAT activity in *Paramecium* sp. Each value is average $\pm$ standard error of three replicates (* $P \leq 0.05$)

Glutathion-S-Transférase Gst Activity

The results indicated a strong induction of the GST activity (Fig 4), the greatest enzymatic activity

appeared with the highest concentration of CuO-NPs (120 mg/l) which had significant increase ($p \leq 0.05$) when compared to the control.

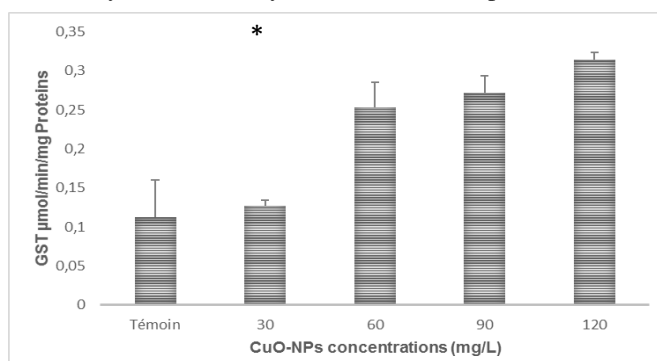


Fig. 5. Effects of CuO-NPs on the GST activity in *Paramecium* sp. Each value is average $\pm$ standard error of three replicates (* $P \leq 0.05$)

Estimation Of Glutathione (Gsh) Content

CuO-NPs exposure induced a significant dose dependent decrease in rate of glutathione reduced ($p \leq 0.05$). (Fig 5), it is of the order of 6.100 ± 1.05

$\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein for the control while it is 2.175 ± 0.74 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein for the highest concentration.

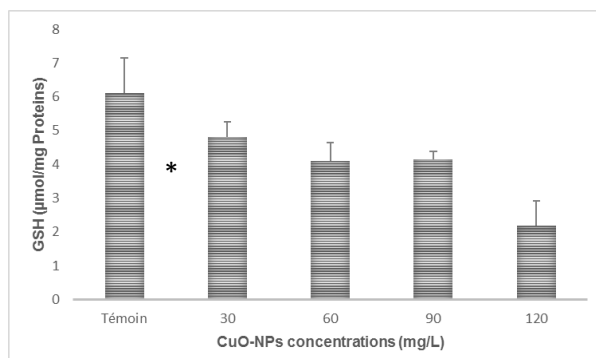


Fig. 6. Effects of CuO-NPs on the rate of GSH in *Paramecium* sp. Each value is average $\pm$ standard error of three replicates (* $P < 0.05$)

DISCUSSION

The production, use and commercialization of nanoparticles (NPs) has rapidly increased in recent years (Mwaanga et al., 2014). It is projected that this will inevitably lead to an increase of the release of NPs into aquatic systems (Keller et al., 2010). This will lead to concomitant increase in the exposure of aquatic organisms to NPs, which may result into adverse effects on these biota (Lin et al., 2010). Several NPs have been shown to induce a variety of toxic effects in aquatic organisms (Aruoja et al., 2009). Exposure of organisms to sublethal concentrations of toxic NPs has been observed to result in changes at cellular and biochemical levels that manifested before any physiological effects were observed at the whole organism, these biochemical changes (biomarkers) can help explain the underlying mechanisms of toxicity (Klaper et al., 2009), and have potential for use as early warning signals for ecologically relevant effects (Forbes et al., 2006).

Fresh water protozoan ciliates like *Paramecia* are the most commonly used ciliated and they are considered as excellent bioindicators of toxicity stress and chemical pollution. (Djekoun et al., 2015)

It is also an advantageous eukaryotic model system for mechanistic studies, as it contains many genes conserved in several eukaryotes (including humans), differently from other widely used unicellular model organisms. Lastly, as protists have highly developed systems for internalisation of nanoscale (100 nm or less) particles (Frankel, 2000), they are very good model organisms for nanotoxicology (Holbrook et al., 2008)

In this work we used *Paramecium* sp as a model cell to study the impact of copper oxide nanoparticles on reproduction and stress antioxidant systems.

In the first time, we were interested at the effect of CuO-NPs on population growth. Our result indicated an inhibition in the growth of *paramecia* especially for the highest concentration, this inhibition can be explained that the toxicity of metal oxide NPs to unicellular organisms (e.g., bacteria and ciliates) is ascribed, at least in part, to interactions between the NPs and the cell surface. Many studies reported that direct spatial contact between NPs and cell surface is necessary for manifestation of the cytotoxicity, and their interaction is central to the cytotoxicity of NPs. An apparent mechanism relies on direct damages, of

NPs to cell surface (cell wall or cell membrane), which can result in death of the cell. Prolonged contact between the cell and the NPs likely alters the cellular surface properties or integrity. (Li et al., 2012). Similar result is reported in the study of Azzouz et al. (2011) and Benbouzid et al. (2012) that demonstrated an inhibition in cell growth and proliferation of *paramecia* exposed to increase concentrations of Amistar xtra and Phosphoramidate respectively.

On the other hand, positive values of the response percentage confirm the toxic effects of the increasing concentrations of copper oxide nanoparticles. Moreover, the growth rate tests revealed that increasing concentrations provokes an important decrease in the number and velocity of generations by increasing the generation time, which mean that CuO-NPs has affected the multiplication of *paramecia* in a concentration dependent manner (Rao et al., 2007). Our results are in agreement with studies of Amamra et al. 2015 and Moumni et al. (2016) who reported the effects of Cypermethrin and Cycloxydim respectively on the growth of *Paramecium tetraurelia*.

ROS are chemical species that are produced as by-products of cellular oxygen metabolism, which occurs via mitochondrial respiration in eukaryotic cells. ROS include the superoxide anion, hydrogen peroxide and the hydroxyl radical. The abnormal accumulation of ROS is called oxidative stress and can lead to serious cellular damage. Environmental toxicants induce oxidative stress and alterations in the cellular redox balance. Oxidative stress in turn plays an important role in many types of cellular injury, some of which can result in DNA damage and apoptotic cell death. Eukaryotic organisms have evolved a comprehensive range of proteins to detoxify ROS and repair oxidative damage to DNA, lipids and proteins. These antioxidants include enzymatic scavengers such as superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and the peroxiredoxins, as well as non-enzymatic factors such as glutathione (GSH) and vitamins (Franco et al., 2009; kim et al., 2012).

Superoxide dismutase (SOD) is an essential metalloenzyme to the antioxidant defence system as it catalyzes the dismutation of the superoxide radical (O_2^-) to form hydrogen peroxide (H_2O_2). (Disner et al., 2017). In our study, SOD activity is found to be

increased in dose dependent manner especially for the two highest concentrations (90 and 120 mg/L)

This observation is in agreement with the results obtained by Ashouri et al. (2015) who recorded an increase in SOD activity in common carp *Cyprinus carpio* intoxicated with selenium nanoparticles. Cherait (2014) and Khebbab (2015) also elucidated a significant increase in SOD activity in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to Nifedipine and ZnO-NPs respectively.

CAT activity consists of a hydrogen peroxide (H₂O₂) transformation in water and molecular oxygen (O₂) (Vander et al., 2003; Brown et al. 2004). Our results showed an increase in catalase activity in these ciliates at the presence of CuO-NPs, probably due to increased antioxidant activity in *Paramecium* cells. The same results are observed by Djekoun et al. (2015) and Khaldi et al. (2016) that presented an increase in CAT activity in *Paramecium* sp exposed to Thiram and ZnO-NPs respectively. Saddick et al. (2017) have also recorded induction in CAT activity in *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii* treated with zinc nanoparticles

It is known that GST is detoxifying enzyme that catalyse the conjugation of a variety of electrophilic substrates to the thiol group of GSH, producing fewer toxic forms (Hayes et al., 1995). The significant increase of GST activity may indicate a high rate of

xenobiotic conjugation with glutathione (Madoni, 2000). These results are in line with those of Benbouzid et al. (2014) recorded a significant increase of GST activity in *Paramecium aurelia* treated with Phosphoramidate, the same result was observed by Kim et al. (2010) in *Daphnia magna* exposed to TiO₂-NPs.

GSH plays an important role in non-enzymatic antioxidant system, since it acts as a reductant in conjugation with xenobiotics (Kanak et al., 2014; Amr et al., 2015). In the present study, the concentration of GSH in *Paramecium* sp decreased significantly compared to control. GSH may be used by GST for conjugation of electrophilic compounds during exposure (Salazar-Medina et al., 2010; Mwaanga et al., 2014). In addition, some GSH may be used directly in the formation of specific thiol complexes with metal ions released from the NPs (Radwan et al., 2010). These results confirmed by Wang et al. (2015) who recorded a depletion of the GSH content in the intestines of juvenile *Epinephelus coioides* treated with copper nanoparticles, Ali et al. (2012) also recorded a decrease in GSH content in freshwater snail *Lymnaea luteola* L treated with zinc oxide nanoparticles. Similarly, GSH was significantly decreased in *Helix aspersa* exposed to TiO₂ microparticles (Khene et al., 2017).

there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

CONCLUSION

In toxicological studies, a single bioassay cannot provide the full picture of the effects in an organism. Physiological and biochemical assays were used to provide information for nanoparticles cytotoxicity. The results obtained in this work revealed that CuO-NPs tested caused perturbations in the physiological and biochemical state of *Paramecium* sp. The effects are manifested by the inhibition of growth accompanied with the induction of oxidative damage supported by the increase of the antioxidant enzymes such as SOD, CAT and GST and depletion in GSH content.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: Chiraz BOURAIYOU; Houria BERREBAH; Mohamed Réda DJEBAR.. Methodology: Myriam DJEKOUN; Tayeb BOUARROUDJ. Data collection: BOURAIYOU Chiraz. Data validation and processing: Houria BERREBAH. Writing—original draft preparation: Chiraz BOURAIYOU; Lyes KHENE; Amina YAHYAUI; Houssein KAHLI. Writing—review and editing: Chiraz BOURAIYOU; Houria BERREBAH; Mohamed Réda DJEBAR.

FUNDING

This work was carried out as part of a doctorate in the Cellular Toxicology Laboratory University Badji Mokhtar Annaba Algeria and which was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research-Algeria.

CONFLICT OF INTEREST

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and

REFERENCES

- Ali D, Alarifi S, Kumar S, Ahamed M, Siddiqui M, Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. *Aquatic Toxicology*, 124- 125, 83-90, 2012.
- Amamra R, Djebar MR, Grara N, Moumeni O, Otmani H, Alayat A, and Berrebbah H, Cypermethrin-Induces Oxidative Stress to the Freshwater Ciliate Model: *Paramecium tetraurelia*. *Ann. Res. & Rev. Biol.* 5(5), 385-399, 2015.
- Amr A. Abdel-Khalek, Mohamed AM, Kadry, Shereen R. Badran, Mohamed-Assem S. Marie, Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile Tilapia: *Oreochromis niloticus*: Biochemical and oxidative stress. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 72, 43-57, 2015.
- Arnaldi S, Exploring imaginative geographies of nanotechnologies in news media images of Italian nanoscientists. *Technol Soc*, 37, 49-58, 2014.
- Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A, Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.*, 1461–1468, 2009.
- Ashouri S, Keyvanshokoo S, Salati AP, Johari SA, Zanoosi HP, Effects of different levels of dietary selenium nanoparticles on growth performance, muscle composition, blood biochemical profiles and antioxidant status of

- common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 446, 25-29, 2015.
- Azzouz Z, Berrebah H and Djebbar MR, Optimization of *Paramecium* tetraurelia growth kinetics and its sensivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5,3243-3250, 2011.
- Benbouzid H, Berrebah H, Berredjem M, Djebbar MR, Induction of oxidative stress in *Paramecium* aurelia exposed to a novel Phosphoramidate. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23, 3303-3307, 2014.
- Benbouzid H, Berrebah H, Berredjem M, Djebbar MR, Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium* sp with special emphasis on respiratory metabolism, growth and generation time. *Toxicological and environmental chemistry*,94(3), 557-565, 2012.
- Bernhardt ES, Colman BP, Hochella MF, Cardinale BJ, Nisbet RM, Richardson CJ, Yin L, An ecological perspective on nanomaterial impacts in the environment. *J Environ Qual.* 39, 1954, 2010.
- Bick H, Ciliated protozoa: An Illustrated Guide to the Species Used as Biological Indicators in Freshwater Biology. World Health Organization, Geneva, p 198, 1972.
- Brown PJ, Long SM, Spurgeon DJ, Toxicological and biochemical responses of the earth worm *Lumbricus rubellus* to pyrene a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 57, 1675-1681, 2004.
- Buffet P, Tankoua O, Pan J, Berhanou D, Herrenknecht C, Poirier L, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Bérard JB, Risso C, Guibolini M, Roméo M, Reip P, Valsami-Jones E, Mouneyrac C, Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Archimer*, 84(1), 166-174, 2011.
- Cherait A, Evaluation à l'échelle cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un composé de la famille des dihydropyridines sur un modèle expérimental bioindicateur de stress. PhD Thesis. Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria, 2014.
- Clairborne A, Catalase Activity. In: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Greenwald, R.A. (ed). 3rd Edn., CRC Press, Boca Raton, FL., USA., ISBN-13 :97808849329364 pp: 283-284, 1985.
- Dastjerdi R, Montazer M, A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 79(1), 5-18, 2010.
- Delgado K, Quijada R, Palma R, Palza H, Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent. *Lett Appl Microbiol*, 53(1), 50-4, 2011.
- Disner GR, Guiloski IC, Klingelfus T, Oya Silva LF, Lirola JR, Silva de Assis HC, Cestari MM, Co-exposure effects of Titanium Dioxide Nanoparticles and Metals on antioxidant systems and DNA in the fish *Hoplias intermedius*. *Ecotoxicol Environ Contam*, 12, 75-84, 2017.
- Djekoun M, Berrebah H, Djebbar MR, In vivo Cytotoxicity Assessment of Thiram: Physiological and Biochemical Changes in *Paramecium* sp. *Science and technology*, 320-326, 2015.
- Forbes VE, Palmqvist A, Bach L, The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem*, 25 (1), 272-280, 2006.
- Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI, Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Ménage à Trois Mutat Res*, 674 : 3-22, 2009.
- Frankel J, Cell biology of *Tetrahymena thermophila*. In: Asai DJ, Forney JD, (Eds.). *Methods Cell Biol*, 62, 27-125, 2000.
- Fubini B, Ghiazza M, Fenoglio I, Physicochemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology* (4), 347-36, 2010.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological chemistry*, 249,7130-7139, 1974.
- Handy RD, Owen R, Valsami-Jones E, The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17, 315-325, 2008.
- Hayes JD, Pulford D, The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30, 445-600, 1995.
- Holbrook RD, Murphy KE, Morrow JB, Cole KD, Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. *Nat Nanotechnol*, 3, 352-355, 2008.
- Kahru A, Dubourguier HC, From ecotoxicology to nanoeotoxicology. *Toxicology* (269), 105-119, 2010.
- Kanak EG, Dogan Z, Eroglu A, Atli G, Canli M, Effects of fish size on the response of antioxidant systems of *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Fish Physiol Biochem*, 40, 1083-1091, 2014.
- Karen VH, Joris TKQ, Joanna MB, Karel ACDS, Andreas E, Paul VM, Clifford B, George MCVH, Dik VM, Konrad R, Kenneth, AD, Anna S, Anna L, Iseult L, Geert S, Bjorn DS, Laszlo V, Colin RJ, Fate and effects of CeO₂ nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests. *Environ Sci Technol*, 43, 4537-4546, 2009.
- Keller AA, Wang H, Zhou D, Lenihan HS, Cherr G, Cardinale BJ, Miller R, Ji Z, Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ. Sci. Technol*, 44, 1962-1967, 2010.

- Khalidi F, Grara N, Anti-oxidant activity research of enzymatic biomarkers in protozoa *Paramecium* sp under stress by manufactured nanoparticles. Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie, 38, 51-57, 2016.
- Khebbab N, Evaluation d'une toxicité induite par des nanoparticules (ZnO) sur deux modèles biologiques unicellulaires (*Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium* sp). PhD Thesis. Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria, 2015.
- Khene L, Berrebah H, Yahyaoui A, Bouarroudj T, Zouainia S, Kahli H, Bouraiou C, Biomarkers of oxidative stress, lipid peroxidation and ROS production induces by TiO₂ microparticles on snails *Helix aspersa*. *Studia Universitatis "Vasile Goldis"*, Seria Stiintele Vietii, 27 (2), 127-133, 2017.
- Kim KT, Stephen J. Klaine b, Jaeweon C, Kim S, Sang D. Kim, Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Science of the Total Environment* 408, 2268-2272, 2010.
- Kim S, Young Ryu D, Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 78-89, 2012.
- Klaper R, Crago S, Barr J, Arndt D, Setyowati K, Chen J, Toxicity biomarker expression in daphnids exposed to manufactured nanoparticles: changes in toxicity with functionalization. *Environment Pollution*, 157, 1152-1156, 2009.
- Kozai N, Ohnuk T, Koka M, Satoli T, Kamiya T, Behavioral of *Paramecium* sp in solutions containing Sr and Bp: Do *Paramecium* sp, Alter chemical forms of those metals? *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, (B269), 2391-2398, DOI: 10.1016/j.nimb.02.052, 2011.
- Li K, Chen Y, Zhang W, Pu Z, Jiang L, Chen Y, Surface interaction Affect the Toxicity of Engineered Metal Oxide Nanoparticles toward *Paramecium*. *Chemical Research in Toxicology* (25), 1675-1681, 2012.
- Lin D, Tin X, Wu F, Xing B, Fate and transport of engineered nanomaterials in the environment. *J Environ Qual* 39, 1896-1908, 2010.
- Madoni P, The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environmental Pollution* 109, 53-59, 2000.
- Marino E, Huijser T, Cerghon Y, van der Heijden A, Synthesis and coating of copper oxide nanoparticles using atmospheric pressure plasmas. *Surf Coat Technol*, 201, 9205-9208, 2007.
- Mortimer M, Kahru A, Slaveykova VI, Uptake, localization and clearance of quantum dots in ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Environment Pollution*, 190, 58-64, 2014.
- Moumni O, Berrebah H, Azzouz Z, Amamra R, Otmani H, Alayat A, Benosmane S and Djebbar MR, Effects of Cycloxydim on population Growth, Phagocytosis, Contractile Vacuole Activity and Antioxidant Responses in the fresh water *Paramecium tetraurelia*. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 10 (2), 115-125, 2016.
- Mwaanga P, Elizabeth R, Carraway, Van Den Hurk P, The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. *Journal of aquatic toxicology*, 150, 201-209, 2014.
- Mwaangaa P, Carraway E, Hurk, The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. *Aquatic Toxicology* 150; 201-209, 2014.
- Paoletti F, Mocali A, Caprini A, A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Superoxide Dismutase Activity in Tissue Extracts. *analytical biochemistry*, 153, 536-541, 1986.
- Perreault F, Oukarroum A, Melegari SP, Matias WG, Popovic R, Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*, 87(11), 1388-94, 2012.
- Radwan MA, El-Gendy KS, Gad AF, Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of *Theba pisana* exposed to heavy metals. *Arch Environ Contam Toxicol*, 58, 828-835, 2010.
- Rao J, Venkateswara, Gunda VG, Srikanth K, Arepalli SK. Acute toxicity bioassay using *Paramecium caudatum*, a key member to study the effects of monocrotophos on swimming behaviour, morphology and reproduction. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 89(2), 307-317, 2007.
- Ren G, Hu D, Cheng EWC, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP, Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents*, 33(6), 587-890, 2009.
- Saddick S, Afifi M, Abu Zinada O, Effect of Zinc nanoparticles on oxidative stress-related genes and antioxidant enzymes activity in the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 1672-1678, 2017.
- Salazar-Medina AS, Garcia-Rico L, Garcia-Orozco KD, Valenzuel-Sot E, Contrera-Vergara CC, Arreola R, Arvizu-Flores A, Sotelo-Mundo RR, Inhibition by Cu²⁺ and Cd²⁺ of a Mu-class glutathione S-transferase from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Biochem Mol Toxicol*, 24 (4), 218-222, 2010.
- Vander Oost R, Beyer J, Vermeulen NP, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environment Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149, 2003.
- Wechbeker G, Cory, Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40, 257-264, 1988.
- Wong CK, Cheung MHY, Toxicological assessment of coastal sediments in Hong Kong using a

- flagellate *Dunaliella tertiolecta*. Environmental pollution, 105,175-83, 1999.
- Zhang W, Zhichao Pu, Songyan Du, Yongsheng Ch, Jiang L, Fate of engineered Cerium Oxide nanoparticles in an aquatic environment and their toxicity toward 14 ciliated protist species. Journal of environmental pollution, 212, 584-591, 2015.
- Zhu J, Li D, Chen H, Yang X, Lu L, Wang X, highly dispersed CuO nanoparticles prepared by a novel quick precipitation method. Mater Lett, 26, 3324-3327, 2004.
- Zou XY, Xu B, Yu CP, Zhang HW, Combined toxicity of ferroferric oxide nanoparticles and arsenic to the ciliated protozoa *Tetrahymena pyriformis*. Aquatic Toxicology, 134-135, 66-73. 2013.