



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

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT LMD
(3^{EME} CYCLE)

Spécialité: BIOLOGIE ANIMALE
Option : TOXICOLOGIE

Intitulé

**Toxicité potentielle d'un insecticide sur un
invertébré de la famille des coelomates**

Presentée par : M^{lle}ZERIRI Ibtissem

Directeur de thèse : Dr.TADJINE Aicha

Professeur Université d'El Tarf

Co-Directeur de thèse : Dr. BERREBBAH Houria

Professeur Université de Annaba

Devant le Jury:

Dr.DJEBAR Mohammed-Réda

Président

Professeur

Université de Annaba

Dr.BENSOLTANE Samira

Examineur

Professeur

Université de Annaba

Dr.KHEBBEB Mohamed El-Hadi

Examineur

Professeur

Université de Annaba

Dr. MEZEDJRI Lyamine

Examineur

M.C.A

Université de Skikda

Année universitaire : 2013 /2014

Remerciements

*Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) de l'Université d'Annaba. Je profite de l'occasion qui m'est offerte pour adresser mes vifs remerciements à **Monsieur Mohamed Réda DJEBAR** (Professeur, Université de Annaba) pour sa disponibilité et son souci constant pour que cette thèse se passe dans les meilleures conditions possibles.*

*Toute ma reconnaissance à **Monsieur Lyamine MEZDJERI** (Maitre de Conférences à l'Université de Skikda) pour avoir pris sur son temps et accepter d'examiner ce travail et participer à ce jury.*

*Ma profonde et sincère gratitude et reconnaissance s'adresse à mon directeur de thèse **Madame Aicha TADJINE** (Professeur, Université d'El-Tarf), qui m'a encadrée pendant ces années. Je la remercie pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience pendant des intenses et rationnelles discussions qui m'ont permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions.*

*Des simples remerciements ne sont pas suffisants pour exprimer toute ma reconnaissance envers mon maitre et mon co-directeur, **Madame Houria DJEBAR-BERREBBAH** (Professeur, Université de Annaba) pour sa présence, ses compétences scientifiques, ses qualités humaines, et ses inestimables conseils. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez portée pendant ces années. Je vous remercie très sincèrement.*

*Je remercie encore une fois **Monsieur Mohamed Réda DJEBAR**, non seulement pour avoir accepté de présider ce jury, mais aussi pour s'être pleinement investi à la réalisation de ce travail et sacrifié de son temps pour répondre à mes nombreuses questions, et surtout pour la qualité de la formation qu'il nous a donnée.*

*J'exprime toute ma gratitude à **Madame Samira DJEKOUN-BENSOLTANE** (Professeur, Université de Annaba) pour avoir accepté de juger ce travail et faire partie de ce jury en qualité d'examineur.*

*Ces mêmes remerciements s'adressent à **Monsieur Mohamed El-Hadi KHEBBEB** (Professeur, Université de Annaba) pour sa disponibilité et pour avoir fait partie de ce jury.*

*Je tiens également à remercier **Madame Leila MEKSEM** (Professeur, Université de Annaba) pour son soutien, et ses orientations au cours de ma formation.*

*Ces mêmes remerciements s'adressent à **Madame Mounia BAHA** (Maitre de Conférences «A» à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba) pour son aide précieuse dans l'identification des espèces de vers de terre.*

Je souhaite également faire part de toute ma reconnaissance à mes collègues et amis du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université d'Annaba qui ont largement contribué à l'exécution de ce travail en m'apportant dans les moments difficiles leur aide, leurs encouragements, leur soutien, et leur générosité.

Ne pouvant malheureusement pas citer toutes les personnes que j'ai rencontrées durant mon parcours et qui ont contribué d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin, à l'aboutissement de cette thèse, je leur dis à toutes et à tous merci d'avoir été là à cet instant précis car ils m'ont apporté cette aide qui a sûrement contribué à aller au bout de cette aventure : MaThèse!!!!!!!!!!!!

Dédicaces

A la mémoire de mes parents

*Ce que je ressens aujourd'hui, je ne pourrai pas le traduire par des mots ;
Vous m'avez comblé de votre amour durant la courte vie que nous avons partagé ;
Vous vous avez toujours sacrifié pour que je réussisse dans mes études et j'imagine votre
bonheur si vous étiez présents à mes côtés en ce jour solennel ;
Que le Tout-Puissant vous accorder ses faveurs et vous accueillera dans son paradis ;
Reposes en paix, Maman, Papa.*

A la mémoire de ma grande mère « Nemcha »

*Vous avez toujours cru en mes capacités et vous m'avez toujours soutenu dans mes études ;
Vous m'appeliez déjà « Docteur » ;
Aujourd'hui vos prières sont exaucées ;
J'aurai tant aimé vous voir vivre ce jour ;
Que la terre te soit légère et qu'Allah, le Miséricordieux t'accueille dans son paradis.*

A la mémoire de ma très chère Tante « Fahima »

*Nous n'oublierons jamais les sacrifices que vous avez consentis depuis le décès de nos
parents ;
Ce n'est pas en quelques mots que je peux résumer tout ce que vous êtes pour moi ;
Vous m'avez toujours soutenue et vous avez toujours cru en moi ;
Votre fierté est ma plus belle récompense, Repose en paix chère tante.*

A mon cher grand frère « Samir »

*Pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour le bien-être de tes frères ;
Pour l'exemple de noblesse d'âme que vous constituez et pour vos sens du devoir ;
J'espère que ce travail vous servira de réconfort.
Puisse le bon Dieu te garder encore longtemps auprès de nous.*

A ma sœur « Nour el Houda »

*Je ne saurais trouver les mots exacts pour vous exprimer ma gratitude ;
Ce travail est le fruit de votre soutien et de vos encouragements renouvelés ;
Puisse le bon Dieu vous protéger, vous accorder une longue vie.*

A mon petit frère « Fares »

*En témoignage de mon amour fraternel ;
Puisse Dieu Vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser vos vœux les plus chers.*

A mes chers grands-parents

De votre affection de votre sacrifice et de tous les efforts que vous avez déployés durant toute ma vie j'espère que ce travail soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect.

A ma belle-mère « maman latifa »

*Vous m'avez accueilli à bras ouverts dans votre famille ;
En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond amour et respect.*

A mon fiancé « Housseem », pour sa compréhension, et ses encouragements.

A mes très chers neveux : Abderrahmen, Chahine et mon adorable nièce Nourhène, vous êtes une source de joie et de fierté pour toute la famille. Joyeuse et longue vie à vous tous.

Enfin, un immense merci va à ma famille pour m'avoir supporté et encouragé dans les moments parfois désespérés tout au long de mes études.

RESUMES

Résumé

Ce travail consiste à étudier l'impact d'un insecticide utilisé couramment en Algérie : le Méthomyl sur un organisme bioindicateur de pollution, le vers de terre (*Octodrilus complanatus*).

Dans un premier temps, une étude d'identification des vers de terre collectés de différents sites de la région de Annaba a été effectuée, les résultats de l'étude taxonomique du peuplement lombricien de notre région, a révélé que les espèces échantillonnées appartiennent à la famille des Lumbricidae, quatre genres lombriciens (*Octodrilus*, *Nicodrilus*, *Eisenia*, *Allolobophora*) correspondant à 4 espèces : *Octodrilus complanatus*, *Nicodrilus caliginosus*, *Eisenia foetida*, *Allolobophora chlorotica*.

Dans notre travail, nous nous sommes concentrés sur les effets du Méthomyl sur les vers de terre à l'aide des tests toxicologiques où les critères d'évaluation sont : la croissance et le taux de mortalité.

D'un autre côté, nous nous sommes intéressés à une batterie de biomarqueurs tels que : GSH, Activité GST, Activité CAT, Activité AChE, et le taux de MDA et leur évolution en présence du xénobiotique chez un organisme bioindicateur (*Octodrilus complanatus*). Nos résultats mettent en évidence une toxicité confirmée par l'augmentation de la peroxydation des lipides (MDA). Cet effet est accompagné par le déclenchement d'un système de détoxification (GSH, GST) et la stimulation de l'activité enzymatique anti-oxydante : la Catalase ainsi qu'une inhibition de l'activité AChE, traduisant une neurotoxicité de Méthomyl.

Enfin, L'examen histologique a confirmé la toxicité du Méthomyl chez le vers de terre, et ce à travers des altérations tissulaires très importantes au niveau de l'épiderme.

Mots clés : Identification, Méthomyl, Biomarqueur, Physiologie, Stress oxydant, Histologie.

Abstract

This work consists to study the impact of an insecticide used fluently in Algeria : Methomyl on an bioindicator organism of pollution, earthworms (*Octadrilus complanatus*).

At first time, a study of identification of earthworms collected by various sites of the region of Annaba has been effected, the results of the taxonomic study of earthworm population in our region, revealed that the sampled species belong to the family Lumbricidae, four kinds earthworms (*Octodrilus*, *Nicodrilus*, *Eisenia*, *Allolobophora*) corresponding to four species: *Octodrilus complanatus*, *Nicodrilus caliginosus caliginosus*, *Eisenia foetida*, *Allolobophora chlorotica*.

In our work, we have concentrated on the effects of Methomyl on earthworms using toxicological tests where the criteria of evaluation are: growth and mortality rates.

On the other hand, we are interested in a battery of biomarkers such as : GSH, GST activity, CAT activity, AChE activity and MDA rate and their evolution in the presence of the xenobiotic in a bioindicator organism (*Octadrilus complanatus*). Our results highlight a toxicity confirmed by the increase in the peroxidation of lipids (MDA). This effect is accompanied by the outbreak of a detoxification system (GSH, GST) and stimulation of the antioxydant enzymatic activity : the Catalase as well as an inhibition of the AChE activity, translating a neurotoxicity of Methomyl.

Finally, the histological examination confirmed the toxicity of the Methomyl to earthworms, and it through tissue alteration very important at the level of the skin.

Keywords: identification, Methomyl, Biomarkers, Physiology, oxidative Stress, Histology.

ملخص

هذا العمل يتمثل في دراسة تأثير المبيدات الحشرية المستخدمة عادة في الجزائر على كائنات مؤشرة للتلوث، دودة الأرض (*Octadrilus complantus*).

في البداية، دراسة لتحديد دودة الأرض التي تم جمعها من مواقع مختلفة في منطقة عنابة تم إجراؤها، نتائج الدراسة التصنيفية من سكان ديدان الأرض في منطقتنا، أوضحت أن أنواع عينات تنتمي إلى عائلة Lumbricidae ؛ أربعة أجناس لديدان الأرض (*Octodrilus, Nicodrilus, Eisenia, Allolobophora*) المقابلة لأربعة أنواع : *Octodrilus complanatus* ، *Nicodrilus caliginosus caliginosus* ، *Eisenia foetida* ، *Allolobophora chlorotica*.

في عملنا، ركزنا على آثار ميثوميل على دود الأرض باستخدام اختبارات السمية حيث معايير التقييم هم : النمو و الوفيات.

من ناحية أخرى، يتم استخدام بطارية من المؤشرات الحيوية مثل : GSH، والنشاط الانزيمي GST، النشاط الانزيمي CAT، النشاط الانزيمي AChE، ومستويات MDA في الكائن المؤشر (*Octadrilus complantus*). نتائجنا تبرز أهمية إجهاد الأكسدة المترجمة بأكسدة الدهون الواضحة MDA. هذا التأثير مرافق بانديلاع نظام إزالة السموم (GSH, GST) وتحفيز نشاط انزيم الأكسدة: CAT وتثبيط نشاط انزيم AChE مما أدى السمية العصبية ميثوميل.

وأخيرا، أكد الفحص النسيجي سمية الميثوميل في دودة الأرض، من خلال التغييرات النسيجية مهمة جدا على مستوى الجلد.

الكلمات المفتاحية : تحديد، ميثوميل، المؤشرات الحيوية، فيزيولوجيا، إجهاد الأكسدة، علم الأنسجة.

TABLE DES MATIÈRES

Résumés

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Planches

Liste des Abréviations

Chapitre I : Introduction générale

1-Généralités	1
2-Rappel sur le phénomène de la bioindication	2
3- Rappel sur les annélides	3
4-Taxonomie général des Oligochètes	6
4.1-Morphologie	6
4.2-Régions du corps	6
4 .2.1- Prostomium	7
4.2.4- Soma	8
4.2.3- Pigydium	8
4.2.4- Soies	8
4.2.5- Caractères sexuels externes	9
4-3 Anatomie	9
5-Rappel sur les pesticides	11
• Les fongicides	12
• Les herbicides	12
• Les insecticides	12
5.1-Propriétés physico-chimiques de la matière active du Méthomyl	12
6-Rappel sur le phénomène du stress oxydant	13
6-1 Systèmes enzymatiques	14

TABLE DES MATIÈRES

6-2 Systèmes non-enzymatiques	16
* Cas de l'AcétylcholinEstérase	16
Objectif	17
Chapitre II : Matériel et méthodes	
1- Régions d'étude	18
1.1- Foret de la commune de Seraïdi	18
1.2- Chorfa	19
1.3- Pépinière de Sidi Amar	19
1.4- La réserve intégrale du lac Tonga EL-KALA	19
2- Matériel biologique	19
2.1- Méthode d'identification et description des espèces	19
2.2- Choix de l'espèce	19
2.3- Systématique du ver de terre	20
3- Matériel Chimique	20
4- Conditions expérimentales	20
5-Mode de traitement	21
6-Méthodes	21
6.1-Méthodes de prélèvement des animaux	21
6.2-Essais toxicologiques	21
6.2.1-Suivi du pourcentage de Mortalité	21
6.2.2-Suivi du taux de Croissance	21
6.3- Dissection et prélèvement du tissu	21
6.4-Méthodes de dosage	22
6.4.1-Dosage des Protéines totales	22
6.4.2-Dosage du Glutathion (GSH)	22

TABLE DES MATIERES

6.4.3-Dosage de l'activité GST (Glutathion S-Transférase)	22
6.4.4-Dosage de l'activité Catalase	23
6.4.5- Dosage du Malondialdéhyde (MDA)	24
6.4.6- Dosage de l'activité AcétylcholinEstérase (AChE)	24
7-Etude histologique	25
8- Analyse statistique des résultats	25

Chapitre III : Résultats et discussion

Partie I : Identification des vers de terre

1-Taxonomie	27
2-Description des espèces répertoriées	28
* <i>Octodrilus complanatus</i>	28
* <i>Nicodrilus caliginosus caliginosus</i>	28
* <i>Eisenia foetida</i>	29
* <i>Allolobophora chlorotica</i>	29
3-Discussion	30

Partie II : Effet du Méthomyl sur la survie et la croissance des vers de terre

1- Essais toxicologiques	32
1.1- Evaluation du pourcentage de Mortalité	32
1.2- Evaluation du taux de Croissance	33
2- Discussion	34

TABLE DES MATIERES

PARTIE III : Etude du Stress oxydant

1- Effet du Méthomyl sur les variations du taux des Protéines totales	35
2- Effet du Méthomyl sur le taux de Glutathion (GSH)	36
3- Effet du Méthomyl sur l'activité Glutathion-S-Transférase	36
4- Effet du Méthomyl sur l'activité Catalase	37
5- Effet du Méthomyl sur le taux du Manlondialdehyde (MDA)	38
6- Effet du Méthomyl sur l'activité AcétylcholinEstérase (AchE)	39
7- Discussion	40

Partie IV : Etude histologique des vers de terre

1- Aspect de l'épiderme après 3 jours de traitement par des concentrations croissantes du Méthomyl	45
2- Aspect de l'épiderme après 6 jours de traitement par des concentrations croissantes du Méthomyl	47
3- Aspect de l'épiderme après 9 jours de traitement par des concentrations croissantes du Méthomyl	47
4- Aspect de l'épiderme après 12 jours de traitement par des concentrations croissantes du Méthomyl	49
5- Discussion	52

Conclusion générale et Perspectives	54
--	-----------

Références bibliographiques	56
------------------------------------	-----------

LISTE DES FIGURES

Liste des figures

N°	Titre	pages
1	Voies de transfert des produits phytosanitaires dans l'environnement (Source : SRPV, 2011)	2
2	Les zones où vivent les trois grands groupes de vers de terre (http://www.bioactualites.ch/)	5
3	Vue ventrale d'un ver de terre (El-Addan, 1992), les régions du corps, et les caractères externes (Bouché, 1972)	7
4	Les différents types de prostomium (Bouché, 1972)	7
5	Dispositions des soies chez le ver de terre (Bouché, 1972)	8
6	Coupe transversale d'un métamère de lombric (www.salinella.bio.uottawa.ca(2009))	9
7	Anatomie interne de la région antérieure (vue dorsale) (http://imageshack.us/photo/my-images/36/dissection.jpg/)	11
8	Mécanismes des lésions biochimiques induites par le stress oxydant (Sergent et al., 2000)	14
9	carte géographique de Annaba (Google Maps), avec les différents sites de collection des vers de terre	18
10	<i>Octodrilus complanatus</i>	20
11	Formule développée du Méthomyl	20
12	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	26
13	Morphologie d' <i>Octodrilus complanatus</i> (Baha, 2008)	28
14	Morphologie de <i>Nicodrilus caliginosus</i> (Baha, 2008)	28
15	Morphologie d' <i>Eisenia foetida</i> (Baha, 2008)	37
16	Morphologie d' <i>Allolobophora chlorotica</i> (Baha, 2008)	29
17	Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur le taux de croissance des vers de terre <i>Octodrilus complanatus</i> en fonction du temps	33

LISTE DES FIGURES

18	Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur le taux des protéines totales chez les <i>Octodrilus complanatus</i> en fonction du temps	35
19	Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur le taux de GSH chez les <i>Octodrilus complanatus</i> en fonction du temps	36
20	Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur sur l'activité Glutathion-S-Transférase (GST) chez les <i>Octodrilus complanatus</i> en fonction du temps	37
21	Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur l'activité Catalase (CAT) chez les <i>Octodrilus complanatus</i> en fonction du temps	38
22	Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur le taux du MDA chez les <i>Octodrilus complanatus</i> en fonction du temps	38
23	Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur l'activité AcétylcholinEsterase (AChE) chez les <i>Octodrilus complanatus</i> en fonction du temps	39

LISTE DES TABLEAUX

Liste des tableaux

N°	Titre	pages
1	Propriétés physico-chimiques du Méthomyl	13
2	Les groupes éco-morphologiques des espèces lombriciennes prélevées	27
3	Pourcentage de mortalité observé chez des vers de terre adultes traités par le Méthomyl durant la période d'exposition	32

LISTE DES PLANCHES

Liste des planches

N°	Titre	pages
1	Aspect de l'épiderme après 3 jours de traitement avec des concentrations croissantes de Méthomyl	46
2	Aspect de l'épiderme après 6 jours de traitement avec des concentrations croissantes de Méthomyl	48
3	Aspect de l'épiderme après 9 jours de traitement avec des concentrations croissantes de Méthomyl	50
4	Aspect de l'épiderme après 12 jours de traitement avec des concentrations croissantes de Méthomyl	51

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

AChE : Acétylcholine Estérase

BSA : Sérum albumine bovine

CAT : Catalase

CDNB : 1-chloro, 2.4-dinitrobenzène

DNTB : Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique

GPx : Glutathion peroxydases

GSH : Glutathion réduit

GST : Glutathion-S-Transférase

GSSG : Glutathion disulfide

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

MDA : Malonedialdéhyde

¹O₂ : Oxygène singulet

O₂^{-•} : Anion superoxyde

[•]OH : Radical hydroxyle

ROS : Espèce réactive oxygène

SOD : Superoxyde dismutase

TBA : acide thiobarbiturique

TCA : Trichloroacétique.

UMA : Unité de masse atomique

CHAPITRE I :
INTRODUCTION
GENERALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1- Généralités :

Les écosystèmes naturels, qu'ils soient aquatiques ou terrestres, présentent un intérêt écologique majeur, et constituent la base du développement socio-économique humain (**Jian et al., 2007**). Ils constituent des entités en équilibre dynamique susceptibles d'évoluer en fonction de variations spontanées ou provoquées par des facteurs extrinsèques, climatiques ou autres (**Ramade, 2002**).

Notre biodiversité a été longtemps préservée, mais les principaux constituants de notre environnement ont été particulièrement modifiés par la libération de diverses molécules dont certaines se révèlent toxiques non seulement pour la flore et la faune mais également pour la santé humaine.

La prise de conscience de la nécessité de protéger les cultures est certainement simultanée à la naissance de l'agriculture (**Schiavon, 1998**). La lutte contre les organismes nuisibles des cultures a été pendant longtemps de nature physique : ramassage des insectes, destruction des plantes malades par le feu, désherbage manuel puis mécanique (**Calvet et al., 2005**). De nombreuses substances toxiques telles que les pesticides sont générées par les activités humaines quotidiennement et déversées dans l'environnement. Cette pollution peut alors être une source de stress pour les organismes non cibles. La majeure partie des substances n'atteint pas la cible et peut donc se disperser dans l'environnement et rejoindre l'atmosphère, le sol, et les eaux (**Murati, 2012**).

Nombreux phénomènes influencent le devenir des pesticides dans l'environnement: l'adsorption, la volatilisation, la dérive gazeuse, le ruissellement, l'infiltration. Pendant l'épandage, des phénomènes de transferts peuvent avoir lieu vers l'atmosphère sous forme de gouttelettes (phénomène de dérive) ou de gaz (phénomène d'évaporation). Le phénomène de dérive a fait l'objet d'un grand nombre d'études, en revanche la génération d'une phase gazeuse reste encore méconnue (**Coparly, 2008**).

Après l'application, des phénomènes de transferts peuvent encore avoir lieu par volatilisation depuis le sol ou le végétal, ou bien par érosion éolienne. La volatilisation dépend des caractéristiques physico-chimiques de la substance et des conditions climatiques, notamment la température. Les composés émis sont alors dispersés dans l'atmosphère, parfois sur de très longues distances (**Coparly, 2008**) (**Figure1**).

INTRODUCTION GENERALE

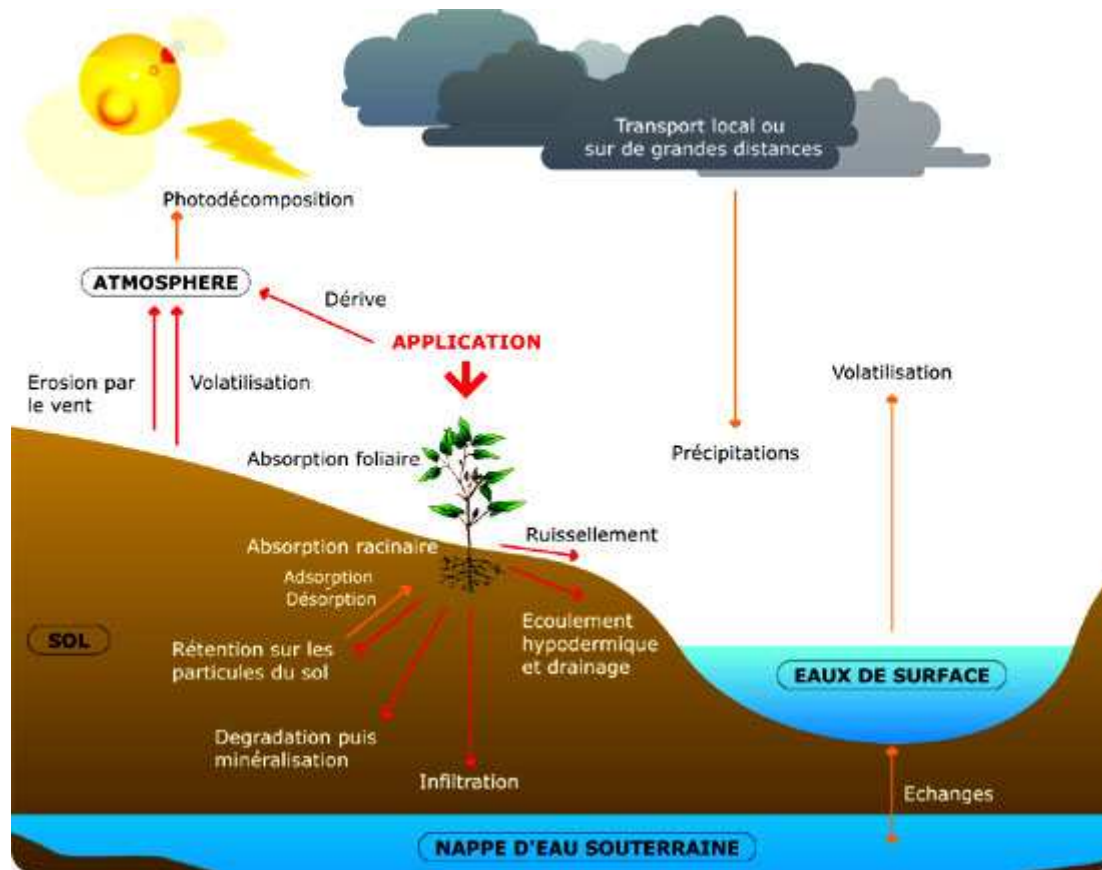


Figure 1 : Voies de transfert des produits phytosanitaires dans l'environnement.
(Source : SRPV, 2011)

2- Rappel sur le phénomène de la bioindication :

La recherche d'outils de surveillance de la qualité des écosystèmes et la mise au point de méthodes d'évaluation du risque environnemental mobilisent d'intenses efforts de la part d'une large communauté scientifique depuis les dernières décennies (**Guerlet, 2010**). Les méthodes d'analyses physico-chimiques, bien que toujours plus performantes, atteignent leurs limites en tant qu'outils d'aide à la gestion environnementale, car elles ne prennent généralement pas en compte la notion de spéciation ou de biodisponibilité des polluants. Il est donc apparu nécessaire de compléter ces mesures par des données biologiques permettant d'évaluer l'effet potentiel global des substances présentes dans le milieu vivant (**Ladhar-Chaabouni et al., 2009**).

Certaines espèces sont très sensibles aux variations des conditions environnementales, qu'elles soient d'origine biotique ou abiotique et y répondent proportionnellement par des

INTRODUCTION GÉNÉRALE

changements mesurables à différents niveaux d'intégration (spatial, morphologique, physiologique, cellulaire, ou bien encore moléculaire). Tous ces changements peuvent s'ils sont bien utilisés, constituer des bioindicateurs, outils précoces et sensible à une large gamme de polluants, pour détecter une dégradation comme une restauration du milieu (**Wu et al., 2005 ; Figueira et al., 2009**). Les bioindicateurs sont définis comme espèces ou groupes d'espèces qui, par leur présence et/ou leur abondance, sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie (**Guelorget et Perthuisot, 1984**).

D'innombrables travaux ont été publiés sur l'emploi de bioindicateurs tels que les espèces bioaccumulatrices destinées à évaluer la qualité des milieux naturels. En effet, l'accumulation de certains polluants par les organismes bioaccumulateurs facilite leur mise en évidence et leur quantification par des méthodes chimiques et/ou physiques. De plus, les espèces bioaccumulatrices retenues comme bioindicatrices sont en général des espèces abondantes, relativement résistantes aux toxiques et d'une durée de vie suffisante qui leur confère une capacité d'intégration des variations de la qualité du milieu (**Amiard et al., 1989**). Parmi les organismes de la faune terrestre, les invertébrés sont utilisés comme bioindicateurs de pollution. Il en est ainsi des mollusques bivalves et des gastéropodes terrestres et aquatiques, certains arthropodes (les crustacés), et les annélides (Polychètes, Achètes) et surtout les oligochètes (**Beeby, 2001**) objet de notre étude.

3- Rappel sur les annélides :

Depuis plusieurs décennies, l'étude du monde vivant du sol a pris de plus en plus d'importance, car plusieurs centaines d'années en arrière le philosophe grec Aristote respectait les vers de terre en tant qu'améliorateurs et garants de la fertilité du sol et les avait surnommé "intestins de la terre". **Charles Darwin (1809-1882)** a étudié le vers de terre et donna à cette famille ses lettres de noblesse en lui consacrant un livre paru en **1881** dans lequel il affirmait qu'il n'existe peut-être aucune autre créature dont le rôle a été aussi important dans l'histoire de la vie sur Terre (**Bogdanov, 1996**).

Les Annélides sont principalement représentés dans les écosystèmes terrestres par les vers de la classe des oligochètes qui représentent une composante majeure de la macrofaune du sol puisque, dans la plupart des écosystèmes terrestres, ils dominent en biomasse. Ils sont également connus comme étant de bons bioaccumulateurs de certains polluants comme les métaux lourds, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les vers de terre sont des organismes communs dans le sol et jouent un rôle important au niveau de l'écosystème terrestre en tant que décomposeurs (**Edwards et Bohlen, 1996**). Ils jouent en effet un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique du sol mais également dans la structuration (agrégats) et dans l'aération du sol en creusant des galeries (**Bartlett et al., 2010**). Ils ont un rôle important dans la chaîne alimentaire car ils sont une source d'alimentation pour les niveaux trophiques supérieurs.

En **1994**, plus de 3 600 espèces de vers de terre avaient été recensées dans le monde, auxquelles s'ajoutaient plus de soixante nouvelles espèces chaque année (**Pelosi, 2008**). La première description d'une espèce de vers de terre en Algérie, a été faite par **Gandolphe** en 1861 dans la région de Annaba. Par la suite, **Beddard (1892)** a signalé la présence de *Microscoclex algeriensis*. Dès lors, les travaux ont été interrompus et n'ont été repris qu'en **1987** par **Omodeo et Martinucci** qui ont identifié des vers de terre dans les régions forestières du massif du Djurdjura, de l'Akfadou et du massif de l'Edough. En **1992**, **Baha** a entrepris une étude quantitative et qualitative des vers de terre sur des sols cultivés. En **1997**, **Barra** a identifié les oligochètes des régions d'El Harrach, du Hamma et Birtouta. En **2003**, **Omodeo, Rota et Baha** s'intéressèrent à la biogéographie et les caractères écologiques des oligochètes du Maghreb.

En France, **Bouché (1972)** a recensé environ 180 espèces de lombriciens. Cet auteur a proposé de classer les vers de terre en trois catégories écologiques, basées sur des critères morphologiques (pigmentation, taille), comportementaux (alimentation, construction de galeries, mobilité) et écologiques (longévité, temps de génération, prédation, survie à la sécheresse). Toujours selon **Bouché (1977)**, **Edwards et Lofty (1977)**, et **Lee (1985)**, on distingue 3 grands groupes écologiques de lombriciens.

Les épigés : qui sont des vers pigmentés de petite taille (10 à 30 mm en général) et vivent généralement dans la litière de surface et se nourrissent des matières organiques en décomposition dans cette litière (**Bouché, 1977 ; Lee, 1985**).

Les endogés : qui sont des vers dépigmentés, sans couleurs ou très pâles, de taille variable (1 à 20 cm), vivant généralement dans les premiers centimètres de sol où ils construisent des galeries d'orientation quelconque (**Bouché, 1977**).

Les anéciques : qui sont de couleur brune, de taille moyenne à géante (10 à 110 cm), ce sont ceux qu'on appelle les "lombrics". Ils creusent des galeries verticales profondes à

INTRODUCTION GÉNÉRALE

subverticales plus ou moins ramifiées s'ouvrant en surface. Ils ont un mode de vie mixte, et se nourrissent de débris organiques prélevés en surface et qu'ils laissent pourrir dans le sol avant de les ingérer avec du sol (**Bouche, 1977**) (**Figure 2**).

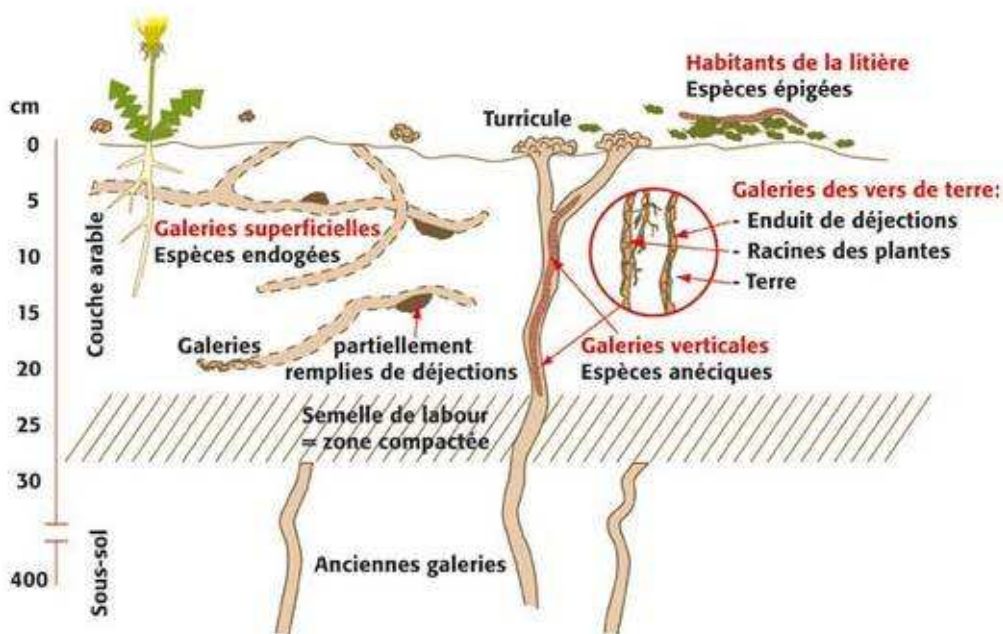


Figure 2 : Les zones où vivent les trois grands groupes de vers de terre.
(<http://www.bioactualites.ch/>)

L'inventaire systématique et la répartition des vers de terre en Algérie sont encore mal connus (**Baha et al., 2001** ; **Omodeo et al., 2003** ; **Kherbouche et al., 2012** ; **Zeriri et al., 2013**). Par contre, dans la plupart des pays du pourtour méditerranéen, ce travail de base a déjà été effectué.

Les vers de terre sont les premiers récepteurs touchés par la contamination, soit par voie cutanée soit par ingestion. Ils sont plus sensibles aux polluants environnementaux, tels que les métaux lourds et les pesticides que d'autres groupes d'invertébrés (**Stürzenbaum et al., 1998** ; **Xiao et al., 2006**). Ils sont la proie commune de beaucoup d'espèces vertébrées telles que des oiseaux et des musaraignes et par conséquent, la bioaccumulation de contaminants chimiques par les vers de terre implique le risque de transfert des polluants vers les niveaux trophiques supérieurs (**Marino et al., 1992**). Ils jouent donc un rôle principal dans le processus de biomagnification de plusieurs polluants du sol et en l'occurrence des effets indirects sur les vertébrés terrestres (**Dell'Omo et al., 1999**). Même si la bioaccumulation des pesticides dans les vers de terre ne peut conduire à des effets significatifs sur l'animal lui-

INTRODUCTION GÉNÉRALE

même, elle peut produire des dommages graves à des niveaux trophiques. Les vers de terre ont fait l'objet de nombreuses études tant sur un plan écologique (dénombrement, reproduction, taux de survie...) (Capowiez et al., 2003 ; Mosleh et al., 2003 ; Ammer et al., 2006) qu'en tant que bioindicateurs de la qualité d'un sol (Pattison et al., 2008 ; Suthar et al., 2008). Enfin, les oligochètes terrestres s'avèrent être également un groupe largement utilisé pour le suivi écotoxicologique de la pollution d'un sol par l'analyse de biomarqueurs enzymatiques et des perturbations de leur état physiologique (Reinecke et al., 2007 ; Brulle et al., 2008a ; Bonnard et al., 2009).

4- Taxonomie général des Oligochètes :

Les lombriciens sont des invertébrés, appartenant à l'embranchement des Annélides (Lamarck, 1801), à la classe des Clitellata, sous-classe des Oligochaeta (Huxley, 1875), et à l'ordre des Haplotaxida, et se répartissent en plusieurs familles suivant des caractéristiques spécifiques.

4.1- Morphologie :

La morphologie externe et l'anatomie interne des oligochètes est détaillée dans des ouvrages généraux tels que Avel (1959). Lorsque les vers de terre ne sont pas pigmentés, ils sont qualifiés d'albiniques (Bouché, 1972) quoique leur teinte apparente puisse être assez variée, elle dépend en effet, de la coloration interne des organes, du fluide coelomique, du tube digestif et de son contenu.

Leur corps est mou, toujours humide grâce à un léger mucus. Ils se déplacent en contractant et allongeant alternativement leurs segments. Signalons que les vers de terre ont une odeur caractéristique, généralement assez discrète, mais qui devient relativement forte et désagréable chez *Eisenia fetida* (Baha, 2008).

4.2- Description morphologique :

Le corps d'un ver de terre est composé de trois régions successives, le prostomium, le soma et le pygidium (Figure 3).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

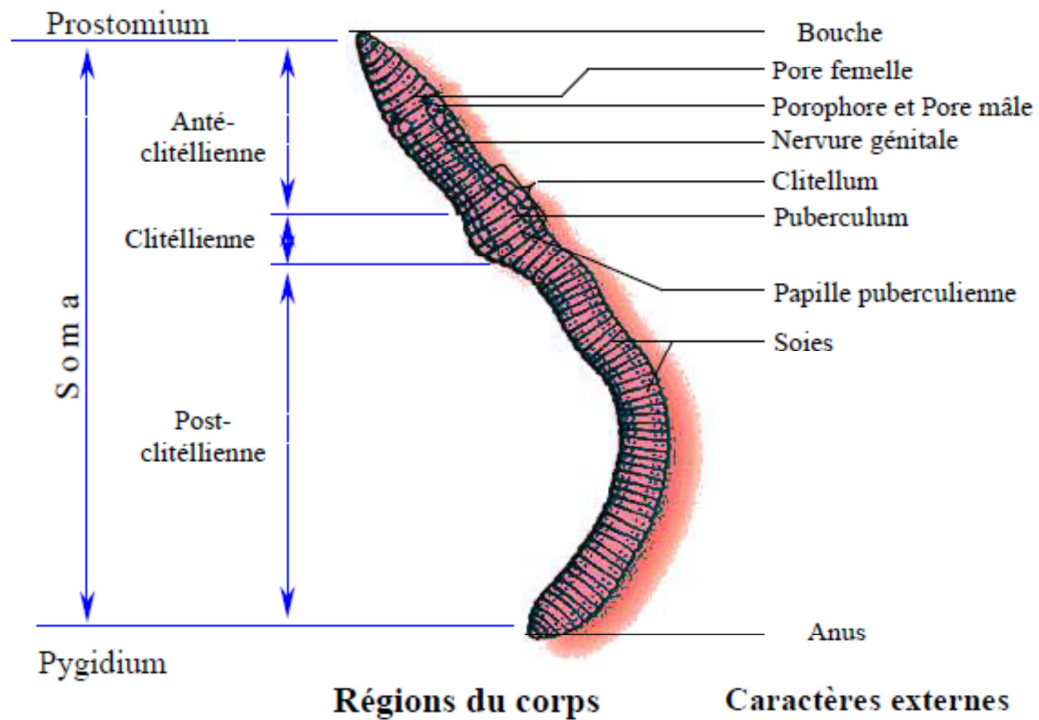


Figure 3 : Vue ventrale d'un ver de terre (El-Addan, 1990), les régions du corps, et les caractères externes (Bouché, 1972).

4.2.1- Prostomium :

Le prostomium (du grec *pro*, devant et *stoma*, bouche) est de forme triangulaire, c'est un petit organe situé au-dessus de la bouche et fusionné avec le premier segment ou péristomium (du grec *peri*, autour). Comme son nom l'indique, ce premier segment entoure la bouche. Le prostomium peut encore être subdivisé transversalement par un sillon et parcouru de rides longitudinales. Chez les vers de terre, il existe plusieurs prostomium sont représentés dans la **Figure (4)**.

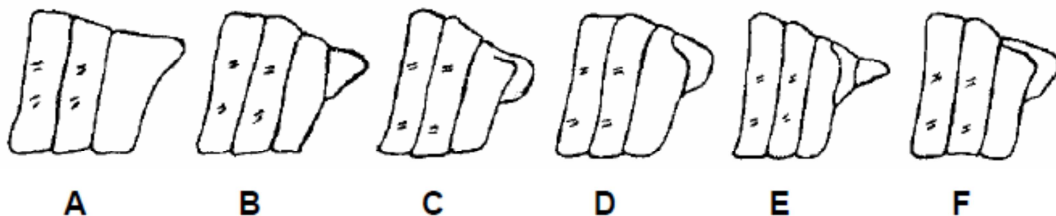


Figure 4 : Les différents types de prostomium (Bouché, 1972).
Prostomiums : zyglobique (A), prolobique (B), épilobique ouvert (C), épilobique, fermé (D), subdivisé (E) et tanylobique (F)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

4.2.2- Soma

Le soma constitue la quasi-totalité du corps. Il est entièrement métamérisé (ou segmenté), c'est-à-dire le corps est constitué par une série de nombreux anneaux successifs appelés les métamères. Chez l'adulte, le soma peut être subdivisé extérieurement, et par rapport au clitellum, en trois zones : *Anteclitellienne*, *clitellienne*, *Posteclitellienne* (Figure 3).

4.2.3- Pygidium

Le pygidium (du grec *pygê*, fesse) est le dernier segment de l'animal, dépourvue de cavité coelomique et qui entoure l'anus.

4.2.4- Soies

Les soies constituent l'un des caractères principaux utilisés pour l'identification des vers de terre. Elles sont de nature double, protéique, chitineuse et sont rigides. Les soies sont groupées en faisceaux dans chaque segment, excepté le prostomium, le peristomium et quelques segments postérieurs. Chaque soie est implantée dans la paroi du corps dans un sac et chaque segment contient le plus souvent quatre faisceaux : deux latéraux-dorsaux et deux latéraux-ventraux.

Il existe deux types de disposition de soie : type lombricienne (Avoir 8 soies par segment souvent se répartissent en 4 paires) et perichaetienne (Avoir plus de 8 soies par segment se répartissent autour de la circonférence du corps).

Les écarts entre les soies sont variables mais constants au niveau d'un même segment et à l'intérieur d'une population, ce qui conduit à l'usage fréquent de ce caractère en taxonomie (Figure 5).

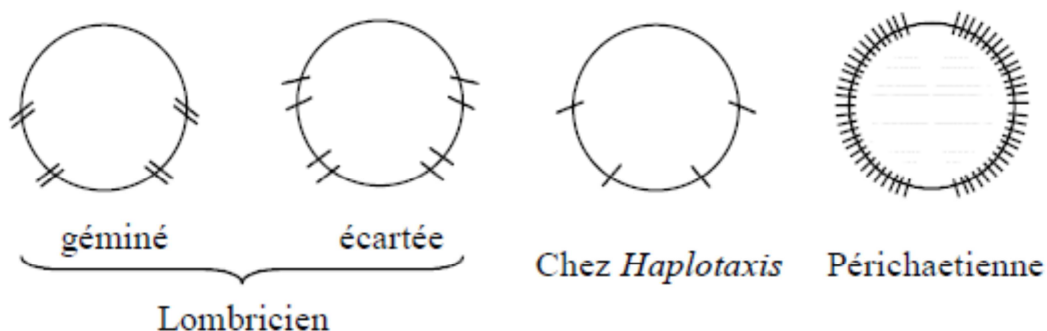


Figure 5 : Dispositions des soies chez le ver de terre (Bouché, 1972).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

4.2.5- Caractères sexuels externes

Au moment de la maturation sexuelle, les organes génitaux se développent et des caractères sexuels secondaires se différencient. Ces caractères, tant internes qu'externes, fourniront un grand nombre d'indications qui sont très précieuses pour le systématicien. **Avel (1929)** a décrit la chronologie du développement sexuel. Il y a d'abord développement des organes liés au processus d'accouplement (chaetophores, atriums mâles, nervures génitales, puberculurris) puis de celui lié à la ponte (clitellum). Ils ont une grande utilité dans la détermination des taxons lombriciens (**Bouché, 1972 et Bachelier, 1978**). Il s'agit en particulier de :

- L'emplacement des orifices mâles, dont les lèvres sont épaisses et blanchâtres au moment de la reproduction. Par contre, les orifices femelles sont difficilement déterminés.
- L'emplacement du clitellum ou selle, qui est un signe de la maturité sexuelle, son importance taxonomique est reconnue dès **1821** par **Savigny**.

4.3- Anatomie

Les vers de terre appartiennent au groupe des coelomates triploblastiques protostomiens. Ce sont des animaux typiquement métamérisés, à symétrie bilatérale. Ils possèdent de cavités cœlomiques métamérisées (**Figure 6**). Ces cavités sont homonomes, c'est-à-dire régulières avec répétition des néphridies et des ganglions et remplies de fluide : le cœlome.

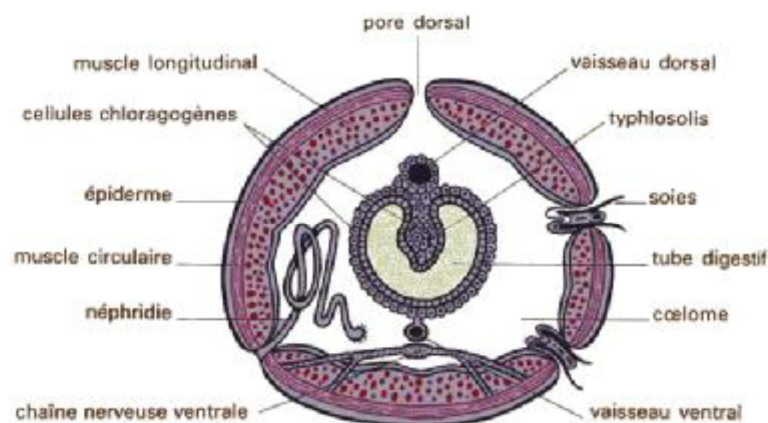


Figure 6 : Coupe transversale d'un métamère de lombric.
(www.salinella.bio.uottawa.ca(2009))

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La physiologie des lombriciens a été largement décrite par **Laverack (1963)**, **Edwards et Lofty (1977)**, et **Tomlin (1980)**. Les lombriciens possèdent un (squelette) hydrostatique dû à la présence du coelome, ce qui leur permet de se déplacer par des mouvements péristaltiques du corps.

Ils sont constitués de deux tubes coaxiaux. Entre ces deux tubes, des cloisons transversales, les dissépiments, marquent la limite de chaque métamère et délimitent entre elles les cavités coelomiques : le tube interne et le tube digestif. Le tube externe, ou paroi du corps, est composé d'un épiderme enveloppé d'une cuticule, d'une couche de muscles circulaires et une autre de muscles longitudinaux. Cette musculature est adaptée à leur mode de locomotion de fousseurs.

Le système nerveux est formé d'une chaîne nerveuse ventrale et d'un simple ganglion cérébroïde qui produit des neurosécrétions fondamentales pour la reproduction. Les vers de terre présentent un système circulatoire fermé, et comporte deux vaisseaux : un ventral est un dorsal et des capillaires qui irriguent les différents organes.

Le tube digestif est constitué d'un tube interne qui parcourt toute la longueur du ver et qui présente des modifications locales pour assurer certaines fonctions digestives spécialisées. Le tube digestif qui débute par un simple orifice la bouche, comporte directement un pharynx suivi, dans un ordre variable, d'un œsophage plus ou moins long, de glande de Morren, d'un jabot et d'un gésier, ces différentes spécialisations peuvent faire défaut, cet ensemble est suivi d'un long intestin comportant le plus souvent un repli interne, dorsal, le typhlosolis (cet organe a un développement et une morphologie très variables en fonction des espèces).

Du fait d'une respiration cutanée, les vers de terre ne possèdent pas de poumons, le corps doit rester humide pour permettre la respiration, ainsi que des (cœurs) latéraux jouant le rôle de pompes.

Les néphridies des vers de terre sont les organes de l'excrétion et de l'osmorégulation, elles jouent un rôle important dans l'élimination. Une néphridie comporte un néphrostome prolongé par un long tube ayant une morphologie très variable qui débouche à l'extérieur par un néphridiopore. En général, il existe une paire de néphridies par segment (**Bouché, 1972**).

Les vers de terre sont des animaux hermaphrodites à fécondation croisée, on trouve chez un même individu des caractères mâles et des caractères femelles. En revanche, la

INTRODUCTION GÉNÉRALE

reproduction se fait toujours entre deux individus, rare est le cas où il existe une fertilisation directe de l'œuf ou Amphimixie (**Razafindrakoto, 2012**) (**Figure7**).

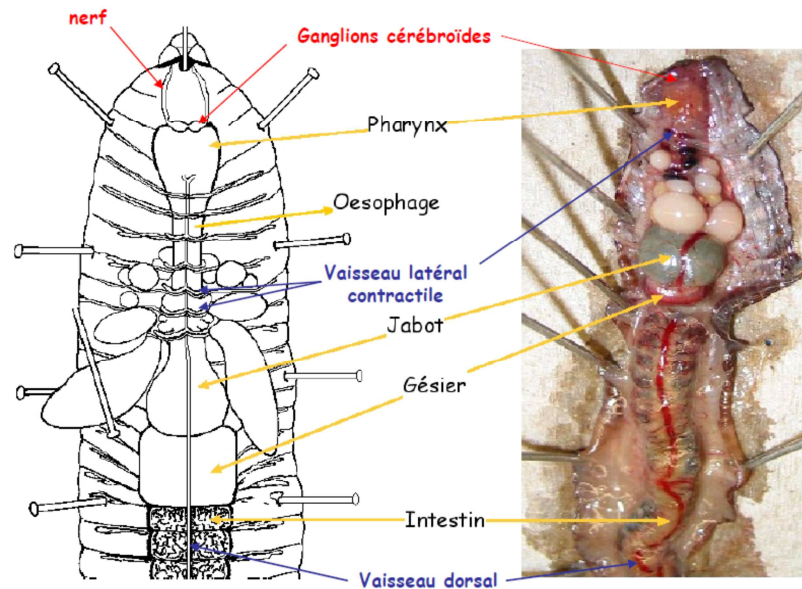


Figure 7 : Anatomie interne de la région antérieure (vue dorsale).
(<http://imageshack.us/photo/my-images/36/dissection.jpg/>)

5-Rappel sur les pesticides

Au cours du siècle dernier, les activités anthropiques, poussées par les avancées technologiques, ont conduit à des augmentations des niveaux de contaminants organiques dans l'environnement. L'agriculture en est une source importante en raison de l'usage généralisé de pesticides pour protéger les cultures et améliorer leur rendement. En effet, depuis les années 40, l'agriculture s'est intensifiée et les pratiques ont profondément changé. Ainsi, la plupart des pesticides inorganiques (cuivre, arsenic, fer, soufre) ont progressivement été remplacés par des pesticides organiques. Ces derniers regroupent de nombreuses familles chimiques, avec des effets variés aussi bien dans leur action que dans leur devenir dans l'environnement (**Lazartigues, 2010**). La contamination des différentes matrices environnementales (eau, sol), a été largement rapportée dans la littérature (**Tariq et al., 2007** ; **Azzouz et al., 2011** ; **Benbouzid et al., 2012**).

Devant le nombre considérable de pesticides (plus de 800 matières actives différentes dans près de 7000 formulation commerciales), les fabricants et utilisateurs les classent suivant

INTRODUCTION GÉNÉRALE

la nature de l'espèce nuisible contre laquelle ils sont destinés. Les trois principales classes sont :

- **Les fongicides** : servant à combattre la prolifération des champignons phytopathogènes. Ils permettent de lutter contre les maladies cryptogamiques qui causent de graves dommages aux végétaux cultivés. Il existe plusieurs familles de fongicides, les plus importantes sont : carbamates (Carbendazine, Mancozèbe,...), triazoles (Bromuconazole, Triticonazole,...), dérivés du benzène (Chlorothalonil, Quintozène), dicarboximides (Folpel, Iprodione,...).

- **Les herbicides** : les plus utilisés des pesticides en tonnages et en surfaces traitées, ils permettent d'éliminer les mauvaises herbes adventices des cultures. Les plus représentées sont les carbamates (Chlorprophame, Triallate,...), les urées substituées (Diuron, Chlortoluron,...), les triazines (Atrazine, Simazine,...), les chlorophenoxyalcanoïques (2,4-D, MCPA, ...), les amides (Alachlore, Propyzamide,...).

- **Les insecticides** : C'est un grand groupe de pesticides utilisé pour éliminer les insectes porteurs de maladies et lutter contre les parasites qui infectent les plantes cultivées (**Hodgson et al., 2004**). Ils se répartissent en trois grands groupes selon leur nature chimique : substances minérales, molécules organiques d'origine naturelle ou produits organiques de synthèse qui sont de loin les plus utilisés actuellement. Autres que les organochlorés (DDT, Dieldrin, ...) qui sont bannis actuellement dans la plupart des pays du Nord, les insecticides appartiennent à trois grandes familles chimiques : les organophosphorés (Diméthoate, Malation, ...), les pyréthrinoides de synthèse (Bifenthrine, Perméthrine, ...), et les carbamates représentés par l'Aldicarbe, le Carbofuran et le **Méthomyl** objet de cette étude.

Ainsi, le Méthomyl est un carbamate utilisé dans le monde entier dans l'agriculture en raison de sa haute activité contre un large spectre d'insectes nuisibles. C'est un perturbateur endocrinien, il est considéré comme puissant génotoxique, capable d'induire des aberrations chromosomiques chez les cellules de mammifères (**Wei et al., 1997 ; Andersen et al., 2002**).

5.1- Propriétés physico-chimiques de la matière active du Méthomyl

Le tableau (1) illustre les principales propriétés physicochimiques du Méthomyl.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Tableau 01 : Propriétés physico-chimiques du Méthomyl (Santé Canada, 2010).

Propriétés	Résultats
Pression de vapeur à 25 °C	0,72 mPa
Constante de la loi d'Henry	$2,13 \times 10^{-6} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$
Spectre d'absorption ultraviolet (UV)-visible	Aucune absorption UV prévue à $\lambda > 350 \text{ nm}$
Solubilité dans l'eau à 25 °C	57,9 g/L
Coefficient de partage n-octanol-eau (log K _{oe})	Log K _{oe} = 0,093
Constante de dissociation	Sans objet, la molécule ne contient pas de fraction dissociable

6- Rappel sur le phénomène du stress oxydant

Les facteurs de stress d'origine environnementale peuvent induire des changements au niveau génétique, biochimique et physiologique chez les individus exposés. Pour se protéger contre le stress oxydant, les organismes terrestres possèdent plusieurs systèmes de défenses. Les premières barrières sont mises en place au niveau de l'organisme entier et constituent des protections physiques contre la pénétration des xénobiotiques (coquille, peau). Si ces défenses s'avèrent inefficaces, d'autres systèmes se mettent en place, comme le système antioxydant, pour protéger les organes et les cellules contre les attaques d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées à la suite d'un stress oxydant (**Bigot, 2009**).

La production des radicaux libres de l'oxygène est physiologique et nécessaire à de nombreux métabolismes. Seul leur excès devient néfaste d'autant que s'y ajoutent les radicaux libres d'origine exogène liés à l'environnement (rayonnement UV, ozone...) (**Cossu et al., 1997a**). Les radicaux libres en particulier les radicaux hydroxyles, sont susceptibles d'interagir au niveau des doubles liaisons C=C avec les chaînes d'acides gras polyinsaturés qui constituent le double feuillet phospholipidique des membranes (**Bonnefont-Rousselot, 1994**). Ils entraînent alors la peroxydation des acides gras polyinsaturés (**Gutteridge et Halliwell, 1990**) provoquant une désorganisation membranaire (perturbation des propriétés physicochimiques des membranes, des communications intercellulaires et du fonctionnement des enzymes membranaires) pouvant aboutir à la lyse cellulaire. Les hydroperoxydes lipidiques formés sont dégradés principalement en malonedialdéhyde (MDA) (**Chaudhary et**

INTRODUCTION GÉNÉRALE

al., 1996) et 4-hydroxynonéal (4-HNE) (Chen et Chung, 1996), qui réagissent de manière covalente avec les protéines et les inactivent.

L'étendue des dommages dépend de l'équilibre entre la production de radicaux libres et l'efficacité des mécanismes de détoxification. Ces dommages amorcent une cascade de réactions qui peuvent être à l'origine de dysfonctionnements à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (Cajaraville *et al.*, 2003) (Figure 8).

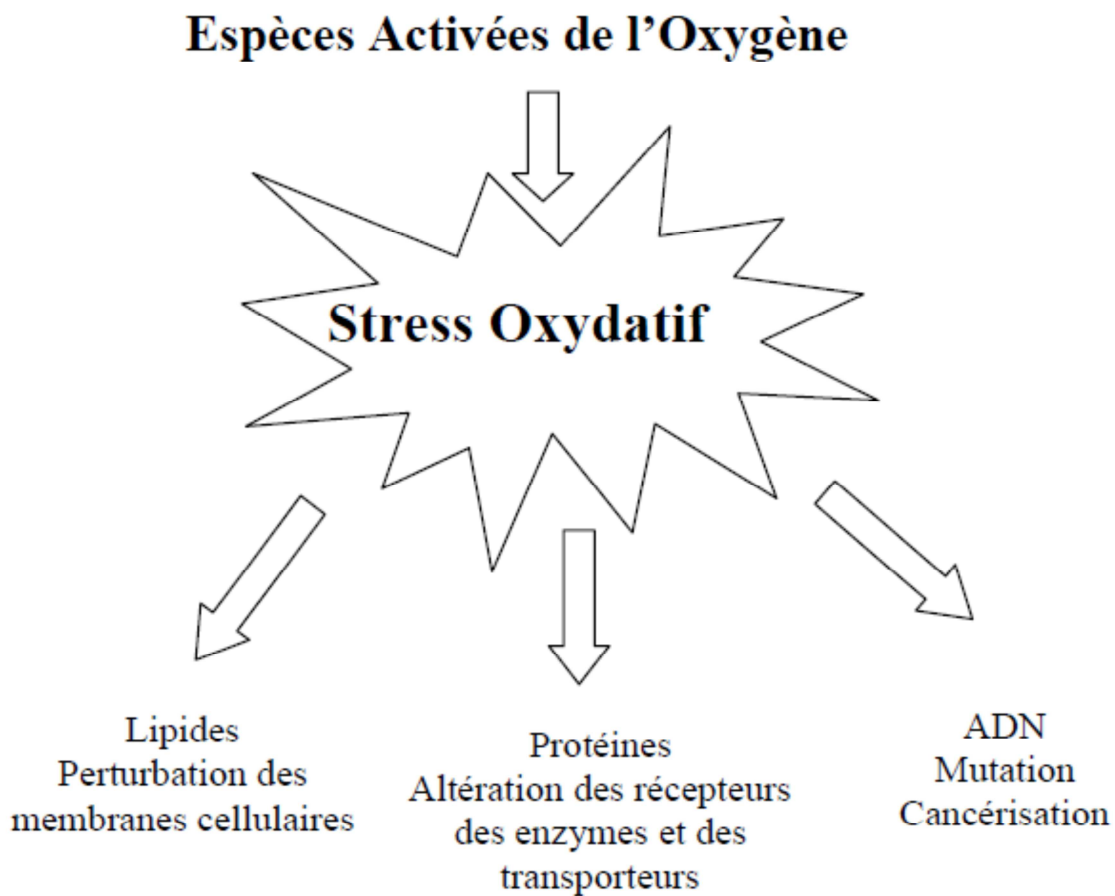


Figure 8 : Mécanismes des lésions biochimiques induites par le stress oxydant.
(Sergent *et al.*, 2000)

6-1 Systèmes enzymatiques :

Les systèmes de défense contre le stress oxydatif ont un rôle central dans la détoxification des xénobiotiques ayant pénétrés dans la cellule. Les antioxydants primaires, qui sont pour la plupart des enzymes, vont limiter la production des espèces réactives de

INTRODUCTION GÉNÉRALE

l'oxygène (ROS) et les antioxydants secondaires, qui peuvent être des substances lipo- ou hydrosolubles, vont piéger les ROS sous une forme peu réactive (**Zielinski et Portner, 2000**).

L'augmentation de la production de ROS peut induire ou inhiber l'activité et la synthèse de ces composés antioxydants dont l'étude donne une indication sensible de la présence de contaminants générateurs d'un tel stress en milieu contrôlé et naturel (**McFarland et al., 1999 ; Lopes et al., 2001**). Il est donc important de bien comprendre d'une part les événements conduisant à un stress oxydant et d'autre part de définir les paramètres les plus discriminants comme biomarqueurs impliqués dans la réponse à ce stress pour fournir un diagnostic plus réaliste de l'impact de la pollution sur les organismes qui peuplent les écosystèmes.

Un biomarqueur peut être défini comme "un paramètre moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental dont les changements, observables et/ou mesurables, révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère toxique" (**Lagadic et al., 1997**). Les expérimentations en conditions contrôlées ont largement démontré que les biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques et, dans certains cas, les effets de ceux-ci sur les structures et fonctions vitales de l'organisme (**Huggett et al., 1992**). Ces bases expérimentales ont permis d'envisager l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel, notamment dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement (**McCarthy et Shugart, 1990 ; Peakall, 1992**).

Chez les êtres vivants, les systèmes antioxydants contribuent à éliminer le stress causé par les ROS. On distingue deux types de systèmes de défenses antioxydants impliqués dans ces mécanismes de protection : des systèmes enzymatiques tels que : Superoxyde Dismutase qui assure la première ligne de défense contre le stress oxydant (**McCord et Fridovich, 1969 ; Nordberg et Arnér, 2001**).

La Catalase qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (**Arora et al., 2002**).

La Glutathion Peroxydase qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elles sont capables non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat

INTRODUCTION GÉNÉRALE

réducteur comme le glutathion. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (**Favier, 2003**).

La Glutathion-S-Transférase qui est une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés électrophiles. Elles sont aussi impliquées dans des opérations diverses de transports et de biosynthèses intracellulaires (**George et Buchanan, 1990**).

6-2 Systèmes non-enzymatiques :

Le glutathion, tri peptide dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection et la détoxification qui résulte principalement de sa fonction de cosubstrat des GPx et de la GSH-S Transférase (**Januel, 2003**). Mais il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tel que la vitamine C, la vitamine E et les Superoxydes Dismutases.

Les Malonedialdéhydes (MDA) agents alkylants puissants capables de réagir avec les macromolécules biologiques. Ce sont des produits terminaux de la dégradation des lipides et dont la teneur est en relation étroite avec la dégradation de la membrane cellulaire. Ce paramètre constitue un indicateur précoce d'une agression toxique et par conséquent il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydatif (**Giguère et al., 2003 ; Funes et al., 2005**).

* Cas de l'AcetylCholinestérase

Les acétylcholinestérases sont considérées comme étant un biomarqueur en puissance de l'état des fonctions neurologiques, elles catalysent l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique (**Grue et al., 1997**). Cette enzyme ne joue aucun rôle dans la détoxification mais elle est impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme.

L'inhibition de l'AChE induite par les xénobiotiques conduit à une accumulation d'Acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques, phénomène susceptible de provoquer des perturbations comportementales affectant plus particulièrement la locomotion et l'équilibre (**Zinkl et al., 1991 ; Saglio et al., 1996**).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Objectif :

Notre travail de recherche a pour objectif d'évaluer la toxicité d'un insecticide utilisé couramment en Algérie (**le Méthomyl**), à travers l'utilisation d'un bioindicateur de pollution, le ver de terre. Pour une meilleure compréhension de notre recherche, notre travail est structuré en 3 chapitres :

- ❖ **Le premier chapitre** est une synthèse bibliographique présentant, en générale la taxonomie des vers de terre et les outils d'évaluation écotoxicologique en particulier les biomarqueurs.
- ❖ **Le deuxième chapitre** concerne le matériel et les méthodes d'études utilisés pour la réalisation de ce travail.
- ❖ **Le troisième chapitre** englobe les différents résultats et discussion qui nous avons partagé en cinq parties distincts :
 - ✓ La première partie est destinée à l'identification des vers de terre en présentant, leur taxonomie et leur écologie.
 - ✓ La deuxième partie est consacrée aux biomarqueurs physiologiques tels que : la croissance et la survie des vers de terre après une exposition par l'insecticide.
 - ✓ La troisième partie consiste à mesurer certains marqueurs enzymatiques et non enzymatiques du stress oxydant.
 - ✓ La quatrième partie s'intéresse à l'étude histologique effectuée sur l'épiderme des vers de terre *Octodrilus complanatus*.

Enfin, nous terminerons ce travail par une conclusion générale et des perspectives envisagées dans la continuité de ces travaux.

CHAPITRE II :
MATERIEL
ET
METHODES

1- Régions d'étude :

Les régions d'étude prises en considération sont représentées dans la figure (9) sur laquelle sont délimitées les 4 régions d'échantillonnage (A, B, C, D). Les vers de terre ont collectés respectivement dans : Forêt de Seraïdi (A), Pépinière de Sidi Amar (B), Chorfa (C) et La réserve intégrale du lac Tonga El-Kala (D).

Dans chaque région, nous avons collecté les vers de terre, en essayant d'inventorier les espèces dans les différents écosystèmes.

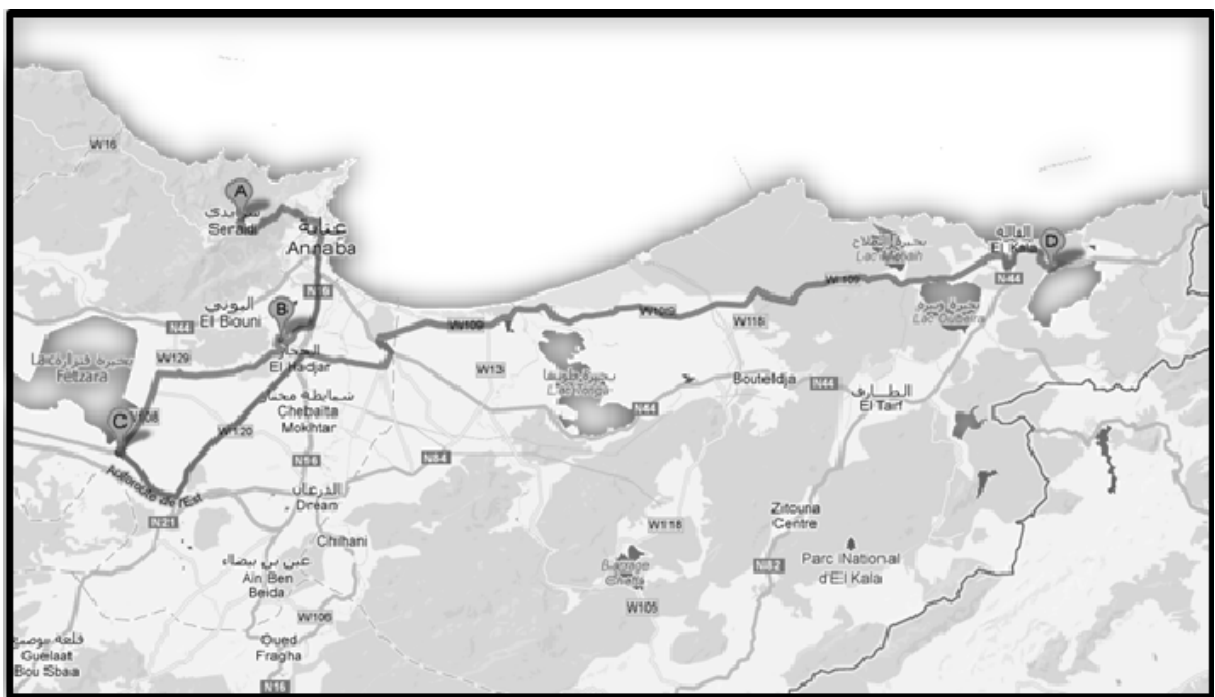


Figure 9 : Carte géographique de Annaba (Google Maps), avec les différents sites de collection des vers de terre.

A : Seraïdi ; B : Sidi-Amar ; C : Chorfa ; D : La réserve intégrale du lac Tonga

1.1- Forêt de Seraïdi :

Elle représente le 1^{er} site de prélèvement. Il est situé au Nord de la wilaya d'Annaba, sur les hauteurs du massif de l'Edough à 850 mètres d'altitude et à 13.3 kilomètres d'Annaba.

1.2- Chorfa :

Le 2^{ème} site est situé dans la région de Chorfa à 40 Km de la wilaya de Annaba. C'est un petit jardin dans de cultures maraichères.

1.3- Pépinière de Sidi Amar :

Le 3^{ème} site est une pépinière située à Sidi –Amar (Annaba).

1.4- La réserve intégrale du lac Tonga El-Kala :

Le dernier site est la réserve intégrale du lac Tonga qui est à 5 kilomètres au Sud - Est de la ville d'El-Kala. Cet écosystème palustre est couvert par une végétation aquatique riche et dense en mosaïque composée d'hélophytes (scirpes, phragmites et typhas).

2- Matériel biologique :

2.1- Méthode d'identification et description des espèces :

L'identification a été effectuée à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (Alger).

Les animaux sont d'abord étudiés morphologiquement, à l'état vivant (avant fixation) en notant la longueur du corps, la couleur du tégument, et le gradient de coloration. Les vers de terre sont ensuite fixés avec du formol à 4%, puis observés sous loupe binoculaire en vue d'une identification basée sur des caractéristiques externes et internes (**Baha, 2008**).

2.2- Choix de l'espèce :

Notre choix s'est porté sur *Octodrilus complanatus* (**Figure 10**), récoltés au niveau de la région d'El-Tarf. Les vers de terre sont conservés dans des terrariums, au laboratoire, ils sont nourris avec du terreau. Leur longueur varie entre 150 à 200 mm, leur largeur de 9-10 mm et d'un poids de l'ordre de 3,5 à 4,0 g.

2.3-Systématique du ver de terre :

Règne : Animalia

Embranchement : Annelidae

Classe : Oligochaeta

Ordre : Haplotaxida

Famille : Lumbricidae

Genre : *Octodrilus*

Espèce : *Octodrilus complanatus* (Dugès, 1828)



Figure 10 : *Octodrilus complanatus*.

3-Matériel Chimique :

Notre choix s'est porté sur le Méthomyl, qui est un insecticide systémique appartenant à la famille des carbamates (Figure 11). Son nom scientifique est : N-[[méthylamino) carbonyl] oxy] éthanimidothioate de méthyle, sa formule moléculaire : $C_5H_{10}N_2O_2S$ et son poids moléculaire de 162,2 uma.

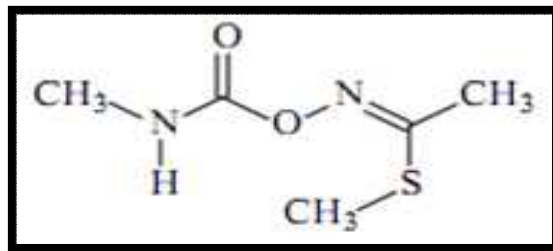


Figure 11 : Formule développée du Méthomyl.

4-Conditions expérimentales :

Tous les essais ont été effectués sur des vers de terre *Octodrilus complanatus*, adultes, dans les mêmes conditions suivantes :

- Photopériodes 18 h de lumière / 24 h ; Eclairage assuré par des tubes néon de type "lumière du jour" ;
- Température $20 \pm 2^\circ C$;
- Hygrométrie : 80 % à 95 %.

5-Mode de traitement :

Le traitement des vers de terre est effectué par pulvérisation du Méthomyl dans les terrariums, aux concentrations suivantes : **4 ; 6 ; 8 et 10 mg de Méthomyl /500 g de sol**. La durée du traitement est de 3, 6, 9 et 12 jours (**Figure12**).

6-Méthodes :

6.1-Méthodes de prélèvement des animaux :

Nous avons utilisé une méthode physique pour extraire les animaux du sol. Cette méthode consiste à creuser le sol jusqu'à une profondeur d'environ 40 cm. La recherche des vers de terre se fait avec la main selon la méthode de **Bouché (1972)**.

6.2- Essais toxicologiques :

6.2.1- Suivi du pourcentage de Mortalité :

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

6.2.2- Suivi du taux de Croissance :

Après chaque période de traitement, les vers de terre sont retirés des terrariums, rincés à l'eau distillée, comptés et pesés. Le taux de croissance est déterminé en utilisant l'équation de **Martin (1986)** :

$$\text{Taux de croissance relatif} = \ln \frac{P_t}{P_0} \times 100$$

P₀: est le poids moyen des vers de terre au début de l'exposition et poids.

P_t : est le poids moyen des vers de terre après la durée d'exposition.

6.3- Dissection et prélèvement du tissu :

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

6.4-Méthodes de dosage :

6.4.1-Dosage des Protéines totales :

La méthode réalisée pour quantifier les protéines est celle de **Bradford (1976)**. La lecture des absorbances est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm d'onde par spectrophotomètre (JENWAY 3600) en utilisant l'Albumine Sérum bovine (BSA) comme standard.

6.4.2-Dosage du glutathion (GSH) :

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de **Weckberker et Cory.(1988)**.

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do}{13,1} \times \frac{Vd}{Vh} \times \frac{Vt}{Vs} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

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

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

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol ($-\text{SH}$).

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

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

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

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

6.4.3-Dosage de l'activité GST (glutathion S-transférase) :

La mesure de l'activité glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al.(1974)**.

La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm dans un spectrophotomètre UV/visible contre un blanc contenant 200 μl d'eau distillée à la place du surnageant.

MATERIEL ET METHODES

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

$$X = \frac{\Delta Do / m}{9,6} \times \frac{Vt}{Vs} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

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

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

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

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

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

6.4.4-Dosage de l'activité catalase :

La mesure de l'activité Catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de **(Regoli et Principato, 1995)** dont le principe repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

La lecture des absorbances est mesurée à une longueur d'onde de 240 nm d'onde par spectrophotomètre (JENWAY 3600).

$$X = \frac{(\Delta DO \times 10)}{\epsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéines}}$$

X : μmoles de H_2O_2 consommées par minute et par mg de protéines.

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

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

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

6.4.5- Dosage du malondialdéhyde (MDA) :

Le taux de malondialdéhyde (MDA) est quantifié selon la méthode de **Draper et Hadley (1990)**.

MATERIEL ET METHODES

La lecture des absorbances est effectuée par un spectrophotomètre d'absorption à une longueur d'onde de 532 nm. Le taux du MDA est déterminé selon la formule suivante :

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

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

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

156 : coefficient d'extinction molaire du TBA.

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

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

6.4.6- Dosage de l'activité Acétylcholine Estérase (AChE)

L'activité spécifique de l'AChE a été déterminée selon la méthode d'**Ellman et al. (1961)**. La lecture des absorbances s'effectue toutes les 4 mn pendant 20 mn à une longueur d'onde de 412 nm.

L'activité Acétylcholine Estérase est calculée selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do/\text{min}}{1,36 \times 10^4} \times \frac{Vt}{Vs} \quad \text{mg de protéines}$$

X : nanomole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines ($\text{nM}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines).

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

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

Vt : volume total dans la cuve.

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,1 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

7-Etude histologique

Après chaque période de traitement, des vers de terre de chaque lot sont choisis d'une manière aléatoire pour l'étude histologique. Les vers de terre sont mis à jeun pendant 48 heures afin que leur tube digestif soit vide.

De chaque ver, un morceau de tissu situé juste derrière la région du clitellum est placé dans une solution de formaldéhyde à 10% pour l'étude histologique selon la méthode de **(Martoja et Martoja, 1967)**.

Les coupes sont observées grâce à un photo microscope LEICA DM 1000.

8- Analyse statistique des résultats

Dans notre étude, pour mieux visualiser les résultats obtenus, la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant Microsoft Excel 2007.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique grâce au logiciel **Minitab 13.31 (Dagnelie, 1999)**. Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart-type ($m \pm s$). Une analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) a été effectuée en utilisant le test ANOVA.

MATERIEL ET METHODES

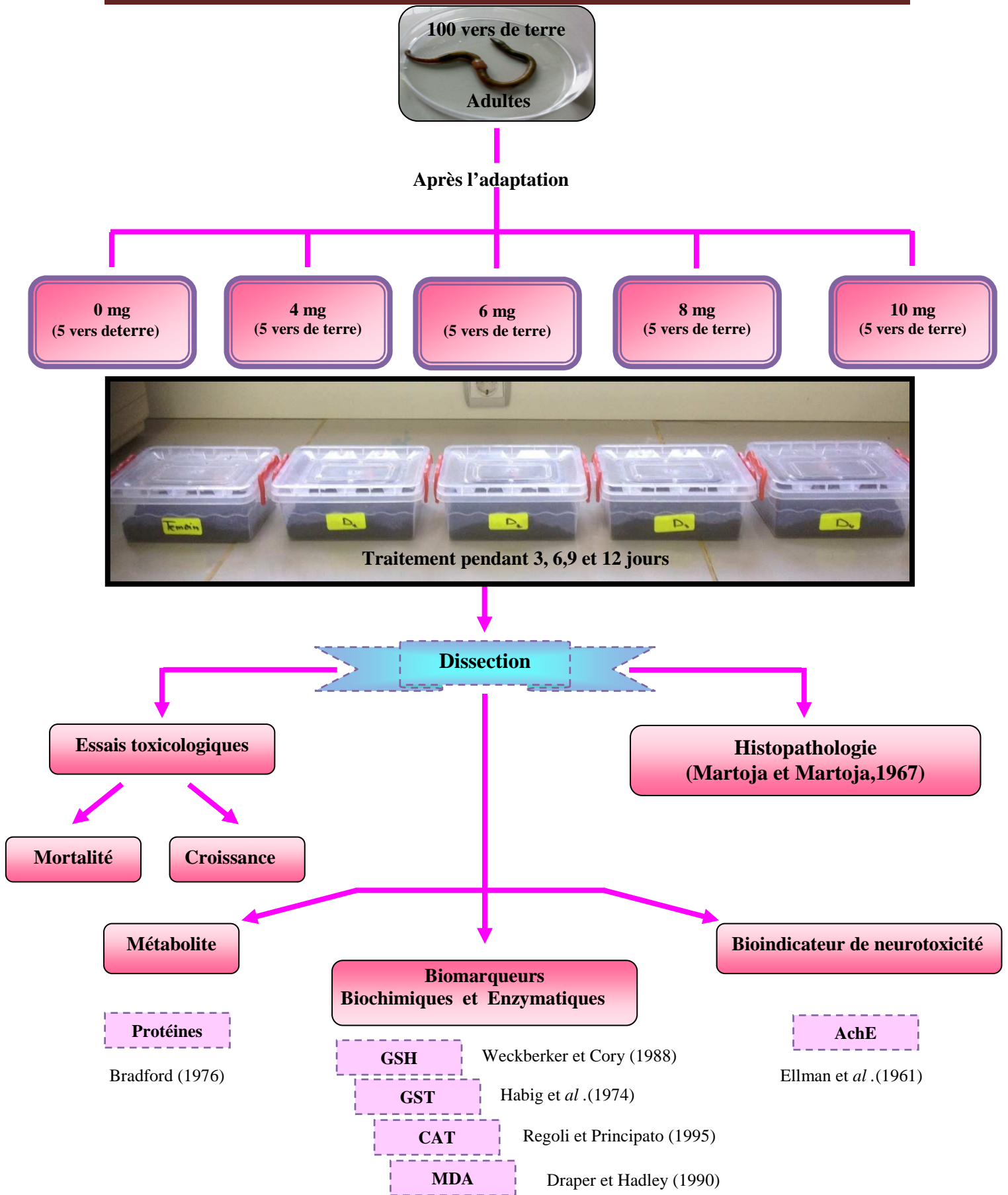


Figure 12 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

CHAPITRE III :
RESULTATS
ET
DISCUSSION

PARTIE I :

Identification des vers de terre

Dans cette partie, nous avons procédé à l'identification des espèces de vers de terre que nous avons récoltées durant notre échantillonnage, pour cela nous avons entrepris une étude taxonomique.

1-Taxonomie

Durant notre échantillonnage nous avons pu recueillir 270 vers de terre, (12) dans la Forêt de Seraïdi, 100 dans le jardin de la commune Chorfa, 100 ramenés de la pépinière de Sidi Amar et 58 vers de terre dans la réserve intégrale du lac Tonga El-Kala. Après différentes observations, nous avons conclu que nos espèces appartiennent à la famille des Lumbricidae, nous avons déterminé quatre genres lombriciens correspondant à 4 espèces différentes (Tableau 1).

Tableau 02 : Les groupes éco-morphologiques des espèces lombriciennes prélevées.

Espèceslombriciennes	Catégorie écologique	Site
<i>Nicodrilus caliginosus caliginosus</i> (Savigny, 1826)	Endogé	La forêt de la commune de Seraïdi
<i>Allolobophora chlorotica</i> (Gates, 1980)	Endogé	La réserve intégrale du lac Tonga
<i>Octodrilus complanatus</i> (Dugès, 1828)	Anécique	Chorfa
<i>Eisenia fetida fetida</i> (Savigny, 1826)	Epigé	La réserve intégrale du lac Tonga Pépinère de Sidi-Amar

2-Description des espèces répertoriées :

**Octodrilus complanatus*

Espèce assez monotypique. Longueur : 110-150 mm, largeur : 9-10mm. Nombre de segments : 122-189. Forme cylindrique avec aplatissement clitellien et caudal. Pigmentation cutanée brune à grise foncée parfois brun rougeâtre. Prostomium épilobique 1/3 fermé (Figure 13).

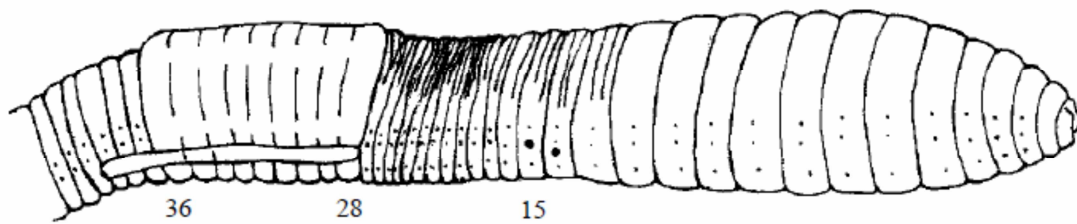


Figure 13 : Morphologie d'*Octodrilus complanatus* (Baha, 2008).

**Nicodrilus caliginosus caliginosus*

Longueur : 36 -168 mm, largeur : 2,8-5 mm. Nombre de segments : 76-150. Forme cylindrique aplatie au niveau caudal. Pigmentation cutanée brune. Prostomium épilobique 1/2 ouvert dans certains individus 1/3 fermé (Figure 14).

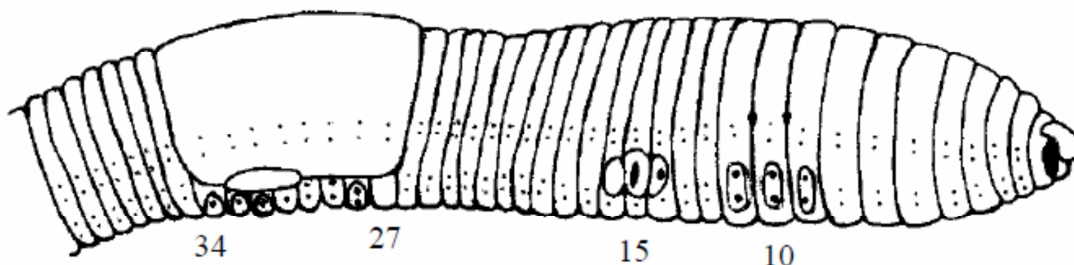


Figure 14 : Morphologie de *Nicodrilus caliginosus* (Baha, 2008).

RESULTATS ET DISCUSSION

**Eisenia foetida*

Espèce assez monotypique. Longueur : 35-65 mm, largeur : 2-3 mm. Nombre de segments : 92-106. Forme cylindrique avec aplatissement caudal léger à section postérieure trapézoïdale. Pigmentation cutanée rouge violacée (**Figure 15**).

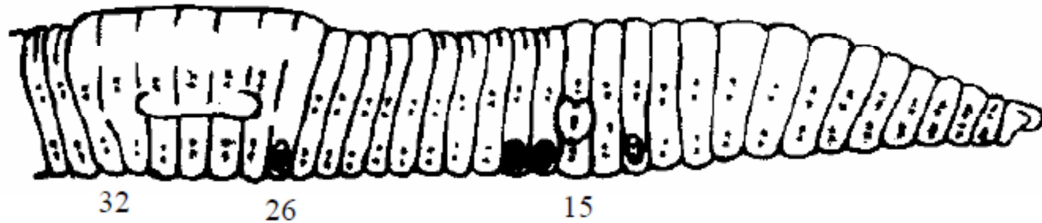


Figure 15 : Morphologie d'*Eisenia foetida* (Baha, 2008).

**Allolobophora chlorotica*

Espèce assez monotypique. Longueur : 40-50 mm, largeur : 2,5-4 mm. Nombre de segments : 90-116. Forme cylindrique. Pigmentation cutanée verte à brune verdâtre avec clitellum irisé. Prostomium épilobique 1/3 (**Figure 16**).

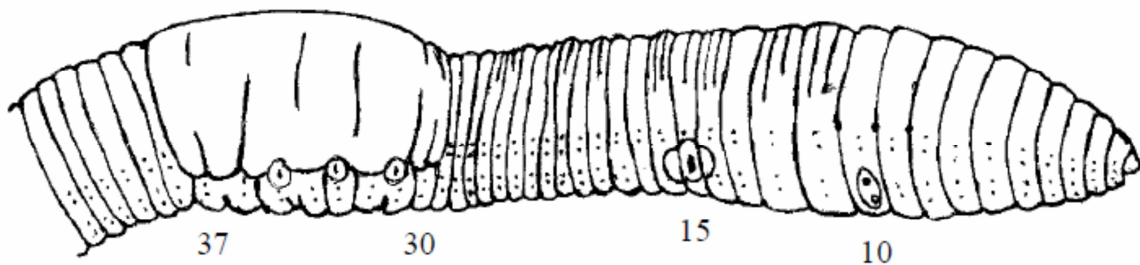


Figure 16 : Morphologie d'*Allolobophora chlorotica* (Baha, 2008).

3-Discussion

Malgré la richesse et la biodiversité de la faune, les oligochètes ont été très peu étudiés jusqu'à présent. La connaissance de cette faune présente d'énormes lacunes malgré les travaux qui ont été effectués par des chercheurs : **Rosa, Michaelsen et Baldasseroni (1887-1931)**. Selon **Cox et al. (2004)**, la pollution environnementale provoque une perte de la qualité du sol en entraînant la disparition d'espèces d'Oligochètes non encore répertoriées. En effet, la connaissance des Oligochètes apportera une meilleure contribution à la conservation des sols en les utilisant comme des bio-indicateurs de pollution.

Dans notre travail, nous nous sommes basés sur la morphologie externe et la biométrie. En nous servant de ces critères, nous avons pu reconnaître les espèces décrites auparavant et définir les espèces échantillonnées.

L'étude taxonomique du peuplement lombricien de notre région, a révélé que les espèces échantillonnées appartiennent à la famille des Lumbricidae :

❖ *Octodrilus complanatus*

Cette espèce occupe à peu près tout le pourtour méditerranéen (**Omodeo, 1961**) et une aire importante s'étendant assez loin dans l'U.R.S.S méridionale. Signalée dans la petite et grande Kabylie par **Omodeo et Martinucci (1987)**, au niveau de la Mitidja (**Baha, 1997**) et dans le Nord algérien en général (**Omodeo et al., 2003**).

❖ *Nicodrilus caliginosus*

Cette espèce est cosmopolite son aire de répartition géographique est assez vaste. Signalée dans la petite et la grande Kabylie (**Omodeo et Martinucci, 1987**), au niveau de la Mitidja (**Baha, 1997**) et dans le Nord algérien (**Omodeo et al., 2003**).

❖ *Eisenia foetida*

Espèce typiquement cosmopolite, quoique son origine soit très certainement européenne, elle a été signalée au : Japon, Hawaï, Les Amériques, Inde, Australie, Nouvelle-Zélande et Afrique du Sud. Elle ne l'a jamais été au Maghreb et en Sardaigne, elle a peut-être été introduite par l'homme par le fumier rapporté d'Inde.

RESULTATS ET DISCUSSION

❖ *Allolobophora chlorotica*

Originnaire du paléarctique, elle est ubiquiste signalée par **Omodeo** en **1961** dans les Açores, Madère, Portugal, Canarie, Italie et importée en Syrie. Elle occupe une aire de répartition très vaste sur l'ensemble de l'Europe et de l'Asie Mineure. Cette espèce est également connue des zones tempérées des Amériques où elle a été vraisemblablement introduite par les transports humains (**Bouché, 1972**). Elle a été signalée pour la première fois en Algérie au niveau de la Mitidja en **1997** par **Baha**.

PARTIE II :

Effet du Méthomyl sur la survie et la croissance des vers de terre

Cette partie est consacrée à l'évaluation de la toxicité potentielle du xénobiotique testé (le Méthomyl) à travers le suivi de certains biomarqueurs physiologiques tels que le pourcentage de mortalité et le taux de croissance des vers de terre.

1- Essais toxicologiques :

1.1- Evaluation du pourcentage de Mortalité :

Le tableau (3) met en évidence l'effet de concentrations croissantes de Méthomyl (4, 6, 8 et 10 mg) sur le pourcentage de mortalité des vers de terre. Ainsi, aucune mortalité n'a été observée durant la période d'exposition (3, 6, 9, 12 jours) par rapport aux témoins.

Tableau 03 : Pourcentage de mortalité observé chez des vers de terre adultes traités par le Méthomyl durant la période d'exposition.

	3 jours	6 jours	9 jours	12 jours	Mortalité %
0 mg/500 g	0	0	0	0	0 %
4 mg/500 g	0	0	0	0	0 %
6 mg/500 g	0	0	0	0	0 %
8 mg/500 g	0	0	0	0	0 %
10 mg/500 g	0	0	0	0	0%

RESULTATS ET DISCUSSION

1.2- Evaluation du taux de croissance :

La figure (17) met en évidence l'évolution du taux de croissance des vers de terre en fonction du temps et en présence de concentrations croissantes de Méthomyl. Ainsi, nous remarquons que chez les vers de terre témoins et traités avec les concentrations de **4 et 6mg de Méthomyl**, le taux de croissance tend à augmenter en fonction du temps. Ainsi, pour la concentration (**10 mg**) le taux de croissance est de l'ordre de (**0,77**) par rapport aux témoins et ce après 9 jours de traitement.

Nous constatons aussi une diminution hautement significative ($P \leq 0,001$) du taux de croissance des vers de terre traités avec la concentration de (**8 mg de Méthomyl**) au 12^{ème} jour de traitement par rapport aux témoins.

En revanche, la croissance des vers de terre traités par la concentration de (**10 mg de Méthomyl**), diminue d'une manière hautement significative ($P \leq 0,01$) dès le 6^{ème} jour de traitement par rapport aux témoins. Ainsi, le taux de croissance est de l'ordre de (**1,63**) chez les témoins et il n'est que de l'ordre de (**0,88**) chez les traités à la plus forte concentration.

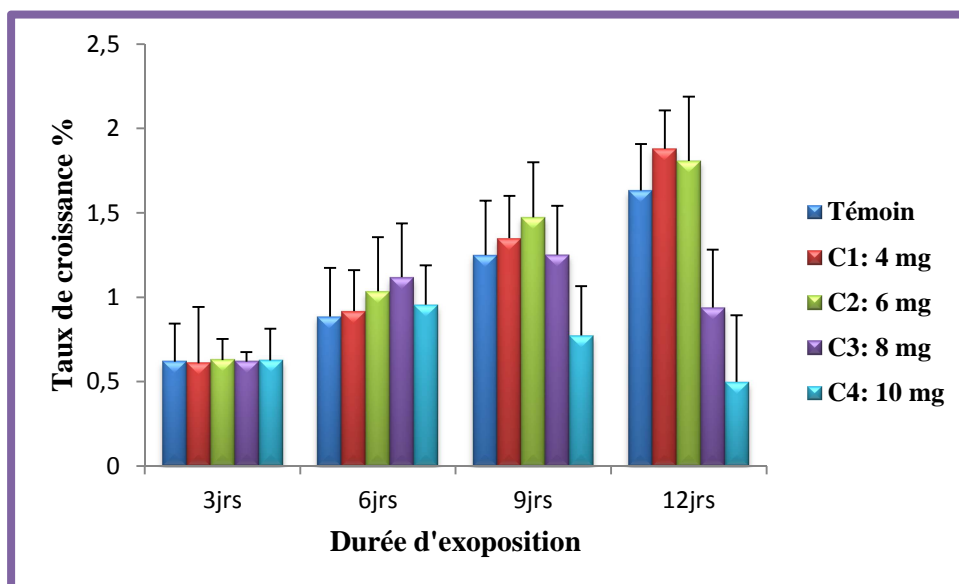


Figure 17: Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur le taux de croissance des vers de terre *Octodrilus complanatus* en fonction du temps.

3-Discussion

L'utilisation de bio-indicateurs en toxicologie et écotoxicologie est une pratique courante dans le monde entier. Parmi les bioindicateurs, les vers de terre, escargots et les microorganismes du sol sont largement utilisés car ils sont la cible immédiate des produits phytosanitaires. Les vers de terre sont utilisés comme bioindicateurs pour évaluer la santé du sol en raison de leur disponibilité, facilité de manipuler et leur capacité d'améliorer la structure et la fertilité du sol (**Mahajan et al., 2007 ; Curry et al., 2008 ; Muthukaruppan et Ganasekaran, 2010**).

À ce jour, un certain nombre d'essais normalisés utilisant la mortalité, la reproduction et le comportement des vers de terre sont disponibles (**Little, 1990 ; Doving, 1991 ; Scherrer, 1992**).

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur les effets du Méthomyl sur les vers de terre à l'aide d'une approche des sols enrichis en laboratoire où les critères d'évaluation, la croissance et la mortalité ont été mesurés.

La mortalité des vers de terre est le premier paramètre abordé. Nos résultats ont montré que celui-ci n'a pas été affecté (même aux plus fortes concentrations) par le Méthomyl, car aucune mortalité n'a été observée au cours de la période d'exposition aux différentes concentrations de ce xénobiotique. Ce résultat est en accord avec ceux de **Zhou et al. (2006)** qui a montré que la mortalité est un paramètre moins révélateur d'une toxicité chez les vers de terre que le poids beaucoup plus sensible et ce après traitement par l'Acétochlor et le Méthamidophos.

Le second paramètre mesuré dans notre étude est le taux de croissance des vers de terre. Il ressort de nos résultats que le Méthomyl réduit le taux de croissance aux plus fortes concentrations (C3, C4). Ce résultat est en accord avec les travaux de **Mostert et al. (2000)** qui a testé l'effet de cinq pesticides (le Cyfluthrine, le Carbaryl, le Chlorpyrifos, le Fipronil et l'Imidaclopride) sur le ver de terre ou encore ceux de **Gomez-Eyles et al. (2009)** qui a testé la toxicité d'une mixture de pesticide.

D'un autre côté **Booth et O'Halloran (2001)** et **Zhou et al. (2007)**, ont montré que la croissance des vers de terre est plus sévère au stade juvénile qu'au stade adulte ceci pourrait expliquer nos résultats concernant l'effet du Méthomyl sur la croissance des vers de terre.

PARTIE III :

Etude du Stress oxydant

Le but de cette étude est d'évaluer les effets du Méthomyl sur le déclenchement d'un stress oxydant et ce par le biais du suivi d'une batterie de biomarqueurs connu pour leur rôle dans la protection des cellules contre les radicaux oxygénés.

1-Effet du Méthomyl sur les variations du taux des protéines totales

La figure (18) illustre les effets du Méthomyl à différentes concentrations sur le taux des protéines totales chez les vers de terre durant le traitement. Ce paramètre est indispensable dans l'étude de mécanismes enzymatiques. Nos résultats montrent qu'en présence de concentrations croissantes du xénobiotique, le taux de protéines totales tend à augmenter de manière dose-dépendante par rapport aux témoins et ce quelle que soit le temps de traitement.

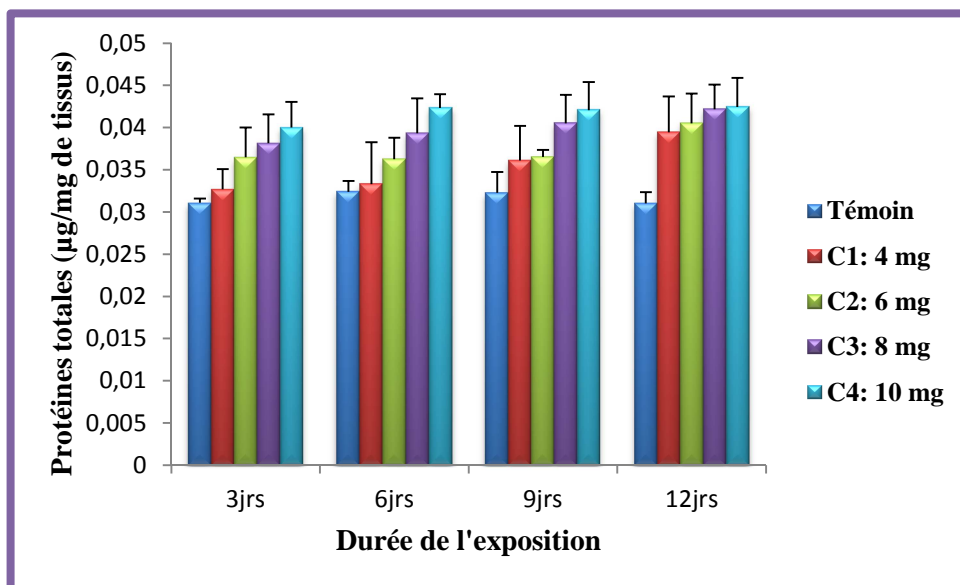


Figure 18 : Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur le taux des protéines totales chez les *Octodrilus complanatus* en fonction du temps.

2-Effet du Méthomyl sur le taux de glutathion (GSH)

La figure (19) met en évidence les variations du taux du glutathion chez les vers de terre traités par des concentrations croissantes de Méthomyl. Après 3 jours de traitement, nous constatons une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) du taux du GSH.

Par contre après 9 jours de traitement, nous remarquons une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) du taux du glutathion. En effet, au 6^{ème} jour de traitement et à la plus forte concentration, le taux de GSH est de (7,50) alors qu'il n'est que de (5,20) après 9 jours de traitement et de (3,40) après 12 jours de traitement pour la même concentration et ce par rapport aux témoins dont le taux de GSH reste relativement stable.

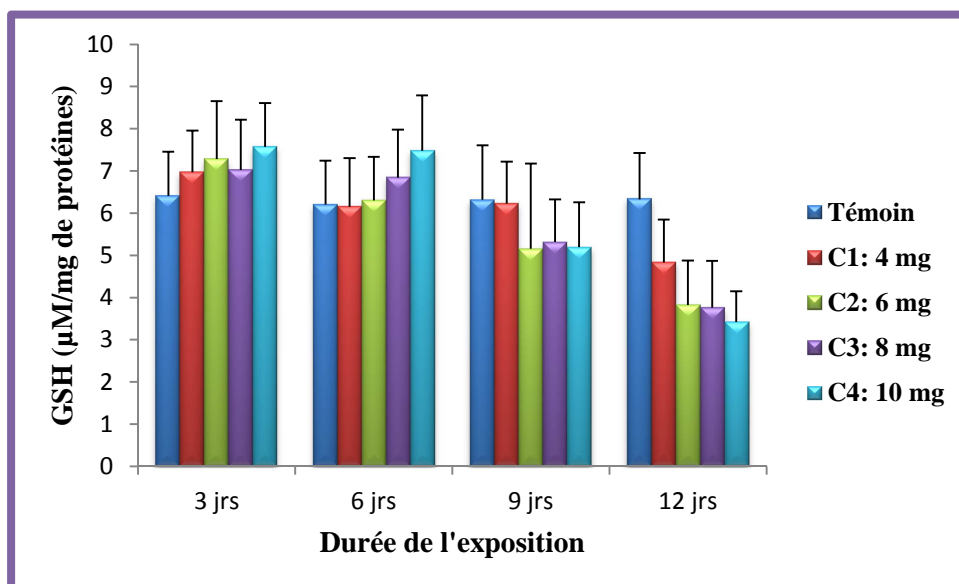


Figure 19 : Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur le taux de GSH chez les *Octodrilus complanatus* en fonction du temps.

3-Effet du Méthomyl sur l'activité Glutathion-S-Transférase

La figure (20) illustre l'effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur l'activité GST en fonction du temps. Ainsi, nous remarquons une augmentation hautement significative de l'activité Glutathion-S-Transférase ($P \leq 0,01$) après 9 jours du traitement pour les concentrations C2, C3 et C4 par rapport aux témoins qui ne subissent aucune variation. En effet l'activité GST est à son maximum après 12 jours de traitement à la plus forte

RESULTATS ET DISCUSSION

concentration avec une valeur de **(0,150)** par rapport aux témoins où l'activité GST ne dépasse pas la valeur de **(0,086)**.

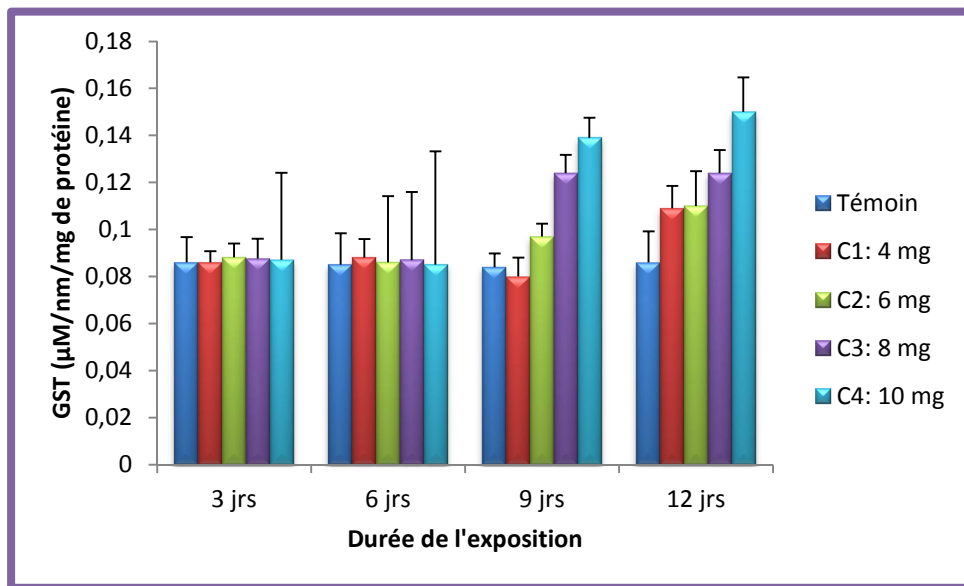


Figure 20 : Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur l'activité Glutathion-S-Transférase (GST) chez les *Octodrilus complanatus* en fonction du temps.

4-Effet du Méthomyl sur l'activité Catalase

L'effet du Méthomyl sur l'activité Catalase chez les vers de terre traités et témoins est illustré dans la figure (21). Nos résultats montrent que pour toutes les concentrations testées, le Méthomyl induit une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) de l'activité Catalase chez les vers de terre par rapport aux témoins. Ainsi, pour la plus forte concentration par exemple, l'activité de cette Enzyme est de l'ordre de **(1,75)** après 12 jours de traitement alors qu'elle n'est que de **(0,9)** pour les témoins.

RESULTATS ET DISCUSSION

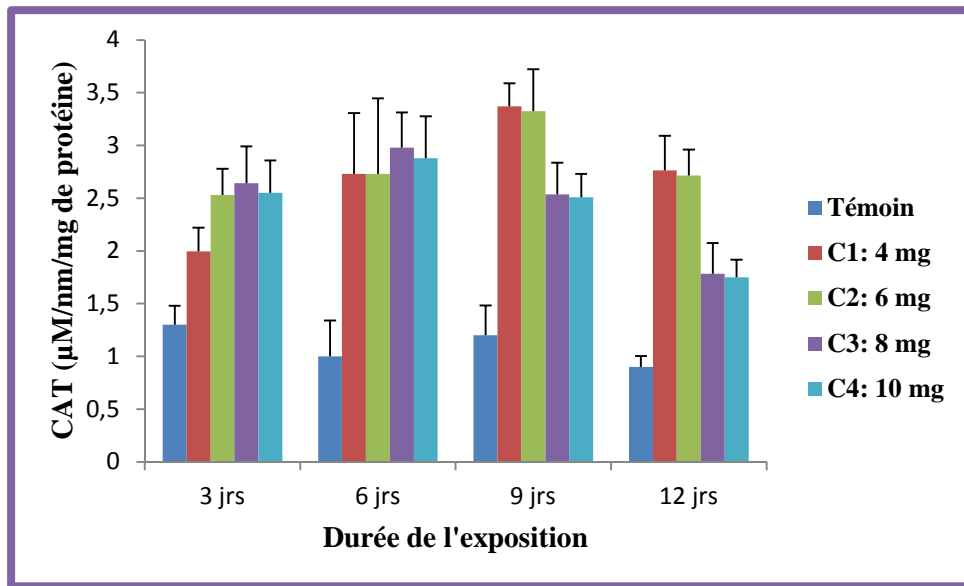


Figure 21: Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur l'activité Catalase (CAT) chez les *Octodrilus complanatus* en fonction du temps.

5-Effet du Méthomyl sur le taux du malondialdéhyde (MDA)

La figure (22) met en évidence l'évolution du niveau de production du MDA en présence de Méthomyl par les différentes concentrations chez les vers de terre. Les résultats montrent une augmentation du taux du MDA chez les vers de terres exposés aux différentes concentrations de l'insecticide étudié.

Les résultats de l'analyse de la variance ne montrent pas de différences significatives.

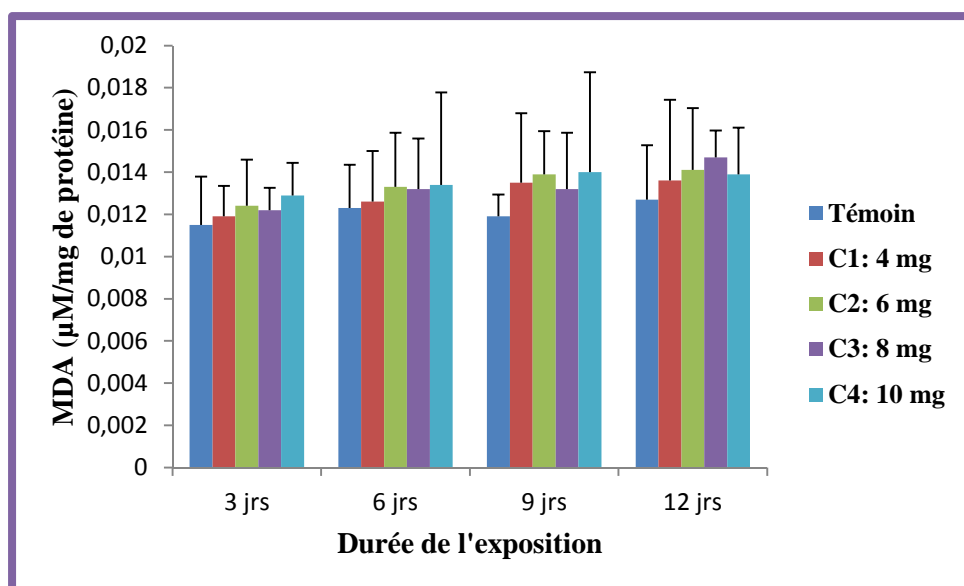


Figure 22 : Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur le taux du MDA chez les *Octodrilus complanatus* en fonction du temps.

6-Effet du Méthomyl sur l'activité AcétylcholinEstérase (AchE)

La figure (23) met en évidence l'effet des différentes concentrations de Méthomyl sur l'activité AcétylcholinEstérase (AchE) chez les vers de terre en fonction du temps.

Nos résultats révèlent que le traitement par des concentrations croissantes de Méthomyl induit une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) et dose-dépendante (pour les concentrations D1 et D2) de l'activité AChE par rapport aux témoins. En effet nous constatons que pour les traités par la plus forte concentration et après 12 jours, la valeur de l'activité AchE ne dépasse pas (0,9) alors qu'elle est de (1,7) chez les témoins.

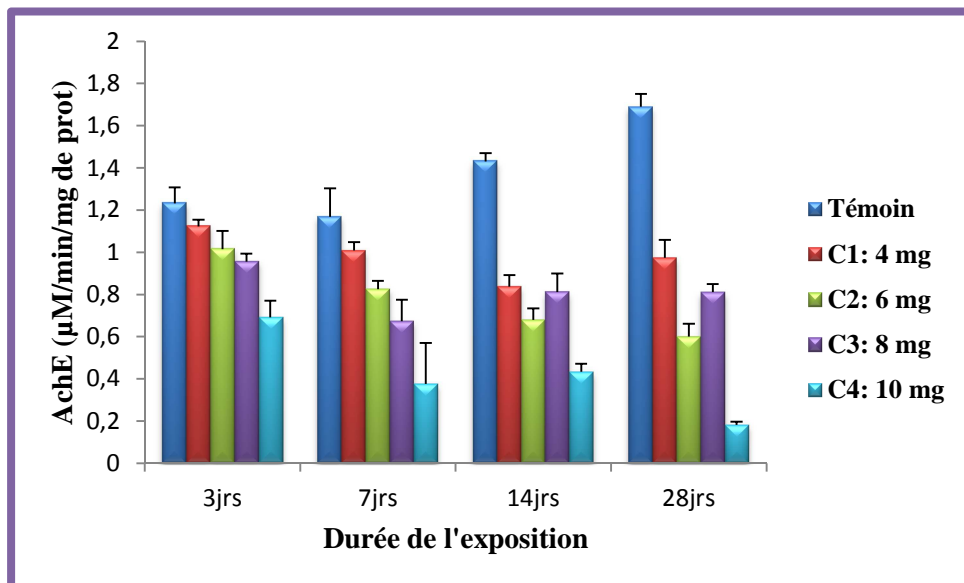


Figure 23 Effet de concentrations croissantes de Méthomyl sur l'activité AcétylcholinEstérase (AchE) chez les *Octodrilus complanatus* en fonction du temps.

7-Discussion

Des quantités importantes de pesticides sont rejetées dans l'environnement, induisant ainsi une contamination chronique d'un nombre croissant d'écosystèmes (**Sarkaret *al.*, 2006**). Cette contamination altère les organismes vivants à tous les niveaux d'organisation. De ce fait, l'utilisation d'organismes bioindicateurs pour la biosurveillance écotoxicologique s'impose grâce à des biomarqueurs qui rendent compte des niveaux de pollution auxquels sont soumis ces organismes.

C'est ainsi que l'on s'est intéressé aux vers de terre ou lombriciens. Ces animaux constituent aujourd'hui une armée de nettoyeurs aux services des autorités locales, des particuliers et des industriels. L'utilisation des vers de terre a été principalement concentrée sur les effets des métaux lourds (**Lukkari *et al.*, 2004 ; Burgos *et al.*, 2005 ; Schleifler *et al.*, 2006 ; Bundy *et al.*, 2007**). Très peu d'études ont été consacrées à l'impact des polluants organiques tels que les pesticides sur le ver de terre (**Gupta et Sundararaman, 1991 ; Venkateswara Rao *et al.*, 2003 ; Gambi *et al.*, 2007**). Lors de l'exposition aux polluants, les vers de terre sont capables de diminuer les effets toxiques du produit chimique **en réglant leurs réponses biochimiques internes avant que la croissance ne soit affectée** (**Gao *et al.*, 2007**), d'où notre intérêt pour le métabolisme biochimique dans l'évaluation de la toxicité des produits chimiques.

Dans notre étude, nous avons tenté d'évaluer l'effet d'un insecticide (le Méthomyl) sur un modèle biologique à savoir, le ver de terre et ce en utilisant une batterie de biomarqueurs biochimiques et enzymatiques utilisés dans le cadre de la biosurveillance.

La teneur en protéines solubles est un test souvent utilisé pour mettre en évidence un stress chez un bioindicateur. La structure des protéines ainsi que leur fonction peut être altérée par les ROS produites soit par le métabolisme cellulaire ou par des oxydants exogènes (**Djekoun, 2012**). Ainsi les travaux de **Masaya *et al.* (2002)** et **Grara *et al.* (2009)** ont mis en évidence une augmentation du taux de protéines sous l'effet d'un stress chimique chez d'autres modèles biologiques bioindicateurs tels les têtards, les gastéropodes ou encore les protistes ciliés.

Nos résultats sont conformes aux travaux suscités, puisque nous avons mis en évidence une augmentation d'une manière dose-dépendante du taux de protéines totales chez les vers de terre traités par le Méthomyl. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, les vers de

RESULTATS ET DISCUSSION

terre déploient une batterie de réponses à travers l'activation de leurs mécanismes de détoxification afin de lutter, de survivre et de s'acclimater à ce nouveau paramètre (**Nzengue, 2008**). Les premiers paramètres concernés sont les protéines totales.

La présence de xénobiotiques à des concentrations toxiques, va induire l'activation des systèmes de protection cellulaires qui auront pour tâche le piégeage et /ou l'élimination des métabolites toxiques. Les enzymes du stress oxydatif interviennent par des réactions en chaîne afin d'empêcher les lésions cellulaires résultantes de l'attaque des radicaux libres et des hydroperoxydes (**Benbouzid, 2012**). Tous les paramètres enzymatiques et non enzymatiques pris en compte dans notre travail indiquent une toxicité de Méthomyl. Il en est ainsi du taux de GSH qui diminue d'une manière significative chez les vers de terre traités confirmant ainsi le déclenchement du processus de métabolisation / biotoxication.

Le GSH est un composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire. En interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD, outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau dans la défense antiradicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase (**Barillet, 2007**).

Certains auteurs comme **Viarengo et al. (1990)** ; **Cossu et al. (1997b)** ; **Canesi et al. (1999)** mettent en évidence une diminution du taux de GSH, chez les mollusques exposés à des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). **Grara et al. (2009)** et **Belhaouchet et al. (2012)** montrent chez des escargots *Helix aspersa* traités par des pesticides ou des métaux lourds une diminution du taux de glutathion, ceci est en accord avec nos résultats puisque nous avons également mis en évidence une diminution du taux de GSH chez les vers de terre traités par le Méthomyl. D'un autre côté, l'exposition de souris au Méthomyl a eu pour conséquence une diminution du taux de glutathion réduit (GSH) (**Dharm Paul Garg et al., 2009**).

Parallèlement à cela, nous nous sommes intéressés à l'activité GST qui est une enzyme de biotransformation de phase II. Cette enzyme est largement distribuée dans le règne animal (**Livingstone, 1991**), elle agit spécifiquement sur de nombreux substrats en offrant aux cellules, outre une fonction essentielle dans le transport intracellulaire, une protection contre les effets nocifs de nombreuses substances (**Hayes et al., 2004**). **Contardo et Wiegand**

RESULTATS ET DISCUSSION

(2008) suggèrent également l'utilisation de la variation de l'activité GST chez le ver de terre *Lumbricus variegatus* comme un biomarqueur sensible de l'exposition à un polluant organique, l'Atrazine. De la même façon, **Ferrari et al. (2007)** ont montré que les pesticides Organophosphorés et les Carbamates induisent des variations de l'activité GST chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). **Radwan et al. (1992)**, ont mis en évidence une induction de l'activité GST après exposition du gastéropode terrestre *Theba pisana* aux Carbamates. Ils associent cette augmentation de l'activité Glutathion-S-Transférase par une forte activité de détoxification de l'organisme par la GST suite à une exposition aux Carbamates. Nos résultats abondent dans le même sens puisque nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité GST chez les vers de terre traités par des concentrations croissantes de Méthomyl.

Selon **Cossu (1997b)**, lorsque l'induction des enzymes antioxydantes est suffisante, elle permet l'adaptation des individus et le retour à la normale. Par contre, des toxicités trop importantes entraînent leur inhibition.

L'inhibition ou l'induction *in vivo* des biomarqueurs est un bon outil environnemental pour évaluer l'exposition et les effets potentiels des xénobiotiques **Sturm et al. (2000)** ; **Varo et al. (2002)**. La Catalase, une enzyme de la phase II, est essentielle à la détoxification et joue un rôle primordial dans les mécanismes antioxydants cellulaires. Elle catalyse la conversion de H₂O₂ en eau moléculaire. Le changement de l'activité de CAT explique les lésions cellulaires provoquées par exposition aux produits chimiques (**Chun et al., 2011**). Les travaux de **Lin et al. (2010)**, ont montré que l'agent antimicrobien (Triclosan) induit l'activité Catalase chez les vers de terre (*Eisina fetida*). Le traitement des vers de terre par le Méthomyl lors de nos expérimentations semble provoquer le même effet c'est-à-dire une augmentation significative de l'activité Catalase confirmant par la même un stress oxydant induit par le Méthomyl.

L'attaque radicalaire des membranes provoque des modifications de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (**Lawton et Donaldson, 1991**). La lipoperoxydation membranaire est une réaction en chaîne qui se déroule en 3 étapes : (1) l'initiation correspond à l'attaque d'un acide gras polyinsaturé par un radical libre. (2) la propagation c'est-à-dire la peroxydation des phospholipides voisins et (3) la réaction cesse lorsqu'une molécule piège les radicaux libres (**Coeurdassier, 2001**). Cette réaction conduit à la formation de produits cytotoxiques et mutagènes de dégradation des acides gras comme les hydroperoxydes ou le malonedialdéhyde (MDA) (**Dixit et al., 2001** ; **Alpha Jalloh et al.,**

RESULTATS ET DISCUSSION

2009). Le malondialdehyde (MDA) a une bonne corrélation avec la génération de ROS (Green et al., 2006 ; Luo et al., 2006) et il est considéré comme un indicateur important du niveau d'effort oxydant (Valavanidis et al., 2006 ; Box et al., 2007). Beaucoup de travaux ont indiqué que le niveau de peroxydation des lipides est un paramètre important évaluant le niveau de l'effort oxydant dans les organismes vivants. Dans plusieurs travaux, MDA a été utilisé comme un bioindicateur de la peroxydation lipidique : chez l'escargot (Grara, 2011 ; Ait hamlat et al., 2012 ; Belhaouchet, 2014), chez la paramécie (Benbouzid, 2007 ; Azouz, 2012), chez les têtards (Bouhafset et al., 2009), et même chez les lichens (Khaldi et al., 2009). Chez le ver de terre Lin et al. (2010) et Liu et al. (2011) ont montré une augmentation du taux de MDA. Des résultats similaires sont observés chez des vers de terre *Eisenia foetida* exposés à un herbicide le Formesafen (Liu et al., 2008) ; (Zhang et al., 2012) ces derniers confirment que l'un des effets les plus dommageables de ROS et leurs produits dans les cellules est la peroxydation des lipides membranaires. Nos travaux abondent dans le même sens puisque nous avons également mis en évidence une forte augmentation du taux de MDA après traitement des vers de terre par le Méthomyl.

L'AChE est une enzyme essentielle dans le système nerveux des vertébrés et des invertébrés, elle est la cible fonctionnelle de plusieurs xénobiotiques. L'activité AChE a été traditionnellement utilisée comme un biomarqueur spécifique des xénobiotiques neurotoxiques tels les Organophosphorés et les Carbamates à la fois *in vivo* et dans des conditions *in vitro* (Ribera et al., 2001 ; Silva et al., 2004 ; Kavitha et Venkateswara, 2008).

Cette enzyme hydrolyse l'acétylcholine, neurotransmetteur impliqué dans la transmission cholinergique (Trotter et al., 1991 ; Heath et al., 1997). L'inhibition de l'AChE induite par les xénobiotiques conduit à une accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques, phénomène susceptible de provoquer des perturbations comportementales affectant plus particulièrement la locomotion et l'équilibre (Zinkl et al., 1991 ; Saglio et al., 1996).

Les travaux de Bouhafset al. (2009) ; Bouaricha (2013) ; Belhaouchet (2014) ont mis en évidence une inhibition de l'activité AchE chez respectivement des populations d'escargots, et de têtards traités par des pesticides. En effet, dans notre travail, nous avons montré que l'activité AchE diminue progressivement suite à l'exposition des vers de terre aux différentes concentrations du Méthomyl. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par

RESULTATS ET DISCUSSION

(Salama et al., 2005) sur des escargot *Helix aspersa* exposés au Méthomyl. L'activité d'AChE a été réduite aussi chez des poissons *Pseudorasbora parva* traités par le même pesticide (le Méthomyl) (Li et al., 2008).

Ainsi, l'inhibition de l'activité AchE chez notre espèce : le ver de terre *Octodrilus complanatus* exposé au Méthomyl vient confirmer le rôle primordial de cette espèce comme un organisme bioindicateur de la pollution.

PARTIE IV :




Etude histologique des vers de terre

Toutes les données obtenues à partir des analyses biochimiques et enzymologiques ont convergé vers une toxicité du Méthomyl, aussi avons- nous jugé impératif l'observation de l'état de certains tissus cibles notamment l'épiderme.

1-Aspect de l'épiderme après 3 jours de traitement avec des concentrations croissantes de Méthomyl :

Les planches (1, 2, 3 et 4) illustrent les coupes longitudinales effectuées au niveau de l'épiderme, chez les vers de terre témoins et traités par le Méthomyl.

La planche (1) met en évidence l'aspect de l'épiderme des vers de terre témoins et après 3 jours de traitement. Chez les témoins, nous observons une structure normale de l'épiderme (I) avec une Cuticule (C), un Epithélium (Ep), et un Muscle Circulaire (MusC).

Le traitement avec le Méthomyl pendant 3 jours provoque certaines modifications au niveau de ces tissus. Ainsi, à la concentration **6 mg de Méthomyl (II)**, nous avons mis en évidence, un épiderme de forme irrégulière (). Ces altérations sont également observées chez les traités par la concentration **8mg**, avec un début de destruction du muscle circulaire (). Pour la plus forte concentration de Méthomyl (**10 mg**), les altérations semblent plus importantes, avec un détachement d'une partie de l'épiderme ().

RESULTATS ET DISCUSSION

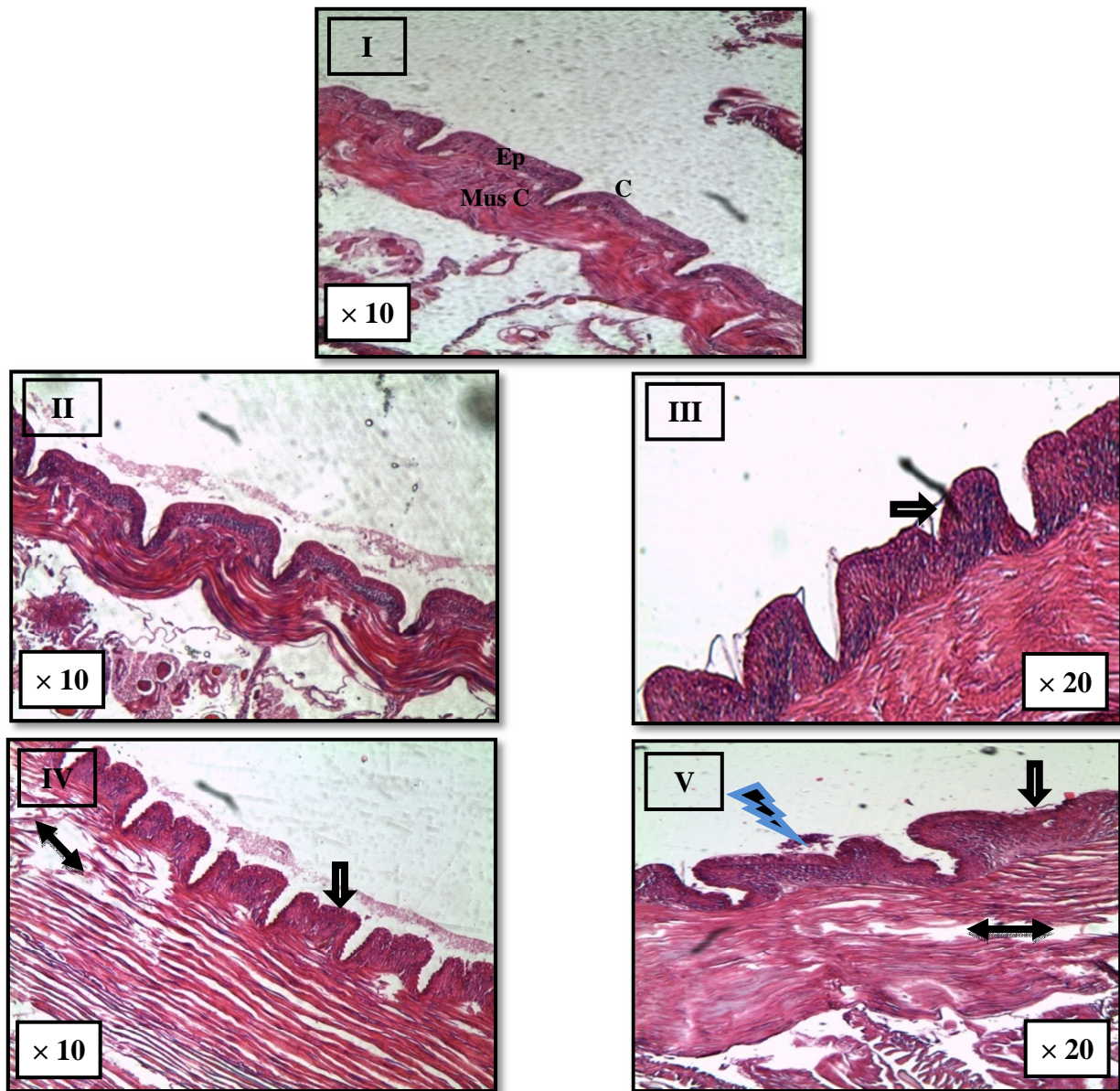


Planche 1 :Aspect de l'épiderme des vers de terres témoins et traités avec des concentrations croissantes de Méthomyl pendant 3 jours.

(I) Vers de terre témoins ; (II) Vers de terre traités avec 4 mg ; (III) Vers de terre traités avec 6 mg, (IV) Vers de terre traités avec 8 mg ; (V) Vers de terre traités avec et 10 mg.

C: Cuticule ; **Ep:** épithélium ; **Mus C:** muscle circulaire ; **V. Ep:** vacuole épidermique ; **V. Mus C :** vacuole muscle circulaire ; ⚡ : Détachement de l'épiderme ; ↔ : altération ; ↗ : congestion vasculaire ; ⇨ : contour irrégulier

2- Aspect de l'épiderme après 6 jours de traitement par des concentrations croissantes de Méthomyl :

Après 6 jours de traitement (**Planche 2**), l'observation de l'épiderme des vers de terre traités met en évidence des altérations et une désorganisation importante du muscle circulaire (\longleftrightarrow) avec un contour irrégulier (\Rightarrow) de l'épiderme et ce à partir des concentrations **6 et 8 mg de Méthomyl (III, IV)**. A la plus forte concentration de Méthomyl (**10 mg**), l'examen histologique met en évidence la présence d'une vacuole épithéliale (**V.Ep**).

3- Aspect de l'épiderme après 9 jours de traitement par des concentrations croissantes de Méthomyl :

La planche (**3**) représente l'aspect de l'épiderme des vers de terre *Octodrilus complanatus* après 9 jours de traitement par des concentrations croissantes de Méthomyl. Nous avons ainsi mis en évidence des altérations sévères chez les traités par les concentrations (**6, 8 et 10 mg**) de Méthomyl. Ainsi pour les traités par la concentration **6 mg de Méthomyl (III)**, nous observons un épiderme à contours irréguliers (\Rightarrow) avec une destruction du muscle circulaire (\longleftrightarrow). Ces altérations sont également observées chez les traités par la concentration (**8mg**) avec l'apparition des vacuoles épithéliales (**V.Ep**) (**IV**) dont le nombre augmente aussi bien au niveau de l'épithélium que des muscles à la plus forte concentration (**10mg**) (**V**), (**V.Ep ; V. Mus C**).

RESULTATS ET DISCUSSION

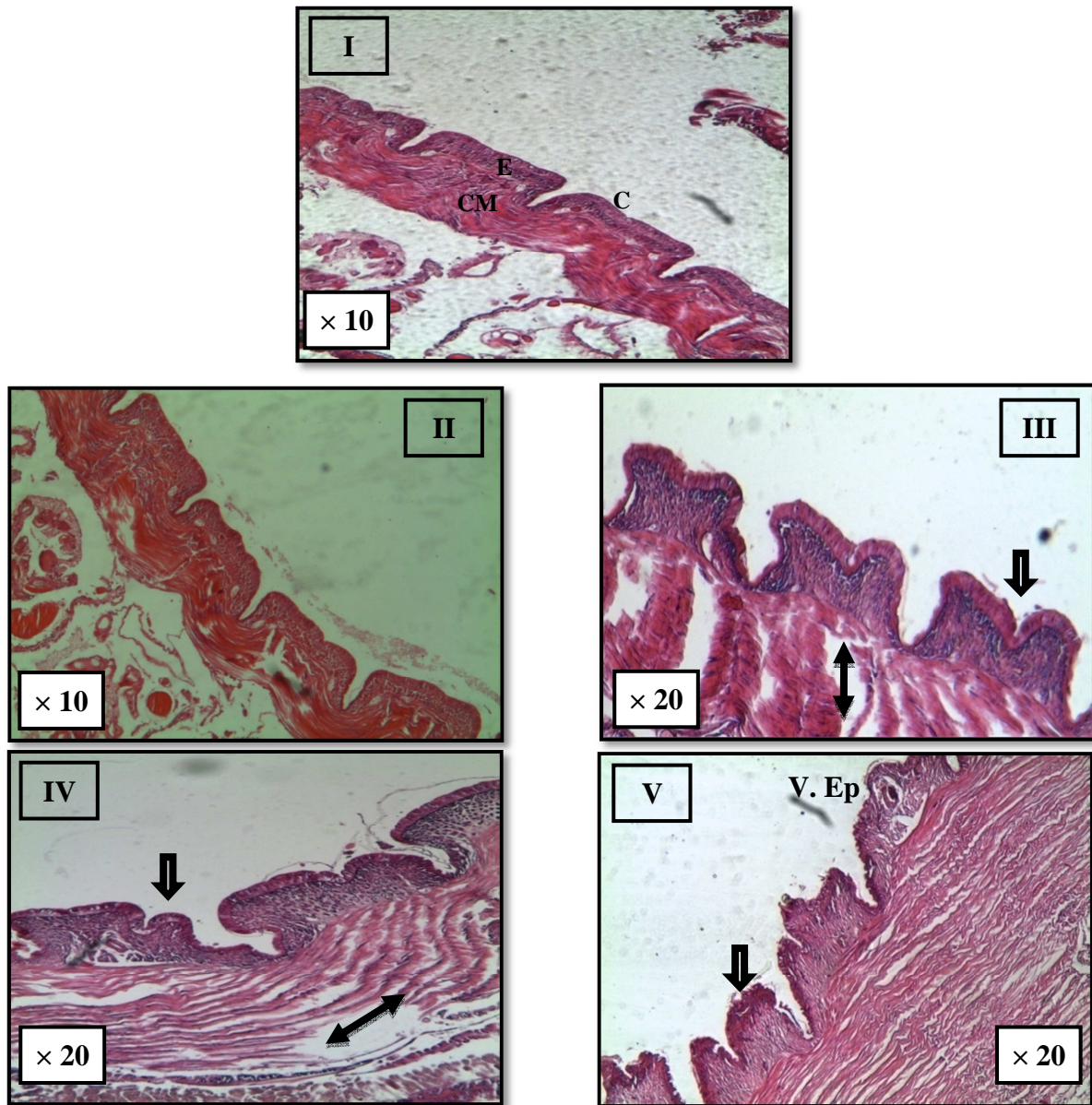






Planche 2 : Changements histologiques d'un fragment d'épiderme après 6 jours de traitement aux concentrations croissantes de Méthomyl.

(I) Vers de terre témoins ; (II) Vers de terre traités avec 4 mg ; (III) Vers de terre traités avec 6 mg, (IV) Vers de terre traités avec 8 mg ; (V) Vers de terre traités avec et 10 mg.

C: Cuticule ; **Ep:** épithélium ; **Mus C:** muscle circulaire ; **V. Ep:** vacuole épidermique ; **V. Mus C :** vacuole muscle circulaire ;  : Détachement de l'épiderme ;  : altération ;  : congestion vasculaire ;  : contour irrégulier

4- Aspect de l'épiderme après 12 jours de traitement par des concentrations croissantes du Méthomyl :

La planche (04) illustre l'aspect de l'épiderme des vers de terre témoins (I) et après 12 jours de traitement par des concentrations croissantes de Méthomyl (II, III, IV, V). Ainsi, à la plus faible concentration du xénobiotique (4mg) (II), l'examen histologique met en évidence un épiderme irrégulier (⇒) avec une désorganisation du muscle circulaire (⇔). Concernant les vers de terre traités par la concentration (6mg) de Méthomyl (III), nous avons mis en évidence un épiderme de forme irrégulière (⇒) avec une désorganisation importante du muscle circulaire (⇔). Il en est de même pour la concentration (8 mg) de Méthomyl avec l'apparition de vacuoles épithéliales (V. Ep)(IV). A la plus forte concentration (10mg) de Méthomyl (V), nous notons des altérations sévères au niveau du muscle circulaire (⇔) avec l'apparition des congestions au niveau épithélial (↗).

RESULTATS ET DISCUSSION

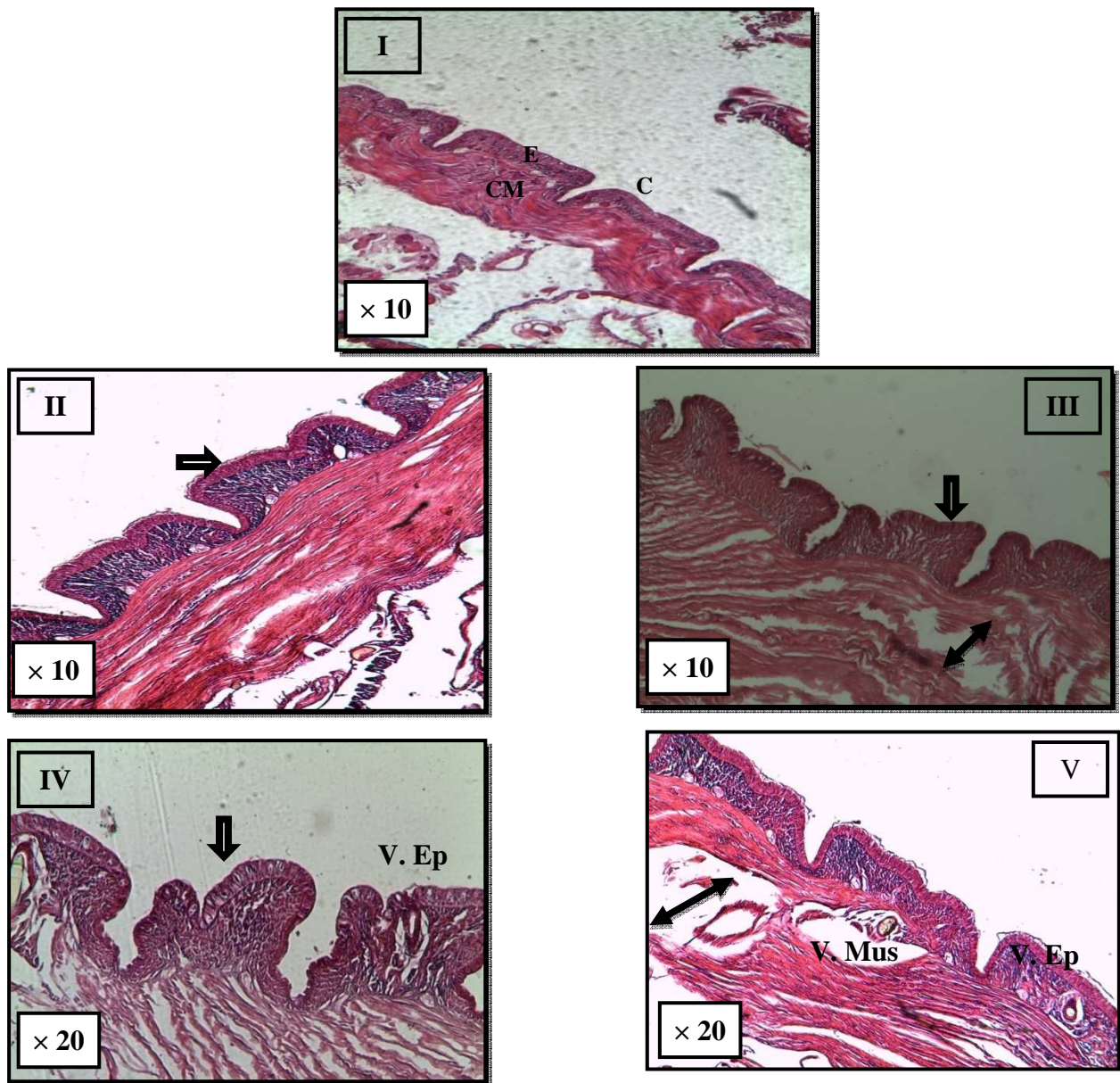






Planche 3 : Changements histologiques d'un fragment d'épiderme après 9 jours de traitement aux concentrations croissantes de Méthomyl.

(I) Vers de terre témoins ; (II) Vers de terre traités avec 4 mg ; (III) Vers de terre traités avec 6 mg, (IV) Vers de terre traités avec 8 mg ; (V) Vers de terre traités avec et 10 mg.

C : Cuticule ; **Ep :** épithélium ; **Mus C :** muscle circulaire ; **V. Ep :** vacuole épidermique ; **V. Mus C :** vacuole muscle circulaire ;  : Détachement de l'épiderme ;  : altération ;  : congestion vasculaire ;  : contour irrégulier

RESULTATS ET DISCUSSION

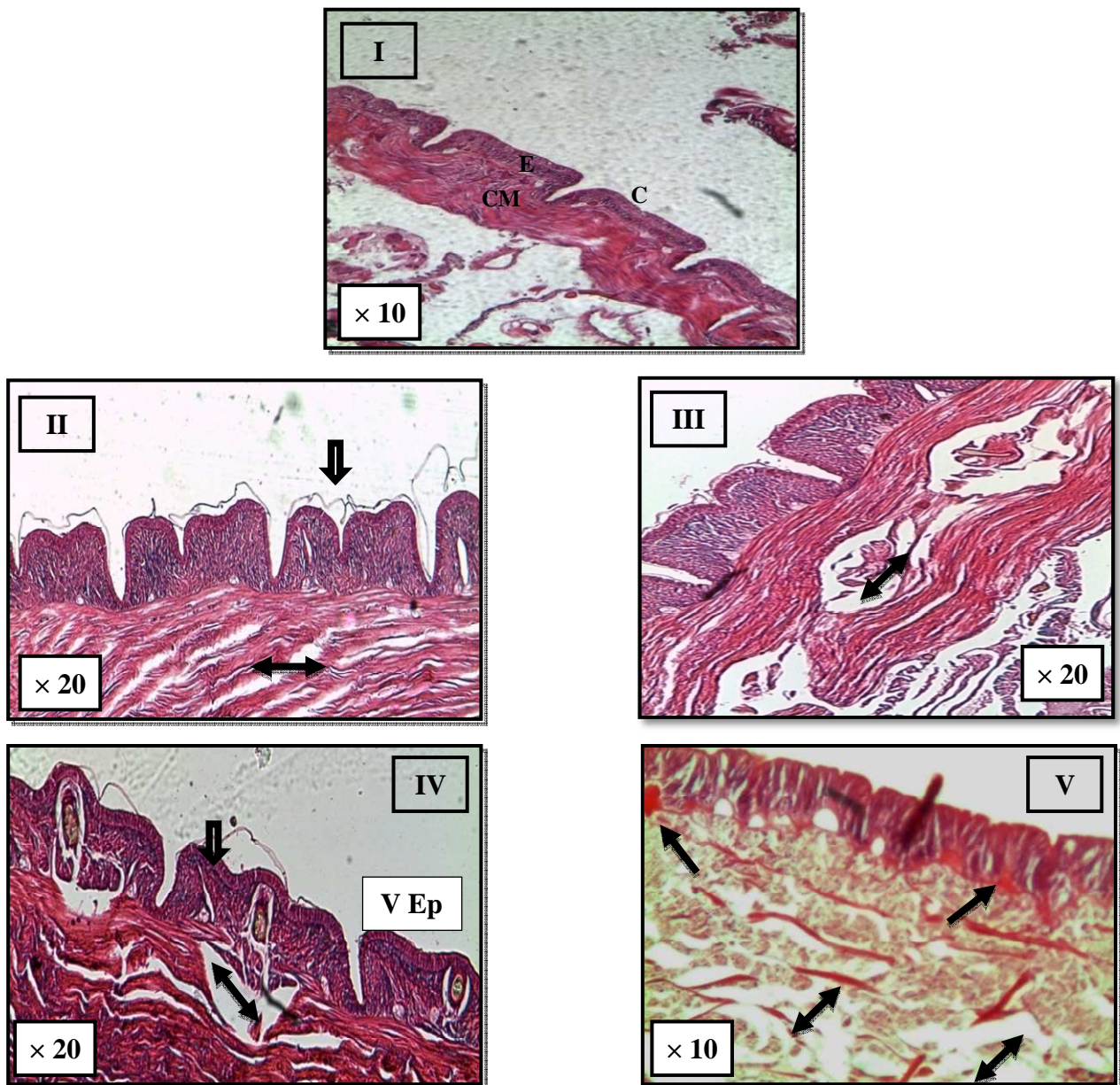






Planche 4 : Changements histologiques d'un fragment d'épiderme après 12 jours de traitement aux concentrations croissantes de Méthomyl.

(I) Vers de terre témoins ; (II) Vers de terre traités avec 4 mg ; (III) Vers de terre traités avec 6 mg, (IV) Vers de terre traités avec 8 mg ; (V) Vers de terre traités avec et 10 mg.

C: Cuticule ; **Ep:** épithélium ; **Mus C:** muscle circulaire ; **V. Ep:** vacuole épidermique ; **V. Mus C :** vacuole muscle circulaire ;  : Détachement de l'épiderme ;  : altération ;  : congestion vasculaire ;  : contour irrégulier

RESULTATS ET DISCUSSION

5- Discussion :

Les pesticides, les métaux lourds et autres polluants chimiques empoisonnent et perturbent l'habitat naturel des animaux et peuvent mener à un déséquilibre écologique (**Luo et al., 1999 ; Rao et al., 2003**). L'exposition à ces substances toxiques peut produire des perturbations biochimiques, histologiques ou morphologiques, se traduisant par des altérations spécifiques d'un organe, d'un système ou d'une fonction (système hématopoïétique, fonction de reproduction...), ou d'un processus biochimique ou biologique (cancer et mutagénicité). Ces effets varient selon l'intensité, la voie, la fréquence et la durée de l'exposition mais aussi en fonction de l'espèce, du sexe, de l'âge et de l'état de santé des populations exposées. Ils peuvent être réversibles ou irréversibles, immédiats ou différés (**Moussavou Moudouma, 2010**).

L'approche des biomarqueurs a été largement appliquée dans le domaine de la biosurveillance en utilisant les moules et d'autres mollusques comme des sentinelles. Plus récemment, et selon la même approche, les limaces et les vers de terre ont été proposées comme espèces sentinelles pour l'évaluation de qualité des sols (**Morgan et al., 2002**). Même si le suivi des altérations histologiques n'est pas encore très développé dans le cadre de l'évaluation de la toxicité environnementale des polluants, il semblerait donc que cette approche tissulaire constitue un indicateur efficace de l'ampleur de la toxicité qui s'exerce sur les organismes tels que les vers de terre.

Selon **Morgan et Turner (2005) et Oluah et al.(2010)**, les observations histologiques des tissus et cellules sont des outils précieux pour évaluer les effets toxiques des contaminants tels que les métaux lourds sur plusieurs espèces dont les vers de terre. C'est dans ce cadre la que se situe notre étude. Ainsi, les vers de terre exposés au Méthomyl dans le sol peuvent subir des effets toxiques multiples tels des atteintes tissulaires importantes au niveau de l'épiderme. En effet l'examen histologique de l'épiderme du ver de terre met en évidence une perte de l'intégrité de la cuticule protectrice, ceci pourrait être une première réponse biologique à la présence du xénobiotique.

Nous avons également mis en évidence l'apparition des vacuoles épithéliales au niveau du muscle circulaire ainsi que des altérations graves, pouvant aller jusqu'à la destruction du tissu aux plus fortes concentrations du Méthomyl. Ces résultats en accord avec ceux de **Gao et al. (2013)** qui a testé l'effet d'un fongicide (Triazole) sur des vers de terre *Eisenia foetida*, et qui a également mis en évidence des nécroses tissulaires chez cet

RESULTATS ET DISCUSSION

organisme, ou encore ceux de **Mohssen (2000)** qui a montré que le glyphosate provoquait des dommages aux tissus épithéliaux des vers de terre *Pheretima elongate*. La perte de l'intégrité structurelle que nous avons observé au niveau du muscle circulaire particulièrement pour les plus fortes concentrations de Méthomyl est un autre signe de toxicité également mis en évidence par **Chakra Reddy et al. (2008)** qui a testé la toxicité d'un Organophosphoré (Profenofos) sur les vers de terre (*Eisenia foetida*).

Après 12 jours de traitement, l'épiderme révèle des signes graves de dégradation et une nécrose, **Kiliç (2011)** rapporte que les xénobiotiques causent des dommages et s'accumulent principalement dans le muscle circulaire de vers de terre exposés à une pollution.

Des modifications d'ultrastructure cellulaires après exposition au Méthomyl ont déjà été observées chez d'autres modèles biologiques, Selon **Radwan et al. (2008)**, le Méthomyl est à l'origine d'altérations se manifestant par une dégénérescence des cellules digestives, un épaississement et une irrégularité de la membrane basale au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargot *Vermiculata eobania*. Cet effet du Méthomyl semble ubiquitaire, puisque **El-Demerdash et al. (2012 ; 2013)** ont mis en évidence des altérations au niveau du tissu hépatique chez des souris traitées traduisant par une dilatation de la veine centrale, une dégénérescence nucléaire et une infiltration de cellules mononucléaires. Il en est de même au niveau du rein. Ainsi, l'examen histologique des reins des souris a révélé des dommages importants au niveau des néphrons : Dilatation sévère du tissu corticale, glomérule congestionné par un gonflement des cellules endothéliales et dégénérescence de l'épithélium des cellules tapissant les tubules.

*CONCLUSION
GENERALE
ET
PERSPECTIVES*

Conclusion générale

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

Dans ce travail, il nous est apparu important de commencer notre travail par une étude taxonomique qui nous a permis d'identifier les espèces récoltées et de les classer. Nos résultats ont révélé que les vers de terre que nous avons recensés, appartiennent à la famille des Lumbricidae, quatre genres lombriciens (*Octodrilus*, *Nicodrilus*, *Eisenia*, *Allolobophora*) correspondant à 4 espèces : *Octodrilus complanatus*, *Nicodrilus caliginosus caliginosus*, *Eisenia foetida*, *Allolobophora chlorotica*).

Très peu de travaux se sont penchés sur le devenir des pesticides et leurs effets sur les vers de terres dans notre région. Dans cette étude, nous nous sommes proposés d'évaluer la toxicité potentielle d'un Carbamate, le Méthomyl sur les vers de terre *Octodrilus complanatus*. Pour cela, nous nous sommes basés sur plusieurs approches : une approche toxicologique dans laquelle nous avons évalué le pourcentage de Mortalité et le taux de Croissance, une approche multi-biomarqueurs, dans laquelle nous avons ciblé un certain nombre de biomarqueurs de la toxicité tels : le GSH, le taux de MDA, et les activités enzymatiques GST, CAT, AChE. Pour mieux étayer nos résultats, il nous a semblé judicieux de nous pencher sur l'aspect histologique qui rend compte sur les éventuelles altérations tissulaires chez l'organisme traité par le xénobiotique.

Dans un premier temps, il ressort de nos résultats que le Méthomyl n'a aucun effet sur le pourcentage de Mortalité. En revanche, aux plus fortes concentrations de Méthomyl (**8 et 10mg**), nous avons noté une diminution du taux de Croissance. Cette perturbation du métabolisme globale s'est manifestée notamment par l'augmentation du taux de protéines totales qui est lui-même révélateur d'une perturbation du métabolisme cellulaire en général.

Concernant l'étude des biomarqueurs, nos résultats mettent en évidence une diminution du taux de GSH accompagné par une augmentation de l'activité GST,

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

parallèlement à une induction de l'activité Catalase et l'activité AChE. Toutes ces enzymes jouent un rôle essentiel dans le processus de métabolisation/détoxication et leur induction témoigne de l'ampleur de la toxicité du xénobiotique étudié (le Méthomyl). Sur un autre plan, l'augmentation du taux de MDA confirme la toxicité du Méthomyl et révèle un stress radicalaire à l'origine de la peroxydation lipidique ainsi mise en évidence.

L'étude histologique vient ainsi confirmer l'extrême sensibilité du ver de terre vis-à-vis des polluants de l'environnement en général et met en évidence la toxicité du Méthomyl qui est à l'origine d'altérations tissulaires sévères.

Perspectives

A l'avenir, Il serait judicieux de :

- Effectuer une étude approfondie sur les mécanismes de défense anti-radicalaire par le dosage d'autres marqueurs du stress oxydatif (GPX, LDH, SOD).
- Déterminer l'impact du Méthomyl sur la reproduction, la survie et la croissance des juvéniles des vers de terre.
- Réaliser des frottis du liquide cœlomique au niveau des vers de terre.
- Réaliser une étude ultrasturcurale.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Ait Hamlet, S., Bensoltane, S., Djekoun, M., Yassi, F., et Berrebbah H., 2012. Histological changes and biochemical parameters in the hepatopancreas of terrestrial gastropod *Helix aspersa* as a biomarker of neonicotinoid insecticide exposure. *African Journal of Biotechnology*, **11 (96)**, 16277-16283.

Alpha Jalloh, M., Chen, J., Zhen, F., Zhang, G., 2009. Effect of different N fertilizer forms on antioxidant capacity and grain yield of rice growing under Cd stress. *Journal of Hazardous Materials*, **162**, 1081–1085.

Amiard, J.C., Berthet, B., Metayer, C., 1989. Importance relative des fluctuations analytiques, biologiques et écologiques dans la détermination de stratégies d'échantillonnage adaptées aux études de bioaccumulation des métaux, *J. Rech. Océanogr*, **14**, 1-2, 53-57.

Ammer, S., Weber, K., Abs, C., Ammer, C., Prietzel, J., 2006. Factors influencing the distribution and abundance of earthworm communities in pure and converted Scots pine stands. *Applied Soil Ecology*, **33**, 10-21.

Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T. H., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, **179**, 1-12.

Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2000. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* **82 (10)**, 1227-1234.

Avel M., 1929. Recherches expérimentales sur les caractères sexuels somatiques des Lombriciens. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **63**, 149-318.

Avel, M., 1959. Classe des annélid soligochaetes (Oligochaeta, **Huxley, 1875**). *Traite de Zool.* P.P. GRASSÉ, Masson et Cie (Eds.), Paris, 5 (I), 224-470.

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

Azzouz, Z., 2012. Etude des effets toxiques d'un fongicide (AmistarXtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. 141p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

B

- Bachelier, G., 1978.** La faune des sols, son écologie et son action, IDT N°38. ORSTOM, Paris, 391 p.
- Beddard, F.E., 1892.** On earthworms from Algeria and Tunisia. *Proceedings of the Royal physical Society of Edinburg*, Session 1892, Edinburg, 28-37.
- Beeby, A., 2001.** What do sentinels stand for? *Environmental Pollution*, **112**, 285-298.
- Baha, M., 1997.** The earthworm fauna of Mitidja, Algeria. *Tropical Zoology*, **10**, 247-254.
- Baha, M., Berra, S., 2001.** *Proselodrilus doumandji* sp. n., a new lumbricid from Algeria. *Tropical Zoology*, **14**, 87-93.
- Baha, M., 2008.** Étude bioécologique des oligochètes du Nord de l'Algérie. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique, El-Harrach. 224p.
- Barillet, S., 2007.** Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz, France. 476p.
- Bartlett, M.D., Briones, M.J.I., Neilson, R., Schmidt, O., Spurgeon, D., Creamer, R.E., 2010.** A critical review of current methods in earthworm ecology: from individuals to populations. *Eur. J. Soil Biol.* **46**, 67-73.
- Belhaouchet, N., Djebbar, M.R., Meksem, L., Grara, N., Zeriri, I., Berrebah, H., 2012.** Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide: The Spinosad on an alternate model: *Helix aspersa*. *Journal of Applied Sciences Research*, **8(8)**, 4199-4206.
- Belhaouchet, N., 2014.** Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix aspersa* ». Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. 90p.
- Benbouzid, H., 2007.** Stress chimique et comportement microbien : Cas de *Paramecium* sp. Mémoire de Magister, Université Badji Mokhtar, Annaba. 71p.
- Benbouzid, H., Berrebah, H., Berredjem, M., Djebbar, M.R. 2012.** Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium* sp. With special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicological and Environmental Chemistry*, **94(3)**, 557-565.
- Benbouzib, H., 2012 :** Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliés. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. 87p.
- Bigot, A., 2009.** Identification et étude de l'expression de gènes de détoxification chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea*: Approches en laboratoire et en milieu naturel. Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine de Metz, France. 189 p.
- Bogdanov, P., 1996.** Commercial vermiculture : how to build a thriving business in redworms. Vermi Co Press, Oregon, 83 p.
- Bonnard, M., Eom, I.C., Morel, J.L., Vasseur, P., 2009.** Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **50(1)**, 60-67.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bonnefont-Rousselot, D., 1994. Irradiation des membranes cellulaires. *Journal de chimie physique*, **91**, 968- 983.

Bouaricha, H., 2013. Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helixaspersa et Parameciumsp.*). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 131p.

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

Bouche, M.B., 1977. Stratégies lombriciennes. *Bull. Ecol.*, Paris, 25: 122-132.

Bouhafs, N., Berrebbah, H., Devaux, A., Rouabhi, R., Djebbar, M.R., 2009. Micronucleus Induction in Erythrocytes of Tadpole *Ranasaharica* (Green Frog of North Africa) Exposed to Artea 330EC. *American-Eurasian Journal of Toxicologic Sciences*, **1 (1)**, 07-12.

Booth, L.H., Heppelthwaite, V.J., O'Halloran, K., 2000. Growth, development and fecundity of the earthworm *Aporrectodeacaliginosa* after exposure to two organophosphates, *New Zealand Plant Protection*, **53**, 221–225.

Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S., 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilusgalloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **146(4)**, 531–539.

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

Brulle, F., Cocquerelle, C., Mitta, G., Castric, V., Douay, F., Leprêtre, A., Vandebulcke, F., 2008a. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eiseniafetidacoelomocytes*. *Developmental & Comparative Immunology*, **32**, 1441-1453.

Bundy, J.G., Keun, H.C., Sidhu, J.K., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Kille, P., Morgan, A.J., 2007. Metabolic profile biomarkers of metal contamination in a sentinel terrestrial species are applicable across multiple sites. *Environmental Science & Technology*, **41**, 4458–4464.

Burgos, M.G., Winters, C., Stürzenbaum, S.R., Randerson, P.F., Kille, P., Morgan, A.J., 2005. Cu and Cd effects on the earthworm *Lumbricusrubellus* in the laboratory: multivariate statistical analysis of relationships between exposure, biomarkers, and ecologically relevant parameters. *Environmental Science & Technology*, **39**, 1757–63.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

C

Cajaraville, M. P., Hauser, L., Carvalho, G., Hylland, K., Olabarrieta, I., Lawrence, A. J., Lowe, D., Goksoyr, A., 2003. Genetic damage and the molecular/cellular response to pollution. In: Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses. eds. Lawrence A. J., Hemingway K. L. Blackwell Sciences. 14-82 p

Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M.P., Coquet Y., 2005. Les pesticides dans le sol : Conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricole, 637 p.

Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, **46**, 67-76.

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

Chakra Reddy, N., Venkateswara Rao, J., 2008. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicol Environ Saf*; **71**, 574-82.

Chaudhary, A.K., Reddy, G.R., Blair, I. A., Marnett, L.J., 1996. Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde - modified DNA using liquid chromatography /electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis*, **17**, 1167-70.

Chen, H.J., Chung, F.L., 1996. Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol*, **9**, 306-312.

Chun, C., Qixing, Z., Shuo, L., Zongming, X., 2011. Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. *Chemosphere*, **83**, 1147–1154.

Coeurdassier, M., 2001. Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymniastagnalis* et *Lymniapalustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques. Thèse de doctorat, université de Franche Comté, France. 281p.

COPARLY., 2008. "Diagnostic de la qualité de l'air intérieur: école primaire de Mions (69)." Disponible sur http://www.atmorthonealpes.org/Site/News/Voir/qualite_de_lair_interieur_groupe_scolaire_pasteur.

Contardo, J.V., Wiegand, C., 2008. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Lumbriculus variegatus* as biomarkers of contaminated sediment exposure. *Chemosphere*, **70**, 1879–1899.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P. 1997a. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. In: Biomarqueurs en écotoxicologie – Aspects fondamentaux (eds. Lagadic L., Caquet T., Amiard J. C., Ramade F.), 149-163p, Paris.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997b. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

freshwater bivalves, *unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**, 122–31.

Cox, R., Rakotondrazafy, A. F. M., Rakotondramazava, H. T., 2004. Geological versus human controls on lavaka formation and extreme erosion in Madagascar. *Geological Society of America*, **36**, 364-377.

Curry, J.P., Doherty, P., Purvis, G., Schmidt, O., 2008. Relationship between earthworm populations and management intensity in cattle-grazed pastures in Ireland. *Applied Soil Ecology*, **39**(1), 58-64.

D

Dagnelie, P., 1999. Statistiques théoriques et appliquées. Tome 2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Univ De boecklet Larcier, 659p.

Darwin, C., 1909. On the Origin of Species, New York : P. F. Collier, 552 p.

Dell'Omo, G., Turk, A., Shore, R.F., 1999. Secondary poisoning in the common shrew (*Sorex araneus*) fed earthworms exposed to an organophosphate pesticide. *Environ. Toxicol. Chem*, **18**, 237-240.

Dharm Paul, G., Punita, B., Ravi, K., Anil, B., Dhawan, D. K., 2009. Vitamin E-mediated protection on methomyl-induced alterations in rat liver. *Toxicological and Environmental Chemistry*, **91**(4), 685-698.

Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential responses to cadmium in roots leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J. Exp. Bot*, **52**, 1101–1109.

Djekoun, M., 2012. Évaluation de l'effet du stress oxydatif généré par le Cadmium à l'échelle cellulaire : Cas de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba. 192p.

Doving, K.B., 1991. Assessment of animal behaviour as a method to indicate environmental toxicity. *Comp. Biochem. Physiol*, **100**(C), 247–252.

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

Dugès, A., 1828. Recherches sur la circulation, la respiration et la reproduction des Annélides abranches. *Ann. Sci. Nat*, **15**, 285-337.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

E

Edwards, C.A., Lofty, J.R., 1977. Biology of earthworms. Chapman and Hall Ltd, Grande Bretagne. 333 p.

Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. The biology and ecology of earthworms. Chapman and Hall, New York. 426 p.

El-Addan, F., 1990. Biophysique du sol: Etude quantitative des relations entre le travail lombricien et les propriétés des sols méditerranéens. *Documents pédozoologiques*. Lab. De Zooécologie du sol, INRA, Montpellier, 245 p.

El-Demerdash, F., Attia, A.A., Elmazoudy, R.H., 2012. Biochemical and histopathological changes induced by different time intervals of methomyl treatment in mice liver. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, **47(12)**, 1948-1954

El-Demerdash, F., Dewar, Y., Elmazoudy, R.H., Attia, A.A., 2013. Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **65(6)**, 897-901.

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

F

Favier, A., 2003. Le stress oxydants: mécanismes biochimiques: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 108-115.

Ferrari, A., Venturino, A., Pechén, D.A., 2007. Effects of carbaryl and azinphos-methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **88**, 134-142.

Figueira, R., Tavares, P.C., Palma, L., Beja, P., Sérgio, C., 2009. Application of indicator kriging to the complementary use of bioindicators at three trophic levels. *Environmental Pollution*, **157** : 2689-2696.

Funes, V., Alhama, J., Navas, J.I., López-Barea, J., Peinado, J., 2005. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environ. Pollut.*, **139**, 214-23.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

G

Gambi, N., Pasteris, A., Fabbri, E., 2007. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **145(4)**, 678-685.

Gandolphe, M., 1861. Lombric phosphorescent. *Revue et Magazine de Zoologie*, **13**, 284-287.

Gao, Y., Sun, Z., Sun, X., Bao, Y., 2007. Toxic effect of olaquinox antibiotic on *Eisenia fetida*. *European Journal of Soil Biology*, **43**, S252-S255.

Gao, M., Song, W., Zhang, J., Guo, J., 2013. Effect on enzymes and histopathology in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by triazole fungicides. *Environmental toxicology and pharmacology*, **35(3)**, 427-433.

Gates, G.E., 1980. Contribution to a revision of the earthworm family Lumbricidae, XXV. The Genus *Allolobophora* Eisen, 1874 IN North America. *Megadrilogica*, **3 (11)**, 177-184.

George, G.S., Buchanan, G., 1990. Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish Physiology and Biochemistry*, **8**, 437-449.

Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Perceval, O., Hare, L., Pinel-Alloul, B., Pellerin, J., 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.*, **64**, 185-200.

Gomez-Eyles J.L., Svendsen, C., Lister, L., Martin, H., Hodson, M., Spurgeon, J.D., 2009. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Saf*, **72**, 71-79.

Grara, N., Berrebbah, H., Rouabhi, R., Atalia, A., Djebbar, M.R., 2009. Impact of pollution by industrial metallic dust on bio-accumulator organism *Helix aspersa*. *Global Veterinaria*, **3**, 276-280.

Grara, N., 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, 120p.

Green, R.M., Graham, M., O'Donovan, M.R., Chipman, J.K., Hodges, N.J., 2006. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis*, **21**, 383-390.

Grue, C.E., Gibert, P.L., Seeley, M.E., 1997. Neurophysiological and behavioral changes in nontarget wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticide: Thermoregulation, food consumption and reproduction. *Am. Zool.*, **37**, 369-388.

Guerlet, G., 2010. La gestion des ports par une entité publique : aspects européens et environnementaux. Thèse de Doctorat, Université de Littoral Côte d'Opale, France. 289p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Guelorget, O., Perthuisot, J.P., 1984. Indicateurs biologiques et diagnose écologique dans le domaine paralique. *Bulletin d'Ecologie*, **15**(1), 67-76.

Gupta, S.K., Sundararaman, V., 1991. Correlation between burrowing capability and AChE activity in the earthworm, *Pheretimaposthuma*, on exposure to carbaryl. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **46**, 859-65.

Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanisms of lipid peroxidation in biological systems. *Trends biochem.Sci*, **15**, 129-135.

H

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

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

Heath, A.G., Cech, J.J. Jr., Brink, L., Moberg, P., Zinkl, J.G., 1997. Physiological responses of fathead minnow larvae to rice pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, **37**, 280-288.

Hodgson, D.A., Vyverman, W., Verleyen, E., Sabbe, K., Leavitt, P.R., Taton, A., Squier, A.H., Keely, B.J., 2004. Environmental factors influencing the pigment composition of in situ benthic microbial communities in east Antarctic lakes. *Aquatic microbial ecology*, **37**, 247-263.

Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergam, H.L., 1992. Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. SETAC Special Publication Series, Lewis Publishers, Boca Raton. 346 p.

J

Jian, P., Yanglin, W., Jianshen, W., Yuqing, Z., 2007. Evaluation for regional ecosystem health: methodology and research progress. *Acta Ecologica Sinica*, **27**(11), 4877-4885.

K

Kavitha, P., Venkateswara Rao, J., 2008. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, **26**, 192 - 198

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Khalidi, F., Djebar, H., Rouabhi, R., Djebar, M. R., 2009. Cellular Response of a Pollution Bioindicator Model (*Ramalinafarinacea*) Following Treatment with Fertilizer (NPKs). *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, **1** (2), 69-73.

Kherbouche, D., Bernhard-Reversat, F., Moali, A., Lavelle, P., 2012. The effect of crops and farming practices on earthworm communities in Soummam valley, Algeria. *European Journal of Soil Biology*, **48**, 17-23.

Kiliç, G.A., 2011. Histopathological and biochemical alterations of the earthworm (*Lumbricus Terrestris*) as biomarker of soil pollution along Porsuk river basin (Turkey). *Chemosphere*, **83**, 1175-1180.

L

Ladhar-Chaabouni, R., Gargouri, R., Hamza-Chaffai, A., 2007. Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus*: Metallothionein quantification by using two techniques. *Inter.J. Environ. Pollu*, **30**, 593-601.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Collection Ecologie, Masson, Paris, 53-66 p.

Lamarck, Jean-B. de. 1801. *Système des Animaux sans Vertèbres, ou Tableau général des classes, des orders et des genres de ces animaux; Présentant leurs caractères essentiels et leur distribution, d'après la considération de leurs rapports naturelles et de leur organisation, et suivant l'arrangement établi dans les galeries du Muséum d'Histoire Naturelle, parmi leurs dépouilles conservées.* Déterville, Paris. 432p.

Lawton, L.J., Donaldson, W.E., 1991. Lead- induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol. Trace Elem. Res*, **28**, 93-97.

Lazartigues, A., 2010. Pesticides et polyculture d'étang : de l'épandage sur le bassin versant aux résidus dans la chair de poisson. Thèse de Doctorat. Université de Nancy, France. 191 p.

Lee, K.E., 1985. Earthworms: Their Ecology and Relationship with Soils and Land use. *Academic Press*: Sydney, Australia. 411p.

Li, H., Jiang, H., Gao, X., Wang, X., Qu, W., Lin, R., Chen, J., 2008. Acute toxicity of the pesticide methomyl on the topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*): mortality and effects on four biomarkers. *Fish Physiol. Biochem*, **34**, 209-216.

Lin, D., Zhou, Q., Xie, X., Liu, Y., 2010. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, **81**, 1328–1333.

Little, E.E., 1990. Behavioral toxicology: stimulating challenges for a growing discipline. *Environ. Toxicol. Chem*, **9**, 1–2.

Liu, S., Zhou, Q., Wang, Y., 2011. Ecotoxicological responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to soil contaminated with HHCb. *Chemosphere*, **83**, 1080–1086.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Livingstone, D. R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Advcomp environ. Physiol*, **7**, 46-185.

Lopes, P.A., Pinheiro, T., Santos, M.C., Mathias, M.D.L., Collares-Pereira M.J., ViegasCrespo A.M. 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscusalburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *The Science of the Total Environment*, **280**, 153-63.

Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M., Oikari, A., Haimi, J., 2004. Biomarkerresponses of the earthworm *Aporrectodeatuberculata* to copper and zincexposure: differences between populations with and without earlier metalexposure. *Environmental Pollution*, **129**, 377–386.

Luo, Y., Zang, Y., Zhong, Y., Kong, Z.M., 1999. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eiseniafetida*. *Chemosphere*, **39**, 2347–2356.

Luo, Y., Su, Y., Lin, R.Z., Shi, H.H., Wang, X.R., 2006. 2-Chlorophenol induced ROS generation in fish *Carassiusauratus* based on the EPR method. *Chemosphere*, **65**, 1064–1073.

M

Mahajan, S., Kanwar, S.S., Sharma, S.P., 2007. Long-term effect of mineral fertilizers and amendements on microbial dynamics in an alfisol of western Himalayas. *Indian Journal of Microbiology*, **47**(1), 86-89.

Marino, F., Ligeró, A., Cosin, D.J.D., 1992. Heavy metals and earthworms on the border of a road next to Santiago. *Soil Biology and Biochemistry*, **24** (12), 1705–1709.

Martin, N.A., 1986. Toxicity of pesticides to *Allolobophoracaliginosa* (Oligochaeta: lumbricidae). *New Zealand journal of agricultural research*, **29** (4), 699–706.

Martoja, R., Martoja, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, 347p.

Masaya, M., Yoshinobu, H., Ai, Y., Maki, K., Yasuo, O., 2002. Determination of cellular levels of nonproteinthiols in phytoplankton and their correlation with susceptibility to mercury. *Journal of Phycology*, **38**, 983-990.

McCarthy, J.F., Shugart, L.R., 1990. Biomarkers of environmental contamination. *Lewis Publishers*, Chelsea, USA.

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 6049-6055.

McFarland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., McCant, D.D., 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurusnebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **37**, 236-41.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Mohssen, M., 2000. Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm (*Pheretimaelongata*) exposed to a field dose of the herbicide glyphosate. *The Environmentalist*, **20**(2), 105-111.

Morgan, M., Gibbs, S., Maxwell, K. and Britten, N., 2002. Hearing Children's Voices: Methodological Issues in Conducting Focus Groups with Children Aged 7–11 Years', *Qualitative Research*, **2**(1), 5–20.

Morgan, A.J., Turner, M.P., 2005. Quantitative ultrastructure of metal -sequestering cells reflects intersite and interspecies differences in earthworm metal burdens. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **49**, 45-52.

Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, S., Vernet, G., 2003. Effects of the herbicide isoproturon on survival, growth rate, and protein content of mature earthworms (*Lumbricusterrestris L.*) and its fate in the soil. *Applied Soil Ecology*, **23**, 69-77.

Mostert, M.A., Schoeman, A.S., Van Der Merwe, M., 2000. The toxicity of five insecticides to earthworms of the *Pheretima* group, using an artificial soil test. *Pest ManagSci*, **58**, 1093-1097.

MoussavouMoudouma, C.F., 2010. Etude des mécanismes d'accumulation du cadmium chez *Arabidopsisthaliana* (écotype Wassilewskija) et chez un mélèze hybride (*Larix eurolepis*) par des approches moléculaire et développementale. Thèse de doctorat, Université de Limoges. 251p.

Murati, M., 2012. Etude d'élimination de trois herbicides : Atrazine, Sulcotrione et Méso-trione, en milieu aqueux par les procédés électrochimiques d'oxydation avancée. Thèse de doctorat, Université Paris-Est, France. 140p.

Muthukaruppan, G., Ganasekaran, P., 2010. Effect of Butachlor herbicide on earthworm *Eiseniafetida* – its histological perspicuity. *Applied and Environmental Soil Science*, 1-5

N

Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, **31**, 1287-1312.

Nzengue, Y., 2008. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du Cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallo thionines et de P53. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier– Grenoble 1, France. 299 p.

O

Oluah, N.S., Obiezue, R.N.N., Ocholor, A.J., Onuoha, E., 2010. Toxicity and histopathological effect of atrazine (herbicide) on the earthworm *Nsukkadrilusmbae* under laboratory conditions. *Animal Research International*, **7**(3), 1287 – 1293

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Omodeo, P., 1956.** Contributo alla revisione dei Lumbricidae. *Arch. Zool. Ital.*, **41**, 129-213.
- Omodeo, P., 1961.** Oligochetidae della Francia Meridionale e di località limitrofe. Dalle Memorie del Museo Civico Vol. di Storia Naturale. Verona. **IX**, 67-95.
- Omodeo, P., Rota, E., Baha, M., 2003.** The megadrile fauna (Annelida: Oligochaeta) of Maghreb: a biogeographical and ecological characterization. *Pedobiologia*, **47**, 458-465.
- Omodeo, P., Martinucci, G., 1987.** Earthworms of Maghreb. In: A.M. Bonvicini Pagliani and P. Omodeo (eds), On Earthworms. *Selected symposia and monographs. Mucchi Modena*, 235-250.

P

- Pattison, A.B., Moody, P.W., Badcock, K.A., Smith, L.J., Armour, J.A., Rasiah, V., Cobon, J.A., Gulino, L.M., Mayer, R., 2008.** Development of key soil health indicators for the Australian banana industry. *Applied Soil Ecology*, **40**, 155-164.
- Peakall, D.B., 1992.** Animal biomarkers as pollution indicators. *London: Chapman Prog. Ser.* **162**, 125-135.
- Pelosi, C., 2008.** Modélisation de la dynamique d'une population de vers de terre *Lumbricus terrestris* au champ. Thèse de doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). 141p.

R

- Radwan, M.A., EL-wakil, H.B., Osman, K.A., 1992.** Toxicity and biochemical impact of certain oxime carbamate pesticides against terrestrial snail *Thebaisana* (Muller). *Journal of Environmental Science and Health*, **27**, 759-773.
- Radwan, M.A., Essawy, A.E., Abdelmeguid, N.E., Hamed, S.S., Ahmed, A.E., 2008.** Biochemical and histochemical studies on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **90**, p.154-167.
- Ramade, F., 2002.** Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Editions Dunod, 1075p.
- Razafindrakoto, M., 2012.** Etude des Annélides Oligochètes de Madagascar : Taxonomie, Distribution et Ecologie. Thèse de doctorat. Université d'Antananarivo. 174p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2007. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **66**, 92-101.

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

S

Saglio, P., Trijasse, S., Azam, D., 1996. Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**, 232 -238.

Salama, A.K., Osman, K.A., Saber, N.A., Soliman, S.A., 2005. Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pak. J. Biol. Sci.*, **8**, 92-96.

Santé Canada. 2010. In : dsp-psd.tpsgc.gc.ca/collections/collection_2010/.../H113-5-2009-2-fra.pdf.

Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., Sarker, S., 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, **15**, 333-340.

Savigny, J.C., 1826. Analyse des travaux de l'Académie Royale des Sciences pendant l'année 1821. Partie physique. *Mem. Acad. Roy. Sci. Inst. Fr.*, **5**, 176-184.

Scherrer, E., 1992. Behavioural responses as indicator of environmental alterations: approaches, results, developments. *J. Appl. Ichthyology*, **8**, 122-131.

Schiavon, M., 1998. Origine et devenir des produits phytosanitaires. In : Agriculture et Environnement - Les produits entraînés par l'eau, p. 107-118. Colloque d'Hydrotechnique - 159^e Session du Comité Scientifique et Technique, Paris 18 et 19 novembre 1998. Document de la Société Hydrotechnique de France.

Schleifler, R., Coeurdassier, M., Morilhat, C., Bernard, N., Faivre, B., Flicoteaux, P., 2006. Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworms inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas. *The Science of Total Environment*, **371**, 197-205.

Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., Cillard, J., 2000. Alcool et stress oxydatif. *Patholboil*, **49**, 689 - 695.

Silva, J. P., Sousa, S., Rodrigues, J., Antunes, H., Porter, J. J., Gonçalves, I., Ferreira-Dias, S., 2004. Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains. *Sep. Purif. Technol.*, **40**, 309-315.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

SRPV., 2001. Les modalités de dissipation des produits phytosanitaires dans les différents compartiments de l'environnement, Service régional de la protection des végétaux Midi Pyrenees, <http://www.srpv-midi-pyrenees.com/pages2007/index.htm> (consultee le 25.10.2011).

Sturm, A., Wogram, J., Segner, H., Liess, M., 2000. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 1607-1615.

Stürzenbaum, S.R., Kille, P., Morgan, A.J., 1998. The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Letters*, **431(3)**, 437-442.

Suthar, S., Singh, S., Dhawan, S., 2008. Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: Is metal bioaccumulation affected by their ecological category, *Ecological Engineering*, **32**, 99-107.

T

Tariq, M.I., Afzal, S., Hussain, I. and Sultana, N. 2007. Pesticides Exposure in Pakistan: A Review, *Environ Intl*, **33**, 1107-1122.

Tomlin, A.D, 1980. La biologie du ver de terre, 10 p.

Trotter, D.M., Kent, R.A., Wong, P., 1991. Aquatic fate and effect of carbofuran. *Critic. Rev. Environ. Contr*, **21**, 137-176.

V

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **64**, 178-189.

Venkateswara Rao, J., Surya Pavan, Y., Madhavendra, S.S., 2003. Toxic effects of chlorpyrifos on survival, morphology and acetylcholinesterase activity of the earthworm *Eisenia foetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, **54**, 296-301.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, M., Moore, M.N., Orunesu, M. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Comp. Biochem. Physiol.*, **79**, 37-42.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

W

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

Wei, L.Y., Chao, J. S., Hong, C. C., 1997. Assessment of the ability of propoxur, methomyl and aldicarb, three carbamate insecticides, to induce micronuclei in vitro in cultured Chinese hamster ovary cells and in vivo in BALB/c mice. *Environ. Molec. Mutagen*, **29**, 386-393.

Wu, R.S.S., Siu, W.H.L., Shin, P.K.S., 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, **51**, 623- 634.

X

Xiao, N., Jing, B., Ge, F., Liu, X., 2006. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere*, **62**, 1366-1373.

Y

Yasmin, S., D'Souza, D., 2007. Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **79**(5), 529–532.

Z

Zeriri, I., Tadjine, A., Belhaouchet, N., Berrebbah, H., Djebar, M.R., Baha, M., 2013. Contribution to the identification of Oligochaeta: Lumbricidae in the region of Annaba in eastern Algeria. *European Journal of Experimental Biology*, **3**(6), 229-232

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zhou, Q.X., Zhang, Q.R., Liang, J.D., 2006. Toxic effects of acetochlor and methamidophos on earthworm *Eiseniafetida* in phaozem, northeast China, *Journal of Environmental Sciences*, **18(4)**, 741–745.

Zhou, S.P., Duan, C.Q., Fu, H., Chen, Y.H., Wang, X.H., Yu, Z.F., 2007. Toxicity assessment for chlorpyrifos - contaminated soil with three different earthworm test methods. *Journal of Environmental Sciences*, **19(7)**, 854–858.

Zielinski, S., Portner, H.O., 2000. Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age?. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 125, 147-160.

Zinkl, J.G., Lockhart, W.L., Kenny, S.A., WARD, F.J., 1991. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In: Cholinesterase-Inhibiting Insecticides* (Mineau P., ed.). New York: Elsevier. 233-254.

Les sites :

(www.salinella.bio.uottawa.ca(2009)

<http://imageshack.us/photo/my-images/36/dissection.jpg/>

<http://www.bioactualites.ch/>