

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique**

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

**BADJI MOKHTAR  
ANNABA UNIVERSITY  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR  
ANNABA**



جامعة باجي مختار  
- عنابة -

**Faculté des Sciences  
Département de Biologie**

**THÈSE**

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

**Caractérisation biologique de certaines molécules nouvellement  
synthétisées et évaluation de leur toxicité**

**Option  
Toxicologie Environnementale**

**Par  
Mme BOUGHOULA Rahma Eps BOUZIDI**

**DIRECTRICE DE THÈSE : Dr. SBARTAI Hana Prof. U.B.M. ANNABA**

Devant le jury

<b>PRESIDENTE</b>	Berrebah Houria	Prof. U. BADJI MOKHTAR- ANNABA
<b>EXAMINATRICE</b>	KHATI Willia	Prof. U. CHADLI BENDJEDID- EL-TARF
<b>EXAMINATRICE</b>	Khaldi Fadila	Prof U. M. Cherif Messaadia. Souk-Ahras
<b>EXAMINATRICE</b>	Kirane Amrani Leila	Prof U. BADJI MOKHTAR- ANNABA

**Année universitaire : 2023/2024**

## **Remerciements**

*Dieu merci de m'avoir donné la force et la volonté d'accomplir cette thèse. Merci de m'avoir aidé de manière irréprochable à franchir les nombreux obstacles dressés dans mon chemin, merci de m'avoir donné la détermination quand tous semblaient perdus.*

*A ma directrice de Thèse **Mme SBARTAI Hana**, professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba, Je tiens à vous exprimer ma sincère gratitude pour votre soutien inlassable, votre expertise et votre encouragement tout au long de cette aventure de recherche. Votre leadership éclairé, votre disponibilité et votre dévouement ont été des piliers indispensables qui m'ont permis d'atteindre cet aboutissement. Je suis reconnaissante d'avoir eu l'opportunité de bénéficier de vos précieux conseils et de votre inspiration.*

*Je remercie vivement **Mme BERREBBAH Houria**, professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, et directrice du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

*Je remercie sincèrement les honorables membres de jury **Mme KHATI Willia**, professeure à l'université Chadli Bendjdid El-Taref, **Mme KHALDI Fadila**, professeure à l'université M. Cherif Messaadia Souk-Ahras et **Mme KIRANE AMRANI Leila**, professeure à l'université Badji Mokhtar Annaba, pour avoir accepté de consacrer leur temps précieux à l'évaluation de ce travail.*

*Je remercie vivement **Mme SBARTAI Ibtissem**, Professeure à l'université Badji Mokhtar Annaba, pour son soutien et son aide*

*Je remercie également **Mme BERREDJEM Malika**, Professeur à l'Université d'Annaba et directrice du laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Groupe Synthèse de Biomolécules et Modélisation Moléculaire pour les encouragements, son aide, et sa disponibilité.*

*J'exprime ma reconnaissance à **Mme Fouzia BENALIOUCHE** directrice de l'institut national de la protection des végétaux (INPV) de m'avoir accueilli très chaleureusement et de m'avoir permis de réaliser une partie de mon travail de thèse.*

*Un grand merci pour toute **l'équipe du laboratoire** toxicologie, physiologie animale et végétale (Meriem, Madina, Linda, Siham et Wafa) pour votre soutien constant, votre collaboration et votre ambiance de travail agréable.*

## **Dédicaces**

### **À la mémoire de ma chère tante Mama Fouzia,**

*Même si tu n'as pas pu être présente physiquement pour assister à ma soutenance, ta présence et ton soutien ont été ressentis tout au long de ce voyage académique. Ta bienveillance, ton amour et tes encouragements ont été une source de réconfort et de force pour moi.*

*Cette thèse est dédiée à ta mémoire, en reconnaissance de l'impact profond que tu as eu sur ma vie. Ta générosité et ta gentillesse continueront à m'inspirer et à guider mes pas alors que je poursuis mon chemin.*

*Tu resteras à jamais dans nos cœurs et dans nos pensées. Que cette dédicace témoigne de l'amour et de l'appréciation éternels que je porte à ton égard.*

### **À ma mère Soraya et à mon père Nanou,**

*Votre encouragement, votre soutien et vos sacrifices ont été ma lumière dans les moments sombres et ma force dans les moments de doute. Cette thèse est le fruit de votre dévouement et de votre foi en moi, et je vous en suis infiniment reconnaissante.*

*Merci pour tout ce que vous avez fait et pour tout ce que vous êtes. Cette réalisation est dédiée à vous, mes merveilleux parents.*

### **À mon cher époux Islam,**

*Compagnon de vie et partenaire dans chaque victoire et défi. Ton soutien inébranlable, ta patience et ta compréhension ont été ma lumière dans les moments sombres et ma joie dans les moments de triomphe*

### **À mes chers frères Raouf et Embarek,**

*Pour leur amour, leur encouragement et leur fierté sans failles. Votre soutien inconditionnel et vos encouragements m'ont donné la force de poursuivre mes rêves et d'atteindre de nouveaux sommets.*

### **À ma famille élargie,**

*(Ma chère tante Noussa, mon oncle Farid, mon petit ange ma soeur Aya, mes chères cousines mes soeurette Lilia, Nesrine, Ahlem, Nadia, Khawla, Ma zahia, Oumniya, Noussa, Narjes, Yasmine....) vos encouragements, vos conseils et votre soutien ont été une source de réconfort et de motivation inépuisable. Votre fierté et votre soutien m'ont donné la force de persévérer même dans les moments les plus difficiles.*

### **À mes chères amies,**

*Mes sœurs de cœur (Kenza, Faïza, Nihed, Loubna, Abir, Nesrine, Chahra, Halima,, jihen) je dédie cette thèse avec une profonde gratitude et affection. Votre présence, votre soutien et votre amitié ont été une source de force et de réconfort tout au long de ce parcours académique*

# *Sommaire*

## SOMMAIRE

Résumé

ملخص

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>01</b>
<b>CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES .....</b>	<b>06</b>
<b>1. LES PHOSPHONATES .....</b>	<b>06</b>
<b>2. PROPRIETES DES PHOSPHONATES .....</b>	<b>06</b>
<b>3. DERIVES DES PHOSPHONATES .....</b>	<b>07</b>
3.1 LES BISPHOSPHONATES .....	07
3.2 LES NUCLEOSIDES PHOSPHONATES .....	07
3.3 LES A-HYDROXYPHOSPHONATES .....	08
3.4 LES ALKYL-PHOSPHONATES ET LES ARYL- PHOSPHONATES .....	08
3.5 POLYPHOSPHONATES .....	09
3.6 LES A-AMINOPHOSPHONATES .....	09
<b>4. PROCEDES DE SYNTHÈSE DES PHOSPHONATES .....</b>	<b>10</b>
4.1 PROCEDE DE MICHAELIS-ARBUZOV .....	10
4.2 PROCEDE D'ABRAMOV ET PUDOVIK .....	10
4.3 PROCEDE DE KABACHNIK-FIELDS .....	10
<b>5.1 SYNTHÈSE DES A-AMINOPHOSPHONATES DERIVES D'AMINOPHENOL</b>	<b>10</b>
<b>CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES .....</b>	<b>13</b>
<b>1. EVALUATION DE L'ACTIVITE INSECTICIDE .....</b>	<b>13</b>
1.1 MATERIEL ET METHODES .....	14
1.1.1 Matériel Biologique .....	14
1.1.1.1 Présentation de l'insecte .....	14
1.1.1.2 Cycle biologique .....	15
1.1.1.3 METHODE D'ELEVAGE DES LARVES .....	16
1.1.2 Matériel chimique .....	17

1.1.3 Les essais biologiques.....	17
1.1.3.1 Test de fumigation (inhalation).....	17
1.1.3.2 Test de contact .....	18
1.1.3.3 Test de repulsivité.....	19
<b>2. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE.....</b>	<b>21</b>
2.1 MATERIEL BIOLOGIQUE.....	21
2.1.1 Prélèvement des échantillons .....	21
2.1.2 Isolement de la bactérie .....	21
2.1.2.1 Désinfection des tumeurs .....	21
2.1.2.2 Macération .....	22
2.1.2.3 Ensemencement .....	22
2.1.2.4 La purification.....	22
2.2 ESSAI BIOLOGIQUE .....	22
2.2.1 Méthode de diffusion en milieu solide.....	22
<b>3. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE .....</b>	<b>23</b>
3.1 MATERIELS ET METHODES.....	24
3.1.1 MATERIEL BIOLOGIQUE.....	24
3.1.1.1 Isolement et identification de la souche.....	24
3.1.1.1.1 Isolement et conditions de culture .....	24
3.1.1.1.2 Identification de la souche fongique .....	24
3.1.1.1.3 Purification de l'agent pathogène .....	25
3.1.1.2 CARACTERISATION MACROSCOPIQUE .....	26
3.1.1.3 CARACTERISATION MICROSCOPIQUE.....	26
3.1.2 MATERIEL CHIMIQUE.....	27
3.1.3 METHODE D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE.....	28
3.1.3.1 Evaluation de la croissance mycélienne.....	28
3.1.3.2 Détermination des pourcentages d'inhibition .....	28
<b>4. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE .....</b>	<b>28</b>
4.1 MATERIEL ET METHODES.....	29
4.1.1 MATERIEL CHIMIQUE.....	29
4.1.2 METHODE .....	29
4.1.2.1 Principe de la méthode.....	29

4.1.2.2 Protocole .....	30
4.1.2.3 Calcul des pourcentages d'inhibition.....	30
4.1.2.4 Calcul des concentrations efficaces IC50 .....	31
<b>RESULTATS .....</b>	<b>32</b>
<b>1. EVALUATION DE L'ACTIVITE INSECTICIDE.....</b>	<b>32</b>
1.1 TEST DE FUMIGATION (INHALATION) .....	32
1.2 TEST DE CONTACT .....	34
1.3 TEST DE REPULSIVITE.....	36
<b>2. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE.....</b>	<b>37.</b>
<b>EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE .....</b>	<b>37</b>
3.1 EVALUATION DE LA CROISSANCE MYCELIENNE .....	37
3.2 POURCENTAGE D'INHIBITION .....	39
3.3 OBSERVATION MORPHOLOGIQUE.....	39
<b>4. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE .....</b>	<b>40</b>
4.1 POURCENTAGE D'INHIBITION .....	40
4.2 DETERMINATION DES CI 50 .....	42
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>43</b>
<b>CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-</b>	
<b>AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR.....</b>	<b>47</b>
<b>1. GENERALITE SUR LE BLE DUR.....</b>	<b>47</b>
<b>1.1 COMPOSITION DU BLE DUR.....</b>	<b>47</b>
<b>1.2 CYCLE PHYSIOLOGIQUE DU BLE .....</b>	<b>48</b>
1.2.1 PERIODE VEGETATIVE .....	48
1.2.2 PHASE DE GERMINATION –LEVEE .....	48
1.2.3 PHASE LEVEE- TALLAGE.....	48
1.2.4 PERIODE DE REPRODUCTION .....	49
1.2.5 PERIODE DE LA FORMATION ET DE MATURATION DU GRAIN.....	49
<b>1.3 IMPORTANCE ECONOMIQUE ET SITUATION DU BLE.....</b>	<b>49</b>
1.3.1 SITUATION DU BLE EN ALGERIE.....	49
1.3.2 SITUATION DU DANS LE MONDE.....	50

<b>1.4 STRESS OXYDATIF CHEZ LES VEGETAUX.....</b>	<b>50</b>
1.4.1 RADICAUX LIBRE .....	50
1.4.2 SOURCES DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LA CELLULE VEGETALE.....	51
1.4.3 LES CIBLES ET CONSEQUENCES DES ERO DANS LA CELLULE VEGETALE.....	54
<b>1.5 LES MECANISMES ANTIOXYDANTS .....</b>	<b>54</b>
1.5.1 LES ANTIOXYDANTS NON-ENZYMATIQUES .....	55
1.5.2 LES ANTIOXYDANT ENZYMATIQUES.....	56
<b>2. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>59</b>
<b>2.1 MATERIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>59</b>
<b>2.2 MATERIEL CHIMIQUE.....</b>	<b>60</b>
<b>2.3 METHODES.....</b>	<b>60</b>
2.3.1 CONDUITE DE L'ESSAI.....	60
2.3.1.1 Préparation des graines de blé.....	60
2.3.1.2 Culture du blé.....	60
2.3.2.1 DOSAGE ENZYMATIQUE .....	61
2.3.2.1.1 Préparation de l'extrait enzymatique .....	61
2.3.2.1.2 Détermination des mesures spectrophotométriques.....	62
2.3.2.1.3 Mesure de l'activité catalase (CAT) .....	62
2.3.2.1.4 Mesure de l'activité Glutathion S-Transférase (GST).....	62
2.3.2.2 DOSAGE NON ENZYMATIQUE .....	63
2.3.2.2.1 Mesure de la teneur en Glutathion (GSH) .....	63
<b>RESULTATS .....</b>	<b>64</b>
1. Effets sur la variation de l'activite catalase (CAT).....	64
2. Effets sur l'evolution de l'activite glutathion s-transferase (GST).....	65
3. Determination du taux de glutathion (GSH).....	66
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>67</b>
<b>CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A</b>	
<b>AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE.....</b>	<b>71</b>
<b>1. GENERALITE SUR LES VERS DE TERRE .....</b>	<b>71</b>

<b>1.1 CLASSIFICATION DES VERS DE TERRE.....</b>	<b>71</b>
<b>1.2 TAXONOMIE DES VERS DE TERRES .....</b>	<b>73</b>
1.2.1 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUES .....	73
1.2.2 ANATOMIE INTERNE.....	75
1.2.3 CYCLE DE VIE DES VERS DE TERRE.....	77
<b>1.3 UTILISATION DU VERS COMME BIOINDICATEUR.....</b>	<b>78</b>
<b>1.4 LE STRESS OXYDATIF CHEZ LE VERS DE TERRE.....</b>	<b>78</b>
<b>1.5 DEFENSE ANTIOXYDANTE.....</b>	<b>78</b>
<b>2. MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>79</b>
<b>2.1 MATERIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>79</b>
<b>2.2 MATERIEL CHIMIQUE.....</b>	<b>80</b>
<b>2.3 METHODES.....</b>	<b>80</b>
2.3.1 CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	80
2.3.2 METHODE D'ECHANTILLONNAGE.....	80
2.3.3 METHODE DE TRAITEMENT.....	81
2.3.4 ESSAIS TOXICOLOGIQUES .....	81
2.3.4.1 Suivi du pourcentage de mortalité .....	81
2.3.4.2 Suivi du taux de croissance.....	82
2.3.4.3 Dissection, prélèvement du tissu et dosages .....	82
2.3.4.3.1 Détermination du taux de glutathion (GSH).....	82
2.3.4.3.2 Mesure de l'activité glutathion-S-transférase (GST).....	83
2.3.4.3.3 Mesure de l'activité Catalase(CAT) .....	83
2.3.4.3.4 Dosage de l'acétylcholinestérase .....	84
<b>RESULTATS.....</b>	<b>85</b>
<b>1. Evaluation du poids des vers de terre.....</b>	<b>85</b>
<b>2. Evaluation du pourcentage de mortalite.....</b>	<b>86</b>
<b>3. Effets des cinq molecules <math>\alpha</math>-aminophosphonates sur l'évolution du taux de glutathion (gsh) des vers de terre.....</b>	<b>86</b>
<b>4. Effets des cinq molecules <math>\alpha</math>-aminophosphonates sur l'évolution de l'activite glutathion s-</b>	

transférase gst des vers de terre .....	87
<b>5. Effets des cinq molécules <math>\alpha</math>-aminophosphonates sur l'évolution de l'activité catalase cat des vers de terre .....</b>	<b>88</b>
<b>6. Effets des cinq molécules <math>\alpha</math>-aminophosphonates sur l'activité acétylcholinestérase chez vers de terre .....</b>	<b>89</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>95</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>97</b>

## Résumé

Grâce à une méthode assistée par ultrasons en immersion, approche de chimie verte qui consiste à concevoir des produits et procédés industriels ayant un impact minimal sur la santé des opérateurs ainsi que la qualité de l'environnement et la santé des consommateurs, une nouvelle série de dérivés  $\alpha$ -aminophosphonates (BR1, BR2, BR3, BR4 et BR5) a été caractérisé biologiquement dans un premier temps afin de déterminer leurs différentes activités à savoir : insecticide, antibactérienne, antifongique et antioxydant et d'évaluer leur toxicité dans un deuxième temps chez deux populations non-cible (*Triticum durum* Desf et *Lumbricus rubellus*).

Nos résultats mettent en évidence une activité antifongique partielle qui ne dépasse pas les pourcentages d'inhibition 50% comparé au fongicide de référence OPUS qui représente un pourcentage d'inhibition égal à 76%. Aussi, nous avons démontré une forte activité antioxydante des aminophosphonates synthétisés par le mode réactionnel amine-aldehyde-diethyl phosphite contre le radical DPPH, et une forte activité insecticide (TM>50%) par fumigation pour les molécules BR1, BR2 et BR3, une activité modérée à forte par contact et une activité faible à très faible par répulsion chez les larves d'*Ephestia* par rapport au Dursban. Concernant l'évaluation de la toxicité de ces molécules, nous n'avons constaté aucune mortalité chez les vers traités avec ces dérivés, quel que soit le traitement, et le poids a diminué de manière significative par rapport aux témoins. La surveillance des biomarqueurs de stress a révélé une inhibition de l'AchE chez *Lumbricus* qui variait entre 21 % et 40 % pour tous les traitements par rapport au pesticide commercialisé, une augmentation des niveaux de GSH et l'induction d'une activité GST non significative, indiquant la présence de stress oxydatif modéré. De même, nous avons observé chez le blé, une augmentation significative du GSH pour BR1, BR4 et BR5, une induction de l'activité GST pour tous les traitements et de l'activité catalase pour les fortes concentrations de molécules BR1, BR2 et BR3.

Grâce à l'ajout du fragment pharmacophore, les cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonate peuvent être utilisées comme pesticide vert puisqu'elles ont un impact non significatif sur les populations non-cible même les quelques perturbations observées se dissiperont avec le temps en raison de leur capacité à tolérer ces conditions stressantes.

**Mots-clés :** Chimie verte ; les  $\alpha$ -aminophosphonates; Activité biologique, *Ephestia kuehniella*, *Lumbricus rubellus*, *Triticum durum*, biomarqueurs de stress ; pesticides verts.

## ملخص

بفضل طريقة مدعومة بالموجات فوق الصوتية المغمورة، وهو نهج الكيمياء الخضراء الذي يتكون من تصميم المنتجات والعمليات الصناعية بأقل تأثير على صحة المشغلين وكذلك جودة البيئة وصحة المستهلكين، تم إنتاج سلسلة جديدة من  $\alpha$ -aminophosphonate تم تشخيص مشتقات (BR1، BR2، BR3، BR4، BR5) بيولوجيا أولا من أجل تحديد أنشطتها المختلفة، وهي: مبيدات الحشرات، المضادة للبكتيريا، المضادة للفطريات ومضادة للأكسدة ولتقييم سميتها ثانيا في مجموعتين غير مستهدفتين (*Triticum durum* Desf و لمبريكوس روبيلوس).

أظهرت نتائجنا فعالية مضادة للفطريات جزئية لا تتجاوز نسبة تثبيط 50% مقارنة بالمبيد الفطري المرجعي OPUS والذي يمثل نسبة تثبيط تساوي 76%. أيضا، أظهرنا نشاطا قويا مضادا للأكسدة للأمينوفوسفونيت تم تصنيعه بواسطة وضع تفاعل أمين-ألدهيد-ثنائي إيثيل فوسفيت ضد جذري DPPH، ونشاط مبيد حشري قوي ( $TM > 50$ ٪) عن طريق التبخير لجزئيات BR1 و BR2 و BR3، وهي مادة معتدلة. إلى نشاط عالي بالتلامس ونشاط منخفض إلى منخفض جداً بالتناثر في يرقات الإفستيا مقارنة بالدورسبان. وفيما يتعلق بتقييم سمية هذه الجزئيات، فقد لاحظنا عدم حدوث وفيات في الديدان المعالجة بهذه المشتقات مهما كانت المعاملة، كما انخفض الوزن بشكل ملحوظ ( $P < 0.01$ ) مقارنة بالشهود. كشفت مراقبة المؤشرات الحيوية للإجهاد عن تثبيط AchE في *Lambricus* والذي تراوح بين 21% و 40% لجميع المعالجات مقارنة بالمبيدات الحشرية المسوقة (66%)، وزيادة مستويات هرمون GSH واستحثاث نشاط GST غير مهم، مما يشير إلى وجود إجهاد مؤكسد معتدل. وبالمثل، لاحظنا في القمح زيادة كبيرة في هرمون GSH لـ BR1 و BR4 و BR5، وتحفيز نشاط GST لجميع المعالجات ونشاط الكاتالاز للتركيزات العالية من جزئيات BR1 و BR2 و BR3.

بفضل إضافة جزء المركب الدوائي، يمكن استخدام جزئيات ألفا-أمينوفوسفونيت الخمس كمبيد آفات أخضر نظرا لأن لها تأثيرا غير كبير على السكان غير المستهدفين، فحتى الاضطرابات القليلة التي لوحظت سوف تتبدد بمرور الوقت بسبب تأثيرها. القدرة على تحمل هذه الظروف العصبية.

**الكلمات المفتاحية:** الكيمياء الخضراء؛  $\alpha$ -أمينوفوسفونيت. النشاط البيولوجي، *Ephestia kuehniella*، *Lumbricus Rubellus*، *Triticum durum*، المؤشرات الحيوية للإجهاد؛ المبيدات الخضراء.

## Abstract

Thanks to a method assisted by immersion ultrasound, a green chemistry approach which consists of designing industrial products and processes with minimal impact on the health of operators as well as the quality of the environment and the health of consumers, a new series of  $\alpha$ -aminophosphonate derivatives (BR1, BR2, BR3, BR4 and BR5) was first characterized biologically in order to determine their different activities, namely: insecticidal, antibacterial, antifungal and antioxidant and to evaluate their toxicity secondly in two non-target populations (*Triticum durum* Desf and *Lumbricus rubellus*).

Our results highlight a partial antifungal activity which does not exceed 50% inhibition percentages compared to the reference fungicide OPUS which represents an inhibition percentage equal to 76%. Also, we demonstrated a strong antioxidant activity of aminophosphonates synthesized by the amine-aldehyde-diethyl phosphite reaction mode against the DPPH radical, and a strong insecticidal activity (TM>50%) by fumigation for the BR1, BR2 and BR3 molecules, a moderate to high activity by contact and low to very low activity by repulsion in *Ephestia* larvae compared to Dursban. Concerning the evaluation of the toxicity of these molecules, we observed no mortality in the worms treated with these derivatives, whatever the treatment, and the weight decreased significantly ( $P < 0.01$ ) compared to the witnesses. Monitoring of stress biomarkers revealed inhibition of AchE in *Lumbricus* that ranged between 21% and 40% for all treatments compared to the marketed pesticide (66%), increased GSH levels and induction of non-significant GST activity, indicating the presence of moderate oxidative stress. Likewise, we observed in wheat, a significant increase in GSH for BR1, BR4 and BR5, an induction of GST activity for all treatments and of catalase activity for high concentrations of BR1, BR2 and BR3 molecules. .

Thanks to the addition of the pharmacophore fragment, the five  $\alpha$ -aminophosphonate molecules can be used as a green pesticide since they have a non-significant impact on non-target populations even the few disturbances observed will dissipate over time in because of its ability to tolerate these stressful conditions.

**Keywords:** Green chemistry;  $\alpha$ -aminophosphonates; Biological activity, *Ephestia kuehniella*, *Lumbricus rubellus*, *Triticum durum*, stress biomarkers; green pesticides.

## **LISTE DES FIGURES**

<b>FIGURE 1:</b> STRUCTURES CHIMIQUES DU PHOSPHATE ET PHOSPHONATE .....	06
<b>FIGURE 2:</b> STRUCTURE DES BISPHOSPHONATES .....	07
<b>FIGURE 3:</b> STRUCTURES DES NUCLEOSIDES PHOSPHONATE (A) ET NUCLEOSIDES (B).....	07
<b>FIGURE 4:</b> STRUCTURE CHIMIQUE DES A-HYDROXYPHOSPHONATES .....	08
<b>FIGURE 5:</b> STRUCTURES CHIMIQUE DES ALKYLES-PHOSPHONATES ET ARYLE-PHOSPHONATES.	08
<b>FIGURE 6:</b> STRUCTURE CHIMIQUE DES POLYPHOSPHONATES .....	09
<b>FIGURE 7:</b> STRUCTURE DE A-AMINOPHOSPHONATE.....	09
<b>FIGURE 8:</b> SYNTHÈSE DES A-AMINOPHOSPHONATES DERIVES D'AMINOPHENOL .....	11
<b>FIGURE 9:</b> LARVE EPHESTIA KUEHNIELLA.....	14
<b>FIGURE 10:</b> CYCLE BIOLOGIQUE D'EPHESTIA KUEHNIELLA A 27°C.....	16
<b>FIGURE 11:</b> DISPOSITIF EXPERIMENTAL (PHOTO PERSONNELLE). .....	18
<b>FIGURE 12:</b> DISPOSITIF EXPERIMENTAL .....	23
<b>FIGURE 13:</b> METHODOLOGIE ADOPTÉE POUR L'ISOLEMENT ET LA PURIFICATION DE LA SOUCHE FONGIQUE.....	25
<b>FIGURE 14:</b> ASPECT DES COLONIES DE FUSARIUM SUR LE MILIEU DE CULTURE PDA APRES 7 JOURS D'INCUBATION A 25°C.....	26
<b>FIGURE 15:</b> ASPECT DES SPORES DE FUSARIUM SOUS MICROSCOPE OPTIQUE GR ×40. ....	26
<b>FIGURE 16:</b> DISPOSITIF EXPERIMENTAL (PHOTO PERSONNELLE) .....	27
<b>FIGURE 17:</b> REACTION DU DPPH• AVEC UN ANTIOXYDANT (MOLYNEUX P, 2004) .....	29
<b>FIGURE 18:</b> PROTOCOLE DE L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE PAR LA MÉTHODE DE LA RÉDUCTION DU RADICAL LIBRE DPPH. ....	30
<b>FIGURE 19:</b> ÉVOLUTION DU TAUX DE LA MORTALITÉ DES LARVES D'EPHESTIA KUEHNIELLA PAR FUMIGATION EN FONCTION DU TEMPS D'EXPOSITION ET DES DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DES CINQ MOLECULES D'A-AMINOPHOSPHONATE (A : BR1, B : BR2 ; C : BR3 ; D : BR4 ; E : BR5).....	32
<b>FIGURE 20:</b> VARIATION DE LA MORTALITÉ PAR CONTACT DES LARVES D'EPHESTIA KUEHNIELLA EN FONCTION DU TEMPS D'EXPOSITION ET DES DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DES CINQ MOLECULES D'A-AMINOPHOSPHONATE ( A : BR1, B : BR2 ; C : BR3 ; D : BR4 ; E : BR5) ....	35
<b>FIGURE 21:</b> SENSIBILITÉ DE LA BACTÉRIE VIS-A-VIS LES DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES.....	37

<b>FIGURE 22</b> : EVOLUTION DE LA CROISSANCE MYCELIENNE EN FONCTION DU TEMPS ET DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATE. ( A : BR1, B : BR2 ; C : BR3 ; D : BR4 ; E : BR5).....	38
<b>FIGURE 23</b> : ASPECT DES COLONIES DE FUSARIUM TEMOIN ET EN PRESENCE DE PESTICIDE DE REFERENCE RECTO ET VERSO. (PHOTO PERSONNELLE).....	40
<b>FIGURE 24</b> : EVALUATION DE L'EFFET PIEGEUR DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATE ET VITAMINE C VIS-A-VIS LE RADICAL DPPH. ( A : BR1, B : BR2 ; C : BR3 ; D : BR4 ; E : BR5). .....	41
<b>FIGURE 25</b> : SITES DE PRODUCTION INTRA-ORGANITES DES FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LA CELLULE VEGETALE (BOLWELL GP, 2002) .....	52
<b>FIGURE 26</b> : OXYDATION DE DEUX MOLECULES DE GSH CONDUISANT A L'ETABLISSEMENT D'UN PONT DISULFURE ET LA FORMATION DE GSSG. ....	55
<b>FIGURE 27</b> : PREPARATION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE.....	61
<b>FIGURE 28</b> : EVOLUTION DE L'ACTIVITE CAT CHEZ LE BLE EN FONCTION DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES .....	64
<b>FIGURE 29</b> : EVOLUTION DE L'ACTIVITE GST CHEZ LE BLE DUR EN FONCTION DES CONCENTRATIONS CROISSANTES DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES .....	65
<b>FIGURE 30</b> : VARIATION DU TAUX DE GSH CHEZ LE BLE EXPOSE AUX CONCENTRATIONS DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES .....	66
<b>FIGURE 31</b> : COUPE DU SOL PRESENTANT LES TROIS GRANDES CATEGORIES DE VERS DE TERRE EN FONCTION DES NICHES ECOLOGIQUES QU'ILS OCCUPENT (CNRS, 2005). (1) LES EPIGES ; (2) LES ANECIQUES ; (3) LES ENDOGES.....	72
<b>FIGURE 32</b> : SCHEMA CARACTERISANT LA MORPHOLOGIE DE VER DE TERRE (BACHELIER G, 1963). .....	73
<b>FIGURE 33</b> : LES DIFFERENTES TYPES DE PROSTOMIUM (BOUCHE MB, 1972).....	74
<b>FIGURE 34</b> : PYGIDIUM ET METAMERES DE VERS DE TERRE (BOUAZDIA K, 2019) .....	74
<b>FIGURE 35</b> : DISPOSITION DES SOIES CHEZ LE VER DE TERRE (BOUCHE MB, 1972) .....	75
<b>FIGURE 36</b> : ANATOMIE INTERNE D'UN VER DE TERRE (LIBERTY PRESS ET GLOTZHABE, 2005). .....	76
<b>FIGURE 37</b> : CYCLE DE VIE DU VERS DE TERRE (BOUAZDIA K, 2019) .....	77
<b>FIGURE 38</b> : VERS DE TERRE LUMBRICUS RUBELLUS, (HOFFMEISTER, 1843) PHOTO PERSONNELLE. .....	79
<b>FIGURE 39</b> : DISPOSITIF EXPERIMENTAL .....	80

<b>FIGURE 40:</b> EFFET DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR L'EVOLUTION DU POIDS DES VERS DE TERRE .....	85
<b>FIGURE 41:</b> EVOLUTION DU TAUX DE GSH CHEZ LES VERS DE TERRE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES .....	87
<b>FIGURE 42:</b> EVOLUTION DE L'ACTIVITE GST CHEZ LES VERS DE TERRE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS CROISSANTES DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES .....	87
<b>FIGURE 43:</b> EVOLUTION DE L'ACTIVITE CAT CHEZ LES VERS DE TERRE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS CROISSANTES DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES .....	88
<b>FIGURE 44:</b> EFFET DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATE SUR L'ACTIVITE ACETYLCHOLINESTERASE DES VERS DE TERRE. LES BARRES D'ERREUR SONT OBTENUES A PARTIR DE MOYENNES CORRESPONDANT A TROIS REPETITIONS $\pm$ SE. ....	89

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>TABLEAU 1 :</b> CARACTERISTIQUES DES DERIVES DES A-AMINOPHOSPHONATES SYNTHETISES .....	12
<b>TABLEAU 2:</b> POSITION SYSTEMATIQUE D'EPHESTIA KUEHNIELLA ( NCBI, 2018).....	14
<b>TABLEAU 3:</b> LA GAMME DE CONCENTRATIONS ( $\mu$ MOL/L) DES CINQ DERIVES .....	17
<b>TABLEAU 4:</b> CLASSEMENT DE LA RECURSIVITE SELON McDONALD ET AL., 1970.....	20
<b>TABLEAU 5:</b> LA CI 50% DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES .....	33
<b>TABLEAU 6:</b> LA CI 50% DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES PAR LE TEST DE CONTACT .....	34
<b>TABLEAU 7:</b> EFFETS REPULSIFS DES CINQ MOLECULES D'A-AMINOPHOSPHONATE SUR LES LARVES D'EPHESTIA KUEHNIELLA.....	36
<b>TABLEAU 8:</b> POURCENTAGE D'INHIBITION (%) DES CINQ MOLECULES.....	39
<b>TABLEAU 9 :</b> LES IC 50 (*MOL/L) DES CINQ MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATE.....	42
<b>TABLEAU 10:</b> ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE RADICALAIRE ET NON RADICALAIRE ET LEURS FORMULES CHIMIQUES (HALLIWELL, 2006) .....	51
<b>TABLEAU 11:</b> ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE RADICALAIRE ET NON RADICALAIRE (HALLIWELL, 2006) .....	52
<b>TABLEAU 12:</b> LES TYPES DE SUPEROXDE DISMUTASE (SOD).....	57
<b>TABLEAU 13:</b> CLASSIFICATION DU BLE DUR (CRONQUIST, 1981).....	59
<b>TABLEAU 14:</b> LA GAMME DE CONCENTRATIONS DES CINQ MOLECULES AMINOPHOSPHONATES EN UMOL/L .....	60
<b>TABLEAU 15:</b> CLASSIFICATION DU VER DE TERRE (HOFFMEISTER, 1843).....	79
<b>TABLEAU 16:</b> LA GAMME DE CONCENTRATIONS DES CINQ MOLECULES AMINOPHOSPHONATE EN UMOL/L .....	81
<b>TABLEAU 17 :</b> POURCENTAGE DE MORTALITE OBSERVE CHEZ LES VERS DE TERRE ADULTES TRAITES PAR LES DIFFERENTES CONCENTRATIONS DES CINQ A-AMINOPHOSPHONATES DURANT UNE PERIODE D'EXPOSITION.....	86

## LISTE DES ABREVIATIONS

- **$\Delta DO$**  : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- **Ac** : Absorbance du contrôle négatif
- **AChE** : Acétylcholine estérase
- **Act** : Activité enzymatique
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **AOX** : Alternative oxydase
- **APX** : Ascorbate peroxydase
- **Asc** : acide ascorbique
- **At** : Absorbance du test effectué
- **BHT**:2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol
- **CAT** : Catalase
- **CE50%** : concentration efficace
- **CI50%** : concentration d'inhibition 50%
- **DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- **DPPH**:2,2diphényl-1-picrylhydrazyl
- **DTNB**:5.5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acide
- **EDTA** : éthylène diamine tétra-acétique
- **ERO** : Espèces réactive de l'oxygène
- **FAO** : L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
- **Fd** : Ferodoxyne (RuBP) ribulose 1,5- biphosphate
- **GSH** : Glutathion
- **GST** : Glutathion S transférase
- **H2O2** : peroxyde d'hydrogène
- **INPV** : l'institut national de protection des végétaux
- **IRM** : l'imagerie par résonance magnétique
- **L** : Largeur de la cuve en cm.
- **M (%)** : pourcentage de morts dans la population traitée.
- **MC (%)** : pourcentage de mortalité corrigé.
- **Mg de protéine** : Teneur en protéine en mg
- **MT (%)** : pourcentage de morts dans la population témoin
- **NC** : Le nombre d'insectes présents sur la partie de disque traité uniquement avec la DMSO
- **NT** : le nombre d'insectes présents sur la partie de disque traité avec les différentes concentrations des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates
- **PDA** : potato Dextrose Agar
- **Ph** : potentiel hydrogène
- **POX** : peroxydases

- **PR** : pourcentage de répulsion
- **PRX** : peroxyredoxines
- **PSI** : photosystème I
- **PSII** : Photosystème II
- **RuBP** : carboxylation du ribulose  
1,5-biphosphate
- **SOD** : Superoxydes dismutases
- **T** : temps de lecture en min.
- **TM** : taux de mortalité
- **uM** : uMol
- **USDA** : Département américain de  
l'agriculture
- **USEPA** : United States  
Environmental Protection  
Agency
- **Ve** : Volume de l'extrait  
enzymatique en ml.
- **Vt** : Volume total du mélange en  
ml.
- **$\epsilon$**  : Coefficient d'extinction molaire
- **N.C.B.I** : Centre national  
d'information sur la biotechnologie

# ***Introduction Générale***

## ***INTRODUCTION GENERALE***

Depuis les années 40, les pesticides ou les produits phytosanitaires sont appliqués de manière préventive afin de repousser ou d'atténuer les effets des organismes nuisibles. Ils sont devenus omniprésents dans la terre, leur développement a contribué à améliorer notre qualité de vie (Messiad *et al.*, 2015). Vingt ans plus tard, l'utilisation de ces produits phytosanitaires à travers le monde a augmenté de façon alarmante (Haarstad *et al.*, 2012) vu les conséquences de la croissance démographique de la population mondiale qui est passée de 2.6 milliards en 1950 à environ 7.8 en 2020 et continuera à atteindre environ les 11.2 milliards en 2100 (Mesterházy *et al.*, 2020) particulier en matière des besoins alimentaires qui font appel à l'augmentation et à l'extension des superficies cultivables. Selon l'organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la consommation mondiale annuelle des pesticides s'est élevée à 2.7 millions de tonnes de principes actifs en 2020, dont 1.4 million de tonnes pour les herbicides, 0.6 million pour les fongicides et bactéricides et 0.5 million pour les insecticides. (FAO, 2020).

L'utilisation des produits phytosanitaires en Algérie ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines avec des quantités accrues en Algérie. Cette dernière est classée parmi les pays qui utilisent des grandes quantités de ces produits phytosanitaires. L'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture a estimé la consommation des produits phytosanitaires en Kilogramme par hectare en Algérie à près de 9.64 en 2002 et de 22.32 en 2016 (Cherif, 2020). Par ailleurs, les changements dans les pratiques agricoles peuvent provoquer des effets néfastes sur les composantes de l'environnement non ciblé ainsi que sur la santé des individus (Kheddam, 2012). Lorsque ces produits pesticides se retrouvent dans les milieux naturels, ils peuvent avoir des différents impacts sur la biodiversité (Tellier *et al.*, 2006) Ils peuvent être ensuite intégrés aux réseaux trophiques (Amara, 2012) vu que seulement 0.3% de ces produits atteignent leur cible, le reste se retrouve dans l'air, la terre et les milieux aquatiques (Magdelaine, 2013).

En effet, des mixtures d'insecticides, herbicides et fongicides contaminaient 90% des sols et 54% des vers de terre à des niveaux qui pourraient altérer et mettre en danger ces organismes bénéfiques et avantageux (Pelosi *et al.*, 2021). De toute évidence, les différentes substances qui composent les pesticides ciblent directement les agresseurs des plantes comme les champignons, les mauvaises herbes et les insectes.

## ***INTRODUCTION GENERALE***

Le blé dur fait partie de la famille des céréales, il occupe la première place dans la production mondiale et la deuxième dans l'alimentation quotidienne du bétail et la consommation humaine (Rastoin & Benabderrazik, 2014). Il devient le patrimoine culturel immatériel de l'humanité et cultivé dans près de 17 millions d'hectare dans le monde (Abecassis *et al.*, 2017).

En Algérie, la culture du blé dur constitue une culture stratégique dans le plan de développement économique (Bouhadi *et al.*, 2020) et elle est considérée comme une activité prédominante dans l'agriculture. Néanmoins, la FAO estime un recul de la production du blé local avec une diminution qui se varie de 5.1 à 3.75 millions de tonnes. D'après les prévisions du département américain de l'agriculture (USDA), l'Algérie peut satisfaire qu'entre 34% et 36% de ses besoins en blé. (FAO, 2021).

L'usage permanent de ces produits phytosanitaires cause des effets néfastes sur la plante, capable de modifier leur métabolisme et leur morphologie, ce qui altère leur croissance et leur développement en entraînant une surproduction des ERO générateurs du stress oxydatif et par conséquent une diminution de la productivité et des pertes quantitative et qualitatives des rendements. (Appelet Hirt, 2004).

En outre, La faune du sol (microfaune, macrofaune et mégafaune) qui joue un rôle primordial pour le maintien de la qualité du sol par l'amélioration de la structure du sol (Wall, 2004 ; Millenium ecosystem assessment, 2005), en participant à la décomposition de la matière organique et à la biodisponibilité des nutriments pour les microorganismes du sol et pour les plantes. A savoir les vers de terre qui sont fréquemment disponibles dans une large gamme de sols et peut déposer 60% à 80% de la biomasse totale du sol (Sizmur et Hodson, 2009). Ils sont considérées comme des bons indicateurs de la qualité de sol, qui présentent un intérêt particulier vu qu'ils sont exposés aux contaminants par différentes voies (phase aqueuse, phase vapeur et phase solide). (Lokke et van Gestel, 1998). Ainsi leur creusement améliore la pénétration des racines des plantes dans le sol et l'infiltration de l'eau (Gaupp-Berghausen *et al.*, 2015). Ces espèces sont atteintes par les pesticides principalement via l'eau contaminée qui imbibe lesol. Une forte pluie juste après un traitement phytosanitaire est dangereuse pour eux (Aubertot *et al.*, 2005).

## ***INTRODUCTION GENERALE***

En effet, l'exposition de ces espèces aux différents pesticides peut avoir des conséquences diverses sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes terrestres. Ces pesticides peuvent entraîner la mort directe des organismes du sol s'ils sont exposés à des doses élevées ce qui permet de réduire la diversité et l'abondance de la faune du sol en perturbant ainsi l'équilibre écologique de l'écosystème. En revanche, même à des doses non létales, les pesticides peuvent avoir des effets sublétaux sur les vers de terre, affectant son comportement, sa reproduction, sa croissance et son développement. Ces effets sublétaux peuvent affaiblir les populations d'organismes du sol et compromettre leur capacité à remplir leurs fonctions écologiques. (Magdelaine, 2013).

Suite aux plusieurs études sur l'impact des pesticides sur l'environnement, un nouveau concept du développement durable a été apparu comme l'un des développements qui répond aux besoins du présent sans compromettre la capacité des générations futures à répondre aux leurs. Ce concept permet de satisfaire les besoins d'une génération actuelle et en parallèle préserver la planète pour les futures générations (CMED, 1987).

Dans les années 90, une nouvelle discipline la chimie verte (Green chemistry) également connue sous le nom de la chimie durable inspirée du concept de développement durable a été énoncée, afin de concevoir des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses et qui sont respectueux de l'environnement. Elle joue un rôle important dans la recherche des solutions durables pour divers secteurs, y compris l'agriculture, en favorisant des alternatives plus respectueuses de l'environnement aux pesticides traditionnels. (Anastas *et al.*, 2000).

Parmi ces alternatives, Les composés organophosphorés de type phosphonates qui sont des analogues des phosphates naturels qui recouvrent un large domaine d'application en raison de leurs propriétés chimiques et biologiques différentes (Salasi *et al.*, 2007), ainsi que leurs structures flexibles et riches en hétéroatomes. Dans ces composés la liaison P-O est remplacée par une liaison P-C, cette substitution permet d'accéder à des composés capables de résister à l'hydrolyse enzymatique (Benbouguerra, 2017).

## ***INTRODUCTION GENERALE***

Dans l'environnement, les phosphonates possèdent une propriété de chélation qui leur donne une affinité forte pour la portion minérale des sols. Le mouvement des phosphonates est très faible dans les sols ce que montre que le risque de contamination des eaux souterraines est réduit. Selon l'agence de protection de l'environnement des états-Unis USEPA ces substances sont classées parmi les substances modérément à légèrement mobiles (Benbouguerra, 2017).

Ces dernières années, une attention particulière a été portée à la synthèse des  $\alpha$ -aminophosphonates qui constituent une famille spécifique des phosphonates, en raison de leur activité biologique. Elles sont connues comme analogues aux acides aminés (Salasi *et al.*, 2007), c'est pourquoi les  $\alpha$ -aminophosphonates se trouvent en compétition avec leurs analogues d'acides aminés pour accéder aux centres actifs d'enzymes ou d'autres cibles cellulaires. Certains d'entre eux ont été utilisés comme agents antibactériens (Huang et Chen, 2000), antifongiques (Hellal *et al.*, 2015), herbicides (Allen *et al.*, 1989), antioxydant (Bahadi *et al.*, 2022).

Le présent travail a été effectué dans le but de caractériser biologiquement une série de dérivés de la famille des  $\alpha$ -aminophosphonates, nouvellement synthétisées par une méthode verte, comme solution alternative à l'utilisation des aminophosphonates, moins stables chimiquement et métaboliquement que leurs dérivés et qui peuvent perturber le métabolisme des espèces non cibles. Pour cela, nous avons déterminé leur activité antifongique, antibactérienne, insecticide ainsi que leur pouvoir antioxydant dans un premier temps et nous avons testé leurs effets sur des modèles non cible chez des modèles biologiques (blé et le ver de terre), dans un deuxième temps, par le suivi de certains biomarqueurs de stress (GSH, AchE, GST, ...).

Ce tapuscrit est structuré en quatre chapitres distincts, une discussion et une conclusion générale. Dans le premier chapitre, des généralités sur les phosphonates et les  $\alpha$ -aminophosphonates seront présentés. D'abord, nous nous intéresserons à présenter les travaux de la littérature concernant les propriétés des phosphonates et leur dérivés, ainsi que les méthodes de synthèse des phosphonates. Ensuite la méthode de synthèse et les structures chimiques des cinq  $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés utilisés dans notre étude qui constituent une famille spécifiques des phosphonates.

## ***INTRODUCTION GENERALE***

Quant au deuxième chapitre, il est consacré à la caractérisation biologique des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates, par l'évaluation de leurs potentiels à agir en tant qu'agents insecticides (par contact, fumigation et répulsive), antibactériens, antifongiques et antioxydants dans le but de les utiliser comme des alternatives aux pesticides existants pour lutter contre les nuisibles, à combattre les infections fongiques, à traiter les infections bactériennes et prévenir les dommages oxydatives.

Dans le chapitre III, qui a été consacré à l'évaluation de l'effet de ces molécules sur une population non cible « le blé dur », nous avons commencé par un rappel des travaux antérieurs déjà réalisés sur le stress oxydatif chez les végétaux et particulièrement chez le blé dur, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les mécanismes de défense chez les plantes dont le système antioxyant enzymatique et non-enzymatique. Ensuite nous avons déterminé l'effet de ces molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sur le blé dur par la mesure de certains biomarqueurs de stress la Catalase (CAT), le Glutathion S transférase (GST) et le Glutathion (GSH).

En fin un dernier chapitre (chapitre IV), consacré à l'évaluation de l'effet de cette série de dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonate sur un modèle non-cible le ver de terre. Nous avons commencé par des généralités sur les vers de terre, leurs classifications et composition, leurs rôles comme des bio-indicateurs, le stress oxydatif chez le ver de terre et leurs systèmes de défense, ensuite nous avons évalué leur effet sur le ver de terre par la détermination du pourcentage de mortalité et le taux de croissance chez les vers traités et témoin. Ainsi par la mesure de certains biomarqueurs de stress oxydatif tel que le Glutathion (GSH), le Glutathion S transférase (GST) et la Catalase (CAT).

Au terme de ces chapitres nous avons discuté en générale nos résultats en faisant ressortir les points forts de l'étude qui nous ont permis de résumer ces résultats dans une conclusion générale.

***CHAPITRE I :***  
***Synthèse des molécules***  
 ***$\alpha$ -aminophosphonates***

# CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES

La synthèse des composés chimiques et la conception de processus industriels ayant un impact minimal sur la santé des opérateurs, de l'environnement et des consommateurs est une nouvelle approche de chimie verte qui a été développée cette dernière décennie tout en maintenant leur utilité dans divers domaines d'applications.

## 1. Les phosphonates

Les phosphonates ou acides phosphoniques sont des composés organiques contenant un ou plusieurs groupement C-PO(OH)<sub>2</sub> ou C-PO(OR)<sub>2</sub> avec (R = alkyl ou Aryl). Ces acides sont des analogues des phosphates naturels qui appartiennent à la famille des composés organophosphorés les plus importants dans le domaine industriel.

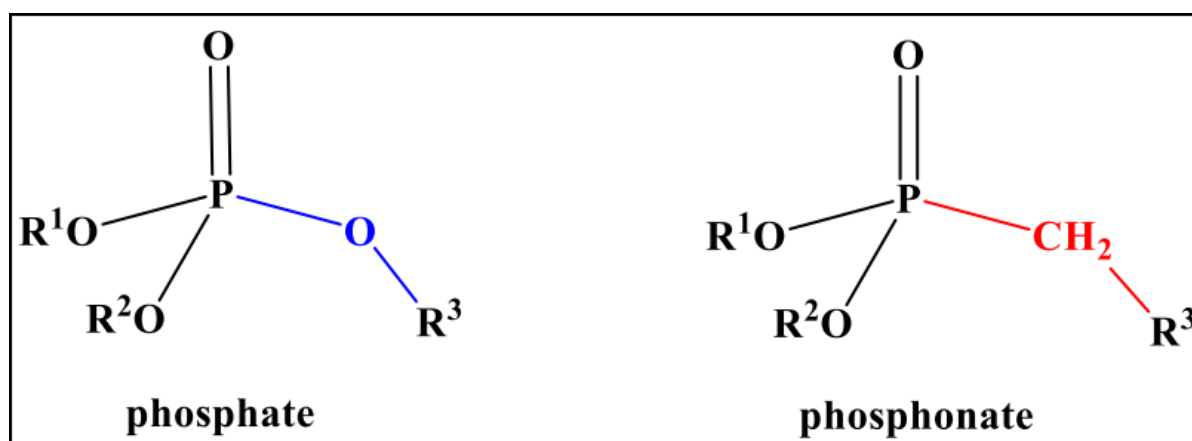


Figure 1: Structures chimiques du Phosphate et Phosphonate.

## 2. Propriétés des phosphonates

Les phosphonates possèdent des propriétés qui leur confèrent une importance marquante dans tous les domaines scientifiques. Ils possèdent une grande solubilité dans l'eau, comme ils sont peu solubles dans les solvants organiques, ainsi ils possèdent une grande stabilité dans les conditions chimiques rigoureuses. (Wang *et al.*, 2020)

Ces composés sont peu toxiques pour l'environnement et biodégradable dans le sol en libérant des phosphates (Rott *et al.*, 2018).

# CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES

## 3. Dérivés des phosphonates

Elles sont subdivisées en six catégories principales :

### 3.1 Les bisphosphonates

Ils sont des composés organiques, caractérisés par un squelette structural P-C-P. Ces dérivés organophosphorés sont des analogues structuraux des pyrophosphates inorganiques dont leur structure générale est présentée comme suite :

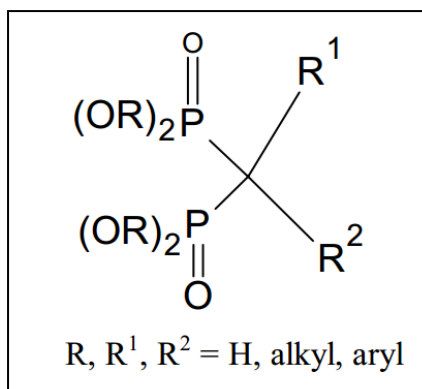


Figure 2: Structure chimique des Bisphosphonates.

### 3.2 Les nucléosides phosphonates

Sont des analogues structuraux des nucléosides naturels et des acides nucléiques.

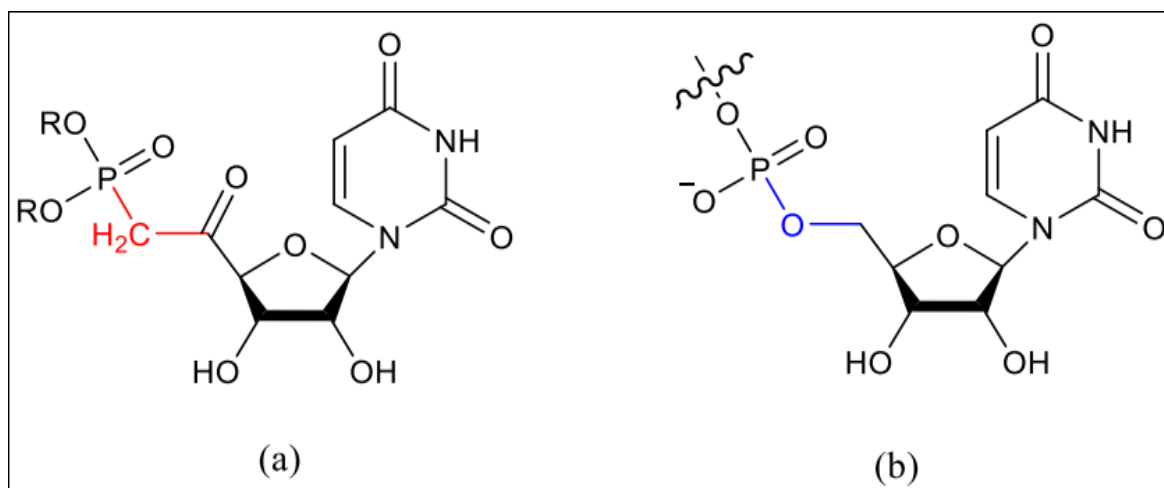


Figure 3: Structures chimiques des nucléosides phosphonates (a) et nucléosides (b).

# CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES

## 3.3 Les $\alpha$ -hydroxyphosphonates

- sont des phosphonates où l'atome  $\alpha$ -carbone lié au phosphore porte un groupement hydroxyle (-OH).

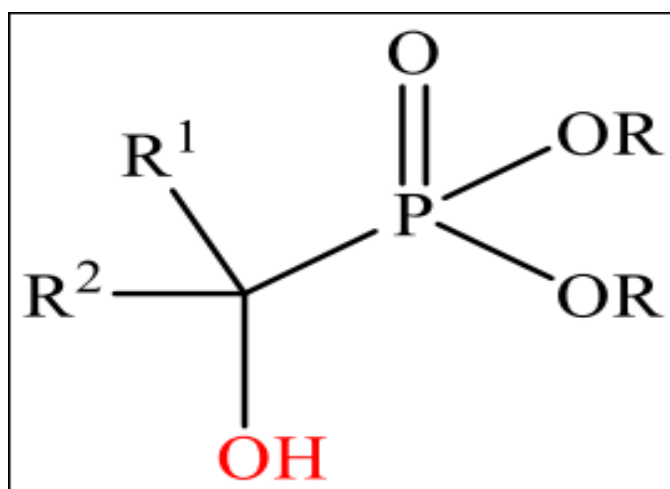


Figure 4: Structure chimique des  $\alpha$ -hydroxyphosphonates.

## 3.4 Les alkyl-phosphonates et les aryl-phosphonates

Ils sont des dérivés organophosphorés où le groupement phosphonates est lié à un radical aryle ou alkyle.

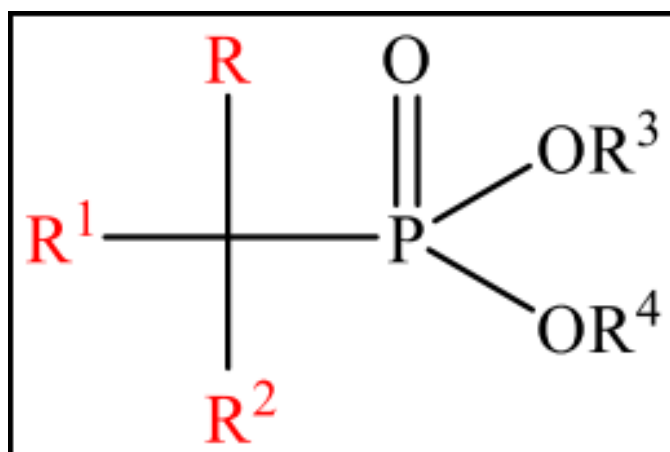


Figure 5: Structures des composés alkyl-phosphonates et aryl-phosphonates.

# CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES

## 3.5 Polyphosphonates

Ils sont des macromolécules organophosphorées, caractérisée par la répétition d'un ou plusieurs types de motifs monomère qui portent un ou plusieurs groupements phosphoniques.

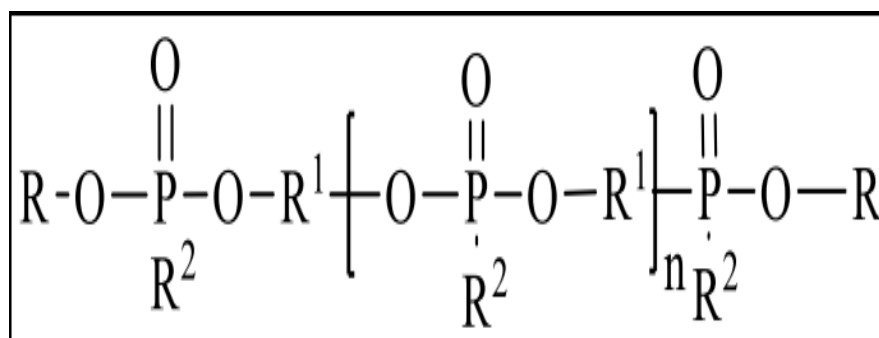


Figure 6: Structure chimique des composés polyphosphonates.

## 3.6 Les $\alpha$ -aminophosphonates

Ils constituent une famille spécifique des phosphonates largement diffusés où l'atome  $\alpha$  – carbone lié au phosphore est substitué par le groupement amine.

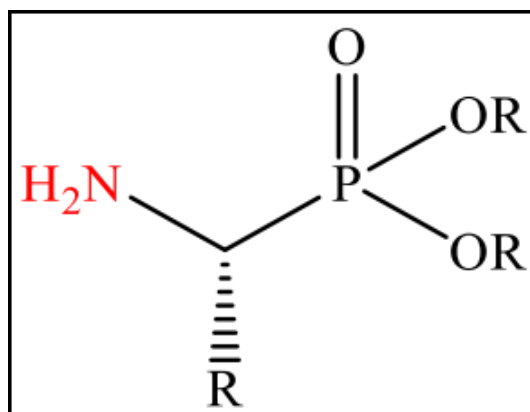


Figure 7: Structure d'une molécule  $\alpha$ -aminophosphonate.

Les  $\alpha$ -aminophosphonates présentent un large éventail d'applications potentielles dans des domaines différents tels que la médecine en raison de leur potentiel thérapeutique dans le traitement de diverses maladies, certains d'entre eux peuvent être utilisés dans le développement des médicaments pour traiter des maladies telles que le VIH et le cancer (De Clercq *et al.*, 2007, Kuliszewska *et al.*, 2008). En chimie et en biologie en raison de leur large

# **CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

spectre d'activité biologique, antibactérien, antiviral, (Huang et Chen, 2000), herbicide ( Allen *et al.*, 1989), antifongique ( Hellal *et al.*, 2015) et antioxydant ( Bahadi *et al.*, 2022), l'imagerie médicale telle que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et dans l'industrie comme agent anticalcaire qui empêchent la précipitation des sels de calcium et empêchent l'accumulation de dépôt calcaire.

Ces composés peuvent être synthétisés en utilisant les réactions Kabachnik-Fields ou les réaction d'Arbuzov ou d'Abramov et Pudovik qui consistent d'additionner un trialkylephosphite ou un dialkylephosphite sur une imine ( $-C=N$ ).

## **4. Procédés de synthèse des phosphonates**

### **4.1 Procédé de Michaelis-Arbuzov**

Elle est la plus utilisée dans la préparation des esters de phosphonates découverte en 1898 et développée par Arbuzov en 1906, il s'agit d'une réaction chimique d'un trialkyl phosphite avec un halogénure d'alkyle pour former un phosphonate. (Michaelis *et al.*, 1898 ; Arbuzov *et al.*, 1906)

### **4.2 Procédé d'Abramov et Pudovik**

Ces deux réactions chimiques sont destinées à la synthèse des  $\alpha$ -hydroxyphosphonates en réagissant un trialkylephosphite ou un dialkylephosphite avec un dérivé carbonylé. (Abramov *et al.*, 1952 ; Pudovik *et al.*, 1952)

### **4.3 Procédé de Kabachnik-Fields**

Cette réaction chimique multicomposants est la plus utilisée pour synthétiser les  $\alpha$ -aminophosphonates (Kabachnik *et al.*, 1952 ; Fields *et al.*, 1952).

## **5.1 Synthèse des $\alpha$ -aminophosphonates dérivés d'aminophénol**

Dans le but de préparer des nouvelles molécules bioactives qui correspondent avec les conditions de la chimie verte, une nouvelle stratégie pour la synthèse de nouveaux dérivés d'aminophosphonate **3a-3e**, a été développée par l'équipe de synthèse de biomolécules, laboratoire de chimie organique appliquée (Bahadi *et al.*, 2022)

La synthèse des molécules  $\alpha$ -aminophosphonates peut être effectuée par la méthode de **Kabachnik-Fields** suite à une réaction « one-pot ». Cette dernière réaction consiste à faire réagir un aminophénol **1**, une variété d'aldéhyde **2** et la triéthyl phosphite, les produits attendus

# CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES

sont obtenus en absence de tout catalyseur ou solvant dans un bain à ultrasons et à une température ambiante avec de bons rendements qui se varient entre 82 et 93% (figure 8, Tableau 1).

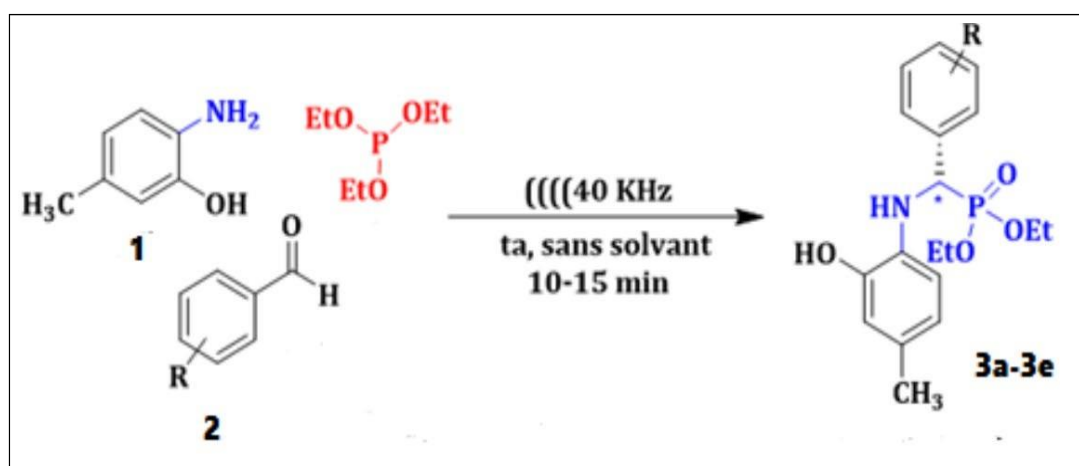
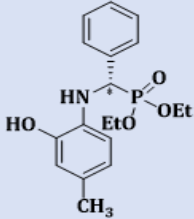
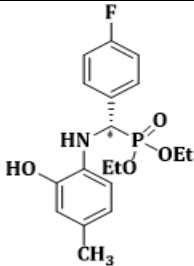
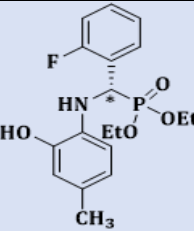
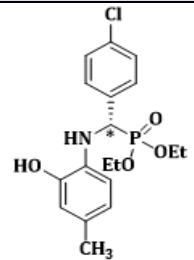
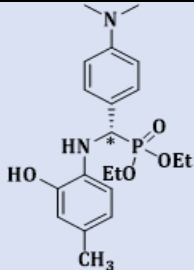


Figure 8: Synthèse des  $\alpha$ -aminophosphonates dérivés d'aminophénol.

**CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES MOLECULES  
 $\alpha$  -AMINOPHOSPHONATES**

**Tableau 1 : Caractéristiques des dérivés des  $\alpha$ -aminophosphonates synthétisés.**

Entré	Composé	Temps (min)	Rdt (%)	T <sub>f</sub> (°C)
3a		10	88	111-123
3b		10	82	140-149
3c		10	83	121-129
3d		15	90	131-138
3e		15	93	142-148

***CHAPITRE II :***  
***Caractérisations biologiques***  
***des molécules***  
 ***$\alpha$ -aminophosphonates***

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **1. Evaluation de l'activité insecticide**

A l'heure actuelle, les insectes ravageurs représentent un véritable problème en agriculture. Ils peuvent nuire la santé humaine et animale vu que ces espèces peuvent transmettre des agents pathogènes (Govindarajan et Rajeswary, 2015) ce qui les a classés dans la catégorie des risques sanitaires (Dureau, 2020).

Selon la FAO, la dégradation de la quantité et la qualité des produits stockés par les insectes ravageurs dans le monde représente 29.6% de la production mondiale (FAO, 2022).

La pyrale de la farine l'*Ephestia kuehniella* Zeller est l'un des ravageurs les plus important ( Kurtulus *et al.*, 2020) qui se trouvent dans la farine , les moulins et dans d'autres céréales stockés (riz ; maïs ; blé) ( pakyari *al.*, 2016, Bendjedid *et al.*, 2021).

Cette mite dégrade la qualité et détruit une quantité importante des produits lorsqu'elle s'en nourrit et cause des dommages direct par la production des produits chimiques par les glandes mandibulaire (Kurtulus *et al.*, 2020). Elle contamine les produits stockés avec ses excréments dont les fils en soie (Soltani *et al.*, 2012). Ainsi cette espèce forme des feutrages qui impactent le fonctionnement régulier des appareils et des arrêts forcés du moteurs au niveau des minoteries (Pandir *et al.*, 2013).

Depuis des années, des pesticides de type insecticide sont utilisés pour lutter contre les infestations des ravageurs dans les installations de stockage de produits afin de prévenir les pertes dans les stocks (Giunti *et al.*, 2019). En effet l'utilisation régulière de ces pesticides conduit à l'apparition de la résistance au sein des populations des ravageurs. (Drabo *et al.*, 2019 El Abdali *et al.*, 2022). C'est dans ce contexte, que nous sommes intéressée à évaluer l'activité insecticide des cinq dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés qui ont un moindre impact environnemental, en utilisant trois test : par contact, par fumigation (inhalation) et de repulsivité sur des larves d'*Ephestia Kuehniella*.

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **1.1 Matériel et Méthodes**

#### **1.1.1 Matériel Biologique**

##### **1.1.1.1 Présentation de l'insecte**

*Ephestia kuehniella* (Zeller) est un insecte holométabole lépidoptère de la famille des pyralidés, connu sous le nom de pyrale de la farine (Doumandji –Mitiche, 1977), découverte par Zeller en 1879 à l'Auckland, nouvelle Zélande. Cette mite des denrées stockées s'attaquent essentiellement à la farine, aux grains de céréales, la semoule, les pâtes alimentaires et aux fruits secs tel que les raisins, figues, abricots... (pakyari *et al.*, 2016, Bendjedid *et al.*, 2021).

**Tableau 2: Position systématique d'*Ephestia kuehniella* ( NCBI, 2018)**

**(Zeller 1879)**

<b>Règne</b>	<b>Animalia</b>
<b>Sous- règne</b>	Metazoa
<b>Embranchement</b>	Arthropoda
<b>Classe</b>	Insecta
<b>Sous classe</b>	Pterygota
<b>Super ordre</b>	Endopterygota
<b>Ordre</b>	Lepidoptera
<b>Famille</b>	Pyralidae
<b>Genre</b>	Ephestia
<b>Espèce</b>	<i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller, 1879)



**Figure 9: Larve *Ephestia kuehniella*.**

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **1.1.1.2 Cycle biologique**

Le cycle du développement d'*Ephestia kuehniella* passe par quatre phases dans un ordre bien déterminé : œuf, larve, chrysalide et adulte (Hami M, 2004). Selon Ndiay SB, 1999 la durée totale du cycle de vie de cet insecte varie de 30 à 50 jours et le passage d'un cycle à un autre constitue la métamorphose.

L'accouplement a lieu immédiatement après le début de la vie de l'adulte (Naumann, 1991).

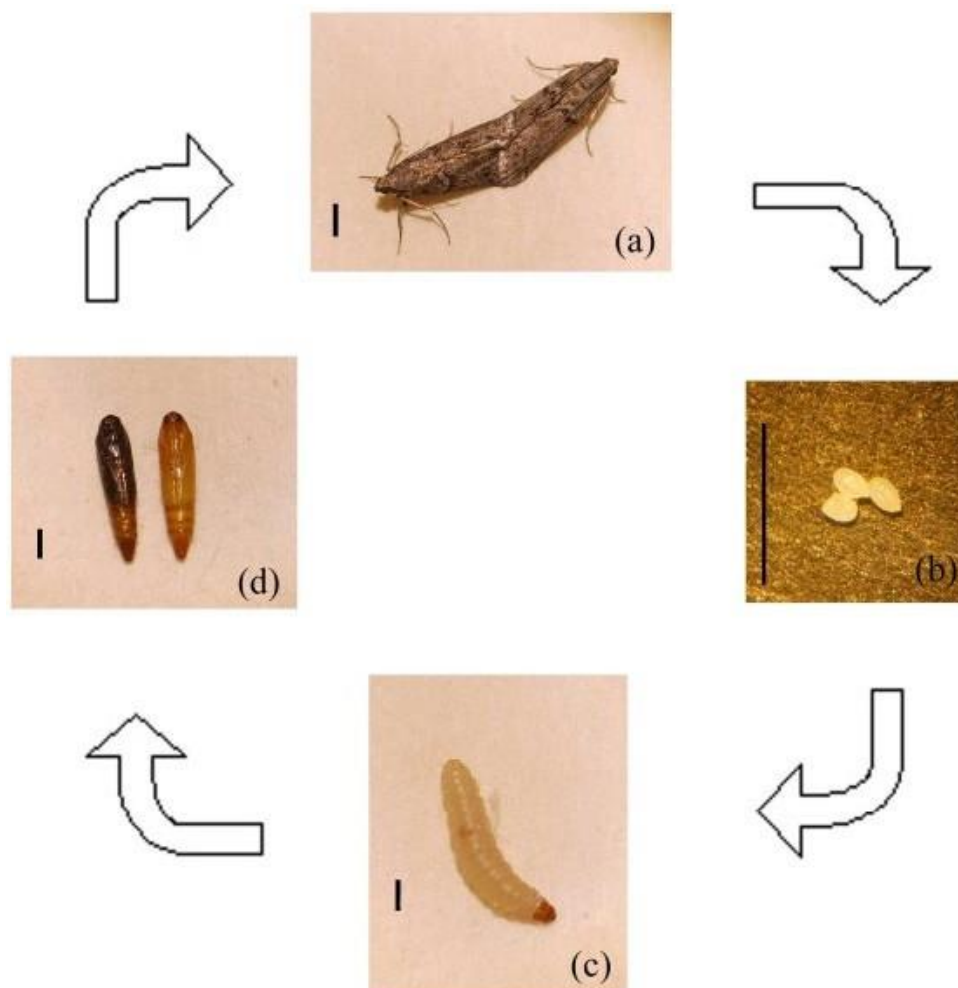
**Stade 1 : l'œuf :** Juste après l'accouplement, sur une période de 3 jours la femelle pond environ 100 à 200 œufs de couleurs blanchâtres de forme ovoïde. L'œuf mesure 500-500  $\mu\text{m}$  de long et 290-325  $\mu\text{m}$  de largeur. (Moreno *et al.*, 1994).

**Stade 2 : Larve :** après 4 à 5 jours à 37°C de température et 70% d'humidité relative les œufs formant un amas au fond et sur les parois des sacs de farine éclosent en donnant naissance à des larves (Brindley, 1930). Elle est blanchâtre ou rosâtre, elle atteint 10 à 13 mm au stade final après six mues. La larve male comprend deux taches noir sur la face dorsale de l'abdomen correspondant aux testicules qui font la différence de celle de la femelle par la présence de deux taches noires (Taibi, 2007).

**Stade 3 : la chrysalide ou nymphe :** les larves s'éloignent de leur source de nourriture en tissant une enveloppe de soie (nymphe) contenant des substances nutritives dans laquelle elles évolueront pendant 8 à 12 jours donnant un stade immobile, le dernier jour du développement, le nymphe devient sombre (nymphe mature) et l'émergence se produira dans les 24 heures. La taille moyenne des nymphes est de 9 mm de long et 2 mm de large. (Khelil, 1995).

**Stade 4 :L'adulte :** l'insecte adulte comprend une petite tête globuleuse qui mesure de 20 à 25 mm d'envergure, l'adulte est formé par deux paires d'ailes : deux ailes antérieures grisâtres avec des points noirs et deux ailes postérieures blanchâtres finement frangées. Sa longévité est de 14 jours, les males meurent quelques jours après l'accouplement, les femelles après la ponte (Ndiay, 1999).

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**



**Figure 10: Cycle biologique d'*Ephestia kuehniella* à 27°C.**

### **1.1.1.3 Méthode d'élevage des larves**

Les insectes utilisés dans notre expérimentation proviennent des Moulins Seybouse d'Annaba. L'élevage est conduit au niveau du laboratoire de physiologie animale de l'université Badji Mokhtar Annaba sous des conditions optimales de développement, caractérisées par une température de 27 °C, une humidité relative voisine à 70% selon les indications de Payne NM, 1966.

Cet élevage s'est fait dans des boîtes en plastique contenant de la farine de blé infestée par les larves d'*Ephestia kuehniella* et du papier plissé afin de permettre aux larves de se transformer en nymphe. (Payne, 1966).

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **1.1.2 Matériel chimique**

Les cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates (BR1, BR2, BR3, BR4 et BR5) sont dissouts séparément dans 100 ml d'eau distillée contenant 10% de DMSO (90ml/10ml).

Le DMSO est choisie pour sa rapidité d'évaporation avec toute absence d'effet résiduel.

Les cinq solutions mères sont ensuite diluées en plusieurs aliquotes de 20 ml avec les concentrations croissantes sélectionnées après plusieurs tests au laboratoire. (Tableau ci-dessous).

**Tableau 3: La gamme de concentrations ( $\mu$ mole/L) des cinq dérivés  $\alpha$ -aminophosphonates**

<b>Concentrations Molécules</b>	<b>C1 (<math>\mu</math>mol)</b>	<b>C2 (<math>\mu</math>mol)</b>	<b>C3 (<math>\mu</math>mol)</b>	<b>C4 (<math>\mu</math>mol)</b>	<b>C5 (<math>\mu</math>mol)</b>	<b>C6 (<math>\mu</math>mol)</b>
<b>S1 BR1</b>	240	280	320	360	400	440
<b>S2 BR2</b>	240	280	320	360	400	440
<b>S3 BR3</b>	300	340	380	420	460	500
<b>S4 BR4</b>	300	340	380	420	460	500
<b>S5 BR5</b>	300	340	380	420	460	500.

### **1.1.3 Les essais biologiques**

L'activité insecticide des molécules a été déterminée à l'aide de trois test : par fumigation (inhalation), contact et un test de repulsivité, avec les résultats comparés à un contrôle positif DMSO (10%) et un pesticide de référence Chlorpyriphos éthyl, commercialisé sous le nom de Dursban

#### **1.1.3.1 Test de fumigation (inhalation)**

Cette méthode consiste à imprégner des disques de papier filtre de 2 cm de diamètre avec différents concentrations des cinq molécules testées, du DMSO et de l'insecticide de référence. A raison de trois répétitions.

Chaque papier filtre a été attaché aux couvercles des crachoirs. Les bouteilles sont fermées afin de saturer l'atmosphère.

Dix larves de l'espèce E. Kuehniella ont été ajoutées à chaque crachoir, des moustiquaires ont été mises en place sur l'ouverture pour éviter tout contact de l'insecte avec papier traité.

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

En l'absence de mouvement des pattes, les insectes ont été considérés comme morts.

Le comptage des insectes morts est effectué après 3h, 6h et 24h



**Figure 11: Dispositif expérimental (photo personnelle).**

### **1.1.3.2 Test de contact**

L'évaluation de la toxicité par contact des molécules  $\alpha$ -aminophosphonates ainsi que témoin positif DMSO et l'insecticide de référence est déterminée par application directe sur des larves d'*Ephestia kuehniella*.

Dix larves ont été ajoutées dans chaque boîte de pétrie accompagnée de leurs milieux nutritifs. Une quantité de 1ul de chaque concentration a été déposée sur la face dorsale des larves d'*Ephestia kuehniella*. Les essais ont été répétés trois fois pour chaque concentration.

Des moustiquaires ont été mises en place sur l'ouverture pour éviter la sortie des insectes.

En l'absence de mouvements des pattes, les insectes sont considérés comme morts. Trois répétitions sont effectuées pour toutes les concentrations.

Un comptage des insectes morts a été réalisé chaque 24h pendant 96h afin de déterminer le taux de mortalité.

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

- **Correction de la mortalité par la méthode d'Abbott pour les tests de fumigation et contact**

Selon la formule d'Abbott, 1925 (Ndomo *et al.*, 2009), qui donne les valeurs corrigées de la mortalité en pourcentage en fonction des mortalités des échantillons traités et celle du témoin. Cette correction permet d'exclure le biais dû à la mort naturelle observée dans nos conditions expérimentales.

$$\text{MC (\%)} = \frac{(M - \text{MT})}{(100 - \text{MT})} \times 100$$

MC (%) : pourcentage de mortalité corrigé.

M (%) : pourcentage de morts dans la population traitée.

MT (%) : pourcentage de morts dans la population témoin.

- **Détermination de DL50 pour les tests fumigation (inhalation) et contact**

Les résultats des tests ont été réalisés par la fonction Probit qui est l'inverse de la fonction de répartition associé à la distribution Normal selon la méthode de (Finney, 1971). Elle est déduite par le tracé de la droite de Probit en fonction de la dose ; après la transformation des pourcentages de mortalité corrigées en Probit.

### **1.1.3.3 Test de repulsivité**

McDonald *et al.*, 1970 a décrit l'effet répulsif de cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonate vis-à-vis des larves d'*Ephestia kuhniella* en utilisant la méthode de la zone préférentielle sur papier filtre

Des disques de papier filtre (8 cm) utilisés à cet effet ont été coupés en deux moitiés l'une imbibés des différentes concentrations des molécules aminophosphonates et l'autre imbibé de DMSO. Après quinze minutes, temps nécessaire pour l'évaporation complète du solvant DMSO, les deux moitiés du papier filtre ont été juxtaposées et collés avec un ruban adhésif inodore et placées dans une boîte de Pétri (9 cm).

Dix larves d'*Ephestia* ont été libérées au centre du papier filtre. Des moustiquaires ont été mises en place sur l'ouverture pour éviter la sortie des insectes

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

Ensuite les larves ont été conservée dans l'étuve à une Température 30°C. Trois répétitions ont été établies pour chaque Concentration d'  $\alpha$  -aminophosphonates, pesticide de référence et DMSO (Témoin positif).

Le nombre de larves présentes dans les moitiés traitées et non traitées du papier filtre a été enregistré après deux heures 02H de l'expérience. Le pourcentage de répulsion (PR) de chaque concentration d'  $\alpha$ -aminophosphonates a été calculé à l'aide de la formule de McDonald *et al.*, 1970 :

$$PR = \frac{(NC - NT)}{(NC + NT)} \times 100 \%$$

PR : pourcentage de répulsion

NC : Le nombre d'insectes présents sur la partie de disque traité uniquement avec la DMSO

NT : le nombre d'insectes présents sur la partie de disque traité avec les différentes concentrations des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates.

Le pourcentage de répulsion moyen pour chaque molécule d'  $\alpha$  -aminophosphonates est calculé et attribué à l'une des différentes classes répulsive (Mc-Donald *et al.*, 1970) qui sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 4: Classement de la récurtivité selon McDonald et al., 1970.**

<b>Classe</b>	<b>Intervalle de répulsion</b>	<b>Propriété de la substance traitée</b>
<b>Classe 0</b>	<b>PR <math>\leq</math> 0,1 %</b>	Non répulsive
<b>Classe I</b>	<b>0,1 &lt; PR <math>\leq</math> 20 %</b>	Très faiblement répulsive
<b>Classe II</b>	<b>20 &lt; PR <math>\leq</math> 40 %</b>	Faiblement répulsive
<b>Classe III</b>	<b>40 &lt; PR <math>\leq</math> 60 %</b>	Modérément répulsive
<b>Classe IV</b>	<b>60 &lt; PR <math>\leq</math> 80 %</b>	répulsive
<b>Classe V</b>	<b>80 &lt; PR <math>\leq</math> 100 %</b>	Très répulsive

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **2. Evaluation de l'activité Antibactérienne**

Les plantes jouent un rôle crucial dans la production d'énergie dont dépendent l'homme et l'animal. Malheureusement, la plante peut être atteinte d'une maladie, ce qui affecte sa croissance, sa fertilité et sa productivité. Des symptômes se développent et tout ou une partie de l'organisme peut mourir (Benziri et *al.*, 2001).

Les maladies des plantes sont parfois regroupées par types de symptômes, par types de plante affectés et par le pathogène responsable de la maladie qui est le critère le plus utile pour la classification (Benjama, 2003).

La tuberculose de l'olivier est l'une des maladies bactériennes causées par la bactérie *Pseudomonas savastanoi* pv, *savastanoi* touchant l'olivier qui possède une grande importance économique. L'utilisation des produits chimiques d'une manière abusive est à l'origine de l'apparition de la multi résistance bactérienne.

A cet effet, nous sommes intéressés à évaluer l'activité antibactérienne de différentes molécules  $\alpha$ -aminophosphonates en utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide, afin de sélectionner les molécules ayant une activité antibactérienne importante. Le test a été effectué au niveau de l'institut national de protection des végétaux (l'INPV).

#### **2.1 Matériel biologique**

Le matériel biologique utilisé est la *Pseudomonas savastanoi* pv, *savastanoi*, qui est une bactérie à Gram négatif qui induit les galles sur la tige, les rameaux et les feuilles de plusieurs plantes hôtes appartenant à la famille Oleaceae et la famille apparentée Apocynaceae.

##### **2.1.1 Prélèvement des échantillons**

Des branches obtenues de plusieurs arbres d'oliviers. Ces derniers ont été sélectionnés selon leur degré d'infection pour l'isolement des souches *Pseudomonas savastanoi*, pv, *savastanoi*

##### **2.1.2 Isolement de la bactérie**

###### **2.1.2.1 Désinfection des tumeurs**

Une solution d'alcool de 2% a été préparée afin de désinfecter les tumeurs. Cette désinfection a été réalisée pendant 3 minutes suivies par trois (03) rinçages successifs à l'eau distillée stérile, puis mis sur papier buvard quelques minutes pour sécher.

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **2.1.2.2 Macération**

Les galles désinfectées ont été découpées en petits fragments à l'aide de bistouri stérile puis mis en macération avec l'eau distillée stérile pendant 30 min dans un mortier préalablement désinfecté. La quantité des tumeurs pour chaque verger a été divisée en deux (A et B) et mises dans deux mortiers différents qui servent de répétitions.

### **2.1.2.3 Ensemencement**

Les deux suspensions A et B ont été ensemencées par la technique de 3 quadrants sur deux milieux de culture différents afin de bien visualiser les colonies obtenues : 03 boîtes de pétri contiennent le milieu de culture levane et 4 boîtes de pétri contiennent le milieu sélectif King B. les boîtes ont été incubées à 27 °C pendant 24h à 72h.

### **2.1.2.4 La purification**

Les colonies bactériennes obtenues ont été purifiées par repiquage successifs sur le milieu sélectif King B, le contrôle de la pureté des souches a été effectuée morphologiquement selon l'homogénéité, l'aspect et la couleur dans le but d'obtenir des isolats pur.

## **2.2 Essai biologique**

### **2.2.1 Méthode de diffusion en milieu solide**

Le test de l'activité antibactérienne des molécules d'  $\alpha$ -aminophosphonates a été effectué à partir des disques imprégnés des différentes concentrations des molécules. Cette technique permet de déterminer l'activité inhibitrice de la croissance bactérienne par la mesure du diamètre d'inhibition autour le disque (Sharififar *et al.*, 2007).

Une suspension de la bactérie est préparée dans l'eau physiologique stérile (0.09%) à partir d'une culture bactérienne de 24H sur gélose nutritive.

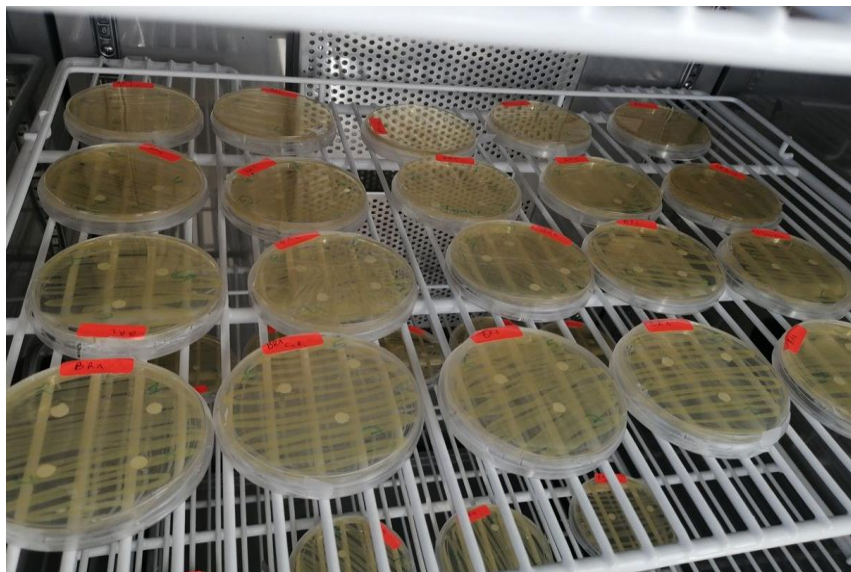
Un ensemencement sur les surface du milieu gélosé Mueller-Hinton des boîtes de pétri de 90mm est effectué par la méthode de Kirby-baur, par écouvillonnage à l'aide d'un écouvillon stérile bien imbibé de la suspension bactérienne, en frottant cet écouvillon sur la surface de la gélose et en tournant la boîte 3 fois 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.

Des disques de papier Wattman de 6mm de diamètre sont imbibés de 10 ul de chaque concentration. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque concentration. Les disques du contrôle négatif sont imprégnés de 10 ul de solvant DMSO 10%.

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. A la fin de l'incubation nous avons mesuré la zone d'inhibition claire, autour les disques à l'aide d'une règle graduée.

Les résultats sont exprimés selon l'échelle de Ponce AG *et al.*, 2003 : **résistant** : Diamètre des zones d'inhibition < 8mm ; **intermédiaire** : 15mm  $\geq$  Diamètre des zone d'inhibition  $\geq$ 8mm ; **sensible** : diamètre des zone d'inhibition >15mm (Bansemir A *et al.*, 2006).



**Figure 12: Dispositif expérimental. (Photo personnelle).**

### **3. Evaluation de l'activité antifongique**

La fusariose est une maladie fongique courante des céréales. Elle frappe toute une gamme d'hôtes tels que l'orge, l'avoine, le maïs et plus particulièrement le blé. Elle attaque à la fois les semences, les tiges et les épis de blé.

Les agents responsables de la fusariose regroupent 2 genres *Microdochium* et *Fusarium* qui comprend 19 espèces. Ces espèces entraînent une série de symptômes et sont responsables de pertes de rendement provoquant ainsi des conséquences économiques considérables. De plus certaines espèces de *Fusarium* sont productrices de mycotoxines toxique pour l'homme et l'animal. (Anonyme, 2008).

Parmi ces agents nous avons choisi le *Fusarium* de blé *Fusarium roseum* pour déterminer l'activité antifongique des cinq molécules d'  $\alpha$ -aminophosphonates. La multi résistance fongique pose de grands problèmes au niveau de la protection des plantes. Peu de produits antifongiques efficaces contre certains agents multi résistant.

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

C'est dans ce contexte que nous avons procédé au niveau de l'institut national de protection des végétaux (INPV) Ben Mhidi EL KOUS- Wilaya d'EL Tarf à l'isolation et l'identification des souches de *Fusarium* issues des plantes de blé. Ainsi d'étudier, *In vitro*, l'efficacité des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisées sur la croissance mycélienne.

### **3.1 Matériels et méthodes**

#### **3.1.1 Matériel biologique**

##### **3.1.1.1 Isolement et identification de la souche**

Le protocole expérimental adopté et utilisé est décrit ci-dessous. Ce protocole est défini dans trois étapes :

##### **3.1.1.1.1 Isolement et conditions de culture**

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

Une fois séchées, les échantillons sont déposés dans les boîtes de pétri contenant des milieux gélosés spécifiques : PDA (potato Dextrose Agar) Les échantillons sont répartis à raison de 5 fragments par boîte.

Les boîtes de pétri contenant le milieu PDA sont amendées avec l'acide tartrique afin d'éviter la prolifération de colonies bactériennes.

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

##### **3.1.1.1.2 Identification de la souche fongique**

L'identification se fait sur la base sur certains caractères morphologiques des colonies (vitesse de croissance, aspect de colonies, pigmentations) et l'observation microscopiques des spores (forme et taille). Dans notre expérimentation, il s'agit du *Fusarium roseum*

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **3.1.1.1.3 Purification de l'agent pathogène**

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

Incubation  
25°C/ 7-10 jours

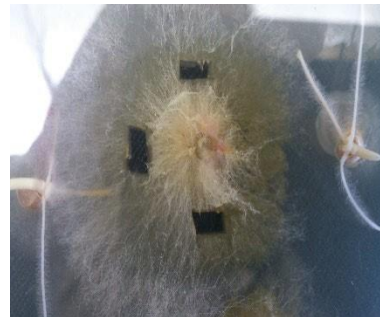
**Isolement**

**Identification**



Observation au M.O  
La méthode du  
scotch/ Bleu de  
méthylène

**Purification**



Repiquage



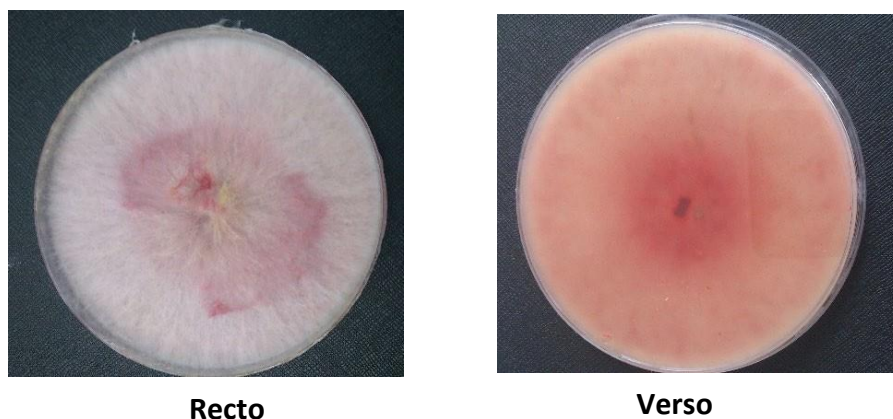
Souche fongique  
purifiée

**Figure 13: Méthodologie adoptée pour l'isolement et la purification de la souche fongique.**

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **3.1.1.2 Caractérisation macroscopique**

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



**Figure 14 : Aspect des colonies de *Fusarium* sur le milieu de culture PDA après 7 jours d'incubation à 25°C.**

### **3.1.1.3 Caractérisation microscopique**

Les microconidies sont absentes. Les macroconidies sont fusiformes et sont divisées en 6 à 7 loges. Elles sont peu incurvées et leur face dorsale est plus incurvée que leur face ventrale et peuvent avoir une extrémité terminale pointue.



**Figure 15 : Aspect des spores de *Fusarium* sous microscope optique Gr  $\times 40$ .**

## ***CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES***

### **3.1.2 Matériel chimique**

Les concentrations des aminophosphonates utilisés dans la partie matérielle chimique de l'activité insecticide.

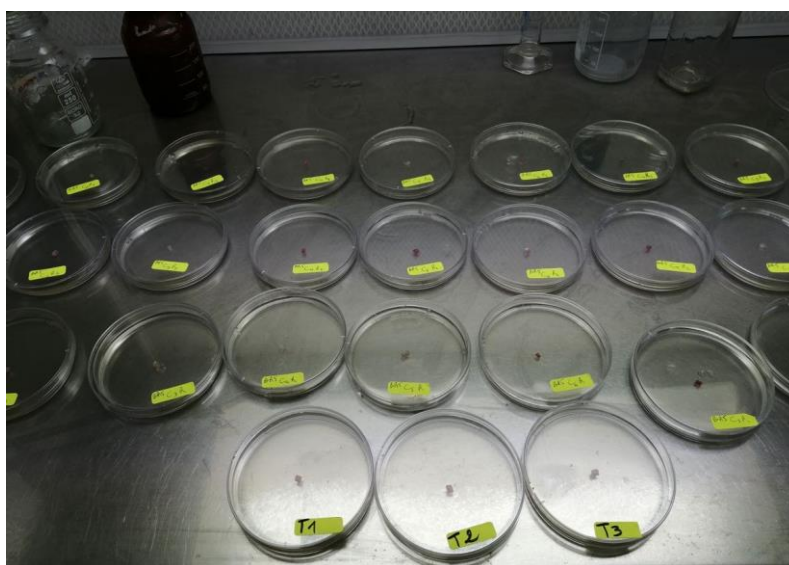
L'activité antifongique des cinq molécules est comparée avec un témoin DMSO 10% et avec un fongicide de référence commercialisé sous le nom de OPUS.

### **3.1.3 Méthode d'évaluation de l'activité antifongique**

Dans le but d'évaluer l'efficacité des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sur la croissance mycélienne, nous prévoyons de tester l'effet antifongique par la méthode de contact direct selon la méthode de salhi *et al.*, 2015. L'objectif de cette expérience est d'apprécier une activité inhibitrice caractérisée par un halo d'inhibition, sur les cultures de *Fusarium roseum*.

Pour cela, les concentrations différentes des cinq molécules incorporés aseptiquement, dans les milieux de culture maintenus en surfusion (40 à 45°C). Le mélange est ensuite coulé dans les boîtes de pétri à raison de 20 ml pour chaque boîte. Des disques mycéliens de 6 mm seront découpés sur des cultures âgées de *Fusarium* et sont ensuite déposés au centre de chaque boîte de pétri. Trois répétitions sont effectuées pour chaque concentration, les résultats sont comparés à un témoin positif et comparées au témoin positif (le pesticide de référence), au témoin négatif (eau distillée stérile) et au DMSO 10%.

Les boîtes seront ensuite incubées à 25°C pendant 120 h à l'étuve à 25 °C. Cette période a été retenue vu qu'elle correspond à la date à laquelle le témoin remplit très nettement la boîte de pétri.



**Figure 16 : Dispositif expérimental (photo personnelle)**

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **3.1.3.1 Evaluation de la croissance mycélienne**

La croissance mycélienne a été évaluée toutes les 24 heures pendant 120H en mesurant la moyenne de trois diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la rondelle.

### **3.1.3.2 Détermination des pourcentages d'inhibition**

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne sera calculé selon la formule suivante (Laib, 2012) :

$$(\%) = (D_0 - D_f) / D_0 \times 100$$

(%) : Taux d'inhibition exprimé en pourcentage.

$D_0$  : Diamètre moyen des colonies témoins.

$D_f$  : Diamètre moyen des colonies en présence du fongicide.

## **4. Evaluation de l'activité Antioxydante**

Les radicaux libres étant impliqués dans la genèse de plusieurs maladies, l'intérêt porté à la recherche des antioxydants a considérablement augmenté ces dernières années.

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydant des molécules. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif spécifique en présence d'un agent antioxydant. C'est dans ce contexte que nous sommes intéressés à évaluer l'activité antioxydante des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonate en utilisant la méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2diphényl-1-picryl-hydrazyl).

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. Elle est fréquemment utilisée pour la détermination de l'activité antioxydante (Burit *et al.*, 2001 ; Hussain *et al.*, 2010 ; Fayed , 2009), simple, efficace et rapide pour l'évaluation des propriétés antioxydants des molécules (Hussain *et al.*, 2010 ).

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

Contrairement aux autres tests, les conditions utilisées (Solvant organique et faible température) évitent l'auto-oxydation des molécules testées (Portes, 2008).

Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH. Le test de permet aussi de calculer la CE50 (Dongmo *et al.*, 2010) la valeur de CE50 signifie la concentration du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH (Simionatto *et al.*, 2007).

### **4.1 Matériel et méthodes**

#### **4.1.1 Matériel chimique**

Les concentrations des aminophosphonates utilisés dans la partie matériel chimique de l'activité insecticide.

L'activité antioxydante des cinq molécules est comparée avec un témoin positif (La vitamine C). Le composé chimique utilisé dans notre expérimentation est le 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH\*) qui est un radical libre stable, centré sur l'azote.

#### **4.1.2 Méthode**

##### **4.1.2.1 Principe de la méthode**

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant est suivie par spectrophotométrie UV-VISIBLE, mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm (Portes ,2008). Le DPPH est de couleur violacé, se réduit et change de couleur en variant au jaune lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration signifie la capacité des molécules à piéger ces radicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique (Parejo *et al.*, 2002).

## CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES

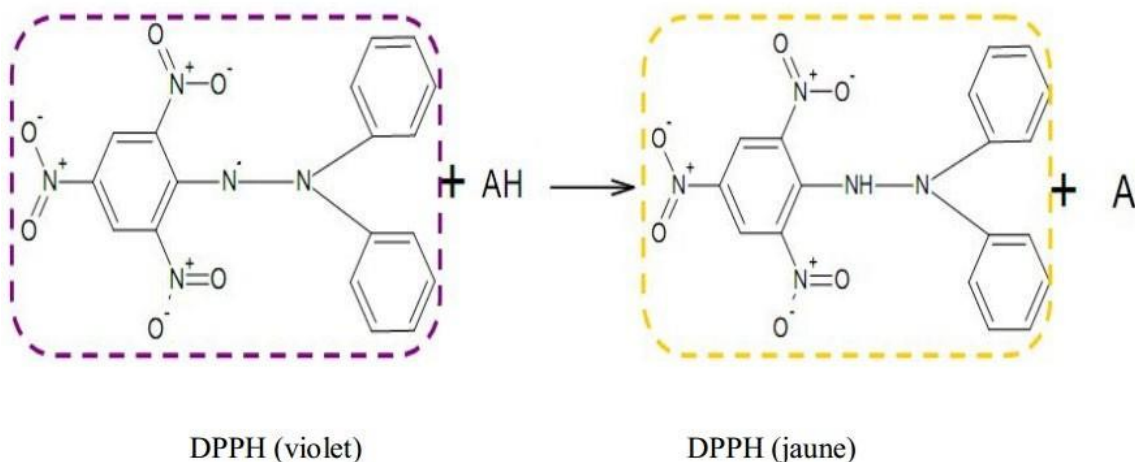


Figure 17: Réaction du DPPH• avec un antioxydant (Molyneux , 2004).

### 4.1.2.2 Protocole

L'effet de chaque molécule d'  $\alpha$ -aminophosphonate sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Benhammou *et al.*, (2007).

Un volume de 50ul de différentes concentrations de chaque molécule est ajouté à 1.950 ml de la solution méthanolique du DPPH (2.4mg DPPH / 100ml méthanol) fraîchement préparée. La vitamine C est utilisée comme control positif. En ce qui concerne le control négatif, ce dernier est préparé en mélangeant 50ul du DMSO avec 1.950 ml d'une solution méthanolique de DPPH. Trois répétitions sont utilisées pour toutes les concentrations. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à une température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

## CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES

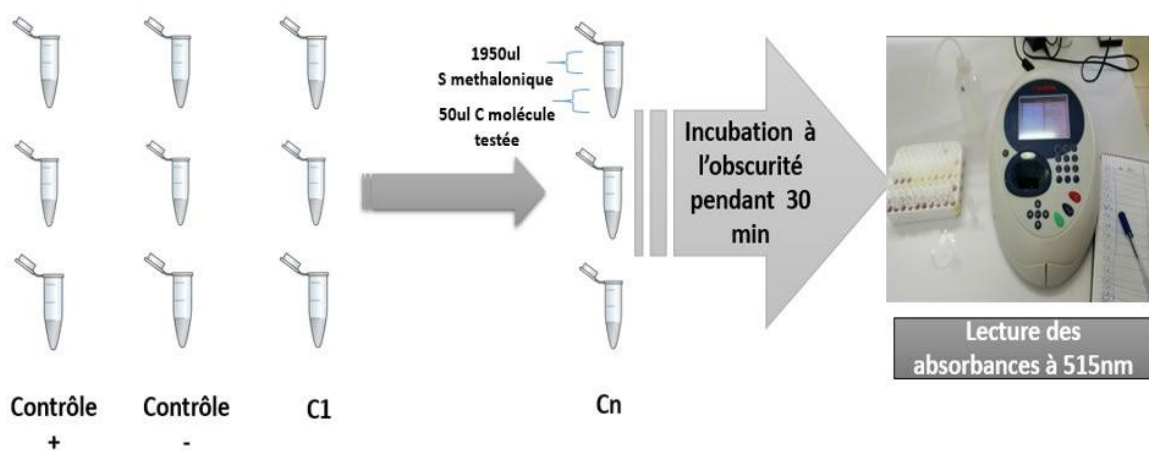


Figure 18: Protocole de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de la réduction du radical libre DPPH.

### 4.1.2.3 Calcul des pourcentages d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$I\% = ((A_c - A_t) / A_c) * 100$$

$A_c$  : Absorbance du contrôle négatif

$A_t$  : Absorbance du test effectué

### 4.1.2.4 Calcul des concentrations efficaces CE 50

La concentration inhibitrice de 50% (aussi appelée EC50 pour efficient concentration 50) est la concentration nécessaire de la molécule testé pour réduire 50% de radical DPPH\*

Les EC 50 sont calculées graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés : le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations des molécules testées.

***CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES  
MOLECULES  $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES***

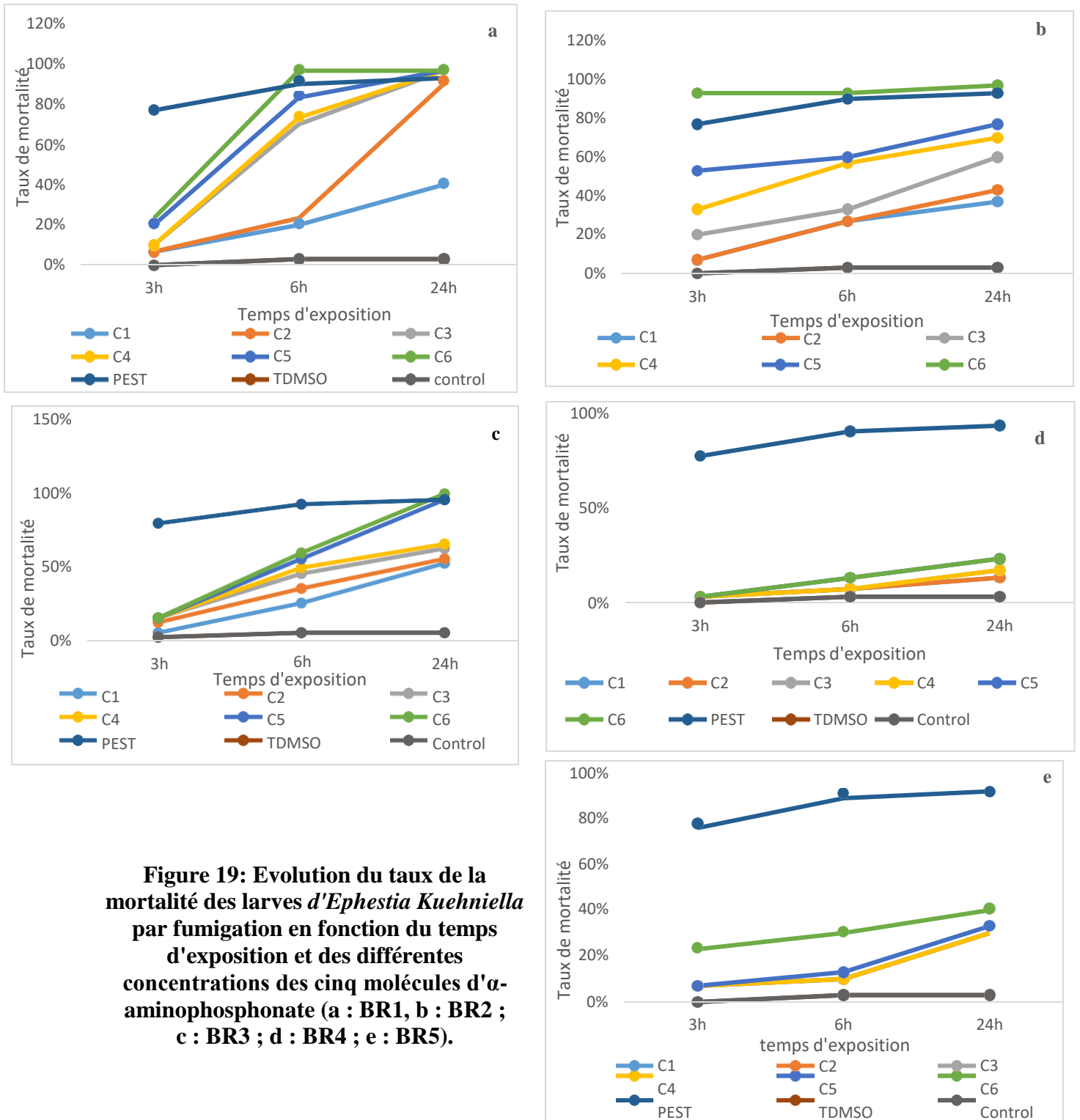
***Résultats***

# CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES

## 1. Evaluation de l'activité insecticide

### 1.1 Test de fumigation (inhalation)

L'évolution du taux de mortalité des larves *Ephestia kuehniella* en fonction du temps et les différentes concentrations des cinq molécules étudiées sont illustrées sur les graphes ci-dessous.



**Figure 19: Evolution du taux de la mortalité des larves *Ephestia Kuehniella* par fumigation en fonction du temps d'exposition et des différentes concentrations des cinq molécules d' $\alpha$ -aminophosphonate (a : BR1, b : BR2 ; c : BR3 ; d : BR4 ; e : BR5).**

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

Ces résultats montrent que le taux de mortalité des larves traitées avec les cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates variaient avec l'augmentation des concentrations et du temps.

Un faible taux de mortalité, allant de 3 à 23% pour la molécule BR4 et de 7 à 40% pour BR5. Une activité moyennement toxique à hautement élevée des molécules BR1, BR2 et BR3, supérieur à celle du pesticide de référence (Dursban) se révèle nettement dans le tracé des graphes précédentes. Les mortalités causées varient entre 23% à 97% pour BR1, de 7% à 97% pour BR2, de 3% à 97% pour BR3 et de 77% à 93% pour l'insecticide de référence (Dursban). Ceci nous amène à croire que les molécules BR1 et BR2 ont les activités insecticides les plus fortes car la molécule BR2 élimine plus d'individus que le pesticide de référence (Dursban) pour sa forte concentration avec un taux de 93 % supérieur à celui du pesticide (Dursban) qui est de 77% juste après 3H du traitement. Ainsi que la molécule BR1 qui provoque une mortalité de 97% à la concentration 320  $\mu\text{mol/l}$  après 24H d'exposition.

- **Détermination de la CI 50%**

Le tableau 5 résume les valeurs CI50 pour les cinq molécules d' $\alpha$ -aminophosphonate qui ont été déterminés mathématiquement.

D'après les résultats obtenus on peut noter que les molécules BR1, BR2, et BR3 ont une bonne activité insecticide par rapport aux molécules BR4 et BR5, car leur taux de mortalité est inférieur à 40% et leur CI50 est loin d'être atteinte. Ainsi, la molécule BR1 présente une meilleure activité insecticide par rapport aux autres molécules ayant la plus faible CI50 (245.47%) ((BR1<BR3<BR2)).

**Tableau 5 : La CI 50% des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates.**

<b>Molécule</b>	<b>BR1</b>	<b>BR2</b>	<b>BR3</b>	<b>BR4</b>	<b>BR5</b>
<b>CI 50% <math>\mu\text{mol/l}</math></b>	245.47	302	300	-	-

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **1.2 Test de contact**

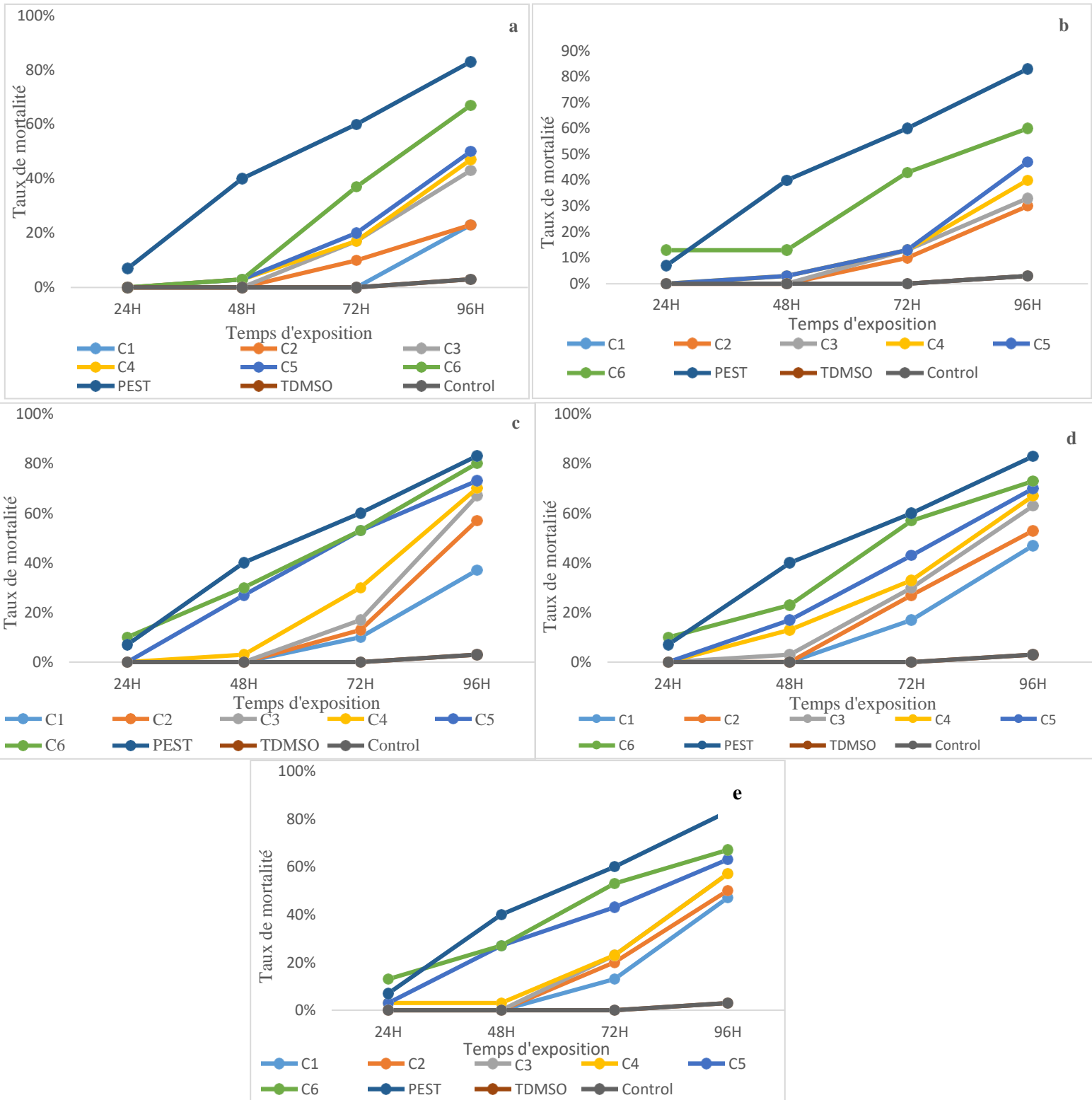
La figure 20 illustre les résultats du test de toxicité par contact des cinq molécules d' $\alpha$ -aminophosphonate sur les larves d'*Ephestia Kuehniella*. Les cinq molécules ont démontré une activité insecticide de contact. En effet Les molécules BR3, BR4 et BR5 montre une activité insecticide pour les fortes concentrations après 72 h d'exposition et les molécules BR1 et BR2 montre une activité après 96H avec un taux de mortalité superieurs à 50% mais inferieurs au pesticide de reference (83%). La molécule BR3 apparait comme la plus toxique, provoquant un taux de mortalité 80% pour la forte concentration après 96H, démontrant un effet toxique similaire à celui du Dursban (83%).

De plus, la détermination de la CI50 (tableau 6) confirme ces résultats car la molécule BR3 a la CI50 la plus basse (325,48%) par rapport aux autres molécules d' $\alpha$ -aminophosphonate.

**Tableau 6: La CI 50% des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates par le test de contact.**

<b>Molecule</b>	<b>BR1</b>	<b>BR2</b>	<b>BR3</b>	<b>BR4</b>	<b>BR5</b>
<b>CI 50% umol/l</b>	400	416.04	325.48	325.54	340

## CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES



**Figure 20: Variation de la mortalité par contact des larves d'*Ephestia kuehniella* en fonction du temps d'exposition et des différentes concentrations des cinq molécules d' $\alpha$ -aminophosphonate ( a : BR1, b : BR2 ; c : BR3 ; d : BR4 ; e : BR5).**

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **1.3 Test de repulsivité**

Les résultats du test de repulsivité des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sur les larves d'*Ephestia kuehniella* sont représentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 7: Effets répulsifs des cinq molécules d' $\alpha$ -aminophosphonate sur les larves d'*Ephestia kuehniella*.**

Molécule/concentration	Pourcentage de repulsivité (%)						Moyenne de repulsivité (%)	Classe	Effet repulsive
	C1	C2	C3	C4	C5	C6			
<b>BR1</b>	20	20	20	20	20	20	20	1	Très faiblement répulsive
<b>BR2</b>	-20	20	20	40	40	40	26	2	Faiblement répulsive
<b>BR3</b>	20	20	20	40	40	40	30	2	Faiblement répulsive
<b>BR4</b>	-40	0	40	40	60	60	27	2	Faiblement répulsive
<b>BR5</b>	20	20	20	20	20	20	20	1	Très faiblement répulsive

Les résultats du tableau 7 indiquent un faible effet répulsif des molécules d' $\alpha$ -aminophosphonate (BR2, BR3 et BR4) avec un pourcentage moyen de répulsion égal à 26%, 30% et 27%, respectivement. En revanche, BR1 et BR5 sont très faiblement répulsifs envers *E. kuehniella*, avec un pourcentage de répulsion de 20 %.

## CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES

### 2. Evaluation de l'activité antibactérienne

Le potentiel antibactérien des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates, exprimé en mesurant les diamètres des zones d'inhibition, en millimètre aux tours les disques imbibés des différentes concentrations de ces molécules est représenté dans la figure ci-dessous :

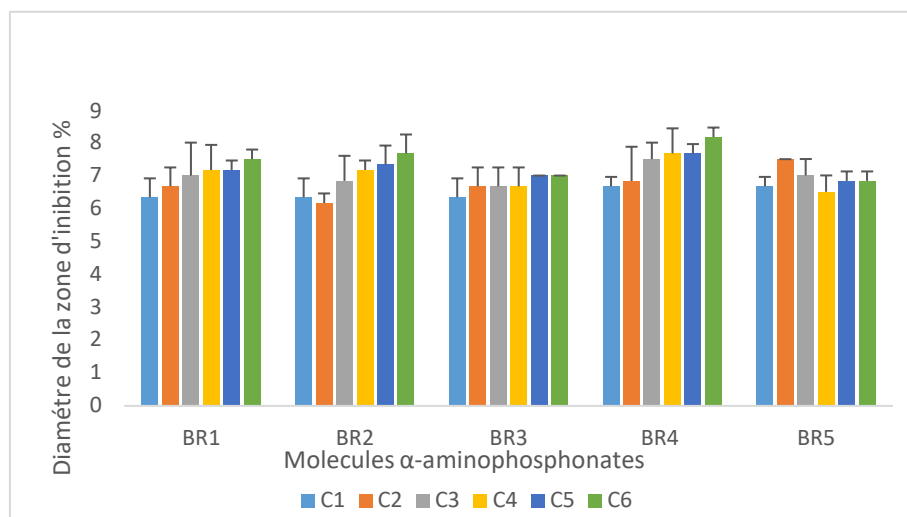


Figure 21: Sensibilité de la bactérie vis-à-vis les différentes concentrations des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates (BR1, BR2, BR3, BR4, BR5).

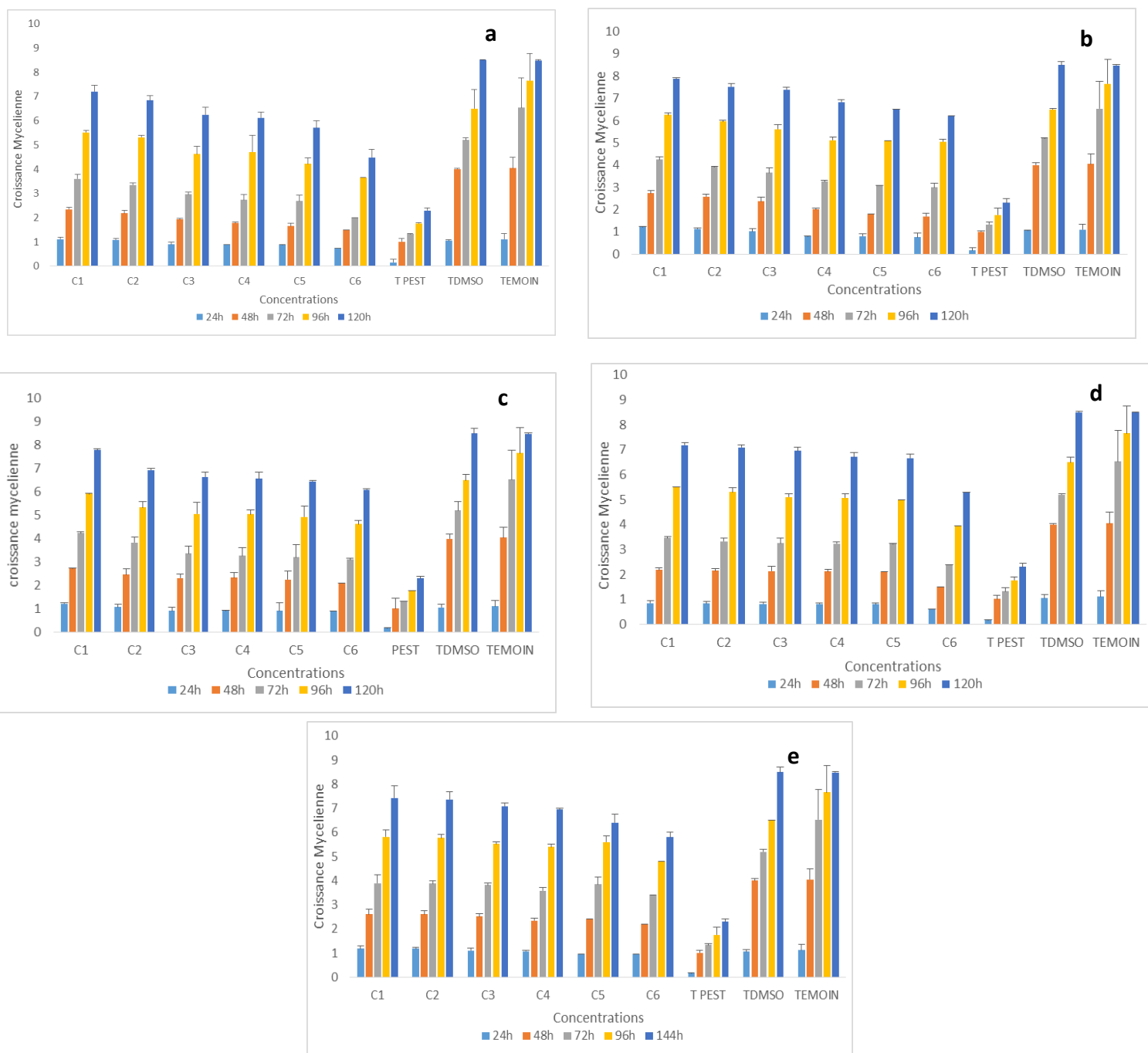
D'après la classification de Ponce *et al.*, 2003, une très faible inhibition de la bactérie a été enregistré avec toute les concentrations des molécules  $\alpha$ -aminophosphonates (BR1 ; BR2 ; BR3 ; BR4 ; BR5), notons un Diamètre de zone d'inhibition inférieur à 8mm, à l'exception de la forte concentration de la molécule BR4 qui a montré une activité antibactérienne intermédiaire avec un diamètre de zone d'inhibition 8.16 mm.

### 3. Evaluation de l'activité antifongique

#### 3.1 Evaluation de la croissance mycélienne

L'activité antifongique est révélée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne du *Fusarium Roseum* les résultats de diamètre de l'activité antifongiques des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sont représentés dans les figures ci-dessous :

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**



**Figure 22 : Evolution de la croissance mycélienne en fonction du temps et des différentes concentrations des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonate. ( a : BR1, b : BR2 ; c : BR3 ; d : BR4 ; e : BR5).**

Après 120 H d'incubation, nous avons constatés une évolution de la croissance mycélienne de la souche testés en présence des différentes concentrations des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates. En revanche, nous avons remarqué une légère inhibition de la croissance mycélienne de la souche testée en présence des cinq molécules par rapport au témoin, tandis

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

qu'une inhibition remarquable a été constaté chez la souche exposé au pesticide de référence qui présente un diamètre de 23mm de la croissance mycélienne.

### **3.2 Pourcentage d'inhibition**

Le tableau 8 regroupe les différents pourcentages d'inhibitions calculés selon l'équation citée précédemment :

**Tableau 8: Pourcentage d'inhibition (%) des cinq molécules**

**$\alpha$ -aminophosphonates.**

<b>Molécule</b>	<b>BR1</b>	<b>BR2</b>	<b>BR3</b>	<b>BR4</b>	<b>BR5</b>
<b>% d'inhibition</b>	29%	31%	38%	47%	32%

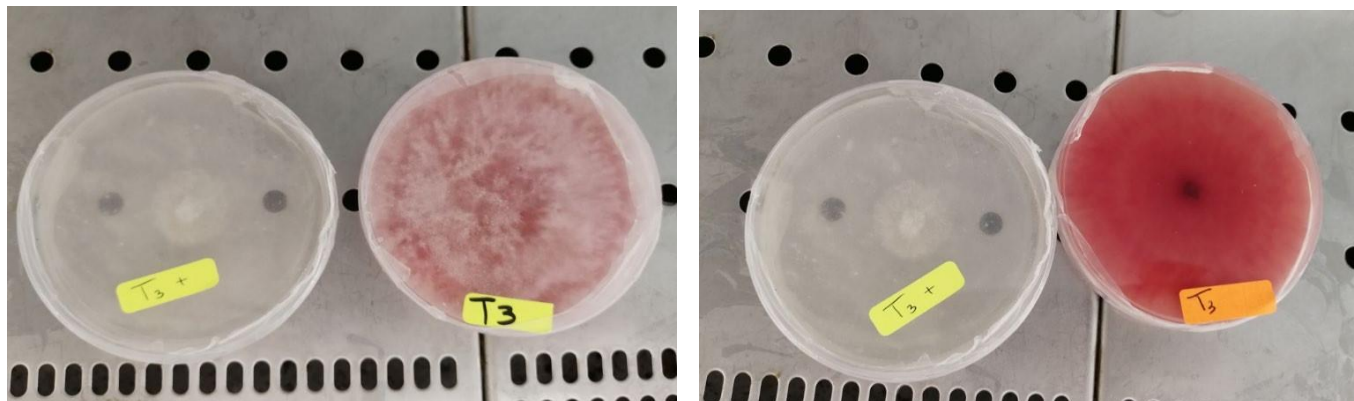
Nos résultats indiquent que les molécules BR1, BR2, BR3 et BR5 possèdent une faible activité antifongique avec un pourcentage d'inhibition inférieur à 50% (29% ; 31% ; 38% ; 32%) respectivement pour les fortes concentrations. Tandis que la molécule BR4 présente une capacité inhibitrice partielle de la croissance mycélienne de la souche testée *Fusarium Roseum* de 47% pour la forte concentration par rapport au pesticide de référence qui a montré une forte activité antifongique avec un pourcentage d'inhibition de 76%.

### **3.3 Observation morphologique**

D'après les figures, le témoin possède une couleur de base rose ayant des hyphes (micelle) blanc gonflée, après 120H la taille de la colonie du témoin atteint le maximum du diamètre de la boîte 85mm avec une couleur rose avec des hyphes gonflée blancs et un aspect poudreux comme du coton. Ainsi nous avons constaté un changement morphologique de la couleur des mycéliums exposée aux molécules  $\alpha$ -aminophosphonate, avec des hyphes moins gonflés de couleur blanchâtre par rapport au témoin.

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

En parallèle nous avons remarqué des légers hyphes de couleur blanchâtre de la souche testée exposée au pesticide de référence.



**Figure 23: Aspect des colonies de Fusarium témoin et en présence de pesticide de référence recto- verso. (Photo personnelle).**

### **4. Evaluation de l'activité antioxydante**

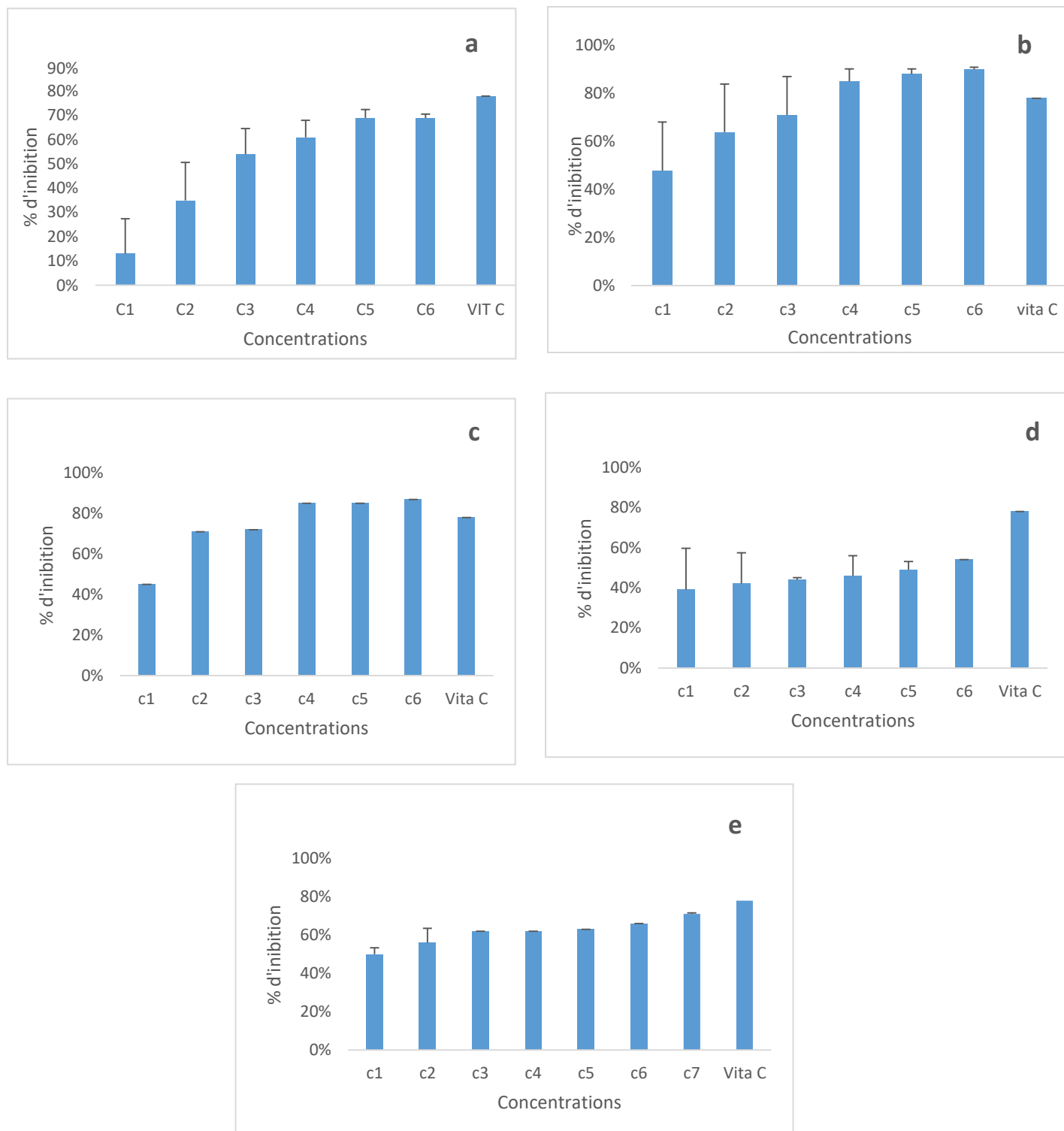
#### **4.1 Pourcentage d'inhibition**

La figure 24 représente l'évaluation de l'effet piègeur des molécules  $\alpha$ -aminophosphonate et Vitamine C vis-à-vis le radical DPPH.

Nous avons constaté que toutes les molécules  $\alpha$ -aminophosphonates étudiées possèdent une activité antioxydante et elles sont capables de piéger le radical DPPH (inhibition de la DPPH supérieure à 50% révélant des activités élevées à très élevées).

A partir de ces résultats nous avons déterminés que les molécules BR2 et BR3 possèdent une activité antioxydante 90% et 87% respectivement, supérieure à celui de la vitamine C 78%, et une bonne activité antioxydante pour la molécule BR5 71% presque similaire à celui de la vitamine C 78%.

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**



**Figure 24 : Evaluation de l'effet piègeur des molécules  $\alpha$ -aminophosphonate et VitamineC vis-à-vis le radical DPPH. ( a : BR1, b : BR2 ; c : BR3 ; d : BR4 ; e : BR5).**

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

### **4.2 Détermination des CE 50**

Les CE50% des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonate sont représenté dans le tableau ci-dessous. D'après les résultats du tableau, nous avons constatés des CE 50 plus faibles pour les BR2 ; BR3 et BR5 : 245 $\mu$ mol/l ; 310  $\mu$ mol/l et 250 $\mu$ mol/l respectivement par rapport aux autres  $\alpha$  - aminophosphonates testés. Tandis que les molécules BR1et BR4 révèlent moins efficaces avecdes valeurs de IC50plus élevées 310  $\mu$ mol/l et 465  $\mu$ mol/l.

**Tableau 9 : Les CE 50 (mol/L) des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonate.**

<b>Molécule</b>	<b>BR1</b>	<b>BR2</b>	<b>BR3</b>	<b>BR4</b>	<b>BR5</b>
<b>CI 50<math>\mu</math>mol/l</b>	310	245	310	465	250

***CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES  
MOLECULES  $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES***

***Discussion***

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

En Algérie l'usage des produits phytosanitaires ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. C'est dans ce contexte que nous avons déterminé la caractérisation biologique des dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés, vu qu'elles sont connues par leur faible toxicité sur l'environnement, ainsi d'évaluer l'activité antioxydante de ces molécules.

Etant donnée la place importante du blé et de ses dérivés dans l'alimentation en Algérie et dans plusieurs pays du monde, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité insecticide par contact et inhalation des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés chez les larves d'*Ephestia kuehniella* et déterminer leur effet repulsive dans le but de recherche des méthodes alternatives pour la lutte contre les insectes des denrées stockées afin de limiter les inconvénients d'utilisation des insecticides disponible dans les marchés et leurs effets secondaires.

En effet, Plusieurs auteurs ont rapporté différentes activités biologiques des dérivés  $\alpha$ -aminophosphonates tel que l'activité antifongique (Syah Ben Aissa *et al.*, 2018), antioxydante (Onita *et al.*, 2010). A l'inverse, l'activité insecticide des dérivés  $\alpha$ -aminophosphonates n'a pas été trop discutée dans la littérature, d'où notre intérêt à confirmer leur efficacité sur la population cible (*Ephestia kuehniella*) par rapport à l'insecticide commercialisé.

Nos résultats montrent que les molécules BR1, BR2 et BR3 ont une activité insecticide élevée (TM>50%) par fumigation, une activité modérée à élevée par contact et une activité faible à très faible par répulsion pour les différentes concentrations testées des cinq molécules. Ces résultats permettent de confirmer que le taux de mortalité varie en fonction des concentrations des substances utilisées, de la voie de contamination et du temps d'exposition (Khalil *et al.*, 1996 ; Spurgeon et Hopkin , 1995). A noter que la CI50 la plus basse est enregistrée successivement pour BR1 (245,47  $\mu$ M) et BR3 (325,54  $\mu$ M) selon le mode de contamination (fumigation et contact), démontrant leur fort pouvoir insecticide ; il est quasiment identique à l'effet du Dursban par mode contact et par fumigation pour les doses les plus élevées.

Ainsi, les résultats confirment l'efficacité de l'utilisation des  $\alpha$ -aminophosphonates (dérivés) comme insecticide sur des populations cibles (*Ephestia kuehniella*) tout en ignorant le mode répulsif de nos molécules.

Nos résultats sont expliqués par le mécanisme d'action neurotoxique de ces molécules qui impliquent l'inhibition de l'Acétylcholinestérase et empêchent ainsi la transmission de l'influx nerveux (Oms, 1991). Cet inhibition se réalise lorsque ces  $\alpha$ -aminophosphonates vont se fixer

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

sur le groupe hydroxyle de la serine du site actif de l'AChE, ce qui empêche la liaison de cette enzyme avec l'acétylcholine. L'AChE qui est une enzyme estérase nécessaire au fonctionnement des synapses du système nerveux central et de la jonction neuromusculaire. En effet cette enzyme extracellulaire hydrolyse en quelques millisecondes l'acétylcholine libre dans la fente synaptique, en acétate et choline. Elle fournit un des moyens de mettre un terme à l'activation des récepteurs cholinergiques (Milan *et al.*, 2006).

L'inhibition de l'AChE provoque une accumulation de l'acétylcholine libérée dans la fente synaptique lors d'une stimulation nerveuse, menant à une hyperstimulation des récepteurs cholinergiques. En conséquence, le passage de l'information nerveuse est perturbé jusqu'au non fonctionnement des synapses, ce qui peut mener à l'apparition de divers troubles nerveux pouvant aller jusqu'à la mort de l'individu (Lotti, 1995).

Aussi, nous avons évalué l'activité antibactérienne des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates contre la bactérie *Pseudomonas* par la méthode des disques qui nous fournit des résultats préliminaire sur l'activité antibactérienne de ces molécules, grâce aux diamètres des zones d'inhibition mesurés en millimètres qui apparaissent autour les disques. Cette méthode a été choisie pour sa fiabilité et sa simplicité.

**Nous avons constaté une très faible activité pour toutes les concentrations des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates, à l'exception de la forte concentration de la molécule BR4 qui présente une activité intermédiaire.** Des travaux similaires de Khaled (2020) ont mis en évidence une activité inhibitrice faible de l'ester diethyl ((dodecylamino)(phenyl) methyl) phosphonate vis-à-vis de la bactérie *S. aureus* ainsi qu'aucune activité sur la bactérie *P. aeryginosa*.

Ces dernières décennies plusieurs agriculteurs utilisent fortement les produits antifongiques pour lutter contre les maladies fongiques en empêchant leurs croissances mycéliennes (Stepien *et al.*, 2011). Dans certains cas, le pouvoir inhibiteur des molécules antifongiques peut être difficile à se manifester vu que les souches fongiques n'ont pas le même degré de sensibilité en raison de la nature de leur paroi. Cette dernière se compose d'un réseau complexe de protéine et de polycarbohydrates pouvant varier selon les espèces fongiques qui permet le développement d'une résistance plus au moins intéressante (Nagendra, 2010).

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

C'est pour cela, nous avons déterminé l'activité antifongique des différentes molécules  $\alpha$ -aminophosphonate. **Nos résultats mettent en évidence une activité antifongique partielle qui ne dépasse pas les pourcentages d'inhibition 50% comparé au fongicide de référence OPUS qui représente un pourcentage d'inhibition 76%.** Selon Biyti el *al.*, 2004 chaque produit est considéré comme actif s'il enduit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10mm. En effet l'activité d'une substance dépend de plusieurs facteurs dont la concentration appliquée (Martin, 2000 ; castillejos et *al.*, 2006) . Ainsi Cichewicz et Thrope (1996) ont montrés que chaque produit testé a divers effets sur les microorganismes testés : une inhibition complète ou partielle ou une stimulation. Cette inhibition serait due au blocage de la germination des conidies (première étape menant à l'établissement d'un tube germinatif et d'un hyphes (McEwan, 1994). Comme elle peut être aussi dû à l'inhibition du métabolisme respiratoire et énergétiques des cellules fongiques ou à la désorganisation cellulaire lors de la division cellulaire (Rocher, 2004). Nos résultats sont en accord avec ceux de Candan et *al.*, (2003) qui ont montré que les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosoluble. Cela réfère à la capacité des molécules liposolubles de s'insérer dans les membranes des cellules et les endommager.

En parallèle nous avons évalué l'activité antioxydante des différentes molécules  $\alpha$ -aminophosphonate afin de déterminer les molécules ayant une bonne activité antioxydante. Après 30 min d'incubation de la solution DPPH-Extrait (à différentes concentrations des cinq molécules), la coloration violette vire vers une coloration jaune pour les cinq molécules, ce changement de couleur est dû à la réduction de DPPH, ce qui montre que tous les échantillons ont un effet de piégeage du radical DPPH.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle qui signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire. A partir de ces courbes nous avons déterminé les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations utilisées ainsi la valeur CI50% de chaque molécule. Plus la valeur de IC50% est petite, plus la molécule à une forte activité antioxydante. Almela et *al.*, (2006) a montré que l'activité efficace dépend de plusieurs facteurs, tels que la concentration, les formes isomériques.

## **CHAPITRE II : CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES**

Nos résultats sont en accord avec ceux de Reddy *et al.*, (2003) qui ont démontré une forte activité antioxydante des aminophosphonates synthétisés par le mode réactionnel amine-aldehyde-diethyl phosphite contre le radical DPPH.

Les travaux de Devineni *et al.*, (2013) qui ont mis en évidence une forte activité des  $\alpha$ -diaminophosphonates à piéger le radical DPPH. Ainsi Onita *et al.*, (2010) ont découvert que quatre dérivés aminophosphonates synthétisés ont une meilleure activité antioxydante que le 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol (BHT).

## ***CHAPITRE III :***

# ***Evaluation de la toxicité des molécules $\alpha$ -aminophosphonates sur le blé dur***

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

Le blé dur joue un rôle crucial dans l'industrie alimentaire mondiale en fournissant des ingrédients de base pour la production de pâtes, de semoule et d'autres produits dérivés.

En Algérie, la culture du blé dur constitue une culture stratégique dans le plan de développement économique (Bouhadi *et al.*, 2020). Elle est considérée comme une activité prédominante dans l'agriculture.

L'usage permanent de ces produits phytosanitaires et le non-respect de la méthode d'utilisation de ces produits causent des effets néfastes sur la plante, capable de modifier leur métabolisme et leur morphologie, ce qui altère leur croissance et leur développement en entraînant une surproduction des ERO générateurs du stress oxydatif et par conséquent une diminution de la productivité et des pertes quantitative et qualitatives des rendements. (Appel et Hirt, 2004).

C'est dans ce contexte que nos travaux ont été menés pour évaluer la toxicité d'une série de dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés sur une population non ciblée (*Triticum durum Desf.*).

### **1. Généralité sur le blé dur**

Le blé dur (*Triticum durum Desf.*) est une plante autogame, herbacée annuelle de la classe des Monocotylédones de la famille des Graminées (Feillet, 2000) avec une hauteur moyenne de 1.5m en fonction des variétés (Ladraa, 2012). Le blé dur est utilisé pour la production d'alimentation humaine (Production de la semoule, pâtes alimentaires et Couscous. Cette espèce possède plusieurs variétés dont leur composition et leurs caractéristiques sont divers.

#### **1.1 Composition du blé dur**

Le blé comporte trois parties dont :

- **L'appareil végétatif**

Il est composé d'un système racinaire comprend des racines séminales (formées pendant la levée) et des racines adventives (formées après les racines séminales). La tige est cylindrique, dressée avec un chaume long et souple dont les entre-nœuds non allongés (Ladraa, 2012), cet appareil comporte des talles issues des bourgeons axillaires à la base de la tige principale (Bozzini, 1988) les feuilles possèdent une couleur. Le nombre de brins et en fonction de la variété de l'espèce et les conditions de croissances. (Clark *et al.*, 2002).

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

- **L'inflorescence**

Elle représente un épi muni d'un rachis solide portant des épillets séparés par des courts entre nœuds (Soltner, 1998). Chaque épillet, contient deux glumes (bractées) refermant de deux à cinq fleurs distiques sur une rachéole ( Biosecurité végétale, 2006) avec trois à quatre épillets fertiles couvert par deux glumelles, trois étamines et un ovaire avec un seul carpelle (Ladraa, 2012).

- **Le fruit ou le grain**

C'est un caryopse nu allongé et pointu de couleur jaune. Il contient un endosperme et un embryon aplati près de la base florale. Le grain de pollen présente trois noyaux au stade de maturité (Ladraa, 2012).

### **1.2 Cycle physiologique du blé**

Le cycle de développement du blé dur est une succession de périodes subdivisées en phases :

#### **1.2.1 Période végétative**

Au cours de cette période le développement est strictement herbacé débutant de la phase germination jusqu'à la formation de l'épi. (Ait-Sliman-Ait-Kaki, 2008).

#### **1.2.2 Phase de germination –levée**

La germination se caractérise par l'émergence du coléohize donnant naissance à des racines séminale et du coléoptile qui protège la première feuille fonctionnelle. La levée est atteinte quand la majorité des lignes de semis sont visible dans une durée de 8 à 15 jours selon la temperature (Abdi, 2018). Parmi les principaux facteurs qui interviennent dans l'atteinte de cette phase sont, la chaleur, l'humidité et l'aération (Eliard, 1979).

#### **1.2.3 Phase levée- tallage**

Lors de la formation de la troisième feuille, une production de talles commence (Moule, 1971) ou une talle primaire apparait à côté de la feuille la plus âgée. La naissance de tallage désigne la fin du cycle végétatif (Ait-Sliman-Ait-Kaki, 2008).

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

### **1.2.4 Période de reproduction**

Cette période est caractérisée par la formation et la croissance de l'épi :

- **Phase montaison-Gonflement** : elle débute à la fin du tallage (dès que l'épi à 1 cm). Elle se caractérise par un allongement des entre-nœuds et la différenciation des pièces florales. Au cours de cette phase un besoin accru en éléments nutritifs notamment en azote (Clement-Grancourt et prats, 1971) la montaison dure de 29 à 30 jours.
- **Phase d'épiaison- fécondation** : elle est caractérisée par la miose pollinique, l'éclatement de la graine avec l'émergence de l'épi et la fin de la formation des organes floraux. Cette phase de fécondation s'achève lorsque 50% des épis à moitié sortis de la gaine de la dernière feuille. Cette phase à une durée de 32 jours.

### **1.2.5 Période de la formation et de maturation du grain**

Cette période comporte deux phases :

- **Phase de grossissement du grain** : au cours de cette phase les graines de blé prennent du poids grâce à l'évolution de l'embryon et l'albumen qui stock les substances de réserves. Tandit que celui des tiges et des feuilles diminue à la fin de cette phase les graines prennent une couleur jaunâtre (Ait-Sliman-Ait-Kaki, 2008).
- **Phase de maturation du grain** : au cours de cette phase les glucides et les protéines migrent vers les graines. Elle dure entre 25 et 26 jours.

## **1.3 Importance économique et situation du blé**

### **1.3.1 Situation du blé en Algérie**

Les céréales sont devenues des produits indispensables, de première nécessité en Algérie, en constituant une ressource alimentaire basique de l'humanité, une ressource privilégiée pour l'alimentation animale et une principale source de protéines. Ils possèdent plusieurs rôles tels que le rôle social, économique et politique dépassant le rôle traditionnel (considéré comme aliment) (Bouhadi *et al.* 2020).

La production algérienne de blé au cours de l'année 2022 est estimée à 30 millions de tonne et exploiter 3.2 million d'hectare de surfaces agricole au niveau national selon la direction de la régulation et du développement de la production agricole.

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

Néanmoins, la FAO prévoit un recul de la production locale de blé avec une diminution de 5.1 à 3.75 millions de tonnes. D'après les prévisions du département américain de l'agriculture (USDA), l'Algérie peut satisfaire qu'entre 34% et 36% de ses besoins en blé (FAO, 2021). A cet effet elle est classée parmi les plus gros importateurs de blé dans le monde.

### **1.3.2 Situation du dans le monde**

Le blé dur est considéré comme principale culture céréalière le fait qu'il participe d'une façon importante et diversifiée à l'alimentation humaine, à la superficie qu'il occupe, ainsi sa culture est pratiquée par tous les peuples du monde. Sa valeur nutritionnelle, sa résilience aux conditions environnementales difficiles et son importance économique en font une culture agricole précieuse à l'échelle mondiale.

Il occupe la première place dans la production mondiale et la deuxième dans l'alimentation quotidienne du bétail et la consommation humaine (Rastoin & Benabderrazik, 2014). Il devient le patrimoine culturel immatériel de l'humanité et cultivé dans près de 17 millions d'hectare dans le monde (Abecassis *et al.*, 2017).

### **1.4 Stress oxydatif chez les végétaux**

L'exposition des plantes à un stress environnemental peut entraîner une situation de stress oxydatif. Ce dernier se caractérise par un déséquilibre entre la balance des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et le système de défense antioxydants (Appel et Hirt, 2004) ce déséquilibre au niveau cellulaire est caractérisé par une surproduction des espèces réactives oxygénées ERO. En se diffusant à travers les parois végétales, ces ERO apportent des modifications assez néfastes au niveau des molécules biologiques responsables de l'intégrité cellulaire. Ainsi plusieurs dégâts cellulaires souvent irréversibles peuvent se manifester, comme l'oxydation des protéines, oxydation des bases de l'ADN, la peroxydation lipidique et peuvent entraîner des modifications de la fluidité membranaire.

#### **1.4.1 Radicaux libre**

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés (Halliwell, 2016). Cela leur confère une grande réactivité et peuvent participer à des réactions chimiques en altérant les cellules et les tissus. (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

### **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

Ces espèces chimiques peuvent être dérivées de l'oxygène (ERO). Ces derniers signifient à la fois des espèces radicalaires de l'oxygène et des espèces non radicalaire (Victor *et al.*, 2009).

**Tableau 10: Espèces réactives de l'oxygène radicalaire et non radicalaire et leurs formules chimiques (Halliwell, 2006).**

<b>ERO (Radicalaire)</b>	<b>Formule Chimique</b>
Oxygène moléculaire	$3O_2$
Dioxygène singulet	$1O_2$
Anion superoxyde	$^{\circ}O_2^-$
Radical hydroxyle	$*OH$
Radical hydroperoxyde	$HOO^{\circ}$
Radical peroxyde	$ROO^{\circ}$
Radical alkoxyde	$RO^{\circ}$
Radical oxyde nitrique	$NO^{\circ}$
Peroxinitrite	$ONOO^{\circ}$
<b>ERO (Non radicalaire)</b>	<b>Formule Chimique</b>
Hydroperoxyde	$ROOH$
Hypochlorite	$ClOH$
Ozone	$O_3$
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$

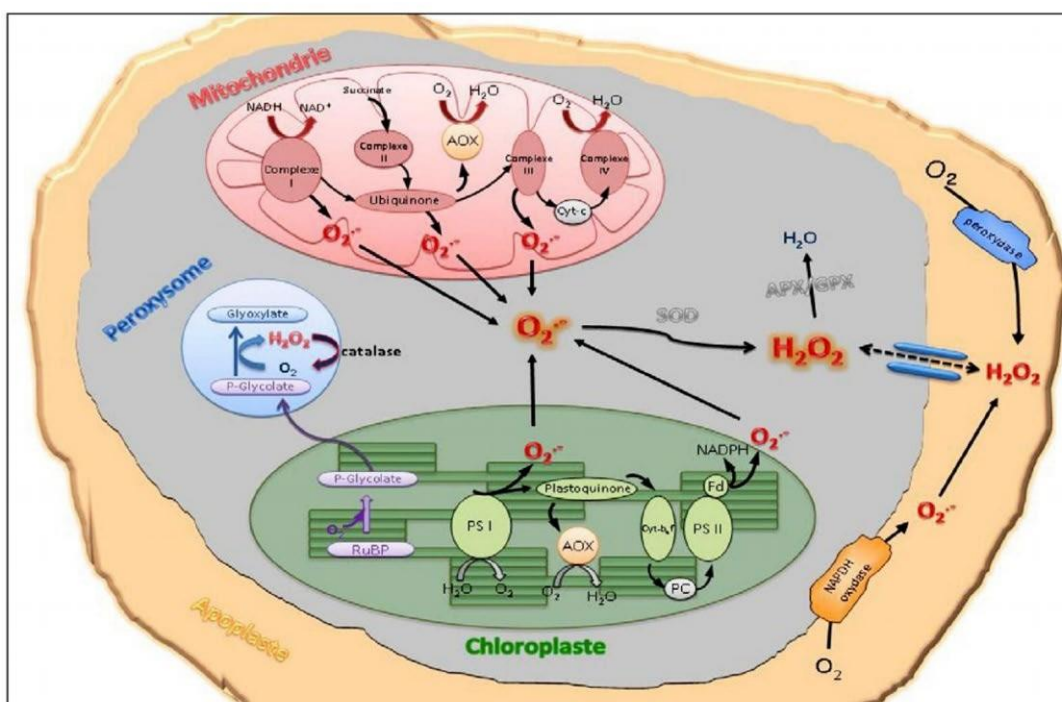
#### **1.4.2 Sources des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule végétale**

Chez la plante il existe de nombreuses sources cellulaires d'ERO, qui sont produites de façon permanente durant le métabolisme normal tel que la respiration cellulaire et la photosynthèse, ainsi que lors de réponses de défense face aux stress environnementaux tel que l'exposition à une forte lumière, sécheresse, des températures basses ou même des produits chimiques toxiques. Il existe plusieurs endroits de la cellule où se localisent les ERO tel que les chaînes de transport d'électrons (CET), mitochondrie, des chloroplastes, certaines enzymes comme les peroxydases et la chlorophylle. (Dat *et al.*, 2000 ; Blokhina *et al.*, 2003).

## CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR

**Tableau 11: Espèces réactives de l'oxygène radicalaire et non radicalaire  
(Halliwell,2006).**

Origine	Localisation	ERO
Photosynthèse, PSI ou PSII	Chloroplaste	$O_2^\circ$
Respiration (transport d'électrons	Mitochondrie	$O_2^\circ$
Glycolate oxydase	Peroxisome	$H_2O_2$
Chlorophylles excitées	Chloroplaste	$O_2^\circ$
B-oxydation des acides gras	Peroxisomes	$H_2O_2$
NADPH Oxydase	Membrane cellulaire	$O_2^\circ$
Oxalate oxydase	Apoplaste	$H_2O_2$
Xanthine oxydase	peroxysome	$O_2^\circ$
Peroxydases Mn <sup>2+</sup> et NADH	Membrane cellulaire	$H_2O_2$
Amine oxydase	Apoplaste	$O_2^\circ$ ; $H_2O_2$



**Figure 25 : Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène dans  
la cellule végétale (Bolwell, 2002).**

APX : Ascorbate peroxydase ; PSI photosystème I ; PSII : Photosystème II ; AOX : Alternative oxydase ; Fd : Ferredoxine (RuBP) ribulose 1,5- biphosphate

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

- **Les chloroplastes et l'appareil photosynthétique**

Au cours du processus photosynthétique, les cellules chlorophylliennes d'une part elles produisent de l'O<sub>2</sub> et d'autre part elles sont exposées à la génération d'ERO. Le chloroplaste est considéré comme étant la source principale de la production d'ERO chez les organismes photosynthétiques. (Edreva, 2005 ; Asada, 2006). Une inhibition de la photosynthèse et les électrons qui n'interviennent plus à la fixation du CO<sub>2</sub>, lors de la survenance d'un stress abiotique va entraîner la production et l'accumulation des ROS. Ainsi que l'inhibition du RuBP (carboxylation du ribulose 1,5-biphosphate qui entraîne la production de phosphoglycolate. En effet, une production du peroxyde d'hydrogène est effectuée lors du transport du phosphoglycolate vers le peroxysome et converti en glyoxylate par la glycolate (Parent *et al.*, 2008)

- **Les Peroxysomes**

Les peroxysomes sont des organites cellulaires, caractérisés par une membrane simple et leur contenu enzymatique riche en catalase. Elles sont considérées comme des organites spécialisés dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ERO), ainsi ils possèdent un rôle central dans le métabolisme des lipides et des acides. Les principales sources d'ERO au niveau des peroxysomes sont la B-oxydation des acides gras et la photo-respiration. (Corpas *et al.*, 2001 ; Nyathi and Baker, 2006).

- **La B-oxydation** : est un processus métabolique essentiel qui se produit principalement au niveau des peroxysomes, dans lequel les acides gras sont dégradés en acétyl-coA. En effet, ce dernier qui est un composé dérivé de ce processus qui est impliqué dans d'autre processus cellulaire tel que l'oxydation de l'Acyl CoA en entraînant la réduction du FAD en FADH<sub>2</sub>. Ainsi, La formation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est effectuée lors de la régénération du cofacteur qui s'effectue à son tour par la réduction d'une molécule d'O<sub>2</sub> (Nyathi and Baker, 2006).
- **Photorespiration** C'est un processus métabolique vital chez les plantes. Il se produit principalement dans le chloroplaste, la mitochondrie et le peroxysome (Foyer and Noctor, 2000).

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

- **Mitochondries et chaine respiratoire**

Elles constituent une source importante d'ERO. Ces organites constituent une source principale d'ERO dans les cellules non-chlorophylliennes, mais elles ne représentent qu'une faible part dans les cellules chlorophylliennes exposées à la lumière (Foyer and Noctor, 2003). Ainsi, lors de stress important, la génération d'ERO mitochondriales est considérée comme l'une des causes principales du vieillissement cellulaire.

### **1.4.3 Les cibles et conséquences des ERO dans la cellule végétale**

Les ERO sont des agents oxydants puissants qui altèrent toute une série de cibles biologiques importantes tel que :

- **Les lipides**

Lors d'un stress, un processus de peroxydation lipidique est déclenché qui va endommager les lipides des membranes cellulaires en altérant l'intégrité de ces dernières et perturbe les fonctions cellulaires essentielles (Moller *et al.*, 2007).

- **Les protéines**

Les protéines sont sensibles aux dommages causés par les ERO (Stadtman et levine, 2000 ; Favier, 2003). Les protéines qui comportent un groupement sulphydryle, SH, sont les plus touchées par le peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle (Stadtman et levine, 2000). Ces dommages peuvent perturber les processus cellulaires.

- **Les acides nucléiques ADN**

Ils sont très sensibles aux radicaux libres. Ces derniers peuvent avoir des effets dommageables sur l'ADN entraînant des mutations génétiques des lésions de la structure de l'ADN et même des ruptures de brins. Ils peuvent avoir même des conséquences importantes sur la membrane cellulaire (Cooke *et al.*, 2003).

- **Les composés non protéiques et non lipidiques :**

Les ERO peuvent également réagir avec d'autres composants cellulaires tels que les glucides, affectant ainsi divers processus métaboliques et cellulaires.

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

### **1.5 Les mécanismes antioxydants**

Afin d'éviter l'accumulation des substances oxydantes et échapper aux effets nocifs du stress oxydatif, les plantes font intervenir un système de défense qui leur permet de neutraliser les radicaux libres formés et de rétablir une balance oxydants/antioxydants bien équilibrée. La plante possède un système de défense non-enzymatique qui regroupe des substances qui piègent et réduisent ces espèces, grâce à leur structure chimique. Ainsi qu'un système de défense enzymatique qui regroupe un ensemble d'enzymes qui agissent en synergie pour catalyser les réactions d'oxydation et limiter l'action des ERO.

#### **1.5.1 Les antioxydants non-enzymatiques**

- **L'ascorbate ou Vitamine C**

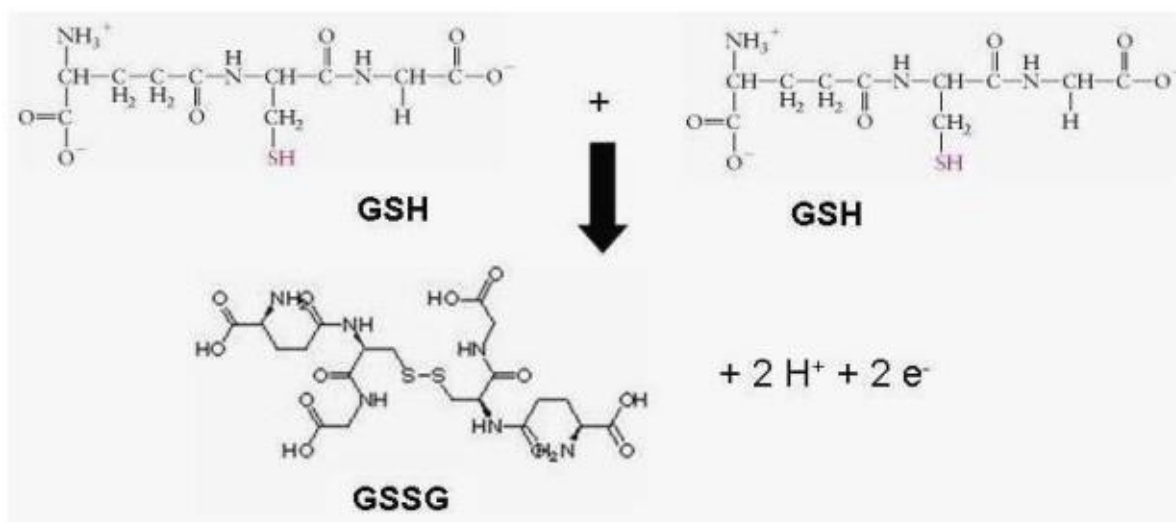
L'acide ascorbique (ASC) est considéré comme l'un des principaux acides faibles de la cellule végétale. Il se dissocie en anion d'ascorbate dans les conditions physiologiques (pH).

L'ascorbate est présent dans tous les compartiments des cellules et dans la matrice extracellulaire. Il est connu pour ses propriétés antioxydantes (Potters *et al.*, 2002 ; Foyer and Noctor, 2005). L'ascorbate réagit principalement avec l'anion superoxyde, l'oxygène singulet ou le peroxyde d'hydrogène (Amako *et al.*, 1994).

- **Le Glutathion**

Le Glutathion est un tripeptide ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) très abondant se trouvant de façon ubiquitaire chez les végétaux. Il réagit avec différents intermédiaires du stress oxydatif, peroxyde d'hydrogène et radicaux superoxydes et hydroxyle, son oxydation entraîne la formation d'un pont disulfure entre les cystéines de deux GSH, appelée GSSG.

### CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR



**Figure 26 : Oxydation de deux molécules de GSH conduisant à l'établissement d'un pontdisulfure et la formation de GSSG.**

Le Glutathion joue des rôles physiologiques chez les végétaux, il est présent à des concentrations importantes dans les cellules végétales, en particulier dans les chloroplastes (Noctor *et al.*, 1998). Ce tripeptide sert comme un substrat pour le glutathion S-transférase (GST) qui catalyse sa conjugaison avec les xénobiotiques et également il participe à leur détoxification (Marrs, 1996). Il participe dans la régulation redox du cycle cellulaire (Noctor *et al.*, 1998). La production de GSH est stimulée lors des différentes situations de stress et son accumulation (Noctor *et al.*, 1998 ; Potters *et al.*, 2002).

- **La vitamine E**

La vitamine E est un antioxydant le plus important dans la prévention de la peroxydation lipidique des membranes (Fryer, 1992). Il correspond à un groupe de composés lipophiles possédant l'activité biologique de l' $\alpha$ -tocophérol (Njus and Kelley, 1991). Ce dernier est considéré comme un piègeur d'oxygène singulet et de radical hydroxyle (Krieger-Liszkay and Trebst, 2006). Cette vitamine est donc un antioxydant clé dans la protection de l'intégrité des membranes (en particulier les membranes des chloroplastes) ainsi elle participe à la protection de l'appareil photosynthétique et les pigments photosynthétiques. (Fryer, 1992).

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

### **1.5.2 Les Antioxydant enzymatiques**

Les cellules végétales possèdent de nombreuses voies de dégradation enzymatiques des ERO

- **Glutathion –S- transférase (GST)**

La glutathion S- transférase (GST) est une famille multifonctionnelle des enzymes de détoxification. Elles sont ubiquitaires et sont retrouvées principalement dans le cytoplasme et les mitochondries (Sheehan *et al.*, 2001). Ces enzymes jouent un rôle crucial dans le métabolisme et la détoxification des composés toxiques et des produits de stress oxydatif.

Leur principale fonction est de conjuguer le glutathion (GSH) à une variété de substrats hydrophobes, rendant ces substrats plus solubles dans l'eau et donc plus facilement excrétés de la cellule. Elles permettent aussi le transport du GSH vers les compartiments cellulaires subissant des dommages oxydatifs et assurent la liaison du GSH aux aldéhydes issus du processus de la peroxydation lipidique (Gill et Tuteja, 2010).

- **Les superoxydes dismutases (SOD)**

Les superoxydes dismutases (SOD) sont métallo-enzymes se trouvant au niveau cellulaire de la plante à proximité des sites de production d'O<sub>2</sub>\*.

Elle opère une oxydoréduction entre deux molécules identiques dont l'une oxyde (O<sub>2</sub>\* en O<sub>2</sub>) et l'autre se réduit (O<sub>2</sub>\* en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Arora *et al.*, 2002).

Les plantes possèdent trois types de SOD contenant des groupements prosthétiques renfermant des métaux différents : du fer (FeSOD), du manganèse (MnSOD) ou du cuivre et du zinc (Cu/Zn SOD).

**Tableau 12: Les types de superoxyde dismutase (SOD).**

<b>Superoxyde dismutase</b>	<b>Localisation intracellulaire</b>
<b>Cu/Zn-SOD</b>	Cytosol
<b>Fe-SOD</b>	Chloroplastes (détectable dans mitochondries et le cytosol)
<b>Mn-SOD</b>	Exclusivement mitochondriales

### **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

- **Les Catalases**

Les catalases sont des enzymes antioxydantes majoritairement peroxysomales qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène (Arora *et al.*, 2002). Elles possèdent un rôle principal représenté par la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit à proximité par la CTE chloroplastique, en particulier produite par les processus peroxysomaux, de B-oxydation et de la photorespiration (Smirnoff, 1998) les peroxydases et les peroxyredoxines sont considérées comme les enzymes clés de la détoxification de cet ERO chez les plantes. La CAT alors ne serait qu'un dévidoir permettant de limiter les productions excessives d'ERO (Willekens *et al.*, 1997).

- **Les peroxydases (POX)**

Les POX sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques, ils catalysent la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs des électrons.

Une partie des POX de classe I et III peut posséder une activité similaire à la catalase en réduisant l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en absence de co-substrat (Mika *et al.*, 2004). Au niveau cellulaire, les POX de classe III se trouvent dans l'apoplaste ou liées aux parois et membranes, alors que les POX de classe I sont présentes uniquement à l'intérieur des cellules.

- **Les peroxyredoxines (PRX)**

Les PRX aussi appelées thiorédoxines peroxydases, sont des enzymes non hémiques. Elles possèdent les mêmes capacités peroxydasiques que les POX avec une efficacité moindre (Navrot *et al.*, 2006).

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

### **2. Matériel et méthodes**

Notre expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de physiologie végétale au sein de l'université Badji Mokhtar- Annaba.

#### **2.1 Matériel biologique**

Le matériel biologique utilisé dans notre expérimentation est le Blé dur *Triticum durum* Desf, fournis par les Moulins Amor BENAMOR.

- **Caractéristique du blé utilisé**

<b>Origine du blé</b>	<b>Canadien</b>
Taux de protéine (%)	15.68
Taux d'humidité (%)	12.25

- **La classification du blé dur selon Cronquist, 1981 :**

**Tableau 13: Classification du blé dur (Cronquist, 1981).**

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous-règne</b>	Tracheobionta
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Liliopsido
<b>Sous-classe</b>	Commelinidae
<b>Ordre</b>	Cyperales
<b>Famille</b>	Poaceae
<b>Genre</b>	<i>Triticum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Durum</i>

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

### **2.2 Matériel chimique**

Le traitement du blé est effectué par pulvérisation des  $\alpha$ -aminophosphonates à des concentrations indiquées dans le tableau suivant :

**Tableau 14: La gamme de concentrations des cinq molécules aminophosphonates  
enumol/l.**

<b>Molécule</b>	<b>Concentration Umol/L / 500g du sol</b>	
<b>BR1</b>	<b>400</b>	<b>480</b>
<b>BR2</b>	<b>400</b>	<b>480</b>
<b>BR3</b>	<b>340</b>	<b>500</b>
<b>BR4</b>	<b>340</b>	<b>500</b>
<b>BR5</b>	<b>340</b>	<b>500</b>

L'activité de ces molécules est comparée à un témoin et un insecticide de référence organophosphoré commercialisé sous le nom de Flurophos Chlorpiriphos appartenant à la même famille après une durée d'exposition de 07 jours.

### **2.3 Méthodes**

#### **2.3.1 Conduite de l'essai**

##### **2.3.1.1 Préparation des graines de blé**

Les graines de blé dur sont incorporer dans une solution d'hypochlorite de sodium à 3+ pendant 5 minutes, puis rincées avec du l'eau distillée afin de les désinfecter (meksem *et al* , 2007). Nous avons choisis que les graines de blé dur saintes et ne présente aucune anomalie apparente (cassure, tache...).

##### **2.3.1.2 Culture du blé**

Pour évaluer la toxicité des molécules d'alpha aminophosphonates sur les plantes de blé dur, en analysant des biomarqueurs de stress oxydatif, nous avons utilisé les essais en pots en plastiques. Chaque pot est rempli d'un mélange de sol et de terreau, les graines sont enfoncer environ de 2 cm de profondeur (20 graines par pot), puis elles sont recouvert en tassant légèrement.

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

Un arrosage de 150 ml par pot a été effectué 3 fois par semaine (l'eau de robinet) en pluie fine pour ne pas déplacer les grains. Le traitement est réalisé dans 14 jours (stade de trois feuilles)

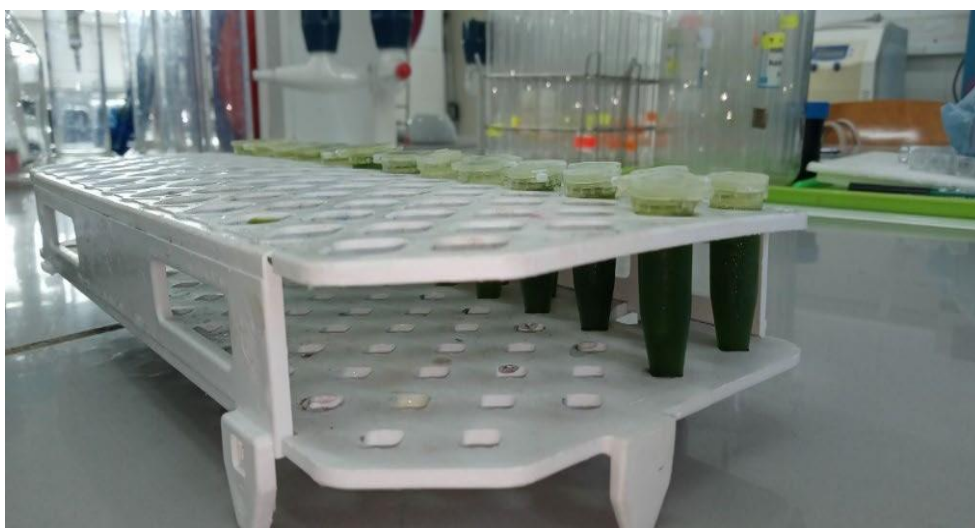
Pour chaque concentration trois répétitions sont effectuées

### **2.3.2 Dosage de quelques biomarqueurs de stress oxydatif**

#### **2.3.2.1 Dosage Enzymatique**

##### **2.3.2.1.1 Préparation de l'extrait enzymatique**

L'extrait enzymatique est préparé selon la méthode Loggini *et al.*,(1999) et Ferfar, (2016). Après sept (07) jours de traitement, 1g des feuilles fraîches pour chaque concentration et pour chaque répétition sont broyées à froid à l'aide d'un mortier dans 5ml de tampon phosphate (50mM, Ph+ 7.5). Ensuite l'homogénat est procédé à une centrifugation à froid 12000g pendant 20min après être filtré à l'aide d'un papier filtre. Le surnageant obtenu sera utilisé comme extrait pour la mesure de l'activité de Catalase (CAT) et le Glutathion transférase (GST).



**Figure 27 : Préparation de l'extrait enzymatique.**

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

### **2.3.2.1.2 Détermination des mesures spectrophotométriques**

Les différentes mesures spectrophotométriques suite aux dosages enzymatiques de la CAT et GST sont quantifiées selon la formule suivante décrite par servais , (2004) :

$$\text{ACT (nmol/mn/mg de protéine)} = \frac{\Delta\text{DO} * \text{Vt}}{\varepsilon * t * L * \text{Ve} * \text{mg de protéine}}$$

**Act** : Activité enzymatique de CAT et GST.

**ε** : Coefficient d'extinction molaire : 39.4.

**ΔDO** : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

**Vt** : Volume total du mélange en ml.

**Ve** : Volume de l'extrait enzymatique en ml.

**L** : Largeur de la cuve en cm.

**Mg de protéine** : Teneur en protéine en mg

**T** : temps de lecture en min.

### **2.3.2.1.3 Mesure de l'activité catalase (CAT)**

Le dosage de l'activité Catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de Boscoloa *et al.*, (2003). La décroissance de la DO est enregistrée pendant trois minutes pour une longueur d'onde de 240 nm.

La mesure des absorbances est effectuée contre un blanc ou l'extrait enzymatique est éliminé. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité CAT est exprimée en nmol/min/ mg de prot

### **2.3.2.1.4 Mesure de l'activité Glutathion S-Transférase (GST)**

La mesure de la Glutathion-S-Transférase est déterminée par la méthode de Habig *et al.*, (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB en présence du Glutathion (GSH), la lecture des absorbances est enregistrée toute les 15 secondes pendant 1 minute à 340 nm dans un spectrophotomètre visible/ UV contre un blanc contenant 200 ul d'eau distillée remplaçant la quantité du surnageant.

L'activité GST est exprimé en nmol/ min/mg de prot.

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

### **2.3.2.2 Dosage non enzymatique**

#### **2.3.2.2.1 Mesure de la teneur en Glutathion (GSH)**

La détermination de la teneur GSH est déterminée par la méthode de Weckbecker et cory (1988).

L'extrait enzymatique est homogénéisé dans une solution EDTA (d'éthylène diamine tétré-acétique) à 0.02 M et subissent une déprotéinisation par l'acide sulfo-salicylique (ASS) 0.25%.

Après centrifugation à 2000g pendant 10 minutes le surnageant est utilisé pour la mesure spectrophotométrique avec le réactif DTNB (5.5'-dithiobis-2- nitrobenzoic acide) à 0.01 M à une longueur d'onde de 412 nm. Les résultats sont exprimés en umol/ Mg de protéine.

Le taux de glutathion (GSH) est estimé selon la formule suivante :

$$\text{GSH (umol/mg de protéine)} = \frac{\text{DO} * 1 * 1.525}{13.1 * 0.8 * 0.5 * \text{Mg de protéine}}$$

**DO** : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat

**1** : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.2 ml ASS+ 0.8ml homogénat)

**1.525** : volume total des solutions utilisé dans le dosage (0.5ml surnageant + 1 ml tris/EDTA+ 0.025 ml DTNB).

**13.1** : Coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH).

**0.8** : Volume en ml de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation.

**0.5** : volume en ml de surnageant utilisé.

**Mg de protéine** : Quantité de protéines exprimée en mg.

### **2.3.2.3 Analyse statistique**

L'analyse de la variance à un facteur contrôlé pour effectuer des tests de comparaisons multiples afin d'expliquer les différences entre les moyennes des différentes activités enzymatiques et facteurs physiologiques.

Les résultats sont interprétés comme suit :

Si P = 0,05 → RHO → il existe des différences significatives \*

Si P = 0,01 → RHO → il existe des différences hautement significatives\*\*

Si P = 0,001 → RHO il existe des différences très hautement significatives \*\*\*

**CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES  
A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

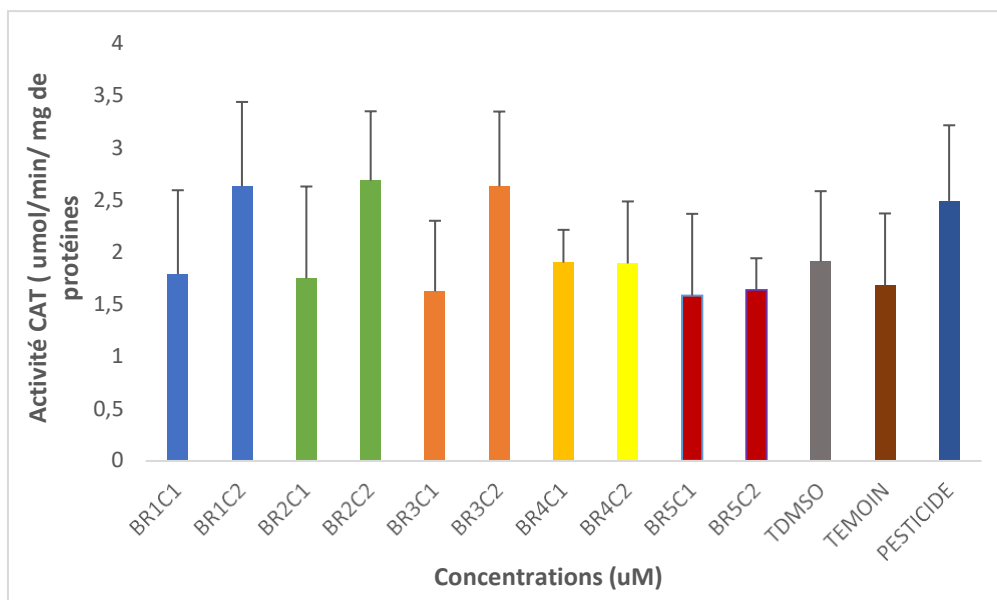
***Résultats***

## CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR

### Résultats

#### 1. Effets sur la variation de l'activité Catalase (CAT)

L'effet des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sur l'activité Catalase chez le blé traités et témoin est illustré dans la figure 28.



**Figure 28 : Evolution de l'activité CAT chez le Blé en fonction des différentes concentrations de cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates.**

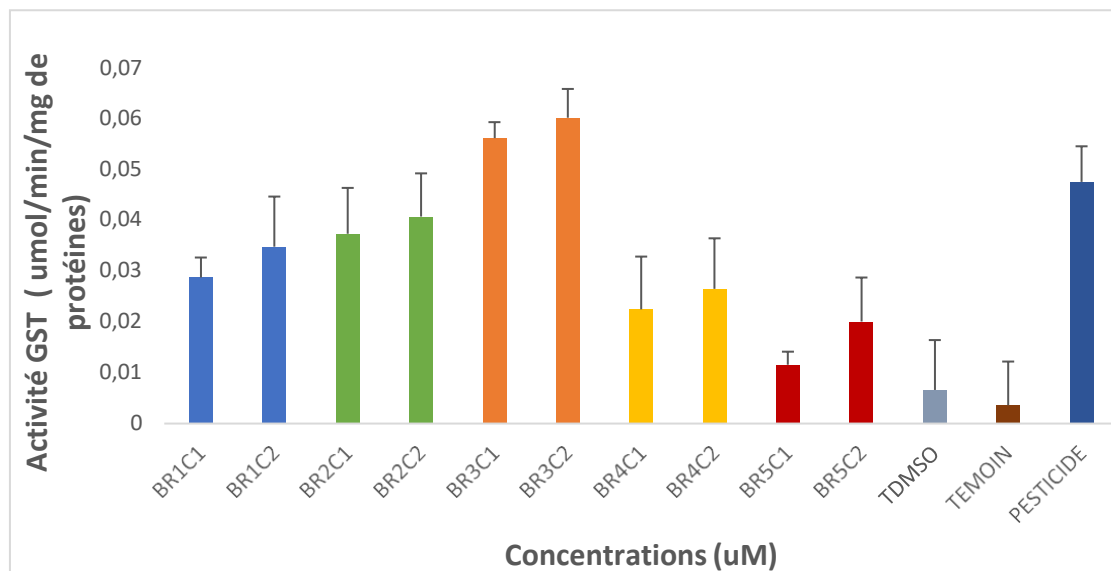
Nos résultats montrent que le blé traité par les faibles concentrations des molécules BR1 et BR2 et BR3 ainsi que les différentes concentrations des molécules BR4, BR5, TDMSO ne subissent aucune variation de l'activité CAT comparée au témoin après la durée d'exposition 7 jours.

En revanche, nous remarquons une augmentation significative environ de 30% de l'activité catalase chez le blé traité par les fortes concentrations d' $\alpha$ -aminophosphonates des molécules BR1, BR2, BR3 et le pesticide de référence par rapport à l'activité du témoin après 7 jours du traitement.

### CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR

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

La figure ci-dessous illustre l'effet des concentrations croissantes des molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sur l'activité GST chez le blé après 7 jours de traitement.



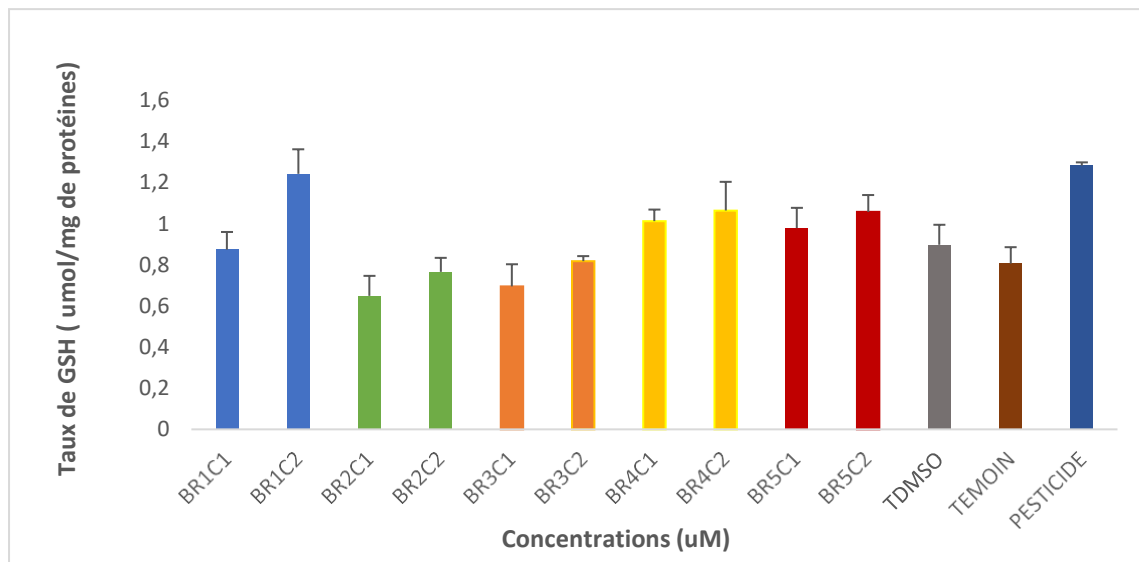
**Figure 29 : Evolution de l'activité GST chez le blé dur en fonction des concentrations croissantes des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates.**

Nous remarquons une augmentation significative de l'activité GST chez le blé traité par les différentes concentrations des molécules BR1, BR2, BR4 et BR5 par rapport à l'activité du témoin. Ainsi, nous remarquons une augmentation remarquable très significative de l'activité GST chez le Tpesticide (0.045  $\mu$ mole/mn/mg de protéines) et les différentes concentrations de la molécule BR3 (0.056 et 0.060  $\mu$ mole/mn/mg de protéines) respectivement par rapport aux témoins (0.003  $\mu$ mole/mn/mg).

### **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

#### **3. Détermination du taux de Glutathion (GSH)**

La figure 30 illustre les variations du taux du glutathion GSH chez le blé dur traité par les différentes concentrations  $\alpha$ -aminophosphonates, pesticide de référence et le témoin.



**Figure 30 : Variation du taux de GSH chez le Blé exposé aux concentrations des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates.**

Nous remarquons que le taux de GSH augmente chez le blé traité par les différentes concentrations des molécules BR1, BR4 et BR5 alors qu'il diminue pour les concentrations des molécules BR2 et BR3 par rapport au témoin après 7 jours de traitement.

L'ensemble de ces valeurs restent inférieurs aux valeurs du Tpest qui montre une augmentation significative qui atteint un maximum (1.28 umol/mn/mg de protéines) comparé au témoin. Notons que la concentration C2BR1 présente un taux de GSH presque identique à celui du pesticide de référence.

**CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES  
A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

***Discussion***

## **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

### **Discussion**

La plante exposée aux différents types de stress met en œuvre diverses stratégies de défense, constitutives ou induites. Elle perçoit un stimulus qui engendre l'émission de signaux. Ces derniers sont transmis à l'intérieur de la cellule végétale en déclenchant l'activation de gènes codant pour des enzymes du métabolisme afin de synthétiser des molécules de défense tel que la catalase CAT, la superoxyde dismutase SOD. (Kangasjarvi *et al.*, 1994 ; pell *et al.*, 1997 ; Noctor *et al.*, 1998 ; Yaiche, 2017 ; Hasanuzzaman, 2020).

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antioxydantes enzymatiques tel que la catalase, Glutathion S-transférase ainsi que la variation du taux des antioxydants non enzymatique comme la GSH chez le blé dur.

La catalase CAT est une enzyme oxydoréductase, localisé essentiellement dans le peroxyosome, elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et dioxygène (Bhaduri et Fulekar, 2012) . Cette enzyme est considéré comme un biomarqueur central dans la protection contre le stress oxydant (Kim *et al.*, 2005).

Dans notre expérience, **nous avons noté que le blé traité par les faibles concentrations des molécules BR1, BR2, BR3 ainsi que les concentrations croissante des molécules BR4, BR5 et le TDMSO ne subissent aucune variation de l'activité CAT par rapport au témoin après sept jours d'exposition.** Ce résultat signifie que le métabolisme de la plante n'est pas affecté par ces molécules. Ce qui peut être expliqué par la très faible toxicité de ces molécules.

**En revanche, nous remarquons une augmentation significative de l'activité CAT chez le blé traité par les fortes concentrations d' $\alpha$ -aminophosphonates BR1, BR2, BR3 et le pesticide de référence (Dursban) par rapport à l'activité du témoin après sept jours du traitement.** L'augmentation de l'activité CAT après la durée d'exposition peut être expliquée par la toxicité des molécules qui ont affectés le fonctionnement de la plante, ce qui a provoqué le déclenchement des systèmes de détoxification à travers la synthèse de la CAT. Ceci permet à la plante de survivre au stress engendré par ces molécules et à éliminer les ROS. Nos résultats sont en accords avec ceux de Kim *et al.*, (2005) et Khosravinejad *et al.*, (2008) qui ont montrés que l'activité CAT augmente dans les feuilles des céréales pendant un stress. Et de Ferfar, (2016) qui a montré une stimulation de l'activité CAT chez le blé exposé par des herbicides sulfonylurées.

### **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

Les travaux de Benhamadi, (2014) ont révélé une augmentation de l'activité CAT avec la concentration des métalloïdes (Antimoine Sb ; Arsenic As) dans les parties supérieures de la plante.

Ainsi, d'autres travaux ont montrés une activité CAT plus élevée chez les plante exposés aux plusieurs situation de stress afin de les protéger contre les adversités et assurer leur survie (Taiz et Ziger, 2002 ; Pang *et al.*, 2002 ; reddy *et al.*, 2005 ; Mishra *et al.*, 2006b).

En parallèle, nous avons mesurés l'activité Glutathion S-transférase (GST) qui forme une superfamille d'enzymes multifonctionnelles tel que l'activité peroxydase, isomerase ou thiol transférase, ainsi d'intervenir dans la modulation de la signalisation cellulaire (Dixon *et al.*, 2010). Elle est très soluble et considérée comme une enzyme majeure de la détoxification enzymatiques des xénobiotiques, intervient dans la réponse des plantes aux Différents stress biotiques et abiotiques (Anjum *et al.*, 2012) cette enzyme est dans la plupart du temps cytosoliques, mais présente aussi dans les microsomes, les plastides, les nucleus et apoplaste ( Foyer et Noctor, 2005).

Dans cette étude, **nous avons constaté une augmentation dose-dépendante de l'activité GST chez le blé traité par les cinq molécules d' $\alpha$ -aminophosphonates et le pesticide de référence (Dursban) par rapport au témoin durant 7 jours d'exposition.** Cette induction révèle une réponse au stress oxydatif provoqué par la présence de ces molécules vu que les enzymes de biotransformation principalement la catalase sont parmi les premières à répondre à la présence d'un xénobiotique dans l'organisme végétale.

En effet la réponse de la cellule végétale au stress oxydatif est modulée en fonction des concentrations des ROS. Vranova *et al.*, (2002) ont montrés que les faibles doses du xénobiotique permet la mise en place d'enzymes antioxydantes et l'arrêt du cycle cellulaire tandis que les fortes doses des ROS provoque la mort cellulaire. Des travaux similaires ont montrés l'induction de l'activité GST, ceux de Bouchlaghem *et al.*, (2011) qui a mis en évidence une augmentation significative du taux de GST chez le blé dur *Triticum durum* exposés aux engrais phosphatés (NPK) au niveau des tiges après sept jours de traitement.

Ainsi les travaux de Sbartai *et al.*, (2012) qui a déterminé que l'induction de l'activité GST chez la tomate exposée au cadmium permet à la plante de tolérer puis de s'adapter au xénobiotiques.

### **CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR**

Le Glutathion GSH est aussi un antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules végétales, le plus abondant et impliqué dans la protection des cellules contre les effets toxiques des xénobiotiques (Disckinson et Forman, 2002). Ce tri-peptide joue de nombreux rôles physiologiques chez les végétaux, il intervient dans différents processus tel que la différenciation cellulaire (Ogawa *et al.*, 2004) la résistance aux pathogènes maintiens un équilibre redox dans les compartiments cellulaires grâce à sa forme oxydées (GSSG) (Foyer et Noctor, 2005).

Il intervient également dans la défense antiradicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la GST. (Barillet, 2007). En résumé le GSH constitue un mécanisme de détoxification critique impliqué contre le stress oxydant (Hayes et McLellan, 1999).

Selon nos résultats, **nous avons constaté une diminution du taux de glutathion GSH chez le blé traité par les différentes concentrations des molécules BR2 et BR3 par rapport au témoin après sept jours de traitement.** Ce qui peut confirmer que le mécanisme de défense en question est dépassé et remplacé par un système de défense enzymatique antioxydant plus performant la GST en réponse au stress oxydatif généré par ces molécules. Cette réduction est également observée par (Hernandez *et al.*, 2000 ; Nagalakshmi et Prasad, 2001).

D'après Mittler, (2002), les ROS influent sur la viabilité des cellules en causant la peroxydation lipidique, les dommages aux membranes ainsi que l'inactivation des enzymes.

**En parallèle, une légère augmentation a été observée chez le blé traité par les molécules BR1, BR4, BR5 et pesticide de référence (Dursban). L'ensemble de ces valeurs restent inférieures aux valeurs du pesticide de référence, sauf que la C2BR1 présente un taux presque identique à celui du pesticide de référence.** Les ROS interviennent dans les cascades de signalisation responsable de l'induction et de la régulation de nombreux gènes de défenses tel que la GSH (Wang *et al.*, 2003).

En effet, la concentration en GSH est très importante dans les cellules végétales, et en particulier dans les chloroplastes (Noctor *et al.*, 1998) sa synthèse est stimulée lors des différentes situations de stress et son accumulation est souvent concomitante avec celle des ERO (Potters *et al.*, 2022). Plusieurs auteurs ont montrés que l'augmentation de l'activité GSH

### ***CHAPITRE III : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE BLE DUR***

est liée aux différentes formes de stress et son accumulation est souvent simultanée avec celle des ERO (Noctor *et al.*, 1998 ; Benavides *et al.*, 2000 ; Potters *et al.*, 2002).

## ***CHAPITRE IV :***

***Evaluation de la toxicité des  
molécules***

***$\alpha$ -aminophosphonates sur le  
ver de terre***

## *CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE*

Les vers de terre sont considérés comme des ingénieurs de l'écosystème. Ils participent dans le développement de la structure du sol, la régularisation du climat, de l'eau et la remédiation à certaines pollutions (Blouin *et al.*, 2013).

L'excès d'utilisation des pesticides et le non-respect de la méthode d'utilisation de ces produits provoquent des effets néfastes sur la faune du sol tel que. (Appel et Hirt, 2004). En effet l'exposition de ces espèces aux différents pesticides peut provoquer un affaiblissement des défenses immunitaire, la baisse de fertilité et des modifications des comportements (Magdeline, 2013)

C'est dans ce contexte que nos travaux ont été menés afin d'évaluer le potentiel toxique d'une série de dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés sur une population non ciblée : le ver de terre.

### **1. Généralité sur les vers de terre**

Les vers de terre sont des invertébrés représentant la famille des lumbricidae qui est la famille la plus importante des Oligochètes. Ils font parties des animaux terrestres les plus anciens, omniprésent dans tous les sols (tempérés ou tropicaux) mais rarement dans, les sommets des montagnes, les déserts et les zones manquant en sol et végétation Römcke *et al.*, (2005).

Selon le centre national de la recherche scientifique français-CNRS, 2005, environ 10 000 d'espèces présentent dans le monde (Römcke *et al.*, 2005).. Ces vers peuvent atteindre environ 1 million d'individus à l'hectare et 2 tonnes par hectare respectivement (Lavelle, 1983).

Ils jouent un rôle essentiel dans la formation et l'entretien des sols fertiles, maintien la fertilité et la préservation la structure du sol grâce aux différents mécanismes physico-chimiques et biologiques. (Razafindrakoto, 2013).

#### **1.1 Classification des vers de terre**

Selon Bouché, (1977) les vers de terres sont repartis en trois grandes catégories écologiques en fonction des niches écologiques qu'ils occupent, des critères morphologiques et leur mode de vie :

- **Les épigés**

Ils sont de petite taille (environ de 10 à 30 mm), présentant des cycles de vie courts (1 à 2 ans).leur corps est très pigmentés en les protégerait des rayons UV. Ces espèces sont soumis à

## CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE

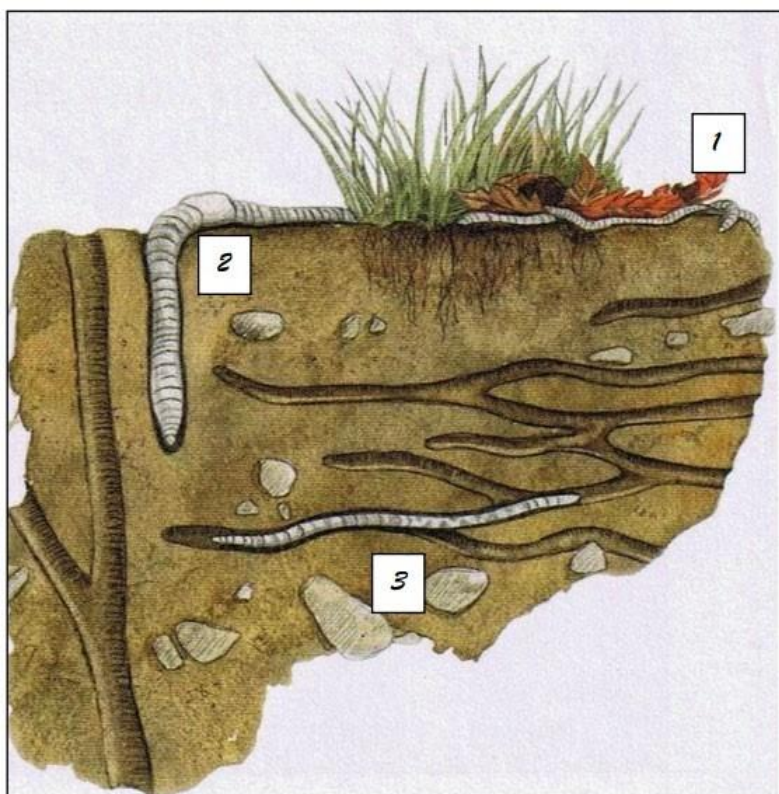
une forte prédation vu leur localisation en surface. Ils jouent un rôle important dans le recyclage de la matière organique.

- **Les anéciques**

Elles sont de taille variable (moyenne à géante), de durée de vie moyenne. Ils se caractérisent par une pigmentation suivant un gradient antéro-postérieur. Ces espèces creusent des galeries profondes verticales et se nourrissent essentiellement de sol et des feuilles en décomposition à la surface du sol.

- **Les endogés**

Elles sont de petite taille à moyenne (environ de 1 à 20 cm), non pigmentés, ils ont un mode de vie mixte. Ces lombriciens creusent des galeries d'orientation horizontale et se nourrissent de sol plus ou moins riche en matière organique.



**Figure 31: Coupe du sol présentant les trois grandes catégories de vers de terre en fonction des niches écologiques qu'ils occupent (CNRS, 2005).**

*(1) Les épigés ; (2) les anéciques ; (3) les endogés.*

## CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE

### 1.2 Taxonomie des vers de terres

#### 1.2.1 Description morphologiques

Les vers de terre sont des annélides fousseurs, possédant un corps mou grâce à un léger mucus. Ils sont constitués par plusieurs segments et ils se déplacent en contractant et allongeant alternativement leurs segments. L'extrémité postérieure est légèrement aplatie et l'extrémité antérieure est pointue. Le vaisseau sanguin dorsal est visible à travers la surface supérieure de la peau. Ils sont caractérisés par une pigmentation dorsale plus foncée que la face ventrale. (Carion, 2012). Ces espèces ont une odeur généralement discrète, mais relativement forte et désagréable chez *Eisenia Fetida* (Baha, 2008). Le corps des vers de terres sont composés de trois régions successives : le prostomium, le soma et le pygidium avec des soies implantées dans la paroi des corps.

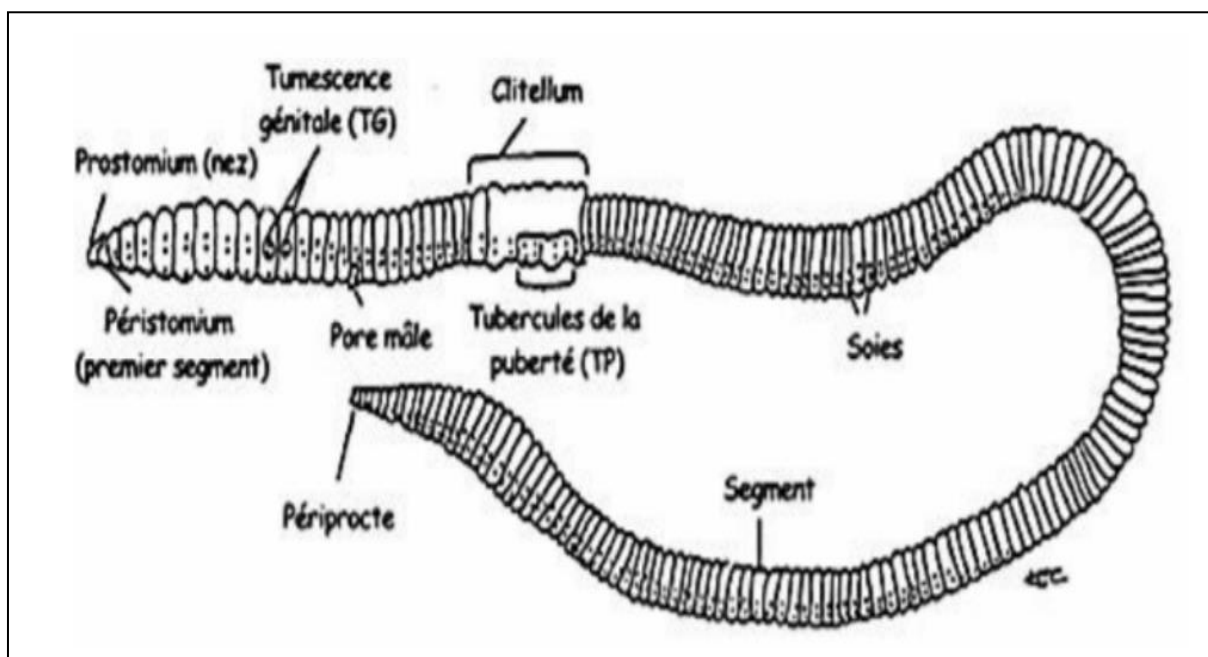
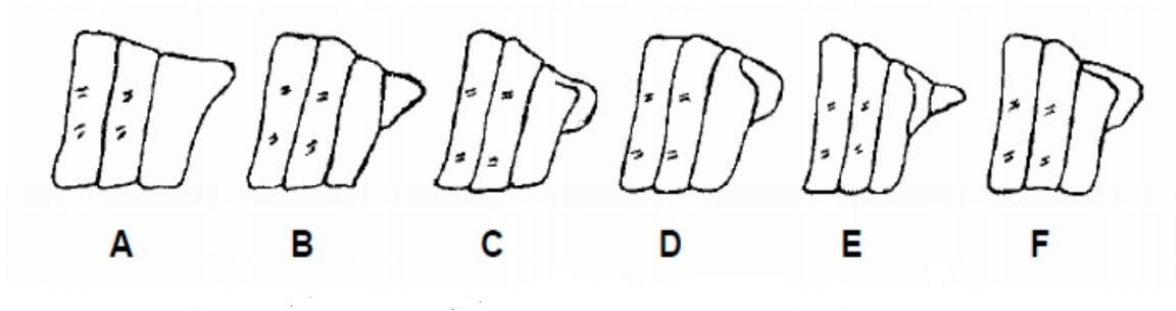


Figure 32: Schéma caractérisant la morphologie de ver de terre (Bachelier, 1963).

## CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE

- **Prostomium**

Le prostomium (du grec pro, devant et bouche) est la forme triangulaire, c'est un petit organe situé au-dessus de la bouche et fusionné avec le premier segment (péristomium). Chez les vers de terre, il existe plusieurs Prostomium sont représentés dans la figure ci-dessous



Prostomiums : zylobique (A), prolobique (B), épilobique ouvert (C), épilobique, fermé (D), subdivisé (E) et tanylobique (F)

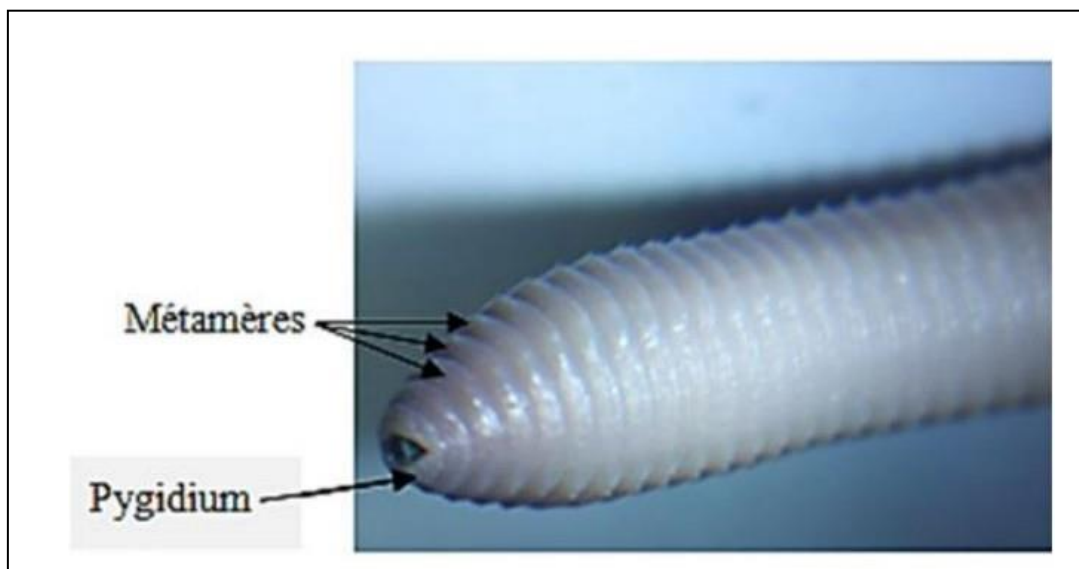
**Figure 33 : Les différents types de Prostomium (Bouché, 1972).**

- **Soma**

Le soma constitue la quasi-totalité du corps. Il est entièrement métamérisé (segmenté), c'est-à-dire le corps du ver est constitué d'une série de nombreux anneaux successifs appelés les métamères. (Figure 34)

- **Pygidium**

Le pygidium (du grec pyge, fesse) est le dernier segment de l'animal (Figure 34), dépourvue de cavité cœlomique et qui entoure l'anus.



**Figure 34 : Pygidium et métamères de vers de terre (Bouazdia, 2019).**

## CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE

### • Les soies

Les soies sont de natures protéiques, doubles et rigides. Elles sont groupées en quatre faisceaux au niveau de chaque segment à l'exception du peristomium et prosomium, deux latéraux ventraux et deux latéraux dorsaux. (Bouché , 1972).

Il existe deux types de soie : un type lombricienne qui contient 4 paires de soies par segment et un type perichaetienne qui contient plus de huit (08) soies par segment

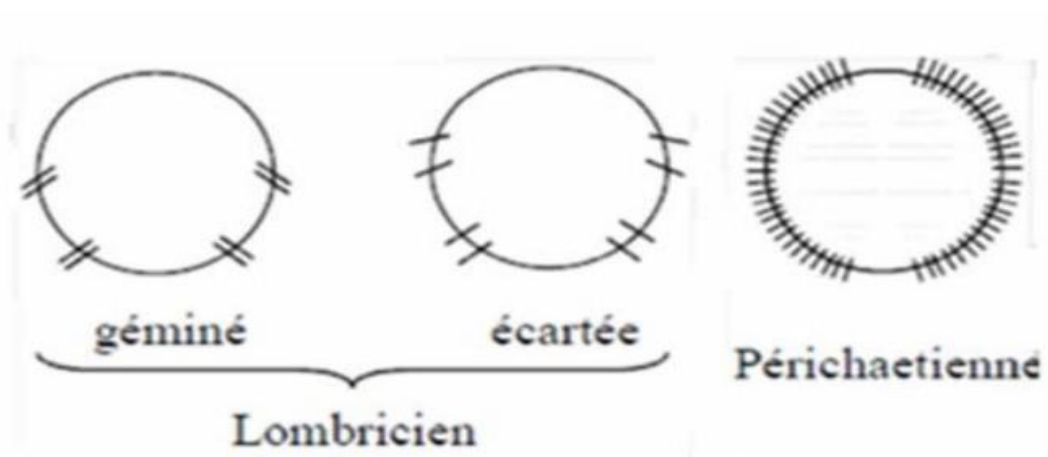


Figure 35: Disposition des soies chez le ver de terre (Bouché, 1972).

### 1.2.2 Anatomie interne

La structure interne est composée d'un système respiratoire, un système circulatoire, un système nerveux, système digestif, un système excréteur et un système reproducteur. Ainsi d'un épiderme qui constitue l'enveloppe externe du ver de terre appelée la cuticule :

#### Un système respiratoire :

Ils respirent à travers leur peau (cuticule), par le mécanisme de la respiration cutanée, d'où l'oxygène est absorbé par la cuticule et libération du dioxyde de carbone dans l'environnement

#### Un système circulatoire

Il est ouvert et permet au sang de circuler librement dans des vaisseaux sanguins et des cavités corporelles. Ainsi de permettre le transport de l'oxygène et les nutriments à travers le corps.

## *CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE*

### **Un système digestif**

Il comprend une bouche, un pharynx, un œsophage, un gésier et un intestin, leur permet de digérer

### **Un système excréteur**

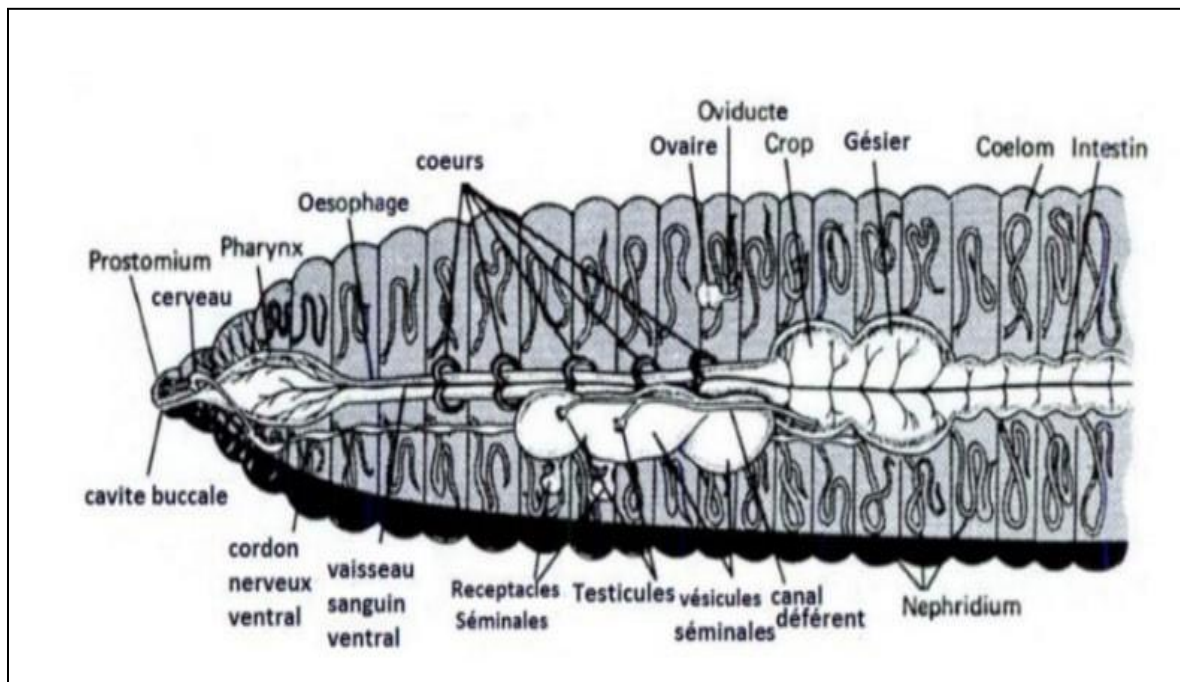
Les déchets métaboliques sont éliminés par les néphridies qui permettent de filtrer les fluides corporels et éliminent les déchets.

### **Un système nerveux**

Il permet de détecter les stimuli environnementaux et de coordonner leur mouvement en conséquence.

### **Un système reproducteur**

Ils sont hermaphrodites, qui possèdent à la fois des organes reproducteurs femelles et males



**Figure 36: Anatomie interne d'un ver de terre (Liberty Press et Glotzhabe, 2005).**

## CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE

### 1.2.3 Cycle de vie des vers de terre

Les vers de terre sont originellement hermaphrodites, certaines espèces sont bi-parentales comme *Lumbricus terrestris*, et certaines peuvent se reproduire sans accouplement, par autofertilisation ou parthénogénèse (Sim et Gerard, 1999, Fernández *et al.*, 2012).

Lors d'un accouplement, un échange de spermatozoïde, qui se produit généralement à la surface du sol. Quelque jours plus tard le clitellum suit une partie renflée formant une bague sur le corps du vers adulte glisse le long de la partie antérieure du ver et le cocon (œuf ; zygote). (Pelosi, 2008).

Les vers adultes produisent plusieurs cocons par an, en fonction de leur âge et les conditions dans lesquelles ils se trouvent un ou plusieurs juvéniles (espèces immatures), éclosent quelque temps plus tard.

L'espèce juvénile va progressivement acquérir des sexuels secondaires externes liés à l'accouplement comme les pores sexuels, il sera au stade sub-adulte. Ensuite il devient adulte en formant le clitellum qui le permet de devenir sexuellement mature et se reproduire à son tour (Pelosi, 2008).

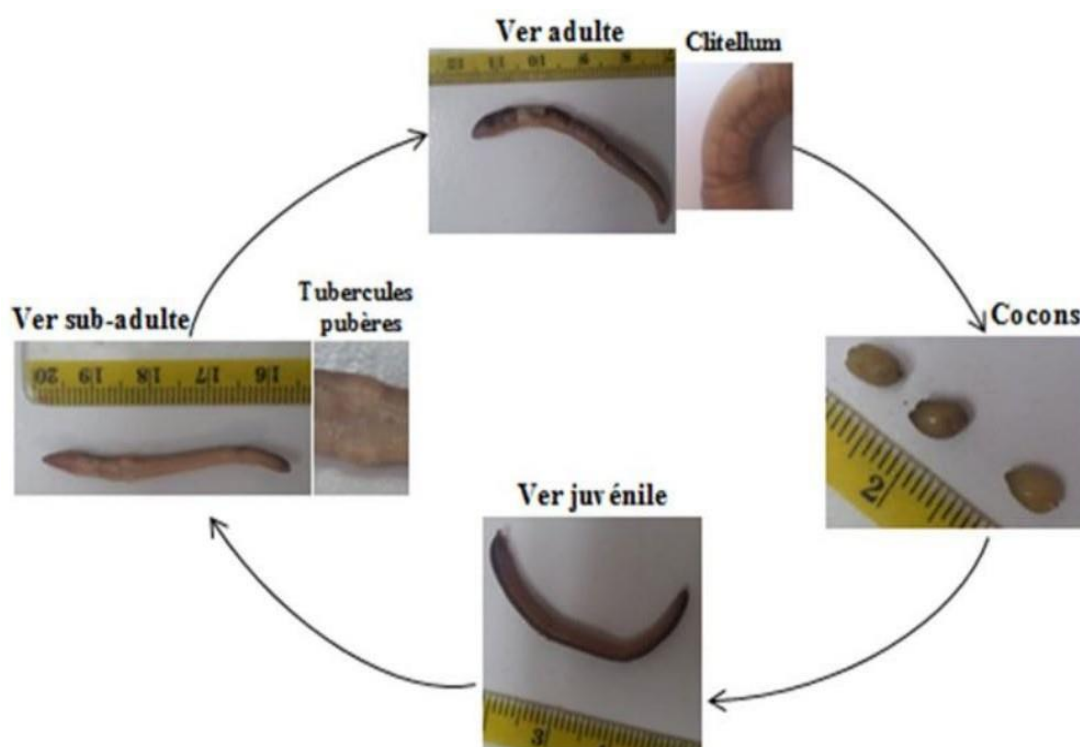


Figure 37: Cycle de vie du vers de terre (Bouazdia, 2019)

## *CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE*

### **1.3 Utilisation du vers comme bioindicateur**

Les vers de terre sont considérés comme des bon indicateurs pour leurs avantages (Rombke *et al.*, 2005) :

- Ils peuvent fournir des informations sur la l'état global du sol (Sa structure, sa fertilité et son niveau de contamination par des pesticides)
- Les vers morts subit une décomposition et une minéralisation qui permettent d'entraîner un relargage des contaminants bioaccumulés dans l'environnement
- Ils sont des outils de biosurveillance efficaces.
- Ces espèces sont parfaitement ubiquistes.

### **1.4 Le stress oxydatif chez le vers de terre**

Chez les vers de terre, des situations de stress d'origine physiologique et environnementale génèrent un stress oxydant. La production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est essentiellement d'origine enzymatique la NAD(P)H oxydase membranaire et le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire qui présentent les principales sources des ERO. Ces derniers peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes afin d'altérer d'autre cellules (Boveris *et al.*, 1972). En effet, les ERO générées lors d'un stress oxydatif peuvent altérer de nombreuses molécules biologiques telles que les lipides, protéines, glucides et les acides nucléiques.

### **1.5 Défense antioxydante**

Les vers de terre possèdent plusieurs systèmes de défenses afin de les protéger du stress oxydatif généré. L'organisme mis en place des premières barrières de protection physiques face à la pénétration des xénobiotiques. Un système antioxydant intervient lorsque les premières défenses s'avèrent inefficaces tel que les antioxydants enzymatiques (La catalase, le Glutathion transférase) et les antioxydants non enzymatiques comme le Glutathion, afin de protéger les organes et les cellules contre les attaques des espèces réactive de l'oxygéné (ERO) générées à lors d'un stress oxydant (Zizlinski et Portner, 2000).

## CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE

### 2. Matériel et méthodes

Notre travail s'est déroulé au laboratoire de physiologie animale et toxicologie cellulaire de l'université Badji Mokhtar- Annaba

#### 2.1 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre expérimentation est le ver de terre récolté au niveau de la région de SERAIDI. Les vers de terre sont conservés dans des terrariums, au laboratoire. Leur poids varie entre 1.6g et 1.7g. Le ver de terre a été identifié selon la méthode de Bouché, 1977.

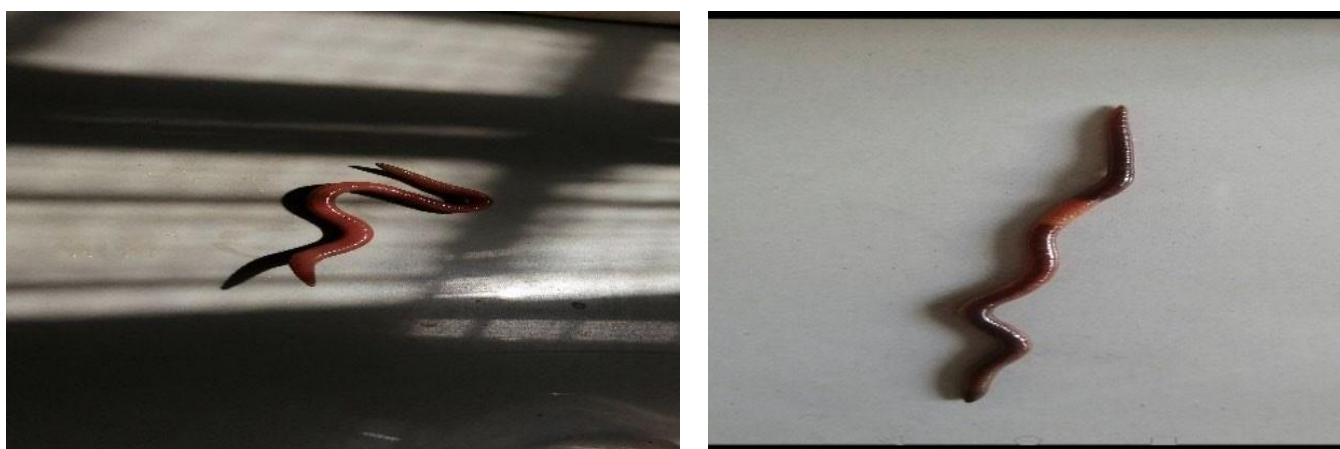


Figure 38: Vers de terre *Lumbricus rubellus*, (Hoffmeister, 1843) photo personnelle.

- **Systematique du vers de terre**

Tableau 15: Classification du ver de terre (Hoffmeister, 1843).

<b>Règne</b>	<b>Animalia</b>
<b>Embranchement</b>	Annelidae
<b>Classe</b>	Clitellata
<b>Sous-Classe</b>	Oligochaeta
<b>Ordre</b>	Crassiclitellata
<b>Famille</b>	Lumbricidae
<i>Genre</i>	<i>Lumbricus</i>
<i>Espèce</i>	<i>Lumbricus rubellus</i> , Hoffmeister, 1843)



## *CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE*

### 2.3.3 Méthode de traitement

Le traitement des vers de terre est effectué par pulvérisation des  $\alpha$ -aminophosphonates dans les terrariums pendant sept jours, aux concentrations indiquées dans le tableau suivant :

**Tableau 16: La gamme de concentrations des cinq molécules aminophosphonate en  $\mu\text{mol/l}$ .**

<b>Molécule</b>	<b>Concentration (<math>\mu\text{mol/L}</math> / 500g du sol)</b>	
<b>BR1</b>	<b>400</b>	<b>480</b>
<b>BR2</b>	<b>400</b>	<b>480</b>
<b>BR3</b>	<b>340</b>	<b>500</b>
<b>BR4</b>	<b>340</b>	<b>500</b>
<b>BR5</b>	<b>340</b>	<b>500</b>

### 2.3.4 Essais toxicologiques

#### 2.3.4.1 Suivi du pourcentage de mortalité

Après la fin de la période de sept jours d'exposition, le pourcentage de mortalité a été déterminé en comptant le nombre de vers de terre morts selon la formule d'Abbott, (1925), qui donne les valeurs corrigées de la mortalité en pourcentage en fonction des mortalités des échantillons traités et celle du témoin. Cette correction permet d'exclure le biais dû à la mort naturelle observée dans nos conditions expérimentales.

$$\text{MC (\%)} = \frac{(\text{M} - \text{MT})}{(100 - \text{MT})} \times 100$$

MC (%) : pourcentage de mortalité corrigé.

M (%) : pourcentage de morts dans la population traitée.

MT (%) : pourcentage de morts dans la population témoin.

## *CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE*

### **2.3.4.2 Suivi du taux de croissance**

Après la fin de la période de traitement, les vers de terre sont retirés des boîtes, rincés à l'eau distillé et pesés à l'aide une balance de précision.

Le taux de croissance est calculé en utilisant l'équation de Martin, (1986) :

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

**P<sub>0</sub>** : est le poids moyen des vers de terre avant le traitement

**P<sub>t</sub>** : est le poids moyen des vers de terre après la durée de sept jours d'exposition.

### **2.3.4.3 Dissection, prélèvement du tissu et dosages**

Après sept jours d'exposition, les vers de terre sont mis à jeun pendant 48 heures afin que leur tube digestif soit vide. Après la dissection, on prélève 4 fragments pour les différents dosages :

#### **2.3.4.3.1 Détermination du taux de glutathion (GSH)**

Le taux de GSH est déterminé selon la méthode de Weckberker et Cory, (1988). Le principe de cette méthode repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5-mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque (DTNB) par le groupement thiol (-SH) du glutathion. La lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 412nm et les résultats sont exprimés en umol/mg de protéine.

Le taux de glutathion (GSH) est estimé selon la formule suivante :

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

- **DO** : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat
- **1** : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.2 ml ASS+ 0.8ml homogénat)
- **1.525** : volume total des solutions utilisé dans le dosage (0.5ml surnageant + 1 ml tris/EDTA+ 0.025 ml DTNB).
- **13.1** : Coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH).
- **0.8** : Volume en ml de l'homogénat utilisé dans la déprotenisation.
- **0.5** : volume en ml de surnageant utilisé.
- **mg de protéine** : Quantité de protéines exprimée en mg.

## *CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE*

### **2.3.4.3.2 Mesure de l'activité glutathion-S-transférase (GST)**

L'activité GST est mesurée selon la méthode de Habig *et al.*, (1974). Le principe de cette méthode est basé sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH).

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

Les résultats sont exprimés en umol/min/mg de protéines

L'activité de GST est déterminée par la formule suivante :

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

- $\Delta\text{DO}$  : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- $\text{Vt}$  : Volume totale de la cuve (1.4ml).
- $\text{e}$  : coefficient d'extinction molaire du CDNB 9.6
- $\text{Vs}$  : Volume du surnageant (0.2ml).
- **mg de protéine** : Quantité de protéines exprimée en mg.

### **2.3.4.3.3 Mesure de l'activité Catalase(CAT)**

La mesure de l'activité catalase (CAT) est déterminée selon la méthode décrite par Regoli et principato, (1995). Elle est basé sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée et la lecture des absorbances est enregistrée pendant 1 min (lecture chaque 15 secondes) dans des cuves en quartz à une longueur d'onde de 240 nm. L'activité Catalase (CAT) est obtenue par application de la formule suivante :

$$\text{CAT (umol / min / mg de protéine)} = \frac{\Delta\text{DO}}{0.040 * \text{L} * \text{mg de protéine}}$$

- $\Delta\text{DO}$  : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- **0.040** : Coefficient d'extinction de l'eau oxygénée.
- **L** : Longueur de la cuve utilisé (1 cm).
- **Mg de protéine** : Quantité de protéines exprimée en mg.

## *CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE*

### **2.3.4.3.4 Dosage de l'acétylcholinestérase**

La méthode développée par Ellman, (1961) a été utilisée pour doser l'acétylcholinestérase. Cette méthode alimente l'enzyme en un substrat d'acétylthiocholine (ASCH) dont l'hydrolyse libère de la thiocholine (SCH) et de l'acide acétique. La thiocholine obtenue réagit avec le DTNB (acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque), ce qui donne le produit jaune TNB (acide 5-thio-2 nitrobenzoïque). Chaque tête des vers de terre témoins et traités a été homogénéisés dans 1 ml de solution détergente avec un broyeur ULTRA-TURRAX à 12 000 tr/min-1 pendant une à deux minutes, suivi de trois répétitions. L'homogénat a été centrifugé à 5 000 g pendant 5 minutes. Le surnageant a été collecté pour être utilisé comme source d'enzymes. Le test d'activité AChE utilisait une aliquote de 100 µl avec 100 µl de DTNB et 1 ml de tampon Tris (0,1 M, PH7). Après 3 à 5 minutes, 100 ul de substrat acétylthiocholine ont été ajoutés pour mettre fin à la réaction spontanée.

La lecture des densités optiques est effectuée à une longueur d'onde de 412nm toute les 4 minutes pendant 20 minutes contre un blanc ou le surnageant est remplacé par un volume équivalent de solution détergente. Les résultats sont exprimés par umol/mn/mg de protéine

L'activité spécifique de l'AChE est déterminée par la formule suivante :

$$\text{AChE (umol/mn/mg de protéine)} = \frac{\Delta\text{DO} * \text{Vt}}{1.36 * \text{Vs} * \text{mg de protéine}}$$

- $\Delta\text{DO}$  : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- $\text{Vt}$  : volume total de la cuve
- $\text{Vs}$  : volume du surnageant
- 1.36 : Coefficient d'extinction molaire du DTNB

*CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES  
MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE*

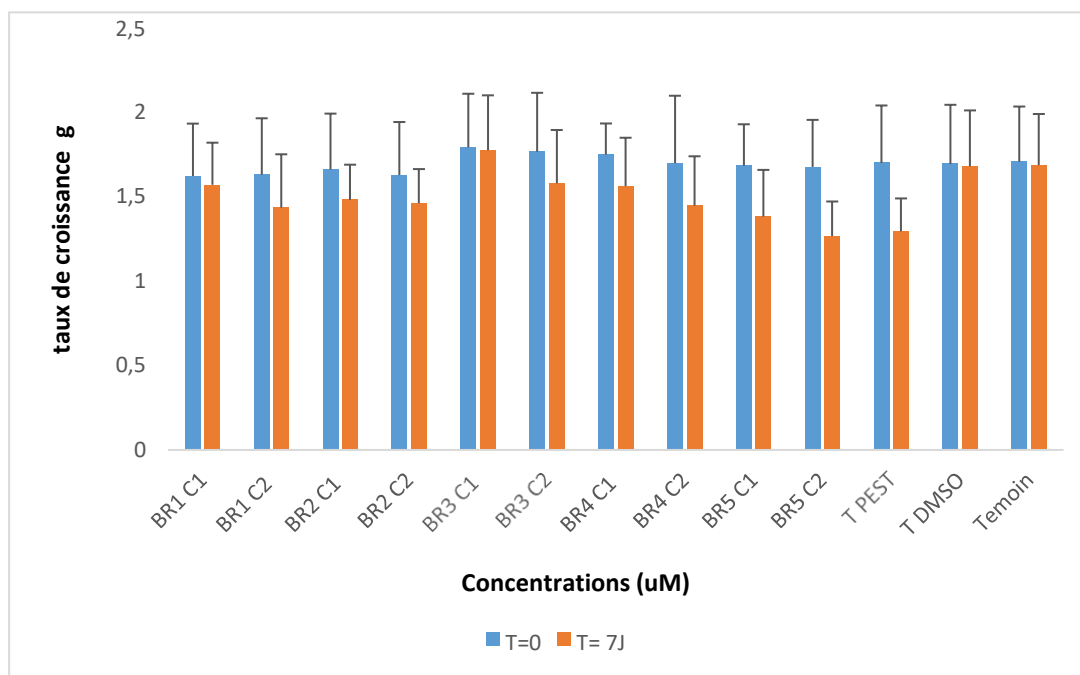
***Résultats***

## CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE

### Résultats

#### 1. Evaluation du poids des vers de terre

La figure 40 représente l'évolution du taux de croissance des vers de terre en fonction du temps et en présence ou non des concentrations des molécules d'  $\alpha$ -aminophosphonates.



**Figure 40 : Effet des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sur l'évolution du poids des vers de terre.**

D'après les résultats, nous constatons que chez les vers de terre témoins et traités par le DMSO et la C1 de la molécule BR3 ne subissent aucune variation du poids durant la période d'exposition 7 jours par rapport au témoin.

En revanche, nous constatons une diminution du poids des vers traités par les différentes concentrations des molécules  $\alpha$ -aminophosphonates BR1, BR2, C2BR3 et BR4. Ainsi une diminution significative ( $P < 0.001$ ) équivaut à 30% chez les vers de terre traités par les différentes concentrations de la molécule BR5 et pesticide de référence par rapport au témoin durant la période d'exposition 7 jours.

## *CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE*

### 2. Evaluation du pourcentage de mortalité

Le tableau 17 met en évidence l'effet de concentrations croissantes des molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sur le pourcentage de mortalité des vers de terre.

Nous constatons qu'aucune mortalité n'a été observée durant la durée d'exposition 07 jours.

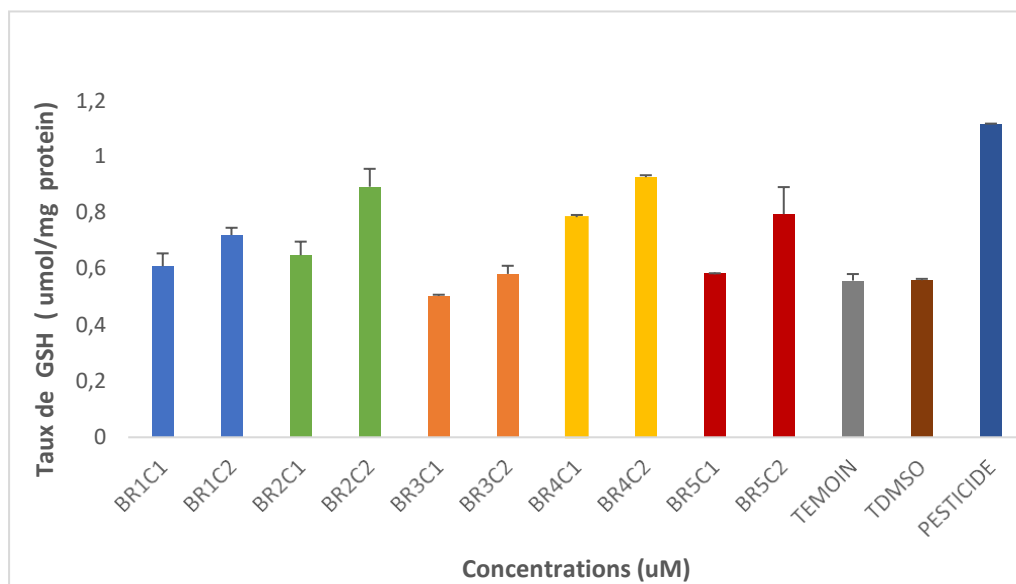
**Tableau 17: Pourcentage de mortalité observé chez les vers de terre adultes traités par les différentes concentrations des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates durant une période d'exposition.**

MOLECULES	CONCENTRATION	7JOURS	MORTALITE %
BR1	C1	0	0%
	C2	0	0%
BR2	C1	0	0%
	C2	0	0%
BR3	C1	0	0%
	C2	0	0%
BR4	C1	0	0%
	C2	0	0%
BR5	C1	0	0%
	C2	0	0%
T		0	0%
TPESTICIDE		0	0%
TDMSO		0	0%

### 3. Effets des cinq molécules $\alpha$ -aminophosphonates sur l'évolution du taux de glutathion (GSH) des vers de terre

La figure 41 représente les variations du taux du glutathion GSH chez les vers de terre traités par les différentes concentrations des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates et le pesticide de référence (Dursban).

## CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE

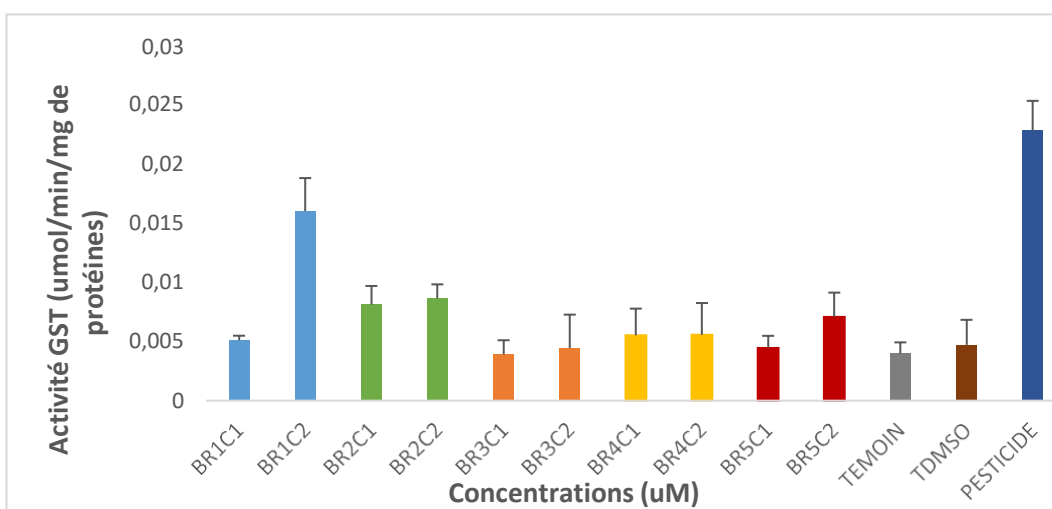


**Figure 41: Evolution du taux de GSH chez les vers de terre en fonction des concentrations des molécules  $\alpha$ -aminophosphonates.**

On observe une augmentation dose dépendante de l'activité chez ces molécules et le pesticide de référence par rapport au témoin après sept jours d'exposition. Sauf que le taux de GSH de ces cinq molécules reste inférieur à celui du pesticide de référence soit une diminution de 17% pour C2BR4.

#### 4. Effets des cinq molécules $\alpha$ -aminophosphonates sur l'évolution de l'activité glutathion S-transférase GST des vers de terre

La figure 42 ci-dessous illustre l'effet des concentrations croissantes des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sur l'activité GST.



**Figure 42: Evolution de l'activité GST chez les vers de terre en fonction des concentrations croissantes des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates.**

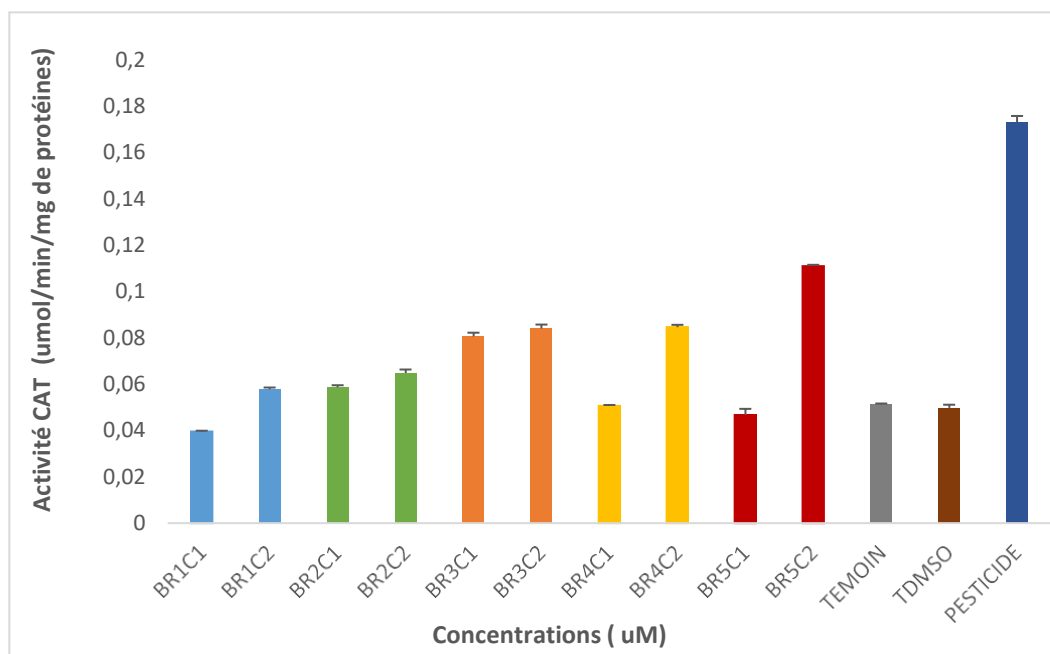
## CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES $\alpha$ -AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE

Nous constatons une augmentation hautement significative de l'activité GST chez le pesticide de référence (Dursban) (0.024  $\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) et C2BR1 (0.017  $\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéine) par rapport au témoin, Ainsi nous constatons une légère augmentation de l'activité chez les vers traités par les différentes concentrations des molécules BR2, BR4 et C2BR5. En revanche, nous n'enregistrons aucun effet sur l'activité GST chez les vers de terre exposés aux molécules C1BR1, BR3 et C1BR5.

### 5. Effets des cinq molécules $\alpha$ -aminophosphonates sur l'évolution de l'activité Catalase CAT des vers de terre

La figure 43 représente l'effet des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sur l'évolution de l'activité CAT chez les vers de terre.

Nous remarquons une augmentation de l'activité CAT chez les vers de terre traités par les différentes concentrations des molécules  $\alpha$ -aminophosphonates ainsi une augmentation importante chez les vers traités par le pesticide de référence (Dursban).

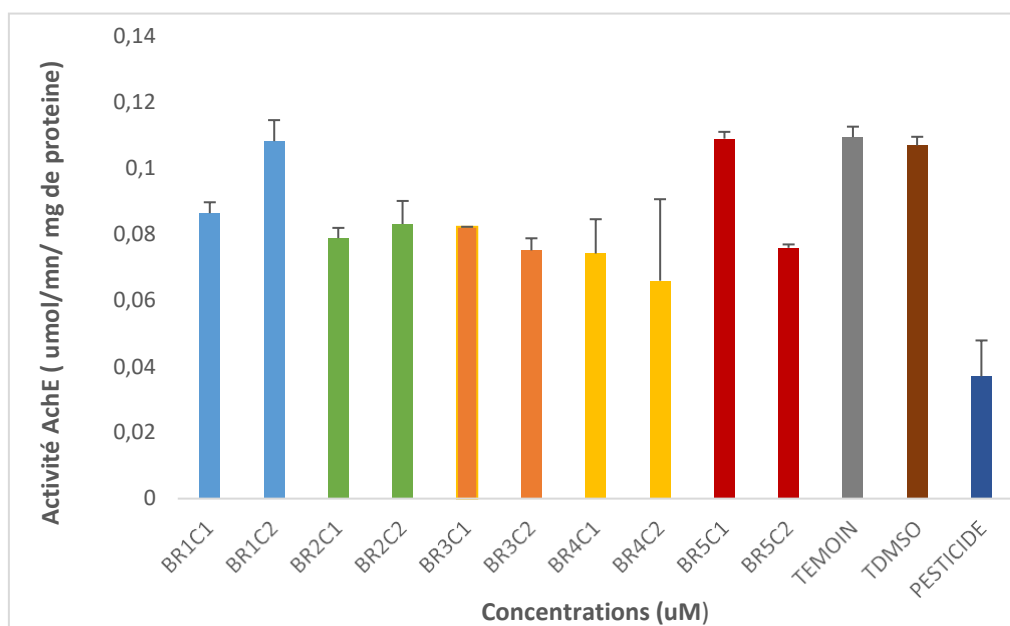


**Figure 43: Evolution de l'activité CAT chez les vers de terre en fonction des concentrations croissantes des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates.**

## CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES A-AMINOPHOSPHONATES SUR LE VER DE TERRE

### 6. Effets des cinq molécules $\alpha$ -aminophosphonates sur l'activité Acétylcholinestérase chez vers de terre

La figure 44 représente les résultats de l'activité de l'acétylcholinestérase chez les vers de terre exposés aux cinq molécules d' $\alpha$ -aminophosphonate. Nous avons observé une inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase chez les vers traités avec le pesticide de référence (66%) par rapport à l'ensemble des molécules et vers témoins, où le pourcentage d'inhibition varie entre 21% pour BRC1 et 40% pour BR1C2 et BR4C2, ce qui est significativement inférieur à le pesticide commercial. Il est à noter que l'activité de BR1C2 et BR5C1 était identique à celle du contrôle et du DMSO. Malgré l'utilisation des deux concentrations les plus élevées des molécules testées, qui ont démontré une forte activité insecticide contre les larves d'*E. kuehniella*, les vers de terre ne semblent pas affectés, ne présentant qu'un effet neurotoxique mineur.



**Figure 44: Effet des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonate sur l'activité acétylcholinestérase des vers de terre. Les barres d'erreur sont obtenues à partir de moyennes correspondant à trois répétitions  $\pm$  SE.**

# *Discussion*

## Discussion

L'utilisation des bio-indicateurs permettent d'évaluer la qualité de l'environnement et des écosystèmes, ainsi que l'impact du stress environnemental sur la composition et le fonctionnement des écosystèmes (Sherwin *et al.*, 2013). Ils sont classés en groupe d'indicateurs d'effet qui répondent rapidement et de manière observable ou mesurable au stress physique ou chimique et un groupe d'indicateurs d'accumulation qui disposent d'une résistance à la déformation, ainsi d'incorporer des xénobiotiques pendant une durée considérable (Franzle, 2006).

Les vers de terres sont largement utilisés comme des bioindicateurs car ils sont considérés comme des organismes du sol non cibles, peuvent être affectés par des produits phytosanitaires. De nombreuses études mettent en évidence la toxicité de ces produits qui varie selon la matière active et la doses de ces derniers (Sherwin *et al.*, 2013). Ces espèces constituent le groupe le plus important de la faune du sol par leur biomasse qui varie de 60% à 80% (Eijsackers, 2011). Darwin croyait que les vers de terre sont les premiers ouvriers sur terre, connus sous le nom d'ingénieurs du sol. Ces vers sont sensibles aux perturbations des écosystèmes, ils peuvent indiquer la qualité du sol par leur abondance, facilité de manipuler (Curry *et al.*, 2008 ; Muthukaruppan et Ganasekaran, 2010). Ces dernières années, plusieurs essais normalisés pour détermination du taux de mortalité et le comportement des vers de terre sont disponibles (Scherrer, 1992).

Dans cette partie de notre étude, nous nous sommes concentrés sur les effets des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates sur le taux de mortalité, la croissance des vers de terre.

Le premier paramètre étudié est le taux de mortalité, nos résultats ont montrée qu'aucune mortalité n'a été observée au cours de la période d'expositions aux différentes concentrations des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates et le pesticide de références ce qui signifie que le paramètre de mortalité n'est pas affecté par ces derniers. Nos résultats sont en accords avec ceux de Yesguer, (2015) qui a déterminé l'effet des concentrations du Chlorpyriphos-éthyl (Dursban) chez les vers de terre de type *Eisenia foetida* après 4 semaines d'exposition. D'après khalil, (1996), la mortalité des vers de terre dépend de l'espèce testée, du temps d'exposition et de sa sensibilité vis-à-vis des substances testées.

## *Discussion*

Le taux de croissance est le deuxième paramètre mesuré, nous avons constaté une diminution du poids des vers traités par les différentes concentrations  $\alpha$ -aminophosphonates BR1, C2BR3 et BR4 ainsi qu'une diminution significative pour les différentes concentrations de la molécule BR5 et le pesticide de référence (Dursban) après 7 jours d'expositions. Nos résultats sont en accord avec ceux Yesguer, (2015) qui a déterminé l'effet de pesticide organophosphoré sur le poids des juvéniles, d'où la croissance est réduite en fonction de la concentration. Zhou *et al.*, (2006) a montré que le poids est un paramètre sensible plus révélateur d'une toxicité chez les vers de terre que la mortalité. En effet, Lett *et al.*, (1976) et Mosleh *et al.*, (2003) supposent que les vers de terre manifestent une stratégie défensive en diminuant leur prise de nourriture et utilisent la majeure partie de l'énergie des aliments absorbés dans le métabolisme afin d'éviter la prise des pesticides, cela est bien prouvé par la diminution du poids exposés à ces xénobiotiques. Les vers régulent la prise de ces pesticides par un apport alimentaire réduit, c'est-à-dire il y aura moins d'énergie et de protéine pour la croissance ce qui induit une inhibition de la croissance. La diminution du poids paraît un bon indicateur du stress physiologique relié au degré d'intoxication et au temps d'exposition (Frampton *et al.*, 2006).

Aussi, nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques spécifiquement chez les vers de terre impliqués dans la détoxification via le suivi d'une batterie de biomarqueurs de défense et de dommage en tant que système d'alerte sensible et précoce. Notre choix s'est porté sur la quantification du taux de glutathion GSH, évaluation de l'activité Glutathion S-transférase GST, l'activité Catalase CAT et l'activité Acétylcholine estérase.

Le glutathion GSH représente l'une des premières barrières contre la toxicité des xénobiotiques qui sont les principaux capteurs non enzymatiques dans les cellules animales (Moumeni *et al.*, 2016). Dans notre étude, nous avons noté que les vers de terre traités par les différentes concentrations de la molécule BR3 et la C1BR5 ne subissent aucune variation par rapport au témoin. Ainsi une augmentation dose dépendante du taux de GSH chez les vers traités par le reste des molécules et le pesticide de référence, sauf que le taux de GSH de ces cinq molécules reste inférieur à celui du pesticide de référence (Dursban). En effet un environnement cellulaire anti-oxydant représente un taux élevé de glutathion réduit GSH qui inhibe les voies d'activation des du stress oxydant. (Morel et Barouki, 1998).

## Discussion

Nos résultats sont en accord avec ceux de Otmani, (2018) qui a montré que l'augmentation dose-dépendante du GSH chez les vers de terre *Allolobophora caliginosa* après 7 jours d'exposition au xénobiotique, est peut être dû à une régulation de la voie de synthèse GSH qui est un mécanisme de protection contre les effets toxique d'un xénobiotique. Le Glutathion intervient d'une part dans la détoxification des xénobiotiques en neutralisant divers produits du stress oxydant grâce à son potentiel réducteur et d'autre part dans la prolifération cellulaire et la régulation de l'apoptose (Dringen, 2000). Selon Droge, (2002) une déficience en GSH expose les cellules à un risque de dommage oxydatif, c'est pour cela le maintien d'un niveau élevé de GSH est essentielle pour prévenir d'éventuels dégâts oxydatifs.

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à l'activité GST qui est une enzyme de biotransformation de phase II, largement distribuée dans le règne animal (Livingstone, 2003). Elle joue un rôle important dans le mécanisme de détoxification des ROS et la régulation de l'équilibre rédox. Cette enzyme est considérée comme un biomarqueur fiable des capacités de détoxification d'un organisme. D'après nos résultats, l'activité GST a augmenté après 7 jours d'exposition chez les vers de terre traités par le pesticide de référence et le C2BR1 par rapport au témoin, ainsi une augmentation a été décelée chez les vers traités par différentes concentrations des molécules BR2, BR4 et C2BR5. L'augmentation de l'activité Glutathion S-transférase (GST) après la durée d'exposition à un xénobiotique est une forme de défense qui traduit la détoxification de ce xénobiotique dans l'organisme afin de permettre son élimination. De nombreuses études ont montrés une induction de la GST chez les vers de terre *Eisenia anderei* et *Lumbricus rubellus* exposées aux pesticides organophosphorés (pirimiphos-methyl) (Velki et Hackenberger, 2013). La réponse de l'activité GST dépend de plusieurs facteurs tels que la nature du xénobiotique, sa concentration et son temps d'exposition. (Oruc et Uner, 2000).

En revanche, aucun effet sur l'activité GST n'a été observé chez les vers de terre exposés aux molécules C1BR1, BR3 et C1BR5, nos résultats sont en accord avec ceux de Booth et O'Halloran, (2001) qui ont constaté que l'activité GST n'a pas changé chez *A. caliginosa* exposé aux insecticides organophosphorés chlorpyrifos et Diazinon.

## Discussion

En effet, la présence du xénobiotique à des concentrations toxiques, va induire l'activation des systèmes de protection cellulaire qui vont piéger ou éliminer les métabolites toxiques (Benbouzid, 2012). Parmi ces enzymes du stress oxydatif qui interviennent afin d'empêcher les lésions cellulaires résultantes de l'attaque des ROS, on trouve la Catalase CAT qui est une enzyme antioxydante de la phase II, impliquée dans la défense de la cellule contre les effets toxique du peroxyde d'hydrogène. Elle est considérée comme un biomarqueur de stress oxydatif présentant une réponse claire et précoce à la contamination (Jebali *et al.*, 2007) ces enzymes sont sensibles à certains contaminants inducteur de stress tel que les métaux, les pesticides (Livingstone, 2003). Cette enzyme possède un rôle important dans la détoxification des ROS générés suite à l'apparition d'un stress oxydatif.

Dans notre expérience, nous avons constaté une augmentation de l'activité CAT chez les vers de terre traités par les différentes molécules  $\alpha$ -aminophosphonates ainsi une augmentation importante chez les vers traités par le pesticide de référence. Cette augmentation suggère l'élimination des  $H_2O_2$  résultant de l'exposition à ces xénobiotiques pour prévenir l'accumulation de ces ROS.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de Torres *et al.*, (2010) qui stipulent que l'augmentation des défenses antioxydantes serait due à une production accrue de radicaux libres, ce qui induit une stimulation des activités antioxydantes pour faire face à ce stress oxydatif accru (le cas de pesticides de référence) et protéger les cellules contre les dommages. De nombreuses études ont montré l'augmentation de l'activité de la CAT lors de l'exposition aux organophosphorés. Schreck *et al.*, (2008) ont constatés que l'insecticide chlorpyrifos-ethyl peut induire une augmentation de l'activité CAT chez les vers *A. caliginosa nocturna* pendant les premiers jours de traitement. Une augmentation de l'activité catalase a été observée suite à l'exposition des *E. andrei* au pirimiphos-éthyl (Velki et Hackenberger, 2013). Ainsi, Givaudan *et al.*, (2014) ont montrés une augmentation de l'activité CAT chez les *A. caliginosa* dans les sols contaminés par les résidus de pesticides agricoles (Givaudan *et al.*, 2014).

En outre, les vers de terres sont classés comme des annélides qui possèdent des épidermes fins. Ils se basent essentiellement sur les particules du sol pour leurs régimes alimentaire, cette propriété leur permet de rester en contact permanent avec les xénobiotiques au niveau du sol.

## Discussion

Ces vers de terre possèdent une enzyme essentielle dans leur système nerveux (l'acétylcholine estérase). Cette enzyme hydrolyse le neurotransmetteur (l'Acétylcholine) impliqué dans la transmission cholinergique (Trotter *et al.*, 1991). Elle est utilisée comme un biomarqueur spécifiques des xénobiotiques neurotoxiques tel que les organophosphorés in vivo et in vitro afin d'estimer l'impact des xénobiotiques sur la faune des écosystèmes terrestres (Silva *et al.*, 2014 ; Venkateswara et Kavitha , 2008). Cependant, certains insecticides organophosphorés pénètrent facilement dans le tissu cutané des vers de terre grâce à leur liposolubilité élevée. A l'intérieur de l'organisme, ces xénobiotiques inhibent le fonctionnement de l'acétylcholine estérase. L'inhibition de cette dernière conduit à l'accumulation de l'acétylcholine au niveau des synapse cholinergiques en perturbant la transmission des messages nerveux (Venkateswara et Kavitha, 2008 ; sanchez *et al.*, 2014).

L'analyse de nos résultats obtenus sur l'activité d l'acétylcholineestérase mesurée chez les vers de terre exposés aux concentrations croissantes des cinq molécules  $\alpha$ - aminophosphonates et le pesticide de référence (Dursban), révèle une légère inhibition de l'activité par rapport au témoin chez les vers traités par les molécules  $\alpha$ - aminophosphonates, qui peut être dû à la très faible toxicité des molécules. Nos resultats sont en concordance avec ceux de et Mekahlia *et al.*, (2016) et Bouazdia, (2019) qui a déterminé l'effet non toxique de l'herbicide Sekator OD chez les vers de terre *A.calaginoso* au cours de la période d'exposition.

En revanche nous avons constaté une inhibition progressive chez les vers traités par le pesticide de référence (Dursban) au cours de la durée de l'exposition. Cette inhibition peut être expliquée par l'effet neurotoxique induit par l'exposition au pesticide de référence (Dursban). Ainsi plus la molécule est toxique plus l'activité de l'acétylcholine estérase est inhibé ce qui indique un stress oxydatif sévère pour cette période d'exposition (Brown *et al.*, 2004). Ces résultats sont en accord avec ceux de Yesguer, (2015) qui a montré l'effet toxique du chlorpyrifos-ethyl (Dursban) sur les vers de terre *Aporrectodea caliginosa* après sept jours d'exposition. Aussi, l'activité acétylcholine estérase est inhibée chez les vers de terres *A. caliginosa* exposé au insecticide organophosphoré Parathion (Rault *et al.*, 2008) et les vers de terre de type *E. fetida* exposé à l'herbicide organophosphoré gluphosate (Samanta *et al.*,2014).

# ***Conclusion générale***

## ***CONCLUSION GENERALE***

Le travail que nous avons réalisé avait pour objectif principal la caractérisation biologique des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés et évaluer leurs toxicités sur deux modèles biologiques non cibles le blé dur et le ver de terre, et ce par la mesure de certains biomarqueur de stress oxydatif.

Nous avons déterminés dans un premier temps l'activité insecticide par inhalation (fumigation), contact et répulsive des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés. Il en ressort que les molécules BR1, BR2 et BR3 ont une activité insecticide élevée par fumigation, une activité modérée à élevée par contact et une activité faible à très faible par répulsion pour les différentes concentrations testées des cinq molécules. Nos résultats suggèrent que les cinq molécules peuvent être utilisées comme des pesticides verts tout en ignorant le mode répulsif de nos molécules.

Nous avons évalué l'activité antibactérienne des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés par la méthode de disque. Une très faible activité pour les cinq molécules a été observée, à l'exception de la forte concentration de la molécule BR4 qui présente une activité intermédiaire

Ensuite nous nous sommes intéressés à déterminés l'activité antifongique de ces cinq molécules. Nos résultats mettent en évidence une activité antifongique partielle qui ne dépasse pas les pourcentages d'inhibition 50%.

Ainsi l'évaluation de l'activité antioxydante des cinq molécules par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2diphényl-1-picryl-hydrazyl) a révélé que toutes les molécules possèdent une activité antioxydante et elles sont capables de piéger le radical DPPH (inhibition de la DPPH supérieure à 50% révélant des activités élevées à très élevées).

Dans un second temps, nous avons évalué la toxicité des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés sur des populations non cibles le blé dur et le vers de terre par la mesure de certains biomarqueurs de stress. L'évaluation de la toxicité des molécules chez le blé dur a révélé que les trois molécules BR1, BR2 et BR3 semblent plus toxiques que BR4, BR5 mais leur toxicité est atténuée par le système de défense représenté dans notre cas par le GSH, la GST et la CAT.

## ***CONCLUSION GENERALE***

Par ailleurs, l'effet des cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonates nouvellement synthétisés sur les vers de terre (population non cible) a montré une faible toxicité par rapport au pesticide de référence.

Grâce à l'ajout du fragment pharmacophore, les cinq molécules  $\alpha$ -aminophosphonate peuvent être utilisées comme pesticide vert puisqu'elles ont un impact non significatif sur les populations non cible le blé dur (*Triticum durum* desf) et le ver de terre, ils résolvent le problème de pollution tout en réduisant leur impact toxique. Même les quelques perturbations observées chez le blé et le ver de terre se dissiperont avec le temps en raison de leurs capacité à tolérer ces conditions de stress, médiées par leurs systèmes de défenses antioxydant.

Au terme de ce travail et en perspective de recherche, il serait intéressant de :

- Compléter ces résultats par une évaluation des effets de ces molécules sur un modèle biologique sentinelle afin de déduire leur impact sur l'homme
- Associer ces dérivés à d'autres pour concevoir des produits chimiques ayant les propriétés recherchées tout en étant moins toxique possible
- Optimiser les méthodologies de synthèse pour répondre aux enjeux environnementaux
- Réaliser une étude socio-économique afin de déterminer le coût de synthèse des molécules à grande échelle

# ***Références bibliographiques***

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Abbott, W.B. (1925). A method for comparing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol*, 18, 265-267.
- Abdelkader, H., Salah, C., & Nadjib, C. (2015). Synthesis, antibacterial and antifungal screening of three new of alpha-aminophosphonic acids. *International Journal of Science and Engineering Research*, 6, 1622-1627.
- Abdi, Y. (2018). Distribution spatiale des maladies fongiques du blé dur (*triticum durum desf.*) et effet de la fusariose sur le rendement en zones semiarides de Sétif (Doctoral dissertation).
- Abécassis, P., Coutinet, N., Domin, J. P. (2017). Les évolutions actuelles du marché de la complémentaire santé: le coût de la concurrence (No. hal-02572008).
- Abramov, V. S. (1952). O vzaimodeistvii dialkylfosforistykh kislot s aldegidami i ketonami-novyi metod polucheniya efirov alpha-oksialkilfosfinovykh kislot. *zhurnal obshchei khimii*, 22(4), 647-652.
- Ait-Slimane-Ait-Kaki, S. (2008). Contribution à l'étude de l'interaction génotype x milieu, pour la qualité technologiques chez le blé dur en Algérie (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Université d'Annaba, Algérie. 170.
- Allen, M. C., Fuhrer, W., Tuck, B., Wade, R., & Wood, J. M. (1989). Renin inhibitors. Synthesis of transition-state analog inhibitors containing phosphorus acid derivatives at the scissile bond. *Journal of medicinal chemistry*, 32(7), 1652-1661.
- Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J. A., Roca, M. J., & Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120(1-2), 221-229.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Amako, K., Chen, G. X., & Asada, K. (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology*, 35(3), 497-504.
- Amara, A. (2012). Evaluation de la toxicité de pesticides sur quatre niveaux trophiques marins: microalgues, échinoderme, bivalves et poisson (Doctoral dissertation, Brest).
- Anastas, P. T.; Bartlett, L. B; Kirchoff, M. M.; Williamson, T. C. *Catal. Today*. (2000), 55, 11.
- Anjum, N. A., Ahmad, I., Mohmood, I., Pacheco, M., Duarte, A. C., Pereira, E., ... & Prasad, M. N. V. (2012). Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—a review. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 307-324.
- Anonyme. (2008). Toutes céréales, détection et identification des espèces de fusarium spp. Et microdochium nivale sur grains de cereales par isolement mycologique semi-selectif et etude microbiologique, 28.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Arbuzov, A. E. (1906). On the structure of phosphonic acid and its derivatives: Isometization and transition of bonds from trivalent to pentavalent phosphorus. *J. Russ. Phys. Chem. Soc*, 38, 687.
- Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science*, 1227-1238.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology*, 141(2), 391-396.
- Assessment, M. E. (2005). *Ecosystems and human well-being: wetlands and water*. World Resources Institute.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Gril, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Voltz, M. (2005). Pesticides, agricultures et environnement. Ed. Quae Versailles Cedex, France, 119.
- Bachelier, G. (1963). La vie animale dans les sols (Vol. 3). Paris: Orstom.
- Baha M. (2008). Etude bioécologique des oligochètes du nord de l'Algérie. Thèse de doctorat.
- Bahadi, R., Boughoula, R., Berredjem, M., Bachari, K., Bouzina, A., Bouacida, S., ... & Redjemia, R. (2022). A convenient synthesis, biological activity and X-ray crystallography of novel  $\alpha$ -aminophosphonate derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 197(11), 1150-1156.
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., & Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252(1), 79-84.
- Barillet S.( 2007). toxicokinetics, chemical and radiological toxicity of uranium in zebrafish (daniorerio). Doctoral thesis in environmental toxicology, University of Metz, France, 326
- Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 21-34.
- Benbouguerra, K., Chafaa, S., Chafai, N., Mehri, M., Moumeni, O., & Hellal, A. (2018). Synthesis, spectroscopic characterization and a comparative study of the corrosion inhibitive efficiency of an  $\alpha$ -aminophosphonate and Schiff base derivatives: experimental and theoretical investigations. *Journal of Molecular Structure*, 1157, 165-176.
- Benbouzid, H., Berrebah, H., Berredjem, M., Djear, M.R. (2012). Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium* sp. With special emphasis on respiratory metabolism,

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

growth, and generation time. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 94(3), 557-565

- Bendjedid H., Yezli-Touiker S., Taffar A. & Soltani N. (2021). Phytochemical composition and insecticidal activities of essential oil of *Thymus munbyanus* (Lamiales : Lamiaceae) aerial parts and its properties against biomarkers of *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae). *Journal of Essential Oilbearing Plants*, 24 (4), 792-807.
- Benhamdi A., Bentellis A., Oualida Rached O., Du Laing G., Mechakra A. (2014). Effects of Antimony and Arsenic on Antioxidant Enzyme Activities of Two Steppic Plant Species in an Old Antimony Mining Area. *Biol Trace Elem Res. Apr*, 158(1), 96-104.
- Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Kadifkova Panovska, T. (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L and *Pistacia atlantica* Desf. *Adv Food Sci*, 29(3), 155-16.
- Benizri, E., Baudoin, E., & Guckert, A. (2001). Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol science and technology*, 11(5), 557-574.
- Benjama, A. (2003). Méthode d'évaluation rapide du degré d'attaque de l'olivier par la tuberculose causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, en verger au Maroc. *Fruits*, 58, 213-219. DOI : 10.1051/fruits : 2003009.
- Bhaduri, A. M., & Fulekar, M. H. (2012). Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11, 55-69.
- Biosécurité Végétale, B. (2006). Agence canadienne d'inspection des aliments-Bureau de biotechnologie végétale-La biologie de *Triticum turgidum* sous-espèce durum (Blé dur).
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Blouin, M., Hodson, M. E., Delgado, E. A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K. R., ... & Brun, J. J. (2013). A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, 64(2), 161-182.
- Blouin, M., Hodson, M. E., Delgado, E. A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K. R., ... & Brun, J. J. (2013). A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, 64(2), 161-182.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., ... & Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1367-1376.
- Bonnefont-Rousselot, D., Raji, B., Walrand, S., Gardes-Albert, M., Jore, D., Legrand, A., ... & Vasson, M. P. (2003). An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*, 52(5), 586-589.
- Booth, L. H., & O'Halloran, K. (2001). A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(11), 2494-2502.
- Boscolo, P. R., Menossi, M., & Jorge, R. A. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62(2), 181-189.
- Bouazdia, K. (2019). Exploration des Oligochètes dans une zone semi-aride et évaluation de l'impact de xénobiotiques sur des espèces non visées: les lombriciens (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- Bouché, M. B. (1972). Lombriciens de France. Ecologie et systématique (Vol. 72, No. HS, pp. 671-p). INRA Editions.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Bouché, M. B. (1977). Strategies lombriciennes. Ecological Bulletins, 122-132.
- Bouchelaghem, S., Djebar Berrebbah, H., Djebar, M.R.. (2011). The impact of dust emits by the steel complex of El Hadjar (ANNABA) on two biological models : Mousses and lichens. African Journal of Biotechnology, 10(18), 3574-3578.
- Bouhadi, D., Ibri, K., Hariri, A., Benattouche, Z., & Belkhodja, H. (2020). Effet de l'ajout de la farine de malt sur les caractéristiques fonctionnelles et technologiques de la farine de blé tendre. Nature & Technology/Nature & Technologie, (23).
- Boveris, A., Oshino, N., & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. Biochemical Journal, 128(3), 617-630.
- Bozzini, A. (1988). Origin, distribution, and production of durum wheat in the world.chemistry and technology : 1-16
- Brindley, T. A. (1930). The Growth and Development of Ephestia Kuehniella Zeller (Lepidoptera) and Tri-Bolium Confusum Duval (Coleoptera) under Controlled Conditions of Temperature and Relative Humidity. Annals of the Entomological Society of America, 23(4), 741-757.
- Burits, M., Asres, K., & Bucar, F. (2001). The antioxidant activity of the essential oils of Artemisia afra, Artemisia abyssinica and Juniperus procera. Phytotherapy Research, 15(2), 103-108.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan.(Asteraceae). Journal of ethnopharmacology, 87(2-3), 215-220.
- Carion, F. J. (2012). Un peu de bio, vers la terre, 5p

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Castillejos, L., Calsamiglia, S., & Ferret, A. (2006). Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *Journal of dairy science*, 89(7), 2649-2658.
- Cichewicz, R. H., & Thorpe, P. A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 52(2), 61-70.
- Clark, J. M, Norvell, W.A, Buckley, T.W. (2002). Concentration of cadmium and other elements in the grain of near-isogenic durum lines. *Can. J. Plant.* (82), 27-33
- Clement Grancourt et Prats. (1971). *Les céréales*. Ed J.B. Bailliers et Fils : 360.
- CMED. (1987). *Notre avenir à tous*. Traduction française Éd. du Fleuve, Montréal, 1989.
- CNRS. (2015). *Bulletin officiel du CNRS*.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., & del Río, L. A. (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in plant science*, 6(4), 145-150.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia university press.
- Curry, J. P. (1998). Factors affecting earthworm abundance in soils. In: Edwards, C. A. (eds), *Earthworm Ecology*. Boca Raton, St. Lucie Press, pp. 389
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E. V. M. M., Van Montagu, M., Inzé\*, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57, 779-795.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- De Clercq, E. (2007). Acyclic nucleoside phosphonates: past, present and future: bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: the phosphonate bridge. *Biochemical pharmacology*, 73(7), 911-922.
- Devineni, S. R., Doddaga, S., Donka, R., & Chamarthi, N. R. (2013). CeCl<sub>3</sub>· 7H<sub>2</sub>O-SiO<sub>2</sub>: Catalyst promoted microwave assisted neat synthesis, antifungal and antioxidant activities of  $\alpha$ -diaminophosphonates. *Chinese Chemical Letters*, 24(8), 759-763.
- Dickinson, D. A., & Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), 1019-1026.
- Dixon, D. P., & Edwards, R. (2010). Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8.
- Dongmo, P. M. J., Tchoumboungang, F., Ndongson, B., Agwanande, W., Sandjon, B., Zollo, P. H. A., & Menut, C. (2010). Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(4), 606-611.
- Doumandji Mitiche, B. (1977). La lutte biologique contre les déprédateurs des cultures. Collection cours d'agronomie. Ed. Office de publication universitaires. Alger.
- Drabo SF., Coulibaly YA., Romba R., Balboné M. & Gnankiné O. (2019). Biochemical resistance to insecticides in *Bemisia tabaci* field population from Burkina Faso, West Africa. *Phytoparasitica*. 47 (5).
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology*, 62(6), 649-671.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Dureau, R. (2020). Gestion collective d'un risque ravageur pour améliorer la résilience des systèmes fourragers. Modélisation bioéconomique de la gestion des pullulations de campagnols terrestres (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne-2017) .(2020
- Edreva, A. (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiol*, 31(1-2), 105-24.
- Edwards, C.A., dan J.R. Lofty. (1977). *Biology of earthworms*. A Halsted Prenew as Book. New York.
- Eijsackers, H. (2011). Earthworms as colonizers of natural and cultivated soil environments. *Applied Soil Ecology*, 50, 1-13.
- El Abdali, Y., Agour, A., Allali A., Bourhia, M., El Moussaoui, A. Eloutassi, N., Salamatullah, A.M., Alzahrani, A., Ouahmane, L., Aboul-Soud, M.A.M. (2022). *Lavandula dentata L.: Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antifungal and Insecticidal Activities of Its Essential Oil*. *Plants*, 11, 311.
- Eliard, J. L. (1979). *Manuel d'agriculture générale : Base de la production vegetale*. A l'usage des eleves de l'enseignement agricole et des stagiaires des centres de formation professionnelle agricole. Editions J.-b. Bailliere.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- FAO Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021). <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/RP>, consulté le 07 septembre 2022.
- FAO Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). <http://faostat.fao.org/>

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- FAO Statistics. (2022), Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/>
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. L'actualité chimique, 108(10), 863-832.
- Fayed, S. A. (2009). Antioxidant and anticancer activities of Citrus reticulata (Petitgrain Mandarin) and Pelargonium graveolens (Geranium) essential oils. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 5(5), 740-747.
- Feillet, P. (2000). Le grain de blé: composition et utilisation. Quae.
- Ferfar, M., Meksem Amara, L., & Djebar, M. R. (2016). Etude des changements physiologiques, biochimiques et enzymatiques due à l'application d'un traitement herbicide chez une plante non cible: Triticum durum Desf.
- Fernández, R., Almodóvar, A., Novo, M., Simancas, B., & Cosín, D. J. D. (2012). Adding complexity to the complex: new insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the Aporetodea caliginosa species complex (Oligochaeta, Lumbricidae). Molecular phylogenetics and evolution, 64(2), 368-379.
- Fields, E. K. (1952). The synthesis of esters of substituted amino phosphonic acids1a. Journal of the American Chemical Society, 74(6), 1528-1531.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. Cambridge University Press 3rd Edition, Cambridge
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. Plant, Cell & Environment, 28(8), 1056-1071.
- Frampton, G. K., Jansch, S., Scott-Fordsmand, J. J., Rombke, J. and Van den Brink, P. J. (2006). Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis using species sensitivity distributions. Environ. Toxicol. Chem, 25, 2480-2489.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Fränze, O. (2006). Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecological indicators*, 6(1), 114-136.
- Fryer, M. J. (1992). The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant, Cell & Environment*, 15(4), 381-392.
- Gaupp-Berghausen, M., Hofer, M., Rewald, B., & Zaller, J. G. (2015). Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Scientific reports*, 5(1), 12886.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Giunti, G., Palermo, D., Laudani, F., Algeri, G.M., Campolo, O., Palmeri, V. (2019). Repellence and acute toxicity of a nano-emulsion of sweet orange essential oil toward two major stored grain insect pests. *Ind Crops Prod*, 142, 111869.
- Givaudan, N., Binet, F., Le Bot, B., & Wiegand, C. (2014). Earthworm tolerance to residual agricultural pesticide contamination: field and experimental assessment of detoxification capabilities. *Environmental Pollution*, 192, 9-18.
- Govindarajan, M., Rajeswary, M. (2015). Ovicidal and adulticidal potential of leaf and seed extract of *Albizia lebbek* (L.) Benth.(Family: Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 114, 1949-1961.
- Haarstad, K., Bavor, J., Roseth, R. (2012). Pesticides in greenhouse runoff, soil and plants: a screening. *The Open Environmental & Biological Monitoring Journal*, 5(1).
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M., & Jakoby, W. B. (1974). The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10), 3879-3882.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Halliwell, J., Borrill, P., Gordon, A., Kowalczyk, R., Pagano, M. L., Saccomanno, B., ... & Cockram, J. (2016). Systematic investigation of FLOWERING LOCUS T-like Poaceae gene families identifies the short-day expressed flowering pathway gene, TaFT3 in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7, 857.
- Hami, M. (2004). Effet de quelques régulateurs de croissance mimétiques de l'hormone de mue en application topique sur le développement et la reproduction d'un ravageur des denrées stockées, *ephestia kuehniella zeller* (Doctoral dissertation, Annaba).
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.B., Raza, A., Hawrylak-Nowak, B., Matraszek-Gawron ,R., Mahmud, J.A., et al. (2020). Selenium in plants : Boon or bane *Environ. Exp. Bot*, 178, 104170. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.104170
- Hayes, J. D., & McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free radical research*, 31(4), 273-300.
- Hernandez, J. A., Jiménez, A., Mullineaux, P., & Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, cell & environment*, 23(8), 853-862.
- Hoffmeister, W. (1843) Beiträge zur Kenntniss deutscher Landanneliden. *Archiv für Naturgeschichte*, 9, 183–198.
- Huang, J., & Chen, R. (2000). An overview of recent advances on the synthesis and biological activity of  $\alpha$ -aminophosphonic acid derivatives. *Heteroatom Chemistry: An International Journal of Main Group Elements*, 11(7), 480-492.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Chatha, S. A. S., Jabbar, A., Mahboob, S., & Nigam, P. S. (2010). *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 1070-1078.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Jebali, J., Banni, M., Almeida, E. A. D., & Boussetta, H. (2007). Oxidative DNA damage levels and catalase activity in the clam *Ruditapes decussatus* as pollution biomarkers of Tunisian marine environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 124, 195-200.
- Kabachnik, M. I., & Medved, T. Y. (1952). New synthesis of aminophosphonic acids. In *Dokl. Akad. Nauk SSSR* (Vol. 83, pp. 689-692).
- Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., & Karjalainen, R. (1994). Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell & Environment*, 17(7), 783-794.
- KHALED, B. (2020). Extraction et étude phytochimique des huiles essentielles de certaines plantes steppiques et évaluation de leur efficacité comme biopesticides (Doctoral dissertation, Université Ibn Khaldoun-Tiaret-).
- Khalil, M. A., Abdel-Lateif, H. M., Bayoumi, B. M., Van Straalen, N. M., & Van Gestel, C. A. (1996). Effects of metals and metal mixtures on survival and cocoon production of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Pedobiologia*, 40(6), 548-556.
- KHEDDAM-BENADJAL, N. (2012). Enquête sur la gestion des pesticides en Algérie et recherche d'une méthode de lutte alternative contre *Meloidogyne incognita* (Nematoda: Meloidogynidae) (Doctoral dissertation).
- Khelil. (1995). Développement post-embryonnaire chez *Synisoma nadejda* Rezig, 1989 (Isopoda, Valvifera)(Post-Embryonic Development of *Synisoma nadejda* Rezig, 1989 (Isopoda, Valvifera)). *Crustaceana*, 841-848.
- Khosravinejad, F., Heydari, R., & Farboodnia, T. (2008). Effects of salinity on photosynthetic pigments, respiration, and water content in two barley varieties. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 11(20), 2438-2442.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Kim, J.C., Simmins, P.H., Mullan, B.P., Pluske, J.R. (2005). The digestible energy value of wheat for pigs, with special reference to the post-weaned animal [Review]. *Anim. Feed Sci. Technol*, 122 (34), 257-287.
- Krieger-Liszkay, A., & Trebst, A. (2006). Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of experimental botany*, 57(8), 1677-1684.
- Kurtulus, A., Pehlivan, S., Achiri, T.D., Atakan, E. (2020). Influence of different diets on some biological parameters of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored Prod, Res*, 85: 101554. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2019.101554>
- LADRAA, N. (2012). Aptitude à la panification de quelques variétés de blé dur Algérien (Doctoral dissertation).
- Laib, I. (2012). Etude des activités antioxydante et antifongique des huiles essentielle des fleurs séchées de *Lavandula officinalis*. *Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro alimentaire INATAA, université de consantine*. *Natude et technologie*, 07, 44-52.
- Lavelle, P. (1983). The structure of earthworm communities. In *Earthworm ecology: from Darwin to vermiculture*. Dordrecht : Springer Netherlands, 449-466
- Laverack, M. S. (1963). Aspects of chemoreception in Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 8(2), 141-151.
- Lett, P. F., Farmer, G. J., & Beamish, F. W. H. (1976). Effect of copper on some aspects of the bioenergetics of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 33(6), 1335-1342.
- Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*, 36(9), 1495-1502.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Liberty Press, C., Glotzhabe, R. (2005). *Biology Laboratory Set Student Manual*, 179 p
- Livingstone, D.R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Medicine Veterinaire*, 154, 427-430.
- Lokke, H., Gestel, C. V. (1998). *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*, 281.
- Lotti, M. (1995). Cholinesterase inhibition : complexities in interpretation. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1814-1818.
- Magdelaine, C. (2013). Pesticides ou produits phytosanitaires. En ligne : <http://www.notreplanete.info/ecologie/alimentation/pesticides.php#>. Consulté le 10/07/2021
- Market, E., & Papavasiliou, F. N. (2003). V (D) J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS biology*, 1(1), e16.
- Marrs, K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 127-158.
- Martin, N.A. (1986). Toxicity of pesticides to *Allolobophora caliginosa* (Oligochaeta: lumbricidae). *New Zealand journal of agricultural research*, 29 (4), 699–706. <https://doi.org/10.1080/00288233.1986.10430466>.
- Mcdonald, L.L., Guy, R.H., Speirs, R.D. (1970). Preliminary Evaluation of New Candidate Materials as Toxicants, Repellents and Attractants against Stored Product Insects. Marketing Research Report No. 882, Agriculture Research Service, US Department of Agric, Washington, p. 183
- McEwen, B. S. (1994). Steroid hormone actions on the brain: when is the genome involved?. *Hormones and behavior*, 28(4), 396-405.
- Mekahlia, M. N., Tine, S., Menasria, T., Amieur, H., & Salhi, H. (2016). In vitro biomarker responses of earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to herbicide sekator and phosphate fertilizer. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227, 1-8.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Meksem, L., Rouabhi, R., Djebbar-Berrebbah, H., & Djebbar, M. R. (2007). The impact of propiconazole (Tilt 250 EC) on the growth and the breathing of hard wheat isolated roots (*Triticum durum*, GTA and Vitron varieties).
- Messiad, R., Habes, S.D., Soltani, N. (2015). Reproductive effects of a neonicotinoid insecticide (Imidacloprid) in the German Cockroaches *Blattellagermanica* L. (Dictyoptera, Blattellidae). *Journal Entoml and Zool. Studies*, 3(2), 01-06.
- Mesterhazy, A., Gyorgy, A., Varga, M., Toth, B. (2020). Methodical Considerations and Resistance Evaluation against *F. graminearum* and *F. culmorum* Head Blight in Wheat. The Influence of Mixture of Isolates on Aggressiveness and Resistance Expression. *Microorganisms*, 8(7), 1036
- Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., Lüthje, S. (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochem Rev*, 3,173–193
- Milan, J., Milo, P., Stojiljkovi. (2006). Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in the treatment of organophosphate poisoning. *European Journal of Pharmacology* ,553 (1-3),10-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.09.054>
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V., Prasad, M.N. (2006). Phytochelatase synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(1), 25-37.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 459-481.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
- Morel, Y., & Barouki, R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *MS. Médecine sciences*, 14(6-7), 713-721.
- Moreno, P. R., Falk, E., Palacios, I. F., Newell, J. B., Fuster, V., & Fallon, J. T. (1994). Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*, 90(2), 775-778.
- Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., & Vernet, G. (2003). Effects of the herbicide isoproturon on survival, growth rate, and protein content of mature earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) and its fate in the soil. *Applied Soil Ecology*, 23(1), 69-77.
- Moule, C. (1971). *Céréales*. La Maison rustique.
- Moumeni, O., Berrebbah, H., Azzouz, Z., Amamra, R., Otmani, H., Alayat, A., ... & Djebar, M. R. (2016). Effects of cycloxydim on population growth, phagocytosis, contractile vacuole activity and antioxidant responses in the freshwater ciliate (*Paramecium tetraurelia*). *Research Journal of Environmental Toxicology*, 10(2), 115-125.
- Muthukaruppan, G., Ganasekaran, P. (2010). Effect of Butachlor herbicide on earthworm *Eisenia fetida* – its histological perspicuity. *Applied and Environmental Soil Science*, 1-5
- Nagalakshmi, N., & Prasad, M. N. V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, 160(2), 291-299.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Nagendra, P.M.N., Shankara, B.S. and Sreenivasa, M.Y. (2010). Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*- the causative agent of die-back disease of neem. *Journal of Agricultural Technology*, 6 (1), 127-13
- Naumann, I.D. (1991). *The insects of australia : a textbook for students and research works*, carlton South : Melbourne Uuniversity Press.
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., ... & Rouhier, N. (2006). Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant physiology*, 142(4), 1364-1379.
- Ndiaye, D. S. B. (1999). *Manuel de stockage et de conservation des céréales et des oléagineux*. Cellule centrale d'appui technique PADER, 2.
- Ndomo, A.F., Tapondjou, L.A., Ngamo, L.T., Hance, T. (2008). Insecticidal activities of essential oil of *Callistemon viminalis* applied as fumigant and powder against two bruchids. *Journal of applied entomology* ,134(4), 333-341
- Njus, D., & Kelley, P. M. (1991). Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo. *FEBS letters*, 284(2), 147-151.
- Noctor, G., Arisi, A. C. M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Rennenberg, H., & Foyer, C. H. (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*, 49(321), 623-647.
- Nyathi, Y., & Baker, A. (2006). Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12), 1478-1495.
- Ogawa, H., et al. (2004). Allergic bronchopulmonary fungal disease caused by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Asthma*, 41(2), 223-8.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Oms, M. T., Forteza, R., Cerdà, V., García-Sánchez, F., & Ramos, A. L. (1991). Fluoropack: A program package for automatic fluorimetric measurements. *Computers & chemistry*, 15(1), 87-90.
- Onița, N., Șișu, I., Penescu, M., Purcarea, V. L., & Kurunczi, L. (2010). Synthesis, characterization and biological activity of some  $\alpha$ -aminophosphonates. *SYNTHESIS*, 58, 5.
- Oruç, E. Ö., Üner, N. (2000). Combined effects of 2, 4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 127(3), 291-296.
- Otmani, H., Tadjine, A., Moumeni, O., Zeriri, I., Amamra, R., Samira, D. B., ... & Berrebbah, H. (2018). Biochemical responses of the earthworm *Allolobophora caliginosa* exposed to cadmium contaminated soil in the Northeast of Algeria. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*.
- Pakyari, H., Amir-Maafi, M., Moghadamfar, Z. (2016). Oviposition model of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econom. Entomol*, 109 (5), 2069- 2073.
- Pandir, D., Sahingoz, R., Ercan, F.S. (2013). Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* eggs and larvae exposed to a static magnetic field and preference by *Trichogramma embryophagum*. *Biocontrol Sci. Technol*, 23 (12), 1402-1411.
- Pang, B.O., Lillian, L., Shivakumar, V. (2002). *EMNLP '02: Proceedings of the ACL-02 conference on Empirical methods in natural language processing*, 10, 79 -86. <https://doi.org/10.3115/1118693.1118704>
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6882-6890.

- Parent, C., Capelli, N., & Dat, J. (2008). Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *Comptes Rendus Biologies*, 331(4), 255-261.
- Payne, N. M. (1933). The differential effect of environmental factors upon microbracon hebetor say (hymenoptera: braconidæ) and its host ephestia kühniella zeller (lepidoptera: pyralidæ). I. *The Biological Bulletin*, 65(2), 187-205.
- Pell, E. J., Schlagnhauser, C. D., & Arteca, R. N. (1997). Ozone-induced oxidative stress : mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 264-273.
- Pelosi, C., Bertrand, C., Daniele, G., Coeurdassier, M., Benoit, P., Néliu, S., ... & Fritsch, C. (2021). Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat?. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 305, 107167.
- Pelosi, C., Bertrand, M., Makowski, D., & Roger-Estrade, J. (2008). WORMDYN: a model of *Lumbricus terrestris* population dynamics in agricultural fields. *Ecological Modelling*, 218(3-4), 219-234.
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
- Portes, E. (2008). Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes: propriétés photochimiques et antioxydantes: applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle (Doctoral dissertation, Bordeaux 1).
- Potters, G., De Gara, L., Asard, H., & Horemans, N. (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 537-548.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Pudovik, A. N., & Zametaeva, G. A. (1952). New method for the synthesis of phosphonic and phosphinic esters and their thio analogs Communication 13. Addition of O, O-diethyl hydrogen phosphorothidite to ketones and aldehydes. Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science, 1(5), 825-830.
- Rastoin, J. L., & Benabderrazik, H. (2014). Céréales et oléoprotéagineux au Maghreb: Pour un co-développement de filières territorialisées.
- Rault M, Collange B, Mazzia Ch, Capowiez Y. (2008). Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl- parathion. Soil Biology & Biochemistry 40, 3086–3091.
- Razafindrakoto, S. (2013). Etude des interactions plante-vers de terre (Dichogaster saliens) dans les cultures de riz et de l'eleusine. Memoire de master, Université Athenee Saint Joseph Antsirabe, Madagascar, 87p, 52.
- Reddy V., Urooj A., Kumar A. (2005). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. Food Chemistry, 90 (1), 317-321.
- Regoli, F., & Principato, G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. Aquatic toxicology, 31(2), 143-164.
- Rekia, C. H. E. R. I. F. (2020). Etude comparative des activités biologiques des extraits de deux plantes spontanées récoltées au Sahara Algérien (Doctoral dissertation, Université de Ghardaia).
- Römbke, J., Jänsch, S., & Didden, W. (2005). The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. Ecotoxicology and Environmental Safety, 62(2), 249-265.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Römbke, J., Jänsch, S., & Didden, W. (2005). The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(2), 249-265.
- Rott, E., Steinmetz, H., & Metzger, J. W. (2018). Organophosphonates: A review on environmental relevance, biodegradability and removal in wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 615, 1176-1191. Michaelis, R. Kaehne, Ueber das Verhalten der Jodalkyle gegen die sogen. Phosphorigsäureester oder O-Phosphine, *Berichte*, 31(1898), 1048–1055.
- Salasi, M., Shahrabi, T., Roayaei, E., & Aliofkhaezai, M. J. M. C. (2007). The electrochemical behaviour of environment-friendly inhibitors of silicate and phosphonate in corrosion control of carbon steel in soft water media. *Materials Chemistry and physics*, 104(1), 183-190.
- Salhi, N., Goumni, Z., Salhi, A., Mehani, M. (2015). Evaluation de l'activité antifongique in vitro des huiles essentielles de *Laurus Nobilis L.* sur la croissance mycélienne de *Fusarium Sporotrichoide*. *EIWahat pour les recherches et les etudes*, 8 (02), 34-44.
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., Ghosh, A.R. (2014). Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 120-125.
- Sanchez-Bayo, F., Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PloS one*, 9(4), 94482.
- Sayah Ben Aissa, M. (2018). Les huiles essentielles de trois plantes aromatiques (*Artemesia herba-alba*, *Ocimum basilicum*, *Mentha puleguim*) issues des régions

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

sahariennes et leurs activité antifongiques à l'égard de fusarium sp (Doctoral dissertation, UNIVERSITE KASDI MERBAH–OUARGLA).

- Sbartai, H., Djebbar, M.R., Sbartai, I., Berrabbah, H. (2012). Bioaccumulation of cadmium and zinc in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Comptes Rendus Biologies, 335 (9), 585-593.
- Scherrer, E. (1992). Behavioural responses as indicator of environmental alterations: approaches, results, developments. *J. Appl. Ichthyology*, 8, 122–131.
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., & Treilhou, M. (2008). Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere*, 71(10), 1832-1839.
- Servais, S. (2004). Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3 (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).
- Sharififar, F., Moshafi, M. H., Mansouri, S. H., Khodashenas, M., & Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food control*, 18(7), 800-805.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical journal*, 360(1), 1-16.
- Sherwin, H. A., Montgomery, W. I., & Lundy, M. G. (2013). The impact and implications of climate change for bats. *Mammal Review*, 43(3), 171-182.
- Silva, S.C. and Duarte, P. (2014). Suggestions for international research using electronic surveys. *The Marketing Review*, 14(3), 297-310.
- Simionatto, E., Bonani, V. F., Morel, A. F., Poppi, N. R., Raposo Júnior, J. L., Stuker, C. Z., ... & Hess, S. C. (2007). Chemical composition and evaluation of antibacterial

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 879-885.

- Sims, R.W., Gerard, B.M. (1985). *Earthworms: keys and notes for the identification and study of the species*. Brill and Backhuys, London, 171
- Sizmur, T., Hodson, M. E. (2009). Do earthworms impact metal mobility and availability in soil?—A review. *Environmental pollution*, 157(7), 1981-1989.
- Smirnov, N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Current opinion in Biotechnology*, 9(2), 214-219.
- Soltani-Mazouni N., Hami M. & Gramdi H., (2012). Sublethal effects of methoxy - fenozide on reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *Invertebr. Reprod. Dev*, 56 (2), 157-163.
- Spurgeon, D. J., & Hopkin, S. P. (1995). Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology*, 4, 190-205.
- Srivatsan, M. (2017). *Neural Stem Cells and Transplantation*. In *Neural Cell Biology*. CRC Press, 125-145
- Stępień, Ł., Koczyk, G., & Waśkiewicz, A. (2011). Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of applied genetics*, 52, 487-496.
- Stępień, Ł., Koczyk, G., & Waśkiewicz, A. (2011). Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of applied genetics*, 52, 487-496.
- Taibi, D. M., Landis, C. A., Petry, H., & Vitiello, M. V. (2007). A systematic review of valerian as a sleep aid: safe but not effective. *Sleep medicine reviews*, 11(3), 209-230.
- Taiz, L., Zeiger, E.(2002). *Plant Physiology (Third Edition)*. Sinauer Associates, Inc., Publishers : Sunderland, 67-86.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Tellier, S. (2006). Les pesticides en milieu agricole: état de la situation environnementale et initiatives prometteuses. Développement durable, environnement et parcs Québec.
- Tomlin, A. D., & Miller, J. J. (1980). Development and fecundity of the manure worm *Eisenia foetida* (Annelida: Lumbricidae) under laboratory conditions.
- TROTTER, D.M., KENT R.A., WONG, M.R. (1991). Aquatic Fate and Effect of Carbofuran. *Critical Reviews in Environmental Control*, 21(2), 137-176.
- Velki, M., Hackenberger, B. K. (2013). Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. *Chemosphere*, 90(3), 1216-1226.
- Venkateswara, J., Kavitha, P. (2010). In vitro effects of chlorpyrifos on the acetylcholinesterase activity of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(3-4), 303-306.
- Victor, V. M., Esplugues, J. V., Hernandez-Mijares, A., & Rocha, M. (2009). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 9(4), 376-389.
- Vranová, E., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1227-1236.
- Wall, D.H. (2004). Sustaining biodiversity and ecosystem services in soils and sediments. Island Press, Washington, USA, 275.
- Wang *et al.*, (2003). *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, 16 (10), 1487-1494.
- Wang, X. X., Zhang, T. Y., Dao, G. H., Xu, Z. B., Wu, Y. H., & Hu, H. Y. (2020). Assessment and mechanisms of microalgae growth inhibition by phosphonates: Effects of intrinsic toxicity and complexation. *Water Research*, 186, 116333.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Weckbecker, G., & Cory, J. G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40(3), 257-264.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., ... & Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. *The EMBO journal*, 16(16), 4806-4816.
- Yaiche, F., sbartai, H., Sbartai, I., Meksem, L., Ouali, kh.. (2017). Cellular réponses observed following contamination by the pathogen of task halo " pyrenophoratrirtici-repentis" or heavy métal " copper" in durum wheat (*tritium durum* desf). *Int.J. PHarm.Sci.Rev.Res*, 44(2), 136-144
- Yesguer, S. (2015). Evaluation de l'écotoxicité de certains pesticides sur les sols par l'utilisation d'un biotest: cas des lombricidés (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat: Université de Bejaia).
- Zhou, Q.X., Zhang, Q.R., Liang, J.D. (2006). Toxic effects of acetochlor and methamidophos on earthworm *Eiseniafetida* in phaiozem, northeast China, *Journal of Environmental Sciences*, 18(4), 741–745.
- Zielinski, S., Pörtner, H. O. (2000). Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 125(2), 147-160.