



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie  
Option : Toxicologie

Intitulé

**Etude de la toxicité d'un Cyclohexanedione (herbicide)  
sur deux modèles biologiques d'eau douce :  
*Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna***

Présentée par : M<sup>lle</sup> MOUMENI Ouissem

Membres de Jury :

DJEBAR Mohamed Réda	Professeur	Président	Université d'Annaba
BERREBBAH Houria	Professeur	Directeur de thèse	Université d'Annaba
SOUIKI Lynda	Professeur	Examineur	Université de Guelma
BENBOUZID Houneida	M.C.A	Examineur	Université d'Annaba

Année universitaire : 2016/2017

## **REMERCIEMENTS**

*M'y voici...Enfin ! Quelle aventure ! Quelle expérience de vie...*

*Une thèse de doctorat peut paraître comme un document très aride, très froid et rigide. Pourtant, le doctorat en soi est loin d'être dénué de vie, de créativité et d'interactions humaines. Il s'agit d'un travail de longue haleine, d'un défi que l'on se donne à soi-même. Mais surtout d'une longue aventure humaine et scientifique pleine d'influences, d'entraves, d'évolution et de rencontres. Cette période de doctorat aura été probablement l'un des plus beaux chapitres de ma vie. J'aimerais remercier ceux et celles qui d'une manière ou d'une autre ont participé à son écriture ...*

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Madame **BERREBBAH Houria**, Professeur à l'université d'Annaba, pour la confiance qu'elle m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux de thèse. Je lui suis extrêmement reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ces années de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, et de sa gentillesse certaine que je n'oublierai jamais. Soyez assuré de ma profonde gratitude pour tout ce que vous m'avez appris.*

*De simples remerciements ne sont pas suffisants pour exprimer ma sincère reconnaissance et mon profond respect à mon MAÎTRE et mon co-directeur Monsieur **AZZOUZ Zoubir**, Maître de conférences à l'université d'Annaba. Ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans lui. Merci pour son soutien sans relâche, sa grande disponibilité, son écoute, sa patience et ses précieux conseils. Il a fourni beaucoup d'efforts pour que j'évolue dans ma carrière scientifique. J'espère être à la hauteur de sa confiance.*

*Toute ma reconnaissance pour mon Professeur **DJEBAR Mohamed Réda**, directeur du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université d'Annaba de m'avoir si gentiment accueillie au sein de son équipe. Je tiens à lui exprimer ma sincère gratitude, non seulement de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, mais également, de m'avoir accompagné et soutenu tout au long de ces années de formation et d'avoir veillé au bon déroulement de ce travail.*

*Mes sincères remerciements s'adressent, aussi, à Madame **SOUIKI Lynda**, Professeur à l'université de Guelma et Madame **BENBOUZID Houneida**, Maître de conférences à l'université d'Annaba, pour l'intérêt et l'attention qu'elles ont accordé à mon travail en faisant partie de ce jury en qualité d'examinateur. Qu'elles trouvent ici l'expression de mon profond respect.*

*Je tiens, par ailleurs, à remercier tous mes enseignants et mes professeurs pour la formation scientifique très enrichissante qu'ils m'ont dispensé tout au long de mon cursus universitaire.*

*Je ne saurais terminer sans souligner le soutien chaleureux et enthousiasmant de mes chers amis et collègues du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire qui ont contribué, chacun à sa façon, à l'exécution de ce travail. Un grand merci du fond du cœur à Rym, Hadjer, Amel, Sana, Manel, Fateh, Amira et Zinou, pour les innombrables et inoubliables moments de plaisir, de joies, de folies, de détente, de fous rires, de stress, de peine... que nous avons partagé ensemble. J'en garde un souvenir de profonde complicité et de sincère dévouement. Sachez simplement que votre amitié m'est précieuse et indispensable. Merci également à Linda, Marwa, Meriem, Khadija, Lyes, Meriem, Medina, Ibtissem, Nawel, Asma, Semsem, hanene, Labiba, Amira, Amina, Housseem, Chiraz...pour leur aide précieuse, leur sympathie et leurs encouragements.*

## **DEDICACES**

### **À MES CHÈRES PARENTS**

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer mon profond respect, mon amour éternel et ma reconnaissance infinie pour les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien être*

*Je vous remercie pour vos précieux conseils, qui ont toujours guidé mes pas vers la réussite... Un immense MERCI pour la confiance indéfectible et le soutien infatigable que vous m'avez accordé tout au long de ces années de thèse*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.*

### **À MON ADORABLE ET UNIQUE FRÈRE « LAMINE »**

*Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour, l'affection et le respect que je porte pour toi*

*Mon conseiller, mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de ma vie... Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.*

*Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et réussite.*

### **À MA BELLE SŒUR « RADIA »**

*Tu es pour moi une sœur et une amie plus qu'une belle sœur*

*Je te remercie, pour tes appuis, conseils et encouragements qui m'ont été d'un grand soutien au cours de ce long parcours, et pour tous les moments de joie et de plaisanteries qu'on a pu partager ensemble...*

*Puisse DIEU, le tout puissant, te préserver du mal, te combler de santé et de bonheur.*

***À MON TRÈS CHER PETIT NEVEU « FADI » ET MON  
ADORABLE NIECE « ISRAË »***

*Quoique je dise, Je ne saurais exprimer tout l'amour que j'ai pour vous,  
Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur  
A vous mes adorables anges je dédie ce modeste travail en implorant  
DIEU de vous garder, éclairer votre chemin et vous aider à réaliser à  
votre tour vos vœux les plus chers.*

***A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-MERES***

*J'aurais tant aimé que vous soyez présentes. Que Dieu ait vos âmes  
dans sa sainte miséricorde.*

***A LA MEMOIRE DE MA TRÈS CHERE ET ADORABLE  
TATA « MALIKA »***

*Vous m'avez toujours accompagné par vos prières, votre tendresse et  
douceur, vous avez toujours cru en mes capacités  
Le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir ce bonheur ensemble  
Vous n'êtes jamais partie pour moi. Repose en paix chère tante.*

***À MES ONCLES, TANTES, COUSINS ET COUSINES***

*Vous m'avez tant soutenu et encouragé tout au long de mon parcours  
Votre présence à mes côtés est d'un immense réconfort. Je prie Dieu le  
tout puissant pour que nous soyons toujours et à jamais réunis.*

***À MON AMIE D'ENFANCE « Hana »***

*En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les  
moments que nous avons partagé, je te dédie ce travail et je te  
souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

***À tous ceux qui ma réussite leur tient à cœur...***

## Résumé

L'objectif général de ce travail consiste en l'étude de la toxicité potentielle d'un herbicide de la famille des cyclohexanediones (Focus Ultra) sur deux modèles biologiques d'eau douce : *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna*.

Les résultats obtenus montrent d'une part un effet inhibiteur dose dépendant sur la croissance cellulaire de *Paramecium tetraurelia* qui se traduit par une diminution du nombre et de la vitesse de génération ainsi qu'une augmentation du temps de génération. Parallèlement, nous avons noté une stimulation de la phagocytose et une inhibition de l'activité vacuolaire. D'autre part, la toxicité de Focus Ultra s'est manifestée chez *Daphnia magna* par une inhibition significative de la mobilité, une diminution dose dépendante de la fréquence cardiaque ainsi qu'une inhibition de l'activité de la mandibule et des appendices thoraciques indiquant une perturbation du comportement trophique.

L'étude du métabolisme biochimique et énergétique a révélé une altération du taux des principales macromolécules biologiques (protéines et lipides), corrélée à une inhibition de l'activité respiratoire chez les deux organismes aquatiques.

De plus, l'exposition aux fortes concentrations de Focus Ultra a induit l'apparition respective de malformations cellulaires et macronucléaires chez *P. tetraurelia* ainsi que des anomalies de développement chez la descendance de *D. magna*, confirmant donc le caractère génotoxique et embryotoxique de ce xénobiotique.

L'étude comportementale a également mis en évidence une perturbation des mouvements des paramécies et des daphnies se traduisant par une altération des trajectoires et des vitesses de nage.

Enfin, le suivi des biomarqueurs du stress oxydant montre des perturbations doses dépendantes et statistiquement significatives en présence de l'herbicide. Nous avons, ainsi, mis en évidence une induction des activités enzymatiques CAT, GST et LDH ainsi qu'une déplétion du taux de GSH, parallèlement à une augmentation du taux de MDA témoignant de la survenue d'une peroxydation lipidique.

**Mots clés :** Cycloxydime, *Paramecium tetraurelia*, *Daphnia magna*, biomarqueurs, malformations, comportement, stress oxydant, peroxydation lipidique.

## Abstract

The general objective of this work is to study the potential toxicity of an herbicide of the cyclohexanediones class (Focus Ultra) on two freshwater biological models: *Paramecium tetraurelia* and *Daphnia magna*.

The results show firstly a dose dependent inhibitory effect on cell growth of *Paramecium tetraurelia* which causes a decrease in the number and the velocity of generation with an increase of the generation time. Similarly, we noted a stimulation of phagocytosis and inhibition of vacuolar activity. On the other hand, the toxicity of Focus Ultra was manifested in *Daphnia magna* by a significant inhibition of the mobility, a dose dependent decrease in heart rate and an inhibition of the activity of the mandible and thoracic appendages indicating disruption of feeding behavior.

The study of biochemical and energetic metabolism showed an alteration of biological macromolecules rate (proteins and lipids) correlated to an inhibition of respiratory activity in both aquatic organisms.

In addition, exposure to high concentrations of Focus Ultra induced cellular and macronuclear deformities in *P. tetraurelia* and developmental abnormalities in the offspring of *D. magna*, thus confirming the genotoxic and embryotoxic character of this xenobiotic.

The behavioral study also revealed a disruption in the movements of paramecium and daphnia resulting in an alteration of trajectories and swimming speeds.

Finally, monitoring biomarkers of oxidative stress shows a significant dose-dependent disturbance in the presence of the herbicide. We have thus demonstrated induction of CAT, GST and LDH enzyme activities as well as a depletion of GSH rate, in parallel with an increase of MDA level, which indicates the occurrence of lipid peroxidation.

**Keywords:** Cycloxydim, *Paramecium tetraurelia*, *Daphnia magna*, biomarkers, malformations, behavior, oxidative stress, lipid peroxidation.

## المخلص

الهدف العام من هذا العمل هو دراسة السمية المحتملة لمبيد اعشاب من عائلة cyclohexanediones (فوكوس الترا Focus Ultra) على نموذجين بيولوجيين للمياه العذبة وهما *Paramecium tetraurelia* و *Daphnia magna*.

بينت النتائج المتحصل عليها من جهة تأثير ميثبط على نمو خلايا *P. tetraurelia* مما ادى إلى انخفاض في عدد و سرعة تولد الجيل بالإضافة الى زيادة الزمن اللازم لذلك. بالموازاة مع هذه التغيرات، لاحظنا تحفيز البلعمة و تثبيط النشاط الفجوي. من جهة أخرى، ظهرت سمية Focus Ultra لدى *D. magna* من خلال تثبيط واضح للحركة و انخفاض طردي عند زيادة الجرعة في معدل ضربات القلب إلى جانب تثبيط نشاط الفك السفلي و الزوائد الصدرية الذي يشير بوضوح الى حدوث اضطراب في سلوك التغذية.

وقد كشفت دراسة الأيض الحيوي عن تغيير في معدلات الجزيئات البيولوجية الرئيسية (البروتينات والدهون) مرفوق بتثبيط النشاط التنفسي لدى الكائنات المائية على حد سواء.

علاوة على ذلك، فإن التعرض لتركيزات عالية من Focus Ultra نجم عنه ظهور تشوهات خلوية و نووية لدى *P. tetraurelia* و تشوهات في النمو لدى ذرية *D. magna* ، الأمر الذي يؤكد السمية الوراثية والجينية لهذا المبيد.

كما كشفت الدراسة السلوكية عن خلل في حركة التنقل لدى كل من الكائنات المائية مما أدى إلى اضطراب في المسارات وسرعات السباحة.

وأخيراً، يظهر رصد المؤشرات الحيوية للأكسدة في وجود مبيد الأعشاب اضطرابات ذات دلالة إحصائية متناسبة طردياً مع الجرعة. لوحظ ذلك من خلال تحريض الأنشطة الإنزيمية CAT, GST, LDH ، إلى جانب انخفاض حاد في معدل GSH، بالتوازي مع زيادة في مستويات MDA، مما يدل على حدوث تأكسد للدهون.

**الكلمات المفتاحية :** Cycloxydim ، *Paramecium tetraurelia* ، *Daphnia magna* ، المؤشرات الحيوية، تشوه، السلوك، الإجهاد التأكسدي، تأكسد للدهون.

# Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

**Introduction générale ..... 1**

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les cyclohexanediones .....	4
1.1. Structure et propriétés physicochimiques .....	5
1.2. Mode d'action .....	6
1.3. Comportement, devenir et persistance des cyclohexanediones dans l'environnement .....	7
2. Le stress oxydant : origines et conséquences .....	10
2.1. Origines des espèces réactives de l'oxygène (ERO) .....	10
2.2. Rôles des espèces réactives de l'oxygène dans les situations physiologiques .....	10
2.3. Le déséquilibre : origines et conséquences .....	10
2.4. Effets du stress oxydant sur les structures moléculaires .....	11
2.5. Les défenses antioxydantes .....	12
3. Les indicateurs biologiques : Définitions et concepts .....	13
3.1. Notion de bioindication .....	13
3.2. Notion de biomarqueurs .....	13
4. La paramécie .....	14
4.1. Biologie et morphologie .....	14
4.2. Mouvement .....	16
4.3. Alimentation .....	17
4.4. Respiration .....	17
4.5. Reproduction .....	17
4.6. Intérêt des paramécies comme modèles d'étude .....	18
5. La daphnie .....	19

5.1. Biologie et morphologie .....	19
5.2. Développement .....	21
5.3. Alimentation .....	23
5.4. Locomotion .....	23
5.5. Cycle de vie .....	24
5.6. Intérêt des daphnies comme modèles d'étude .....	26

## Chapitre II : Etude physiologique

1. Introduction .....	27
2. Matériel et méthodes .....	27
2.1. Matériel chimique .....	27
2.2. Matériel biologique .....	29
2.2.1. <i>Paramecium tetraurelia</i> .....	29
2.2.2. <i>Daphnia magna</i> .....	29
2.3. Méthodes .....	30
2.3.1. Cas de <i>Paramecium tetraurelia</i> .....	30
2.3.1.1. Culture des paramécies .....	30
2.3.1.2. Traitement des paramécies .....	30
2.3.1.3. Cinétique de croissance cellulaire .....	30
2.3.1.4. Calcul du pourcentage de réponse .....	31
2.3.1.5. Détermination de la Concentration Inhibitrice (CI <sub>50</sub> ) .....	31
2.3.1.6. Détermination de l'activité phagocytaire .....	31
2.3.1.7. Détermination de l'activité des vacuoles contractiles .....	32
2.3.2. Cas de <i>Daphnia magna</i> .....	33
2.3.2.1. Condition d'élevage des daphnies .....	33
2.3.2.2. Test de toxicité aiguë .....	33
2.3.2.3. Calcul du taux d'immobilisation (24h/48h) .....	34
2.3.2.4. Détermination de la Concentration Effective (CE <sub>50</sub> ) .....	35
2.3.2.5. Mesure du rythme cardiaque et détermination de l'activité des appendices thoraciques et de la mandibule .....	35
2.4. Analyses statistiques .....	35
3. Résultats .....	36

3.1. Cas de <i>Paramecium tetraurelia</i> .....	36
3.1.1. Effet de Focus Ultra sur la cinétique de croissance cellulaire .....	36
3.1.2. Effet de Focus Ultra sur le nombre, le temps et la vitesse de génération .....	37
3.1.3. Effet de Focus Ultra sur le pourcentage de réponse .....	38
3.1.4. Détermination de la concentration inhibitrice CI <sub>50</sub> .....	39
3.1.5. Effet de Focus Ultra sur l'activité phagocytaire .....	40
3.1.6. Effet de Focus Ultra sur l'activité de la vacuole pulsatile .....	42
3.2. Cas de <i>Daphnia magna</i> .....	43
3.2.1. Taux d'immobilisation de <i>Daphnia magna</i> après exposition au Focus Ultra (24/48h) .....	43
3.2.2. Détermination de la concentration effective CE <sub>50</sub> (24/48h) .....	44
3.2.3. Effet de Focus Ultra sur la fréquence cardiaque .....	44
3.2.4. Effet de Focus Ultra sur l'activité des appendices thoraciques .....	45
3.2.5. Effet de Focus Ultra sur l'activité mandibulaire .....	46
4. Discussion .....	47

### **Chapitre III : Etude Biochimique et polarographique**

1. Introduction .....	53
2. Matériel et méthodes .....	53
2.1. Méthodes de dosage des métabolites .....	53
2.1.1. Dosage des protéines totales .....	54
2.1.2. Dosage des lipides totaux .....	54
2.2. Mesure de l'activité respiratoire .....	54
3. Résultats .....	55
3.1. Effet de Focus Ultra sur le métabolisme biochimique .....	55
3.1.1. Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'évolution du taux de protéines totales .....	55
3.1.2. Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'évolution de la teneur en lipides totaux .....	57
3.2. Effet de Focus Ultra sur le métabolisme respiratoire .....	59
4. Discussion .....	61

## **Chapitre IV : Embryotoxicité, malformations cellulaires et macronucléaires**

1. Introduction .....	64
2. Matériel et méthodes .....	64
2.1. Cas de <i>Paramecium tetraurelia</i> .....	64
2.1.1. Détermination du taux de malformations cellulaires .....	64
2.1.2. Détermination du taux de malformations macronucléaires .....	65
2.2. Cas de <i>Daphnia magna</i> .....	65
2.2.1. Test d'embryotoxicité .....	65
2.2.2. Calcul du taux de malformations néonatales .....	66
3. Résultats .....	68
3.1. Cas de <i>Paramecium tetraurelia</i> .....	68
3.1.1. Taux de malformations cellulaires induites par l'exposition au Focus Ultra .....	68
3.1.2. Anomalies structurelles et atteintes membranaires .....	69
3.1.3. Taux de malformations macronucléaires induites par l'exposition au Focus Ultra .....	76
3.1.4. Anomalies macronucléaires .....	77
3.2. Cas de <i>Daphnia magna</i> .....	81
3.2.1. Taux d'anomalies développementales induites par l'exposition au cours du stade embryonnaire aux concentrations croissantes de Focus Ultra .....	81
3.2.2. Anomalies développementales observées chez les descendants de <i>Daphnia magna</i> après exposition au Focus Ultra .....	82
4. Discussion .....	86

## **Chapitre V : Etude comportementale**

1. Introduction .....	89
2. Matériel et méthodes .....	89
2.1. Cas de <i>Paramecium tetraurelia</i> .....	89
2.1.1. Test d'évitement .....	89
2.1.2. Suivi des Trajectoires de déplacement .....	90

2.1.3. Calcul de la vitesse de déplacement .....	90
2.2. Cas de <i>Daphnia magna</i> .....	91
2.2.1. Evaluation de la capacité natatoire de <i>Daphnia magna</i> (Swimming Ability test) .....	91
2.2.2. Test de phototaxie (Phototactic behaviour) .....	92
2.2.3. Suivi des Trajectoires de déplacement .....	94
2.2.4. Calcul de la vitesse de nage .....	94
3. Résultats .....	96
3.1. Cas de <i>Paramecium tetraurelia</i> .....	96
3.1.1. Effet de Focus Ultra sur le pourcentage d'évitement .....	96
3.1.2. Variation du pourcentage d'évitement en fonction du temps .....	96
3.1.3. Effet de Focus Ultra sur les trajectoires de déplacement .....	98
3.1.4. Effet de Focus Ultra sur la vitesse de déplacement .....	102
3.2. Cas de <i>Daphnia magna</i> .....	103
3.2.1. Effet de Focus Ultra sur la capacité natatoire .....	103
3.2.2. Influence de Focus Ultra sur le comportement phototactique .....	105
3.2.3. Effet de Focus Ultra sur les trajectoires de déplacement .....	106
3.2.4. Effet de Focus Ultra sur la vitesse de nage .....	109
4. Discussion .....	110

## **Chapitre V : Etude du stress oxydant**

1. Introduction .....	116
2. Matériel et méthodes .....	116
2.1. Détermination du taux de glutathion (GSH) .....	116
2.2. Mesure de l'activité glutathion-S-transférase (GST) .....	117
2.3. Mesure de l'activité catalase (CAT) .....	118
2.4. Mesure de l'activité Lactate déshydrogénase (LDH) .....	118
2.5. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA) .....	119
3. Résultats .....	120
3.1. Effet de Focus Ultra sur l'évolution du taux de glutathion (GSH) .....	120
3.2. Effet de Focus Ultra sur l'évolution de l'activité glutathion-S-transférase (GST) .....	122

3.3. Effet de Focus Ultra sur la variation de l'activité catalase (CAT) .....	124
3.4. Effet de Focus Ultra sur la variation de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) .....	126
3.5. Effet de Focus Ultra sur la variation du taux de malondialdéhyde (MDA) .....	128
4. Discussion .....	130
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>135</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>138</b>

## Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
<b>1</b>	Propriétés physico-chimiques des cyclohexanediones	<b>6</b>
<b>2</b>	Principaux produits de dégradation biotiques et abiotiques des cyclohexanediones dans différentes matrices	<b>8</b>
<b>3</b>	Caractéristiques physicochimiques et structure moléculaire de Focus Ultra (cycloxydime)	<b>28</b>
<b>4</b>	Composition chimique de l'eau de dilution (ISO/DIS 6341.2)	<b>34</b>
<b>5</b>	Evolution du nombre, du temps et de la vitesse de génération de <i>Paramecium tetraurelia</i> après 96h d'exposition au Focus Ultra	<b>37</b>

## Liste des figures

N°	Titres	Pages
1	Structures chimiques des herbicides de la famille des cyclohexanediones	4
2	Tautomérie céto-énolique des cyclohexanediones	5
3	Morphologie générale d'un spécimen de <i>Paramecium</i> du genre <i>aurelia</i>	16
4	Anatomie de <i>Daphnia magna</i> femelle adulte	20
5	Dimorphisme sexuel chez <i>Daphnia magna</i> , A (femelle), B (mâle)	21
6	Photos des différents stades de développement embryonnaire chez <i>Daphnia magna</i>	22
7	Cycle de vie de la daphnie	24
8	Reproduction parthénogénétique de la daphnie en conditions favorables	25
9	Photographie d'un mâle de 21 jours	25
10	Photographie d'une éphippie	25
11	Image représentant <i>Paramecium tetraurelia</i>	29
12	Image représentant <i>Daphnia magna</i>	29
13	Activité de la vacuole pulsatile antérieure chez <i>Paramecium tetraurelia</i> (x 400)	32

<b>14</b>	Elevage de <i>Daphnia magna</i> au laboratoire	<b>33</b>
<b>15</b>	Effet de Focus Ultra sur la croissance de <i>Paramecium tetraurelia</i>	<b>36</b>
<b>16</b>	Evolution du pourcentage de réponse de <i>Paramecium tetraurelia</i> en présence des concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>38</b>
<b>17</b>	Détermination de la concentration inhibitrice moyenne (CI <sub>50</sub> ) de la croissance chez <i>Paramecium tetraurelia</i> après exposition au Focus Ultra	<b>39</b>
<b>18</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'activité phagocytaire chez <i>Paramecium tetraurelia</i>	<b>40</b>
<b>19</b>	Vacuoles digestives chez <i>Paramecium tetraurelia</i> témoin et traitée par 3, 6, 9 et 12 mg/L de Focus Ultra colorées au rouge neutre	<b>41</b>
<b>20</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'activité des vacuoles pulsatiles chez <i>Paramecium tetraurelia</i>	<b>42</b>
<b>21</b>	Taux d'immobilisation enregistré chez <i>Daphnia magna</i> exposée pendant 24 et 48h aux concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>43</b>
<b>22</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la fréquence cardiaque chez <i>Daphnia magna</i> après 24 et 48h d'exposition	<b>44</b>
<b>23</b>	Effet de Focus Ultra sur l'activité des appendices thoraciques chez <i>Daphnia magna</i> après 24 et 48 heures d'exposition	<b>45</b>
<b>24</b>	Effet d'une exposition de 24 et 48h aux concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'activité mandibulaire chez <i>Daphnia magna</i>	<b>46</b>
<b>25</b>	Effet de Focus Ultra sur le taux de protéines totales chez <i>Paramecium tetraurelia</i>	<b>55</b>

<b>26</b>	Effet de Focus Ultra sur le taux de protéines totales chez <i>Daphnia magna</i>	<b>56</b>
<b>27</b>	Effet de Focus Ultra sur la teneur en lipides totaux chez <i>Paramecium tetraurelia</i>	<b>57</b>
<b>28</b>	Effet de Focus Ultra sur la teneur en lipides totaux chez <i>Daphnia magna</i>	<b>58</b>
<b>29</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur le métabolisme respiratoire de <i>Paramecium tetraurelia</i>	<b>59</b>
<b>30</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur le métabolisme respiratoire de <i>Daphnia magna</i>	<b>60</b>
<b>31</b>	Protocole expérimental du test d'embryotoxicité	<b>67</b>
<b>32</b>	Taux de malformations cellulaires enregistré chez <i>Paramecium tetraurelia</i> après exposition aux concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>68</b>
<b>33</b>	Observation microscopique d'une cellule de <i>Paramecium tetraurelia</i> témoin avec une morphologie normale	<b>69</b>
<b>34 A</b>	Anomalies morphologiques observées chez <i>Paramecium tetraurelia</i> après exposition au Focus Ultra	<b>70</b>
<b>34 B</b>	Anomalies morphologiques observées chez <i>Paramecium tetraurelia</i> après exposition au Focus Ultra	<b>71</b>
<b>35</b>	Noircissement et condensation du cytoplasme	<b>72</b>
<b>36</b>	Formation de vésicules et des bourgeonnements au niveau de la membranaire cellulaire	<b>73</b>

<b>37</b>	Ruptures au niveau membranaire et libération du contenu cellulaire	<b>74</b>
<b>38</b>	désintégration membranaire et mort cellulaire (apoptose)	<b>75</b>
<b>39</b>	Taux de malformations macronucléaires enregistré chez <i>Paramecium tetraurelia</i> après exposition aux concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>76</b>
<b>40</b>	Observation microscopique d'une cellule de <i>Paramecium tetraurelia</i> témoin avec coloration du noyau au bleu de méthylène	<b>77</b>
<b>41</b>	Marginalisation et déformation du macronucléus chez <i>Paramecium tetraurelia</i> exposée aux plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)	<b>78</b>
<b>42</b>	Elongation du macronucléus chez <i>Paramecium tetraurelia</i> exposée aux plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)	<b>79</b>
<b>43</b>	Début de caryolyse et diffusion du contenu macronucléaire dans le cytoplasme chez <i>Paramecium tetraurelia</i> exposée aux plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)	<b>80</b>
<b>44</b>	Taux d'anomalies développementales induites par l'exposition des daphnies durant leur stade embryonnaire aux concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>81</b>
<b>45</b>	Observation microscopique d'une néonate de <i>Daphnia magna</i> témoin	<b>82</b>
<b>46</b>	Néonates de <i>Daphnia magna</i> avec un courbement et une déformation de l'épine caudale	<b>83</b>
<b>47</b>	Néonates de <i>Daphnia magna</i> présentant un sous-développement et des malformations au niveau des antennes secondaires et de l'épine caudale	<b>84</b>
<b>48</b>	Néonates de <i>Daphnia magna</i> présentant des déformations au niveau de la carapace, un sous-développement des soies et un courbement de l'épine caudale	<b>85</b>

<b>49</b>	Néonates de <i>Daphnia magna</i> présentant des anomalies et des dommages au niveau du tube digestif	<b>85</b>
<b>50</b>	Représentation schématique de la lame (Well-test apparatus) utilisée pour le test d'évitement	<b>90</b>
<b>51</b>	Photo prise via le logiciel « Kinovea » montrant la mesure de la distance (en pixel) parcourue par une paramécie en fonction du temps	<b>91</b>
<b>52</b>	Schéma du dispositif expérimental utilisé pour l'évaluation de la capacité natatoire de <i>Daphnia magna</i>	<b>92</b>
<b>53</b>	Illustration du dispositif expérimental utilisé pour l'analyse des réponses phototactiques	<b>93</b>
<b>54</b>	Schéma représentant la distribution verticale des daphnies sur les 4 compartiments du tube à essai dans le test de phototaxie	<b>94</b>
<b>55</b>	Pourcentages d'évitement enregistrés après 15 minutes d'exposition aux concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>97</b>
<b>56</b>	Pourcentages d'évitement enregistrés toutes les 3 min pour les différentes concentrations de Focus Ultra	<b>97</b>
<b>57</b>	Trajectoires de <i>Paramecium tetraurelia</i> témoin enregistrées en absence et en présence d'obstacles	<b>98</b>
<b>58</b>	Mouvements en zigzag et changements brutaux de directions observés chez <i>Paramecium tetraurelia</i> traitée par les fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)	<b>99</b>
<b>59</b>	Mouvements circulaires et rotations sur place enregistrés chez <i>Paramecium tetraurelia</i> traitée par les plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)	<b>100</b>

<b>60</b>	Mouvements désordonnés et aléatoires induits chez <i>Paramecium tetraurelia</i> suite au traitement par les plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)	<b>101</b>
<b>61</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la vitesse de déplacement de <i>Paramecium tetraurelia</i>	<b>102</b>
<b>62</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la capacité natatoire de <i>Daphnia magna</i> après 6, 24 et 48h d'exposition	<b>104</b>
<b>63</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur le comportement phototactique de <i>Daphnia magna</i>	<b>105</b>
<b>64</b>	Trajectoires de mouvements enregistrées par les témoins de <i>Daphnia magna</i>	<b>106</b>
<b>65</b>	Trajectoires circulaires et quasi-hélicoïdales induites chez <i>Daphnia magna</i> par l'exposition aux concentrations (1, 2 et 4 mg/L) de Focus Ultra	<b>107</b>
<b>66</b>	Trajectoires en zigzag induites chez <i>Daphnia magna</i> par l'exposition aux concentrations (1, 2 et 4 mg/L) de Focus Ultra	<b>108</b>
<b>67</b>	Mouvements aléatoires observés chez <i>Daphnia magna</i> exposée aux plus fortes concentrations (2 et 4 mg/L) de Focus Ultra	<b>108</b>
<b>68</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la vitesse de nage de <i>Daphnia magna</i> en fonction du temps	<b>109</b>
<b>69</b>	Variation du taux de GSH chez <i>Paramecium tetraurelia</i> exposée aux concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>120</b>
<b>70</b>	Variation du taux de GSH chez <i>Daphnia magna</i> exposée aux concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>121</b>

<b>71</b>	Evolution de l'activité GST chez <i>Paramecium tetraurelia</i> en fonction des concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>122</b>
<b>72</b>	Evolution de l'activité GST chez <i>Daphnia magna</i> en fonction des concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>123</b>
<b>73</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la variation de l'activité CAT chez <i>Paramecium tetraurelia</i>	<b>124</b>
<b>74</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la variation de l'activité CAT chez <i>Daphnia magna</i>	<b>125</b>
<b>75</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'évolution de l'activité LDH chez <i>Paramecium tetraurelia</i>	<b>126</b>
<b>76</b>	Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'évolution de l'activité LDH chez <i>Daphnia magna</i>	<b>127</b>
<b>77</b>	Evolution du taux de MDA chez <i>Paramecium tetraurelia</i> en présence des concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>128</b>
<b>78</b>	Evolution du taux de MDA chez <i>Daphnia magna</i> en présence des concentrations croissantes de Focus Ultra	<b>129</b>

## Liste des abréviations

**ACCase** : Acétyl-CoA Carboxylase

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**Ag<sup>+</sup>** : Ion d'argent

**AIA** : Acide indol-acétique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ATP** : Adénosine triphosphate

**BSA** : Bovin Sérum Albumine

**Ca<sup>2+</sup>** : Ion Calcique

**CAT** : Catalase

**CDNB** : 1-chloro 2, 4 dinitrobenzène

**CE<sub>50</sub>** : Concentration effective moyenne

**CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice moyenne

**DO** : Densité optique

**DTNB** : Acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque

**EOR** : Espèces oxygénées activées

**GPx** : Glutathion Peroxydase

**GSH** : Glutathion

**GSSG** : Disulfure de glutathion

**GSSH** : Glutathion réduit

**GST** : Glutathion-S-Transférase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**HO•** : Radical Hydroxyl

**Ip** : Index phototactique

**ISO** : International Standards Organisation

**LDH** : Lactate Dehydrogenase

**MDA** : Malondialdéhyde

**MR** : Métabolisme Respiratoire

**MTOC** : Centres organisateurs des microtubules

**NAD** : Nicotinamide Adénine

Dinucléotide

**NADPH** : Nicotinamide Adénine

Dinucléotide Phosphate réduit

**O<sub>2</sub>•-** : Radical Superoxyde

**PR** : Pourcentage de Réponse

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**SOD** : Superoxide dismutase

**TBA** : Acide Thiobarbiturique

# ***Introduction générale***

Le développement exponentiel des activités humaines a été sans cesse accompagné par le déversement croissant de nombreuses substances dans l'environnement. Le compartiment aquatique est généralement le réceptacle final d'une grande variété de ces composés qui menacent sérieusement le fonctionnement et la pérennité de l'écosystème. Cette pollution diffuse, due à la présence de contaminants de nature variée a entraîné une détérioration progressive de la qualité des eaux menaçant ainsi la biodiversité et l'équilibre de l'écosystème aquatique (Chevalier, 2014).

Depuis plusieurs décennies, le contrôle chimique des produits alimentaires a entraîné une augmentation spectaculaire du rendement des denrées majeures faisant partie du régime alimentaire. Ce traitement par les pesticides est jusqu'à présent le moyen de protection le plus prépondérant (Jawich, 2006). Cependant, l'utilisation intensive en agriculture, de ces produits phytosanitaires est à l'origine d'une situation de plus en plus dramatique des écosystèmes aquatiques, ce qui pose de graves problèmes environnementaux et de santé publique (Aubertot et *al.*, 2005 ; Ramade, 2005)

La dégradation des milieux aquatiques à laquelle nous assistons aujourd'hui est un sujet d'inquiétude majeur tant pour les populations que pour les autorités. Ainsi, la prise en considération de l'importance de protéger l'environnement contre les effets délétères des polluants est donc devenue une des priorités primordiales de la communauté scientifique. Pour atteindre un tel objectif une gestion adaptée et pertinente doit reposer sur des outils d'évaluation de l'intégrité des écosystèmes (Sarkar et *al.*, 2006).

Malgré leur popularité actuelle et le nombre sans cesse croissant de travaux et de publications qui leur sont consacrés, l'utilisation des bioindicateurs dans l'évaluation de la qualité de l'environnement est un phénomène relativement nouveau dans l'histoire des sciences environnementales (Burger, 2006). Les méthodes d'évaluation environnementale faisant appel aux bioindicateurs ont souvent l'avantage d'être peu coûteuses comparativement aux méthodes traditionnelles impliquant des mesures de composés chimiques. De plus, leur accessibilité et leur capacité à rendre compte de l'effet individuel ou combiné des différents polluants à long terme sur les organismes et les écosystèmes aquatiques en font des outils de prédilection pour les programmes environnementaux à grande échelle (Fränzle, 2003).

Les biomarqueurs sont des indices sensibles à la fois de la biodisponibilité d'un polluant et des réponses biologiques précoces. Ainsi, l'utilisation simultanée de plusieurs biomarqueurs pris à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, tissulaire, physiologique) chez diverses espèces apparaît comme l'approche la plus satisfaisante pour le diagnostic des effets des polluants sur les individus (Lagadic et *al.*, 1997). **L'approche multi-espèces** semble à son tour une méthode très efficace pour prédire les effets écologiques des polluants chez des espèces qui diffèrent à la fois par leur sensibilité au stress, par leur physiologie et leur mode de reproduction ainsi que par le groupe fonctionnel auquel elles appartiennent au sein d'une communauté (Sanchez et Tarazona, 2002 ; Brown et *al.*, 2004 ; Bouaricha, 2013). Le suivi en tandem **espèce bioindicatrices-biomarqueurs** conduit ainsi à une vision intégrée de l'impact du stress chimique sur les écosystèmes (Dupuy, 2012).

Les espèces du genre *Paramecium* et *Daphnia* sont reconnus pour être d'excellentes espèces bioindicatrices de la qualité des eaux douces, compte tenu notamment de leur large distribution géographique, leur intérêt écologique comme maillons clés des chaînes trophiques, leur cycle de vie court, leur facilité de culture et de maintien au laboratoire ainsi que leur sensibilité à une grande variété de toxiques. Représentatives des communautés zooplanctoniques des écosystèmes aquatiques d'eau douce, ces deux modèles biologiques ont autant d'avantages pour la réalisation d'expérimentations, qui en font un sujet d'étude recommandé en écotoxicologie (Manar, 2008 ; Massarin, 2010 ; Azzouz, 2012 ; Sbartai, 2013).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre thématique relative à l'évaluation des effets d'un herbicide de la famille des cyclohexanediones (Focus Ultra) sur deux organismes aquatiques représentant **deux différents niveaux trophiques** : *Paramecium tetraurelia* (décomposeur détritivore) et *Daphnia magna* (consommateur primaire). A cet effet nous avons privilégié une approche multibiomarqueurs (à différents niveaux d'organisation biologique) en étudiant les variations de plusieurs paramètres morpho-physiologiques, comportementales et biochimiques.

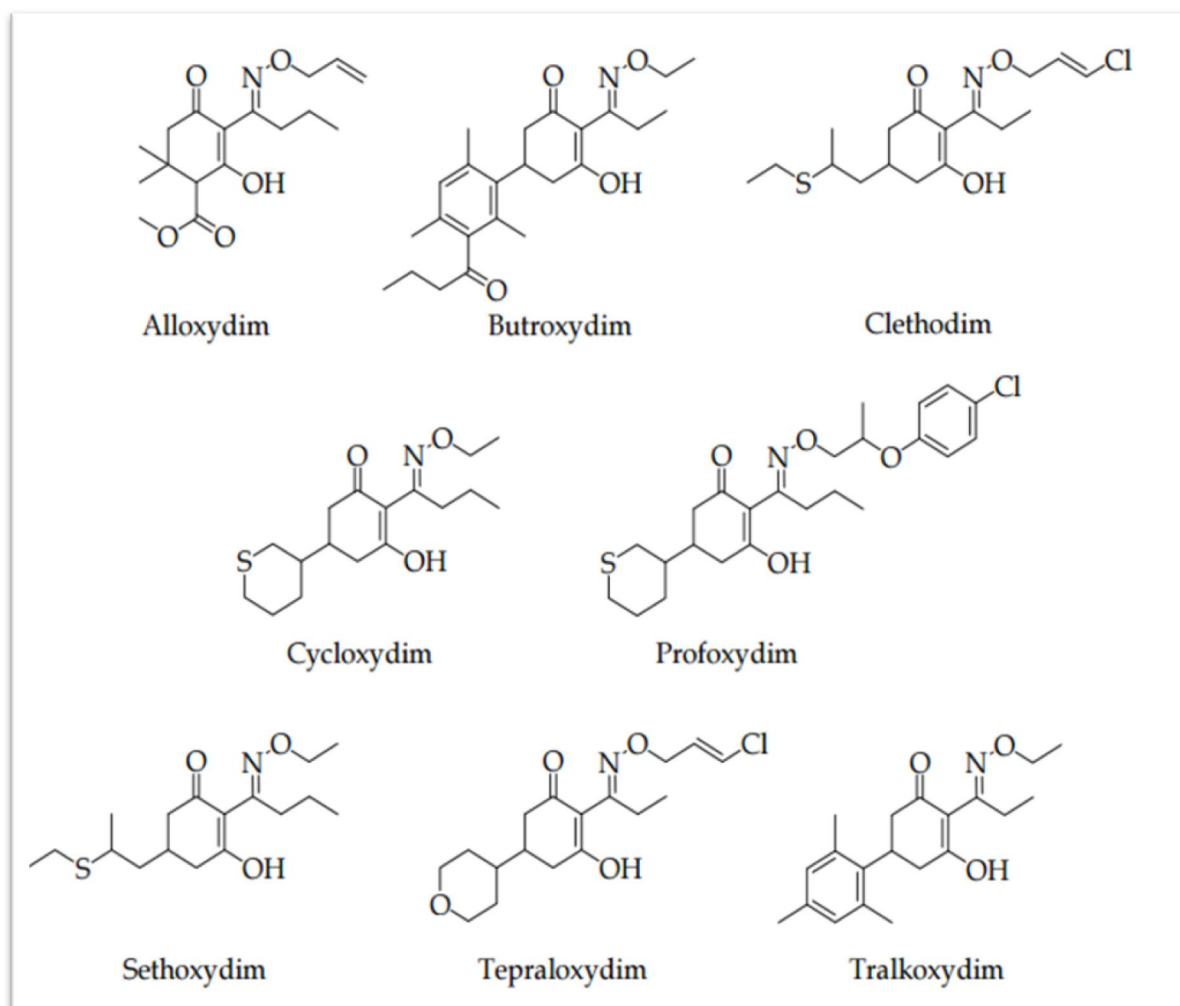
Cette démarche consiste dans un premier temps à mettre en évidence d'éventuelles perturbations physiologiques reflétant l'état de santé globale des organismes étudiés. Les données ainsi obtenues ont suscité l'intérêt d'élucider l'impact de ce xénobiotique sur le métabolisme biochimique et énergétique qui est considéré comme l'un des signaux précoces

d'un déséquilibre du fonctionnement et de l'homéostasie cellulaires. Une étude morphologique nous a donc ensuite paru indispensable dans le but de caractériser les altérations cellulaires et macronucléaires observées chez *Paramecium tetraurelia*, ainsi que les malformations développementales décelées chez les descendants de *Daphnia magna*. Afin de mieux étayer ces observations, il nous a semblé crucial de s'interroger sur les effets potentiels de Focus Ultra sur leur aspect comportemental, jouant un rôle fonctionnel déterminant dans la survie, la croissance, la reproduction et le maintien de l'équilibre homéostatique des individus, et ce par l'étude des perturbations de l'activité locomotrice. Pour une meilleure compréhension du mécanisme d'action cytotoxique de cet herbicide, nous nous sommes dirigés vers le suivi des variations des principaux biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques témoignant de la mise en évidence d'un stress oxydant.

***Chapitre I:***  
***Synthèse bibliographique***

## 1. Généralités sur les cyclohexanediones

La famille des cyclohexanediones (Figure 1) est l'une des principales familles chimiques d'herbicides sélectifs de post-émergence (Harwood, 1999). Depuis leur introduction à la fin des années 1970, les cyclohexanediones ont connu une progression très importante jusqu'en 2000, non seulement grâce à leur efficacité contre une large gamme de mauvaises herbes (graminées adventices des céréales, notamment les vulpins, ray-grass, folle avoine et brome) mais surtout à leur faible dose d'utilisation (ne dépassant pas 0,2-0,5 kg/ha) (Sandín-España et *al.*, 2003) et leur innocuité vis-à-vis des organismes non cibles ; puis une stabilisation de leur emploi en raison d'une moindre efficacité liée à l'acquisition de résistance par de plus en plus d'espèces d'adventices dans le monde (Délye et *al.*, 2005 ; Powles et Yu, 2010).

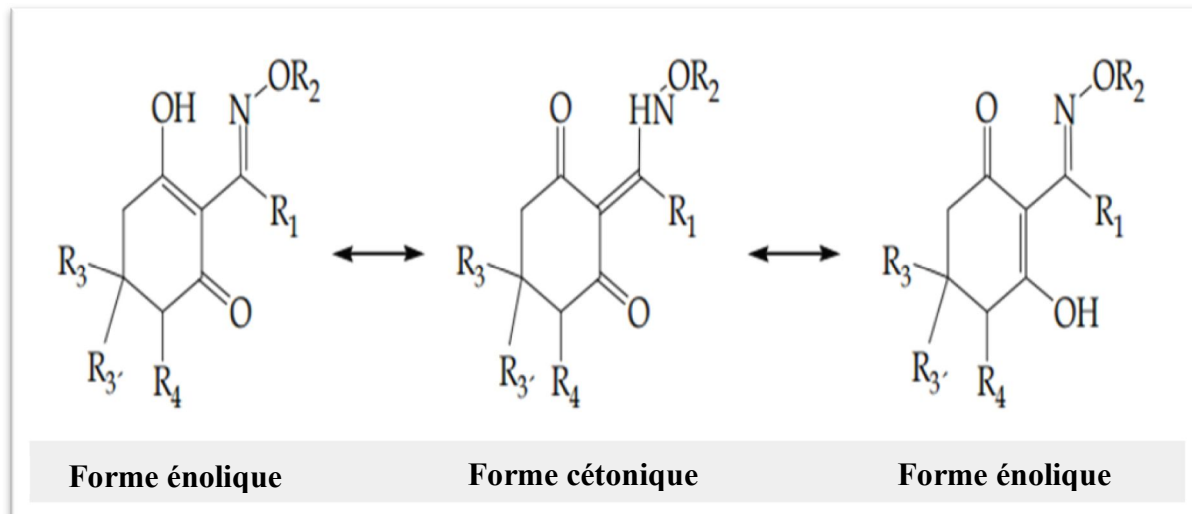


**Figure 1:** Structures chimiques des herbicides de la famille des cyclohexanediones (Sandín-España et *al.*, 2012)

### 1.1. Structure et propriétés physicochimiques

La structure de base des herbicides cyclohexanediones est représentée sur la figure (2). Ces composés montrent une tautomérie (équilibre) céto-énolique, où la forme énolique est généralement prédominante (Iwataki, 1992). Ils présentent deux types d'isomères (cis et trans) relatifs à la chaîne latérale alkyle liée au groupe éther oxime. La forme cis est plus active que la forme trans (McInnes et *al.*, 1992; Sandín-España et *al.*, 2003) et c'est sous cette forme isomérique que les cyclohexanediones sont commercialisés. Bien qu'elle puisse être augmentée en fonction des différentes fonctionnalisations des substituants  $R_2$ - $R_3$ , l'activité herbicide de ces composés est principalement due au cycle cyclohexane-1,3-dione et au groupe oxyimino (Watson, 2011).

Les herbicides de cette famille se comportent comme des acides faibles avec une valeur de pKa allant de 3.7 à 5.9. Leur solubilité et leur dégradation sont strictement liées aux variations de la température et du pH du milieu. Ils sont décomposés à un pH inférieur à 5 et supérieur à 10, et sont également photochimiquement instables (Iwataki, 1992 ; Roberts, 1998).



**Figure 2 :** Tautomérie céto-énolique des cyclohexanediones (Sandín-España et *al.*, 2012).

Le tableau (1) résume les propriétés physicochimiques des cyclohexanediones commercialisés. Ces propriétés jouent un rôle très important dans leur devenir dans l'environnement.

**Tableau 1** : Propriétés physico-chimiques des cyclohexanediones (Les données ont été compilées à partir de « Pesticide Manual ») (Tomlin, 2006).

Herbicide	Nom commercial	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Pka	TD <sub>50</sub> dans le sol (jours)	Mobilité dans le sol (pH=7)
Alloxydime	Clout, Kusagard, Fervin	$> 2 \cdot 10^6$ (sels de sodium)	3.7	2-10	/
Butroxydime	Falcon	6.9	4.36	9	Largement variable
Clethodime	Select	5.45	4.47	1-3	Très grande
Cycloxydime	Focus, Laser, Stratos	53	4.17	< 1	Grande à très grande
Profoxydime	Aura, Tetris	5.31	5.91	3-13	Largement variable
Sethoxydime	Poast, Nabu	> 4700	4.1	1	Grande
Tepraloxymide	Aramo	430	4.58	5.2-14	Grande
Tralkoxydime	Achieve, Grasp, Splendor	6.7	4.3	2-5	Très grande

## 1.2. Mode d'action

Les cyclohexanediones sont des herbicides systémiques à pénétration foliaire. Leur cible biochimique est le métabolisme lipidique puisqu'ils agissent par inhibition de l'enzyme Acétyl Coenzyme-A Carboxylase (ACCase) (Secor et Cseke, 1988 ; Rendina *et al.*, 1990 ; Burton *et al.*, 1991) localisée au niveau des chloroplastes et du cytosol, et qui catalyse la première étape de la biosynthèse des acides gras, c'est-à-dire la formation du malonyl conenzyme A à partir de l'acéto-acétate. La conséquence physiologique pour la plante est une altération de

l'intégrité des membranes cellulaires qui aboutit à sa mort rapide (Devine et Shimabukuro, 1994).

### **1.3. Comportement, devenir et persistance des cyclohexanediones dans l'environnement**

Le principe de « dose minimale, efficacité maximale », apporté avec la mise de plusieurs herbicides sur le marché (Arabet, 2014), tel est le cas des cyclohexanediones, a certainement été un très grand succès économique mais un véritable problème environnemental. La grande activité de ses produits permet d'en utiliser de faibles concentrations mais ne met pas à l'abri la possibilité d'avoir des effets toxiques sur des organismes non cibles malgré leur grande spécificité (Sandín-España et *al.*, 2012).

Bien que la plupart des herbicides soient appliqués sur les parties aériennes des plantes, une bonne partie du produit atteint toujours le sol. Les propriétés intrinsèques des herbicides et du sol, les paramètres et techniques d'application, les pratiques culturales ainsi que les conditions climatiques et hydrologiques interviennent dans leur devenir dans l'environnement et doivent être considérés dans l'évaluation de leur probabilité d'occurrence et de leur risque potentiel de contamination (Benmahdi, 2008).

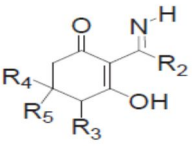
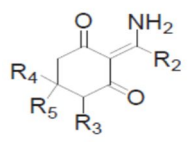
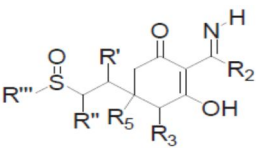
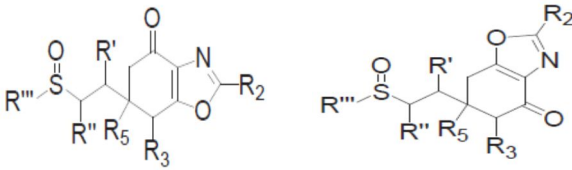
Les cyclohexanediones se dégradent plus ou moins rapidement après leur application, surtout dans les milieux aqueux (Iwataki, 1992 ; Sevilla-Morán et *al.*, 2011). Vu leur caractère polaire et non volatil, ils sont très mobiles et facilement lessivables dans les eaux souterraines et potentiellement contaminants à des concentrations supérieures à 0,1 µg/L (Sandín-España et *al.*, 2003). Une faible part est exportée par ruissellement par les pluies ou par lessivage dans les couches inférieures du sol ; et une part est adsorbée par les argiles et les matières organiques du sol avant de subir une dégradation biochimique et microbiologique (Coulibaly, 2005 ; Sandín-España et *al.*, 2012). Le type de dégradation, son importance et sa durée dépendent de la matière active (Marliere, 2000).

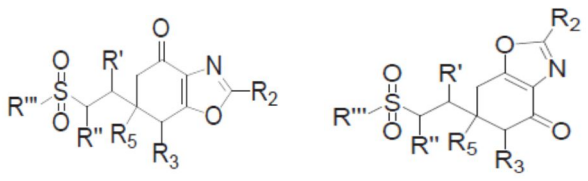
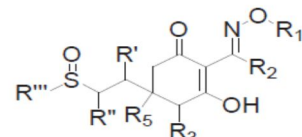
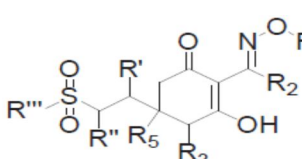
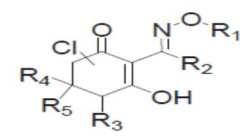
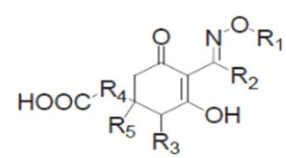
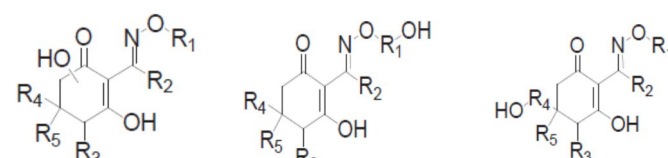
Une des principales caractéristiques qui influence les risques de contamination du milieu par les herbicides est leur persistance plus ou moins longue dans un environnement donné (Devez, 2004). Les cyclohexanediones peuvent être considérés comme des herbicides ayant un faible potentiel de contamination. Certes, ils présentent une relative mobilité dans les sols mais ont un temps de demi-vie relativement court. Par contre, ils peuvent être lessivés et

transformés en produits de dégradation potentiellement plus toxiques, plus mobiles et/ou plus persistants dans l'environnement. Il faut également noter que les formulations apparaissent plus toxiques que les molécules actives pures (Sandín-España et *al.*, 2012).

Le tableau (2) présente les principaux produits de transformation des cyclohexanediones, dans différentes matrices (eau, sol, plantes, animaux) résultant de nombreux processus de dégradation. Beaucoup d'entre eux sont formés à la suite de la combinaison de deux ou plusieurs réactions.

**Tableau 2 :** Principaux produits de dégradation biotiques et abiotiques des cyclohexanediones dans différentes matrices (Sevilla-Morán et *al.*, 2014).

Produit de dégradation (métabolite)	Matrice (processus de transformation)*
<p><b>Imine</b></p> 	<p>Eau (c, h, p) Sol (p, b) Plante (p, b) Animal (b)</p>
<p><b>Amine</b></p> 	<p>Eau (p) Sol (p) Plante (p, b)</p>
<p><b>Imine sulfoxyde</b></p> 	<p>Eau (p) Sol (b) Plante (b) Animal (b)</p>
<p><b>Oxazole sulfoxyde</b></p> 	<p>Eau (h, p) Sol (b, p) Plante (t, b) Animal (b)</p>

<p style="text-align: center;"><b>Oxazole sulfone</b></p> 	<p>Sol (n.d.) Plante (t)</p>
<p style="text-align: center;"><b>Sulfide</b></p> 	<p>Eau (c, h, p) Sol (n.d.) Plante (b) Animal (b)</p>
<p style="text-align: center;"><b>Sulfone</b></p> 	<p>Eau (c, h, p) Sol (n.d.) Plante (b) Animal (b)</p>
<p style="text-align: center;"><b>Dérivés chlorés</b></p> 	<p>Eau (c)</p>
<p style="text-align: center;"><b>Dérivés de l'acide carboxylique</b></p> 	<p>Sol (n.d.)</p>
<p style="text-align: center;"><b>Dérivés hydroxylés</b></p> 	<p>Eau (c) Sol (b) Animal (b)</p>

\* (H: hydrolyse, c: chloration, p: photodégradation, t: thermodégradation, b: biodégradation, n.d: non définie).

## 2. Le stress oxydant : origines et conséquences

### 2.1. Origines des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'oxygène moléculaire, apparu voici 3 milliards d'années dans l'atmosphère terrestre, est le deuxième élément le plus abondant de la biosphère. C'est un carburant indispensable à la vie des cellules aérobies (Gilbert, 1997). L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécule d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction permet la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique à partir d'une molécule de glucose (contre 2 seulement dans un processus anaérobie). Le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfait. En effet, les cellules convertissent 3% de la quantité totale d'oxygène consommée en espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement réactionnelles (Ferradini, 1986). Les ERO sont majoritaires mais des radicaux soufrés, nitrogénés, phosphorés ou carbonés sont également formés. Ces ERO qui peuvent être radicalaires ou non radicalaires, sont aussi produites en permanence par différents systèmes enzymatiques dont les plus importants sont les NAD(P)H-oxydase et les NOsynthase (Sekli-Belaidi, 2011).

### 2.2. Rôles des espèces réactives de l'oxygène dans les situations physiologiques

Du fait de l'importance de l'oxygène dans les systèmes biologiques, en situations physiologiques, les espèces réactives sont créées en continu dans l'organisme. Ainsi, les radicaux libres générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène, ne sont pas seulement des produits agressifs mais aussi des modulateurs de voies de transduction du signal et de l'expression de gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. Ils jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections (Harman, 2002).

### 2.3. Le déséquilibre : origines et conséquences

La notion de stress oxydant a été utilisée pour la première fois par Sies (1985). Il est défini comme une altération cellulaire et tissulaire par des molécules oxydantes. C'est la résultante d'un déséquilibre profond dans la balance entre les prooxydants, producteurs d'espèces radicalaires, et les antioxydants, au profit des premiers. Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, d'une activation de systèmes

enzymatiques (NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine, transferrine) ou d'une oxydation de certaines molécules (Michelson, 1982). Les ERO très électrophiles tentent de ré-apparier leur électron célibataire en agressant toutes les molécules susceptibles de céder un électron ; leur durée de vie est donc très courte. L'espèce agressée devient à son tour radicalaire, initiant de cette façon un processus de réactions en chaîne (Lehucher-Michel et *al.*, 2001). Les ERO interagissent avec toute une série de substrats biologiques. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation du glucose, des cassures au niveau de l'ADN avec possibilité de mutation et des processus de peroxydation lipidique peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule (Pincemail et *al.*, 2002).

#### 2.4. Effets du stress oxydant sur les structures moléculaires

- L'ADN

Les ERO, en particulier les radicaux hydroxyles, sont capables de léser et de modifier des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. Parmi les bases transformées, la 8-hydroxy-guanine a été utilisée comme marqueur de stress oxydant des différentes espèces animales. Les radicaux OH• sont capables de réagir avec les désoxyriboses de la molécule d'ADN. Les multiples dégâts engendrés sont réparables grâce aux mécanismes d'excision et de re-synthèse effectuées par des enzymes de reconnaissance et de réparation de l'ADN. Mais lorsque ces systèmes de protection sont eux même atteints par l'oxydation, de graves altérations du matériel génétique sont induites, comme des mutations pouvant être à l'origine de cancers (Lehucher-Michel et *al.*, 2001).

- Les protéines

Les ERO peuvent dénaturer les protéines de soutien comme le collagène mais aussi les protéines circulantes comme l'albumine ou la transferrine. Les protéines de reconnaissance moléculaire (enzymes, anticorps ou récepteurs membranaires) sont aussi des cibles de l'oxydation radicalaire. Les attaques s'effectuent préférentiellement sur les acides aminés portant des chaînes latérales aromatiques (phénylalanine, tyrosine, histamine, tryptophane) et sur les acides aminés soufrés (Lehucher-Michel et *al.*, 2001).

- **Les lipides polyinsaturés et la peroxydation lipidique**

Au cours de la phase d'initiation de la peroxydation lipidique, les ERO arrachent un atome d'hydrogène aux chaînes insaturées des acides gras pour former des radicaux alkyles. Au cours de la phase de propagation, les réactions en chaîne interviennent ensuite dans la membrane où les radicaux alkyles réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux peroxydes. Cette phase est stoppée essentiellement grâce à l'action des antioxydants physiologiques. La peroxydation lipidique a pour conséquence l'altération de la fluidité des membranes qui, associée à leur désorganisation globale, peut conduire jusqu'à leur lyse (Lehucher-Michel et *al.*, 2001).

## 2.5. Les défenses antioxydantes

Pour faire face aux attaques radicalaires, les organismes possèdent des systèmes de défense localisés dans différents compartiments cellulaires visant à: (i) éliminer les espèces réactives et les catalyseurs de leur formation, (ii) induire la synthèse des antioxydants et (iii) accroître l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées par les espèces réactives de l'oxygène (Pelletier et *al.*, 2004).

Les systèmes de défense antioxydants sont composés d'enzymes (superoxyde dismutases (SODs), catalase, glutathion peroxydases (GPx's), couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, hème oxygénase, peroxyrédoxine...) capables d'éliminer les ERO et d'autres espèces réactives, de molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, bilirubine, acide lipoïque, ubiquinone, ...) qui piègent et neutralisent les radicaux libres, les transformant en molécules ou ions stables (Krinsky, 1989), de protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine) qui bloquent les ions métalliques ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  ou  $Cu^{2+}/Cu^{+}$ ) impliqués dans la réaction de Fenton, ainsi que de protéines de choc thermique ("Heat Shock Protein" 90, HSP 90, HSP 70) qui agissent en protégeant les biomolécules contre les oxydations (Wirth et *al.*, 2003). Certains oligo-éléments comme le cuivre, le zinc et le sélénium sont indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu,Zn-SOD, MnSOD, SeGPx). Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports alimentaires en flavonoïdes, alcaloïdes et polyphénols, jouant un rôle dans le piégeage des radicaux libres (Bors et *al.*, 1990 ; Aviram et Fuhrman, 2002 ; Bhat et Pezzuto, 2002). Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases et ligases et de

macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (Pincemail et *al.*, 2002).

### 3. Les indicateurs biologiques : Définitions et concepts

#### 3.1. Notion de bioindication

La bioindication désigne l'évaluation de la qualité des milieux à l'aide de bioindicateurs c'est-à-dire d'organismes vivants connus pour leurs capacités à refléter l'état des écosystèmes. Dans ce sens, un bioindicateur peut être défini comme une espèce qui, par son absence, sa présence, son abondance ou sa distribution, nous donne des informations de nature qualitative sur l'état d'un environnement ou d'une partie de celui-ci (Kaiser, 2001; Markert et *al.*, 2003). Le principal avantage des bioindicateurs réside dans le fait qu'ils permettent d'évaluer les impacts des différentes perturbations sur les écosystèmes, contrairement aux indicateurs physico-chimiques qui permettent seulement de faire un diagnostic de ces perturbations (Fränzle, 2003).

Ces espèces bioindicatrices sont généralement divisées en 3 catégories :

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

#### 3.2. Notion de biomarqueurs

Un biomarqueur se définit comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et *al.*, 1997 ; Stagg, 1998 ; Key et *al.*, 2006). Les biomarqueurs permettent de détecter les pressions environnementales dans un milieu donné avant même que les effets

néfastes se fassent sentir au niveau des organismes. On peut ainsi prédire les dommages potentiels pouvant menacer un écosystème et prendre des mesures nécessaires pour remédier à la situation avant que celle-ci ne devienne trop critique (den Besten et *al.*, 2001).

Les biomarqueurs peuvent être classés en trois catégories :

- **Les biomarqueurs d'exposition**, qui sont généralement caractérisés par leur réponse précoce et leur spécificité de réaction. Ils sont induits par un type spécifique de polluants et, de ce fait, leurs variations sont indicatrices d'une exposition de l'organisme à cette classe de polluants.
- **Les biomarqueurs d'effet** correspondent à une altération biologique qui, en fonction de l'intensité de la réponse, peut être associée à une altération possible de l'état physiologique de l'individu, comme des effets sur la croissance ou sur le succès reproducteur.
- **Les biomarqueurs de sensibilité/susceptibilité** utilisent la mise en évidence de caractères de résistance d'origine génétique des organismes à certains contaminants, comme la synthèse d'enzymes moins sensibles ou une augmentation du pouvoir de détoxification (résistance des insectes aux pesticides) (Champeau, 2005).

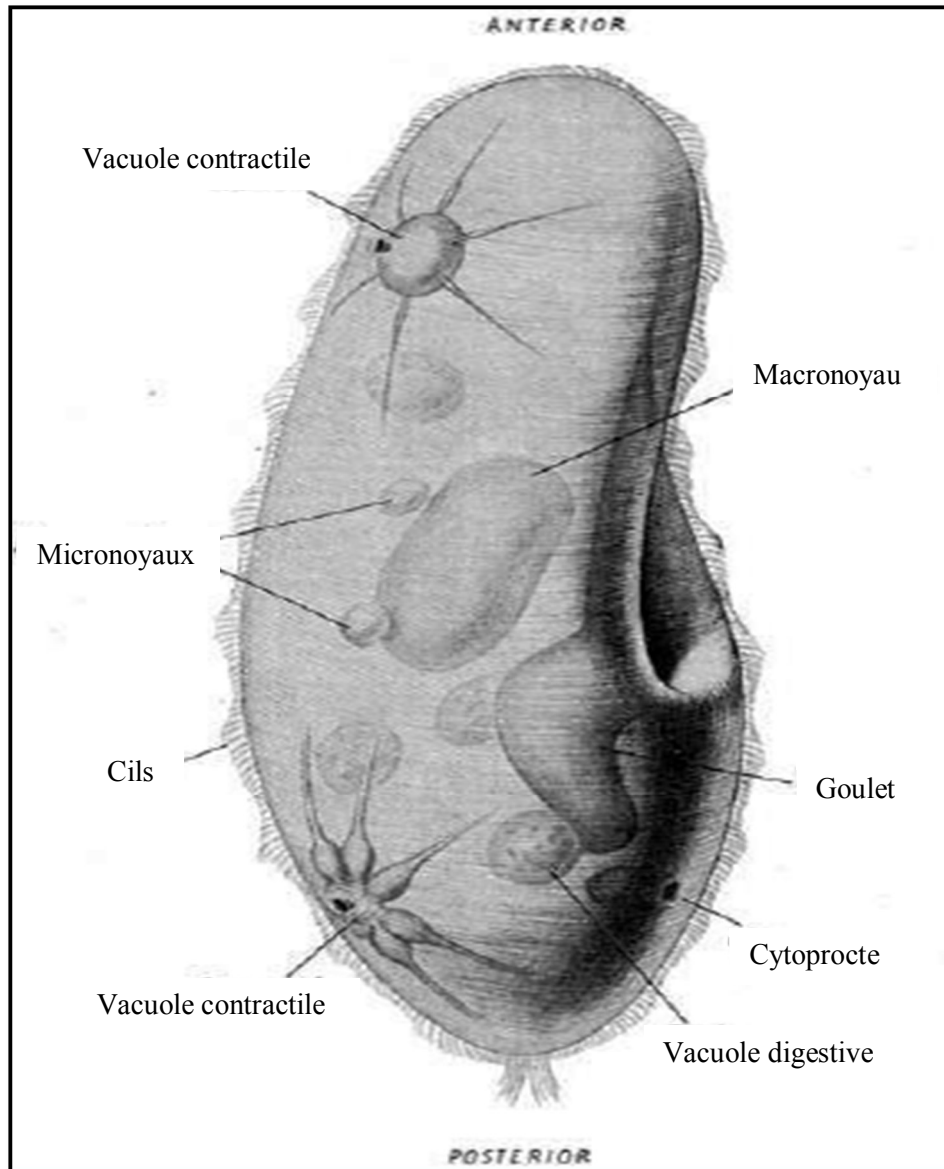
#### 4. La paramécie

Les représentants du genre *Paramecium* sont les plus fréquents des protozoaires. Ils sont très répandus dans les milieux d'eau douce contenant des débris végétaux ou dans les infusions de foin (infusoires) car les bactéries dont ils se nourrissent pullulent à la surface des végétaux en décomposition (Beaumont et Cassier, 1998).

##### 4.1. Biologie et morphologie

Les cellules de paramécies appartenant au groupe *aurelia* (Figure 3) sont exceptionnellement grandes. Elles mesurent environ 150 µm de long et 50 µm de large. Leur taille varie considérablement en fonction de l'approvisionnement alimentaire et le stade du cycle de vie (Beale et Preer, 2008).

La paramécie possède un macronoyau, deux ou plusieurs micronoyaux et deux vacuoles contractiles qui se produisent sur la surface dorsale. Ces vacuoles, servant à réguler l'osmolarité, se situent sur le premier et le dernier quart de l'organisme et vident leur contenu liquide à l'extérieur par l'intermédiaire des pores excrétoires. Sur le côté de la cellule notée "ventrale", se trouve l'œsophage, dans lequel la nourriture (bactéries, levures, algues, etc) est véhiculée par des cils spéciaux. Au bas de l'œsophage, la nourriture est concentrée dans des vacuoles alimentaires qui sont continuellement bourgeonnées et pénétrées dans le cytoplasme. Les résidus non digérés seront déchargés dans le milieu extérieur par un pore anal appelé cytoprocte (anus cellulaire) (Beale et Preer, 2008). La paramécie possède également une voie de sécrétion régulée des trichocystes (voie d'exocytose) comme un moyen de défense contre ses prédateurs (Damaj, 2008). Le cytoplasme des paramécies limité par une mince cuticule présente une zone périphérique hyaline et visqueuse. Cette cuticule résistante, souple, et élastique, limite l'amplitude des déformations du corps. Ce dernier est uniformément recouvert de cils vibratiles. Cette ciliature somatique, qui bat de façon synchronisée, permet aux paramécies de se déplacer (Beaumont et Cassier, 1998).



**Figure 3** : Morphologie générale d'un spécimen de *Paramecium* du groupe *aurelia* (Jurand et Selman, 1969)

#### 4.2. Mouvement

Le déplacement des paramécies est assuré par les battements rapides et rythmiques des cils vibratiles. Les paramécies peuvent diriger les battements de leurs cils pour se déplacer en avant ou en arrière (en présence d'un obstacle) dans un mouvement spiralé. Elles peuvent également se déformer et s'étirer légèrement en passant entre deux obstacles rapprochés (Cohen, 2007).

### 4.3. Alimentation

L'alimentation chez les paramécies s'effectue en 3 étapes :

- **Ingestion des aliments** : La bouche forme un entonnoir allongé qui s'enfonce dans le cytoplasme. Cet entonnoir est pourvu de cils spéciaux qui produisent un courant d'eau entraînant les proies (débris de végétaux, bactéries, algues unicellulaires) dans le fond de la cavité buccale (péristome). Il se forme ensuite, autour des particules, une vacuole digestive (Samworth et Morgan, 2000).
- **Digestion** : Les aliments sont digérés au niveau des vacuoles digestives, et les produits de la digestion sont absorbés par le cytoplasme (Samworth et Morgan, 2000).
- **Excrétion** : Les éléments indigestibles sont ensuite rejetés vers l'extérieur par le cytoprocte (pore anal) (Beale et Preer, 2008). Les paramécies éliminent leurs déchets azotés sous forme d'ammoniac par diffusion. Cette élimination est facilitée par les mouvements internes du cytoplasme (Samworth et Morgan, 2000).

### 4.4. Respiration

La respiration chez les paramécies se fait par des échanges gazeux avec le milieu environnant à travers la membrane cellulaire. Ainsi, les gouttelettes d'eau, absorbées au moment de la capture de la nourriture, contiennent de l'oxygène et l'eau rejetée par les vacuoles pulsatiles contient une forte proportion de gaz carbonique (Wehner et Gehring, 1995).

### 4.5. Reproduction

**4.5.1. Reproduction asexué (fission binaire)**: Les paramécies se multiplient surtout par voie asexuée : division binaire transversale. Cette division débute par celle de l'appareil nucléaire : le macronoyau s'étire, s'étrangle et se divise en deux (par ségrégation de génomes) et le micronoyau subit une mitose (avec fuseau achromatique intranucléaire et individualisation des chromosomes). Ensuite les organites se dupliquent puis le cytoplasme s'étrangle et les deux cellules filles se séparent. Ce rythme de division est rapide (de deux à trois fois par jour pour un individu) (Dragesco, 1980 ; Purves et *al.*, 2000).

**4.5.2. Reproduction asexué (conjugaison):** Il existe aussi une multiplication sexuée appelée conjugaison qui se produit après un assez long temps d'élevage en culture. Deux ciliés s'accolent par leur péristome puis échangent des noyaux sexuels. Le macronoyau des deux conjugants dégénère et est éliminé tandis que le micronoyau se divise plusieurs fois de suite. Une des dernières mitoses est réductionnelle. Un seul micronoyau haploïde subsiste. Une mitose équationnelle donnera, dans chaque individu, deux noyaux sexuels (véritables gamètes). Après copulation les conjugants seront en possession d'un noyau diploïde (syncaryon) qui se divisera plusieurs fois. Un des produits de la division du syncaryon subit une hyperploïdisation et deviendra macronoyau (Dragesco, 1980).

#### **4.6. Intérêt des paramécies comme modèles d'étude**

Les paramécies sont non seulement caractérisées par une organisation complexe mais jouent, aussi, un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes d'eau douce. Elles sont, donc, d'excellents bio-indicateurs puisqu'elles présentent plusieurs avantages, à savoir :

- ❖ Leur large distribution géographique, leur abondance de même que leur facilité d'identification (Bennett et Cubbage, 1992, Marchese et Brinkhurst, 1996) ;
- ❖ Ce sont des cellules hautement organisées sur lesquelles on peut aisément expérimenter, en raison de leur facilité de culture en laboratoire ainsi que leur multiplication rapide (cycle de vie court) (Dragesco, 1980 ; Beal et Anderson, 1993 ; Kamola, 1995).
- ❖ La paramécie constitue un modèle biologique de choix pour la modélisation des tests de cytotoxicité et l'étude des effets aigus et chroniques des toxiques et éventuellement leur bioaccumulation (Chapman, 2001).
- ❖ Leur mobilité grâce à des cils possédant la même structure que ceux des cellules épithéliales respiratoires des mammifères (Gräf et Stahr, 1999), d'autant plus que les battements ciliaires chez les mammifères sont parfaitement comparables à ceux de la paramécie, Tetrahymena, ...etc, (Berrebbah, 1990).

- ❖ Elles permettent l'étude des mécanismes d'action des xénobiotiques à différents niveaux d'organisation de la cellule (échelles cellulaire, subcellulaire et moléculaire) (Rouabhi et *al.*, 2006).
- ❖ Leur sensibilité en tant que cellules eucaryotes et leur organisation exposent leurs récepteurs à l'environnement externe, les faisant réagir parfaitement à des stimuli environnementaux (Venkateswara et *al.*, 2006).

Toutes ces caractéristiques biologiques font des paramécies un outil précieux pour la détection d'une contamination des eaux douces (Madoni et Romeo, 2006 ; Amaroli, 2010).

## 5. La daphnie

*Daphnia magna* est un microcrustacé, de l'ordre des cladocères, très largement répandu dans les eaux douces non courantes des zones climatiques tempérées (Manar, 2008).

### 5.1. Biologie et morphologie

La taille de la daphnie adulte varie entre 3 et 5 mm. Elle est subdivisée en 2 parties : la tête et le corps. La tête comporte un œil unique composé permettant l'orientation des individus lors de la nage, une bouche et 2 antennes biramées servant à la locomotion. Le corps est protégé par une carapace transparente qui est changée lors des mues. Cette carapace se prolonge par une épine caudale dont la taille est variable en fonction de plusieurs contraintes environnementales. Le tube digestif traverse tout le corps de la daphnie et se termine par un anus au niveau de la griffe post-abdominale. La partie ventrale est équipée d'appendices qui filtrent le phytoplancton. La partie dorsale est constituée d'une cavité qui joue le rôle d'une chambre de maturation (poche incubatrice) pour les œufs. Le cœur est situé au-dessus de la chambre de maturation. Quant aux ovaires, ils sont placés de part et d'autre de l'intestin (Figure 4) (Manar, 2008). Les mâles se distinguent des femelles par la forme de la tête, une taille plus petite et des antennules plus développées servant de crochets lors de l'accouplement ainsi qu'une partie antérieure du post-abdomen (située avant la griffe post-abdominale) plus proéminente (Figure 5) (Massarin, 2010 ; Toumi, 2013).

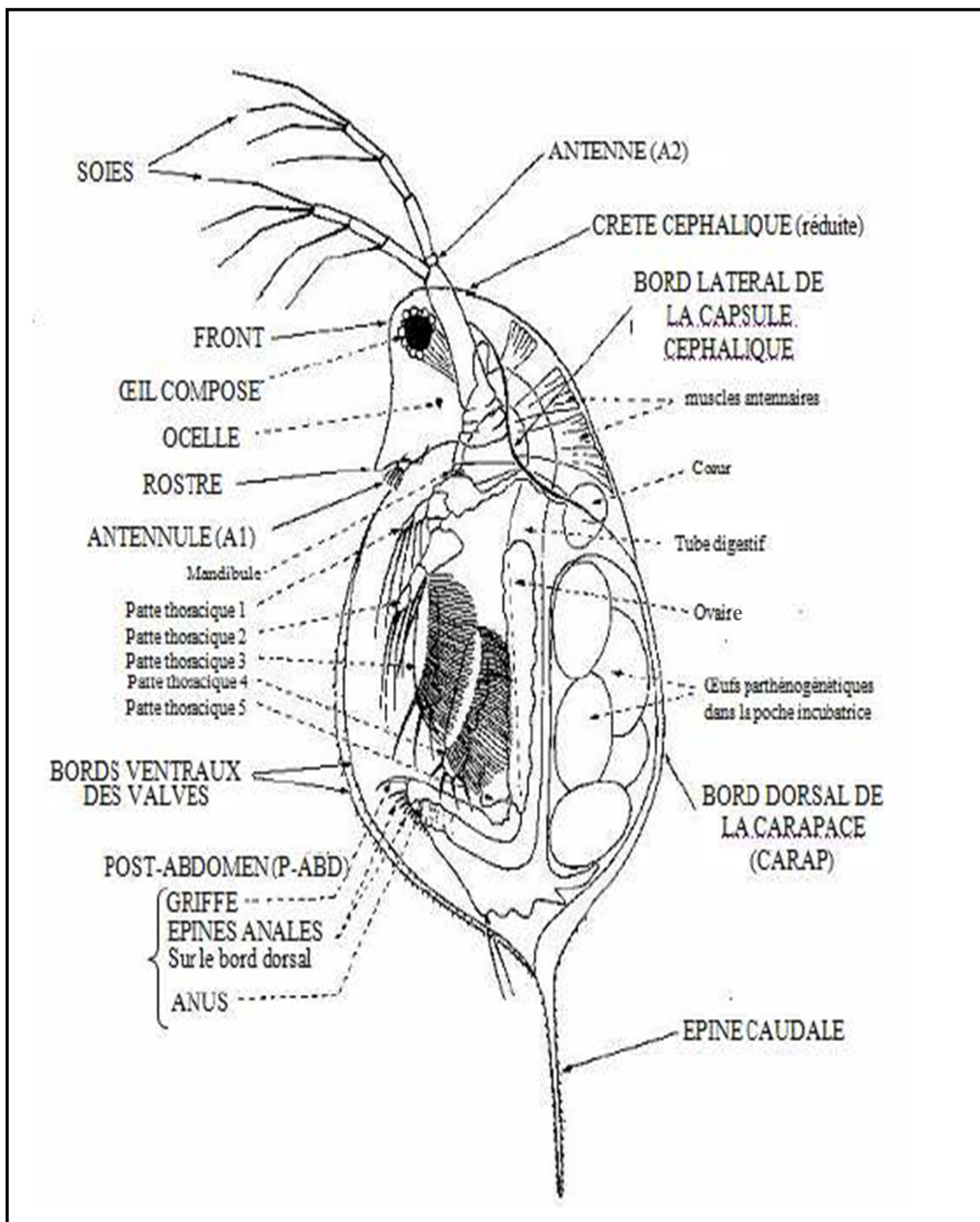
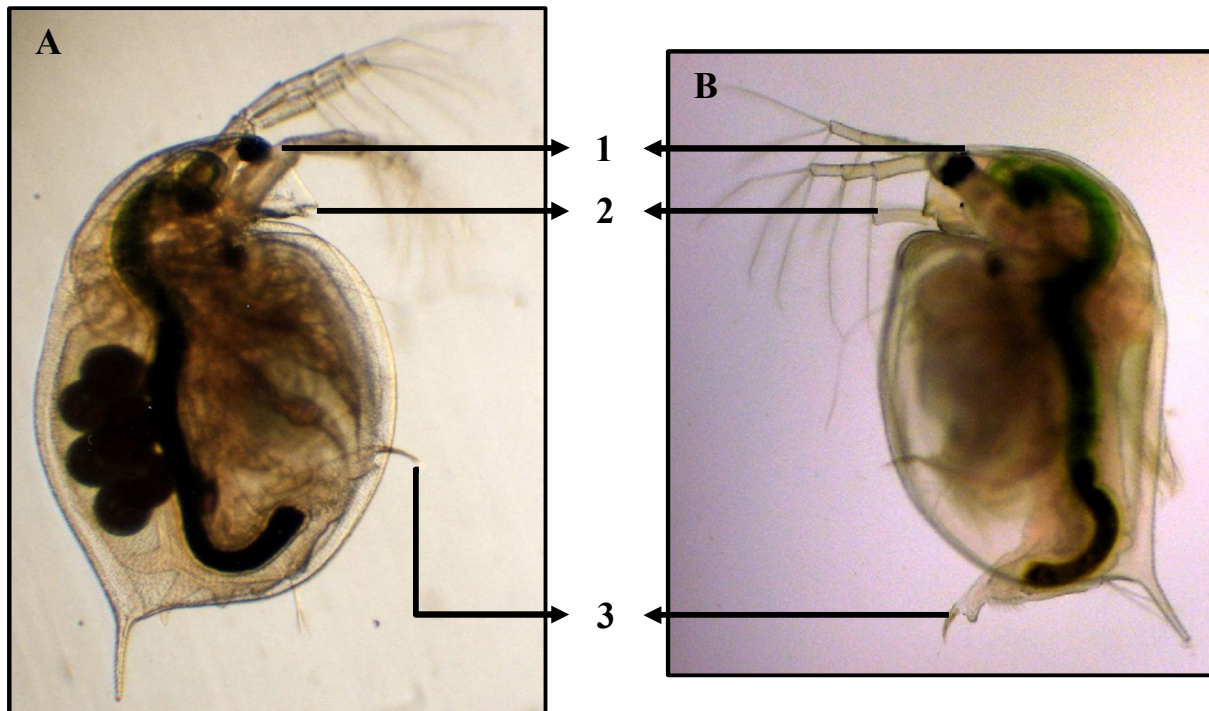


Figure 4 : Anatomie de *Daphnia magna* femelle adulte (Ebert, 2005)



**Figure 5:** Dimorphisme sexuel chez *Daphnia magna*, A (femelle), B (mâle).

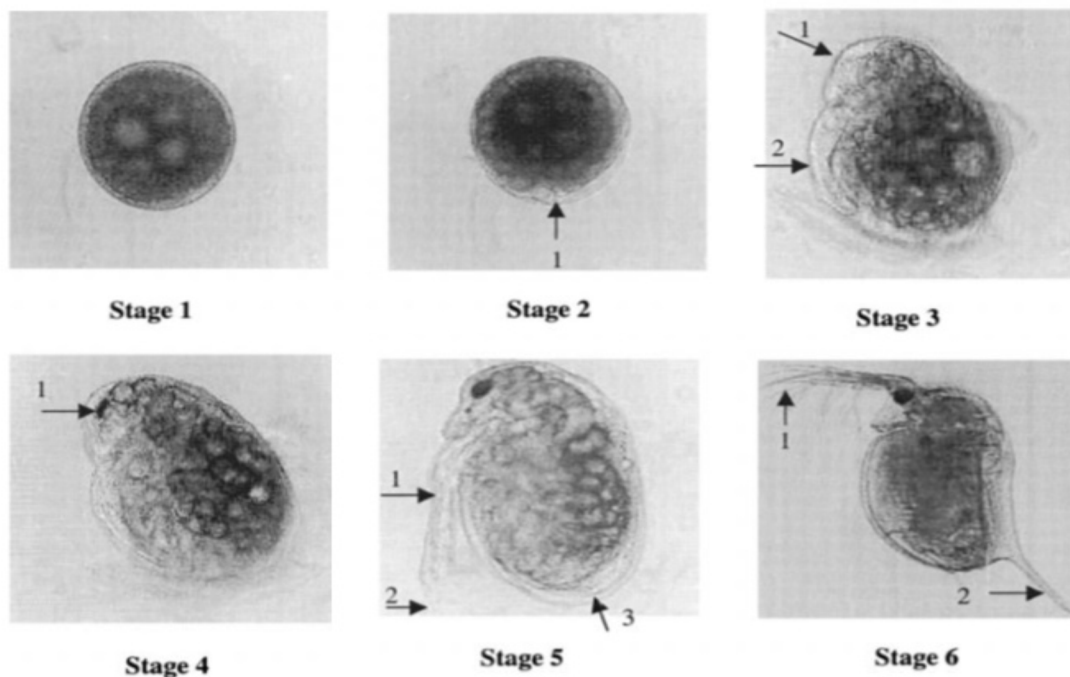
(1 → différence dans la forme de la tête, 2 → antennules (antennes primaires) plus développées chez le mâle, 3 → partie antérieure du post-abdomen plus proéminente chez le mâle) (D'après Olmstead et LeBlanc, 2007)

## 5.2. Développement

L'embryon de la daphnie, déposé dans la poche incubatrice, passe par 6 stades de développement (Kast-Hutcheson et *al.*, 2001) (Figure 6).

- **Stade 1** : correspond au **stade de division (clivage)** au cours duquel l'embryon est parfaitement sphérique. Ce stade se déroule entre 0 et 15h.
- **Stade 2** : nommé **stade de gastrulation**. Au cours de ce stade, l'embryon devient asymétrique avec la présence d'un blastopore en raison du début de la différenciation cellulaire. Il se déroule entre 15 et 25h.
- **Stade 3** : ou encore **stade de maturation embryonnaire précoce**. Il se déroule entre 25 et 35h et présente une différenciation de la tête et des antennes secondaires.

- **Stade 4** : est le **stade de maturation embryonnaire moyenne**, qui se déroule entre 35 et 45h et correspond à la mise en place de l'œil pigmenté ainsi qu'au développement des antennes qui restent encore collées à la membrane embryonnaire.
- **Stade 5** : ou **stade de maturation embryonnaire tardive**, au cours duquel il y'a une rupture de la seconde membrane embryonnaire et une extension partielle des antennes secondaires alors que l'épine caudale reste encore pliée sous la carapace. Ce stade se déroule entre 45 et 50h.
- **Stade 6** : c'est le dernier stade qui correspond au **développement complet de l'embryon** et se déroule entre 50 et 72h. A ce niveau, les antennules sont complètement développées et l'épine caudale est bien décollée et libérée de la carapace, de sorte que le nouveau-né est prêt à nager.



**Figure 6** : Photos des différents stades de développement embryonnaire chez *Daphnia magna* (Stade 2 : 1 → apparition du blastopore ; stade 3 : 1 → présence de la tête, 2 → présence des antennes secondaires ; stade 4 : 1 → apparition de l'œil ; stade 5 : 1 → antenne secondaire partiellement étendue, 2 → antennules non développées, 3 → épine collée au corps ; stade 6 : 1 → antenne secondaire développée, 2 → épine totalement étendue) (D'après Kast- Hutcherson et *al.*, 2001).

Quatre périodes distinctes peuvent être reconnues dans l'histoire de la vie de *Daphnia*: (1) œuf, (2) juvénile, (3) adolescence et (4) adulte (Pennak, 1989). Généralement, une portée de 6 à 12 œufs est déposée dans la poche incubatrice, mais le nombre peut atteindre jusqu'à 57 œufs. Les œufs éclosent dans la poche incubatrice et les juvéniles sont pondus après 2 jours de la mue des mères (rejet de la carapace). Le temps requis pour la maturité (production de la première ponte) varie de 7 à 10 jours. Le taux de croissance des organismes est important durant la phase juvénile et la taille du corps peut doubler après chaque phase caractérisée par la fin de la mue. La croissance se fait directement après la mue étant donné l'élasticité de la nouvelle carapace (Manar, 2008).

### 5.3. Alimentation

La daphnie se nourrit en filtrant de petites particules en suspension dans la colonne d'eau et plus particulièrement d'algues vertes. L'acheminement des particules vers l'organisme est assuré par les appendices thoraciques (phyllopoodes). Ces particules sont transférées via un sillon alimentaire muni de poils spéciaux, jusqu'à la bouche. Le système digestif est plus ou moins tubulaire et est composé de trois parties : l'œsophage, une partie médiane et une partie terminale. Deux petits diverticules, présents au niveau de l'intestin médian, ont un rôle de production de fluides assurant la digestion. Cette même partie de l'intestin est constituée d'un épithélium, possédant des microvillosités au niveau desquelles se font la digestion des aliments et l'assimilation des nutriments (Ebert, 2005). La nourriture non assimilée est expulsée par la partie terminale du tube digestif grâce aux mouvements péristaltiques du corps (Ebert, 2005).

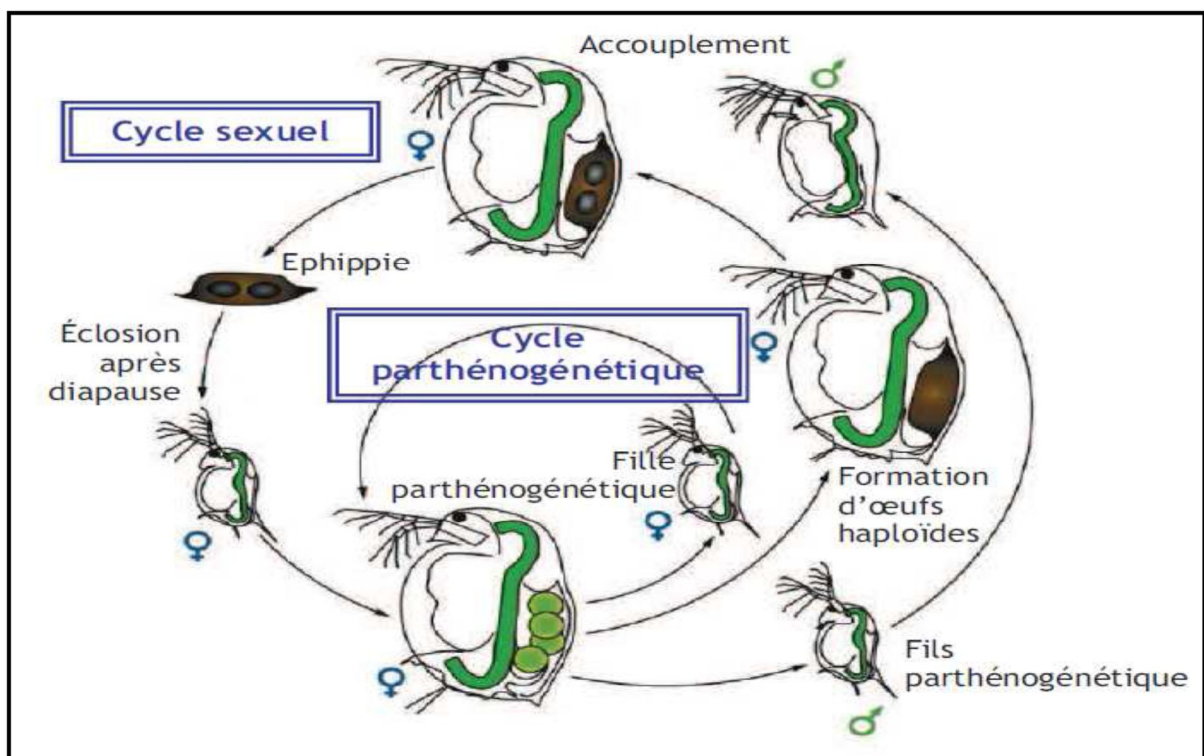
### 5.4. Locomotion

La daphnie se déplace en battant simultanément ses deux antennes secondaires. Sa nage saccadée lui a valu le nom de « puce d'eau » (Toumi, 2013). Les nuances des daphnies donnent l'impression d'un mouvement natatoire aléatoire, mais en réalité, elles effectuent de lentes migrations horizontales et verticales (nyctémérales) qui semblent être guidées par l'éclairement, les cycles jour/nuit et lunaire, la température et la salinité d'eau (Amoros, 1984).

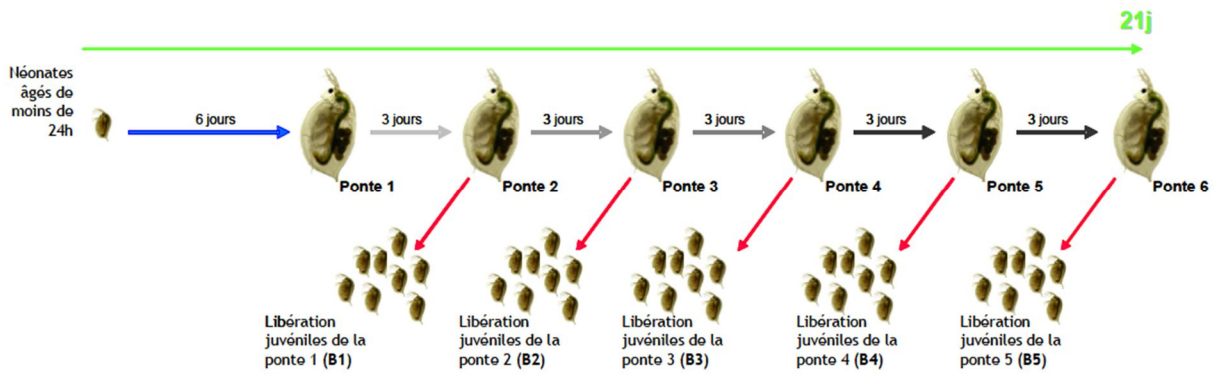
### 5.5. Cycle de vie

Selon les conditions environnementales, la daphnie peut se reproduire de façon sexuée ou asexuée (parthénogénétique) (Figure 7):

En conditions favorables, les daphnies se reproduisent par reproduction asexuée ou parthénogénétique. Dans ce cas, les femelles existent seules et produisent à partir d'ovules non fécondés d'autres daphnies filles qui leur sont génétiquement identiques. Les daphnies deviennent matures, c'est-à-dire ont leur 1<sup>ère</sup> ponte, au bout de 6-7 jours (Figure 8). Les juvéniles de cette première ponte restent dans la poche incubatrice des mères pendant 3 à 4 jours, le temps de leur développement. Ils sont ensuite expulsés par des flexions ventrales. Au plus tard une heure après cette libération, les daphnies adultes subissent une mue puis déposent une nouvelle ponte dans leur poche incubatrice. Une fois les daphnies deviennent matures, elles pondent tous les 3 à 4 jours jusqu'à leur mort. Les générations parthénogénétiques, sans apparition de mâles, se succèdent tant que les conditions du milieu restent favorables.



**Figure 7 :** Cycle de vie de la daphnie (d'après Zeman, 2008 ; repris de Ebert, 2005)

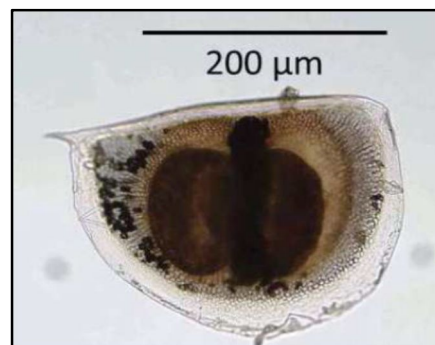


**Figure 8 :** Reproduction parthénogénétique de la daphnie en conditions favorables  
(Zeman, 2008)

Si les conditions deviennent défavorables (manque de nourriture, pollution chimique, densité excessive, assèchement du volume d'eau, désoxygénation sévère, abaissement de la température, etc...), la reproduction sexuée se met en place. Les daphnies femelles donnent alors naissance à des mâles qui sont plus petits et reconnaissables à l'absence de poche incubatrice (Zeman, 2008) (Figure 9). Elles produisent ainsi des œufs haploïdes qui requièrent une fécondation par les mâles. Ces œufs de résistance sont encapsulés dans une membrane protectrice, appelée « éphippie » (Figure 10), contenant généralement 2 gros œufs, issus de chaque ovaire. Ils donneront naissance, lorsque les conditions deviennent de nouveau favorables, à une population génétiquement différente des daphnies mères (Chèvre, 2000 ; Zeman, 2008).



**Figure 9 :** Photographie d'un mâle de 21 jours  
(Zeman, 2008)



**Figure 10 :** Photographie d'une éphippie  
(Boehler et al., 2012)

### 5.6. Intérêt des daphnies comme modèles d'étude

*Daphnia magna* est le microcrustacé d'eau douce le plus recommandé en tant que modèle biologique de référence pour l'évaluation des effets toxiques potentiels de substances chimiques (ISO, 1996, ASTM, 2004, OECD, 2004 et 2008). Cette espèce est choisie pour diverses raisons, à savoir :

- ❖ Sa facilité de manipulation et d'élevage au laboratoire du fait de sa taille relativement petite (Colbourne et *al.*, 2011).
- ❖ Son cycle de vie court, ce qui permet de suivre l'effet des polluants sur plusieurs générations (Colbourne et *al.*, 2011).
- ❖ Son mode de reproduction asexuée (population génétiquement stable) et sa fécondité élevée (pontes abondantes) (Colbourne et *al.*, 2011).
- ❖ Sa sensibilité à une large gamme de produits chimiques (Colbourne et *al.*, 2011).
- ❖ En tant que consommateur primaire, la daphnie occupe une place importante dans les transferts de matière et d'énergie dans les chaînes alimentaires des écosystèmes aquatiques d'eau douce (Massarin, 2010).

Toutes ces raisons ont encouragé l'adoption de cette espèce pour la normalisation au niveau international dans différents bioessais de toxicité à court et à long terme (US EPA, 1989 ; OECD, 1998; ASTM, 2001).

***Chapitre II:***  
***Etude physiologique***

## 1. Introduction

De par leur mode d'action, les herbicides utilisés dans le milieu naturel ont un impact écologique plus ou moins important selon leur efficacité, leur toxicité plus ou moins ciblée et leur rémanence dans l'environnement. Ainsi, l'usage des pesticides de manière prolongée, intensive, répétée et non spécifique provoque non seulement des altérations de l'environnement, mais aussi des perturbations au niveau de plusieurs systèmes physiologiques chez les organismes non cibles (Gagné et *al.*, 1999). Ces indices physiologiques sont donc considérés comme étant des biomarqueurs écologiques pertinents qui permettent une détection précoce des effets des contaminants avant que les altérations ne soient observables au niveau des populations (Arinc et *al.*, 2000).

C'est dans ce contexte que se positionne notre première partie de travail dont l'objectif principal est l'étude des effets d'un herbicide à base de cycloxydime sur la physiologie générale de deux espèces représentatives des écosystèmes aquatiques d'eau douce : *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna*.

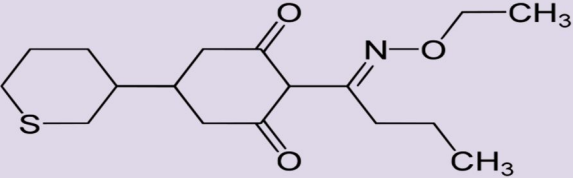
## 2. Matériel et méthodes

L'étude expérimentale a été menée au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Badji Mokhtar - Annaba.

### 2.1. Matériel chimique

Notre choix s'est porté sur un herbicide sélectif à base de cycloxydime utilisé sous forme de préparation commerciale nommée « Focus Ultra » (10.9% de cycloxydime). C'est un herbicide systémique à large spectre, de la famille chimique des cyclohexanediones, utilisé en Algérie pour le contrôle des graminées annuelles et vivaces. Les propriétés physicochimiques de Focus Ultra sont indiquées dans le tableau (3).

**Tableau 3 :** Caractéristiques physicochimiques et structure moléculaire de Focus Ultra (cycloxydime) (Source : fiche technique)

Nom commercial	Focus Ultra
Nom chimique	2-[1-(ethoxyimino)butyl]-3-hydroxy-5-(tetrahydro-2Hthiopyran-3-yl)-2-cyclohexen-1-one
Formule brute	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub> S
Masse molaire	325,46
Formulation	Concentré Emulsionnable (EC)
Couleur	Jaune
Odeur	Aromatique
Valeur du pH à 20°C	env. 4 – 5
Densité	0,93 g/cm <sup>3</sup> à 20 °C
Viscosité dynamique	env. 4,7 mPa.s à 20 °C
Solubilité dans l'eau	Emulsifiable
Structure chimique	

## 2.2. Matériel biologique

### 2.2.1. *Paramecium tetraurelia*

Le premier matériel biologique utilisé dans nos expérimentations est le protozoaire cilié : *Paramecium tetraurelia*. Sa position taxonomique selon Corliss et *al.* (1961) est la suivante :

**Super règne :** Eukaryotae

**Phylum :** Protista

**Classe :** Ciliophora

**Sous Classe :** Oligohymenophorea

**Ordre :** Peniculia

**Sous Ordre :** Urocentrida

**Famille :** Paramecina

**Genre :** *Paramecium*

**Espèce :** *tetraurelia*

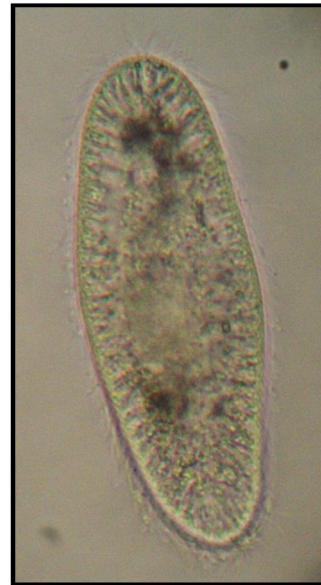


Figure 11 : *Paramecium tetraurelia*

### 2.2.2. *Daphnia magna*

Le deuxième matériel biologique utilisé est le microcrustacé d'eau douce : *Daphnia magna*, connu également sous le nom de "puce d'eau". Il répond à la classification taxonomique suivante :

**Règne :** Animalia

**Phylum :** Arthropoda

**Classe :** Branchiopoda

**Sous Classe :** Phyllopoda

**Ordre :** Cladocera

**Famille :** Daphnidae

**Genre :** *Daphnia*

**Espèce :** *magna* (Straus, 1820)



Figure 12 : *Daphnia magna*

## 2.3. Méthodes

### 2.3.1. Cas de *Paramecium tetraurelia*

#### 2.3.1.1. Culture des paramécies

Les cellules de *Paramecium tetraurelia* sont cultivées dans un milieu dont la composition est détaillée par Azzouz et *al.* (2011). Les paramécies sont incubées dans une étuve de type Memmert 400 à pH 6.5 et une température de  $28 \pm 2$  °C. Afin de maintenir une bonne culture, les cellules sont repiquées tous les trois jours.

#### 2.3.1.2. Traitement des paramécies

Sur la base de plusieurs essais préliminaires effectués avec différentes batteries de concentrations de Focus Ultra, nous avons retenu quatre concentrations, à savoir : 3, 6, 9 et 12 mg/L. L'herbicide est testé sur des aliquotes de 10 ml et le traitement est réalisé avant l'ensemencement des paramécies. Cinq répétitions sont maintenues pour chaque concentration en plus du témoin.

#### 2.3.1.3. Cinétique de croissance cellulaire

La cinétique de croissance des paramécies est réalisée par comptage cellulaire journalier (toutes les 24 heures) après fixation au lugol à 1%. L'opération est effectuée sous microscope optique (Leica DM 1000) à l'aide d'une lame striée (Azzouz, 2012). La cinétique de croissance commence dès la mise en contact des paramécies avec le xénobiotique et se poursuit jusqu'au cinquième jour. Le dénombrement est répété au moins cinq fois pour chaque tube. L'évaluation de la croissance de la population est déterminée par les équations suivantes :

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

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

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

Où :

- **$n$**  : Nombre de génération,  $N_t$  : Population dans le temps  $t$ ,  $N_0$  : Nombre initial de cellules ;
- **$k$**  : Vitesse de la génération ;
- **$g$**  : Temps de génération (temps nécessaire pour qu'une population de cellules double en nombre).

#### 2.3.1.4. Calcul du pourcentage de réponse

C'est un calcul qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis de la molécule testée. Les valeurs positives indiquent une inhibition de la croissance alors que celles négatives indiquent une stimulation de la croissance (Wong et *al.*, 1999).

Cette relation dose-réponse est calculée par l'équation suivante :

$$PR (\%) = \frac{(Nc - Ne)}{Nc} * 100$$

Où :

- **$PR$**  : Pourcentage de réponse ;
- **$Nc$**  : Nombre de cellules témoins ;
- **$Ne$**  : Nombre de cellules traitées.

#### 2.3.1.5. Détermination de la Concentration Inhibitrice ( $CI_{50}$ )

La concentration inhibitrice ( $CI_{50}$ ) qui, dans les conditions standards inhibe 50% de l'accroissement d'une population de paramécies est calculée par l'analyse de cinétique de croissance en utilisant la régression linéaire (méthode des moindres carrés).

#### 2.3.1.6. Détermination de l'activité phagocytaire

L'activité phagocytaire est estimée par une technique de coloration au rouge neutre suggérée par Rouabhi et *al.* (2006). Elle consiste à mélanger une goutte de rouge neutre à 1% avec une goutte de paramécies. Après 3 minutes, les cellules sont placées entre lame et

lamelle et le nombre total de vacuoles digestives par cellule est compté sous microscope optique (grossissement x 200).

### 2.3.1.7. Détermination de l'activité des vacuoles contractiles

L'activité vacuolaire est déterminée par l'enregistrement vidéo, sous microscope (Leica DM 1000) équipé d'une caméra de type (Leica EC 3), des fréquences d'expulsion de paramécies légèrement comprimées entre lame et lamelle tel que proposé par Naitoh et *al.* (1997). Après enregistrement des vidéos, le taux de pulsations par minute de la vacuole pulsatile antérieure (Figure 13) est déterminé pour les groupes témoin et traités. Cinq lectures sont prises pour chaque échantillon.



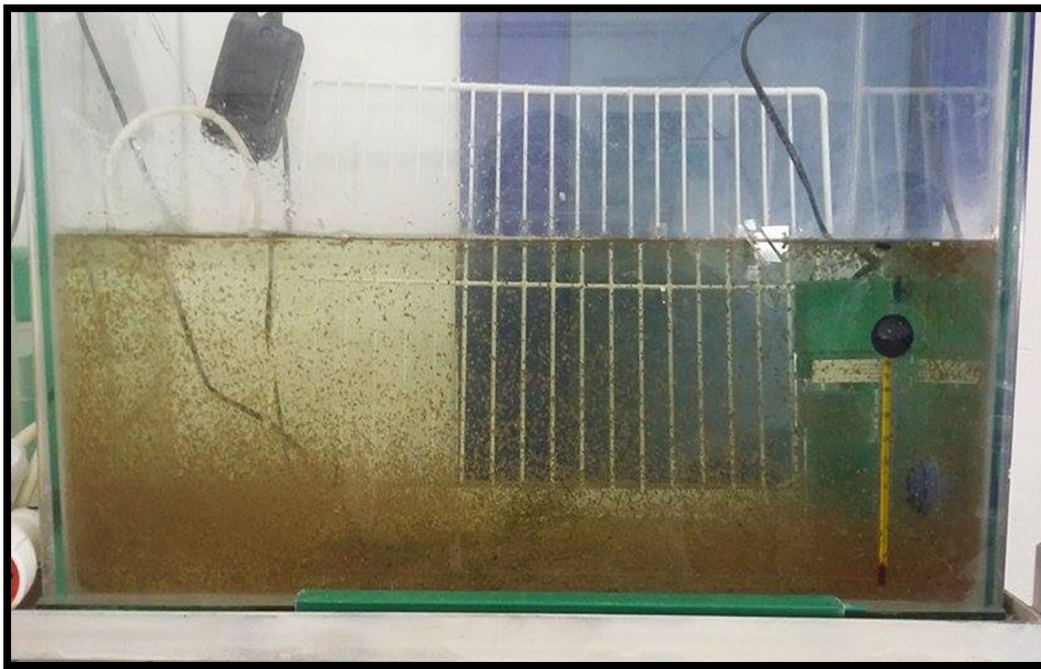
**Figure 13 :** Activité de la vacuole pulsatile antérieure chez *Paramecium tetraurelia* (x 400).

**A:** Vacuole pulsatile en diastole, **B:** Vacuole pulsatile en systole.

### 2.3.2. Cas de *Daphnia magna*

#### 2.3.2.1. Condition d'élevage des daphnies

Les daphnies sont issues d'une culture continue au sein de notre laboratoire, et maintenues en phase de reproduction parthénogénétique. *Daphnia magna* sont cultivées à température et photopériode constantes ( $20 \pm 2$  °C ; 16h de lumière/ 8h d'obscurité), dans un aquarium contenant environ 15 L d'eau de robinet déchlorée (dureté totale :  $181.8 \pm 18.8$  mg/L ; pH  $7.9 \pm 0.2$ ) (Ferrando et al., 1995). Le milieu est renouvelé deux fois par semaine et les daphnies sont nourries quotidiennement avec une mixture d'algues (*Chlorella vulgaris*) et de levure (*Saccharomyces cerevisiae*). L'oxygénation du milieu de culture est assurée par une pompe à air (Figure 14).



**Figure 14 :** Elevage de *Daphnia magna* au laboratoire

#### 2.3.2.2. Test de toxicité aiguë

C'est un test de toxicité à court terme qui vise à déterminer la concentration qui provoque l'inhibition de la mobilité des jeunes daphnies (<24 heures) au bout de 48 heures d'exposition. Ce test est réalisé en se basant sur la norme **ISO/DIS 6341.2** (ISO, 1996).

Après avoir effectué une série d'essais préliminaires avec différentes gammes de concentrations, nous avons maintenu quatre concentrations, à savoir, 0,1, 1, 2 et 4 mg/L. Cinq néonates (< 24 heures d'âge) sont placées dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu ISO (ISO/DIS 6341.2) (Tableau 4) et la concentration voulue de Focus Ultra. Cinq réplicats sont réalisés pour chaque concentration en plus du témoin. L'incubation des tubes se fait à l'abri de la lumière. Un dénombrement visuel des daphnies immobiles est effectué après 24 et 48 heures d'exposition. Les daphnies incapables de se déplacer dans les quinze secondes qui suivent une légère agitation du tube sont considérées comme étant immobilisées, même si elles remuent leurs antennes. Le test n'est validé que lorsque le pourcentage d'immobilisation dans les témoins est inférieur ou égal à 10% en fin d'essai.

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

	Eléments chimiques	Quantités (g/L)
<b>Solution 1</b>	Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O)	11,76
<b>Solution 2</b>	Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	4,93
<b>Solution 3</b>	Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	2,59
<b>Solution 4</b>	Chlorure de potassium (KCl)	0,23

- Prélever 25 ml de chacune des quatre solutions préparées, puis compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.
- L'eau de dilution doit être aérée avant utilisation pour les tests de toxicité et le pH doit être ajusté à  $7,8 \pm 0,2$ .

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

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

$$IM(\%) = \frac{(N0 - Ni)}{N0} * 100$$

Où :

- $IM$  : Pourcentage d'inhibition de la mobilité (24h/48h) ;
- $N_0$  : Nombre de daphnies mises en essai ;
- $N_i$  : Nombre de daphnies immobiles en fin d'essai.

#### 2.3.2.4. Détermination de la Concentration Effective ( $CE_{50}$ )

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

#### 2.3.2.5. Mesure du rythme cardiaque et détermination de l'activité des appendices thoraciques et de la mandibule

La mesure de ces paramètres physiologiques est basée sur la méthode de Jeong et *al.* (2015). Le rythme cardiaque ainsi que les mouvements des appendices thoraciques et de la mandibule sont contrôlés après 24 et 48 heures d'exposition. Après avoir déposé une daphnie sur une lame en verre, et retiré l'excès d'eau afin de limiter le mouvement de celle-ci, l'activité de chaque organe (cœur, appendices thoraciques et mandibule) est filmée sous microscope (Leïca DM 1000) pendant 1 min. Les fréquences des battements de cœur et les mouvements des appendices et de la mandibule sont comptés à partir des vidéos enregistrées. Cinq répétitions sont réalisées pour chaque concentration.

### 2.4. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique grâce au logiciel Minitab (Version 14.0). Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart type ( $m \pm SD$ ). Les moyennes des groupes témoins et traités ont été comparées deux à deux en utilisant le test  $t$  de Student. Afin de déterminer la significativité des différences des moyennes pour l'ensemble des variables nous avons utilisé une analyse de la variance à un critère d'évaluation (ANOVA). Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $p \leq 0,05$  (\*); hautement significatives lorsque  $p \leq 0,01$  (\*\*) et très hautement significatives lorsque  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

### 3. Résultats

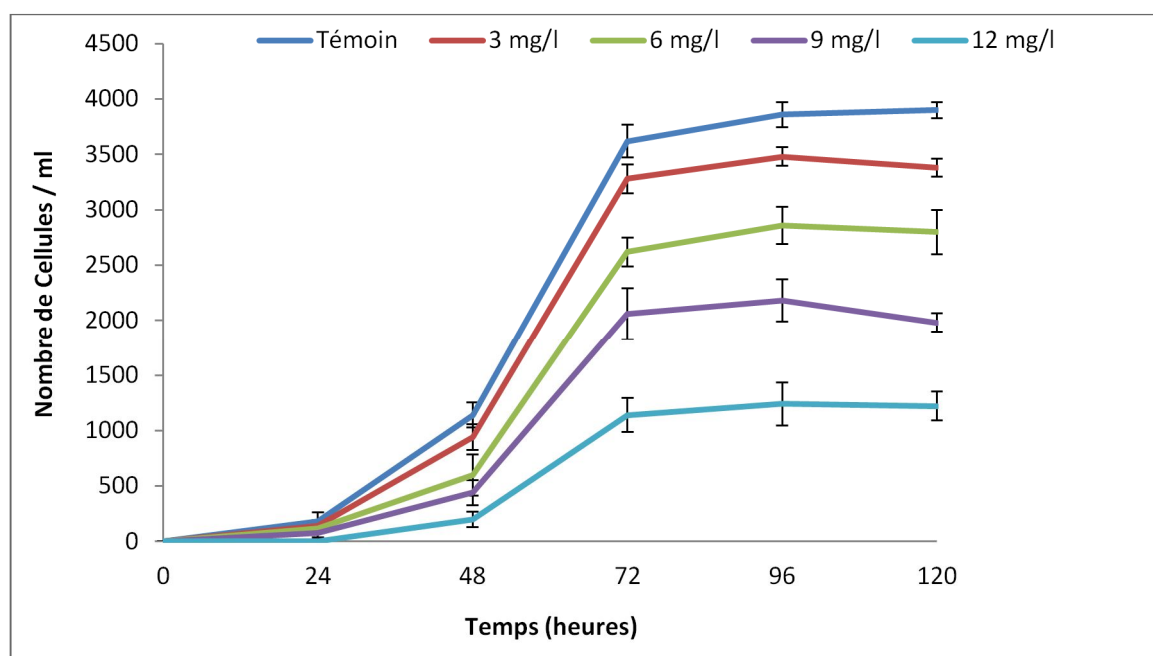
#### 3.1. Cas de *Paramecium tetraurelia*

##### 3.1.1. Effet de Focus Ultra sur la cinétique de croissance cellulaire

La figure (15) illustre l'effet, en fonction du temps, des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la cinétique de croissance de *Paramecium tetraurelia*.

Nos résultats montrent que durant les 24 premières heures de traitement, la croissance des cellules traitées est similaire à celle des témoins. Cependant, une diminution progressive du nombre de cellules traitées est constatée, dès le 3<sup>ème</sup> jour (72h) d'exposition. Cette déplétion est plus prononcée et très hautement significative ( $p = 0,000$ ) pour les deux plus fortes concentrations (9 et 12 mg/L) de Focus Ultra, et persiste jusqu'à la fin du traitement (120h). Ainsi, nous notons respectivement, des différences d'environ 51 et 70% pour les traitées par les concentrations 9 et 12 mg/L, par rapport aux témoins au 5<sup>ème</sup> jour de traitement.

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle un effet très hautement significatif du traitement par Focus Ultra sur la croissance cellulaire ( $p = 0.000$ ).



**Figure 15 :** Effet de Focus Ultra sur la croissance de *Paramecium tetraurelia*  
(T = 30°C, pH = 6,5)

### 3.1.2. Effet de Focus Ultra sur le nombre, le temps et la vitesse de génération

Les résultats relatifs au nombre, au temps et à la vitesse de génération des paramécies exposées aux concentrations croissantes de Focus Ultra sont regroupés dans le tableau (5).

Nous notons un ralentissement de la division cellulaire de *Paramecium tetraurelia* en présence de Focus Ultra, se traduisant par une diminution progressive du nombre et de la vitesse de génération par rapport aux témoins. Cette diminution est dose dépendante et inversement proportionnelle aux concentrations croissantes de l'herbicide. Parallèlement, nous remarquons une augmentation dose dépendante du temps de génération qui atteint environ 16h chez les paramécies traitées par la plus forte concentration (12 mg/L), comparé à celui des témoins qui n'est que de 12h.

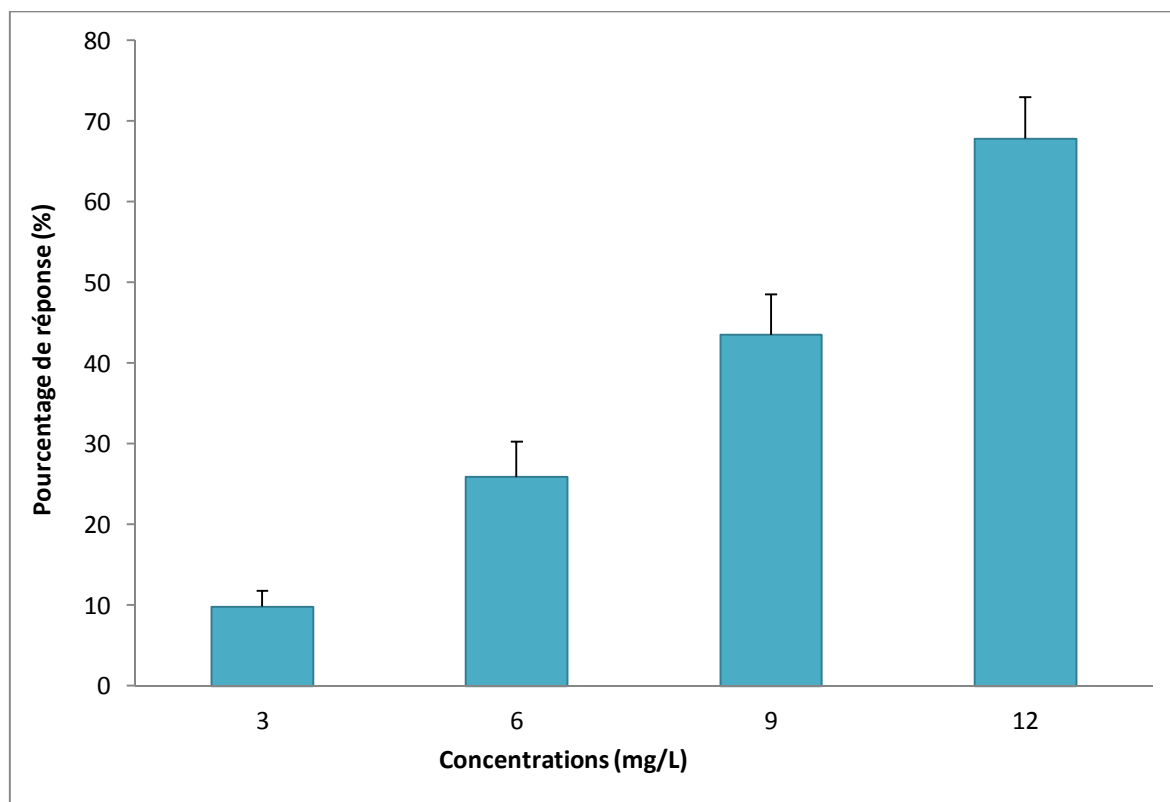
**Tableau 5 :** Evolution du nombre, du temps et de la vitesse de génération de *Paramecium tetraurelia* après 96h d'exposition au Focus Ultra

Concentrations (mg/L)	Nombre de génération	Temps de génération (h)	Vitesse de génération (n/h)
<b>Témoin</b>	7.59 ± 0.04	12.64 ± 0.07	0.0790 ± 0.0004
<b>3</b>	7.44 ± 0.03	12.89 ± 0.05	0.0775 ± 0.0003
<b>6</b>	7.15 ± 0.08	13.41 ± 0.15	0.0745 ± 0.0008
<b>9</b>	6.76 ± 0.12	14.19 ± 0.27	0.0704 ± 0.0013
<b>12</b>	5.94 ± 0.22	15.93 ± 0.59	0.0618 ± 0.0022

### 3.1.3. Effet de Focus Ultra sur le pourcentage de réponse

La figure (16) représente l'évolution du pourcentage de réponse chez les paramécies traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra.

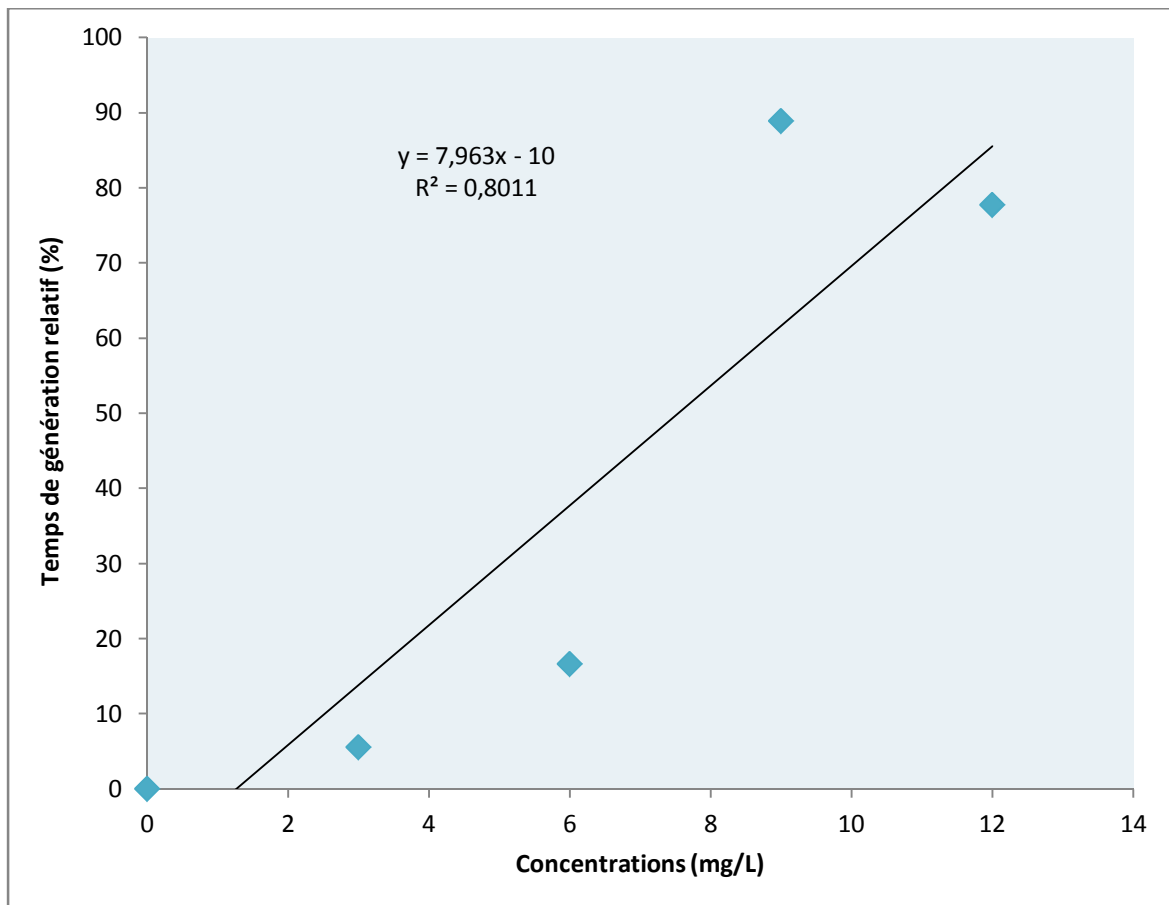
Nous constatons que le pourcentage de réponse est positif pour toutes les concentrations testées, indiquant une inhibition dose dépendante de la croissance chez les cellules traitées par Focus Ultra. En effet, cette inhibition est de l'ordre de 10% pour la concentration (3 mg/L) et atteint environ 70% pour la plus forte concentration (12 mg/L).



**Figure 16 :** Evolution du pourcentage de réponse de *Paramecium tetraurelia* en présence des concentrations croissantes de Focus Ultra

### 3.1.4. Détermination de la concentration inhibitrice $CI_{50}$

La  $CI_{50}$  qui inhibe à 50% la croissance de *Paramecium tetraurelia* après 96h de traitement au Focus Ultra est calculée à partir de l'équation linéaire :  $y = 7,963x - 10$  (Figure 17). Elle est estimée à **7,53 mg/L**.



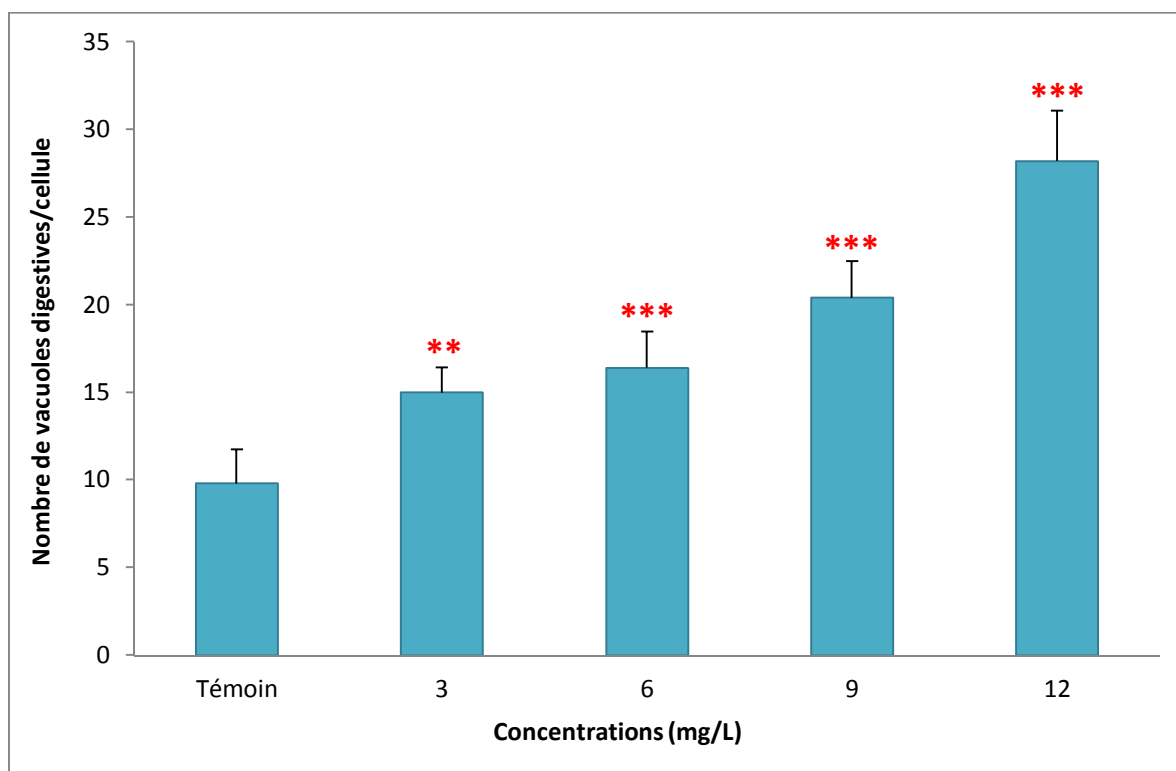
**Figure 17 :** Détermination de la concentration inhibitrice moyenne ( $CI_{50}$ ) de la croissance chez *Paramecium tetraurelia* après exposition au Focus Ultra

### 3.1.5. Effet de Focus Ultra sur l'activité phagocytaire

La figure (18) met en évidence l'effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'activité phagocytaire chez *Paramecium tetraurelia*.

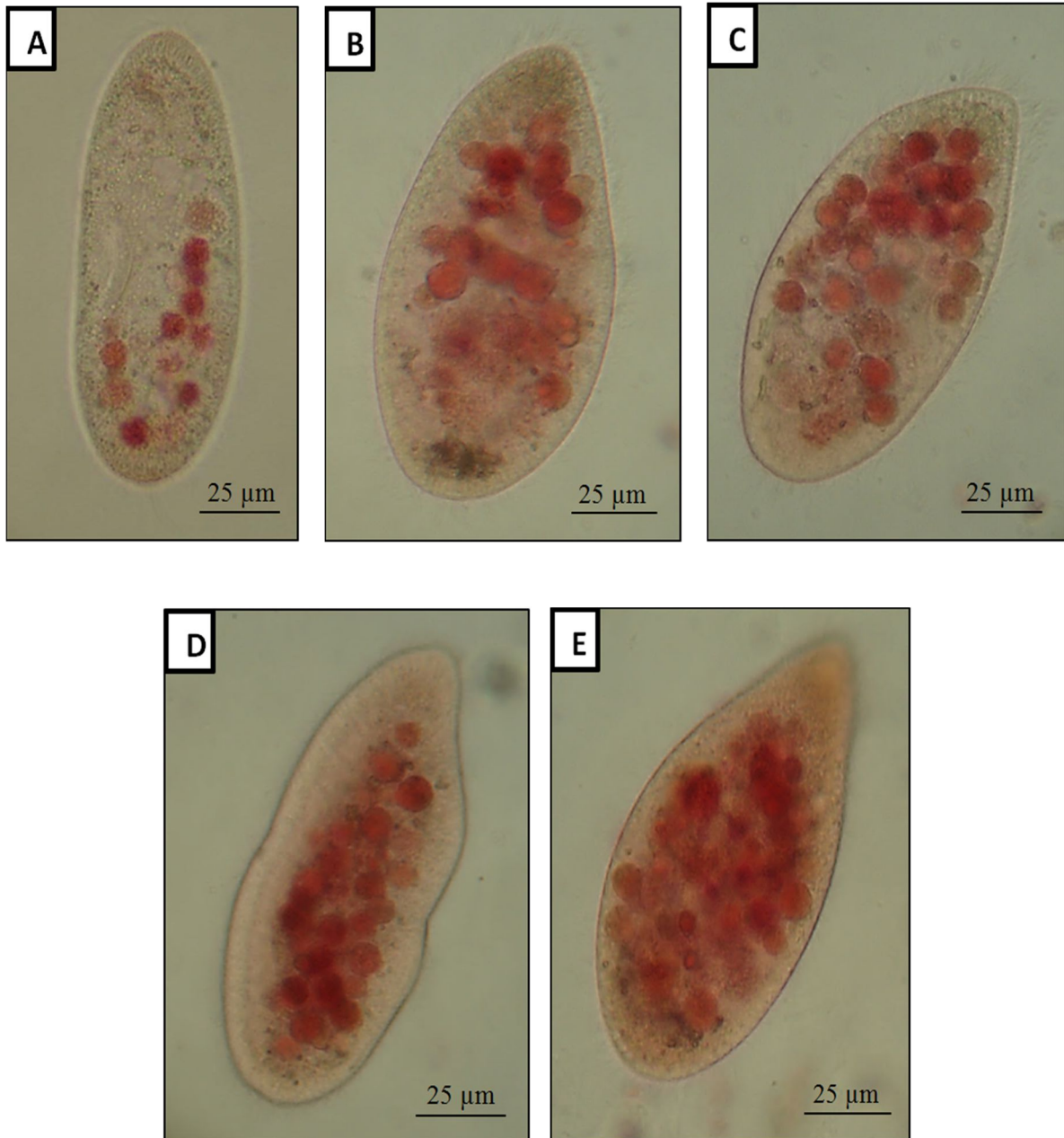
Les résultats obtenus révèlent une stimulation dose dépendante de l'activité phagocytaire chez les paramécies traitées par Focus Ultra. Cette stimulation est très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) pour les concentrations 6, 9 et 12 mg/L du xénobiotique, par rapport aux témoins. Ainsi, le nombre de vacuoles digestives passe de 9.8 vacuoles/cellule chez les paramécies témoins à 16.4 et 20.4 vacuoles/cellule chez les paramécies traitées par les concentrations 6 et 9 mg/L, pour atteindre un maximum de 28.2 vacuoles/cellule chez les paramécies traitées par la plus forte concentration (12 mg/L).

La comparaison entre les effets des différentes concentrations par l'analyse de la variance (ANOVA), révèle des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ).



**Figure 18 :** Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'activité phagocytaire chez *Paramecium tetraurelia*

Cette stimulation de l'activité phagocytaire est clairement visible sur la figure (19), qui représente des photos de cellules de *Paramecium tetraurelia* témoin et traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra dont les vacuoles digestives sont colorées au rouge neutre.



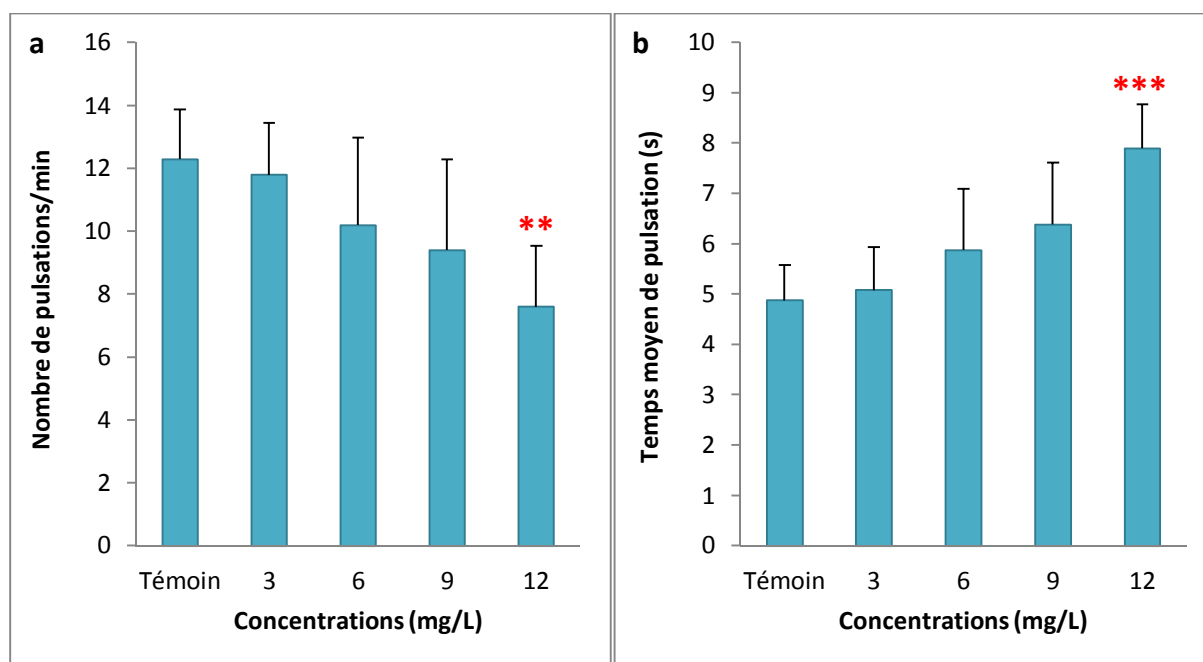
**Figure 19 :** Vacuoles digestives chez *Paramecium tetraurelia* témoin (A) et traitée par 3 mg/L (B), 6 mg/L (C), 9 mg/L (D) et 12 mg/L (E) de Focus Ultra colorées au rouge neutre

### 3.1.6. Effet de Focus Ultra sur l'activité de la vacuole pulsatile

L'effet du traitement par les concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'activité de la vacuole pulsatile chez *Paramecium tetraurelia* est illustré dans la figure (20).

Nos résultats mettent en évidence une diminution hautement significative ( $p = 0.006$ ) du nombre de pulsations, parallèlement à une augmentation très hautement significative ( $p = 0.001$ ) du temps moyen de pulsations chez les paramécies traitées par la plus forte concentration de l'herbicide (12 mg/L), où nous notons un nombre de pulsations de l'ordre de 7.6 pulsations par minute avec un temps moyen de 7.9 secondes pour une pulsation complète, comparé à celui des témoins qui est d'environ 12.30 pulsations par minute avec un temps moyen de 4.88 secondes pour chaque pulsation.

L'analyse de la variance (ANOVA) indique des différences très hautement significatives entre les effets des concentrations croissantes de l'herbicide sur le nombre de pulsations et le temps moyen de pulsation ( $p = 0.001$ ).



**Figure 20** : Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'activité des vacuoles pulsatiles chez *Paramecium tetraurelia*. (a) : Nombre de pulsations/min, (b) : Temps moyen d'une pulsation complète (s)

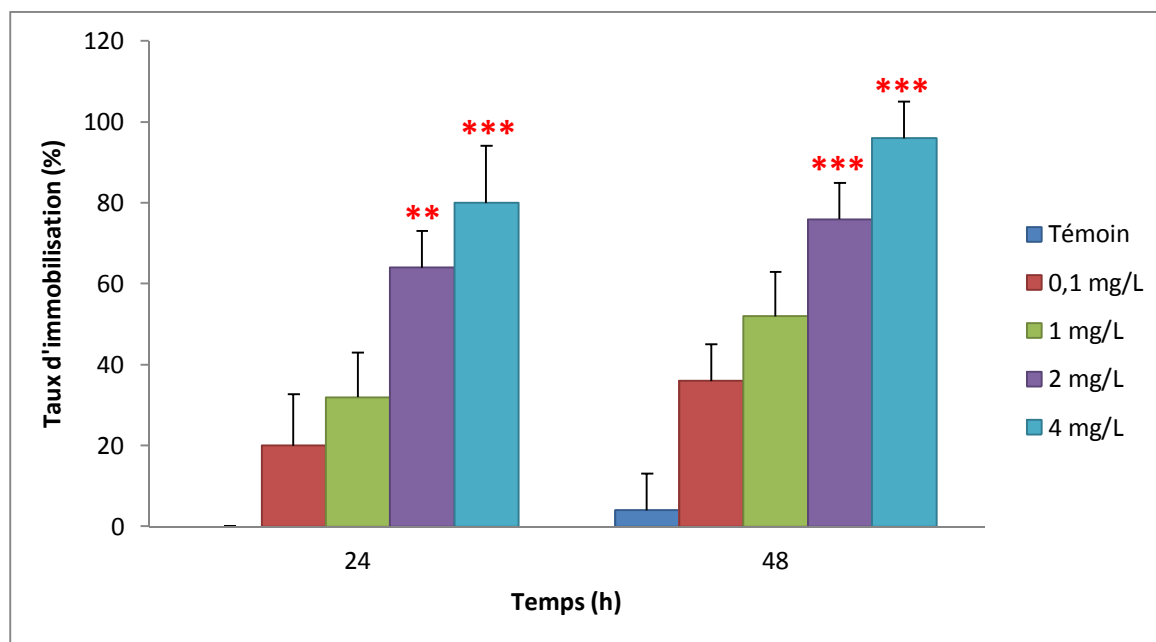
### 3.2. Cas de *Daphnia magna*

#### 3.2.1. Taux d'immobilisation de *Daphnia magna* après exposition au Focus Ultra (24/48h)

Les résultats concernant le taux d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* après 24 et 48h d'exposition au Focus Ultra sont représentés dans la figure (21).

Nous remarquons que le taux d'immobilisation des daphnies tend à augmenter de manière dose dépendante chez les traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra, et ce en fonction du temps. Cette augmentation est très hautement significative ( $p = 0.000$ ) pour les néonates exposées aux plus fortes concentrations (2 et 4 mg/L), par rapport aux témoins. Ainsi, après 48h d'exposition, nous enregistrons une inhibition maximale de la mobilité qui est de l'ordre de 80% et 96% chez les individus traités par les concentrations 2 et 4 mg/L, respectivement.

La comparaison entre les effets des différentes concentrations par l'analyse de la variance (ANOVA), révèle des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ), et ce pour les deux durées d'exposition.



**Figure 21** : Taux d'immobilisation enregistré chez *Daphnia magna* exposée pendant 24 et 48h aux concentrations croissantes de Focus Ultra

### 3.2.2. Détermination de la concentration effective CE<sub>50</sub> (24/48h)

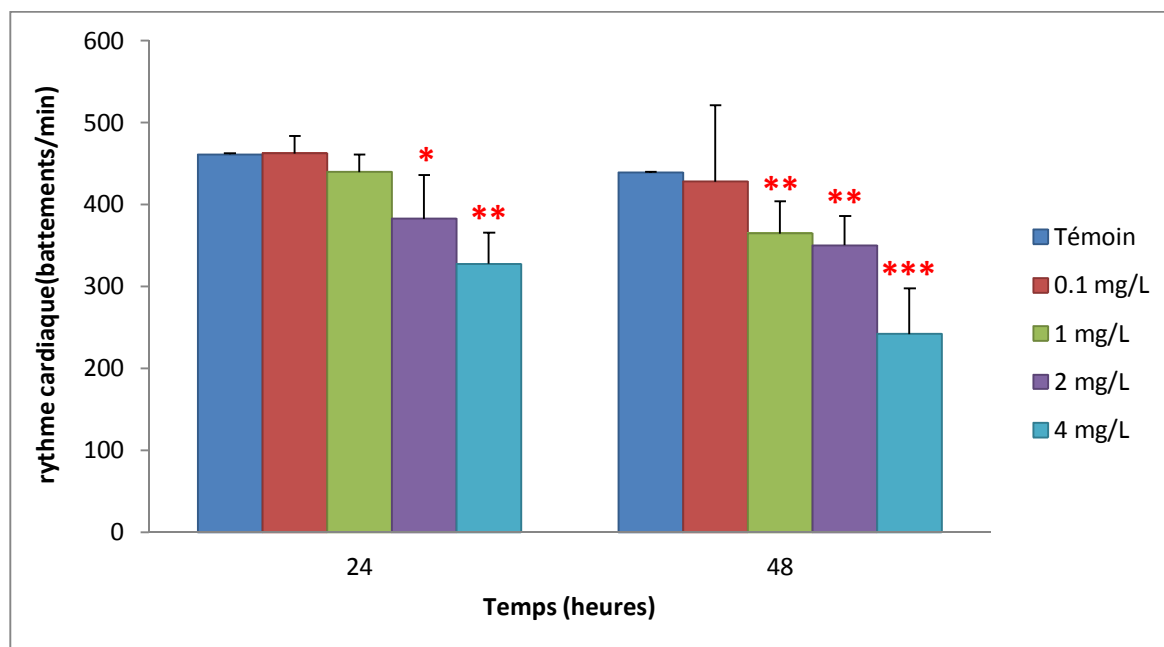
Les concentrations effectives moyennes qui causent 50% d'immobilisation des néonates (CE<sub>50</sub>) ont été calculées par la méthode Probit. Elles sont de l'ordre de **1.05 mg/L** et **0.31 mg/L** après 24 et 48 heures d'exposition, respectivement.

### 3.2.3. Effet de Focus Ultra sur la fréquence cardiaque

La figure (22) illustre les variations de la fréquence cardiaque chez *Daphnia magna* après exposition aux concentrations croissantes de Focus Ultra pendant 24 et 48 heures.

Nous constatons une réduction dose dépendante du rythme cardiaque chez les daphnies traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra, en fonction du temps. Cette diminution est très hautement significative ( $p = 0.000$ ) pour la plus forte concentration (4 mg/L) par rapport aux témoins, après 48h d'exposition. Elle est ainsi estimée à environ 50%.

L'analyse de la variance (ANOVA) montre l'existence de différences très hautement significatives entre les effets des concentrations croissantes de Focus Ultra ( $p = 0.000$ ), et ce pour les deux durées de traitement.



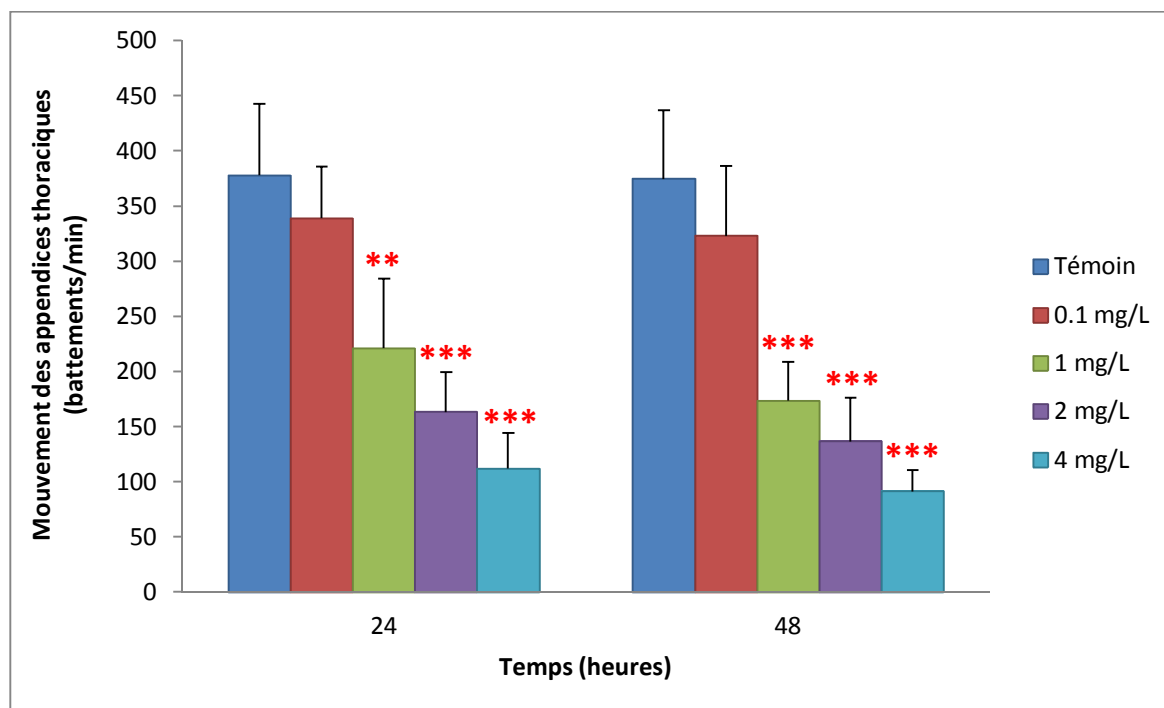
**Figure 22** : Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la fréquence cardiaque chez *Daphnia magna* après 24 et 48h d'exposition

### 3.2.4. Effet de Focus Ultra sur l'activité des appendices thoraciques

Les variations de l'activité des appendices thoraciques chez les daphnies exposées pendant 24 et 48 heures aux concentrations croissantes de Focus Ultra sont illustrées dans la figure (23).

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative de l'activité des appendices thoraciques chez les individus traités par les concentrations 1, 2 et 4 mg/L ( $p \leq 0.001$ ), par rapport aux témoins. Ainsi, Au bout de 48h d'exposition, le nombre moyen de battements des appendices thoraciques diminue à 112 battements/minute pour la plus forte concentration (4 mg/L), comparé à celui des témoins qui est de l'ordre de 400 battements/minute.

L'analyse de la variance (ANOVA) indique des différences très hautement significatives entre les effets des différentes concentrations ( $p = 0.000$ ), et ce pour les deux durées d'exposition.



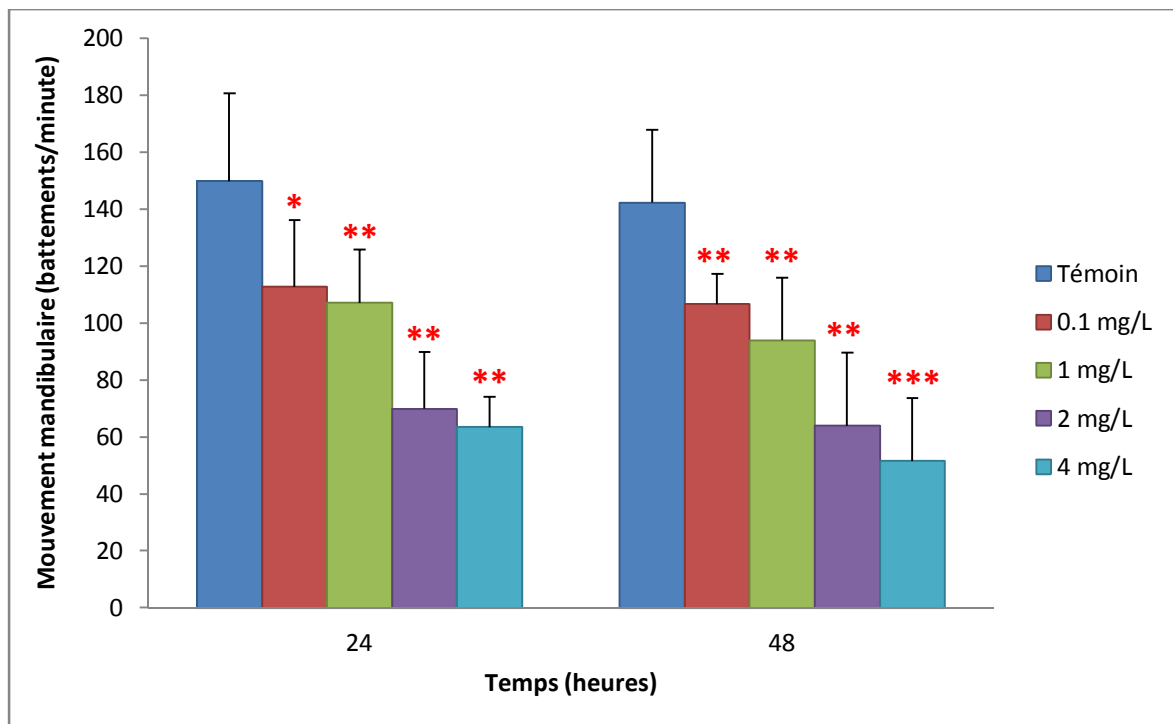
**Figure 23 :** Effet de Focus Ultra sur l'activité des appendices thoraciques chez *Daphnia magna* après 24 et 48 heures d'exposition

### 3.2.5. Effet de Focus Ultra sur l'activité mandibulaire

L'effet, en fonction du temps, des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'activité mandibulaire chez *Daphnia magna* est présenté dans la Figure (24).

Nous constatons une diminution dose dépendante de l'activité mandibulaire chez les daphnies exposées pendant 24 et 48h aux concentrations croissantes de l'herbicide. Cette diminution est très hautement significative pour la plus forte concentration de Focus Ultra ( $p = 0.001$ ). En effet, l'activité mandibulaire est réduite à 51.6 battements/minute après 48h d'exposition à la concentration 4 mg/L, comparée à celle des témoins qui est de 142.4 battements/minute.

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle un effet très hautement significatif du traitement par Focus Ultra ( $p = 0.000$ ), et ce pour les deux durées de traitement.



**Figure 24 :** Effet d'une exposition de 24 et 48h aux concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'activité mandibulaire chez *Daphnia magna*

#### 4. Discussion

Plusieurs espèces biologiques sont utilisées dans les programmes de biosurveillance de la qualité environnementale en prenant en compte les différents niveaux trophiques. Ces espèces sentinelles doivent en outre être sélectionnées au sein de communautés biocénotiques sur la base de leur pertinence vis-à-vis des types de biomarqueurs choisis ainsi que leur praticité expérimentale (Suter, 2005).

En raison de leurs caractéristiques générales et de leur position dans la chaîne trophique, les paramécies et les daphnies sont considérés comme d'excellents bioindicateurs de la qualité des écosystèmes aquatiques d'eau douce. Ce sont des organismes abondants, faciles à manipuler et dont les caractéristiques physiologiques les rendent particulièrement sensibles aux perturbations extérieures affectant leur milieu de vie.

En état de stress, ces organismes aquatiques présentent généralement une grande variété de réponses adaptatives au niveau physiologique. Lorsque ces réponses mises en place par l'organisme ne peuvent plus résister aux effets délétères du stress, des dommages physiologiques (taux de mortalité élevé, retard de croissance et réduction de la fécondité) peuvent alors apparaître (Weis et *al.*, 2001). Les réponses physiologiques sont donc des signaux « **d'alerte précoce** » sensibles aux perturbations environnementales, et qui peuvent nous fournir des informations utiles sur l'état de santé global de l'individu.

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes focalisés dans cette première partie de notre travail, sur l'étude des réponses physiologiques chez ces deux modèles biologiques d'eau douce (*Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna*) suite à une exposition au Focus Ultra.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la cytotoxicité de cet herbicide sur *Paramecium tetraurelia* en élucidant ses effets sur la croissance de la population, un paramètre qui reflète l'état du métabolisme cellulaire chez les microorganismes (Perez-Rama et *al.*, 2001). Plusieurs travaux ont mis l'accent sur la sensibilité des ciliés d'eau douce vis-à-vis d'une multitude de pesticides. Ainsi leurs effets toxiques sont perceptibles au niveau de la population par une réduction du nombre de cellules (Garad et *al.*, 2007, Rouabhi et *al.*, 2009 ; Sbartai et *al.*, 2009). **Nos résultats montrent**

qu'en présence de Focus Ultra la croissance des paramécies est inhibée particulièrement pour les plus fortes concentrations. Cette inhibition se traduit par une augmentation du nombre et du temps de génération parallèlement à une diminution de la vitesse de génération. Ainsi, ces effets inhibiteurs du cycloxydime, rapportés dans notre travail, pourraient être une conséquence directe de son mécanisme d'action, qui se manifeste par l'inhibition spécifique de la biosynthèse des acides gras, éléments essentiels pour la croissance et le fonctionnement cellulaire : il en résulte une déstabilisation de la structure cellulaire et une altération de la fluidité membranaire conduisant inévitablement à la mort de la cellule. Des observations similaires ont été signalées par Venkateswara et *al.* (2006), Azzouz et *al.* (2011), Benbouzid et *al.* (2012a) et Amamra et *al.* (2015a), qui ont mis en évidence l'effet inhibiteur de l'Acéphate, Amistar Xtra, Phosphoramidate et la Cyperméthrine sur la croissance et la prolifération cellulaire des paramécies, soulignant l'intérêt de cet aspect comme excellent biomarqueur d'une éventuelle toxicité. Madoni (2000) et Mountassif et *al.* (2007) suggèrent aussi que, chez les protistes ciliés, la présence de molécules toxiques en concentrations élevées pourrait être à l'origine d'une altération de l'intégrité cellulaire, ce qui a pour conséquence une forte réduction du taux de survie. De même, Wagner et *al.* (2015a) ont rapporté une importante létalité chez les têtards de *Discoglossus scovazzi* exposés au Focus Ultra à des concentrations comprises entre 10 et 20 mg/L avec une  $CL_{50}$  de 14.5 mg/L à 96h de traitement. Il a été également observé que le cycloxydime affecte considérablement la croissance et la survie des rats nouveau-nés, issus de mères exposées à une concentration de 1600 ppm (Hellwing et *al.*, 1988). Les valeurs positives du pourcentage de réponse ainsi que la valeur de la  $CI_{50}$  ne font que confirmer les effets inhibiteurs de Focus Ultra sur la croissance cellulaire et la sensibilité de *Paramecium tetraurelia* vis-à-vis de cet herbicide.

Ces effets inhibiteurs sur la croissance de la population ont suscité l'intérêt d'élucider l'influence au niveau cellulaire de Focus Ultra sur l'activité phagocytaire et l'activité des vacuoles pulsatiles, qui sont deux fonctions physiologiques cruciales permettant le maintien de l'équilibre homéostatique cellulaire, et qui ont fait l'objet de plusieurs études illustrant les effets perturbateurs de différents facteurs extracellulaires sur leur fonctionnement (Okada et *al.*, 2001 ; Wiejak et *al.*, 2003 ; Hussain et *al.*, 2008 ; Amanchi, 2010a).

La phagocytose chez les protozoaires est un processus cellulaire qui permet non seulement la digestion des aliments, mais considéré aussi comme un moyen de défense contre toutes sortes de xénobiotiques. Dans notre étude, nous avons mis en évidence une stimulation de

**l'activité phagocytaire marquée par une augmentation significative du nombre de vacuoles digestives après traitement par Focus Ultra.** Nos résultats sont en accord avec les travaux de Nilsson (1981) et Stefanidou et *al.* (1990) qui ont étudié l'effet du Lanthane et l'Amphétamine sur la phagocytose de *Tetrahymena*. Il est établi que la formation et le mouvement des vacuoles digestives chez les paramécies sont assurés par les battements ciliaires. De ce fait, toute altération du mouvement ciliaire pourrait automatiquement affecter le taux de formation des vacuoles digestives (Nilsson, 2003). La stimulation de la phagocytose signalée dans notre travail pourrait essentiellement être due à l'entrée massive de l'herbicide puis son accumulation au niveau des vacuoles digestives, suite au mouvement accéléré des cils buccaux, comportement, également observé chez les paramécies en présence de Focus Ultra (voir chapitre V). Cette réaction pourrait probablement être accompagnée d'une inhibition des enzymes hydrolytiques responsables de la digestion intra-vacuolaire ainsi que les voies d'exocytose qui permettent la sécrétion des éléments indigestibles vers le milieu extracellulaire (Ravdin et *al.*, 1985). Selon, Ravdin et *al.* (1985), le calcium semble également jouer un rôle important au cours de la phagocytose. Cependant, son flux pourrait être stimulé et/ou inhibé sous l'effet de certains xénobiotiques, ce qui a pour conséquence une altération de la phagocytose soit par une inhibition ou alors une stimulation de la formation de vacuoles digestives. Amanchi et Hussain (2008), quant à eux, suggèrent que la présence de pesticides dans le milieu externe des paramécies pourrait entraîner une modification du pH, conduisant à une perturbation de la phagocytose.

Les vacuoles pulsatiles sont des structures subcellulaires spécialisées qui permettent aux paramécies de maintenir leur équilibre osmotique. Le fonctionnement de ces vacuoles est assuré par des contractions périodiques du cytoplasme par lesquelles l'excès d'eau est évacué vers le milieu extracellulaire. Nombreuses sont les études ayant illustré la sensibilité du complexe vacuolaire aux changements environnementaux et la perturbation de son fonctionnement suite à un déséquilibre dans la pression osmotique de part et d'autre de la membrane cellulaire (Patterson, 1980 ; Masaki et *al.*, 1993 ; Stock et *al.*, 2002 ; Toumani et *al.*, 2002). **Dans notre travail, la présence de Focus Ultra a provoqué une diminution notable du nombre de pulsations.** Ces résultats témoignent d'une altération de l'activité vacuolaire en réponse à un changement brutal de la pression osmotique externe. Selon Amanchi et Hussain (2008), l'inhibition de l'activité des vacuoles pulsatiles, est le résultat d'un dysfonctionnement de l'appareil vacuolaire, et peut être corrélé à un changement des facteurs environnementaux (composition du milieu externe, pH, teneur en oxygène,...), qui

peuvent à leur tour influencer la toxicité des pesticides. Nos résultats sont en étroite adéquation avec ceux de Shubhamsingh et Tejashree (2014) qui ont démontré l'effet inhibiteur du Diméthoate sur l'activité vacuolaire chez *Paramecium sp* ou encore ceux de Venkateswara et *al.* (2006) qui ont mis en évidence une rupture des vacuoles pulsatiles due à une forte pression intracellulaire chez *Paramecium caudatum* exposée à l'Acéphate.

Dans un second temps, nous nous sommes penchés dans cette partie de notre travail, sur l'évaluation de la toxicité aiguë de Focus Ultra sur le microcrustacé *Daphnia magna* à travers la détermination de la concentration inhibitrice de la mobilité ( $CE_{50}$ ), ainsi que le suivi de quelques aspects physiologiques, en l'occurrence, la fréquence cardiaque et les mouvements des appendices thoraciques et mandibulaires, indices déterminants de la bonne santé de l'individu, et qui sont communément utilisés en tant que biomarqueurs pour évaluer les effets de différents facteurs stressants sur *Daphnia magna* (Pirow et *al.*, 2001 ; Villegas-Navarro et *al.*, 2003 ; Campbell et *al.*, 2004).

Les cladocères, spécialement les daphnies, sont des organismes largement utilisés dans les tests écotoxicologiques. Ces tests standardisés de toxicité aiguë (Biesinger et Christensen, 1972 ; ISO, 1996 ; ASTM, 2001 ; OECD, 2004) sont réalisés sur un temps bien défini et constituent la première étape dans un programme d'évaluation dont l'objectif essentiel est la détermination des concentrations effectives moyennes ( $CE_{50}$ ).

**Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que la  $CE_{50}$  de Focus Ultra est de l'ordre de 1.05 mg/L et 0.31 mg/L pour des durées d'exposition de 24 et 48 heures, respectivement.** Ainsi, nous remarquons que ces valeurs sont inférieures à celles fixées par l'EFSA (2010) ( $CE_{50}$  48h comprise entre 11.54 et 15.5 mg/L pour la matière active seule), ce qui démontre l'extrême sensibilité des daphnies à cette formulation commerciale. Effectivement, de nombreuses études ont confirmé que l'addition d'adjuvants aux formulations de pesticides augmente significativement leurs potentiels toxiques (Puglis et Boone, 2011). De plus, l'étude menée par Wagner et *al.* (2015b) concluent que les têtards *Xenopus laevis* sont beaucoup plus sensibles vis-à-vis de la formulation commerciale « Focus Ultra », que de la matière active seule « cycloxydime », et la valeur de la  $CL_{50}$  du cycloxydime après 96h d'exposition (32.2 mg/L) est dix fois plus élevée que celle déterminée pour Focus Ultra (0.6 mg/L).

Chez la plupart des animaux, l'automatisme cardiaque est difficilement observable *in situ*. Par contre chez la daphnie, vu la transparence de sa carapace, les battements du cœur peuvent être très facilement observés. Cette caractéristique permet de visualiser et de mesurer plusieurs fonctions physiologiques, simultanément, par le biais de méthodes microscopiques (Rudiger et *al.*, 1997).

Afin de mettre en évidence la présence d'éventuelles perturbations au niveau de son fonctionnement, il nous a paru judicieux de mesurer la fréquence des battements du cœur de *Daphnia magna* en présence de Focus Ultra. **Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que l'exposition de *Daphnia magna* à des concentrations croissantes de Focus Ultra engendre une réduction dose dépendante de la fréquence cardiaque en fonction du temps.** Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Friberg-Jensen et *al.* (2010) et Bownik et Stepniewska (2015a) qui ont rapporté une inhibition de l'activité cardiaque chez *Daphnia magna* exposée à l'azoxystrobin et au peroxyde d'hydrogène, respectivement. La capacité du cœur à adapter sa production d'énergie à la demande est un facteur déterminant de sa propre fonction, qui repose sur un métabolisme équilibré des acides gras. En effet, les acides gras constituent la source énergétique principale du cœur. Par ailleurs, Seng et *al.* (2003) ont démontré, dans une étude menée sur des rats, que les herbicides appartenant à la famille des cyclohexanediones ont un effet inhibiteur sur l'Acétyl CoA carboxylase cardiaque, enzyme qui intervient dans la première étape de la biosynthèse des acides gras, provoquant ainsi une altération de la balance énergétique et donc une réduction de l'activité cardiaque. Un dysfonctionnement des enzymes vitales de la contraction du cœur, tel que  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, en réponse à un stress oxydatif pourrait également être à l'origine d'une inhibition de son activité (Fan et *al.*, 2012).

Les daphnies en tant que micro-filtreurs, font partie des groupes de consommateurs primaires les plus importants dans les milieux aquatiques (Gerritsen et Porter, 1982). En effet, le comportement trophique représente un élément clé pour la survie des daphnies. Toute altération de ce comportement sous l'effet de substances toxiques pourrait être à l'origine d'un déséquilibre de la chaîne trophique, et par conséquent de l'écosystème.

La fonction physiologique principale des mouvements continus des appendices thoraciques chez les daphnies est de créer un courant d'aspiration qui leur permet de filtrer l'eau afin de se nourrir de particules en suspension (algues, bactéries, matières organiques, ...). Les particules

alimentaires sont ensuite déplacées vers la bouche par la mandibule où elles sont consommées. La présence de pesticides même à des concentrations relativement faibles, peut provoquer une réduction de l'activité de filtration, pouvant réduire l'absorption de nourriture par *D. magna* (Friberg-Jensen et al., 2010). **Nos résultats confirment donc cette perturbation du comportement trophique en présence de Focus Ultra** et corroborent les travaux de Villarroel et al. (1999) qui ont testé l'effet de l'acaricide tetradifon sur *Daphnia magna*. Friberg-Jensen et al. (2010) suggèrent que l'apport en énergie diminue considérablement chez les daphnies exposées à la cyperméthrine, en raison de la réduction de la consommation alimentaire. En effet, une proportion d'énergie importante est allouée au processus de détoxification mis en place par l'organisme et à la réparation des dommages physiologiques occasionnés par la présence des pesticides, induisant ainsi une réduction de l'énergie disponible pour la croissance, la reproduction et l'acquisition des ressources alimentaires, ce qui pourrait potentiellement influencer les chances de survie (Barata et al., 2004 ; Reynaldi et al., 2006). Cette hypothèse a également été émise par Sancho et al. (2009) pour expliquer l'effet inhibiteur du tébuconazole (fongicide) sur le comportement trophique et les fonctions métaboliques (métabolisme énergétique) chez *Daphnia magna*, soulignant ainsi l'étroite corrélation entre ces deux paramètres et leur sensibilité vis-à-vis du stress environnemental. D'autre part, ces résultats peuvent être expliqués par une oxydation des protéines et des lipides membranaires des cellules nerveuses et musculaires induisant ainsi une diminution de l'activité neuromotrice, une altération des mouvements des appendices thoraciques et par conséquent une réduction du taux de filtration et de la consommation d'aliments (Aoi et al., 2004).

***Chapitre III:***  
***Etude biochimique et***  
***polarographique***

## 1. Introduction

L'exposition des organismes vivants à des cocktails de polluants dans l'environnement est susceptible d'engendrer une perturbation de leur métabolisme biochimique et énergétique. En effet, les mécanismes de défense vis-à-vis des facteurs de stress environnementaux sont considérés comme métaboliquement coûteux, impliquant une diminution de l'énergie disponible en faveur d'autres processus : le métabolisme basal, la croissance et la reproduction (Holloway et *al.*, 1990 ; Knops et *al.*, 2001), ce qui a pour conséquence une modification de l'allocation énergétique avec des altérations directes sur les fonctions vitales au niveau individuel et des effets potentiels au niveau populationnel (Calow, 1991). De plus, dans les conditions de stress, la perte de l'équilibre homéostatique cellulaire peut entraîner de nombreux dommages. Ainsi, les radicaux libres générés pouvant interagir avec les macromolécules cellulaires telles que les lipides et les protéines, provoquant leur dégradation.

L'estimation des changements biochimiques induits par la présence de Focus Ultra pourrait donc fournir des informations utiles sur ses conséquences cytotoxiques. C'est dans cet axe que s'inscrit la seconde partie de notre étude, qui vise à mettre en évidence d'éventuelles perturbations du métabolisme cellulaire chez *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* par le suivi de l'évolution des taux de protéines totales et lipides totaux, principaux constituants de l'architecture cellulaire (membrane plasmique) et éléments fondamentaux du métabolisme basal (réserves énergétiques). Dans le but de mieux étayer cette partie de notre recherche, nous nous sommes intéressés au contrôle des variations du métabolisme respiratoire qui joue un rôle clé dans la production d'énergie indispensable pour la cellule.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Méthodes de dosage des métabolites

Le dosage des métabolites, pour *Paramecium tetraurelia*, est réalisé au quatrième jour de la culture (fin de la phase exponentielle) afin d'éviter toute influence sur la croissance. Après traitement des paramécies pendant 3 heures, les cellules sont centrifugées à 1000 tours/ min (cette centrifugation douce a pour but de concentrer les cellules tout en les maintenant vivantes), puis les culots sont récupérés pour servir au dosage des protéines et des lipides.

Concernant *Daphnia magna*, le traitement par Focus Ultra est également effectué pour une période de 3 heures, dans du milieu ISO où une quinzaine d'individus adultes est exposée aux concentrations croissantes de l'herbicide. Après traitement, nous procédons au dosage des métabolites.

### 2.1.1. Dosage des protéines totales

Le taux de protéines totales est quantifié selon la méthode de Bradford (1976), et la lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 595 nm. Les teneurs en protéines sont déterminées en référence à une gamme étalon réalisée à partir d'une solution mère de BSA (1 mg/ml).

### 2.1.2. Dosage des lipides totaux

La teneur en lipides totaux est estimée selon la méthode de Goldsworthy et *al.* (1972), par comparaison à une gamme étalon effectuée à partir d'une solution mère de lipides à 25 mg/ml. Les absorbances sont lues à une longueur d'onde de 530 nm.

## 2.2. Mesure de l'activité respiratoire

La consommation d'oxygène est mesurée selon la méthode de Djebbar et Djebbar (2000), mise au point au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, en utilisant un oxygraphe à électrode (Hansatech Instrument). L'activité respiratoire est mesurée par simple adjonction des paramécies ou des daphnies avec leur milieu de culture à un volume total de 1,5 ml. Les signaux enregistrés par l'électrode sont recueillis à l'aide d'un ordinateur équipé d'une carte d'acquisition et traités grâce au logiciel Oxygraph (Hansatech Instrument). La quantité d'oxygène consommée est exprimée en nmol d'O<sub>2</sub>/ ml.

### 3. Résultats

#### 3.1. Effet de Focus Ultra sur le métabolisme biochimique

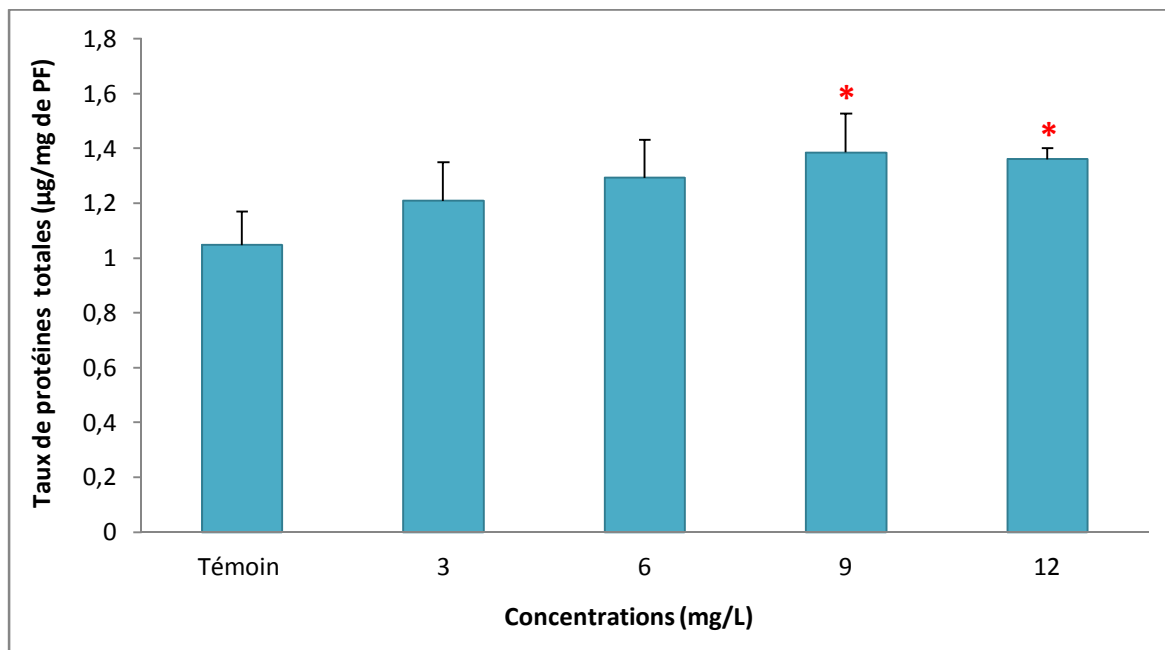
##### 3.1.1. Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'évolution du taux de protéines totales

➤ Chez *Paramecium tetraurelia*

La figure (25) illustre l'évolution du taux de protéines totales en fonction des concentrations croissantes de Focus Ultra.

Nos résultats montrent qu'en présence de l'herbicide, le taux de protéines totales tend à augmenter de manière dose dépendante et significative ( $p = 0.050$ ) pour les deux plus fortes concentrations (9 et 12 mg/L), par rapport aux témoins. En effet, ce taux passe d'une moyenne de 1.04  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de PF chez les cellules témoins, à 1.38 et 1.36  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de PF chez celles traitées par les concentrations 9 et 12 mg/L, respectivement.

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle des différences significatives entre les effets des différentes croissantes de Focus Ultra ( $p = 0.041$ ).



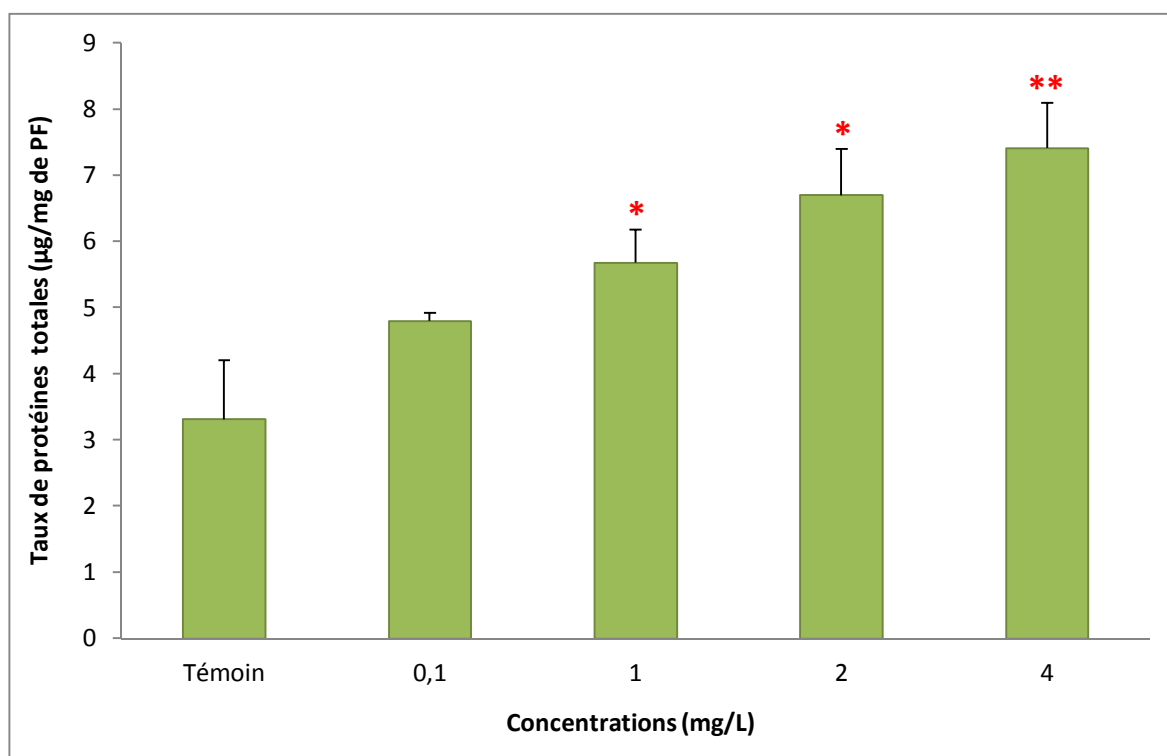
**Figure 25 :** Effet de Focus Ultra sur le taux de protéines totales chez *Paramecium tetraurelia*

➤ Chez *Daphnia magna*

Les variations du taux de protéines totales chez les daphnies témoins et traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra sont représentées dans la figure (26).

Nous constatons une augmentation dose dépendante du taux de protéines totales chez les daphnies traitées par rapport aux témoins. Cette augmentation est significative pour les concentrations 1 et 2 mg/L ( $p < 0.05$ ), et hautement significative pour la plus forte concentration de 4 mg/L ( $p = 0.008$ ). Ainsi, le taux de protéines totales passe de 3.31  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de PF chez les daphnies témoins à 5.68, 6.7 et 7.41  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de PF chez celles traitées, respectivement, par les concentrations 1, 2 et 4 mg/L.

La comparaison entre les effets des différentes concentrations par l'analyse de la variance (ANOVA), indique des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ).



**Figure 26 :** Effet de Focus Ultra sur le taux de protéines totales chez *Daphnia magna*

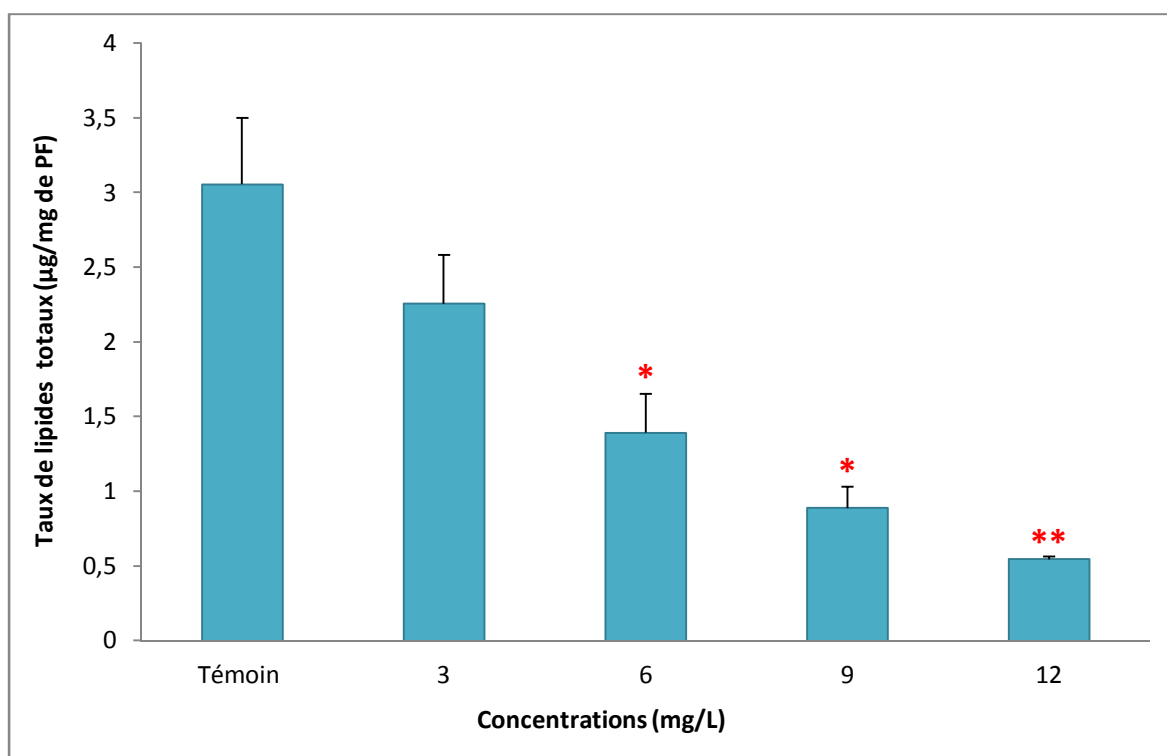
### 3.1.2. Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'évolution de la teneur en lipides totaux

#### ➤ Chez *Paramecium tetraurelia*

La figure (27) met en évidence les variations de la teneur en lipides totaux chez les paramécies témoins et traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra.

Nous observons que le taux de lipides totaux tend à diminuer de manière significative ( $p < 0.05$ ) pour les paramécies exposées aux concentrations (6 et 9 mg/L), et hautement significative ( $p = 0.010$ ) pour celles exposées à la plus forte concentration de Focus Ultra (12 mg/L), par rapport aux témoins. Cette déplétion est respectivement d'environ 54, 71 et 82% pour les cellules traitées par les concentrations 6, 9 et 12 mg/L.

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle un effet très hautement significatif du traitement par Focus Ultra ( $p = 0.000$ ).



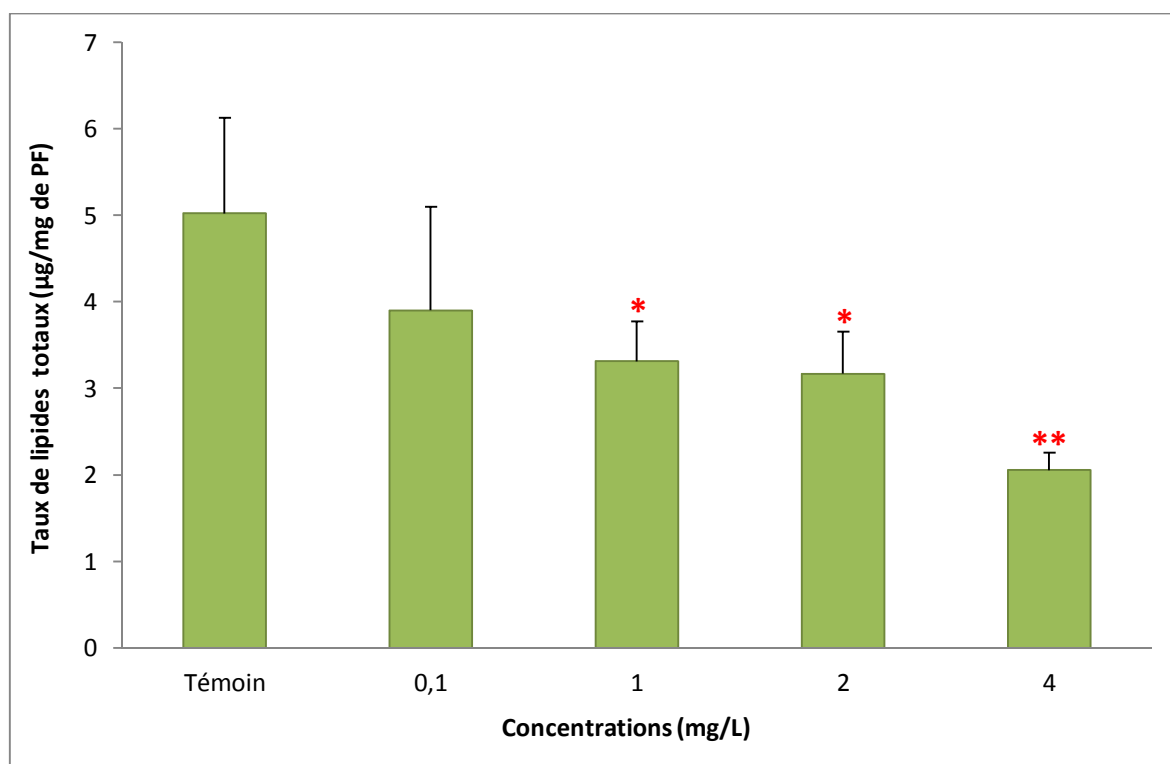
**Figure 27 :** Effet de Focus Ultra sur la teneur en lipides totaux chez *Paramecium tetraurelia*

➤ Chez *Daphnia magna*

La figure (28) représente l'effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la variation de la teneur en lipides totaux.

Nos résultats révèlent que chez les daphnies traitées, la teneur en lipides totaux tend à diminuer de manière dose dépendante et significative ( $p < 0.05$ ) pour les concentrations 1 et 2 mg/L, et hautement significative ( $p = 0.01$ ) pour la plus forte concentration (4 mg/L), par rapport aux témoins. En effet, cette diminution est estimée à 34 et 37% chez les daphnies traitées par les concentrations 1 et 2 mg/L et atteint environ 59% pour la concentration la plus élevée (4 mg/L) de Focus Ultra.

L'analyse de la variance (ANOVA) montre des différences hautement significatives entre les effets des différentes concentrations ( $p = 0.002$ ).



**Figure 28 :** Effet de Focus Ultra sur la teneur en lipides totaux chez *Daphnia magna*

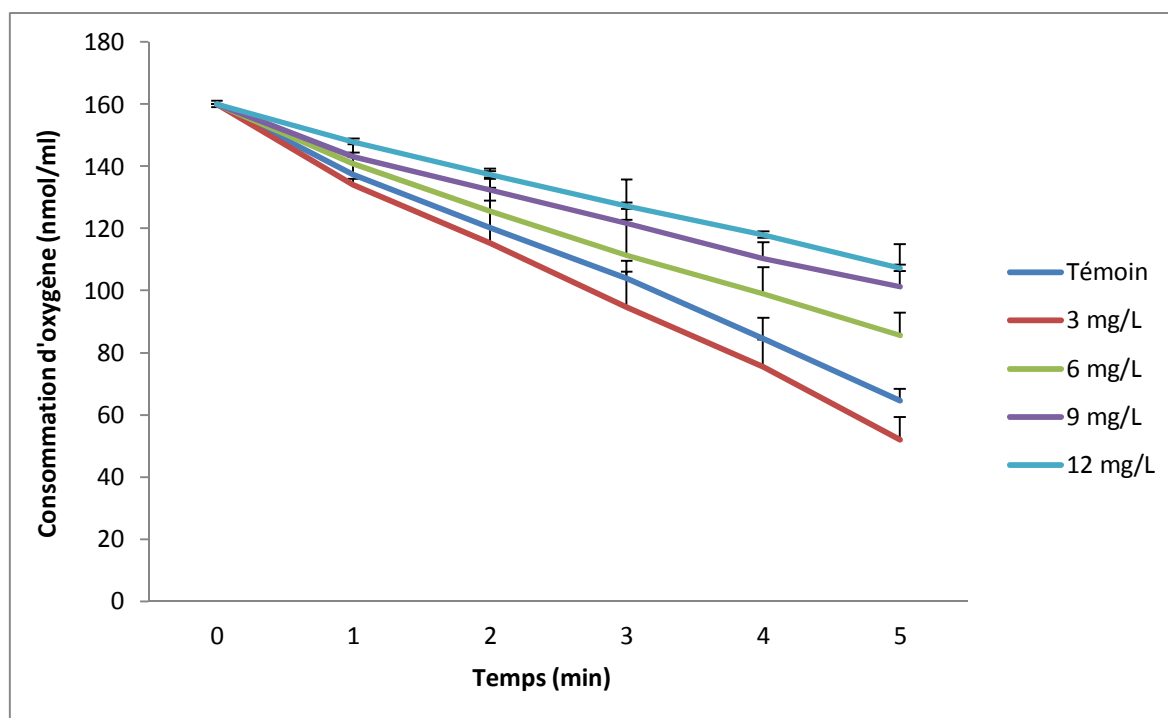
### 3.2. Effet de Focus Ultra sur le métabolisme respiratoire

#### ➤ Chez *Paramecium tetraurelia*

La figure (29) illustre l'effet des différentes concentrations de Focus Ultra sur le métabolisme respiratoire des paramécies.

Nous constatons que les cellules témoins présentent une respiration tout à fait normale avec une consommation d'O<sub>2</sub> constante et régulière. Chez les paramécies traitées par la concentration 3 mg/L, nos résultats mettent en évidence une induction de l'activité respiratoire. En revanche, nous notons une diminution dose dépendante de la consommation d'O<sub>2</sub> chez les cellules traitées par les concentrations 6, 9 et 12 mg/L, par rapport aux témoins, où nous enregistrons des différences d'environ 32.5, 56.6 et 66% (t = 5 min), respectivement.

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle un effet très hautement significatif du traitement par Focus Ultra (p = 0.000).



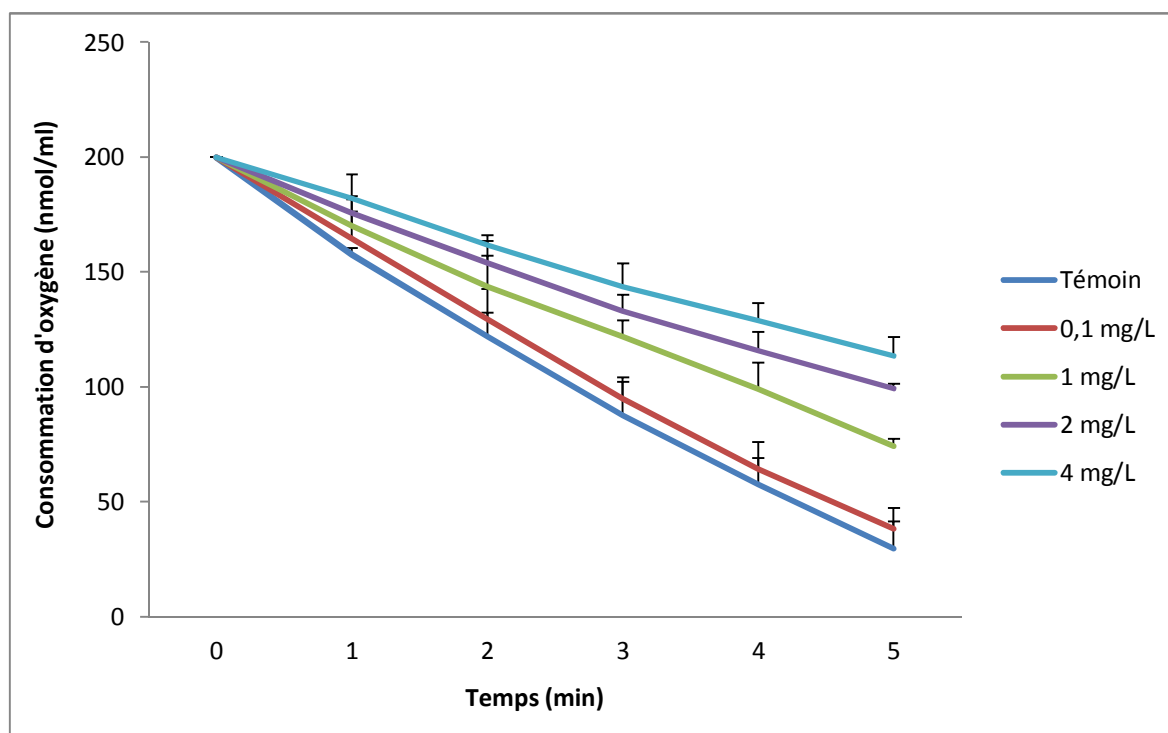
**Figure 29 :** Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur le métabolisme respiratoire de *Paramecium tetraurelia*

➤ Chez *Daphnia magna*

Les résultats présentés dans la figure (30) mettent en évidence l'évolution de la consommation d'oxygène chez les daphnies en présence des concentrations croissantes de Focus Ultra.

Nous constatons que les daphnies témoins consomment l'oxygène d'une manière régulière et continue. Chez les individus traités par contre, nous notons une inhibition dose dépendante du métabolisme respiratoire. En effet, la consommation d'oxygène passe de 200 nmol/ml ( $t=0$ ) à seulement 99 et 113 nmol/ml ( $t=5$  min) pour les daphnies exposées aux deux plus fortes concentrations de Focus Ultra (2 et 4 mg/L), respectivement.

La comparaison entre les effets des différentes concentrations par l'analyse de la variance (ANOVA), indique des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ).



**Figure 30 :** Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur le métabolisme respiratoire de *Daphnia magna*

#### 4. Discussion

Afin d'assurer le maintien des fonctions biochimiques impliquées dans les mécanismes de défense, un organisme dépense de l'énergie. Ainsi, la mesure des réserves énergétiques, présentes sous forme de glycogène, de lipides ou bien encore de protéines, ont une grande importance en tant que biomarqueurs d'une exposition aux toxiques, pouvant rendre compte d'une perturbation des performances individuelles (Choi et *al.*, 2001 ; Baird et *al.*, 2007).

Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des variations du statut énergétique que peut induire une exposition au Focus Ultra, en étudiant l'état des réserves énergétiques (protéines et lipides) et du métabolisme respiratoire chez *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna*.

Il est communément admis que l'exposition intense et prolongée aux pesticides est une source principale de la surproduction de ROS et d'entités radicalaires, qui sont impliquées dans l'induction du stress oxydant et susceptibles de causer des dommages aux constituants cellulaires (Radic et *al.*, 2009). Ces radicaux libres ont pour cible principale les macromolécules biologiques, parmi lesquelles les protéines et les lipides, qui jouent un rôle prépondérant dans le métabolisme énergétique (Choi et *al.*, 2001 ; Abdel-Daim et *al.*, 2015).

En plus de leur intégration dans la cellule en tant qu'éléments structuraux, les protéines sont impliquées dans diverses réactions assurant la catalyse biochimique et la régulation hormonale entre autres (Jacob et Monod, 1961). En revanche, la structure des protéines ainsi que leur fonction peuvent être altérées par les ROS produites soit par le métabolisme cellulaire ou encore par des oxydants exogènes (Djekoun, 2012). **Dans notre travail, nous avons constaté que l'addition de Focus Ultra au milieu engendre chez *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* une augmentation dose dépendante et significative de la teneur en protéines totale.** Ce résultat est en accord avec les observations de Bouaricha et *al.* (2012) et Sbartai (2013) qui ont démontré l'effet stimulateur de l'Emamectine Benzoate et du Bifénazate sur la synthèse des protéines chez le protiste cilié *Paramecium sp.* Des effets similaires ont été enregistrés même avec des molécules utilisées en thérapie humaine telles que la Nifédipine et ce chez le modèle cellulaire *Saccharomyces cerevisiae* (Cherait, 2015). De même, Soetaert et *al.* (2006) ont rapporté une induction des protéines de choc thermique (heatshock protein : HSP 90) comme un mécanisme de défense et de protection contre le stress induit par le fongicide Propiconazole chez *Daphnia magna*. Cette induction du pool

protéique pourrait être corrélée au déclenchement du processus de métabolisation et de détoxification à travers l'induction des enzymes et des molécules antioxydantes de nature protéique, ainsi que la biosynthèse des protéines spécifiques impliquées dans la défense cellulaire contre le stress (Smolders et *al.*, 2003 ; Nzengue, 2008 ; Ojha et *al.*, 2011).

Les lipides constituent l'une des plus importantes molécules énergétiques pour la cellule. Outre leur rôle structural, ils interviennent également dans la signalisation intracellulaire et la modulation de l'expression de nombreux gènes. **D'après nos résultats, Focus Ultra provoque une réduction dose dépendante du taux de lipides totaux chez les deux modèles biologiques étudiés**, confirmant ainsi son mécanisme d'action primaire sur la synthèse des lipides via l'inhibition de l'acétyl CoA carboxylase (ACCase), l'enzyme catalysant la carboxylation de l'acétyl CoA en malonyl CoA, qui est l'une des premières étapes de la biosynthèse des acides gras (Price et *al.*, 2003; Baghestani et *al.*, 2008). Nos résultats abondent dans le même sens que ceux rapportés par Soetaert et *al.* (2007), Villarroel et *al.* (2009) ou encore Villarroel et *al.* (2013) qui ont mis en évidence une nette réduction des réserves énergétiques (lipides, protéines et glycogène) chez *Daphnia magna* après exposition au cadmium, propanil et tetradifon, respectivement. Selon Amamra (2015), la réduction de la teneur lipidique engendrée par l'exposition des paramécies aux pyréthrinoides (cyperméthrine et deltaméthrine) pourrait être liée d'une part à leur catabolisme pour produire l'énergie nécessaire au métabolisme basal, et d'autre part à l'interférence des deux insecticides avec les voies de la biosynthèse des lipides en provoquant la perturbation de leur fonctionnement. De Coen et Janssen (2003), quant à eux, expliquent la diminution des réserves lipidiques par la mobilisation de ces dernières par l'organisme afin de maintenir son homéostasie durant les conditions de stress. L'étude d'Arambourou (2013) suggère que la réduction des lipides chez *Chironomus riparius* (insecte diptère), consécutive à l'introduction de plomb, pourrait être liée à l'utilisation massive d'énergie pour les processus de détoxification, en effet, l'augmentation du contenu en métallothionéines (MT) résulte d'une activité de synthèse protéique accrue qui exige de l'énergie.

Afin de mieux appréhender les perturbations métaboliques observées précédemment ainsi que les mécanismes biochimiques mis en jeu lors du stress induit au niveau cellulaire par l'exposition au Focus Ultra, il nous a semblé complémentaire et nécessaire d'estimer le métabolisme respiratoire de *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* via la mesure de la quantité d'oxygène dissous dans le milieu.

Chez les organismes aérobies, en conditions physiologiques, la consommation intracellulaire (au niveau de la mitochondrie) de l'oxygène, processus essentiel pour de nombreuses fonctions vitales, génère en permanence la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou « Reactive Oxygen Species » (ROS) qui sont potentiellement toxiques pour l'intégrité mitochondriale et cellulaire. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté qu'une des conséquences majeures du stress environnemental est l'altération des fonctions respiratoires par la perturbation de l'activité mitochondriale (Stolze et Nohl, 1994 ; Espina *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2004 ; Abele *et al.*, 2007). **Nos résultats montrent que l'exposition de *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* aux concentrations croissantes de Focus Ultra est à l'origine d'une inhibition progressive de la consommation d'oxygène. Nous constatons, en revanche, une induction de l'activité respiratoire chez les paramécies exposées à la concentration 3 mg/L.** Nous pouvons supposer, comme l'ont suggéré Benbouzid *et al.* (2012b) et Amamra *et al.* (2015b) chez les paramécies, que cette perturbation du métabolisme respiratoire pourrait être essentiellement due au déclenchement du processus de métabolisation des xénobiotiques, pris en charge par une batterie d'enzymes particulièrement ceux de la phase I dont les Monooxygénases à CYP450, en leur incorporant un atome d'oxygène en vue de leur détoxification/élimination. De plus, compte tenu de l'effet inhibiteur de Focus Ultra, sur la biosynthèse des acides gras, mis en évidence précédemment, nous avons émis l'hypothèse qu'un déficit en substrats lipidiques, considérés comme étant les principales sources énergétiques utilisées par la mitochondrie dans le processus de la  $\beta$ -oxydation, pourrait être impliqué dans la perturbation de l'activité mitochondriale et par conséquent, la chute de la synthèse d'ATP. Selon Malhi *et al.* (2006) et Labbe *et al.* (2008), certaines molécules toxiques peuvent entraîner l'ouverture des pores mitochondriaux tout en provoquant une augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriales qui va être associée à une profonde perturbation de la phosphorylation oxydative ayant pour conséquence une réduction de la synthèse d'ATP, ainsi, les membranes mitochondriales peuvent perdre leur intégrité physique et fonctionnelle, ce qui est susceptible d'induire la mort cellulaire. Nos résultats sont en accord avec ceux de Martins *et al.* (2007a) et Zeman (2008) qui ont mis en évidence une altération de la consommation d'oxygène chez *Daphnia magna* exposée à différents contaminants aquatiques. Ces auteurs s'accordent sur le fait que cette perturbation de l'activité respiratoire pourrait être considérée comme une stratégie de survie reflétant une adaptation des daphnies au stress afin d'assurer le maintien de leur intégrité et homéostasie mitochondriales.

***Chapitre IV:  
Embryotoxicité,  
malformations cellulaires  
et macronucléaires***

## 1. Introduction

Au cours de leur cycle de vie, les organismes aquatiques subissent de profonds changements développementaux, fonctionnels et morphologiques. La présence dans l'environnement de certaines molécules chimiques, peut affecter considérablement ce développement. En effet, la mise en évidence des effets toxiques de ces molécules est beaucoup plus complexe en raison de la multiplicité de leurs modes d'action liée à diverses voies d'exposition, mais il est pourtant vraisemblable qu'elles contribuent fréquemment à l'apparition d'anomalies développementales et morphologiques qui peuvent avoir des répercussions directes et très importantes sur la croissance, la survie et le comportement des organismes exposés (Agostini et *al.*, 2010 ; Dawar et *al.*, 2016). Ainsi, la caractérisation des atteintes développementales et morphologiques est apparue comme une bonne approche complémentaire pour évaluer les effets des contaminants sur ces organismes.

L'objectif de cette partie est d'étudier et de caractériser les anomalies morphologiques cellulaires et macronucléaires ainsi que les atteintes membranaires observées chez *Paramecium tetraurelia* lors d'une exposition au Focus Ultra. D'autre part, nous nous sommes intéressés à l'appréciation des effets embryotoxiques de l'herbicide en caractérisant les diverses malformations développementales touchant les néonates de *Daphnia magna*.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Cas de *Paramecium tetraurelia*

#### 2.1.1. Détermination du taux de malformations cellulaires

Le taux de malformations cellulaires engendrées par l'exposition aux concentrations croissantes de Focus Ultra est estimé par le dénombrement sous microscope de cellules présentant des anomalies structurelles et/ou membranaires. Le calcul du taux de malformations est effectué selon l'équation suivante :

$$TMc (\%) = \frac{Nm}{Nt} * 100$$

Où :

- **TMc** : Taux de malformations cellulaires ;
- **N<sub>m</sub>** : Nombre de cellules malformées ;
- **N<sub>t</sub>** : Nombre total de cellules dans l'échantillon.

Les différents types de malformations sont observés et pris en photos durant les cinq jours de traitement, à l'aide d'une caméra (Leica EC3) intégrée au microscope optique (Leica DM 1000).

### **2.1.2. Détermination du taux de malformations macronucléaires**

Pour la caractérisation des malformations macronucléaires nous avons adapté la méthode de Bird et Good (2000), qui consiste à colorer les noyaux cellulaires des paramécies au bleu de méthylène à 1%. Après coloration, le nombre de cellules traitées présentant des anomalies macronucléaires est compté sous microscope pour chaque concentration. Le taux de malformations est calculé selon l'équation suivante :

$$TMn (\%) = \frac{Nm}{Nt} * 100$$

Où :

- **TMn** : Taux de malformations macronucléaires ;
- **N<sub>m</sub>** : Nombre de cellules ayant des noyaux malformés ;
- **N<sub>t</sub>** : Nombre total de cellules dans l'échantillon.

L'observation et la prise de photos des différentes formes d'anomalies macronucléaires ont été réalisées pendant cinq jours, sous microscope optique (Leica DM 1000) équipé d'une caméra de type (Leica EC3).

## **2.2. Cas de *Daphnia magna***

### **2.2.1. Test d'embryotoxicité**

Le test d'embryotoxicité est effectué selon la méthode décrite par Massarin (2010), en exposant des œufs de daphnies durant leur développement embryonnaire dans la poche incubatrice des mères adultes aux concentrations croissantes (0.1, 1, 2 et 4 mg/L) de Focus Ultra. Des femelles parthénogénétiques gravides sont placées individuellement, pendant 3 jours, dans des béciers en verre contenant 50 ml du milieu de culture et la concentration désirée de l'herbicide. Trois répétitions sont réalisées pour chaque concentration en plus du témoin. Après libération des jeunes daphnies (néonates) dans le milieu, celles-ci sont soumises à un examen microscopique pour l'identification, la caractérisation et le

dénombrement des anomalies développementales et morphologiques (Figure 31). Les photos des néonates présentant des déformations sont enregistrées grâce à un système constitué d'une caméra (Leica EC3) reliée au microscope optique (Leica DM 1000) connecté à un ordinateur.

### 2.2.2. Calcul du taux de malformations néonatales

Le taux d'anomalies développementales des néonates est calculé par l'équation suivante :

$$TA(\%) = \frac{Nm}{Nt} * 100$$

Où :

- $TA$  : Taux d'anomalies développementales ;
- $N_m$  : Nombre de néonates malformées ;
- $N_t$  : Nombre total de néonates produit par mère.

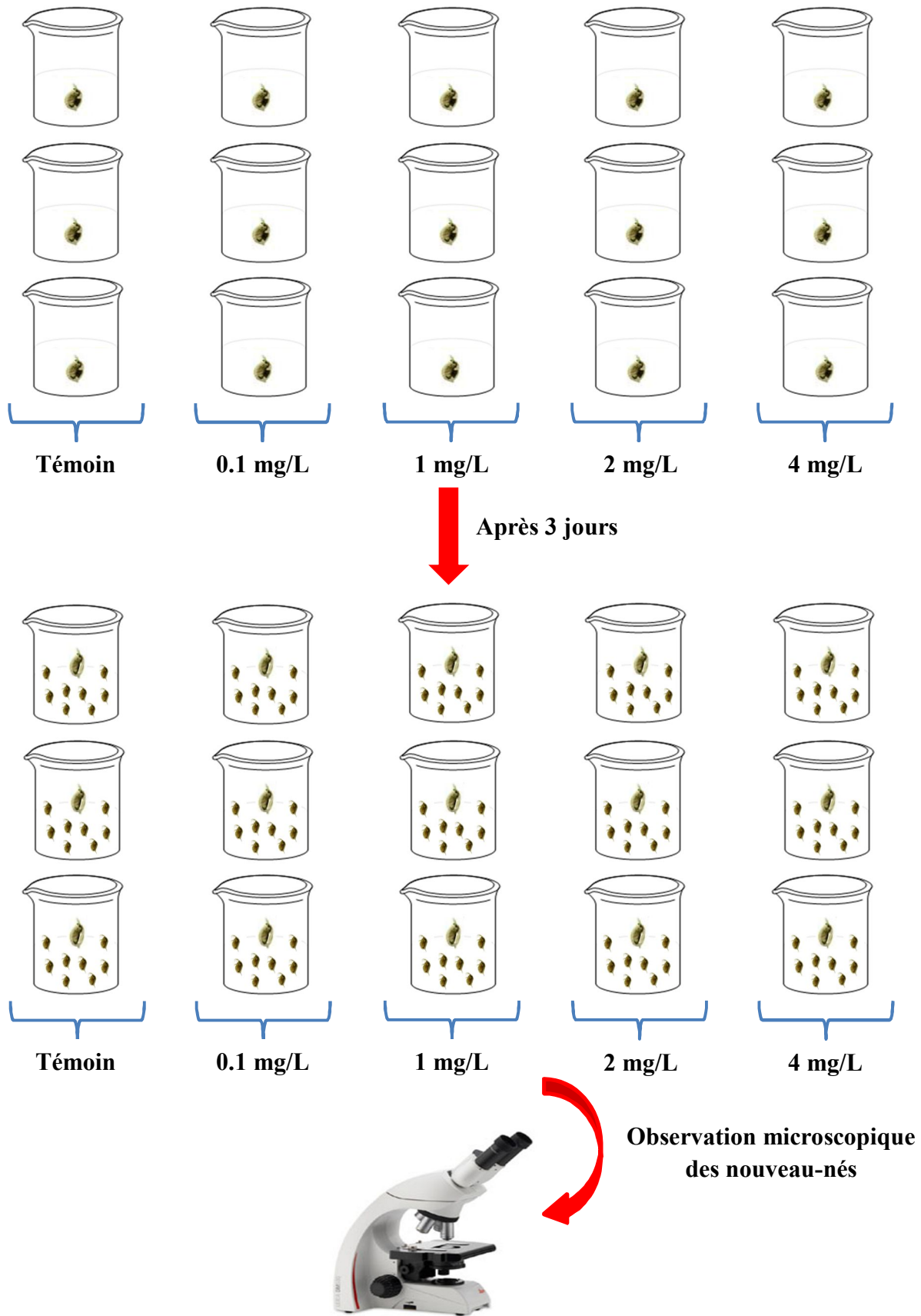


Figure 31 : Protocole expérimental du test d'embryotoxicité selon Massarin (2010)

3. Résultats

3.1. Cas de *Paramecium tetraurelia*

3.1.1. Taux de malformations cellulaires induites par l'exposition au Focus Ultra

La Figure (32) illustre l'évolution du taux de malformations cellulaires chez les paramécies traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra.

Nous constatons que le taux de malformations tend à augmenter de manière dose dépendante et proportionnelle aux concentrations croissantes de l'herbicide. Ainsi, nous remarquons qu'il est dans l'intervalle de 0.8 à 8.1% chez les cellules exposées aux concentrations 6 et 9 mg/L et atteint son maximum à savoir 30% pour la plus forte concentration (12 mg/L). En revanche, aucune anomalie morphologique n'a été notée chez les paramécies témoins et celles traitées par la plus faible concentration de Focus Ultra (3 mg/L).

L'analyse de la variance (ANOVA) indique des différences très hautement significatives entre les effets des différentes concentrations ( $p = 0.000$ ).

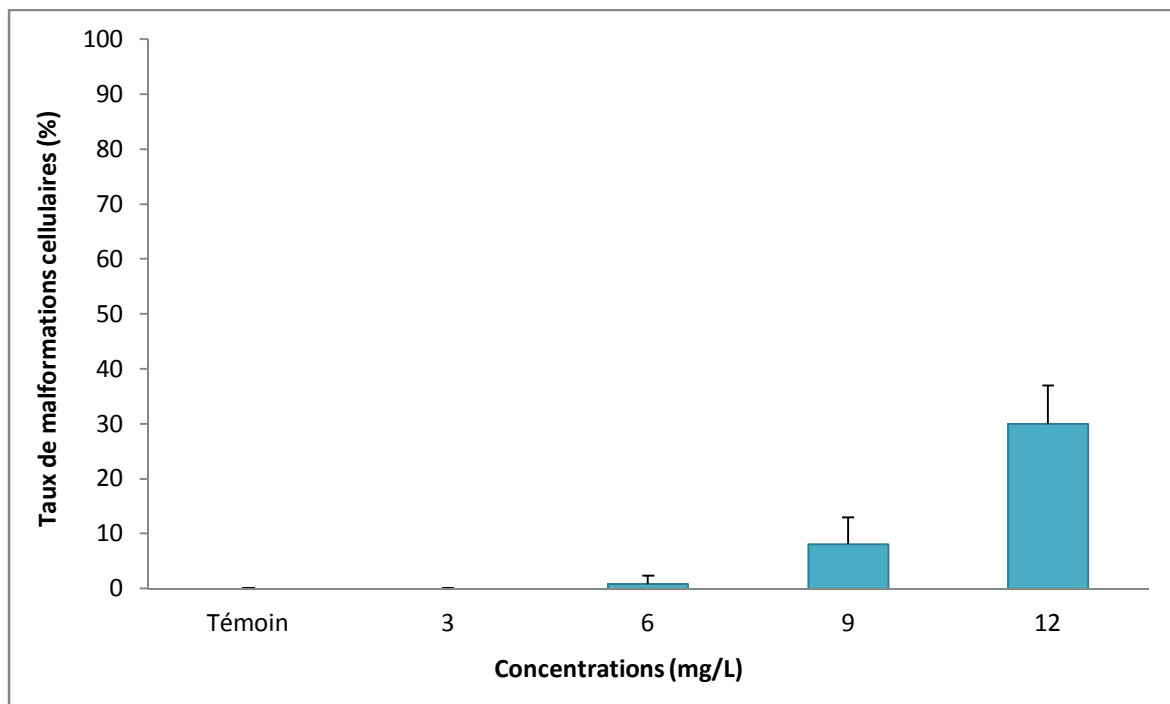
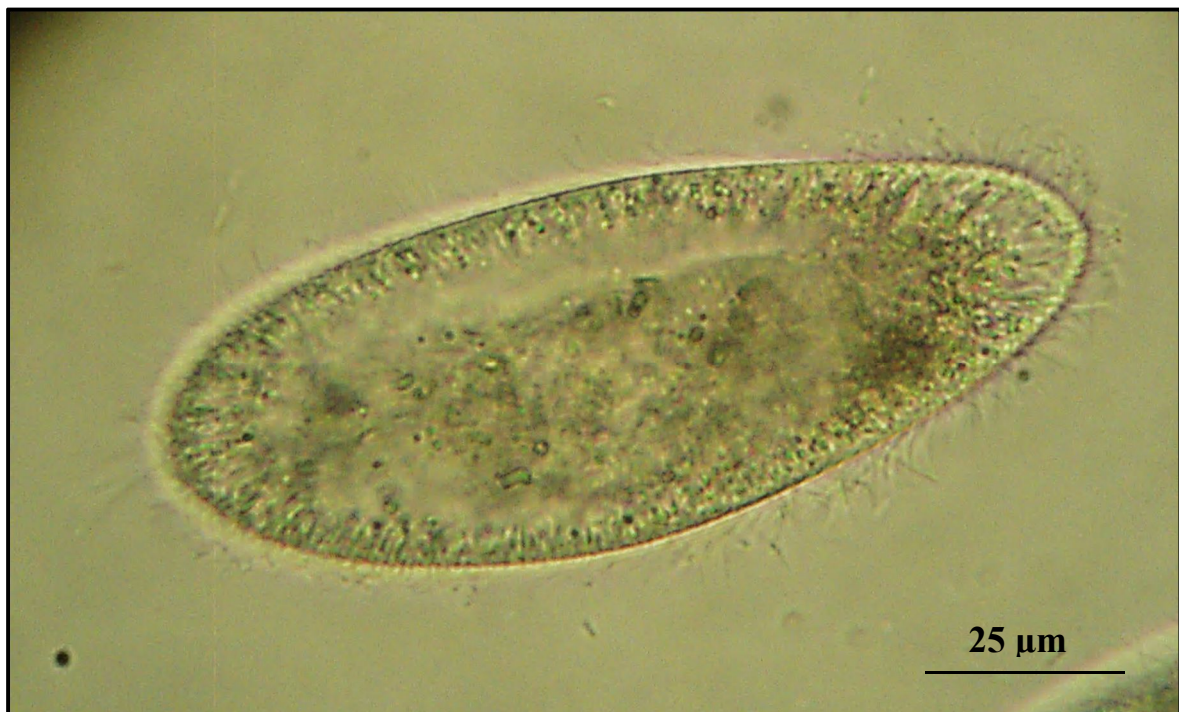


Figure 32 : Taux de malformations cellulaires enregistré chez *Paramecium tetraurelia* après exposition aux concentrations croissantes de Focus Ultra

### 3.1.2. Anomalies structurelles et atteintes membranaires

Les figures (34 A), (34 B) démontrent les diverses malformations structurelles induites par l'exposition de *Paramecium tetraurelia* aux concentrations 6, 9 et 12 mg/L de Focus Ultra.

Comparativement aux cellules témoins qui présentent une morphologie symétrique bien organisée (Figure 33), l'observation microscopique des paramécies traitées par Focus Ultra a révélé l'apparition d'un nombre important de malformations structurelles (Figures 34 A et 34 B), qui s'intensifie avec l'augmentation des concentrations de l'herbicide et du temps d'exposition. Les anomalies morphologiques les plus fréquemment observées sont caractérisées par des gonflements cellulaires avec des formes plus ou moins sphéroïdes (Figure 34 A.a) et des augmentations du volume des paramécies traitées (Figures 34 A.c et 34 B.d) ou au contraire un rétrécissement de la taille de celles-ci (Figures 34 A.f, 34 B.a et B.f). Dans certains cas, nous observons des allongements cellulaires avec des extrémités plus pointues (Figures 34 A.b, 34 B.b et B.c), ainsi que des asymétries morphologiques et des déformations membranaires (Figures 34 B.a et B.e).



**Figure 33 :** Observation microscopique d'une cellule de *Paramecium tetraurelia* témoin avec une morphologie normale

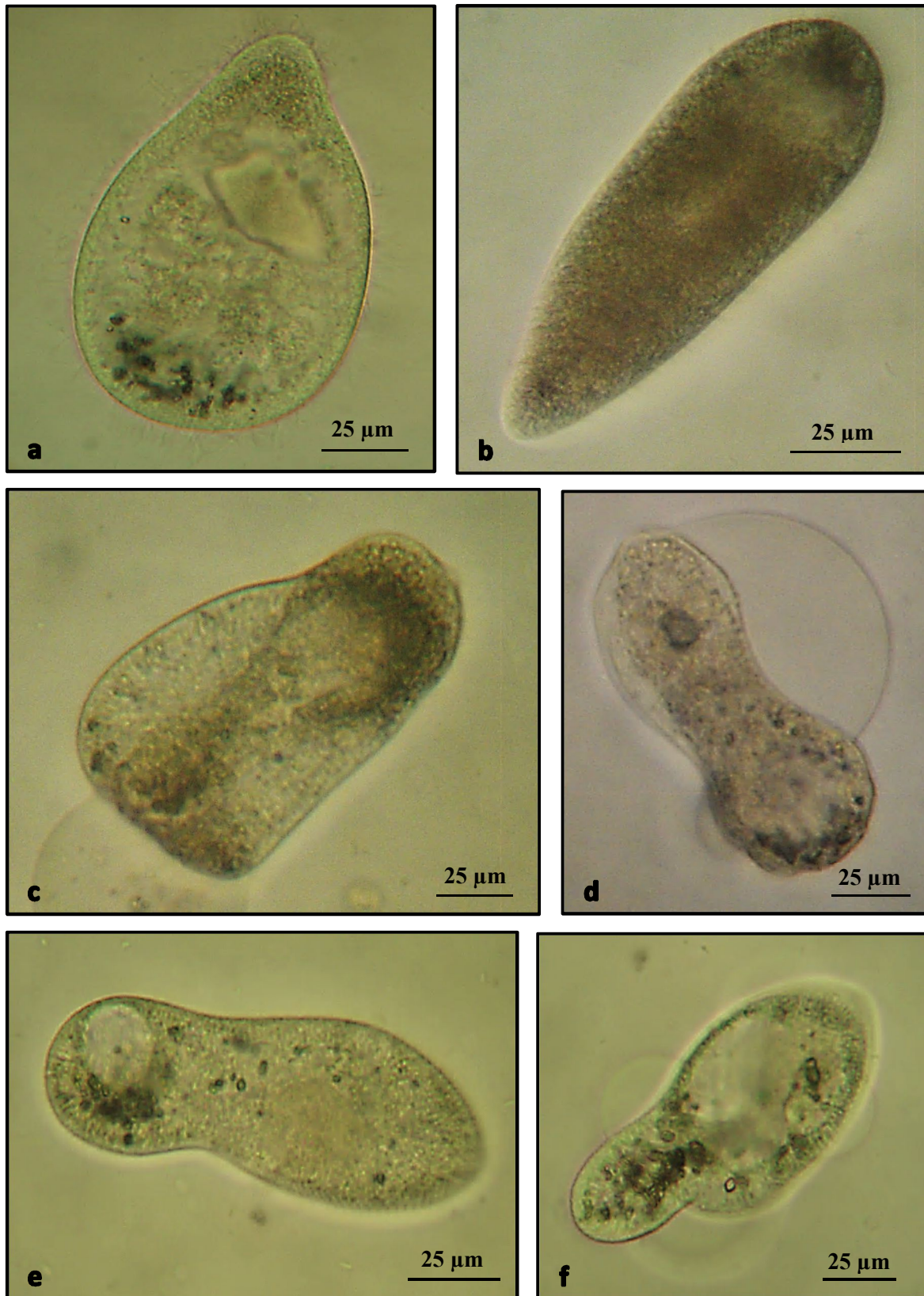


Figure 34 A : Anomalies morphologiques observées chez *Paramecium tetraurelia* après exposition au Focus Ultra

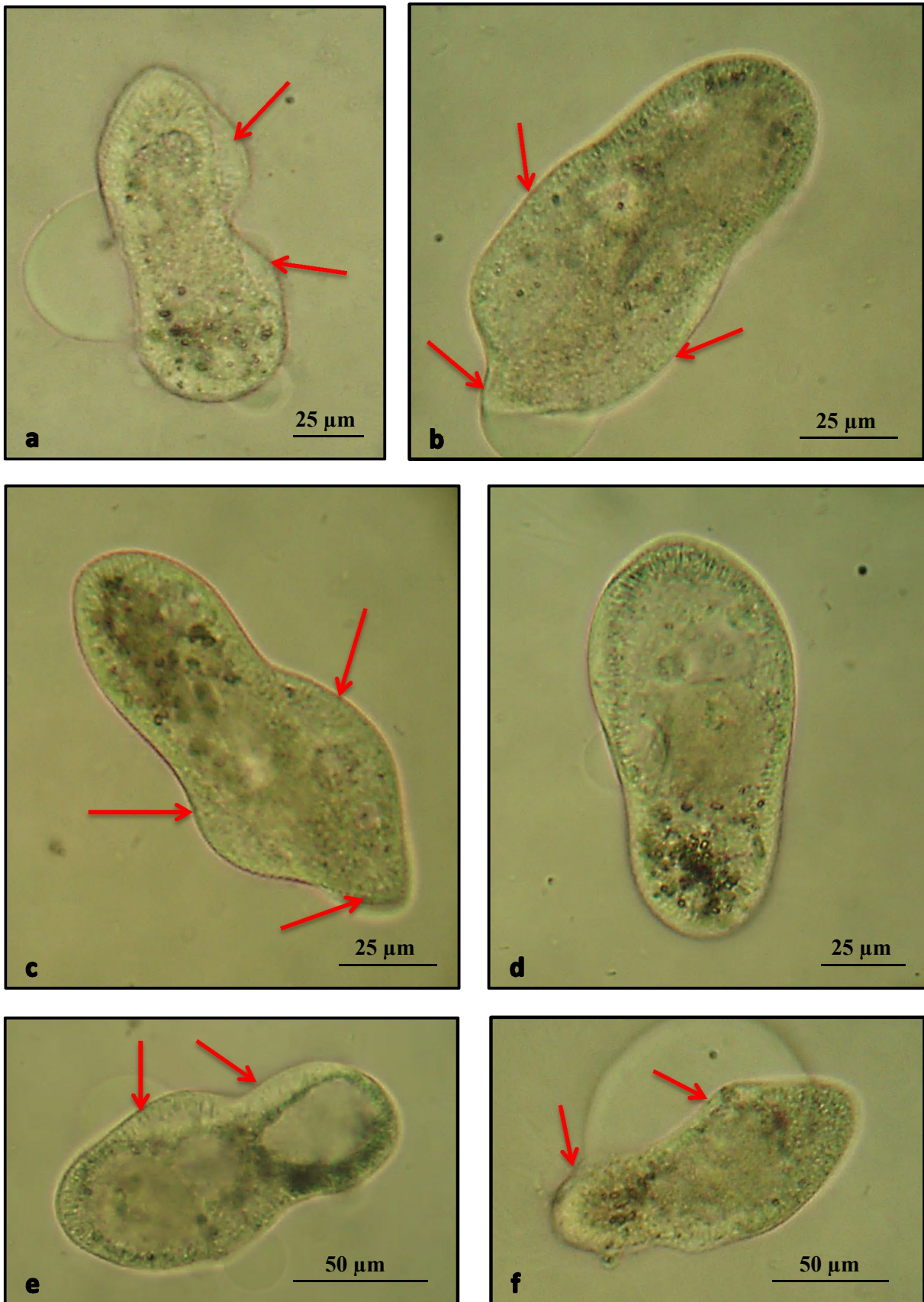


Figure 34 B : Anomalies morphologiques observées chez *Paramecium tetraurelia* après exposition au Focus Ultra

D'après la figure (35), nous constatons un noircissement et une condensation du cytoplasme suite à la rupture des vacuoles et du noyau et la diffusion de leurs contenus dans le milieu intracellulaire.

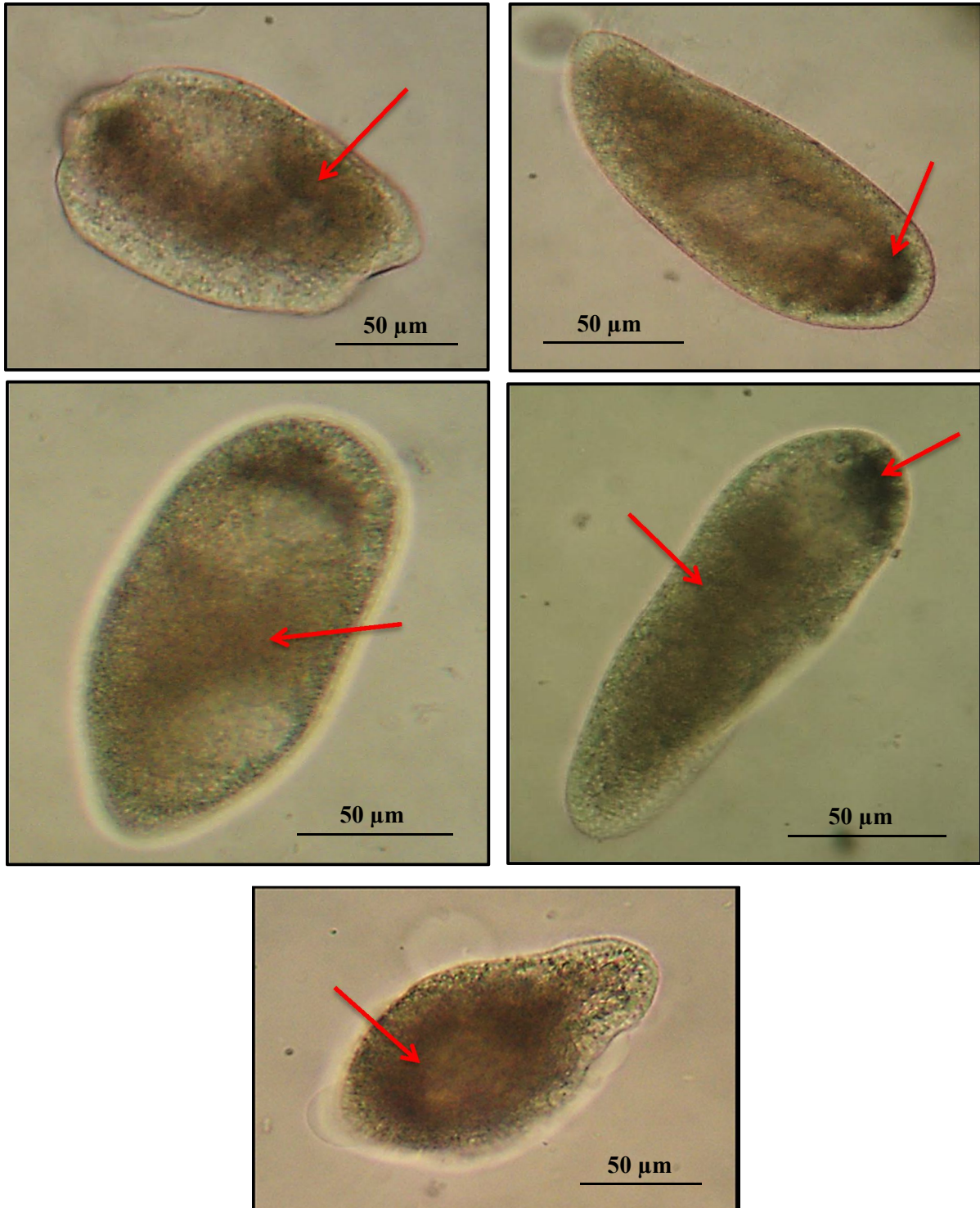
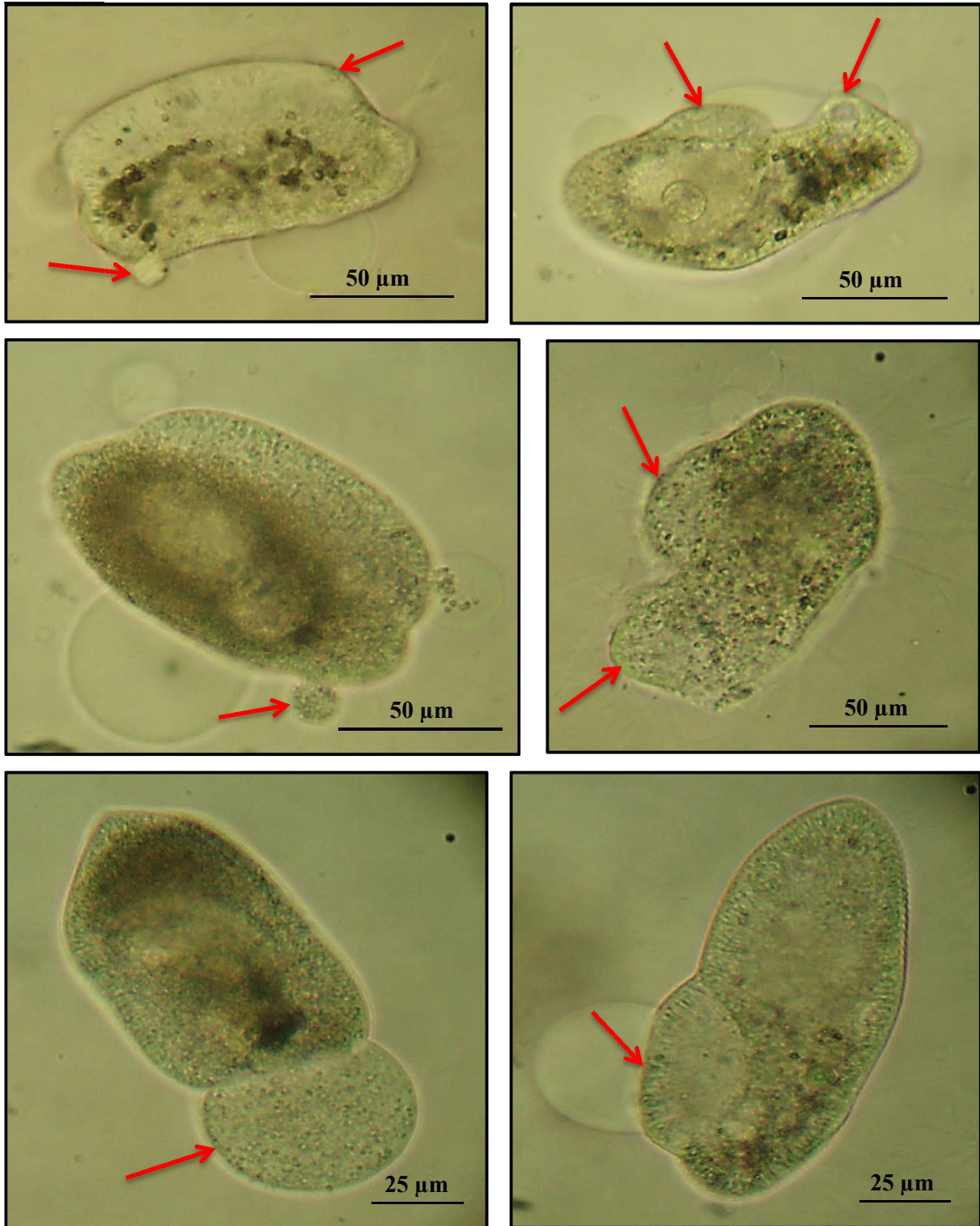


Figure 35 : Noircissement et condensation du cytoplasme

Comme le montre la figure (36), les atteintes causées par l'exposition au Focus Ultra se manifestent, au niveau membranaire, par la formation de petites vésicules et de bourgeonnements apparaissant autour de la membrane cellulaire.



**Figure 36 :** Formation de vésicules et des bourgeonnements au niveau de la membranaire cellulaire

La figure (37) met en évidence l'apparition de perforations et de ruptures membranaires suivies de la libération du contenu cellulaire dans le milieu environnant.



Figure 37 : Ruptures au niveau membranaire et libération du contenu cellulaire

La figure (38) révèle une désintégration complète de la membrane plasmique conduisant à la lyse cellulaire.

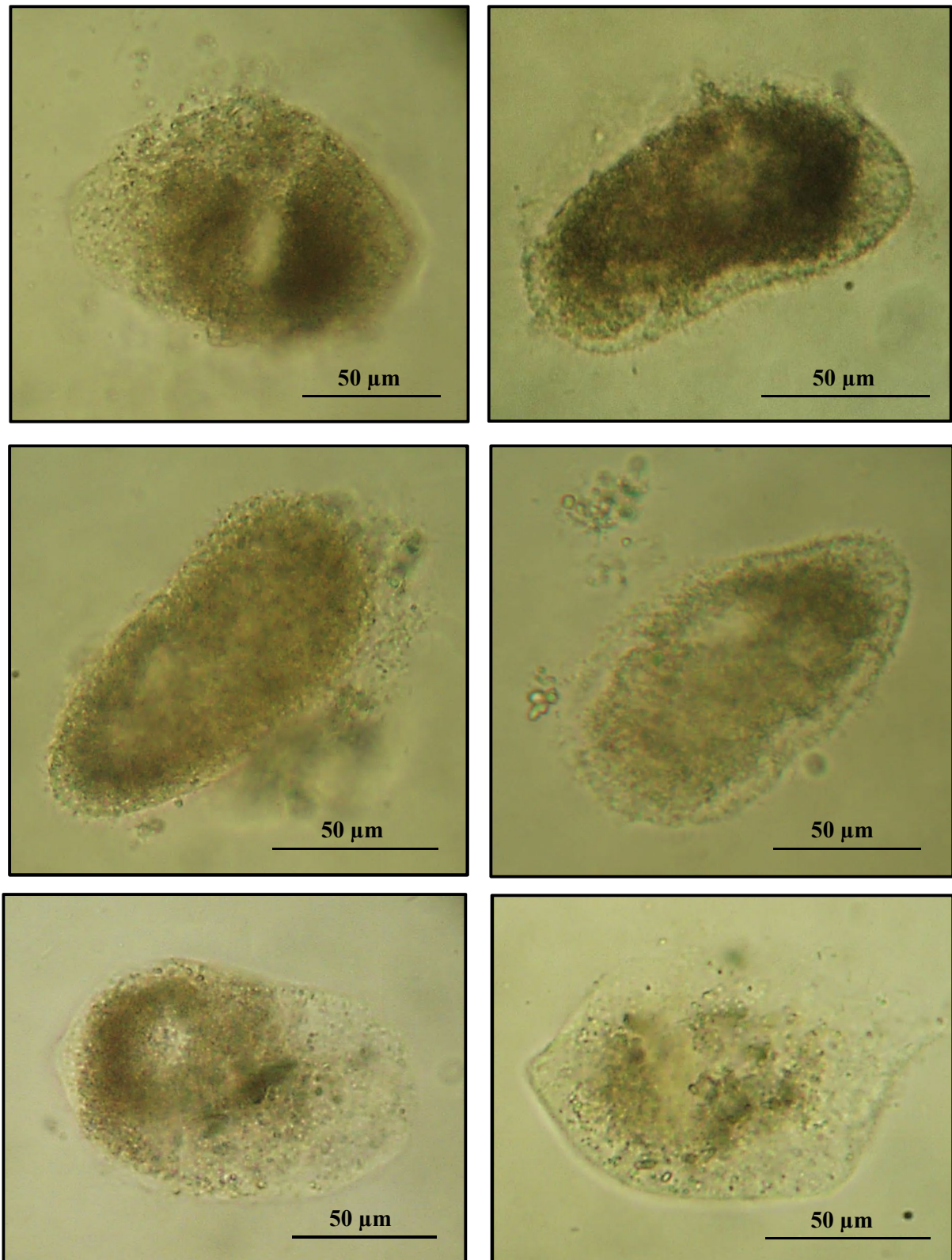


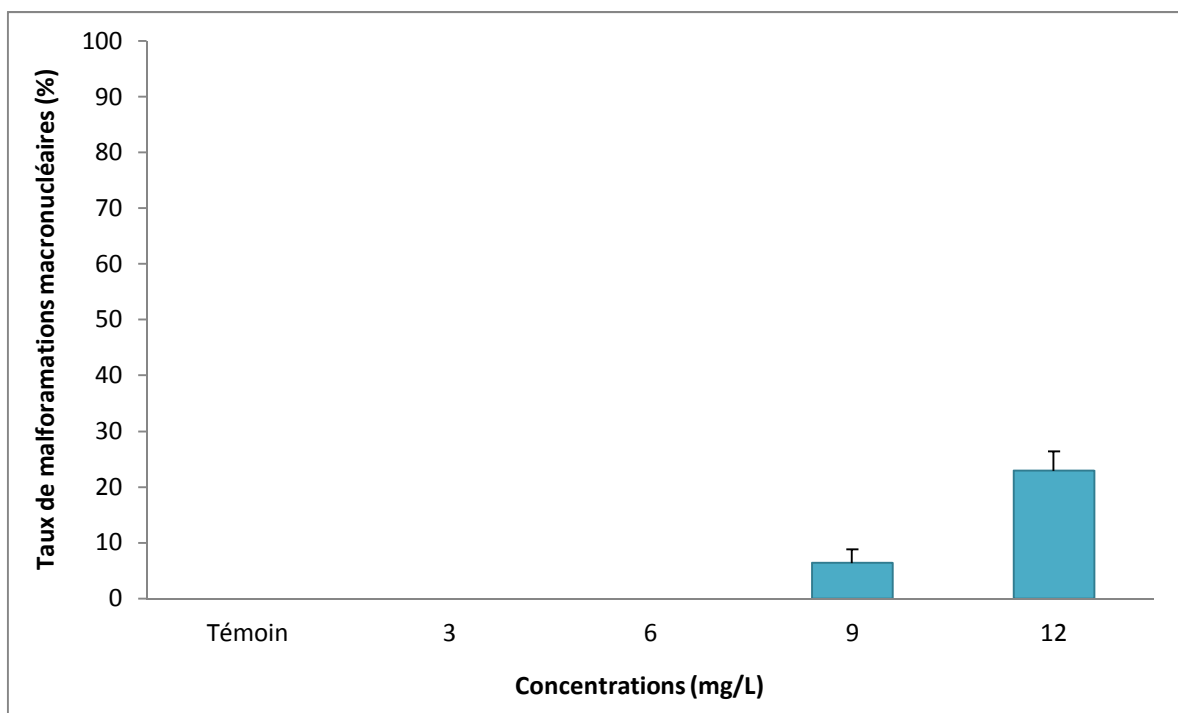
Figure 38 : Désintégration membranaire et mort cellulaire (apoptose)

### 3.1.3. Taux de malformations macronucléaires induites par l'exposition au Focus Ultra

La variation du taux de malformations macronucléaires observées chez *Paramecium tetraurelia* après traitement par les concentrations croissantes de Focus Ultra est représentée dans la figure (39).

Nous constatons que le taux de malformations est nul pour les deux plus faibles concentrations de l'herbicide (3 et 6 mg/L). Toutefois, nous notons une légère augmentation du nombre d'anomalies macronucléaires chez les paramécies traitées par les concentrations les plus élevées de Focus Ultra (9 et 12 mg/L), où nous enregistrons des taux variant respectivement de 6.4 à presque 23% de malformations.

La comparaison entre les effets des concentrations croissantes de Focus Ultra par l'analyse de la variance (ANOVA), indique des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ).



**Figure 39 :** Taux de malformations macronucléaires enregistré chez *Paramecium tetraurelia* après exposition aux concentrations croissantes de Focus Ultra

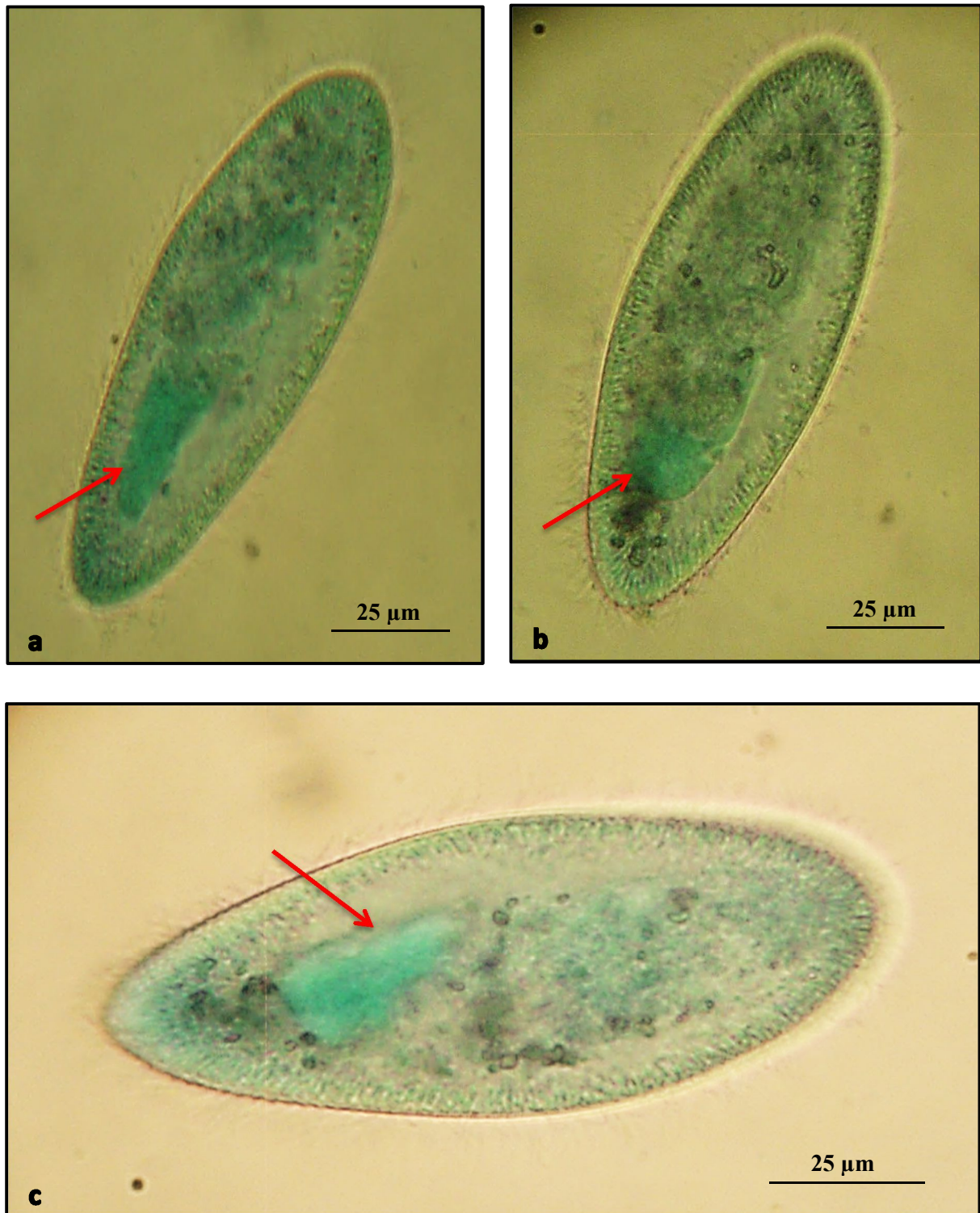
### 3.1.4. Anomalies macronucléaires

Les différents types de malformations macronucléaires observées chez les paramécies exposées aux plus fortes concentrations de Focus Ultra sont illustrés dans les figures (41), (42) et (43).

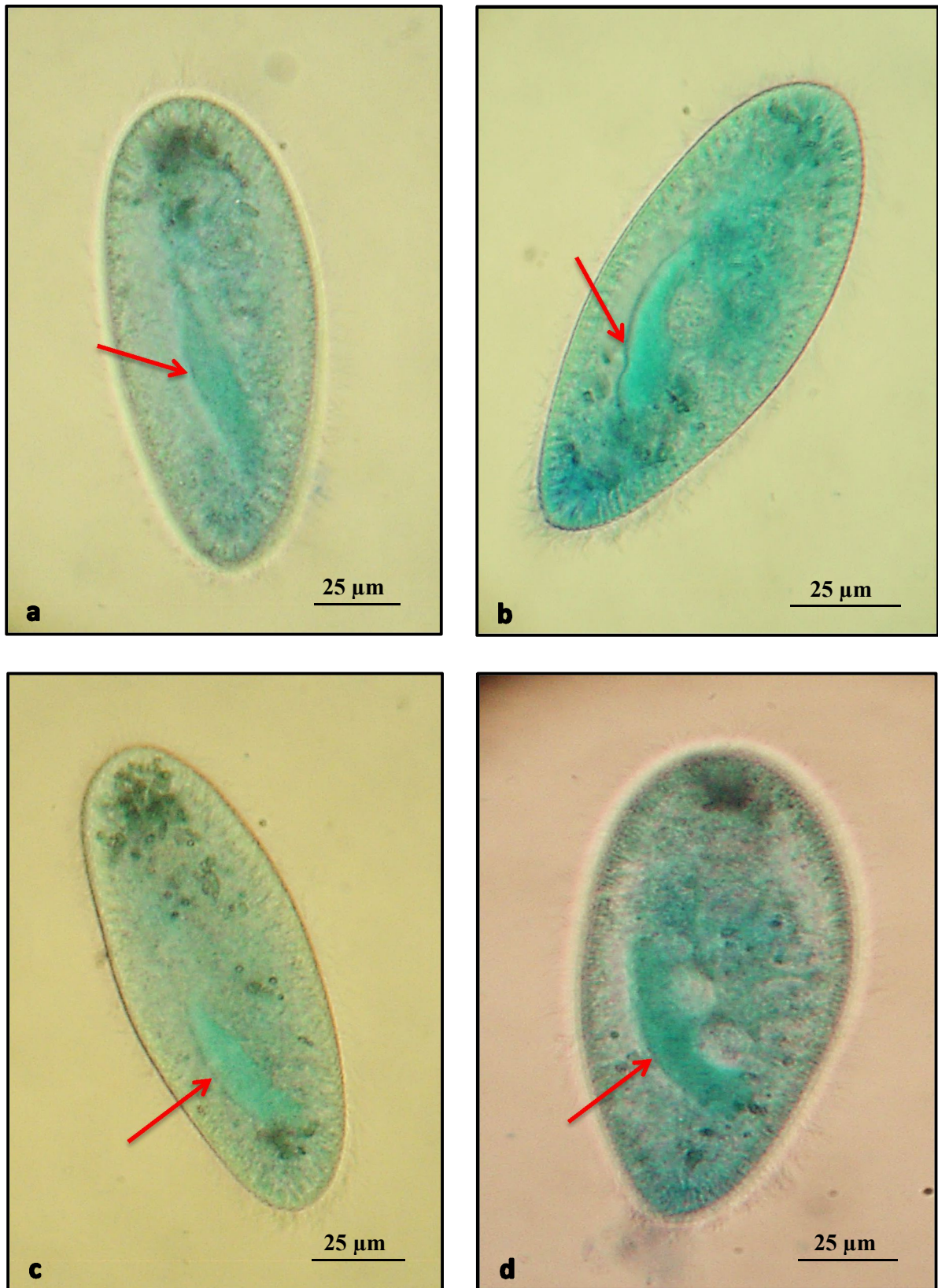
Observées sous microscope optique, les cellules traitées présentent de multiples modifications dans la forme, la taille et la position macronucléaire. Ces changements sont caractérisés principalement par une marginalisation ou un déplacement du macronucléus vers l'extrémité postérieure des paramécies (Figure 41 c), alors qu'il occupe visiblement une position quasiment centrale chez les cellules témoins (Figure 40). Nous remarquons également la présence de diverses malformations et des variations de taille du macronucléus dues essentiellement à des divisions inégales (Figure 41 a, b). Ces anomalies morphologiques se manifestent par une élongation (Figure 42) ou alors une déformation totale du macronucléus pouvant aller, dans certains cas, jusqu'à la caryolyse et la diffusion complète du contenu macronucléaire (Figure 43).



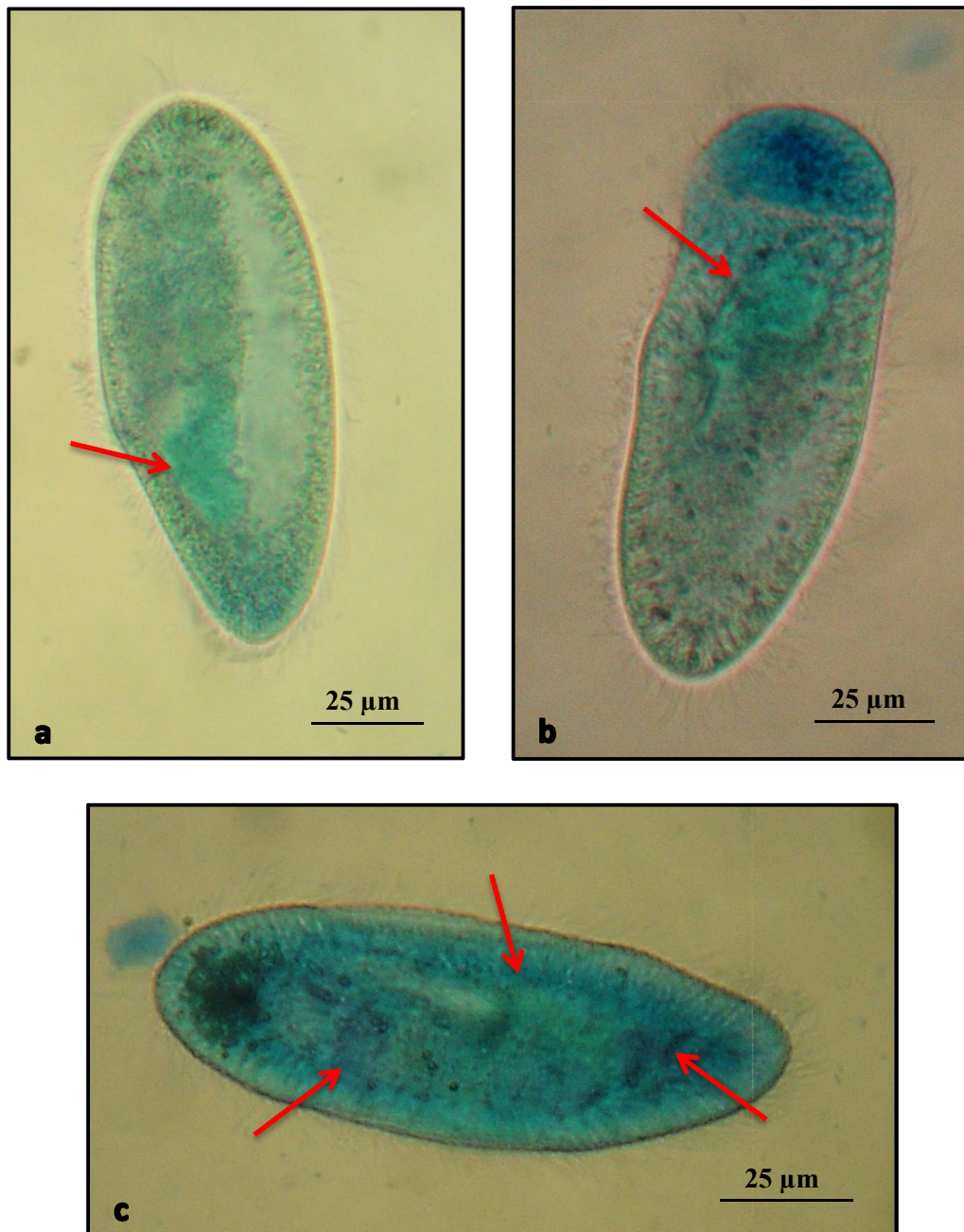
**Figure 40 :** Observation microscopique d'une cellule de *Paramecium tetraurelia* témoin avec coloration du noyau au bleu de méthylène



**Figure 41 :** Marginalisation et déformation du macronucléus chez *Paramecium tetraurelia* exposée aux plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)



**Figure 42 :** Elongation du macronucléus chez *Paramecium tetraurelia* exposée aux plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)



**Figure 43 :** Début de caryolyse et diffusion du contenu macronucléaire dans le cytoplasme chez *Paramecium tetraurelia* exposée aux plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)

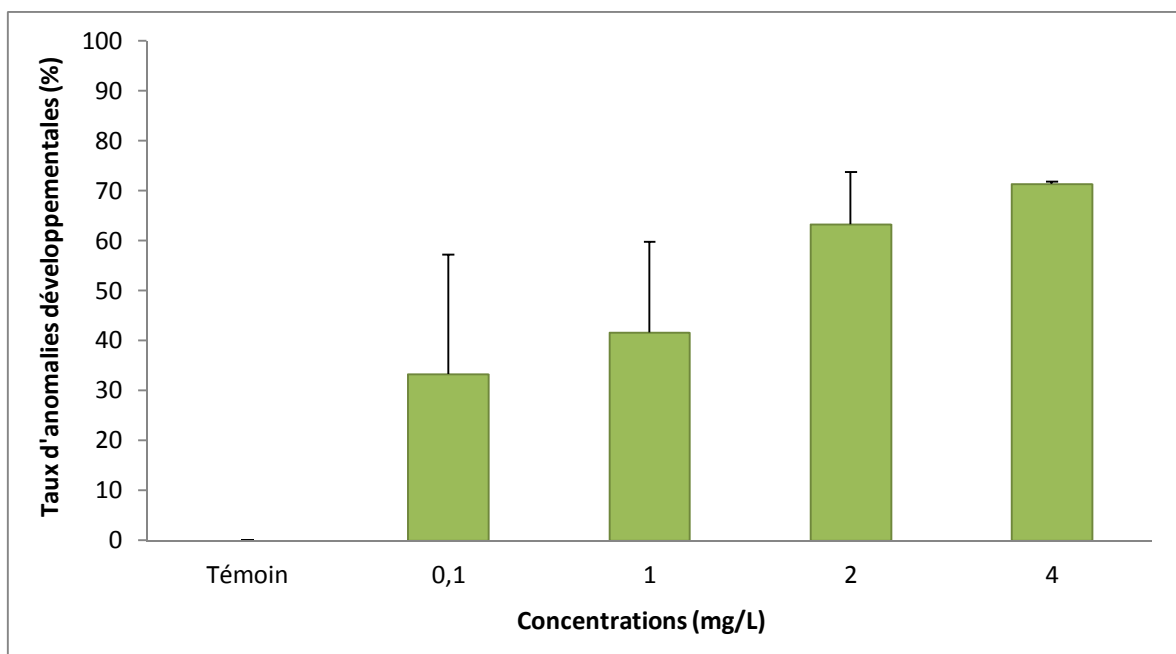
### 3.2. Cas de *Daphnia magna*

#### 3.2.1. Taux d'anomalies développementales induites par l'exposition au cours du stade embryonnaire aux concentrations croissantes de Focus Ultra

La figure (44) met en évidence l'évolution du taux d'anomalies développementales induites par l'exposition des daphnies durant leur stade embryonnaire aux concentrations croissantes de Focus Ultra.

Les résultats obtenus montrent une augmentation dose dépendante du taux de malformations néonatales. Elles concernent respectivement 33.33 à presque 42% des descendants de femelles traitées par les concentrations 0.1 et 1 mg/L, et atteint entre 63.33 et 71.42% chez les traitées par les deux plus fortes concentrations (2 et 4 mg/L) de l'herbicide, par rapport aux néonates témoins, qui ne révèlent aucune malformation lors de l'observation microscopique.

La comparaison entre les effets des concentrations croissantes de Focus Ultra par l'analyse de la variance (ANOVA), indique des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ).



**Figure 44 :** Taux d'anomalies développementales induites par l'exposition des daphnies durant leur stade embryonnaire aux concentrations croissantes de Focus Ultra

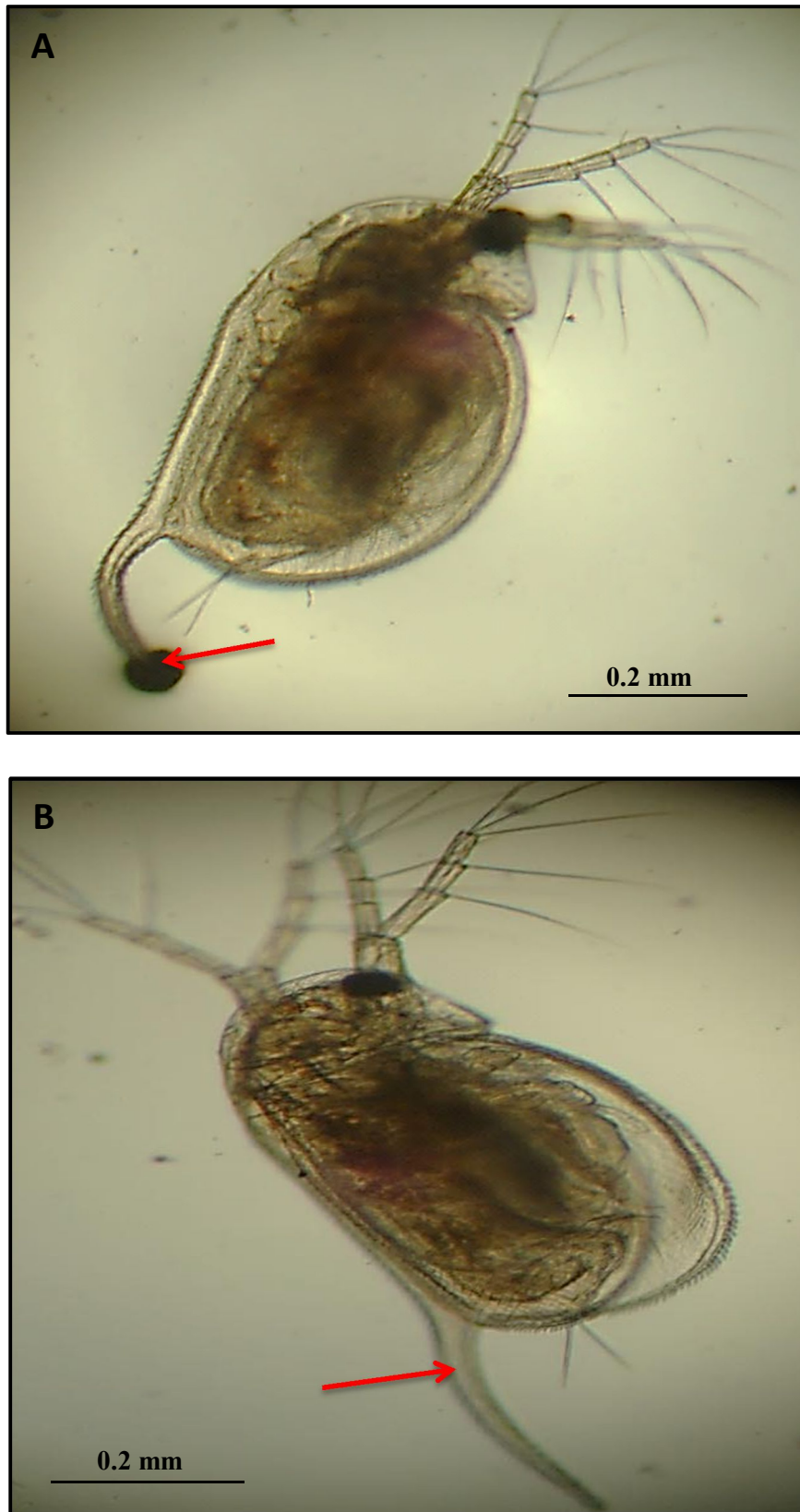
### 3.2.2. Anomalies développementales observées chez les descendants de *Daphnia magna* après exposition au Focus Ultra

Les figures (46), (47), (48) et (49) représentent les différentes anomalies développementales induites chez les nouveau-nés de *Daphnia magna* issues de mères exposées aux concentrations croissantes de Focus Ultra.

D'après l'examen microscopique, les malformations observées chez les descendants semblent toucher plusieurs organes. Elles consistent essentiellement en un courbement plus ou moins important de l'épine caudale (Figure 46) et/ou un sous-développement (Figure 47 A) ou carrément, une absence des antennes secondaires (Figure 47 B) et des soies (Figure 47 C). Certains individus présentent également des altérations morphologiques au niveau de leur carapace (Figure 48 A et B), et moins fréquemment, des déformations et des dommages du tube digestif, observés particulièrement aux plus fortes concentrations de l'herbicide (Figure 49). Il est à noter que les daphnies témoins ne présentent aucune malformation ou anomalie développementale (Figure 45).



**Figure 45 :** Observation microscopique d'une néonate de *Daphnia magna* témoin



**Figure 46 :** Néonates de *Daphnia magna* avec un courbement et une déformation de l'épine caudale

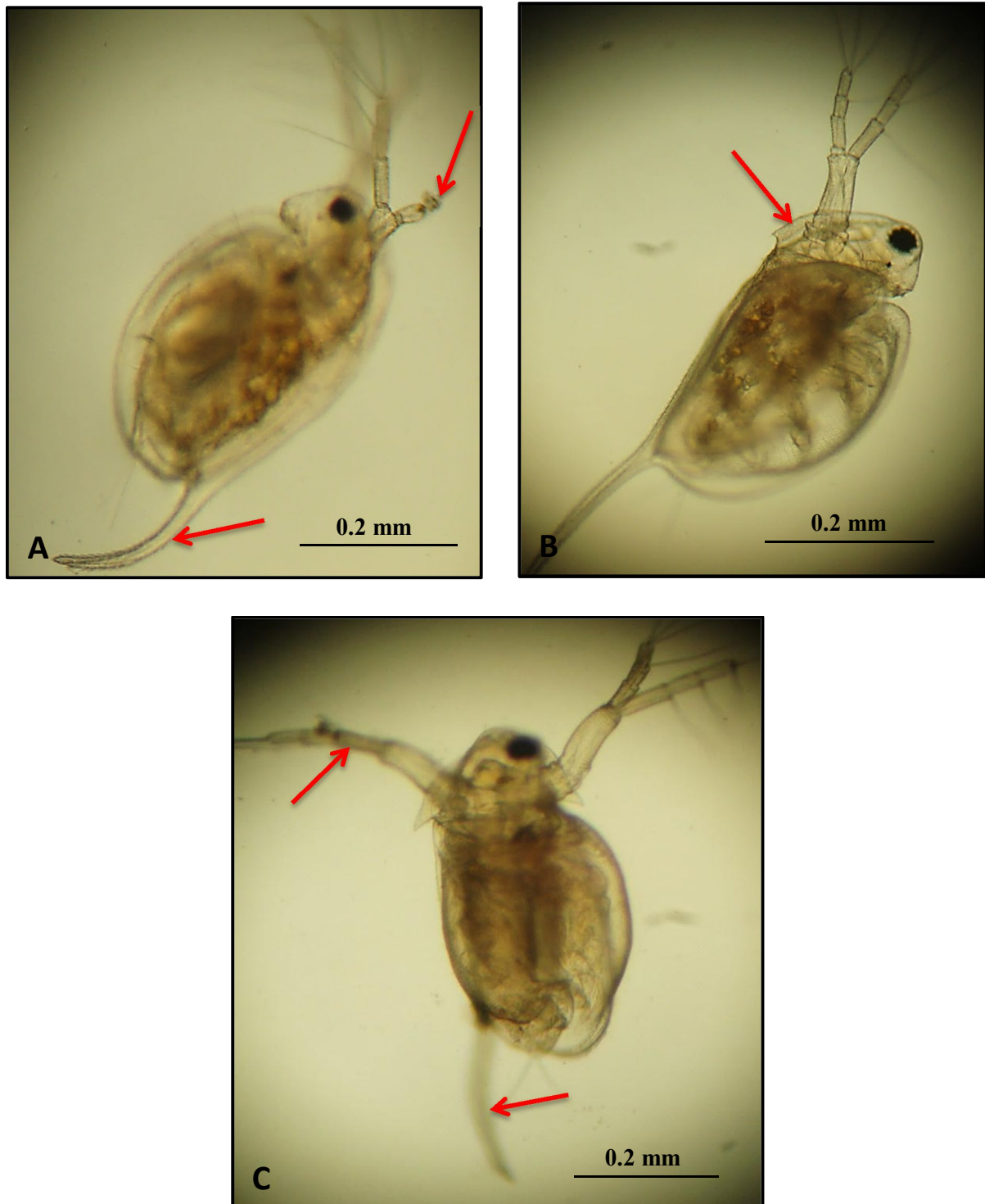


Figure 47 : Néonates de *Daphnia magna* présentant un sous-développement et des malformations au niveau des antennes secondaires et de l'épine caudale



**Figure 48 :** Néonates de *Daphnia magna* présentant des déformations au niveau de la carapace, un sous-développement des soies (A) et un courbement de l'épine caudale (B)



**Figure 49 :** Néonates de *Daphnia magna* présentant des anomalies et des dommages au niveau du tube digestif

#### 4. Discussion

Largement utilisée dans les programmes de recherche, l'analyse des anomalies morphologiques affectant les organismes d'eau douce apparaît comme un outil privilégié pour la biosurveillance des milieux aquatiques. L'étude des réponses biologiques aux niveaux morphologique et développementale permet d'améliorer la compréhension globale des mécanismes susceptibles d'engendrer des altérations au niveau individuel et/ou populationnel. Ces indicateurs très facilement observables s'avèrent donc idéalement complémentaires aux investigations physiologiques, biochimiques et métaboliques précédemment mises en œuvre en apportant des informations supplémentaires relatives aux effets du stress induit par Focus Ultra sur les deux modèles biologiques utilisés dans notre étude.

Ainsi, nous nous sommes intéressés, en premier lieu, à la caractérisation des atteintes morphologiques observées au niveau cellulaire et macronucléaire chez *Paramecium tetraurelia* suite à une exposition au Focus Ultra. **Les observations microscopiques des paramécies traitées ont permis de mettre en évidence une profonde altération de la forme cellulaire avec une condensation du cytoplasme et l'apparition de lésions et de bourgeonnements au niveau de la membrane plasmique.** Des observations similaires ont été enregistrées par Venkateswara et al. (2007), Amanchi (2011) ou encore Azzouz et al. (2015) chez les ciliés d'eau douce *Paramecium caudatum*, *Oxytricha fallax* et *Paramecium tetraurelia* après traitement par le monotrochophos et le Rophosate. Selon Friedl et Wolf (2003) et Golam et al. (2005), ces dommages structuraux sont exclusivement attribuables à l'altération de l'interaction cytosquelette-membrane qui contribue à l'édification et à la stabilisation de la morphologie cellulaire, ce qui se traduit par l'émergence d'anomalies morphologiques suite à la formation de bourgeonnements au niveau membranaire aboutissant indéniablement à la destruction et la mort cellulaire. Cunningham (1995), Mills et al. (1998), Friedl et Wolf (2003), Shalom et Bergmann (2004), suggèrent également que l'apparition de vésicules et de bourgeonnements, lors de l'apoptose, est corrélée à la rupture de la membrane plasmique au niveau du cytosquelette, suivie de l'écoulement du fluide intracellulaire à l'intérieur des vésicules formées. Comme l'a proposé Harris (1990), nous pouvons cependant penser que la formation de vésicules chez *Paramecium* est irréversible et résulte du détachement de la membrane plasmique de la couche d'actine corticale. Ainsi, le détachement des vésicules est susceptible d'engendrer une détérioration de la membrane plasmique conduisant à la mort cellulaire.

**Nos constatations relatives aux dommages intracellulaires qui se manifestent par le noircissement et la condensation du cytoplasme** sont en accord avec les travaux de Venkateswara et *al.* (2006 ; 2008) ou encore Hussain et *al.* (2008), portant respectivement sur l'effet cytotoxique de l'Acéphate, le Fenthion et le Carbofuran chez *Paramecium caudatum*. Les auteurs expliquent ce phénomène commun par la survenue de ruptures au niveau des membranes vacuolaires (vacuoles digestives et pulsatiles) et nucléaires entraînant la libération de leurs contenus dans le protoplasme. En effet, la désintégration de l'ensemble des organites cellulaires et du protoplasme qui apparaissent condensés à la périphérie de la cellule entraîne une augmentation du volume cellulaire. Cette pression interne est à l'origine d'une rupture de la membrane externe et par conséquent de la lyse cellulaire.

Par ailleurs, **nos observations liées aux anomalies morphologiques et positionnelles décelées au niveau macronucléaire témoignent bien évidemment du caractère génotoxique de Focus Ultra, vu sa potentialité à induire une multitude de modifications variant d'une marginalisation et une élongation du macronucléus à une diffusion complète et une désintégration macronucléaire.** D'après les travaux d'Amanchi et Hussain (2010), l'apparition d'anomalies macronucléaires est vraisemblablement liée à une altération des divisions cellulaires ainsi que le déclenchement des mécanismes de l'apoptose qui se manifestent en premier lieu par une marginalisation et une condensation de la chromatine nucléaire suivie d'une vacuolisation et une fragmentation du macronucléus. De plus, Klopman et *al.* (1985) et Amanchi (2010b) stipulent qu'après métabolisme, certains pesticides donnent naissance à des radicaux libres électrophiles, qui sont des espèces extrêmement réactives, susceptibles d'interagir avec les sites nucléophiles de l'ADN conduisant à des ruptures et des dommages nucléaires pouvant entraîner une caryolyse et une destruction cellulaire. De même, l'étude menée par Kovács et Pállinger (2003) sur *Tetraymena* conclue que l'exposition à l'Indométhacin affecte considérablement les processus de morphogenèse divisionnaire en altérant la structure du système microtubulaire cortical, ayant pour conséquence, des déformations nucléaires et des divisions inégales au cours du cycle cellulaire. Selon Shimizu et *al.* (2000) et Fenech et Crott (2002), l'apparition de ces anomalies est directement corrélée à une instabilité génomique, et représente un moyen d'éliminer tout matériel génétique amplifié à partir du noyau cellulaire, ceci pourrait probablement être une stratégie adoptée par la cellule pour maintenir son intégrité.

Notre intérêt s'est porté en deuxième lieu sur l'étude de l'embryotoxicité de Focus Ultra chez le microcrustacé *Daphnia magna* à travers l'observation et la caractérisation des

anomalies développementales des nouveaux-nés. **Les résultats expérimentaux ont mis en évidence que cet herbicide affecte amplement leur développement embryonnaire, en induisant l'apparition de diverses malformations consistant en un courbement de l'épine caudale, un sous-développement des antennes secondaires et des soies, des déformations au niveau de la carapace et des atteintes au niveau du tube digestif.** Des malformations similaires ont pu aussi être révélées par LeBlanc et *al.* (2000), Zhang et *al.* (2003), Manar et *al.* (2009) et Toumi et *al.* (2013) chez la descendance de *D. magna* lors de l'exposition maternelle au 4- Nonylphénol, l'éthanol, le Chlordane et la Deltaméthrine, respectivement. Cependant les mécanismes impliqués dans ce phénomène n'ont pas été identifiés par ces auteurs. En effet, l'apparition des malformations peut résulter d'une diminution du taux d'ecdystéroïdes chez les embryons, sachant que ces hormones jouent un rôle primordial dans les processus de reproduction, d'embryogenèse et de mue (Mu et LeBlanc, 2004 ; Creuzburg et *al.*, 2007). Manar et *al.* (2009) soutiennent que cette diminution du taux d'ecdystéroïdes est liée à une inhibition de leur synthèse chez les mères ou alors à l'interférence du chlordane avec l'activité hormonale par l'antagonisme des récepteurs ecdystéroïdiens. D'un autre côté, ces anomalies développementales peuvent être associées à des perturbations d'autres hormones sexuelles, tel est le cas des malformations observées chez le crustacé *Neocaridina denticulata* par Huang et *al.* (2004). Selon ces auteurs, les perturbations endocrines se manifestent par une augmentation du taux d'œstrogène et une diminution de la testostérone, en plus de l'augmentation de la vittélogénine aux fortes concentrations des deux organochlorés testés (Chlordane et Lindane). En outre, l'altération du développement embryonnaire induite par Focus Ultra pourrait également découler de sa toxicité pour les mères exposées, ou encore de la biotransformation maternelle du pesticide en un dérivé embryotoxique, comme l'ont décrit Kast-Hutcheson et *al.* (2001) et Palma et *al.* (2009) durant l'exposition de *Daphnia magna* au Propiconazole et au sulfate d'endosulfan, respectivement. D'après les travaux de Massarin (2010), l'apparition de malformations embryonnaires implique que les daphnies échangent activement des fluides entre la poche incubatrice et le milieu environnant pour satisfaire la demande en oxygène des embryons. Par ce processus, les embryons peuvent être exposés à un certain nombre de contaminants perturbant leur développement. Très récemment, les effets de l'exposition embryonnaire au Focus Ultra ont été pareillement étudiés chez la grenouille africaine *Xenopus laevis* par Wagner et *al.* (2015b), qui ont noté une augmentation significative du taux de malformations accompagnée d'une inhibition considérable de la croissance des embryons exposés aux concentrations comprises entre 10 et 50 mg/L de l'herbicide.

***Chapitre V:***  
***Etude comportementale***

## 1. Introduction

Un animal est en constante évolution au sein de son répertoire comportemental en réponse à des stimuli internes et externes. En effet, à l'échelle individuelle, le comportement se définit comme toute action, réaction ou fonctionnement d'un système sous l'effet de circonstances spécifiques. Il est donc le fruit de l'intégration des conditions auxquelles l'organisme est exposé (Little, 2002 ; Surnom, 2012). Les réponses comportementales, en particulier, représentent le premier niveau de réaction face aux modifications environnementales lesquelles peuvent présenter des niveaux de contraintes plus ou moins élevés. Dans ce contexte, les biomarqueurs comportementaux sont considérés comme des « indicateurs d'alerte précoce » quasi-immédiats et sensibles aux stress (Hellou, 2011; Amiard-Triquet et Amiard, 2012), qui pourraient contribuer grandement à l'amélioration du processus d'évaluation des risques environnementaux (Robinson, 2009).

L'objectif de cette partie de notre travail est de valider la pertinence de l'utilisation du comportement comme indicateur sensible de la contamination des eaux douces, à travers l'étude de la variabilité des réponses comportementales observées chez *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* lors de l'exposition au Focus Ultra.

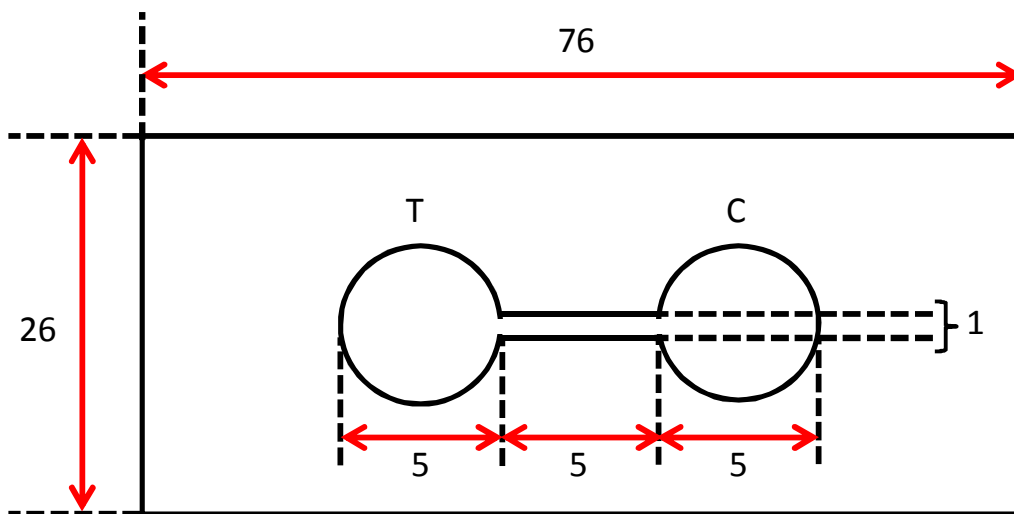
## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Cas de *Paramecium tetraurelia*

#### 2.1.1. Test d'évitement

Dans le but d'étudier l'impact de Focus Ultra sur le comportement d'évitement chez *Paramecium tetraurelia*, nous avons suivi la méthode de Takiguchi et *al.*, (2002), adaptée par Azzouz (2012), dont le principe repose sur la mise en contact, pendant 15 min, d'environ une cinquantaine de paramécies dans un puits, avec la molécule à tester. L'évaluation de l'évitement est effectuée par le dénombrement toutes les 3 min, des cellules qui migrent du premier puits contenant l'herbicide vers le second qui ne comporte que de l'eau distillée.

La méthode de base suggérée par Takiguchi et *al.*, (2002) utilise une lame (Well-Test apparatus) creusée de deux puits de 5 mm de diamètre reliés par un fin canal d'une largeur de 1 mm (Figure 50).



**Figure 50 :** Représentation schématique de la lame (Well-test apparatus) utilisée pour le test d'évitement (Takiguchi et *al.*, 2002).

### 2.1.2. Suivi des Trajectoires de déplacement

Afin de déterminer l'influence de Focus Ultra sur la direction de déplacement des paramécies, nous avons procédé à l'étude de leurs trajectoires en présence et en absence de l'herbicide en réalisant un enregistrement vidéo des déplacements. Après enregistrement, les vidéos sont analysées par le logiciel (Kinovea 0.8.15), qui permet le traçage des trajectoires de déplacement des cellules avec précision.

### 2.1.3. Calcul de la vitesse de déplacement

La vitesse de déplacement des paramécies est calculée par le logiciel d'analyse vidéo (Kinovea 0.8.15) en utilisant des cellules en phase exponentielle de croissance avec des mouvements actifs et des trajectoires de déplacement plus ou moins droites. Ce logiciel calcule la distance en pixels et le temps en centièmes de secondes (Figure 51).

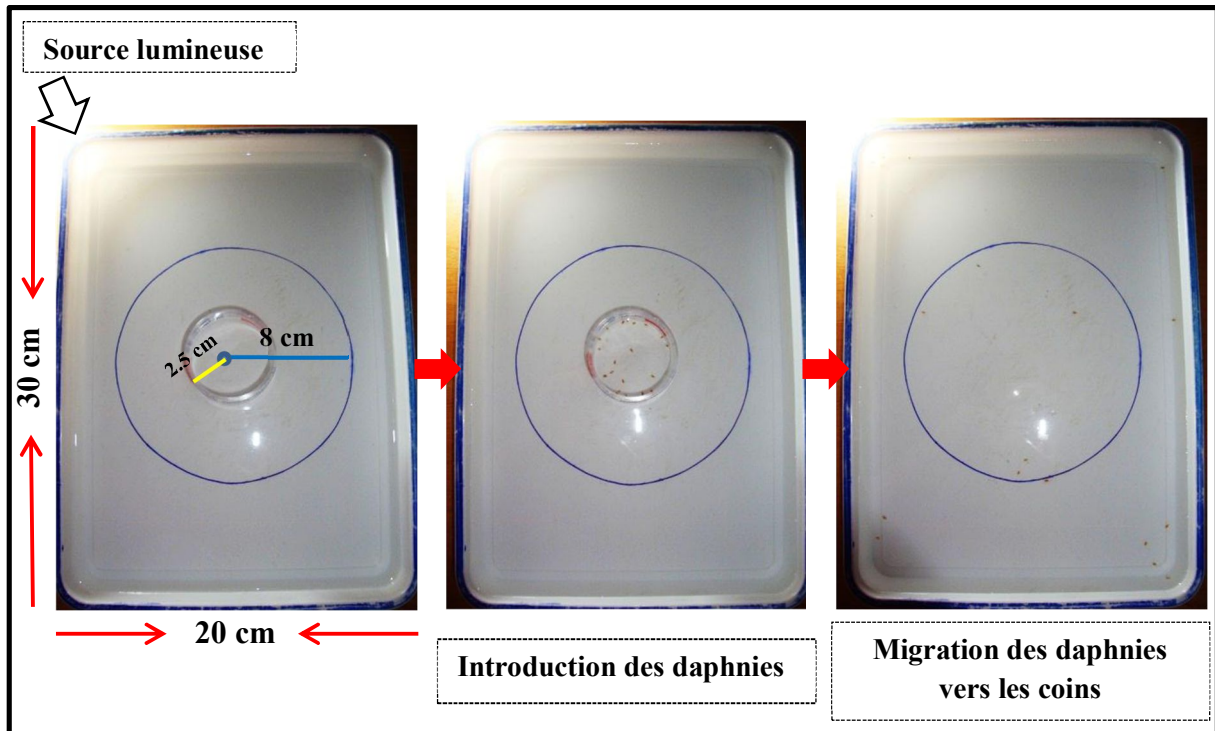


**Figure 51 :** Photo prise via le logiciel « Kinovea » montrant la mesure de la distance (en pixel) parcourue par une paramécie en fonction du temps (en centième de seconde)

## 2.2. Cas de *Daphnia magna*

### 2.2.1. Evaluation de la capacité natatoire de *Daphnia magna* (Swimming Ability test)

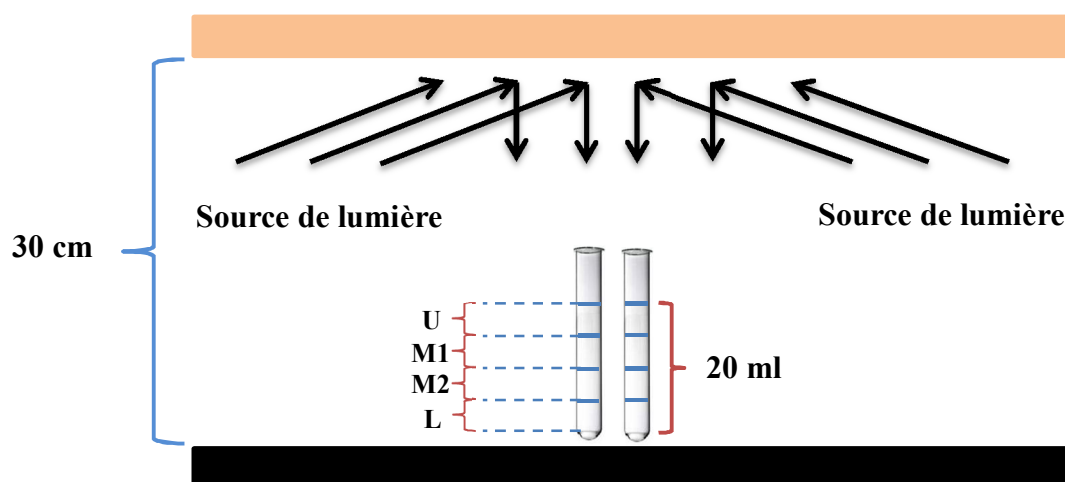
L'analyse de la capacité natatoire est réalisée selon la méthode proposée par Christensen et *al.* (2005). L'expérience repose sur l'introduction de 20 daphnies dans un anneau en plastique (5 cm), placé dans une zone circulaire (16 cm) tracée au centre d'un plateau blanc rectangulaire (30 x 20 cm) contenant 1 L de milieu de culture. Une source de lumière est placée dans le coin supérieur gauche pour stimuler le mouvement. Après 10 secondes de la mise en place des daphnies, l'anneau est retiré et l'emplacement des individus est enregistré au bout de 30, 60 et 120 secondes d'observation, respectivement. La capacité natatoire des daphnies est mesurée après 6, 24 et 48 heures d'exposition, par le comptage du nombre d'individus ayant migré de la zone centrale vers l'un des quatre coins (Figure 52). Le comportement natatoire normal est noté par le passage des daphnies de la zone centrale vers les zones de coins immédiatement après leur introduction (Van Gool et Ringelberg, 1998a, 1998b).



**Figure 52 :** Schéma du dispositif expérimental utilisé pour l'évaluation de la capacité natatoire de *Daphnia magna*

### 2.2.2. Test de phototaxie (Phototactic behaviour)

La méthode utilisée pour la détermination des effets de Focus Ultra sur le comportement phototactique de *Daphnia magna* est celle décrite par Michels et *al.* (1999), modifiée par Martins et *al.* (2007b). L'appareil expérimental consiste en une quinzaine de tubes à essai divisés en 4 compartiments de 2,5 cm repérés du haut vers le bas par: Un (U) pour le compartiment supérieur, (M1 et M2) pour les deux médians, et un (L) pour le compartiment inférieur. Une source de lumière est placée de part et d'autre des tubes à essai et dirigée vers une plaque en bois opaque positionnée à environ 30 cm au-dessus des tubes. Les tubes à essai sont disposés dans un portoir métallique posé sur une plaque noire pour éliminer toute réflexion de la lumière (Figure 53).



**Figure 53 :** Illustration du dispositif expérimental utilisé pour l'analyse des réponses phototactiques (Martins et *al.*, 2007b)

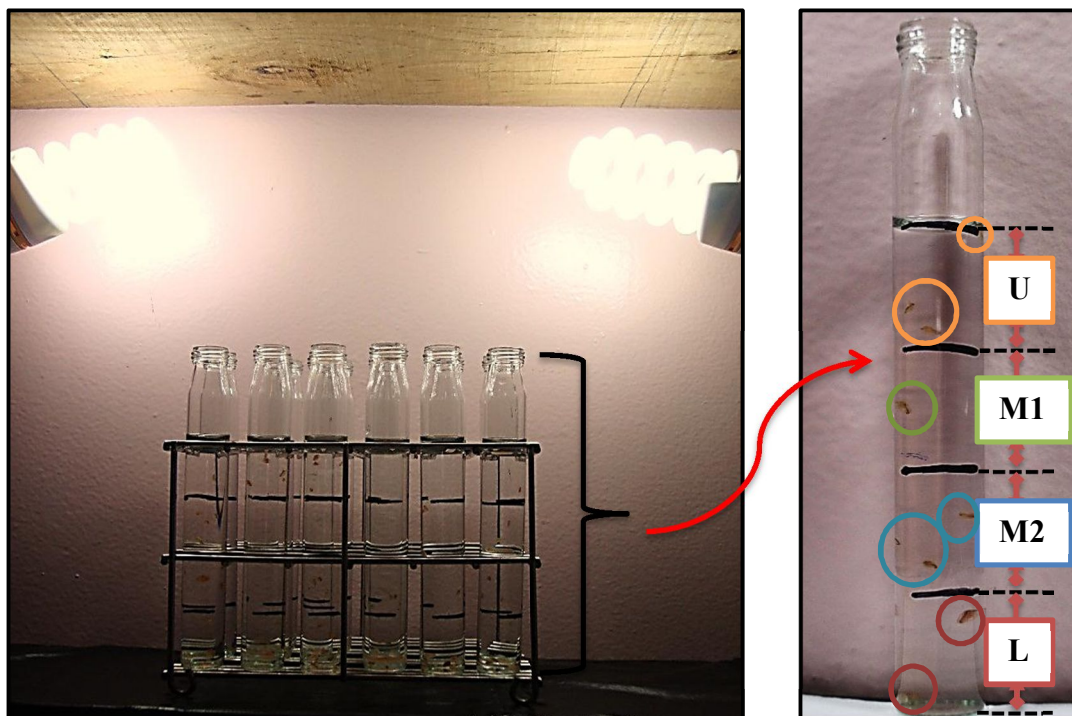
Après 3h d'exposition aux concentrations croissantes de Focus Ultra, des groupes de 10 daphnies (témoins et traitées) sont introduits dans chacun des tubes à essai contenant 20 ml de milieu de culture. Chaque concentration a fait l'objet de 3 répétitions en plus du témoin. L'essai est réalisé dans une pièce sombre, maintenue à une température constante de  $20 \pm 2$  °C. Avant le commencement de l'essai, les daphnies sont maintenues à l'obscurité pendant 5 min, pour s'assurer qu'elles soient au fond des tubes au début de l'expérience. Le comportement phototactique est estimé par le comptage du nombre d'individus dans chacun des 4 compartiments, pendant une période de 10 min, à un intervalle d'1 min (Figure 54). La réponse phototactique des daphnies est numériquement quantifiée par un indice ( $I_p$ ) nommé « **indice phototactique** ». La valeur de cet indice est calculée par la formule suivante :

$$I_p = (U - L) / (U + M1 + M2 + L)$$

Où :

- $I_p$  : Indice phototactique ;
- $U$  : Nombre de daphnies présentes dans le compartiment U ;
- $M1$  : Nombre de daphnies présentes dans le compartiment M1 ;
- $M2$  : Nombre de daphnies présentes dans le compartiment M2 ;
- $L$  : Nombre de daphnies présentes dans le compartiment L.

La valeur de l'indice phototactique est considérée comme étant la moyenne des valeurs obtenues pour **les 5 dernières minutes de l'expérience** (les 5 premières minutes ne sont pas prises en compte). Ceci a pour but de minimiser l'influence initiale de la réaction lumineuse et de permettre aux daphnies de présenter une distribution verticale stable (De Meester, 1991). Les valeurs de l'indice phototactique varient de « 1 » pour un **comportement extrêmement positif** à « -1 » pour un **comportement extrêmement négatif**.



**Figure 54** : Schéma représentant la distribution verticale des daphnies sur les 4 compartiments du tube à essai dans le test de phototaxie

### 2.2.3. Suivi des Trajectoires de déplacement

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

### 2.2.4. Calcul de la vitesse de nage

La vitesse de nage de *Daphnia magna* est estimée selon la méthode de Shimizu et *al.* (2002), modifiée par Bownik et *al.* (2015b). 10 daphnies sont exposées aux concentrations

croissantes de Focus Ultra pendant 6, 24 et 48h, puis transférées individuellement dans une boîte d'observation de 85 mm de diamètre et 12 mm d'hauteur contenant 40 ml de milieu de culture. Les déplacements des daphnies sont enregistrés en vidéo pendant 1 min au minimum. Le mouvement vertical est négligeable en raison de la faible profondeur de la boîte d'observation. Les vidéos sont ensuite analysées par le logiciel d'analyse des mouvements (Kinovea 0.8.15).

### 3. Résultats

#### 3.1. Cas de *Paramecium tetraurelia*

##### 3.1.1. Effet de Focus Ultra sur le pourcentage d'évitement

La variation du pourcentage d'évitement chez les paramécies exposées aux concentrations croissantes de Focus Ultra est représentée dans la figure (55).

Nos résultats révèlent une augmentation dose dépendante et significative ( $p = 0.024$ ) de ce paramètre pour la concentration 9 mg/L, et hautement significative ( $p = 0.002$ ) pour la plus forte concentration (12 mg/L), et ce par rapport aux témoins. Cette augmentation est estimée à 70.27% chez les paramécies traitées par la concentration 9 mg/L et atteint 80.19% pour la concentration la plus élevée (12 mg/L) de Focus Ultra, alors que chez les cellules témoins, ce taux ne dépasse pas 36.33%.

L'analyse de la variance (ANOVA) montre l'existence de différences très hautement significatives entre les effets des concentrations croissantes de l'herbicide ( $p = 0.000$ ).

##### 3.1.2. Variation du pourcentage d'évitement en fonction du temps

Les résultats concernant le pourcentage d'évitement enregistré toutes les 3 minutes chez *Paramecium tetraurelia* après exposition aux différentes concentrations de Focus Ultra sont illustrés dans la figure (56).

D'après nos résultats, nous constatons une augmentation de la sensibilité des paramécies aux concentrations croissantes de Focus Ultra en fonction du temps, à travers un accroissement dose dépendant du pourcentage d'évitement dès les six premières minutes de l'expérience apparaissant à partir de la plus faible concentration et s'accroissant aux plus fortes concentrations de l'herbicide. En effet, à la sixième minute, le taux d'évitement chez les paramécies témoins n'est que de 4%, tandis que pour les traitées par la concentration 12 mg/L, il est d'environ 23% et atteint son maximum d'environ 80% à la fin de l'expérience (15 min).

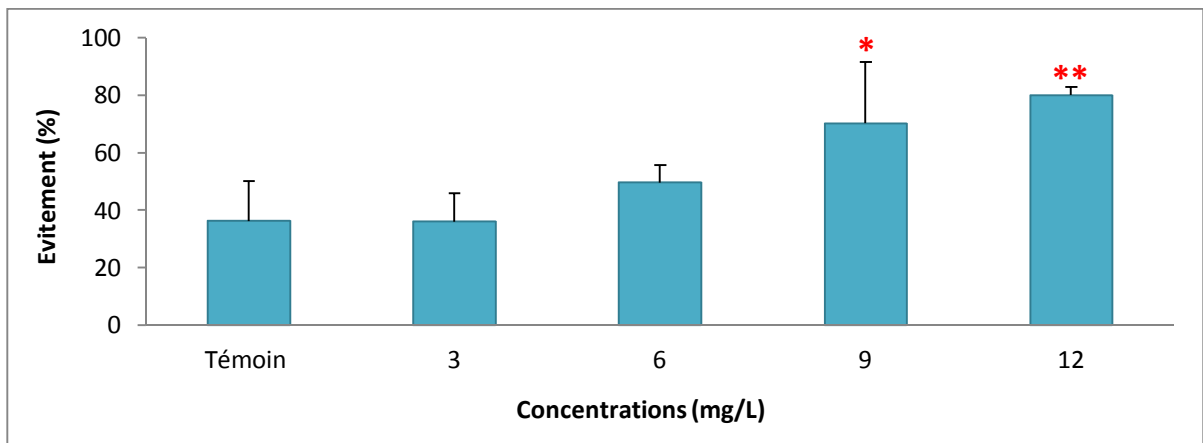


Figure 55 : Pourcentages d'évitement enregistrés après 15 minutes d'exposition aux concentrations croissantes de Focus Ultra

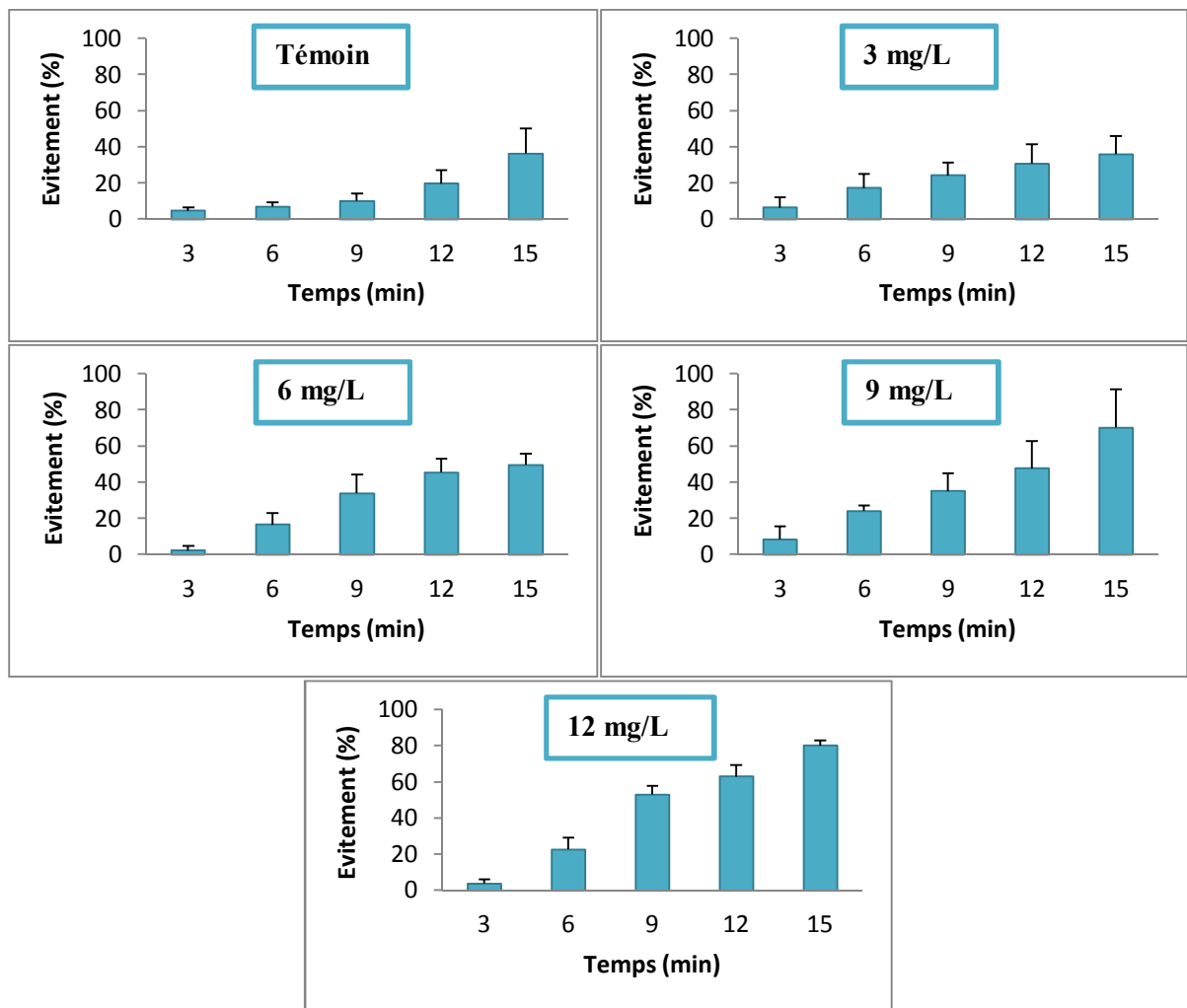
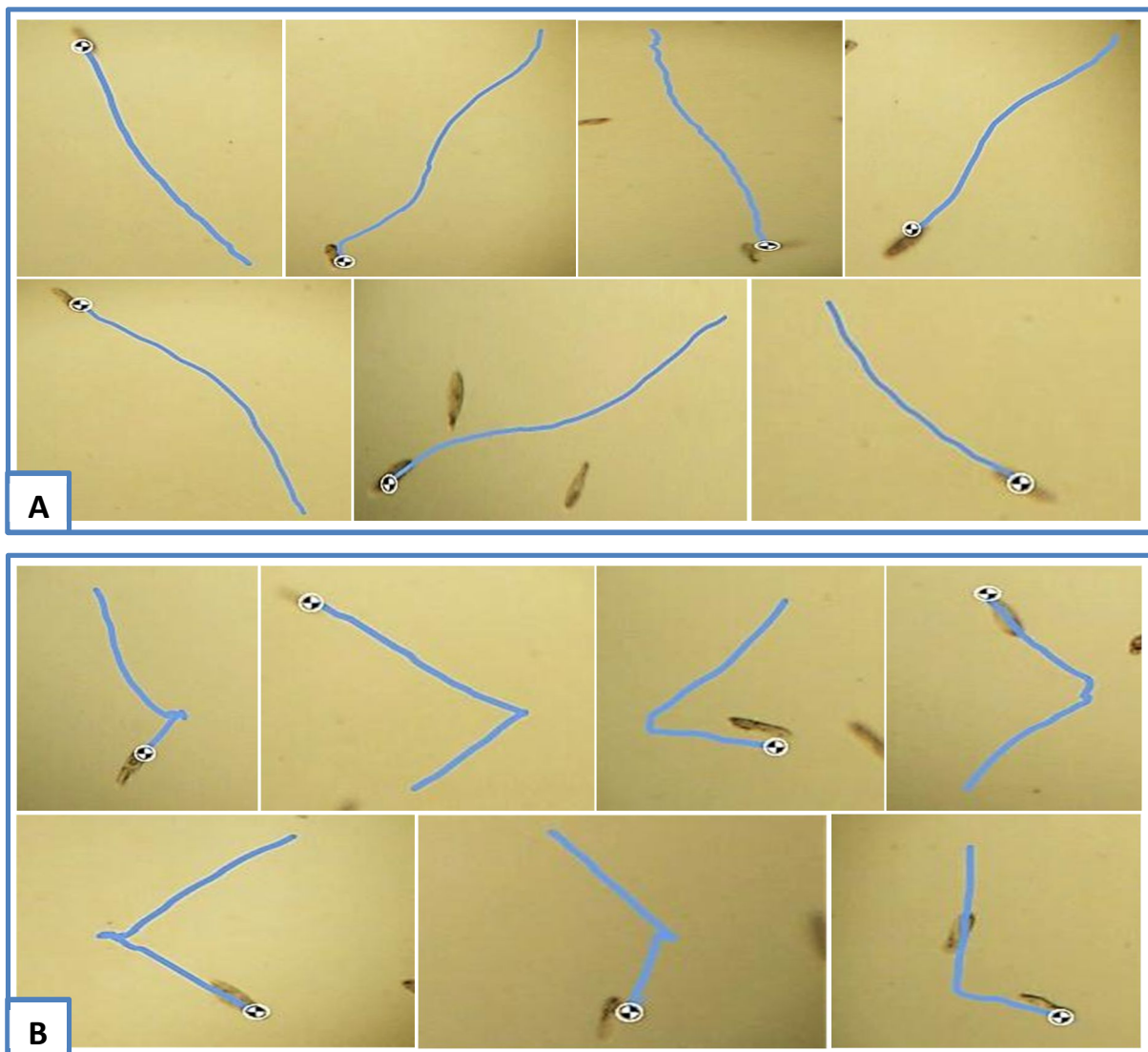


Figure 56 : Pourcentages d'évitement enregistrés toutes les 3 minutes pour les différentes concentrations de Focus Ultra

### 3.1.3. Effet de Focus Ultra sur les trajectoires de déplacement

La figure (57) représente différentes trajectoires de paramécies témoins observées en absence et en présence d'obstacles.

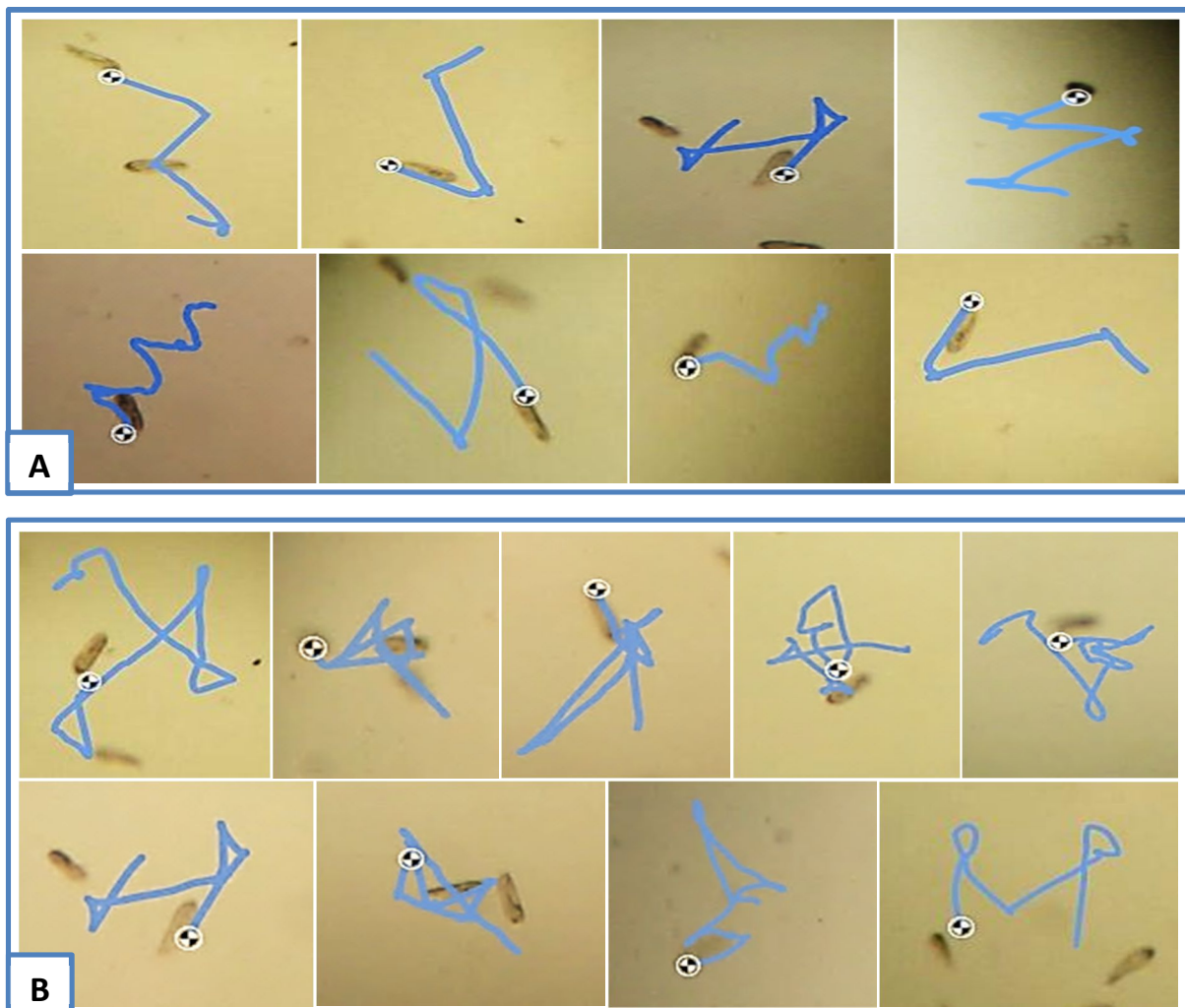
En absence d'obstacles, nous remarquons que les paramécies suivent une trajectoire apparemment ondulatoire mais est en fait hélicoïdale autour d'un axe longitudinal. Ce mouvement est assuré par l'action des vagues successives créées par les battements ciliaires du corps (Figure 57 A). Au contact d'un obstacle, les cellules se heurtent à celui-ci, et par une inversion du sens des battements ciliaires elles reculent puis pivotent et nagent rapidement dans une nouvelle direction pour l'éviter (Figure 57 B).



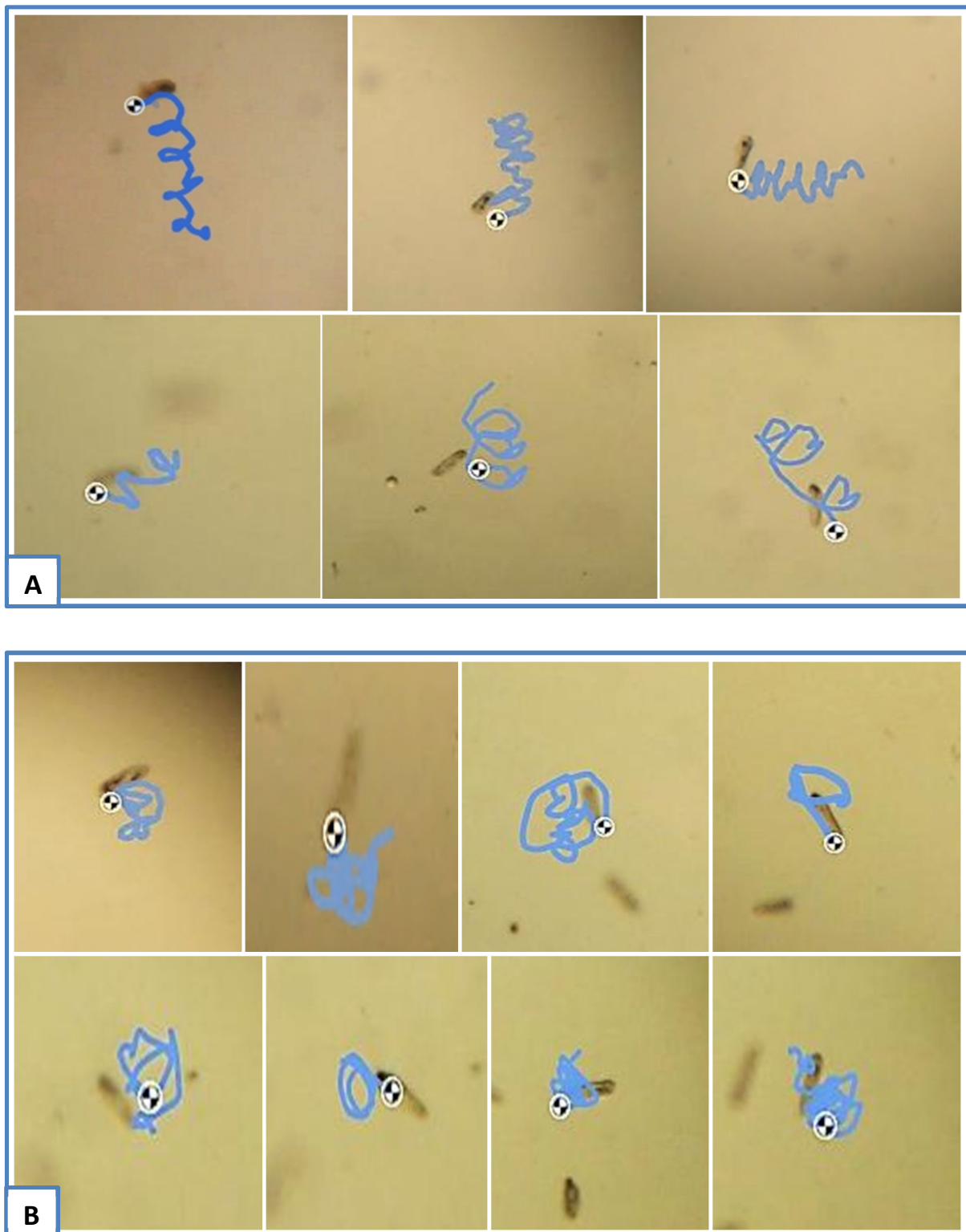
**Figure 57 :** Trajectoires de *Paramecium tetraurelia* témoin enregistrées en absence (A) et en présence (B) d'obstacles

Les figures (58), (59) et (60) illustrent les différentes trajectoires observées chez les paramécies exposées aux plus fortes concentrations de Focus Ultra.

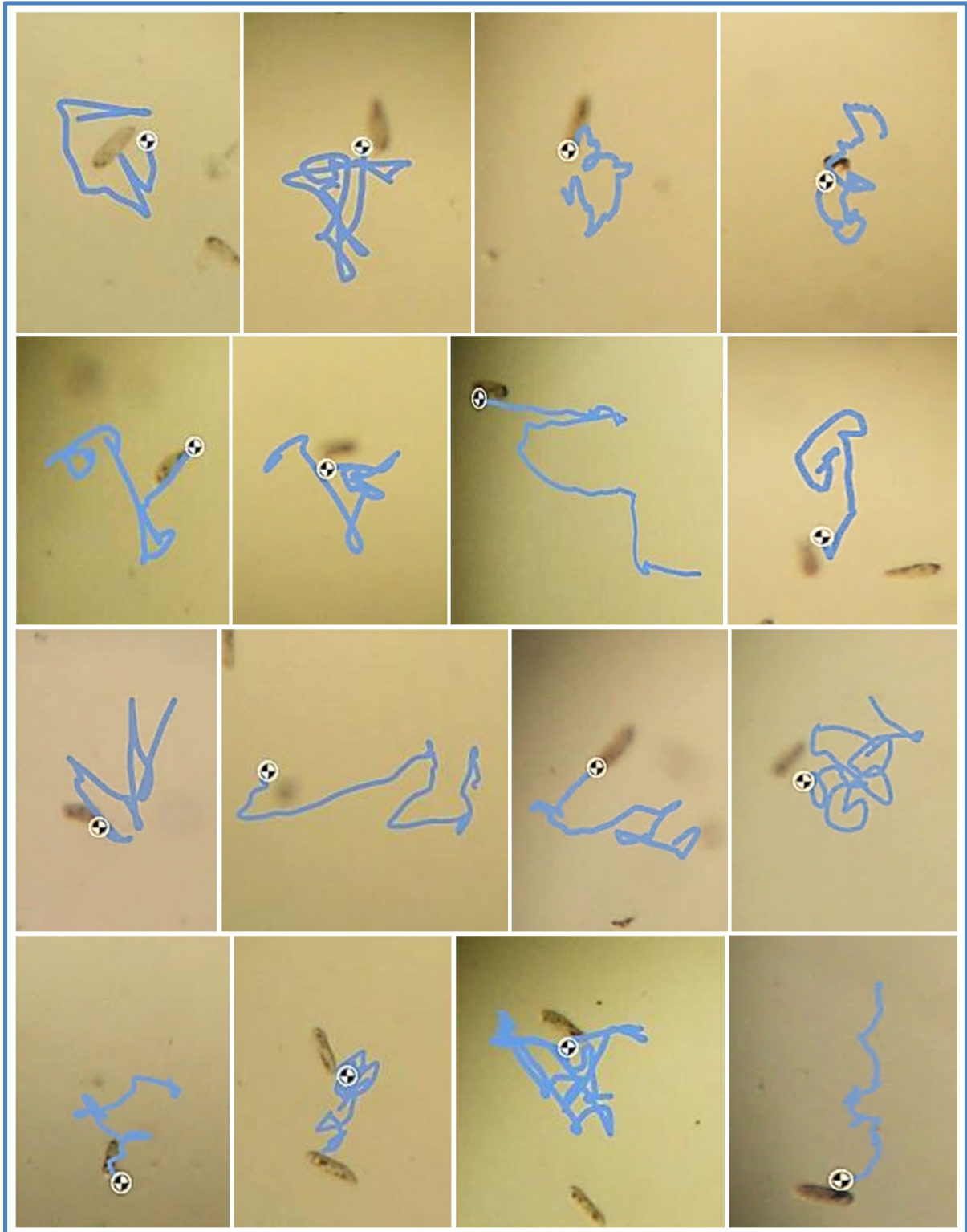
D'après l'observation microscopique des paramécies traitées, nous constatons une perturbation plus ou moins considérable des trajectoires de déplacement marquée par des mouvements en zigzag (Figure 58 A) et des changements brutaux de direction accompagnés d'une nage en arrière (backward swimming) (Figure 58 B). Ces perturbations se manifestent plus particulièrement par une perte de la linéarité des itinéraires. En effet, les paramécies présentent une nage impliquant divers mouvements caractérisés par des trajectoires désordonnées (Figure 60), et d'autres circulaires (Figure 59 A), ainsi que des rotations sur place (Figure 59 B).



**Figure 58** : Mouvements en zigzag (A) et changements brutaux de directions (B) observés chez *Paramecium tetraurelia* traitée par les plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)



**Figure 59** : Mouvements circulaires (A) et rotations sur place (B) enregistrés chez *Paramecium tetraurelia* traitée par les plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)



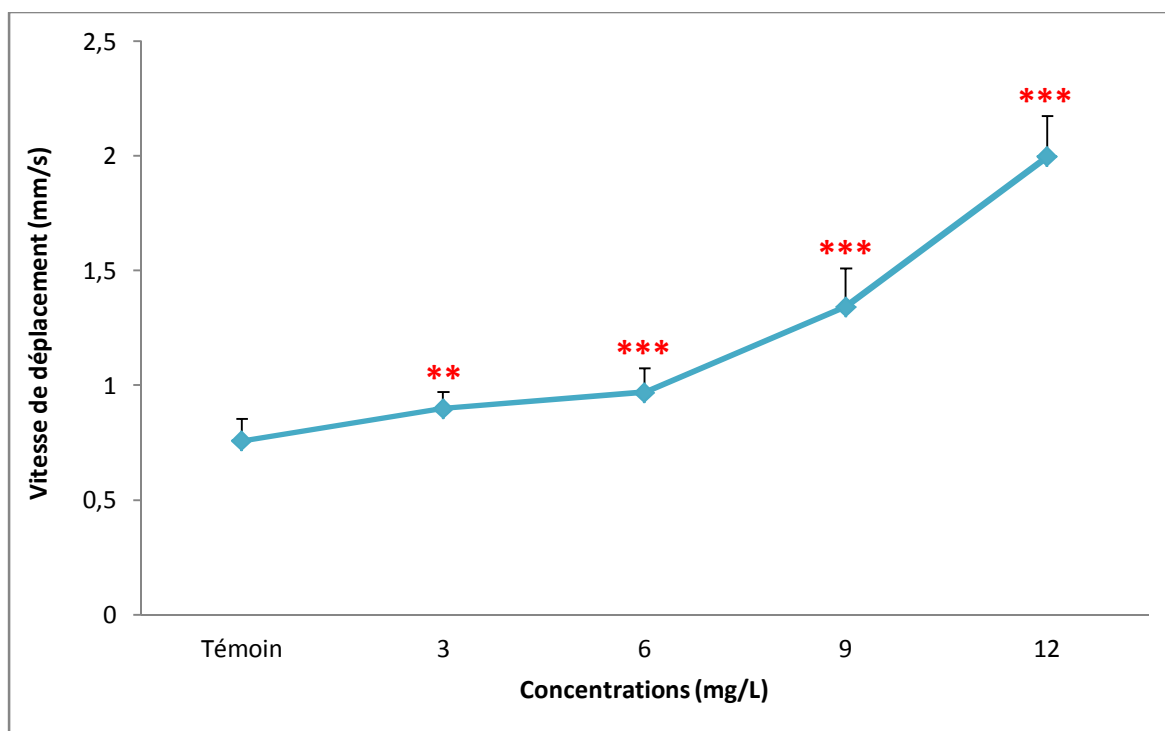
**Figure 60** : Mouvements désordonnés et aléatoires induits chez *Paramecium tetraurelia* suite au traitement par les plus fortes concentrations de Focus Ultra (9 et 12 mg/L)

### 3.1.4. Effet de Focus Ultra sur la vitesse de déplacement

La figure (61) met en évidence l'effet du traitement par Focus Ultra sur la vitesse de déplacement de *Paramecium tetraurelia*.

Les résultats obtenus montrent une accélération dose dépendante de la vitesse de déplacement des paramécies exposées aux concentrations croissantes de Focus Ultra. Cette stimulation est hautement significative ( $p = 0.002$ ) pour la plus faible concentration (3 mg/L), et très hautement significative ( $p = 0.000$ ) pour les concentrations (6, 9 et 12 mg/L), comparativement aux témoins. En effet, nous enregistrons une vitesse moyenne de  $0.76 \pm 0.09$  mm/s chez les cellules témoins, tandis que pour les traitées par les concentrations 3, 6, 9 et 12 mg/L, elle est respectivement de l'ordre de ( $0.89 \pm 0.07$  mm/s), ( $0.97 \pm 0.1$  mm/s), ( $1.34 \pm 0.16$  mm/s) et ( $2 \pm 0.17$  mm/s).

L'analyse de la variance (ANOVA) montre un effet très hautement significatif du traitement par Focus Ultra ( $p = 0.000$ ).



**Figure 61** : Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la vitesse de déplacement de *Paramecium tetraurelia*

### 3.2. Cas de *Daphnia magna*

#### 3.2.1. Effet de Focus Ultra sur la capacité natatoire

La figure (62) met en évidence l'influence, en fonction du temps, du traitement par les concentrations croissantes de Focus Ultra sur la capacité natatoire de *Daphnia magna*.

Nos résultats montrent qu'en présence de l'herbicide, le taux de migration des daphnies vers les coins tend à diminuer de manière dose-dépendante est significative pour toutes les concentrations testées par rapport aux témoins, et ce en fonction du temps d'exposition. Cette réduction est observée dès la 6<sup>ème</sup> heure de traitement et s'intensifie au 2<sup>ème</sup> jour. Ainsi, nous constatons une inhibition quasi-totale de la capacité natatoire des daphnies traitées par les deux plus fortes concentrations (2 et 4 mg/L) de Focus Ultra ( $p = 0.000$ ), après 48h d'exposition, où nous notons une chute importante du taux de migration atteignant respectivement 5 et 2.5%, par rapport à celui des témoins qui est d'environ 94%.

L'analyse de la variance (ANOVA) montre un effet très hautement significatif du traitement par Focus Ultra ( $p = 0.000$ ), et ce pour toutes les durées d'exposition.

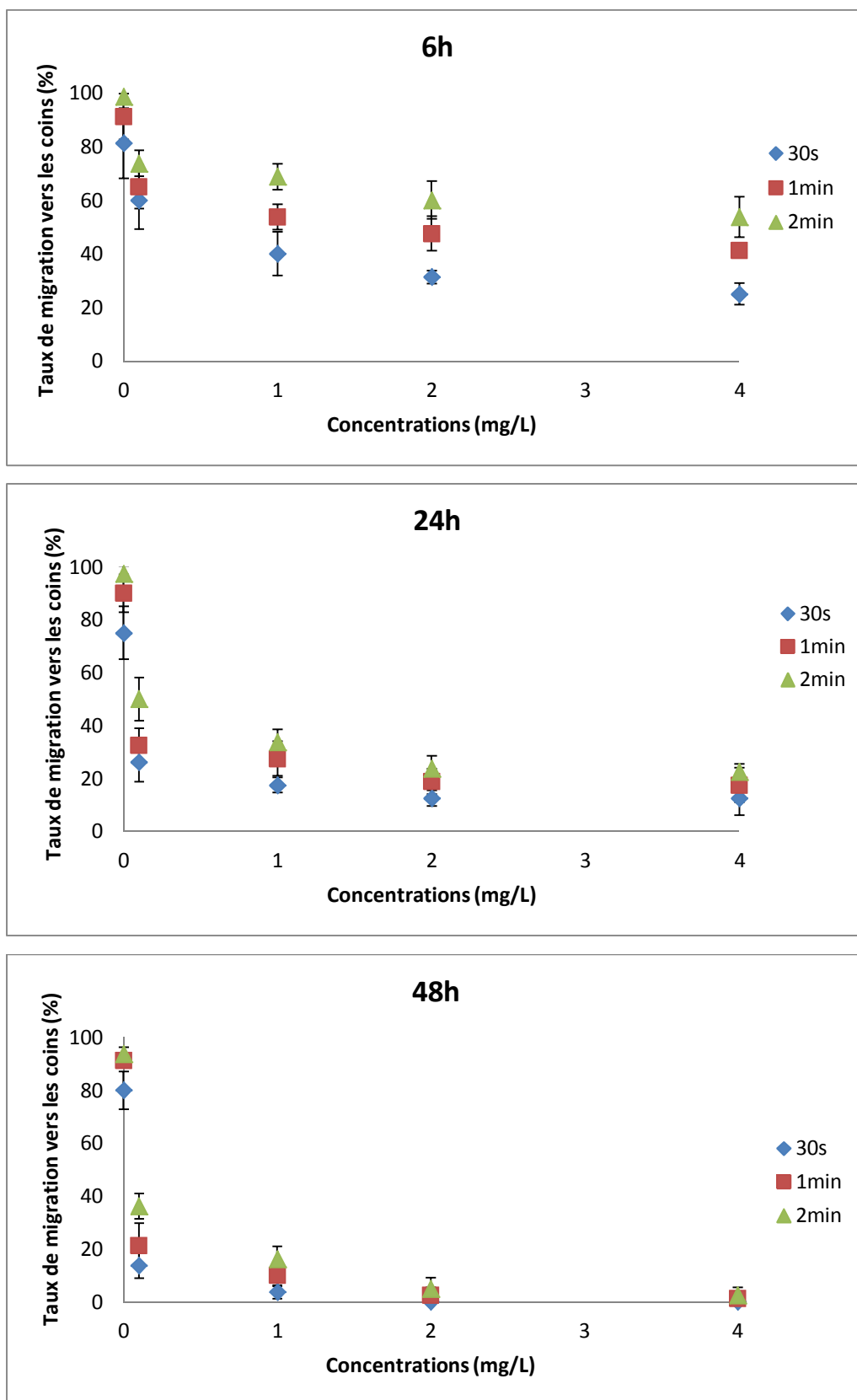


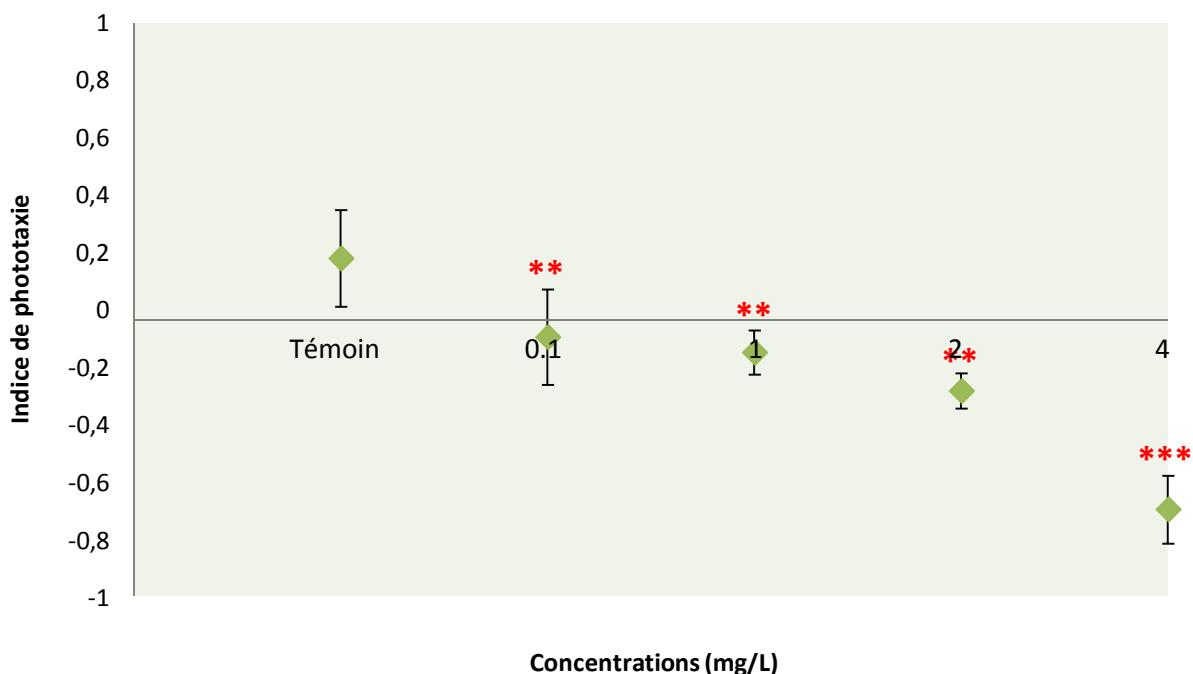
Figure 62 : Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la capacité natatoire de *Daphnia magna* après 6, 24 et 48h d'exposition

### 3.2.2. Influence de Focus Ultra sur le comportement phototactique

Les résultats relatifs aux effets de Focus Ultra sur le comportement phototactique de *Daphnia magna* sont illustrés dans la figure (63).

Nous notons une inhibition dose dépendante de la réponse phototactique, se traduisant par une baisse progressive de l'indice de phototaxie ( $I_p$ ) chez les daphnies traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra. Cette réduction est hautement significative pour les concentrations 0.1, 1 et 2 mg/L ( $p \leq 0.01$ ) et très hautement significative pour la plus forte concentration de l'herbicide ( $p = 0.001$ ), passant ainsi, d'un  $I_p$  d'environ 0.2 indiquant un comportement phototactique positif chez les daphnies témoins, à un  $I_p$  d'environ -0.7 représentant un comportement phototactique extrêmement négatif chez les traitées par la concentration 4 mg/L.

La comparaison entre les effets des différentes concentrations par l'analyse de la variance (ANOVA), révèle des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ).

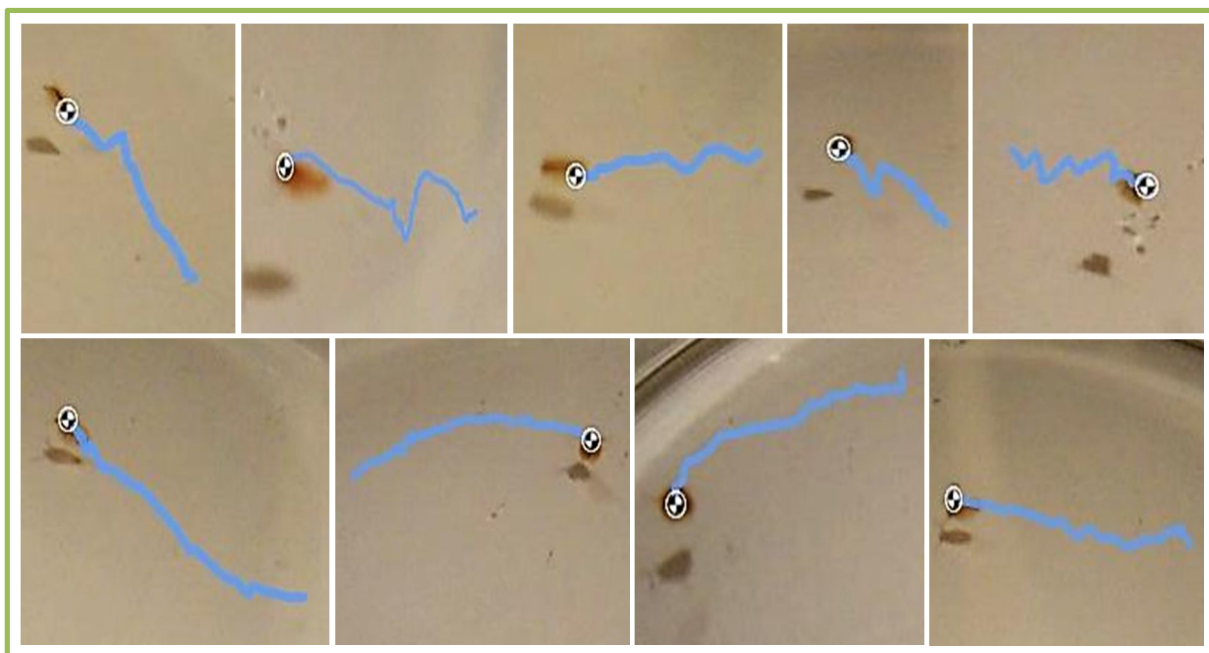


**Figure 63 :** Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur le comportement phototactique de *Daphnia magna*

### 3.2.3. Effet de Focus Ultra sur les trajectoires de déplacement

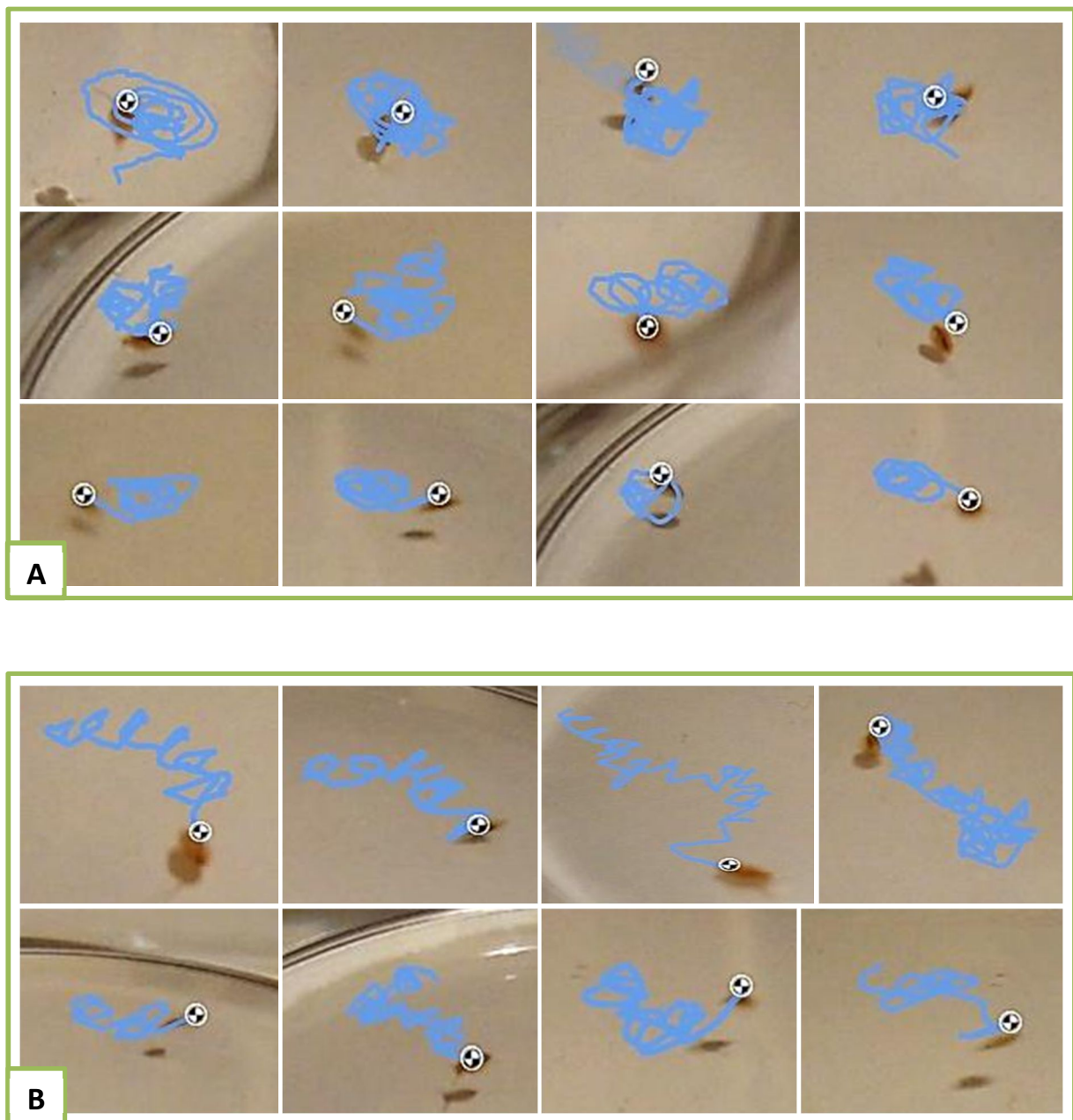
Les trajectoires enregistrées par les daphnies témoins sont représentées dans la figure (64).

Nous apercevons qu'en absence de Focus Ultra, les daphnies se déplacent par des mouvements saccadés en effectuant de lentes migrations horizontales et verticales assurées par les battements de leurs antennes secondaires (Figure 64).

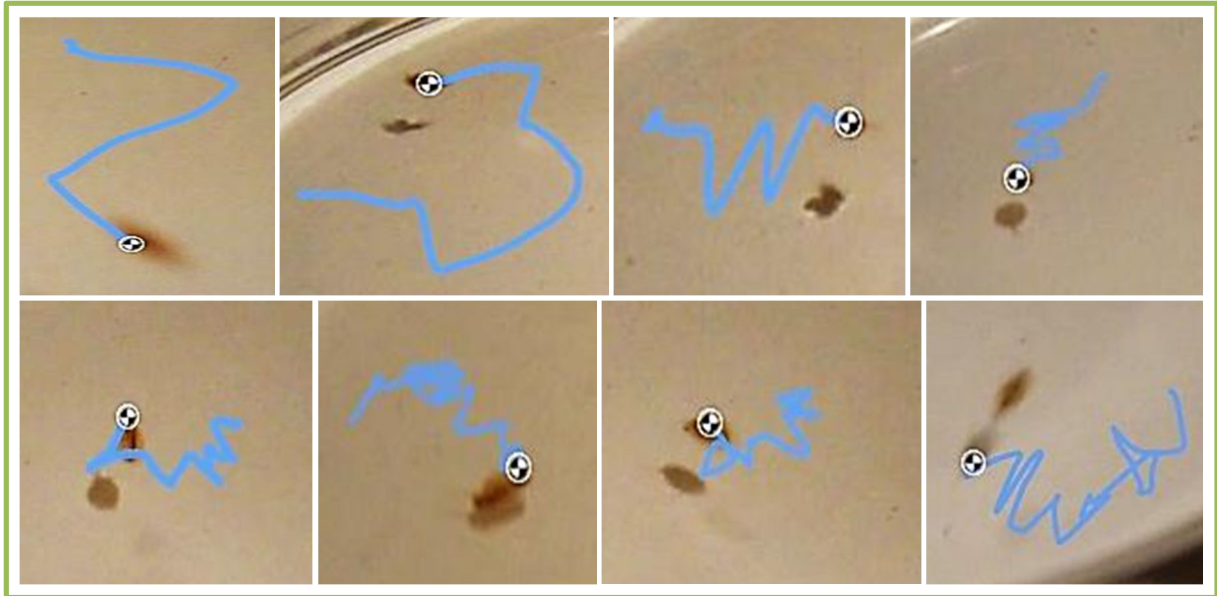


**Figure 64 :** Trajectoires de mouvements enregistrées par les témoins de *Daphnia magna*

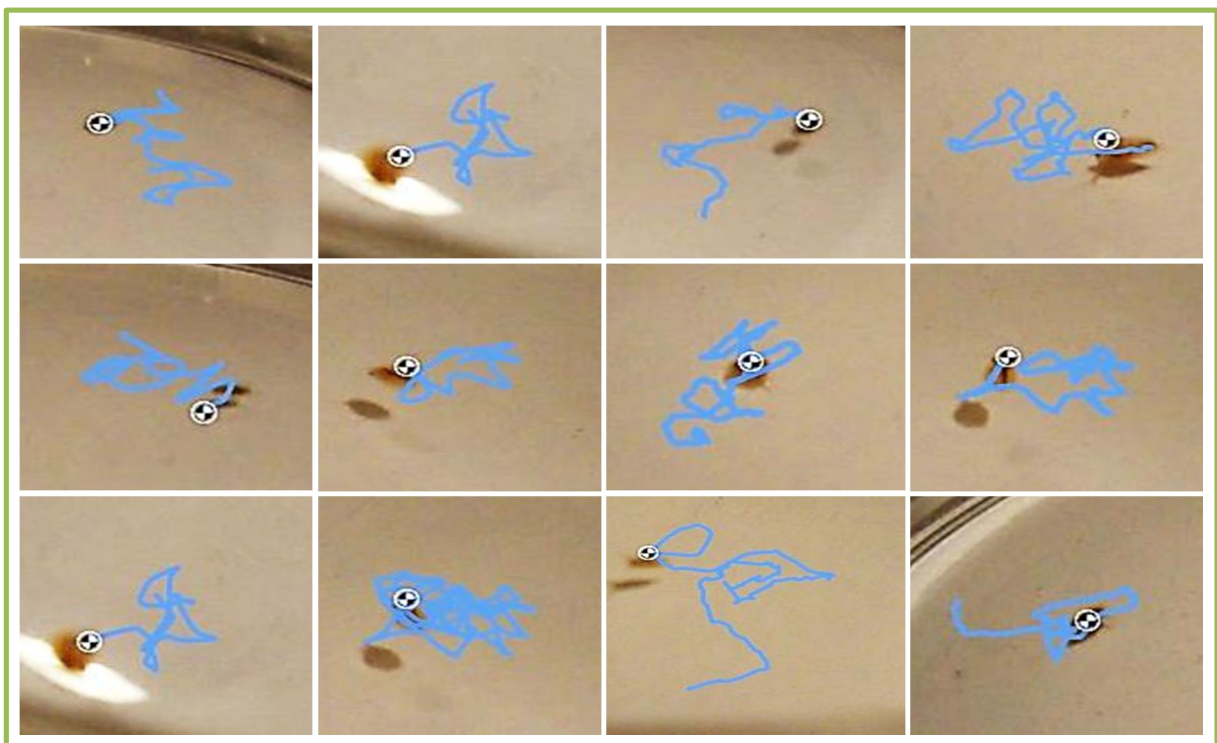
Les figures (65), (66) et (67), représentatives des différentes trajectoires induites chez *Daphnia magna* par l'exposition aux concentrations (1, 2 et 4 mg/L) de Focus Ultra, indiquent clairement une perturbation du comportement natatoire exprimée par des mouvements complètement désorganisés et irréguliers. Les daphnies se déplacent ainsi selon des trajectoires circulaires (Figure 65 A) et quasi-hélicoïdales (Figure 65 B) accompagnées d'une rotation sur place et des mouvements en zigzag (Figure 66). Aux plus fortes concentrations (2 et 4 mg/L) de l'herbicide, nous observons que les daphnies sont beaucoup plus excitées et présentent des mouvements aléatoires avec des changements fréquents de direction (Figure 67).



**Figure 65 :** Trajectoires circulaires (A) et quasi-hélicoïdales (B) induites chez *Daphnia magna* par l'exposition aux concentrations (1, 2 et 4 mg/L) de Focus Ultra



**Figure 66 :** Trajectoires en zigzag induites chez *Daphnia magna* par l'exposition aux concentrations (1, 2 et 4 mg/L) de Focus Ultra



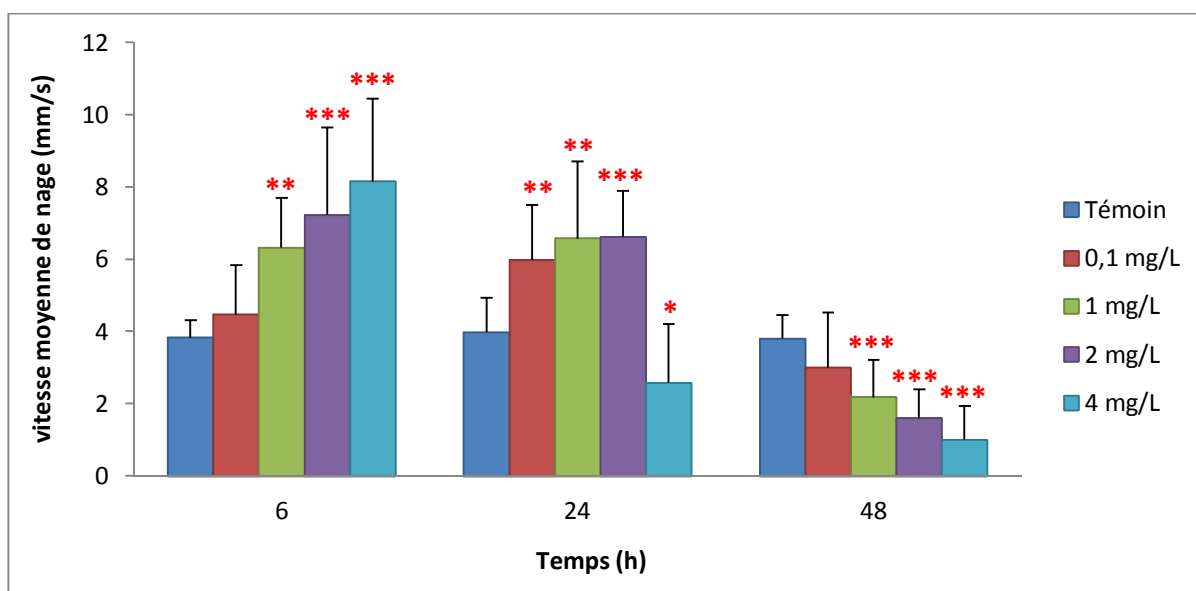
**Figure 67 :** Mouvements aléatoires observés chez *Daphnia magna* exposée aux plus fortes concentrations (2 et 4 mg/L) de Focus Ultra

### 3.2.4. Effet de Focus Ultra sur la vitesse de nage

La figure (68) illustre les variations de la vitesse de nage de *Daphnia magna* en fonction des concentrations croissantes de Focus Ultra et du temps d'exposition.

Nous constatons qu'aux premières 6h de traitement, la vitesse moyenne de nage tend à augmenter de manière dose dépendante chez les daphnies traitées par rapport aux témoins. L'augmentation la plus prononcée est observée à la plus forte concentration (4 mg/L) où nous notons une vitesse moyenne maximale de  $(8.16 \pm 2.28 \text{ mm/s})$ , par rapport à celle des témoins qui n'est que de  $(3.84 \pm 0.46 \text{ mm/s})$ . Cette augmentation se poursuit jusqu'à la 24<sup>ème</sup> heure d'exposition où nous remarquons chez les individus traités par la concentration (4 mg/L) une diminution significative de la vitesse moyenne estimée à environ 36%. Après 48h d'exposition, la vitesse de nage se ralentit de manière progressive et très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez les daphnies exposées aux concentrations (1, 2 et 4 mg/L), pour atteindre respectivement  $(2.19 \pm 1.02 \text{ mm/s})$ ,  $(1.60 \pm 0.79 \text{ mm/s})$  et  $(1.00 \pm 0.93 \text{ mm/s})$ , comparativement à celle des témoins qui est de l'ordre de  $(3,81 \pm 0.64 \text{ mm/s})$ .

La comparaison entre les effets des concentrations croissantes de Focus Ultra par l'analyse de la variance (ANOVA), révèle des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ), et ce pour toutes les durées d'exposition.



**Figure 68 :** Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la vitesse de nage de *Daphnia magna* en fonction du temps

#### 4. Discussion

L'étude des réponses comportementales offre l'avantage d'établir une relation privilégiée et ciblée entre les effets toxiques observés à l'échelle cellulaire/biochimique et les impacts observés à l'échelle des populations ou des communautés (Rinderhagen et *al.*, 2000; Wallace et Estephan, 2004 ; Mills et *al.*, 2006). Elle permet ainsi de poser les premiers jalons de la compréhension des conséquences d'une perturbation des écosystèmes (Surnom, 2012). Dans cette optique, un intérêt croissant est porté à l'étude des biomarqueurs comportementaux dans les tests écotoxicologiques. Afin d'appréhender les mécanismes comportementaux mis en place chez *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* lors d'une exposition au Focus Ultra, nous nous sommes intéressés spécialement à l'étude de quelques paramètres comportementaux relatifs à la locomotion, le cas présent, le comportement natatoire, qui est un bioindicateur prometteur, commun à toutes les espèces aquatiques.

L'évitement, en particulier, est le comportement locomoteur le plus apparent chez l'espèce *Paramecium* au contact d'un obstacle: en se propulsant par des cils, la paramécie évite tous types de stimuli externes qu'ils soient physiques ou chimiques en reculant et nageant dans une nouvelle direction. Ainsi, **en présence des concentrations croissantes de Focus Ultra les paramécies nagent vers l'arrière par un mouvement rapide, puis repartent en avant avec un angle de déviation, jusqu'à l'évitement total de l'obstacle.** Nos observations concordent avec les travaux de Takiguchi et *al.*, (2002), Venkateswara et *al.* (2006) et Azzouz (2012) qui ont étudié respectivement l'effet de l'acide 2,4-Dichlorophoxyacétique, l'Acéphate et le Glyphosate sur le comportement locomoteur de *Paramecium caudatum* et *Paramecium tetraurelia*. Ces auteurs ont mis en évidence l'apparition du phénomène de **"backward swimming" (nage vers l'arrière)** en présence des xénobiotiques testés. La création d'un changement dans le potentiel membranaire constitue une hypothèse plausible concernant ce phénomène d'évitement observé dans notre étude (Haga et *al.*, 1982 ; Schultz et *al.*, 1992 ; Takiguchi et *al.*, 2002). En effet, selon Naitoh et Eckert (1969) et Naitoh et *al.* (1972), la collision d'une paramécie avec un obstacle est censée stimuler mécaniquement la partie antérieure de la cellule. Cette stimulation est à l'origine d'une induction de l'activation des canaux calciques mécano-sensibles de la membrane cellulaire, conduisant à une dépolarisation membranaire qui provoque une augmentation du flux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cils, à travers l'activation des canaux calciques voltage-dépendant de la membrane ciliaire (Ogura et Takahashi, 1976 ; Dunlap, 1977 ; Machemer et Ogura, 1979). Il est à noter que la

repolarisation membranaire est produite après l'ouverture retardée des canaux potassiques (Schultz et *al.*, 1992). De même, Les expériences de Symington et *al.*, (1999) suggèrent que certains pesticides sont toxiques à travers la modification du mécanisme d'ouverture des canaux calciques associés à la ciliature membranaire ce qui induit une augmentation de l'influx du  $\text{Ca}^{2+}$ , accompagnée d'une forte dépolarisation membranaire se traduisant par une inversion de la direction des battements ciliaires et l'enclenchement de la nage en arrière et l'évitement.

En parallèle, **nos résultats concernant les mouvements de déplacement de *Paramecium tetraurelia* montrent une perturbation de la nage en présence des concentrations croissantes de Focus Ultra. Ainsi les paramécies déploient une multitude de trajectoires irrégulières et désordonnées caractérisées par des mouvements en zig-zag, des mouvements circulaires, des changements brutaux de directions suivis d'une nage vers l'arrière et des rotations sur place.** Ces observations sont conformes aux travaux de Azzouz (2012) et Sbartai (2013) qui ont étudié l'effet du Glyphosate et du Bifénazate sur les trajectoires de déplacement de *Paramecium tetraurelia* et *Paramecium sp*, respectivement. Comme l'ont souligné précédemment Bernal et Ruvalcaba (1996), il est connu que la paramécie se déplace en tournant autour d'un axe longitudinal, selon un mouvement hélicoïdal. Cependant, Elle peut changer brusquement de direction et faire marche arrière. Ils rajoutent que la présence de concentrations élevées de plomb provoque une réduction du mouvement en tourbillon créé par les battements ciliaires chez les paramécies exposées. Kung (1971), Hildebrand et Dryl (1983) et Machemer (2001) observent, quant à eux, qu'une fois stimulées, les paramécies avancent rapidement selon une trajectoire droite ou au contraire reculent en arrière. En cas d'un stimulus provenant de tous les côtés, elles adoptent une nage aléatoire avec des changements brutaux de directions. Campan et Scapini (2002) et Ishikawa et Hota (2006) stipulent également que les paramécies évitent les télescopages entre elles en déviant leurs trajectoires. Selon Van Houten et Preston (1988), les paramécies détectent la présence de nombreuses substances chimiques dans leur milieu et réagissent face à ce type de stimuli en changeant leur comportement migratoire/natatoire. L'ensemble de ces modifications des voies de migration ou des trajectoires de déplacement impliquent une augmentation et/ou une diminution de la vitesse de nage, des altérations de l'amplitude ou la fréquence de rotation et des changements brusques de direction de migration. Ce mécanisme électrophysiologique de la chimio-orientation est appelé « Chemokinesis » (chimiokinèse). Machemer (1986, 2001), explique à son tour le changement soudain de la voie de

déplacement par la stimulation de la membrane cellulaire conduisant à une dépolarisation et une hyperpolarisation membranaires continues.

D'autre part, **nous avons mis en évidence une stimulation progressive de la vitesse de déplacement chez les paramécies traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra.** Ce phénomène pourrait être la conséquence de la perturbation du flux de calcium et de potassium, ce qui pourrait induire un déséquilibre au niveau du potentiel membranaire et avoir une répercussion sur la motilité et la vitesse de déplacement chez *Paramecium tetraurelia*. C'est ce que propose également Azzouz (2012) pour expliquer la forte excitation des paramécies en présence des deux xénobiotiques testés (Glyphosate et Amistar Xtra). Les mêmes constatations ont été rapportées antérieurement par Offen et Roberts (1973) chez *Paramecium caudatum* suite à une exposition à un faible champ électrique. De plus, les expériences de Venkateswara et *al.* (2006) et Hamel et *al.* (2011) montrent que sous l'effet d'un stimulus faible, les paramécies se déplacent avec une vitesse de nage stable. Suite à un stimulus plus important, les battements ciliaires sont plus rapides induisant une accélération des déplacements. Cependant, en présence d'un stimulus fort et brutal, les paramécies déploient un système de défense qui ne dépend pas des battements ciliaires mais de la libération soudaine d'un groupe de trichocystes qui se dirigent vers l'objet du stimulus permettant ainsi aux cellules d'échapper à l'agression. Selon Klauke et *al.* (2000) et Iwadate (2003), l'apparition de ce phénomène est principalement lié à une variation du flux de calcium chez les paramécies stimulées.

L'autre aspect auquel nous nous sommes intéressés dans cette partie de notre travail concerne le suivi des variations comportementales observées chez le microcrustacé *Daphnia magna* après exposition au Focus Ultra. En premier lieu, **nous avons mis en évidence une inhibition dose-dépendante et significative de la capacité natatoire des daphnies traitées par rapport aux témoins, et ce en fonction du temps.** Les mêmes résultats ont été rapportés antérieurement par Christensen et *al.* (2005) chez la même espèce en présence des concentrations croissantes de Cyperméthrine. Nous avons ainsi remarqué que les daphnies témoins nagent immédiatement vers les bords de la zone expérimentale dès leur contact avec la paroi de l'anneau centrale. Selon Christensen et *al.* (2005), ce comportement est appelé "thigmotaxie", et est défini comme une réponse directionnelle d'un organisme mobile à un contact continu avec une surface solide, phénomène qu'ont également relevé Van Gool et Ringelberg (1998a,b) et Burks et *al.* (2001, 2002) chez les daphnies qui, en situations de

danger, ont tendance à s'orienter vers les endroits sombres et les lits de macrophytes en profondeur pour se protéger des prédateurs. Toutefois, la réduction progressive de la capacité natatoire enregistrée dans notre travail pourrait probablement être liée à une désorientation des daphnies exposées au Focus Ultra, ce qui a pour conséquence une altération du comportement migratoire. C'est ce que constatent également Goodrich et Lech (1990) chez *Daphnia magna* après exposition au Lindane. Nous pouvons, en outre, émettre l'hypothèse d'une adsorption/accumulation du xénobiotique sous la carapace des daphnies, limitant ainsi leurs mouvements, ce qu'observent aussi Artells et al. (2013) lors de leur étude menée sur la performance de nage de deux espèces de daphnies (*Daphnia pulex* et *Daphnia similis*) en présence de différentes concentrations de nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO<sub>2</sub>).

La lumière, qui constitue un stimulus pour divers organes sensoriels, peut agir sur le déplacement des organismes et provoquer deux types de réactions: une modification de la cinétique de locomotion et un changement d'orientation de l'animal (Sacchi et Testard, 1971). On parle donc du comportement phototactique, qui est une réaction d'orientation d'un organisme par rapport à la lumière, pouvant être soit négative (fuite de la lumière) ou positive (attraction par la lumière). C'est le résultat d'effets intégrés sur les systèmes nerveux et musculaire (Di Delupis et Rotondo, 1988). En effet, de nombreux travaux ont rapporté l'intérêt de l'utilisation du comportement phototactique comme excellent biomarqueur pour la biosurveillance de la qualité des eaux, tout en soulignant sa perturbation voire même son inhibition sous l'effet d'une multitude d'agents polluants (Whitman et Miller, 1982 ; Ohman et al. 1983 ; Loose et Dawidowicz, 1994 ; Michels et al. 1999 ; Martins et al. 2007b ; Wu et al. 2008). Ainsi, **l'inhibition de la réponse phototactique que nous observons dans notre travail chez les microcrustacés exposés au Focus Ultra est probablement liée à une forte accumulation de l'herbicide au niveau de l'œil composé**, qui est constitué d'un ensemble de photorécepteurs sensibles à la lumière, ce qui a pour conséquence une perturbation de la photoréception. Comme l'ont montré Bianchini et al. (2005) chez *Daphnia magna*, l'accumulation de l'argent (Ag<sup>+</sup>) dans la région oculaire pourrait être due à une augmentation de l'activité des composés et des enzymes de détoxification, y compris le glutathion et la GST, qui sont riches en groupements (SH), en plus des cristallines de la lentille oculaire qui participent grandement à la protection de ces structures vitales contre le stress oxydatif (Bianchini et al., 2005). De la même manière, Kolkmeier et Brooks (2013) ont constaté que l'activité musculaire accrue en conditions de stress pourrait également contribuer à la réduction de la performance de nage et l'inhibition de la phototaxie. D'après les travaux

d'Amiard (1976), il est possible que la phototaxie ne soit altérée que de façon passagère, soit par action directe sur le système nerveux, soit par action sur le mécanisme de locomotion lui-même. Les résultats établis par Michels et *al.* (2000) ont aussi révélé une réduction significative de la capacité phototactique chez *Daphnia magna* exposée au Cadmuim.

D'autre part, Au vu de nos observations, **les daphnies montrent des fluctuations de l'activité natatoire en fonction des concentrations croissantes de Focus Ultra. Ces changements de comportement sont visibles grâce aux études de la forme des trajectoires de nage. Ainsi, nos résultats ont permis d'identifier un large éventail de mouvements complètement désorganisés caractérisés par des trajectoires circulaires et quasi-hélicoïdales accompagnés d'une rotation sur place, des trajectoires en zigzag ainsi que des mouvements rapides, aléatoires et irréguliers, suivis de brusques changements d'orientation.** Ces constatations sont en accord avec les travaux de Shimizu et *al.* (2002) qui ont analysé la réponse comportementale de *Daphnia magna* en présence et en absence de  $\text{CuSO}_4$ , en mesurant la dimension fractale de la trajectoire de nage (mesure mathématique qui décrit la configuration ou la géométrie fondamentale d'un système). Cette méthode permet d'identifier la structure et le degré de complexité de la trajectoire de déplacement. Les résultats de cette étude ont révélé que les trajectoires de nages sont plus complexes et circulaires chez les individus exposés au  $\text{CuSO}_4$ , avec un diamètre du cercle circonscrit (le cercle dont le diamètre est défini comme la plus grande distance entre deux points quelconques de la trajectoire) beaucoup plus petit que celui de la trajectoire obtenue par une daphnie témoin. Plusieurs facteurs abiotiques, tel que la température, peuvent également avoir un impact significatif sur le comportement locomoteur de *Daphnia magna*. C'est un facteur potentiel de stress qui peut modifier les effets toxiques des xénobiotiques (Messiaen et *al.*, 2010 ; Muysen et *al.*, 2010). Les travaux de Bownik et *al.* (2014) ont montré que l'exposition des daphnies à un stress thermique entraîne une perturbation des mouvements natatoires. En effet, à une température de 37° C, les daphnies nagent de façon erratique et rapide s'orientant dans toutes les directions, comparativement aux individus témoins qui se caractérisent par une homogénéité et une coordination des mouvements. Cependant, les daphnies exposées à une température de 40° C ont tendance à avoir des mouvements ralentis avec des trajectoires circulaires allant jusqu'à l'immobilisation complète à 42° C. Ce changement de comportement pourrait être la conséquence d'une « **réaction spontanée d'évitement** » de la chaleur (Lagerspetz, 2000 ; Paul et *al.*, 2004), phénomène qui a été

également observé chez plusieurs espèces en réponse à un stress chimique (Sager et *al.* 2000 ; Erik et *al.* 2005 ; Eriksson Wiklund et *al.* 2006 ; Ren et *al.*, 2009).

Beaucoup de travaux ont démontré que les polluants environnementaux, perturbent considérablement l'activité natatoire et par conséquent la vitesse de nage chez les daphnies (Shimizu et *al.*, 2002 ; Schmidt et *al.*, 2005 ; Nikitin et *al.*, 2015 ). Dans ce sens, **nos résultats ont mis en évidence une altération marquée de la vitesse de nage chez les daphnies traitées par Focus Ultra. Cette altération s'est ainsi traduite par une forte excitation des individus aux premières 24 heures d'exposition.** Selon Amiard et *al.* (2013), cette hyperactivité pourrait essentiellement être le résultat d'une réponse d'évitement qui est une stratégie protectrice permettant aux daphnies de s'échapper activement des environnements pollués. Les mêmes constatations ont été récemment rapportées par Chevalier et *al.* (2014) chez la même espèce exposée à l'esfenvalérate (insecticide). D'après ces auteurs l'augmentation de la vitesse de nage pourrait être exclusivement liée à la modulation de l'activité des canaux sodiques, par induction de leur blocage réversible au niveau des neurones, ce qui conduit à une altération du potentiel d'action le long de l'axone résultant ainsi en une hyper-excitation neuromusculaire (Hodgson, 2004). Toutefois, **le ralentissement significatif de la vitesse de nage des daphnies observé après 48h d'exposition au Focus Ultra pourrait être attribué à une forte réduction de l'activité neuromusculaire suite à une perte accrue d'énergie dans d'autres processus physiologiques notamment ceux de la biotransformation du xénobiotique.** Ces résultats corroborent d'ailleurs ceux obtenus antérieurement par Untersteiner et *al.* (2003) et Werth (2006) chez *Daphnia magna* exposée aux concentrations sublétales de cyperméthrine et de cuivre, respectivement. De plus, Baillieul et Blust (1999) ont rapporté que la présence de concentrations croissantes de cadmium provoque une diminution progressive de la fréquence de battement des antennes secondaires responsables de l'activité natatoire de *D. magna*, qui pourrait probablement être la raison directe d'une défaillance neurologique. Wolf et *al.* (1998) suggèrent quant à eux que les altérations comportementales observées chez les daphnies en conditions de stress sont considérées comme une réaction typique de protection, caractérisée en première ligne par une diminution de l'activité locomotrice (vitesse de nage) due à la perte de coordination musculaire. **Il convient de souligner que la diminution de la vitesse de nage est apparue plus précocement chez les daphnies traitées par la plus forte concentration de Focus Ultra (après 24h d'exposition), éventuellement en raison de l'ampleur du stress subi et l'intensité des altérations neuromotrices qui en résultent.**

***Chapitre VI:***  
***Etude du stress oxydant***

## 1. Introduction

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles (Favier, 2003 ; Delattre et *al.* 2005). La réduction univalente de l'oxygène résulte en la formation d'espèces oxygénées activées (EOA) dont font partie les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle), le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'ADN avec, comme conséquence, une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés (Gueye, 2007). En situation normale, les EOA sont produites en permanence par l'organisme (rôle physiologique) mais un système efficace de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif (Pincemail et *al.*, 1998).

Le stress oxydant peut être diagnostiqué par deux principales voies d'approche ; soit par évaluation de la teneur des espèces pro-oxydantes, soit par mesure de l'efficacité du système de défense antioxydant (Sekli-Belaidi, 2011). Dans cette partie de notre travail, nous nous focalisons sur l'évaluation de la capacité de Focus Ultra à générer un stress oxydatif chez *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* à travers le suivi des variations des activités des biomarqueurs non-enzymatiques et enzymatiques les plus impliqués dans les mécanismes de défense antioxydante contre ce stress.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Détermination du taux de glutathion (GSH)

Le taux de GSH est quantifié selon la méthode de Weckbeker et Cory (1988), dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5-mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion. La lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 412 nm et les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol/mg}$  de protéines.

La teneur en GSH est déterminée par la formule suivante :

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

Où :

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

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

L'activité GST est mesurée selon la méthode décrite par Habig et *al.*, (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH). La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm et les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

L'activité de l'enzyme est obtenue par application de la formule suivante :

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

Où :

- ❖  **$\Delta DO$**  : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- ❖  **$Vt$**  : Volume total de la cuve (1.4 ml).
- ❖  **$e$**  : Coefficient d'extinction molaire du CDNB ( $9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
- ❖  **$Vs$**  : Volume du surnageant (0,2 ml).
- ❖ **mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg.

### 2.3. Mesure de l'activité catalase (CAT)

La mesure de l'activité catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de Claiborne (1985). Elle repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée et la décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant 30 secondes (lecture toutes les 15 s) à une longueur d'onde de 240 nm.

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

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

Où :

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

### 2.4. Mesure de l'activité Lactate déshydrogénase (LDH)

La détermination de l'activité LDH est réalisée selon la méthode décrite par Hill et Levi (1954) où la LDH catalyse la conversion réversible du lactate en pyruvate. L'activité de la lactate déshydrogénase est mesurée suivant la vitesse d'oxydation de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD : coenzyme) puisée dans la réaction. La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5 mn à une longueur d'onde de 340 nm.

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

$$LDH (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO * Vt}{e * Vs * \text{mg de protéines}}$$

Où :

- ❖  $\Delta DO$  : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- ❖  $e$  : Coefficient d'extinction molaire du NAD ( $6.22 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).
- ❖  $V_t$  : Volume total de la cuve (0.775 ml).
- ❖  $V_s$  : Volume du surnageant dans la cuve (0.050 ml).
- ❖ **mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg.

### 2.5. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique est estimée par la quantification du taux de MDA selon la méthode de Draper et Hadley (1990). Cette technique est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA), qui donne un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm. Les résultats de ce paramètre sont exprimés en  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines.

La concentration de MDA est calculée selon la formule suivante :

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

Où :

- ❖ **DO** : Densité Optique.
- ❖ **V<sub>t</sub>** : Volume total de la cuve (1ml).
- ❖ **e** : Coefficient d'extinction du TBA ( $156 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).
- ❖ **V<sub>s</sub>** : Volume du surnageant (0,5 ml).
- ❖ **mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg.

### 3. Résultats

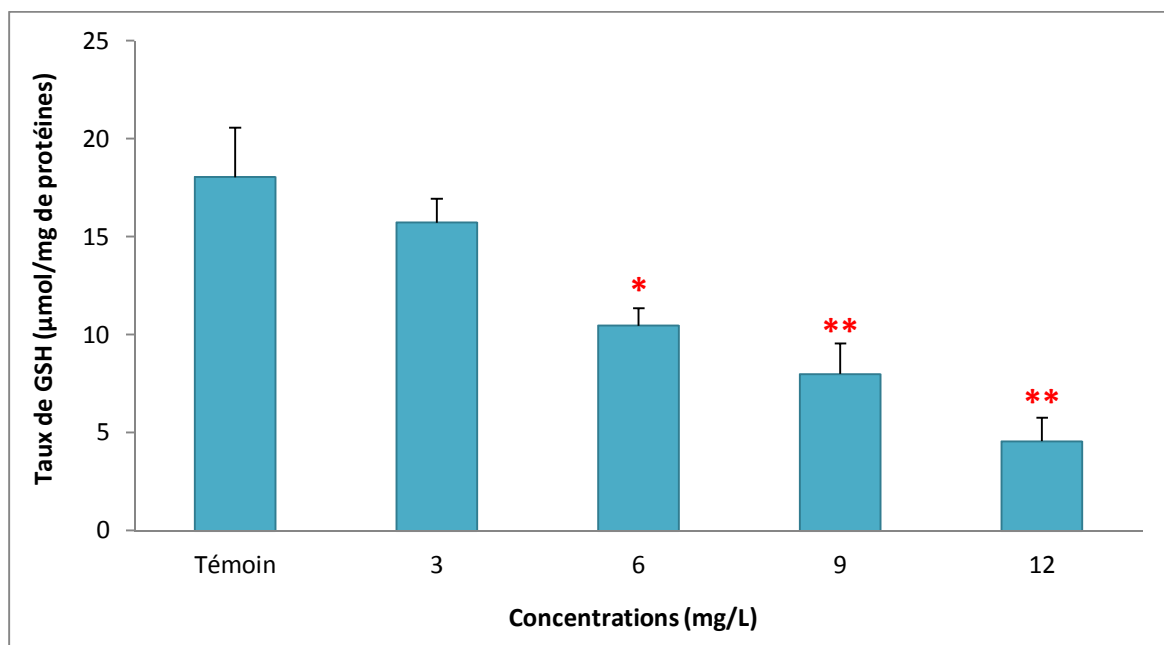
#### 3.1. Effet de Focus Ultra sur l'évolution du taux de glutathion (GSH)

##### ➤ Chez *Paramecium tetraurelia*

La figure (69) illustre l'évolution du taux de GSH en présence de concentrations croissantes de Focus Ultra.

Nous constatons une diminution dose dépendante du taux de GSH chez les paramécies traitées par rapport aux témoins. Cette déplétion est significative pour la concentration 6 mg/L ( $p = 0.039$ ), et hautement significative ( $p = 0.010$ ) pour les deux plus fortes concentrations de l'herbicide (9 et 12 mg/L). En effet, le taux de GSH passe de 18.05  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines chez les paramécies témoins à 10.47  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines chez les cellules traitées par la concentration 6 mg/L, et atteint jusqu'à 7.99 et 4.57  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines chez les traitées par les concentrations 9 et 12 mg/L, respectivement.

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle des différences très hautement significatives entre les effets des différentes concentrations de Focus Ultra ( $p = 0.000$ ).



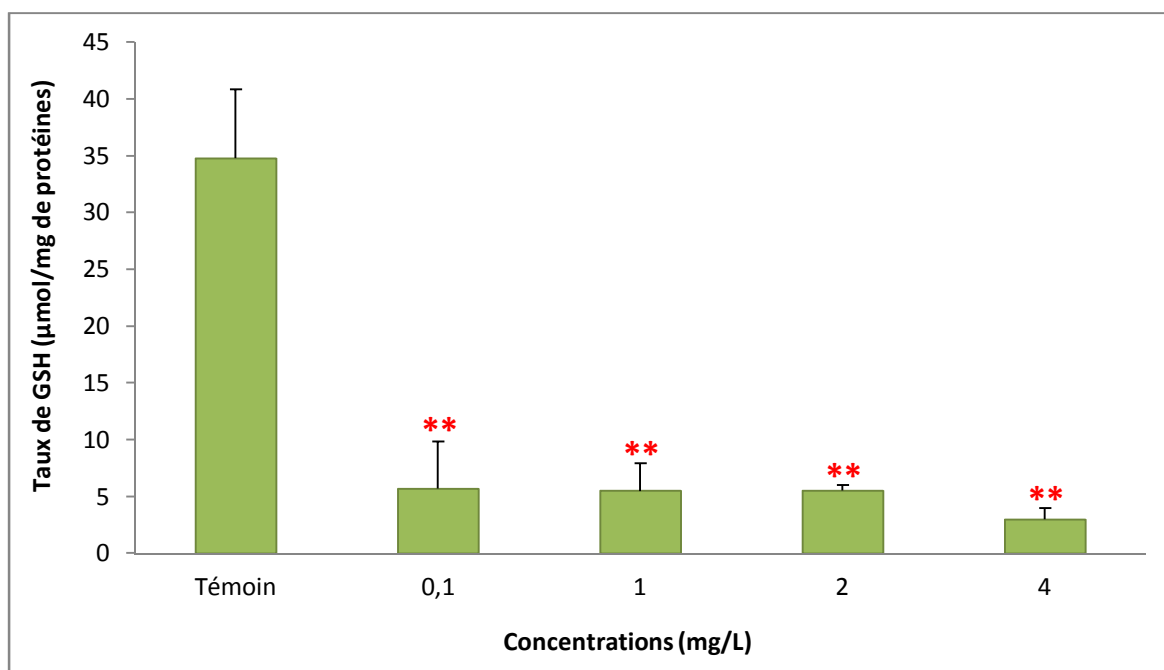
**Figure 69 :** Variation du taux de GSH chez *Paramecium tetraurelia* exposée aux concentrations croissantes de Focus Ultra

➤ *Chez Daphnia magna*

Les variations du taux de GSH chez les daphnies témoins et traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra sont représentées dans la figure (70).

Nous remarquons que le taux de GSH tend à diminuer de manière dose dépendante et hautement significative ( $p < 0.01$ ) par rapport aux témoins pour toutes les concentrations retenues. Ainsi, ce taux varie de  $35.80 \mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines chez les daphnies témoins à  $2.99 \mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines chez celles traitées par la plus forte concentration (4 mg/L), ce qui correspond à un pourcentage de diminution d'environ 91.40%.

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle un effet très hautement significatif du traitement par Focus Ultra ( $p = 0.000$ ).



**Figure 70 :** Variation du taux de GSH chez *Daphnia magna* exposée aux concentrations croissantes de Focus Ultra

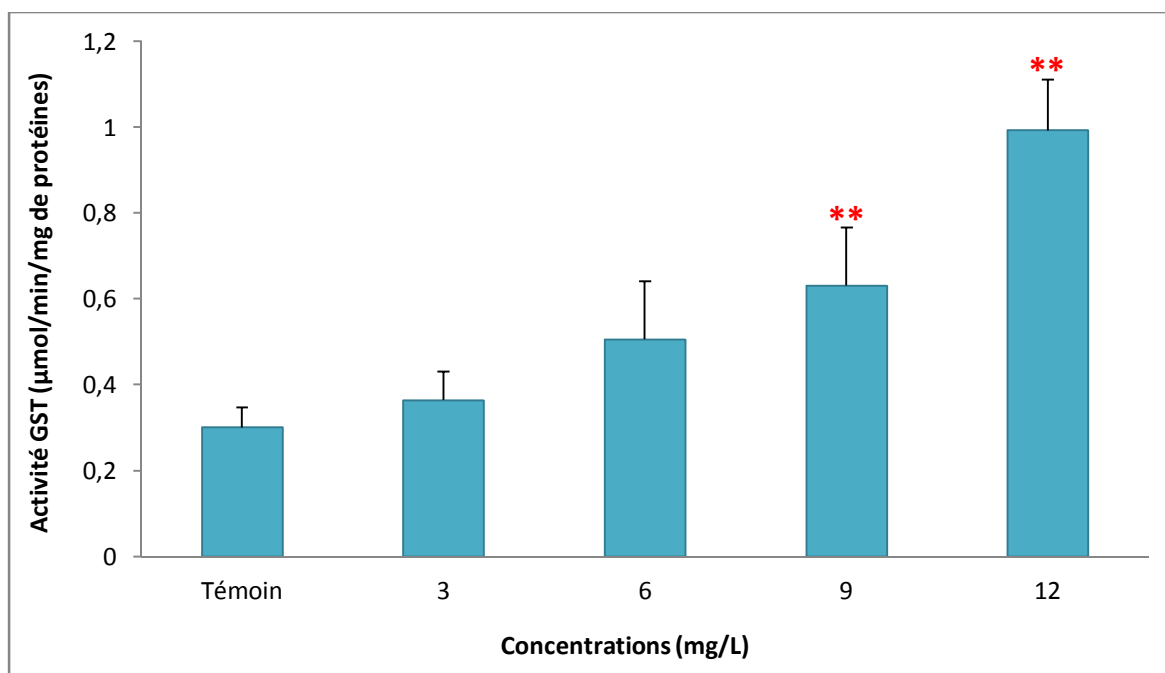
### 3.2. Effet de Focus Ultra sur l'évolution de l'activité glutathion-S-transférase (GST)

#### ➤ Chez *Paramecium tetraurelia*

La figure (71) met en évidence la variation de l'activité GST chez les paramécies traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra.

Nous constatons une stimulation dose dépendante de l'activité GST chez les cellules traitées par l'herbicide. Aux plus fortes concentrations (9 et 12 mg/L), cette diminution est hautement significative ( $p < 0.01$ ), elle est respectivement de l'ordre de 0.63 et 0.99  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines comparée à celle des témoins qui ne dépasse pas 0.3  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

L'analyse de la variance (ANOVA) montre un effet très hautement significatif du traitement par les concentrations croissantes de l'herbicide ( $p = 0.000$ ).



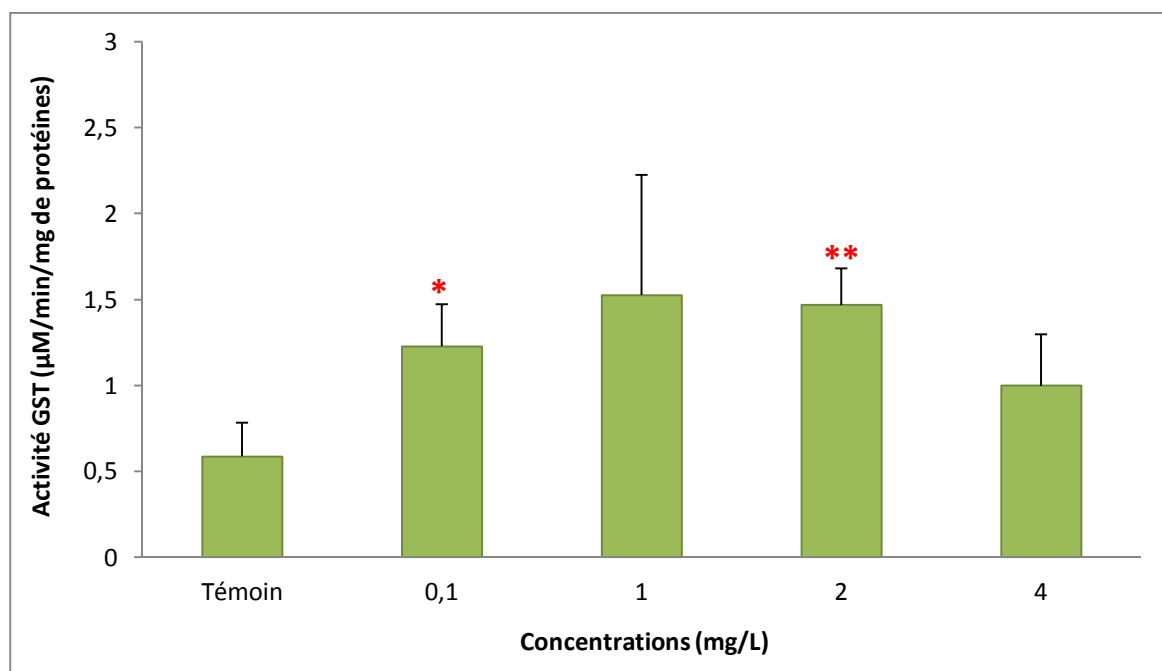
**Figure 71 :** Evolution de l'activité GST chez *Paramecium tetraurelia* en fonction des concentrations croissantes de Focus Ultra

➤ *Chez Daphnia magna*

La figure (72) illustre la variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes de Focus Ultra.

Nos résultats mettent en évidence une augmentation significative ( $p = 0.037$ ) de l'activité GST chez les daphnies traitées par la concentration 0.1 mg/L, et hautement significative ( $p = 0.010$ ) pour les traitées par la concentration 2 mg/L, par rapport aux témoins. En effet, l'activité GST varie de 1.42 à 1.46  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines pour les daphnies traitées par les concentrations (0.1 et 2 mg/L), respectivement, alors qu'elle n'est que de 0.58  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines chez les individus témoins. Toutefois, nous enregistrons une activité enzymatique plus ou moins faible chez les daphnies traitées par la plus forte concentration (4 mg/L), mais qui reste néanmoins plus élevée que celle des témoins.

La comparaison entre les effets des concentrations croissantes de Focus Ultra par l'analyse de la variance (ANOVA), indique des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ).



**Figure 72 :** Evolution de l'activité GST chez *Daphnia magna* en fonction des concentrations croissantes de Focus Ultra

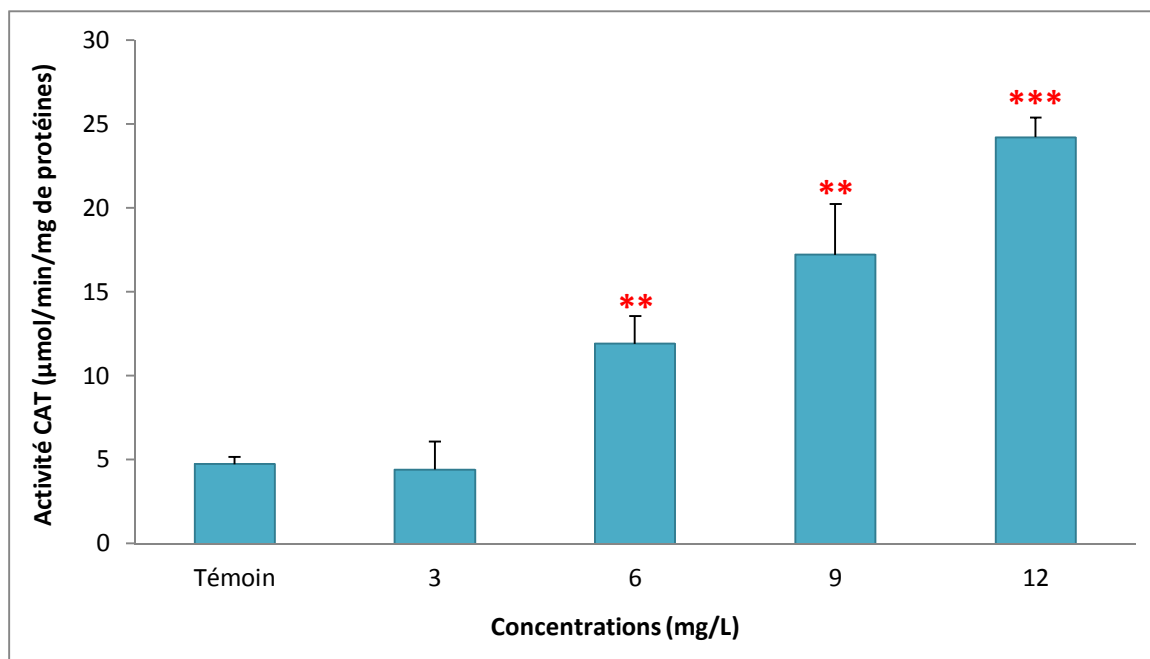
### 3.3. Effet de Focus Ultra sur la variation de l'activité catalase (CAT)

#### ➤ Chez *Paramecium tetraurelia*

Les résultats concernant l'évolution de l'activité CAT chez les paramécies témoins et traitées par les différentes concentrations de Focus Ultra sont représentés dans la figure (73).

Nous remarquons que la présence de l'herbicide induit une augmentation dose dépendante de l'activité CAT chez les paramécies traitées. Cette augmentation est très hautement significative ( $p = 0.001$ ) pour celles traitées par la plus forte concentration (12 mg/L). Ainsi, la valeur enregistrée chez les témoins est de 4,75  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines. Toutefois, elle varie entre 11.93 et 17.22  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines chez les paramécies traitées par les concentrations 6 et 9 mg/L, respectivement, et atteint un niveau maximal de 24.23  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines pour celles traitées par la concentration 12 mg/L de Focus Ultra.

La comparaison entre les effets des concentrations croissantes de l'herbicide par l'analyse de la variance (ANOVA), révèle des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ).



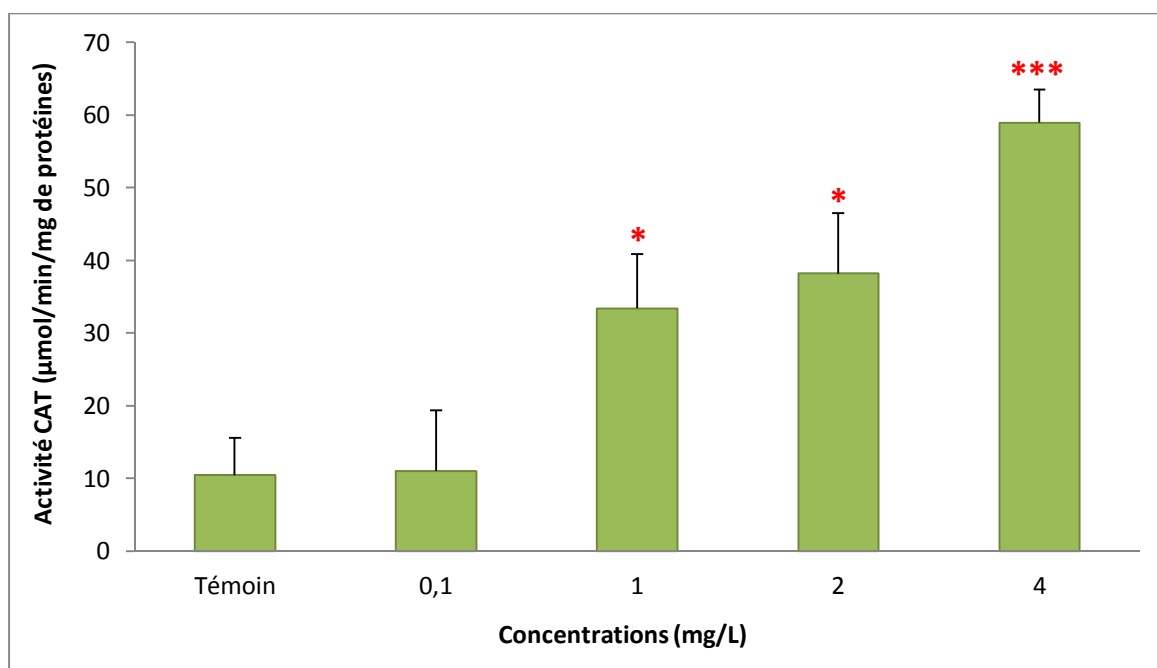
**Figure 73** : Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la variation de l'activité CAT chez *Paramecium tetraurelia*

➤ *Chez Daphnia magna*

La figure (74) illustre les effets des différentes concentrations de Focus Ultra sur la variation de l'activité CAT.

Nous constatons une stimulation dose dépendante de l'activité CAT chez les daphnies traitées par l'herbicide. Cette augmentation est très hautement significative pour la plus forte concentration (4 mg/L) par rapport aux témoins ( $p = 0.001$ ). En effet, nous notons une activité enzymatique d'environ  $9.62 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines chez les individus témoins, tandis que pour les traités par les concentrations 1, 2 et 4 mg/L, elle atteint respectivement 33.44, 36.11 et  $58.24 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

L'analyse de la variance (ANOVA) met en évidence l'existence de différences très hautement significatives entre les effets des différentes concentrations ( $p = 0.000$ ).



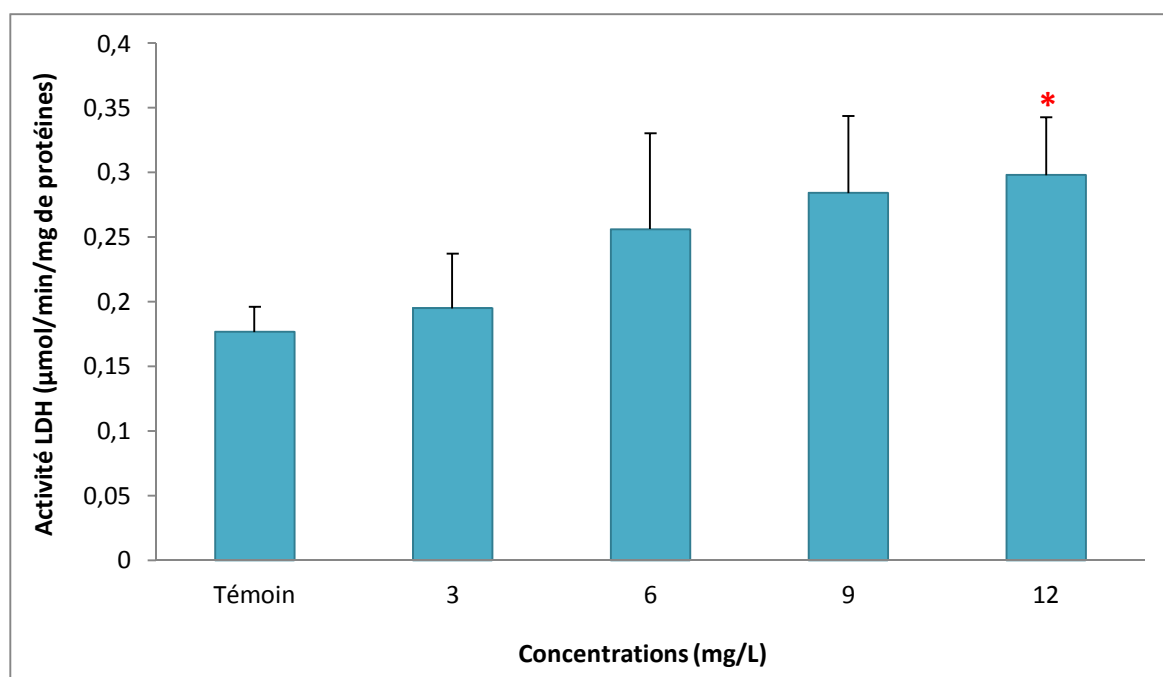
**Figure 74** : Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur la variation de l'activité CAT chez *Daphnia magna*

### 3.4. Effet de Focus Ultra sur la variation de l'activité lactate déshydrogénase (LDH)

#### ➤ Chez *Paramecium tetraurelia*

D'après la Figure (75), représentative de l'évolution du taux de LDH chez les paramécies témoins et traitées par les concentrations croissantes de Focus Ultra, nous remarquons une augmentation dose dépendante et significative ( $p = 0.041$ ) de cette activité enzymatique chez les cellules traitées par la plus forte concentration de l'herbicide où nous enregistrons une valeur d'environ  $0.30 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines comparativement à celle des témoins qui n'est que de  $0.12 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

La comparaison entre les effets des différentes concentrations de l'herbicide par l'analyse de la variance (ANOVA), montre des différences très hautement significatives ( $p = 0.000$ ).



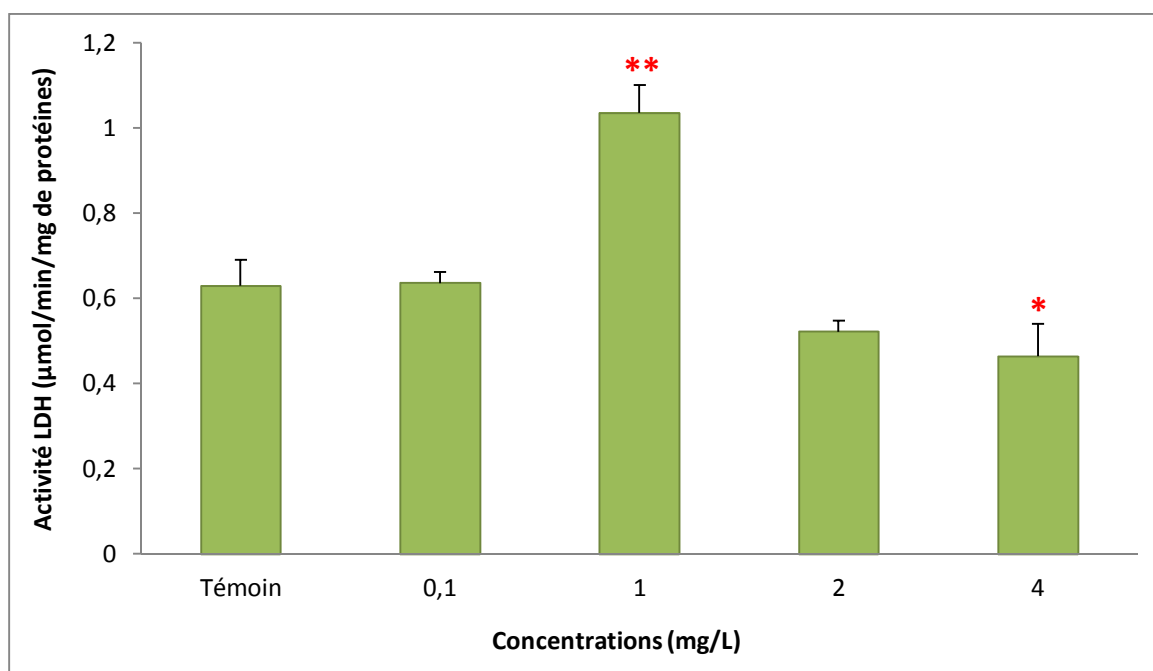
**Figure 75 :** Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'évolution de l'activité LDH chez *Paramecium tetraurelia*

➤ *Chez Daphnia magna*

La figure (76) met en évidence l'effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'évolution de l'activité LDH.

Nos résultats révèlent qu'en présence de l'herbicide, l'activité LDH tend à augmenter de manière hautement significative ( $p = 0.004$ ) chez les daphnies traitées par la concentration 1 mg/L, par rapport aux témoins. Cette augmentation est estimée à environ 63.5%. Toutefois, une diminution de l'activité enzymatique est constatée chez les individus traités par les concentrations 2 et 4 mg/L. Cette diminution de l'ordre de 27%, n'est significative ( $p = 0.050$ ) que pour la plus forte concentration de l'herbicide (4 mg/L).

L'analyse de la variance (ANOVA) montre des différences très hautement significatives entre les effets des concentrations croissantes de Focus Ultra ( $p = 0.000$ ).



**Figure 76 :** Effet des concentrations croissantes de Focus Ultra sur l'évolution de l'activité LDH chez *Daphnia magna*

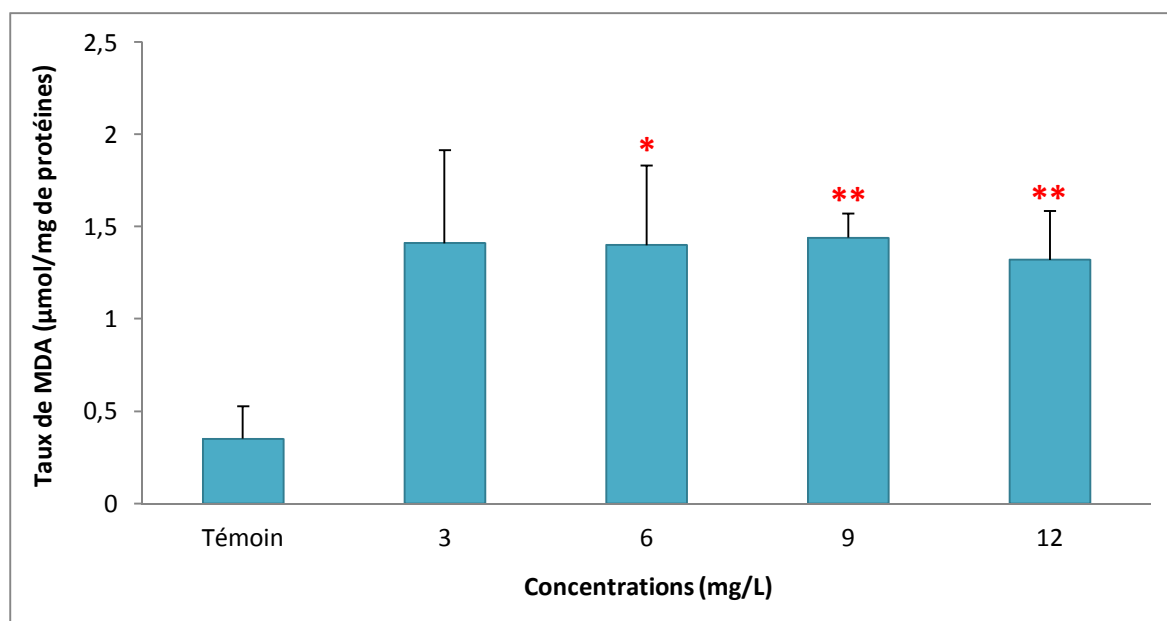
### 3.5. Effet de Focus Ultra sur la variation du taux de malondialdéhyde (MDA)

#### ➤ Chez *Paramecium tetraurelia*

La figure (77) montre l'évolution du taux de MDA en présence des différentes concentrations de Focus Ultra.

Nous constatons que le traitement des paramécies par les concentrations croissantes de l'herbicide induit une augmentation dose dépendante du taux de MDA. Cette augmentation est significative ( $p = 0.050$ ) pour la concentration 6 mg/L, et hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) pour les deux plus fortes concentrations (9 et 12 mg/L). En effet, le taux de MDA est de l'ordre de  $0.35 \mu\text{mol/mg}$  de protéines chez les cellules témoins, et augmente à  $1.4 \mu\text{mol/mg}$  de protéines chez celles traitées par la concentration 6 mg/L, pour atteindre, respectivement,  $1.44$  et  $1.32 \mu\text{mol/mg}$  de protéines chez les traitées par les deux plus fortes concentrations de l'herbicide (9 et 12 mg/L).

L'analyse de la variance (ANOVA) montre un effet très hautement significatif du traitement par Focus Ultra ( $p = 0.000$ ).



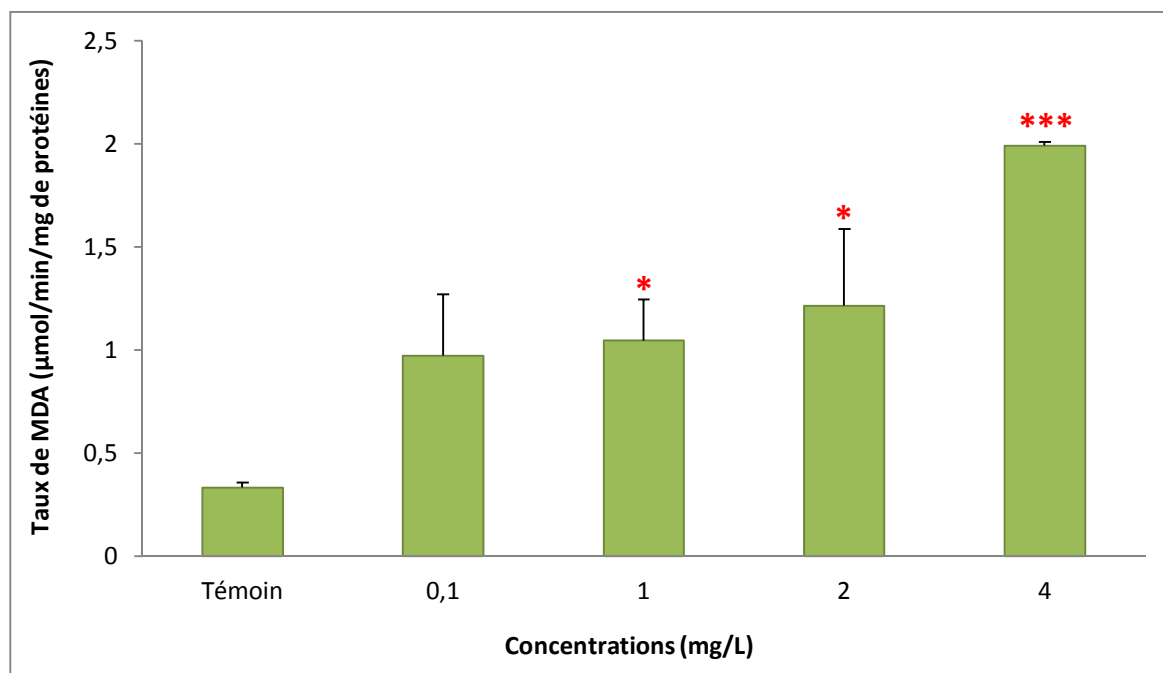
**Figure 77 :** Evolution du taux de MDA chez *Paramecium tetraurelia* en présence des concentrations croissantes de Focus Ultra

➤ *Chez Daphnia magna*

La figure (78) met en évidence l'effet de Focus Ultra sur la variation de la teneur en MDA.

Nos résultats montrent qu'en présence du xénobiotique le taux de MDA augmente de manière dose dépendante. Cette augmentation est significative ( $p \leq 0.05$ ) pour les concentrations 1 et 2 mg/L et très hautement significative ( $p = 0.000$ ) pour la plus forte concentration (4 mg/L), et ce par rapport aux témoins. En effet, ce taux passe de 0,33  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines chez les daphnies témoins à 1,99  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines chez celles traitées par la concentration la plus élevée de Focus Ultra (4 mg/L).

L'analyse de la variance (ANOVA) révèle un effet très hautement significatif du traitement par les différentes concentrations de l'herbicide ( $p = 0.000$ ).



**Figure 78 :** Evolution du taux de MDA chez *Daphnia magna* en présence des concentrations croissantes de Focus Ultra

#### 4. Discussion

Exposés à un stress naturel ou chimique, les organismes réagissent par la mise en place d'un nouvel état physiologique afin de maintenir leur homéostasie. Si les effets du stress dépassent l'homéostasie, des dommages cellulaires peuvent avoir lieu et des mécanismes de détoxification et de réparation s'activent (Mouneyrac et *al.*, 2011). Les biomarqueurs utilisés à l'échelle sub-individuelle, peuvent fournir des informations utiles sur les stratégies et les mécanismes moléculaires et cellulaires qu'un organisme développe pour faire face aux effets néfastes du stress induit par l'exposition aux xénobiotiques (Van der Oost et *al.*, 2003).

Afin d'élucider l'implication du stress oxydatif dans la toxicité induite par Focus Ultra chez *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* et la capacité de ces deux modèles biologiques à survivre et à s'acclimater à cette condition de stress, nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes antioxydants spécifiquement 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. En effet, notre choix s'est porté sur la quantification du taux de GSH qui joue un rôle majeur dans les processus de défense antioxydante intracellulaire par piégeage et neutralisation des radicaux libres, ou encore, le suivi de la variation de quelques activités enzymatiques, en l'occurrence, la GST, enzyme impliquée dans la phase II de la métabolisation, la CAT, première ligne de défense contre le stress oxydant, et la LDH, un indicateur de dommage cellulaire et de perturbation métabolique. Nous avons également mesuré la teneur en MDA, utilisé comme étant un biomarqueur spécifique de la peroxydation lipidique associé à la dégradation des membranes cellulaires.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'évolution du taux de GSH, le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire. Outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau dans la défense antiradicalaire par son implication dans les réactions de conjugaison catalysées par la glutathion-S-transférase (Barillet, 2007). **Les résultats acquis dans cette étude révèlent une réduction dose dépendante et significative du taux de GSH chez *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* après traitement par Focus Ultra.** Cette diminution est probablement due à sa liaison spontanée avec l'herbicide grâce à son groupement thiol (-SH), (Barillet, 2007 ; Benbouzid-Haddad, 2012) ou encore à son utilisation dans le piégeage des radicaux libres produits lors de la réaction de son oxydation en GSSG (Bamela et Richard, 1994 ;

Kadry et *al.*, 2012). La baisse de la teneur en glutathion pourrait également être corrélée à une diminution de l'activité de la glutamyl cystéine synthétase intervenant dans la biosynthèse du GSH, par l'action toxique directe de Focus Ultra (Canesi et Viarengo, 1997 ; Kadry et *al.*, 2012). De plus, sous l'effet d'un stress oxydant sévère, les capacités de la cellule à réduire le glutathion oxydé (GSSG) par le biais de la glutathion réductase (GR) peuvent être dépassées, aboutissant alors à une accumulation de GSSG dans le cytosol (Cadenas et Sies, 1985; DeLeve et Kaplowitz, 1991). D'un autre côté, la réduction du taux de GSH pourrait éventuellement être liée à la mobilisation accrue de ce dernier par la GST dans les réactions de conjugaison (Yildirim et *al.*, 2011), ceci est confirmé par nos résultats qui témoignent d'une induction de cette enzyme en présence du xénobiotique testé. Nos résultats convergent dans le même sens que ceux obtenus auparavant par Grara et *al.* (2012) chez *Paramecium* suite à une exposition au Polyméthacrylate de Méthyle (résine dentaire), de même que pour Saib et *al.* (2014) suite à une exposition à l'Amidophosphonate (insecticide organophosphoré), ou encore avec le microcrustcé cladocère d'eau douce *Simocephalus vetulus* suite à une exposition de 30 min aux radiations UV (Obuid-Allah et *al.*, 2015), qui ont mis en évidence une diminution marquée de la concentration du GSH.

Dans un second temps, et après avoir élucidé les effets de Focus Ultra sur l'évolution du taux de GSH, nous avons jugé utile de suivre les variations de l'activité GST sachant qu'elle fait partie des premières enzymes antioxydantes à répondre à la présence de xénobiotiques, par intervention au niveau de la phase II du processus de détoxification cellulaire en catalysant la réaction de conjugaison des composés à caractère électrophile et de leurs métabolites avec le glutathion réduit (GSH) (Vidal, 2001; Mansour et Mossa, 2009 ; de Menezes et *al.*, 2010). Cette réaction permet donc d'augmenter leur hydrosolubilité et facilite ainsi leur élimination (Van der Oost et *al.*, 2003). **Nos résultats illustrent une forte induction de l'activité GST chez les deux modèles biologique étudiés, toutefois, une légère diminution de celle-ci est observée chez les daphnies exposées à la plus forte concentration de Focus Ultra.** La stimulation de l'activité enzymatique constatée dans nos expériences témoigne probablement de l'induction du système de détoxification, et du rôle physiologique important joué par la GST dans la protection de l'organisme contre le stress. Une intensification de l'activité GST a été également signalée tout aussi bien chez *Paramecium tetraurelia* après exposition aux pyréthrinoides (la Cyperméthrine et la Deltaméthrine) (Amamra et *al.*, 2015a) que chez *Daphnia magna* traitée par différentes concentrations de liquides ioniques (1-alkyl-3-methylimidazolium bromide) (Yu et *al.*, 2009) et de composés rédox cycliques (Barata et *al.*,

2005). En revanche, nous pourrions attribuer la diminution de l'activité GST décelée chez les daphnies à la plus forte concentration, au "dépassement d'un seuil d'accumulation" de Focus Ultra au-delà-duquel la pression toxico-chimique exercée par cet herbicide serait suffisante pour faire diminuer ou inhiber l'activité GST (Barillet, 2007 ; Benbouzid-Haddad, 2012), ce qui est en parfaite adéquation avec les travaux menés par Jemec et *al.* (2012) chez *Daphnia magna* qui ont mis en évidence un effet inhibiteur direct et intense du bisphénol A sur l'activité GST à la plus forte concentration (13.8 mg/L).

D'autre part, nos résultats relatifs à la variation de l'activité CAT indiquent une stimulation dose dépendante et significative de cette dernière chez les deux espèces d'eau douce en présence des concentrations croissantes de Focus Ultra. Les catalases sont des enzymes principalement péroxy-somales dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par le peroxyde d'hydrogène en catalysant la réaction de sa dismutation en eau et en oxygène moléculaire (Devier, 2003 ; Yi et *al.*, 2007). Elles constituent avec les SOD la première ligne de défense contre les attaques radicalaires (Amin et Hashem, 2012 ; Sapana Devi et Gupta, 2014). En effet, la catalase est considérée comme l'un des biomarqueurs les plus sensibles au stress oxydatif particulièrement vis à vis des pollutions chimiques en milieu aquatique (Livingstone, 2001 ; Regoli et *al.*, 2003 ; Vlahogianni et *al.*, 2007). L'induction de l'activité CAT observée dans notre étude pourrait être due à une intensification de l'activité antioxydante en vue de la dégradation des radicaux oxygénés et la conversion du peroxyde d'hydrogène en oxygène gazeux et en eau, sachant que la génération du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consécutive à l'arrêt de la biosynthèse des acides gras est connue comme une cause primaire de la toxicité des **inhibiteurs de l'ACCase** dont fait partie le cycloxydime (Cummins et *al.* 1999). Les mêmes résultats ont été enregistrés par Bouaricha (2013), Sbartai (2013) et Djekoun et *al.* (2015) chez des paramécies exposées respectivement au Proclaim (Emamectine Benzoate), au Bifénazate et au Thiram. Ulm et *al.* (2015) ont également rapporté une intensification de l'activité CAT chez *Daphnia magna* suite à une exposition aux nanoparticules d'argent. De plus, les études effectuées par Barata et *al.* (2005) ont pareillement mis en évidence une induction des activités CAT et SOD chez la même espèce en présence du cadmium et du cuivre, et concluent que ces toxiques peuvent induire différentes réponses antioxydantes/prooxydantes en fonction de leur capacité à produire des ROS.

Nous nous sommes intéressés, ensuite, au suivi de la variation de l'activité LDH, enzyme cytoplasmique qui joue un rôle important dans le cycle glycolytique (Senthil Nathan et *al.*, 2006), en catalysant la réaction réversible du lactate en pyruvate, et est largement utilisée comme indicateur de cytotoxicité ou de dommages cellulaires (Long et *al.*, 2003). La perturbation de son activité indique souvent des altérations métaboliques. **Nos résultats montrent que l'exposition de *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* aux concentrations croissantes de Focus Ultra est à l'origine d'une forte stimulation de l'activité LDH.** Ces résultats témoignent ainsi de la survenue d'une perturbation métabolique vu l'intensité du stress chimique induit par l'herbicide. C'est ce que suggère également Amamra (2015) pour expliquer l'importante induction de l'activité LDH chez les paramécies exposées à la Cyperméthrine. Selon EL-Khawaga (2005) et Manawadi et Kaliwal (2010), l'augmentation de l'activité LDH représente un mécanisme compensatoire (métabolisme anaérobie) adopté par l'organisme affecté qui exige une énergie additionnelle aussi bien pour son entretien et sa protection antioxydante contre le stress que pour le maintien de ses fonctions vitales (El-Demerdash et *al.*, 2012 ; Vasanth et *al.*, 2012). Toutefois, **le déclin de l'activité LDH chez *Daphnia magna* aux plus fortes concentrations (2 et 4 mg/L) pourrait s'expliquer par une inhibition de l'enzyme soit par liaison directe de l'herbicide et/ou ses métabolites, ou encore par blocage de la synthèse enzymatique** (Tripathi et Shasmal, 2011). Ces constatations sont en accord avec ceux obtenus par Diamantino et *al.* (2001), qui signalent une augmentation suivie d'une diminution de l'activité LDH chez *Daphnia magna* exposée à différentes concentrations de zinc. Les mêmes effets ont été également rapportés chez la moule, *Mytilus edulis* suite au traitement par des hydrocarbures (Long et *al.*, 2003).

La peroxydation lipidique est considérée comme l'une des conséquences les plus remarquables des attaques radicalaires. Elle est responsable des altérations cellulaires et de la diminution de la fluidité membranaire (Davies, 2000 ; Favier, 2003). Le malondialdéhyde (MDA) est largement utilisé comme biomarqueur de la peroxydation lipidique et plus généralement d'un stress oxydatif (Zielinski et Pörtner, 2000 ; Viarengo et *al.*, 2007). **Nos expérimentations réalisées sur *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* indiquent une augmentation dose dépendante et significative du taux de MDA suite au traitement par Focus Ultra.** Ces résultats viennent confirmer ceux rapportés antérieurement par Mountassif et *al.* (2007) chez le cilié *Tetrahymena pyriformis* soumis à un stress métallique ou encore ceux de Amamra et *al.* (2015b) après une exposition des paramécies à la Cyperméthrine. Les

mêmes réponses ont été également observées par Cherait et Djebbar (2013) et Benosmane (2015) chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et les têtards *Rana saharica* en présence de la Nifédipine et du Mancozèbe, respectivement. Peng et *al.* (2013) révèlent aussi une stimulation de la peroxydation lipidique chez *Daphnia magna* après 6h d'exposition au Triclosan, se traduisant par une augmentation significative de la teneur en MDA. En effet, d'après Van Der Vaart et *al.* (2004) et Al-Mutairi et *al.* (2007) l'augmentation du taux de malondialdéhyde indique la survenue d'une peroxydation lipidique par liaison des radicaux libres avec les chaînes d'acides gras polyinsaturés. Cette réaction est à l'origine de changements au niveau de la structure, la perméabilité, le transport et les propriétés physicochimiques des membranes biologiques (Pampanin et *al.*, 2005), aboutissant généralement à la mort cellulaire (Marnett, 2002). Les hydroperoxydes lipidiques ainsi formés sont dégradés principalement en malondialdéhyde (MDA), produit final de la peroxydation lipidique, qui est très réactif vis à vis des macromolécules biologiques telles que les protéines, les phospholipides, l'ARN et l'ADN. Il peut former des adduits à l'ADN pouvant induire un effet mutagène pour l'organisme, ou se complexer aux acides aminés ou encore au glutathion (Stohs et *al.*, 2000).

# ***Conclusion générale et perspectives***

En raison de leur degré élevé de sélectivité et leur grande efficacité contre un large éventail de mauvaises herbes, les cyclohexanediones ont connu un très grand succès dans le monde agricole en contribuant à l'augmentation spectaculaire des rendements. Toutefois, l'utilisation massive, inconsidérée et prolongée des cyclohexanediones pour un désherbage systématique des grandes cultures a conduit à l'apparition de mauvaises herbes résistantes face à ceux-ci, réduisant d'autant leur efficacité. Ce phénomène de résistance est à l'origine d'immenses pertes économiques entraînant ainsi la nécessité d'utiliser des taux plus élevés d'herbicides. Cette surapplication provoque leur dispersion dans l'environnement et indéniablement leur écoulement dans les milieux aquatiques avec comme conséquence ultime, des effets néfastes sur les espèces non visées.

Dans le cadre de ce travail, nous avons donc fixé comme objectif principal l'évaluation du potentiel toxique d'un cyclohexanedione commercialisé sous le nom de Focus Ultra sur deux organismes aquatiques considérés comme d'excellents bioindicateurs de la qualité des eaux douces : *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna*. Pour répondre à cet objectif, la démarche engagée dans la présente étude s'est appuyée sur cinq principaux axes : dans un premier temps, nos recherches se sont portées sur l'estimation des effets toxiques potentiels sur la physiologie des deux modèles étudiés. Dans un second temps, nous nous sommes orientés vers l'étude d'éventuelles perturbations au niveau du métabolisme biochimique et respiratoire. Notre intérêt s'est ensuite focalisé sur une étude morphologique dans le but d'identifier et de caractériser les anomalies observées suite à l'exposition au Focus Ultra. A partir de ces données, nous nous sommes plus particulièrement concentrés sur l'analyse des réactions comportementales spontanément déclenchées lors d'une situation de stress. Afin de mieux cerner les mécanismes cellulaires mis en jeu dans la toxicité de Focus Ultra, nous nous sommes penchés sur le suivi des variations des biomarqueurs du stress oxydant.

Dans la première partie de notre travail, l'exposition au Focus Ultra semble avoir un effet inhibiteur sur la croissance de la population de *Paramecium tetraurelia* confirmé par un pourcentage de réponse positif, une diminution du nombre et de la vitesse de génération parallèlement à une augmentation du temps de génération. De plus, nous avons noté une stimulation de la phagocytose accompagnée d'une inhibition de l'activité vacuolaire. D'autre part, nos résultats ont révélé une augmentation dose dépendante du taux d'immobilisation, conjointement à une réduction de l'activité cardiaque ainsi qu'une inhibition de l'activité des mandibules et des appendices thoraciques chez *Daphnia magna*.

L'étude du métabolisme biochimique et respiratoire réalisée lors de la deuxième partie vient confirmer la cytotoxicité de Focus Ultra. Nos résultats ont donc mis en évidence une perturbation du taux de protéines totales et des lipides totaux ainsi qu'une altération de l'équilibre homéostatique traduite par une inhibition de l'activité respiratoire.

D'un autre côté, le traitement par les fortes concentrations de Focus Ultra a induit des atteintes morphologiques se manifestant chez les paramécies par l'apparition de bourgeonnements et de vésicules membranaires avec des lésions cytosoliques et macronucléaires conduisant, dans certains cas, à la lyse cellulaire. Chez les daphnies, l'exposition des œufs à l'herbicide pendant l'embryogenèse a révélé la présence de différentes malformations touchant plusieurs organes des descendants, consistant en un courbement de l'épine caudale, un sous-développement des antennes secondaires et une déformation de la carapace et du tube digestif, témoignant ainsi du caractère génotoxique/embryotoxique de cet herbicide.

La quatrième partie de notre travail s'est orientée vers l'étude des réponses comportementales à travers le suivi et l'analyse des variations de l'activité locomotrice chez les deux organismes aquatiques. Il en ressort que la présence de Focus Ultra a pour effet net une dépolarisation membranaire exprimée par une augmentation de l'évitement des paramécies avec l'intensification du stress, accompagnée d'une nage rapide et complètement erratique, caractérisée par des trajectoires aléatoires et des changements brutaux de directions. Nous avons également enregistré une stimulation de la vitesse de déplacement des paramécies sous l'effet de Focus Ultra. De même, les perturbations comportementales se sont manifestées chez *D. magna* par une réduction de la capacité natatoire avec une perturbation de la vitesse et des mouvements de nage ainsi qu'une inhibition dose dépendante de la réponse phototactique suite à une altération du comportement migratoire.

Ce travail a été finalement complété par une étude du stress oxydant induit par Focus Ultra à travers le suivi de quelques biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques. En effet, nous avons constaté une forte déplétion du taux de GSH associée à une induction de l'activité GST en réponse au stress généré par la présence de l'herbicide testé et/ou ses métabolites, traduisant ainsi l'importance des réactions de conjugaison de ces derniers. Parallèlement, l'induction des activités CAT et LDH corrobore le déclenchement de la défense antioxydante. D'autre part, l'importante augmentation du taux de MDA témoigne de la survenue d'une

peroxydation lipidique qui semble être due aux effets toxiques indirects induits par les radicaux libres produits lors de la métabolisation de Focus Ultra.

En conclusion, il convient de souligner que les deux espèces aquatiques *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna* ont révélé une réelle pertinence comme modèles biologiques de choix et une capacité élevée à détecter les plus faibles concentrations à partir desquelles les effets toxiques induits par Focus Ultra sont observés. Les atteintes physiologiques, biochimiques, métaboliques, morphologiques, embryologiques et comportementales suscitées par cet herbicide confirment explicitement, et sans le moindre doute, nos soupçons relatifs à sa toxicité une fois disséminé dans le milieu aquatique. La récente attention de sa présence dans l'environnement à des concentrations pas si anodines et le manque d'informations et de données relatives à sa biodégradabilité, sa métabolisation, la toxicité de ses métabolites, ainsi que la dose exacte pénétrant dans l'organisme soulève plusieurs interrogations auxquelles nous essayerons d'apporter des réponses à travers une étude plus approfondie de la toxicité pour une meilleure compréhension des mécanismes d'action toxique, dans une perspective plus large, qui reste à mettre en œuvre.

Sur la base des résultats obtenus tout au long de ce travail, de nombreuses perspectives peuvent être avancées afin d'ouvrir d'autres pistes de recherches futures. Il serait donc judicieux de :

- Appliquer de nouvelles approches moléculaires et employer divers tests de toxicité sur d'autres organismes aquatiques clés occupant différents niveaux trophiques, pouvant ainsi nous renseigner des vraies cibles cellulaires et contribuant à l'évaluation des effets toxiques de l'herbicide à différents niveaux d'organisation biologique.
- Identifier les métabolites résultants de la dégradation de l'herbicide et apprécier leur potentiel toxique.
- Étendre les tests de toxicité classiques sur plusieurs générations, pour mettre en évidence l'expression de la toxicité du xénobiotique dans la population et mieux cerner les phénomènes de sensibilité ou d'adaptation de celle-ci.
- Entreprendre une étude comparative complémentaire des effets toxiques de la matière active seule « cycloxydime » et de sa formulation commercialisée.

***Références  
bibliographiques***

**Abdel-Daim M.M., Abdelkhalek N.K., Hassan A.M., 2015.** Antagonistic activity of dietary allicin against deltamethrin-induced oxidative damage in freshwater *Niletilapia*, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 111, 146–152.

**Abele D., Philipp E., Gonzalez P.M., Puntarulo S., 2007.** Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Front. Biosci*, 12, 933–946.

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

**Al-Mutairi D. A., Craik J. D., Batinic-Haberle I., Benov L. T., 2007.** Induction of oxidative cell damage by photo - treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. *Free radic. res*, 41, 89–96.

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

**Amamra R., Djebbar M.R., Grara N., Moumeni O., Otmani H., Alayat A., Berrebbah H., 2015a.** Cypermethrin-induces oxidative stress to the freshwater ciliate model: *Paramecium tetraurelia*. *Annu. Res. Rev. Biol*, 5, 385–399.

**Amamra R., Djebbar M.R., Moumeni O., Azzouz Z., Zeriri I., Atailia A., Benosmane S., Berrebbah H., 2015b.** Lipid peroxidation, oxidative stress and respiratory metabolism alteration in the freshwater ciliate *Paramecium tetraurelia* exposed to cypermethrin, a pyrethroid insecticide. *J. Biodivers. Environ. Sci*, 6 (4), 115–123.

**Amanchi N.R., 2010a.** Toxicity assesment of monocrotophos using a single cell protozoan ciliate *Paramecium caudatum* as an alternative model. *ANU J. Nat. Sci*, 1 (1), 56–60.

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

**Amanchi N.R., 2011.** Acute toxicity and cytogenetic effects of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. *Ind. J. Fund. Appl Life Sci*, 1 (3), 65–70.

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

**Amanchi N.R., Hussain M.M., 2010.** Cytotoxicity assessment of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. *J. Env. Biol*, 31, 603–607.

**Amaroli., 2010.** Nitric oxide production inhibited by xenobiotic compounds in the protozoan *Paramecium primaurelia*. *Ecol. Indic*, 10, 212–216.

**Amiard J., Amiard-Triquet C., Rainbow P.S., 2013.** Behavioral Ecotoxicology, in *Ecological Biomarkers - Indicators of Ecotoxicological Effects*. Amiard-Triquet C, Amiard J (Edts) Boca Raton: CRC Press, USA.

**Amiard J.C., 1976.** Les variations de la phototaxie des larves de crustacés sous l'action de divers polluants métalliques: mise au point d'un test de toxicité sublétales. *Mar. Biol*, 34, 239–245.

**Amiard-Triquet C., Amiard J.C., 2012.** Behavioural ecotoxicology. In: Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Rainbow PS (eds) *Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects*. CRC Press, Boca Raton, pp: 253–278.

**Amin K.A., Hashem K.S., 2012.** Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC Vet. Res*, 8, 45.

**Amoros C., 1984.** Crustacés, Cladocères - extrait du bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon 5, p 63.

**Aoi W., Naito Y., Takanami Y., Kawai Y., Sakuma K., Ichikawa H., Yoshida N., Yoshikawa T., 2004.** Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic. Biol. Med*, 37, 480–487.

**Arabet D., 2014.** Effets d'un herbicide de la famille des Sulfonylurées sur la communauté bactérienne d'un sol agricole, étude de cas : le Chevalier® OnePass. Thèse de doctorat, Université de Constantine I, 79 p.

**Arambourou H., 2013.** Stress toxique et variations de forme chez *Chironomus riparius* (Diptère, Chironomidae). Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France, 188 p.

**Arinc E., Sen A., Bozcaarmutlu A., 2000.** Cytochrome P4501A and associated mixed function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. Pure and applied chemistry, Research Triangle Park, NC, ETATS-UNIS.

**Artells E., Issartel J., Auffan M., Borschneck D., Thill A., Tella M., Brousset L., Rose J., Bottero J.Y., Thiéry A., 2013.** Exposure to cerium dioxide nanoparticles differently affect swimming performance and survival in two daphnid species. PLoS One, 8 (8):e71260.

**ASTM, 2001.** Standard guide for conducting *Daphnia magna* life-cycle toxicity tests. In: Annual book of ASTM standards, E 1193-97, Philadelphia, 418–433.

**ASTM, 2004.** Standard guide for conducting *Daphnia magna*. Life Cycle Toxicity Tests, 1193–1197.

**Aubertot J.N., Barbier J.M., Carpentier A., Gril J.J., Guichard L., Lucas P., Savary S., Savini I., Voltz M., 2005.** Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Expertise scientifique collective, Synthèse du rapport. INRA et Cemagref, France, 64 p.

**Aviram M., Fuhrman B., 2002.** Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. Ann. N. Y. Acad. Sci, 957, 146–161.

**Azzouz Z., 2012.** Etude des effets toxiques d'un fongicide (Amistar Xtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 159 p.

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

**Azzouz Z., Berrebbah H., Djebar M.R., 2015.** Toxic Effects of Rophosate on Growth, Morphology and Internal Cell Organization of *Paramecium tetraurelia*. Adv. Environ. Biol, 9 (24), 421–430.

**Baghestani M.A., Zand E., Soufizadeh S., Beheshtian M., Haghghi A., Barjasteh A., Birgani D.G., Deihimfard R., 2008.** Study on the efficacy of weed control in wheat (*Triticum aestivum* L.) with tank mixtures of grass herbicides with broadleaved herbicides. Crop Prot, 27, 104–111.

**Baillieul M., Blust R., 1999.** Analysis of the swimming velocity of cadmium-stressed *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 44, 245–254.

**Baird D.J., Brown S.S., Lagadic L., Liess M., Maltby L., Moreira-Santos M., Schulz R., Scott G.I., 2007.** In situ-based effects measures: Determining the ecological relevance of measured responses. Integr. Environ. Assess. Manage, 3, 259–267.

**Bamela C.C., Richard A.H., 1994.** Libbincott's Illustrated Reviews Biochemistry. 2nd ed., Washington, Philadelphia, Pennsylvania, 113–114.

**Barata C., Porte C., Baird D.J., 2004.** Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates. A review. Ecotoxicology, 13, 511–517.

**Barata C., Varo I., Navarro J.C., Arun S., Porte C., 2005.** Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol, 140 (2), 175–186.

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

**Beal D.L., Anderson R.V., 1993.** Response of Zooplankton to rotenone in a small pond. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 51, 551–556.

**Beale G.H., Preer J.R., 2008.** *Paramecium*: genetics and epigenetics. 1<sup>st</sup> edition. Taylor & Francis Group, Boca Raton, p 191.

**Beaumont R., Cassier C., 1998.** Travaux Pratiques de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3<sup>ème</sup> édition DUNOD, 123–143.

**Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M., Djebbar M.R., 2012a.** Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium sp.* with special emphasis on respiratory metabolism, growth and generation time. *Toxicol. Environ. Chem*, 94, 557–565.

**Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M., Djebbar M.R., 2012b.** Effect of novel phosphoramidate on growth and respiratory metabolism of *Paramecium Aurelia*. *J. Nat. Sci. Biol. Med*, 3 (1), 48–51.

**Benbouzid-Haddad H., 2012.** Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricides sur les protistes ciliés. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie, 114 p.

**Benmahdi F., 2008.** Etude de la rétention d'un herbicide dans un sol agricole. Mémoire de Magister. Université du Colonel Hadj Lakhdar, Batna, Algérie, 115 p.

**Bennett J., Cabbage J., 1992.** Evaluation of Bioassay Organisms for Freshwater Sediment Toxicity Testing. Washington Department of Ecology, Olympia, WA. 29 pp.

**Bernal J., Ruvalcaba S., 1996.** Pharmacological prevention of acute lead poisoning in *Paramecium*. *Toxicology*, 108, 165–173.

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

**Benosmane S., 2015.** Impact d'un mimétique oestrogène (MOS) sur un organisme bio indicateur de pollution : *R. saharica*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 95 p.

**Bhat K.P., Pezzuto J.M., 2002.** Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 957, 210–29.

**Bianchini A., Rouleau C., Wood C.M., 2005.** Silver accumulation in *Daphnia magna* in the presence of reactive sulfide. *Aquat. Toxicol*, 72, 339–349.

**Biesinger K.E., Christensen G.M., 1972.** Effects of Various Metals on Survival, Growth, Reproduction, and Metabolism of *Daphnia magna*. J. Fish. Res. Board Can, 29, 1691–1700.

**Bird R.P., Good C.K., 2000.** The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. Toxicol. Lett, 112–113, 395–402.

**Boehler J.A., Keller T.S., Krieger K.A., 2012.** Taxonomic Atlas of the Water Fleas, Cladocera” (Class Crustacea). National Center for Water Quality Research Heidelberg University Tiffin, Ohio, USA 44883.

**Bors W., Heller W., Michel C., Satan M., 1990.** Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging-efficiencies. Methods Enzymol, 186, 343–355.

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

**Bouaricha H., Berrebbah H., Grara N., Djebbar M.R., 2012.** Response of *Paramecium sp.* With respect to an insecticide (Proclaim): Growth, content of MDA, AChE activity and respiratory metabolism. J. appl. sci. res, 8 (8), 4172–4180.

**Bownik A., Stępniewska Z., 2015a.** Protective effects of ectoine on behavioral, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna* subjected to hydrogen peroxide. Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol, 170, 38–49.

**Bownik A., Stępniewska Z., Skowroński T., 2014.** Protective effects of ectoine on heat-stressed *Daphnia magna*. J. Comp. Physiol B, 184(8), 961–976.

**Bownik A., Stępniewska Z., Skowroński T., 2015b.** Effects of ectoine on behavioural, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna*. Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol, 168, 2–10.

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

**Brown R.J., Galloway T.S., Lowe D., Browne M.A., Dissanayake A., Jones M.B., Depledge M.H., 2004.** Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquat. Toxicol*, 66, 267–278.

**Burger J., 2006.** Bioindicators: a review of their use in the environmental literature 1970-2005. *Environ. bioindic*, 1, 136–144.

**Burks R.L., Jeppesen E., Lodge D.M., 2001.** Littoral zone structures as *Daphnia refugia* against fish predators. *Limnol. Oceanogr*, 46 (2), 230–237.

**Burks R.L., Lodge D.M., Jeppesen E., Lauridsen T.L., 2002.** Diel horizontal migration of zooplankton: costs and benefits of inhabiting the littoral. *Freshw. Biol*, 47, 343–365.

**Burton J.D., Gronwald J.W., Keith R.A., Somers, D.A., Gengenbach B.G., Wyse D.L., 1991.** Kinetics of inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by sethoxydim and haloxyfop. *Pestic. Biochem. Physiol*, 39, 100–109.

**Cadenas E., Sies H., 1985.** Oxidative stress: Excited oxygen species and enzyme activity. *Adv. Enzyme Regul*, 23, 217–237.

**Calow P., 1991.** Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol*, 100, 3–6.

**Campan R., Scapini F., 2002.** Ethologie: Approche systémique du comportement. Edit. De Boeck Supérieur, France, 740 p.

**Campbell A.K., Wann K.T., Matthews S.B., 2004.** Lactose causes heart arrhythmia in the water flea *Daphnia pulex*. *Comp. Biochem. Physiol., Part B*, 139, 225–234.

**Canesi L., Viarengo A., 1997.** Age-related differences in glutathione metabolism in mussel tissues. *Comp. Biochem. Physiol., Part B*, 116, 217–221.

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

**Chapman P.M., 2001.** Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. *Hydrobiologia*, 463, 149–169.

**Cherait A., 2015.** Evaluation à l'échelle cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un composé de la famille des dihydropyridines sur un modèle expérimental bioindicateur de stress. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie, 152 p.

**Cheriet A., Djebbar M.R., 2013.** Evaluation of dihydropyridine calcium antagonist effects on the stress bioindicator organism *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Biol. Res*, 4 (10), 40–46.

**Chevalier J., 2014.** Utilisation du comportement natatoire de *Daphnia magna* comme indicateur sensible et précoce de toxicité pour l'évaluation de la qualité de l'eau. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, France, 153 p.

**Chevalier J., Grote M., Keller M., Pandard P., Cachot J., 2014.** A New Multi-cell Exposure System for Continuous Tracking of *Daphnia* Behavior for Toxicity Assessments. *J. Environ. Anal. Toxicol*, 5 (1), 246.

**Chèvre N., 2000.** Etude et modélisation des effets écotoxicologiques d'un micropolluant organique sur *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*. Thèse de Doctorat de l'Ecole Polytechnique fédérale de Lausanne, Lausanne, Suisse, 206 p.

**Choi, J., Roche, H., Caquet, T. 2001.** Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol*, 130, 11–17.

**Christensen B.T., Lauridsen T.L., Ravn H.W., Bayley M., 2005.** A comparison of feeding efficiency and swimming ability of *Daphnia magna* exposed to cypermethrin. *Aquat. Toxicol*, 73, 210–220.

**Claiborne A., 1985.** Catalase Activity. In: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, Greenwald, R.A. (Ed.). 3rd Edn., CRC Press, Boca Raton, FL., USA., pp: 283–284.

**Cohen J., 2007.** Génétique de la dynamique cellulaire chez la paramécie. Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.). Département de Génétique des Fonctions Cellulaires.

**Colbourne J.K., Pfrender M.E., Gilbert D., Kelley Thomas W.K., Tucker A., Oakley T.H., and al., 2011.** The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*, 331, 555–561.

**Corliss J.O., Lacy D., Palay S.O., 1961.** Fixing and staining of Protozoa in the Microtomist's Vade-Mecum (Bolles-Lee). London, XII e ed.

**Coulibaly H., 2005.** Le SCV (Semis direct sous Couverture Végétale), un élément stratégique de gestion durable des terres agricoles : une expérience française comme base de réflexion pour le Mali. Mémoire DEPA, France, Chapitre 2, 13–20.

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

**Cummins I., Cole D.J., Edwards R., 1999.** A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J*, 18, 285–292.

**Cunningham C.C., 1995.** Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J. Cell Biol*, 129, 1589–1599.

**Damaj R., 2008.** Squelette membranaire chez *Paramecium tetraurelia* : analyse structurale et fonctionnelle de la famille multigénique des épiplasmines. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, France, 171 p.

**Davies K.J., 2000.** Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50, 279–289.

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

**De Coen W.M., Janssen C., 2003.** The missing biomarker link: relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environ. Toxicol. Chem*, 22, 1632–1641.

**De Meester L., 1991.** An analysis of the phototactic behaviour of *Daphnia magna* clones and their sexual descendants. *Hydrobiologia*, 225, 217–227.

**de Menezes C.C., da Fonseca M.B., Loro V.L, Santi A., Cattaneo R., Clasen B., Pretto A., Morsch V. M., 2010.** Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 60 (4), 665–671.

**Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D., 2005.** Eds. Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques. 1ère édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 547 pages.

**DeLeve L.D., Kaplowitz N., 1991.** Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther*, 52 (3), 287–305.

**Délye C., Zhang X.Q., Michel S., Matejcek A., Powles S.B., 2005.** Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass, *Plant Physiol*, 137, 794–806.

**den Besten P.J., Postma J.F., de Valk S., Dubbeldam M., Everaarts J.M., 2001.** Environmental monitoring in the North Sea by combining biomarkers studies in the sea stars *Asterias rubens* with sediment quality assessment based on sea urchin bioassays. *Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach*, Garrigues Ph., Barth H., Walker CH, Narbonne J.F., editors (Amsterdam; New York: Elsevier Science), 279–330.

**Devez A., 2004.** Caractérisation des risques induits par les activités agricoles sur les écosystèmes aquatiques. Thèse de Doctorat L'ENGREF, Centre de Montpellier, Montpellier. Chapitre 1, 2–4.

**Devier., 2003.** Etude intégrée sur l'impact des différentes classes de contaminants (composés organiques, métaux, HAP, PCB) sur les moules. bioaccumulation et réponses biochimiques. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux I, France, 345 p.

**Devine M.D., Shimabukuro R.H., 1994.** Resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides, In Powles, S.B. and Holtum, J.A. (Eds.), *Herbicide resistance in plants, biology and biochemistry*, Lewis Publishers, Boca Raton (USA), 141-169.

**Di Delupis G.D., Rotondo V., 1988.** Phototaxis in aquatic invertebrates: possible use in ecotoxicity tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 16, 189–193.

**Diamantino T.C., Almeida E., Soares A.M.V.M., Guilhermino L., 2001.** Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere*, 45, 553–560.

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

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

**Djekoun M., Berrebbah H., Djebar M.R., 2015,** In Vivo Cytotoxicity Assessment of Thiram: Physiological and Biochemical Changes in *Paramecium sp*. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology (IJSRSET)*, 1 (6), 320–326.

**Dragesco J., 1980.** Les protozoaires. Office de la Recherche scientifique et Techniques Outre-Mer Paris. Initiations, documentations, techniques, 44, 153–192.

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

**Dunlap K., 1977.** Localization of calcium channels in *Paramecium caudatum*. *J. Physiol*, 271, 119–133.

**Dupuy C., 2012.** Réponses de populations de poissons au stress chimique en milieux estuariens: intégration des réponses moléculaires, biochimiques et immunotoxicologiques. Sciences agricoles. Université de Bretagne occidentale - Brest; Institut national de la recherche scientifique (Québec, province), 205 p.

**Ebert D., 2005.** Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.

**EFSA, 2010.** Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cycloxydim. *EFSA J*, 8, 1669–1741.

**El-Demerdash F.M., Attia A.A., Elmazoudy R.H., 2012.** Biochemical and histopathological changes induced by different time intervals of methomyl treatment in mice liver. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 47 (12), 1948–1954.

**El-Khawaga O.Y., 2005.** Role of selenium on antioxidant capacity in methomyl-treated mice. *J. Physiol. Biochem.*, 61 (4), 501–506.

**Erik H., Finn-Arne W., Joachim S., Svante W., Holger U., 2005.** Avoidance behavior and brain monoamines in fish. *Brain Res.*, 1032, 104–110.

**Eriksson Wiklund A.K., Börjesson T., Wiklund S.J., 2006.** Avoidance response of sediment living amphipods to zinc pyrithione as a measure of sediment toxicity. *Mar. Pollut. Bull.*, 52, 96–99.

**Espina S., Saliban A., Díaz F., 2000.** Influence of cadmium on the respiratory function of the grass carp (*Ctenopharygodonidella*). *Water Air Soil Pollut.*, 119, 1–10.

**Fan W.H., Cui M.M., Shi Z.W., Tan C., Yang X.P., 2012.** Enhanced oxidative stress and physiological damage in *Daphnia magna* by copper in the presence of nano-TiO<sub>2</sub>. *J Nanomater.*, 7 pages.

**Favier A., 2003.** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique*, 108–115.

**Fenech M., Crott J., 2002.** Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient in human lymphocytes – evidence for breakage – fusion – bridge cycles in the cytokinesis – block micronucleus assay. *Mutat Res.*, 504, 131–136.

**Ferradini C., 1986.** Espèces activées radicalaires de l’oxygène. *Biochimie*, 68, 779-785.

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

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

**Fränze O., 2003.** Bioindicators and environmental stress assessment. Bioindicators and biomonitoring: principles, concepts and applications, B.A. Market, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors (Amsterdam : Elsevier Science Ltd.), 41–84.

**Friberg-Jensen U., Nachman G., Christoffersen K.S., 2010.** Early signs of lethal effects in *Daphnia magna* (Branchiopoda, Cladocera) exposed to the insecticide cypermethrin and the fungicide azoxystrobin. Environ. Toxicol, 29, 1–8.

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

**Gagné F., Pardos M., Blaise C., 1999.** Estrogenic effects of organic environmental extracts with the trout hepatocyte vitellogenin assay. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 62, 723–730.

**Garad U., Desai S.N., Desai P.V., 2007.** Toxic effects of monocrotophos on *Paramecium caudatum*. Afr. J. Biotechnol, 6 (19), 2245-2250.

**Gerritsen J., Porter K.G., 1982.** The Role of Surface Chemistry in Filter Feeding by Zooplankton. Science, 216, 1225–1227.

**Gilbert D. L., 1997.** Oxygen and living processes. Springer-Verlag, New York, 73–102.

**Golam Mortuza M., Toshiyuki T., Tatsuya U., Toshikazu K., Hitoshi M., Hiroshi H., 2005.** Toxicity and bioaccumulation of hexavalent chromium in green *Paramecium*, *Paramecium bursaria*. J. Health. Sci, 51, 676–682.

**Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J., 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. Gen. Comp. Endocrinol, 18 (3), 545–551.

**Goodrich M., Lech J.J., 1990.** A behavioural screening assay for *Daphnia magna*: a method to assess the effects of xenobiotics on spatial orientation. Environ. Toxicol. Chem, 9, 21–30.

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

**Grara N., Bouaricha H., Boucena M., Atailia A., Berrebbah H., Djebbar M.R., Chafica Z., 2012.** Evaluation of the potential toxicity of the polymethyl methacrylate (dental resin) on a cellular model alternate *Paramecium*. *Adv. Environ. Biol*, 6, 1392–1399.

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

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

**Haga N., Forte M., Siami Y., Kung C., 1982.** Microinjection of cytoplasm as a test of complementation in *Paramecium*. *J. Cell Biol*, 96, 1072–1080.

**Hamel A., Fisch C., Combettes L., Dupuis-Williams P., Baroud C.N., 2011.** Transitions between three swimming gaits in *Paramecium* escape. *Proceedings of Natural Academy of Sciences. USA*, 108 (18), 7290–7295.

**Harman D., 2002.** Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Science of Aging Knowledge Environment*, 37, 14.

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

**Harwood J.L., 1999.** Graminicides which inhibit lipid synthesis. *Pesticide Outlook*, 10, 154–158.

**Hellou J., 2011.** Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*, 18, 1–11.

**Hellwing J., Freisberg K.O., Hildebrand B., 1988.** Reproductive study with Reg. No. 172 999 Na salt in rats: continuous administration with the drinking water over two generations (2 liters in the first and 2 letters in the second generation). Unpublished report from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, D-6700 Ludwigshafen, Germany, submitted to WHO by BASF AG.

**Hildebrand E., Dryl S., 1983.** Dependence of ciliary reversal in *Paramecium* on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *J. Comp. Physiol*, 152, 385–394.

**Hill B.R., Levi C., 1954.** Elevation of a Serum Component in Neoplastic Disease. *Cancer Res*, 14, 513–515.

**Hodgson E., 2004.** *A Textbook of Modern Toxicology*, 4th Edition Wiley. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.

**Holloway G.J., Sibly R.M., Povey SR., 1990.** Evolution in toxin-stressed environments. *Func. Ecol*, 4, 289–294.

**Huang D.J., Wang S.Y., Chen H.C., 2004.** Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*). *Chemosphere*, 57, 1621–1627.

**Hussain M.M., Amanchi N.R., Solanki V.R., Bhagavathi M., 2008.** Low cost microbioassay test for assessing cytopathological and physiological responses of ciliate model *Paramecium caudatum* to carbofuran pesticide. *Pestic. Biochem. Physiol*, 90, 66–70.

**Ishikawa T., Hota M., 2006.** Interaction of two swimming Paramecia. *J. Exp. Biol*, 209, 4452–4463.

**ISO, 1996.** Water quality-Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)- Acute toxicity test. ISO 6341. Geneva, Switzerland.

**Iwadate Y., 2003.** Photolysis of caged calcium in cilia induces ciliary reversal in *Paramecium caudatum*. *J. Exp. Biol*, 206, 1163–1170.

**Iwataki I., 1992.** Cyclohexanedione herbicides: their activities and properties, In Draber W. and Fujita T. (Eds.), *Rational approaches to structure, activity and ecotoxicology of agrochemicals*, CRC Press, Boca Raton (USA), 397–426.

**Jacob F., Monod J., 1961.** Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol*, 3, 318-321.

**Jawich D., 2006.** Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire. Thèse de doctorat, Université de Saint Joseph De Beyrouth, INP Toulouse, France, 134 p.

**Jemec A., Tisler T., Erjavec B., Pintar A., 2012.** Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 86, 213–218.

**Jeong T.Y., Kim H.Y., Kim S.D., 2015.** Multi-generational effects of propranolol on *Daphnia magna* at different environmental concentrations. *Environ. Pollut*, 206, 188–194.

**Jurand A., Selman G.G., 1969.** The anatomy of *Paramecium aurelia*. London, Macmillan; New York: St. Martin's Press, 218 pp.

**Kadry S.M., Marzouk M.S., Amer A.F., Hanna M.I., Azmy A.H., Hamed H.S., 2012.** Vitamin E as antioxidant in female african catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. *Egypt. J. Aquat. Biol. Fish*, 16, 83–98.

**Kaiser J., 2001.** Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment. Hartford, Sciences Publishers, 304 pages.

**Kamola Z., 1995.** Notes on the Use of Invertebrates, especially Ciliates, in Studies on Pollution and Toxicity. *Folia biologica (Krakow)*, 43 (1–2).

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

**Key P.B., Wirth E.F., Fulton M.H., 2006.** A review of grass shrimp, *Palaemonetes* spp., as a bioindicator of anthropogenic impacts. *Environ. Bioindic*, 1, 115–128.

**Klauke N., Blanchard M.P., Plattner H., 2000.** Polyamine triggering of exocytosis in *Paramecium* involves an extracellular Ca<sup>2+</sup>/(Polyvalent Cation)-Sensing receptor, subplasmalemmal Ca-Store Mobilization and Store-Operated Ca<sup>2+</sup>-Influx via unspecific cation channels. *J. Membr. Biol*, 15, 141–56.

**Klopman G., Contreras R., Rosenkranz H.S., Waters M. D., 1985.** Structure- genotoxic activity relationship of pesticides comparison of the results from several short-term assays. *Mutat Res*, 147, 343–356.

**Knops, M., Altenburger, R., Segner, H., 2001.** Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquat. Toxicol*, 53, 79–90.

**Kolkmeier M.A., Brooks B.W., 2013.** Sublethal silver and NaCl toxicity in *Daphnia magna*: a comparative study of standardized chronic endpoints and progeny phototaxis. *Ecotoxicology*, 22, 693–706.

**Kovács P., Pállinger E., 2003.** Effects of indomethacin on the divisional morphogenesis and cytoskeleton-dependent processes of *Tetrahymena*. *Cell Biochem. Funct*, 21 (2), 169–175.

**Krinsky N.I., 1989.** Antioxydants function of carotenoides. *Free Radic. Biol. Med*, 7 (6), 617–635.

**Kung C., 1971.** Genic mutants with altered system of excitation in *Paramecium aurelia*. I. Phenotypes of the behavioural mutants. *Z. Vergl. Physiol*, 71, 142–164.

**Labbe G., Pessayre D., Fromenty B., 2008.** Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam. Clin. Pharmacol*, 22, 335–53.

**Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., 1997.** Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement. In : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. (Eds.). *Biomarqueurs en écotoxicologie – aspects fondamentaux*. Masson, Londres, Paris, New York, pp 393–401.

**Lagerspetz K.Y.H., 2000.** Thermal avoidance and preference in *Daphnia magna*. *J. Therm. Biol*, 25, 405–410.

**LeBlanc G.A., Mu X., Rider C.V., 2000.** Embryotoxicity of the Alkylphenol Degradation Product 4- Nonylphenol to the Crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Health. Perspect*, 108, 1133–1138.

**Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med*, 30, 1076–1081.

**Little E.E., 2002.** Behavioural measures of environmental stressors in fish. Dans *Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress*, S.M. Adams, éditeur. (Bethesda: American Fisheries Society), 431–472.

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

**Long S.M., Ryder K.J., Holdway D.A., 2003.** The use of respiratory enzymes as biomarkers of petroleum hydrocarbon exposure in *Mytilus edulis* planulatus. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 55, 261–270.

**Loose C.J., Dawidowicz P., 1994.** Trade-offs in diel vertical migration by zooplankton: the costs of predator avoidance. *Ecology*, 75, 2255–2263.

**Machemer H., 1986.** Electromotor coupling in cilia. In: Lüttgau H. C. (ed.): *Membrane control of cellular activity*, Gustav Fischer, Stuttgart, 205–250.

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

**Machemer H., Ogura A., 1979.** Ionic conductances of membranes in ciliated and deciliated *Paramecium*. *J. Physiol*, 296, 49–60.

**Madoni P., 2000.** The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Enviro. Pollut*, 109, 53–59.

**Madoni P., Romeo M.G., 2006.** Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Enviro. Pollut*, 141, 1–7.

**Malhi H., Gores G.J., Lemasters J.J., 2006.** Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*, 43(2 Suppl. 1), 31–44.

**Manar R., 2008.** Effets populationnels du chlordane sur les microcrustacés cladocères *Daphnia sp.* Dans une perspective d'évaluation des risques. Thèse de doctorat, en cotutelle

entre l'Université de Hassan II, Mohammedia- Maroc et l'Université de Paul Verlaine, Metz-France, 169 p.

**Manar R., Bessi H., Vasseur P., 2009.** Reproductive effects and bioaccumulation of chlordane in *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem, 28, 2150–2159.

**Manawadi S.I., Kaliwal B.B., 2010.** Methomyl induced gonadal dysfunction, biochemical contents and enzyme activities in male albino mice. Internat. J. Biotechnol. Applicat, 2 (2), 20–32.

**Mansour A.S., Mossa A.H., 2009.** Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. Pestic. Biochem. Physiol, 93, 34–39.

**Marchese M.R., Brinkhurst R.O., 1996.** A comparison of two tubificid oligochaete species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia, 334, 163–168.

**Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G., 2003.** Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications, Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G., editors. (Oxford : Elsevier Science Limited), 3–39.

**Marliere F., 2000.** Mesure des pesticides dans l'atmosphère. Laboratoire Central de surveillance de la Qualité de l'Aire. Document d'INERIS. Convention 18/99, 17.

**Marnett L.J., 2002.** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology, 181–182, 219–222.

**Martins J.C., Saker M.L., Oliva-Teles L.F., Vasconcelos V.M., 2007a.** Oxygen consumption in *Daphnia magna* Straus as a marker of chemical stress in the aquatic environment. Environ. Toxicol. Chem, 26 (9), 1987–1991.

**Martins J.C., Soares M.L., Sakerb M.L., Oliva-Teles L.F., Vasconcelos V.M., 2007b.** Phototactic behavior in *Daphnia magna* Straus as an indicator of toxicants in the aquatic environment. Ecotoxicol. Environ. Saf, 67, 417–422.

**Masaki I., Aihara M., Richard S., Allen D., Fok A.K., 1993.** Osmoregulation in *Paramecium*: the locus fluid segregation in the contractile vacuole complex. *J. Cell Sci*, 106, 693–702.

**Massarin S., 2010.** Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna*. Thèse de Doctorat, Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II), France, 228 p.

**McInnes D., Harker K.N., Blackshaw R.E., Born W.H.V., 1992.** The influence of ultraviolet light on the phytotoxicity of sethoxydim tank mixtures with various adjuvants, In Foy, C.L. (Eds.), *Adjuvants for agrichemicals*, CRC Press, Boca Raton (USA), 205–213.

**Messiaen M., De Schamphelaere K.A., Muysen B.T., Janssen C.R., 2010.** The micro-evolutionary potential of *Daphnia magna* population exposed to temperature and cadmium stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 73, 1114–1122.

**Michels E., Leynen N., Cousyn C., De Meester L., Ollevier F., 1999.** Phototactic behaviour of *Daphnia* as a tool in the continuous monitoring of water quality: Experiments with a positively phototactic *Daphnia magna* clone. *Water Res*, 33, 401–408.

**Michels E., Semsari S., Bin C., De Meester L., 2000.** Effect of sublethal doses of cadmium on the phototactic behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 47, 261–265.

**Michelson A.M., 1982.** Oxygen radicals. *Agents Actions (Suppl.)*, 11, 179–201.

**Mills C.L., Shukla D.H., Compton, G.J., 2006.** Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. *Aquat. Toxicol*, 77, 197–201.

**Mills J.C., Stone N.L., Erhardt J., Pittman R.N., 1998.** Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell. Biol*, 140, 627–636.

**Mouneyrac C., Leung P., Leung K., 2011.** Cost of tolerance, In: Amiard-Triquet, Rainbow, Roméo (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, 265–297.

**Mountassif D., Kabine M., Manar R., Bourhim N., Zaroual Z., Latruffe N., El Kebbaj M. S., 2007.** Physiological, morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis*

for the in vivo cytotoxicity assessment of metallic pollution: Impact on D-B-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Ecol. Indic.*, 7, 882–894.

**Mu X., LeBlanc G.A., 2004.** Synergistic interaction of endocrine disrupting chemicals: model development using an ecdysone receptor antagonist and a hormone synthesis inhibitor. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 1085–1091.

**Muysen B.T.A., Messiaen M., Janssen C.R., 2010.** Combined cadmium and temperature acclimation in *Daphnia magna*: physiological and sub-cellular effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 73 (5), 735–742.

**Naitoh Y., Eckert R., 1969.** Ionic mechanisms controlling behavioral responses of *Paramecium* to mechanical stimulation. *Science*, 164, 963–965.

**Naitoh Y., Eckert R., Friedman K., 1972.** A regenerative calcium response in *Paramecium*. *J. Exp. Biol.*, 56, 667–681.

**Naitoh Y., Tominaga T., Allen R.D., 1997.** The contractile vacuole fluid discharge rate is determined by the vacuole size immediately before the start of discharge in *Paramecium multimicronucleatum*. *J. Exp. Biol.*, 200, 1737–1744.

**Nikitin O.V., Petrova V.M., Latypova V.Z., 2015.** Bioassay of pyrethroid insecticide esfenvalerate using fractal analysis of *Daphnia magna* motion. *Research Journal of Pharmaceutical, Biol. Chem. Sci.*, 6 (6), 1729–1736.

**Nilsson J.R., 1981.** Effects of copper on phagocytosis in *Tetrahymena*. *Protoplasma*, 109, 359–370.

**Nilsson J.R., 2003.** Lanthanum affects proliferation and motility of *Tetrahymena*. *Euro. J. Protistol.*, 39, 468–474.

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

**Obuid-Allah A.H., Zeinab El-bakary A., Wakeil K.F., Wafaa A.El. Mohammad., 2015.** Effects of UV-A radiation on some antioxidant biomarkers in the freshwater zooplankton

*Simocephalus vetulus* (Schoedler, 1858) (Crustacean, Cladocera), Int. j. adv. res, 3 (6), 354–361.

**OECD, 1998.** Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.

**OECD, 2004.** Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals: Essay of immediate immobilization. Procedure 202. Paris, France.

**OECD, 2008.** *Daphnia magna* acute immobilisation test and reproduction test. Guidelines for testing for chemicals, Rep, 211.

**Offen R.J., Roberts A.M., 1973.** The relations between membrane potential and parameters of ciliary beat In free-swimming *Paramecium caudatum*. J. Exp. Biol, 59, 583–593.

**Ogura A., Takahashi K., 1976.** Artificial deciliation causes loss of calcium-dependent responses in *Paramecium*. Nature, 264, 170–172.

**Ohman M.D., Frost B.W., Cohen E.B., 1983.** Reverse diel vertical migration—an escape from invertebrate predators. Science, 220, 1404–1407.

**Ojha A., Yaduvanshi S.K., Sivastava N., 2011.** Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticide on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. Pestic. Biochem. Physiol, 99, 148–156.

**Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J., Morishina S., 2001.** Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD), J. Physiol, 532, 3–16.

**Olmstead A.W., LeBlanc G.A., 2007.** The environmental endocrine basis of gynadromorphism (intersex) in a crustacean. Int. J. Biol. Sci, 3 (2), 77–84.

**Palma P., Palma V.L., Fernandes R.M., Soares A.M.V.M., Barbosa I.R., 2009.** Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf, 72, 344–350.

**Pampanin D.M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci, C., 2005.** Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Mar. Pollut. Bull*, 50, 1548–1557.

**Patterson D.J., 1980.** Contractile vacuoles and associated structures: their organization and function. *Biol. Rev*, 55 (21), 1–46.

**Paul R.J., Lamkemeyer T., Maurer J., Pinkhaus O., Pirow R., Seidl M., Zeis B., 2004.** Thermal acclimation in the microcrustacean *Daphnia*: a survey of behavioural, physiological and biochemical mechanisms. *J. Therm. Biol*, 29, 655–662.

**Pelletier B., Boles M., Lynch W., 2004.** Change in health risks and work productivity over time. *J. Occup Environ Med*, 46, 746–754.

**Peng Y., Luo Y., Nie X.P., Liao W., Yang Y.F., Ying G.G., 2013.** Toxic effects of Triclosan on the detoxification system and breeding of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22, 1384–1394.

**Pennak R.W., 1989.** Fresh-water invertebrates of the United States. 3rd ed. Protozoa to Mollusca, John Wiley and Sons, New York, New York.

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

**Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O., 2002.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr. Clin. Métabol*, 16, 233–239.

**Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O., 1998.** Espèces oxygénées activées en médecine humaine: une approche didactique. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 3, 133–138.

**Pirow R., Bäumer C., Paul R.J., 2001.** Benefits of haemoglobin in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *J. Exp. Biol*, 204, 3425–3441.

**Powles S.B., Yu Q., 2010.** Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Ann. Rev. Plant Biol*, 61, 317–347.

**Price L.J., Herbert D., Cole D.J., Harwood J.L., 2003.** Use of plant cell cultures to study graminicide effects on lipid metabolism. *Phytochemistry*, 63 (5), 533–41.

**Puglis H.J., Boone M.D., 2011.** Effects of technical-grade active ingredient vs. commercial formulation of seven pesticides in the presence or absence of UV radiation on survival of green frog tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 60, 145–155.

**Purves W.K., Orians G.H., Heller H.G., Sadava D., 2000.** Le monde du vivant, 2<sup>ème</sup> édition Flammarion, pp 552–577.

**Radic S., Cvjetko P., Glavas K., Roje V., Pevalek K.B., Pavlica M., 2009.** Oxidative stress and DNA damage in broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings induce by thallium. *Environ. Toxicol. Chem*, 28, 189–196.

**Ramade F., 2005.** Elément d'écologie. Ecologie appliquée. 6ème édition. Paris, France : Dunod, 864 p.

**Ravdin J.I., Murphy C.F., Guerrant R.L., Long-Krug S.A., 1985.** Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis*, 152 (3), 542–549.

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

**Ren Z., Li Z., Ma M., Wang Z., Fu R., 2009.** Behavioral responses of *Daphnia magna* to stresses of chemicals with different toxic characteristics. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 82, 310–316.

**Rendina A.R., Craig-Kennard A.C., Beaudoin J.D., Breen M.K., 1990.** Inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by two classes of grass-selective herbicides, *J. Agric. Food Chem* 38, 1282–1287.

**Reynaldi S., Duquesne S., Jung K., Liess M., 2006.** Linking feeding activity and maturation of *Daphnia magna* following short-term exposure to fenvalerate. Environ. Toxicol. Chem, 25 (7), 1826–1830.

**Rinderhagen M., Ritterhof J., Zauke G.P., 2000.** Crustaceans as bioindicators. In: A. Gerhardt (Eds.) Biomonitoring of polluted water - Reviews on actual topics. Environmental Research Forum. Volume 9. Trans Tech Publications – Scitech Publications, 161–194.

**Roberts T.R., 1998.** Metabolic pathways of agrochemicals, Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK).

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

**Rouabhi R., Berrebbah H., Djebbar M.R., 2006.** Toxicity evaluation of flucyclozuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium sp.* Afr. J. Biotechnol, 5, 45–48.

**Rouabhi R., Saci F.Z., Berrebbah H., Djebbar M.R., 2009.** Toxic effects of combined molecule from novaluron and diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. Am.Eur. J. Toxicol. Sci, 1 (2), 74–80.

**Rudiger J., Paul J., Colmorgen M., Huller S., Tyroller F., Zinkler D., 1997.** Circulation and respiratory control in millimetre-sized animals (*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods. J. Comp. Physiol. B, 167, 399–408.

**Sacchi C.F., Testard P., 1971.** Ecologie animale. Organismes et milieu, 480 pp. Paris: Doin.

**Sager D.R., Hocutt C.H., Stauffer Jr, J.R., 2000.** Avoidance behavior of *Morone americana*, *Leiostomus xanthurus* and *Brevoortia tyrannusto* strobe light as a method of impingement mitigation. Environ. Sci. Policy, 3, 393–403.

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

**Samworth M., Morgan M., 2000.** Article on pond life: *Paramecium*. MISCape Article: *Paramecium*, Text by MIKE SAMWORTH, images by MIKE MORGAN. Dec.95 Updated by the MISCape Editor April 2000.

**Sanchez P., Tarazona J.V., 2002.** Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*. *Aquat. Toxicol*, 60, 249–256.

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

**Sandín-España P., Llanos S., Magrans J.O., Alonso-Prados J.L., García-Baudín J.M., 2003.** Optimization of hydroponic bioassay for herbicide tepraloxym by using water free from chlorine. *Weed Res*, 43, 451–457.

**Sandín-España P., Sevilla-Morán B., Alonso-Prados J.L., Santín-Montanya I., 2012.** Chemical Behaviour and Herbicidal Activity of Cyclohexanedione Oxime Herbicides, In: Nagib Hasaneen M. (Eds.), *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*, 76-102, Open Access Publisher InTech.

**Sapana Devi M., Gupta A., 2014.** Sublethal toxicity of commercial formulations of deltamethrin and permethrin on selected biochemical constituents and enzyme activities in liver and muscle tissues of *Anabas testudineus*. *Pestic. Biochem. Physiol*, 115, 48–52.

**Sarkar S., Ray D., Sshrivastava A.N., 2006.** Molecular biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15, 333–340.

**Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi R., Sbartai H., Guy S. et Djebbar M.R., 2009.** Behavior of *Paramecium Sp.*, Treated with bifenazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *Am.Eur. J. Toxicol. Sci*, 1 (1), 13–18.

**Sbartai I. 2013.** Toxicité d'un hydrazine (Bifenazte) et d'un oxadiazine (Indoxacarbe) observée chez un modèle cellulaire d'eau douce: *Paramecium sp.* Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie, 132 p.

**Schmidt K., Steinberg C.E.W., Staaks G.B.O., Pflugmacher S., 2005.** Influence of a Xenobiotic Mixture (PCB and TBT) Compared to Single Substances on Swimming Behavior or Reproduction of *Daphnia magna*. *Acta hydrochim. Hydrobiol*, 33 (4), 287–300.

**Schultz J.E., Klumpp S., Bernz R., Schürhoff-Goetus W.J., Schmid A., 1992.** Regulation of adenylatecyclises from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductive. *Science*, 255, 600–603.

**Secor J., Cseke C., 1988.** Inhibition of acetyl-CoA carboxylase activity by haloxyfop and tralkoxydim. *Plant Physiol*, 86, 10–12.

**Sekli-Belaidi F., 2011.** Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique: application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin. Thèse de doctorat, Université de Toulouse III - Paul Sabatier, France, 173 p.

**Seng T.W., Skillman T.R., Yang N., Hammond C., 2003.** Cyclohexanedione Herbicides are Inhibitors of Rat Heart Acetyl-CoA Carboxylase. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 13, 3237–3242.

**Senthil Nathan S., Kalaivani K., Murugan K., 2006.** Effect of biopesticides on the lactate dehydrogenase (LDH) of the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 65, 102–107.

**Sevilla-Morán B., López-Goti C., Alonso-Prados J.L., Sandín-España P., 2014.** Degradation of Cyclohexanedione Oxime Herbicides, In: Price A. J. and Kelton J. A (Eds.), *Herbicides - Advances in Research*, Chapter 6, 101-130, Open Access Publisher InTech.

**Sevilla-Morán B., Mateo-Miranda M., López-Goti C., Alonso-Prados J.L., Sandín-España P., 2011.** Photodegradation of profoxydim in natural waters. Comparative study of the photolytic behaviour of the active substance and its formulation Aura®, *Proceedings of Proceedings of XIV Symposium in Pesticide Chemistry. Pesticides in the environment: fate, modelling and risk mitigation*, Piacenza, Italy.

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

**Shimizu N., Ogino C., Kawanishi T., Hayashi Y., 2002.** Fractal analysis of *Daphnia* motion for acute toxicity bioassay. *Environ. Toxicol*, 17, 441–448.

**Shimizu N., Shimuara T., Tanaka T., 2000.** Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat. Res*, 448, 81–90.

**Shubhamsingh T., Tejashree S., 2014.** Effect of neurotoxic insecticide dimethoate on unicellular freshwater protozoan ciliate *Paramecium sp.* *Int. Res. J. Biol. Sci*, 3, 62–66.

**Sies H., 1985.** Oxidative stress: introductory remarks. H. Sies editor: Academic Press, London, 1–2.

**Smolders R., de Boeck G., Blust R., 2003.** Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem*, 22, 890–899.

**Soetaert A., Moens L.N., Van der Ven K., Van Leemput K., Naudts B., Blust R., De Coen W.M., 2006.** Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol*, 142 (1–2), 66–76.

**Soetaert A., Vandenbrouck T., van der Ven K., Maras M., van Remortel P., Blust R., De Coen W.M., 2007.** Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: Integration of differential gene expression with higher-level effects. *Aquat. Toxicol*, 83, 212–222.

**Stagg R.M., 1998.** The development of an international programme for monitoring the biological effects of contaminants in the OSPAR convention area. *Mar. Environ. Res*, 46, 307–313.

**Stefanidou M., Georgiou M., Maravelias C., Koutselinis A., 1990.** The effects of morphine, cocaine, amphetamine and hashish on the phagocytosis of the protozoan *Tetrahymena pyriformis* strain W. *Toxicol. In Vitro*, 4, 779–781.

**Stock C., Gronline H.K., Allen R.D., Naitoh Y., 2002.** Osmoregulation in *Paramecium*: In situ ion gradients permit water to cascade through the cytosol to the contractile vacuole. *J. Cell Sci*, 205 (22), 3261–3270.

**Stohs S.J., Bagchi D., Hasoun E., Bagchi M., 2000.** Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Path. Toxicol. Oncol*, 19, 201–213.

**Stolze K., Nohl H., 1994.** Effect of xenobiotics on the respiratory activity of rat heart mitochondria and the concomitant formation of superoxide radicals. *Environ. Toxicol. Chem*, 13, 499–502.

**Surnom P., 2012.** Indicateurs populationnels de pollution: marqueurs comportementaux chez des crustacés d'eau douce face à un stress métallique. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France, 250 p.

**Suter G.W., Norton S.B., Fairbrother A., 2005.** Individuals versus organisms versus populations in the definition of ecological assessment endpoints. *Integr. Environ. Assess. Manag*, 1, 397–400.

**Symington S.B., Zhang A., Karstens W., Van Houten J.L., Clark, J.M., 1999.** Characterization of pyrethroid action on ciliary calcium channels in *Paramecium tetraurelia*. *Pestic. Biochem. Physiol*, 65, 181–193.

**Takiguchi N., Tajima T., Isayama K., Ikeda T., Kuroda A., Kato J., Ohtake H., 2002.** Behavioral Responses of the Ciliated Protozoan *Paramecium caudatum* to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and its Analogues. *J. Biosci. Bioeng*, 93 (4), 416–420.

**Tomlin C.D.S., 2006.** The Pesticide Manual: A World Compendium. 14 ed., Hampshire: BCPC Publications.

**Toumani T., Tominaga T., Allen R.D., Naitoh Y., 2002.** Development of periodic tension in the contractile vacuole complex membrane of *Paramecium* governs its membrane dynamics, *Cell. Biol. Int*, 26 (10), 853–860.

**Toumi H., Boumaiza M., Millet M., Radteski C.M., Felten V., Fouque C., Férard J.F., 2013.** Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Sci. Total Environ*, 458, 47–53.

**Toumi H., 2013.** Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur différentes souches de "*Daphnia magna*" (Crustacea, Cladocera) : apport de la protéomique dans la recherche de nouvelles cibles cellulaires. Thèse de doctorat, en cotutelle entre l'Université de Lorraine – France et l'Université de Carthage – Tunisie, 208 p.

**Tripathi G., Shasmal J., 2011.** Concentration related responses of chlorpyrifos in antioxidant, anaerobic and protein synthesizing machinery of the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*. Pestic. Biochem. Physiol. 99, 215–220.

**Ulm L., Krivohlavek A., Jurašin D., Ljubojević M., Šinko G., Crnković T., Žuntar I., Šikić S., Vinković Vrček I., 2015.** Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. Environ. Sci. Pollut. Res, 22 (24), 19990–19999.

**Untersteiner H., Kahapka J., Kaiser H., 2003.** Behavioural response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to copper stress validation by image analysis. Aquat. Toxicol, 65, 435–442.

**US EPA., 1989.** Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, EPA/600/4-89/001, Cincinnati, 249.

**Van der Oost H., Beyer J., Vermeulen P.E., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol, 13, 57–149.

**Van Der Vaart H., Postma D.S., Timens W., Ten Hacken N.H.T., 2004.** Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. Thorax, 59, 713–721.

**Van Gool E., Ringelberg J., 1998a.** Light-induced migration behavior of *Daphnia* modified by food and predator kairomones. Anim. Behav, 56, 741–747.

**Van Gool E., Ringelberg J., 1998b.** Quantitative effects of fish kairomones and successive light stimuli on downward swimming responses of *Daphnia*. Aquat. Ecol, 291, 291–296.

**Van Houten J., Preston R.R., 1988.** Chemokinesis. In: Görtz H. D. (ed.): *Paramecium*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 282–300.

**Vasanth S., Arul G., Siva Vijayakumar T., Karthikeyeni S., Manimegalai M., Subramanian P., 2012.** Assessment of anthracene on hepatic and antioxidant enzyme activities in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Int. J. Pharm. Life Sci*, 3 (5), 1696–1704.

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

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

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

**Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A., 2007.** The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol., Part C : Toxicol. Pharmacol*, 146, 281–300.

**Vidal ML., 2001.** Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalves d'eau douce *Corbicula fluminea* (Muller)- Purification et caractérisation des Glutathion S-Transférases .Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, France, 267 p.

**Villarroel M.J., Ferrando M.D., Sancho E., Andreu E., 1999.** *Daphnia magna* feeding behavior after exposure to tetradifon and recovery from intoxication. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 44, 40–46.

**Villarroel M.J, Sancho E., Andreu-Moliner E., Ferrando M.D., 2009.** Biochemical stress response in tetradifon exposed *Daphnia magna* and its relationship to individual growth and reproduction, *Sci. Total Environ*, 407 (21), 5537–5542.

**Villarroel M.J., Sancho E., Andreu-Moliner E., Ferrando M.D., 2013.** Caloric content of *Daphnia magna* as reflect of propanil stress during a short-term exposure and its relationship to long-term responses. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 35 (3), 465–72.

**Villegas-Navarro A., Rosas L.E., Reyes J.L., 2003.** The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 136, 127–134.

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

**Wagner N., Lötters S., Veith M., Viertel B., 2015a.** Acute toxic effects of the herbicide formulation Focus Ultra® on embryos and larvae of the Moroccan painted frog, *Discoglossus scovazzi*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 69, 535–544.

**Wagner N., Lötters S., Veith M., Viertel B., 2015b.** Acute toxic effects of the herbicide formulation and the active ingredient used in cycloxydim-tolerant maize cultivation on embryos and larvae of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 94, 412–418.

**Wallace W.G., Estephan A., 2004.** Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaride amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquat. Toxicol.*, 69, 289–297.

**Wang Y., Fang J., Leonard S.S., Rao K.M.K., 2004.** Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.*, 36, 1434–1443.

**Watson K.G., 2011.** Cyclohexane-1,3-Dione Oxime Ether Grass-Specific Herbicides and the Discovery of Butoxydim. *Aust. J. Chem.*, 64 (4), 367–372.

**Weckbeker G., Cory., 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett.*, 40, 257–264.

**Wehner R., Gehring W., 1995.** *Biologie et Physiologie Animales. Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles : Orientation comparée et évolutive.* Deboeck Université. Thieme Verlag, 286–287.

**Weis J.S., Smith G., Zhou T., Santiago-Bass C., Weis P., 2001.** Effects of contaminants on behaviour: biochemical mechanisms and ecological consequences. *Bioscience*, 51, 209–217.

**Werth C., 2006.** New test organisms for the immission of rivers with continuous bioassays - investigations on the sensitivity of *Daphnia magna*, *Eudiaptomus vulgaris* and *Gammarus roeseli* on insecticides. Thèse de doctorat, Université de Karlsruhe, Allemagne.

**Whitman L. J., Miller R.J., 1982.** The phototactic behavior of *Daphnia magna* as an indicator of chronic toxicity. Proc. Okla. Acad. Sci, 62, 22–33.

**Wiejak J., Surmacz L., Wyroba E., 2003.** Dynamin involvement in *Paramecium* phagocytosis. Europ. J. Protistol, 39, 416–422.

**Wirth D., Christians E.S., Drion P.V., Dessy-Doize C., Gustin P., 2003.** Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. Ann. Med. Vet, 147 (2), 127–144.

**Wolf G., Scheunders P., Selens M., 1998.** Evaluation of the swimming activity of *Daphnia magna* by image analysis after administration of sublethal cadmium concentrations. Comp. Biochem. Physiol A, 120, 99–105.

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

**Wu Y., Lin C., Yuan L., 2008.** Phototaxis index of *Daphnia carinata* as an indicator of joint toxicity of copper, cadmium, zinc, nitrogen and phosphorus in aqueous solutions. Ecol Indic, 8, 69–74.

**Yi X., Ding H., Lu Y., Liu H., Zhang M., Jiang W., 2007.** Effects of long-term alachlor exposure on hepatic antioxidant defense and detoxifying enzyme activities in crucian carp (*Carassius auratus*). Chemosphere, 68, 1576–1581.

**Yildirim N.C., Benzer F., Danabas D., 2011.** Evaluation of environmental pollution at Munzur River of Tunceli applying oxidative stress biomarkers in *Capoeta trutta* (Heckel, 1843). J. Anim. Plant. Sci, 21 (1), 66–71.

**Yu M., Wan S.H., Luo W.R., Han Y.W., Li X.Y., Zhang B.J., Wang J.J., 2009.** Effects of the 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids on the antioxidant defense system of *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf, 72, 1798–1804.

**Zeman F., 2008.** Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie *Daphnia magna* : Etude des effets biologiques de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange. Thèse de doctorat, Université Montpellier II, France, 199 p.

**Zhang L., Gibble R., Baer K.N., 2003.** The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55, 330–337.

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



Research Journal of  
**Environmental  
Toxicology**

ISSN 1819-3420



Academic  
Journals Inc.

[www.academicjournals.com](http://www.academicjournals.com)



## Research Article

# Effects of Cycloxydim on Population Growth, Phagocytosis, Contractile Vacuole Activity and Antioxidant Responses in the Freshwater Ciliate (*Paramecium tetraurelia*)

<sup>1</sup>Ouissem Moumeni, <sup>1</sup>Houria Berrebbah, <sup>1,2</sup>Zoubir Azzouz, <sup>1</sup>Rima Amamra, <sup>1</sup>Hadjer Otmani, <sup>1</sup>Amel Alayat, <sup>1</sup>Sana Benosmane and <sup>1</sup>Mohamed Reda Djebbar

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, B.P. 12, Annaba 23000, Algeria

<sup>2</sup>Department of marine Sciences, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, B.P. 12, Annaba 23000, Algeria

## Abstract

The continuous contamination of the aquatic environments by numerous agricultural and industrial pollutants has triggered the need to identifying new models and bioassays for assessing water pollution and understanding toxic effects of these xenobiotics at different levels. In the present study, investigation was done on physiological changes and antioxidant responses of the freshwater ciliate *Paramecium tetraurelia* exposed to a selective herbicide; Focus Ultra (a.i., cycloxydim: 100 g L<sup>-1</sup>). Our results revealed an inhibitory effect on the cell proliferation rate. The growth inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was found to be 7.53 mg L<sup>-1</sup>. Thus, the number and the velocity of generation were decreased when the generation time was extended significantly at the higher concentration of Focus Ultra (12 mg L<sup>-1</sup>). The normal functioning of the contractile vacuole was also significantly affected at this concentration. Focus Ultra caused evenly a dose dependent stimulation of the phagocytic activity. Furthermore, monitoring biomarkers of oxidative stress showed a significant depletion in glutathione level (GSH) accompanied with a strong increase of glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT) activities reflecting the toxic effects of this herbicide on *Paramecium tetraurelia* cells.

**Key words:** Cycloxydim, *Paramecium tetraurelia*, phagocytic activity, oxidative stress, contractile vacuole

**Received:** December 17, 2015

**Accepted:** January 26, 2016

**Published:** February 15, 2016

**Citation:** Ouissem Moumeni, Houria Berrebbah, Zoubir Azzouz, Rima Amamra, Hadjer Otmani, Amel Alayat, Sana Benosmane and Mohamed Reda Djebbar, 2016. Effects of cycloxydim on population growth, phagocytosis, contractile vacuole activity and antioxidant responses in the freshwater ciliate (*Paramecium tetraurelia*). Res. J. Environ. Toxicol., 10: 115-125.

**Corresponding Author:** Ouissem Moumeni, Laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, B.P. 12, Annaba, 23000, Algeria

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

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

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

## INTRODUCTION

The environmental pollution by dispersed chemical herbicides has become a serious problem especially in aquatic ecosystems due to their extensive use in agriculture and industry (Uri, 1999; Relyea, 2005). Although most herbicides are mainly applied to terrestrial environments, they can be found in diverse aquatic ecosystems albeit at highly variable concentrations (Carter, 2000; Relyea, 2005).

Graminicides belonging to the cyclohexanedione class, are post emergence herbicides widely used, to control annual and perennial grasses in a large variety of broad-leaved crop plants. They inhibit the enzyme, acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) and disrupt fatty acid biosynthesis in susceptible grasses (Burton *et al.*, 1991; Devine and Shimabukuro, 1994). Cyclohexanedione herbicides are known to be biologically active at very low concentrations. Their polar character makes them easily leach to groundwater and potentially contaminant at levels above  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  (Sandin-Espana *et al.*, 2003).

Cycloxydim is one of most popular cyclohexanediones. This active substance and its metabolites exhibits a high to very high mobility in soil and can potentially contaminate groundwater at levels reaching the  $10 \text{ ng L}^{-1}$  (Silva *et al.*, 2006; EFSA., 2010). There are a number of studies carried out by EFSA (2010) on the toxicity of cycloxydim on non-target aquatic organisms. The acute toxicity data indicated that technical cycloxydim is harmful to aquatic organisms (EFSA., 2010).

The environmental disturbance of aquatic ecosystems has generated the need to develop methods for assessing the potential ecological effects of toxic chemicals on individual organisms, populations and communities. Recently, the use of biochemical processes as sensitive indicators of toxic stress had been paid much attention. Indeed, the continuous exposure of non-target organisms to pesticides may cause a metabolic imbalance, thus disrupting biochemical processes and leading to oxidative stress (Gowland *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2010). To minimize oxidative damage and harmful effects of Reactive Oxygen Species (ROS) to cellular components organisms are equipped with numerous defense mechanisms, (Di Giulio *et al.*, 1995; Halliwell and Gutteridge, 2007), which can adapt to increasing ROS production by up-regulating antioxidant defenses, including the activities of enzymatic and non-enzymatic antioxidants (Livingstone, 2003).

The application of protists in laboratory researches as valuable bioassays offer the possibility for predicting toxic effects of chemical compounds (Garad *et al.*, 2007; Fawole *et al.*, 2008). Among protists, ciliated protozoa

represent a basic component of aquatic environments (Jiang *et al.*, 2013). Their microscopic size, ubiquitous distribution, high reproductive rate, relative ease of culturing and accessibility of experimental manipulation make of them excellent unicellular models for toxicological investigations (Morange, 2006; Weisse, 2006).

Paramecium is a ubiquitous freshwater ciliated protozoan that has been extensively investigated and increasingly being used as bioindicators in laboratory researchers to evaluating the environmental pollution and toxic effects of industrial, agricultural and domestic chemicals (Madoni, 2000; Miyoshi *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2005; Sbartai *et al.*, 2009; Amanchi, 2010; Benbouzid *et al.*, 2012). In this context, the main purpose of the present study is to evaluate physiological responses of the ciliated protozoan *Paramecium tetraurelia* exposed to a selective herbicide (cycloxydim). Inhibitory effects on growth and cell division were investigated by determining the  $\text{IC}_{50}$ . In addition, alterations caused by cycloxydim on phagocytic activity and contractile vacuole functioning of Paramecium cells were assessed. On the other hand, oxidative stress was monitored by measuring the antioxidant response using enzymatic (GST and CAT) and nonenzymatic (GSH) antioxidants.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals:** An emulsifiable concentrate of  $100 \text{ g L}^{-1}$  of cycloxydim (10.9%) (Fig. 1), was used in the present experiments as a test chemical, which is readily soluble in water. It is a selective herbicide used for outdoor foliar spraying against perennial grasses and commercialized under the name of Focus Ultra.

**Paramecium culture and maintenance:** *Paramecium tetraurelia* cells were cultured in a synthetic culture medium (pH 6.5) as described previously by Azzouz *et al.* (2011). The culture was maintained in a constant temperature of  $30^\circ\text{C}$  into the oven (memmert 400) and the cells were transplanted each three days in a new medium for keeping the youthful state of the culture.

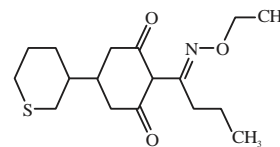


Fig. 1: Structural formula of the active ingredient (cycloxydim: 2-[1-(ethoxymino)butyl]-3-hydroxy-5-(tetrahydro-2H-thiopyran-3-yl)-2-cyclohexen-1-one)

**Treatment with the herbicide:** Based on several preliminary assays carried out on different ranges of Focus Ultra, the appropriate stock solution and the test concentrations were selected. Indeed, four nominal test concentrations were chosen: 3, 6, 9 and 12 mg L<sup>-1</sup>. The herbicide was tested in aliquots of 10 mL of culture medium and the treatment was done at the beginning (t = 0) before the transplantation of Paramecium cells. All experiments were performed with Paramecium cells in logarithmic growth phase. Thus, twenty active paramecia were exposed to selected concentrations with five replicates each.

**Growth monitoring:** The growth kinetics study was established by the daily cell counting during five days (120 h), after fixation with a Lugol solution at 1%, under optic microscope (LEICA DM 1000) using a striated slide. The count was repeated at least five times for each repetition (Azzouz *et al.*, 2011).

**Calculating the median inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>:** The potential toxicity of Focus Ultra (cycloxydim) was quantified by determining the median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>), which is the concentration required to induce 50% decrease in cell growth compared with the control cells for 96 h of treatment. Determination of the IC<sub>50</sub> values was carried out by the kinetic growth method using the linear regression analysis.

**Determination of the number, the time and the velocity of generation:** The number of generations, the time required for each generation and the velocity of the generation were calculated by the following formulae:

$$\text{Number of generations} = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$$

$$\text{Generation velocity} = \frac{\text{Number of generations}}{\text{Time of growth}}$$

$$\text{Generation time} = \frac{1}{\text{Generation velocity}}$$

where, N<sub>t</sub> is the population in time t, N<sub>0</sub> is the initial number of cells.

**Determination of the phagocytic activity:** Phagocytic activity was estimated by a staining technique suggested by Rouabhi *et al.* (2006). It consists to mix a drop of 1% of neutral red with a drop of culture sample (control or treated cells). After 3 min, cells were placed between a glass slide and a

coverslip and the total number of labelled food vacuoles per cell was counted under optic microscope type LEICA DM 1000 (×20 objective).

**Measurement of expulsion frequency of the contractile vacuole:** To restrict the movement of Paramecium, cells were slightly compressed between a glass slide and a coverslip as proposed by Naitoh *et al.* (1997). Expulsion frequencies were video-recorded (Leica EC 3) under optic microscope (×40 objective). The rate of pulsation per minute of the anterior contractile vacuole (from the beginning of one contraction to the beginning of the next one) was determined for the control and treated groups. Five readings were taken for each cell.

**Biochemical assays:** For biomarkers analysis, treatment was done in the fourth day of culture (the end of exponential phase) to avoid any influence on growth. The beginning of the assay for each biomarker takes place three hours after treatment with the herbicide. A preconcentration of Paramecium cells at 3000 rpm min<sup>-1</sup> is necessary. Then, the pellet is recovered for use in the assay of glutathione (GSH), glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT). All assays were performed in triplicate (Azzouz, 2012).

**Determination of glutathione rate (GSH):** The rate of GSH was quantified according to the method of Weckberker and Cory (1988). Cells were homogenized in 1 mL of EDTA (0.02 M) and 0.2 mL of sulfosalicylic acid (ASS) was added to 0.8 mL of homogenate. After agitation, the homogenate was centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The reaction was initiated by adding to 0.5 mL of supernatant, 1 mL of tris/EDTA buffer (0.02 M, pH 9.6) and 0.025 mL of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). The absorbance was measured at 412 nm and the amount of GSH was expressed as μmol mg<sup>-1</sup> of proteins.

**Measurement of glutathione-S-transferase activity (GST):** Determination of GST activity was performed by the method of Habig *et al.* (1974) by following the conjugation of GSH with CDNB. After homogenization of the sample in 1 mL of phosphate buffer (0.1M, pH 6), homogenate was centrifuged at 14000 rpm for 30 min. 1.2 mL of the mixture CDNB (1 mM)/GSH (1mM) was added to 0.2 mL of supernatant to start the reaction. The formation of S-2,4-dinitrophenyl glutathione conjugate was evaluated by recording the increase in absorbance at 340 nm for 5 min after every 1 min interval. It was expressed as μmol/min/mg protein.

**Measurement of catalase activity (CAT):** The CAT activity was measured following the method of Claiborne (1985) whose

the principle is based on the change in optical density due to the dismutation of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). Samples were homogenized in 1 mL of phosphate buffer (100 mM, pH 7.5) then centrifuged at 15000 g for 10 min. The 0.75 mL of phosphate buffer and 0.2 mL of  $H_2O_2$  were added to 0.050 mL of the supernatant. Decrease in absorbance caused by  $H_2O_2$  consumption was monitored at 240 nm for 30 sec with an interval of 15 sec. The results of this enzymatic assay were expressed as  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein.

**Statistical analysis:** Experiments were carried out at least in triplicate and all values were expressed as the Mean  $\pm$  Standard Deviation (SD). To evaluate the relationship between the concentrations of Focus Ultra and the effects on the growth we used the regression analysis. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). To look for differences by pairs between treated samples and the control, we applied the Student's t-test and a value of  $p \leq 0.05$  was considered statically significant. Statistical analyses were performed using the Minitab software (14.0) (Dagnelie, 1999).

## RESULTS

**Effects of Focus Ultra on the growth rate of *Paramecium tetraurelia*:** Focus Ultra showed a significant inhibitory effect on the population density of *P. tetraurelia* in a concentration dependent manner and the growth rate was reduced significantly with the increasing of Focus Ultra concentrations (Fig. 2).

In the first 24 h of exposure, no significant changes were observed in the growth rate of paramecia treated by the lowest concentrations (3 and 6  $\text{mg L}^{-1}$ ) of the herbicide when compared to the control ( $p > 0.05$ ). However, a highly significant depletion in cell number was noticed, since the third day of exposure (72 h), with the highest concentrations (9 and 12  $\text{mg L}^{-1}$ ) of Focus Ultra ( $p \leq 0.001$ ). Thus, it caused about 50 and 70% of the growth decrease, respectively.

**Calculating the  $IC_{50}$ :** According to the growth curve, the  $IC_{50}$ , causing a 50% decrease in growth rate, was calculated from the linear equation " $Y = 7.963x - 10$ " to be 7.53  $\text{mg L}^{-1}$  (Fig. 3).

**Effects on the number, the time and the velocity of generation:** Figure 4 illustrates the effect of Focus Ultra on the number, the time and the velocity of generation. The results showed that Focus Ultra has gradually affected the multiplication of *P. tetraurelia* and led to a slower growth and a delayed cell division.

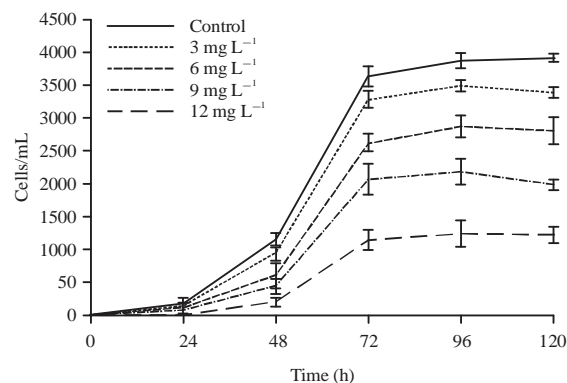


Fig. 2: Growth kinetics of *P. tetraurelia* exposed to different concentrations of Focus Ultra

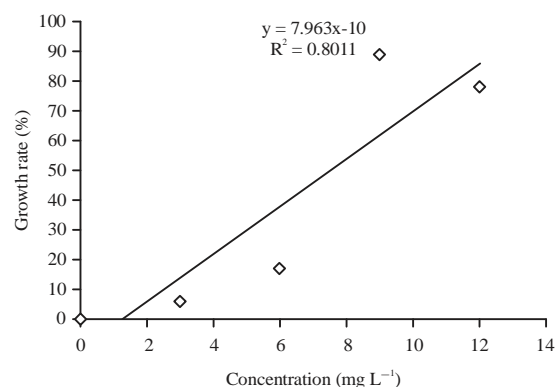


Fig. 3: Determination of the  $IC_{50}$  by the kinetic growth method

Table 1: Phagocytic activity of <i>P. tetraurelia</i> after treatment with Focus Ultra	
Concentrations of Focus Ultra ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Number of food vacuoles per cell
Control	$9.80 \pm 1.92^*$
3	$15.0 \pm 1.41^*$
6	$16.4 \pm 2.07^*$
9	$20.4 \pm 2.07^*$
12	$28.2 \pm 2.86^*$

Values are represented as Mean  $\pm$  SD (n = 5). Significant differences from the control are indicated as: \* $p \leq 0.05$

Exposure to increasing concentrations of Focus Ultra caused an increase of the generation time in a dose dependent manner (Fig. 4b). The generation time of the control *P. tetraurelia* cells was calculated to be 12.6 h; however, it increased at the higher concentration (12  $\text{mg L}^{-1}$ ) to reach approximately 16 h. Consequently, the number and the velocity of generation were inversely proportional to the concentrations of Focus Ultra and they knew a progressive decrease along with increasing concentrations (Fig. 4a and c).

**Phagocytic activity:** Results concerning the effect of Focus Ultra on phagocytic activity in *P. tetraurelia* are illustrated in Table 1. A dose-dependent stimulatory effect of the number of food vacuoles in cells treated with increased concentrations

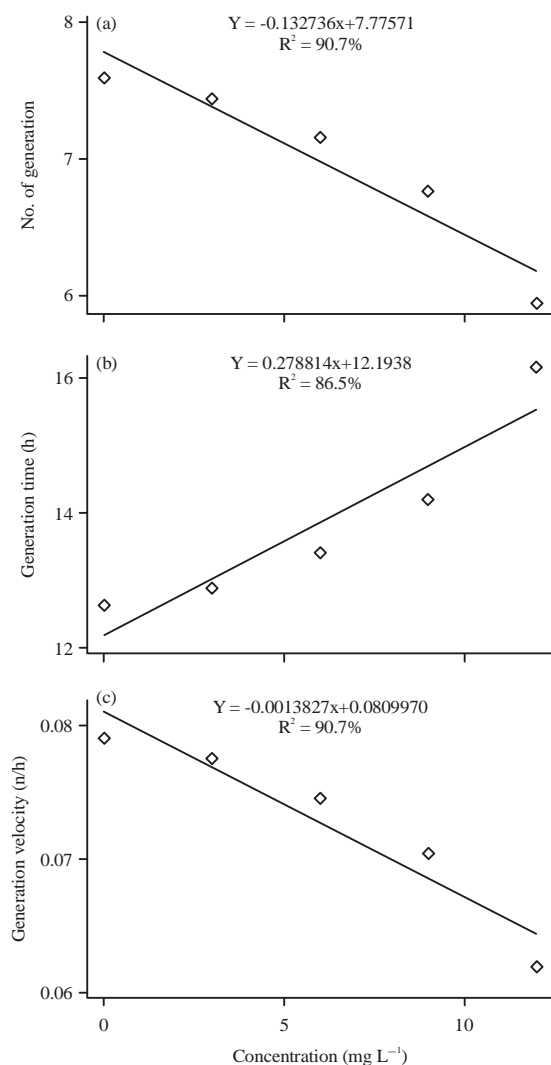


Fig. 4(a-c): Effects of Focus Ultra on (a) The number of generation (b) Generation time and (c) Velocity of generation of *P. tetraurelia*

Table 2: Contractile vacuole activity in *P. tetraurelia* exposed to increased concentrations of Focus Ultra

Concentrations of Focus Ultra (mg L <sup>-1</sup> )	No. of pulses min <sup>-1</sup>	Average time of one pulsation (sec)
Control	12.3 ± 1.56	4.88 ± 0.70
3	11.8 ± 1.64	5.08 ± 0.85
6	10.2 ± 2.77	5.88 ± 1.20
9	9.4 ± 2.88	6.38 ± 1.22
12	7.6 ± 1.93*	7.90 ± 0.86

Values are represented as Mean ± SD (n = 5). Significant differences from the control are indicated as: \*p < 0.05

of Focus Ultra compared to the control was observed (Fig. 5). Indeed, the average number of food vacuoles was significantly elevated from 9.8 in control cells to 15 and 16.4 in paramecia exposed to 3 and 6 mg L<sup>-1</sup> (p = 0.002 and p = 0.001),

respectively. The maximal stimulation was occurred in cells treated with the highest concentrations (9 and 12 mg L<sup>-1</sup>) of Focus Ultra, noted values were equal to 20.4 and 28.2 food vacuoles/cells (p = 0.000).

**Contractile vacuole activity:** As shown in Table 2, a dose dependent decrease in expulsion frequency of the contractile vacuole was found in *Paramecium* cells exposed to Focus Ultra. In concentration 3, 6 and 9 mg L<sup>-1</sup>, the vacuolar activity was insignificantly diminished when compared to the control. The maximum inhibitory effect on contractile vacuole activity was recorded at the highest concentration of 12 mg L<sup>-1</sup>. In fact, a significant vacuolar retardation estimated by 7.6 pulses min<sup>-1</sup> (p = 0.006) and an average time of 7.9 sec for one pulsation, as compared with control values of 12.3 pulses min<sup>-1</sup> and 4.88 sec for one pulsation was noted.

**Antioxidant responses:** The results of antioxidant enzyme activities (CAT and GST) and the GSH level are presented in Fig. 6.

A significant increase in CAT activity compared with the control was observed following exposure to all concentrations of Focus Ultra (p = 0.000), except for the lowest concentration of 3 mg L<sup>-1</sup> (p = 0.775) (Fig. 6a). Thus, it was from 11.93 ± 1.63 μM/min/mg protein and 17.22 ± 3 μmol/min/mg protein for the concentrations (6 and 9 mg L<sup>-1</sup>), respectively and reached a rate of 24.23 ± 1.17 μmol/min/mg protein for the highest concentration of 12 mg L<sup>-1</sup>. While, in control cells catalase activity was only from 4.75 ± 0.41 μmol/min/mg protein.

On the other hand, exposure of *P. tetraurelia* to this herbicide resulted in a strong induction of the GST activity (Fig. 6b). The greatest enzymatic activity appeared with concentrations (9 and 12 mg L<sup>-1</sup>), which had highly significant increase when compared to the control (p = 0.004 and p = 0.008). However, the effects of Focus Ultra were less intense in concentrations 3 and 6 mg L<sup>-1</sup>, where there were no significant differences in GST activity (p = 0.434 and p = 0.129).

The results regarding the variation of the GSH level are shown in Fig. 6c. It was found that Focus Ultra causes a dose dependent decrease in the GSH rate. Compared to the control (18.05 ± 2.52), GSH level was significantly reduced to be 10.47 ± 0.85 μmol mg<sup>-1</sup> protein (p = 0.039) in paramecia treated with the concentration of 6 mg L<sup>-1</sup>. For cells treated with 9 and 12 mg L<sup>-1</sup> this rate was determinate to be 7.99 ± 1.54 and 4.47 ± 1.18 μmol mg<sup>-1</sup> protein (p = 0.010 and p = 0.014), respectively.

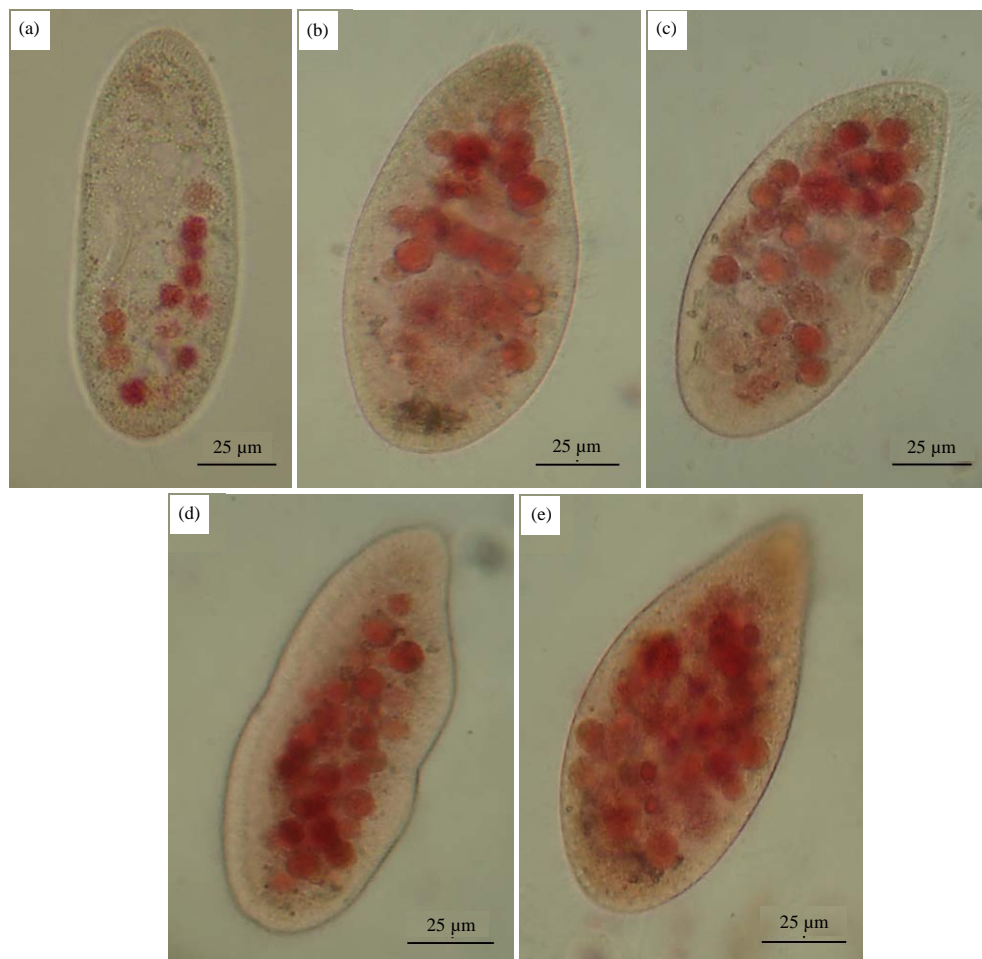


Fig. 5(a-e): Microscopic images of (a) *P. tetraurelia* control, (b) Exposed cells to 3 mg L<sup>-1</sup>, (c) 6 mg L<sup>-1</sup>, (d) 9 mg L<sup>-1</sup> and (e) 12 mg L<sup>-1</sup> of Focus Ultra, stained with neutral red at 1%

## DISCUSSION

Due to their high degree of selectivity and efficiency against both annual and perennial grass weeds, cyclohexanediones are important herbicides in crop production (Kukorelli *et al.*, 2013). However, their intensive use may cause many toxicological and environmental problems and has led to the emergence of herbicide resistant weeds (Toyama *et al.*, 2003; Hochberg *et al.*, 2009; Collavo *et al.*, 2011). This could result in significant economic losses and the necessity of using higher herbicide rates with deleterious consequences to both the environment and human health (Park *et al.*, 2010).

Cycloxydim is a frequently used active ingredient from the chemical group of cyclohexanediones, which have been qualified as high-risk herbicide (Mohassel *et al.*, 2010). Several studies have been carried out on the efficiency of cycloxydim

on a wide variety of troublesome weeds and their resistance to this herbicide (Delye *et al.*, 2002; Mohassel *et al.*, 2010; Cruz-Hipolito *et al.*, 2012). Although, microorganisms are convenient for culture and highly sensitive to many chemical substances (Weisse, 2006), the toxicological effects of cycloxydim on microorganisms, especially ciliates have not been well documented. Majority of studies have been conducted on plants. From this vision, the aim of the present study is to evaluate the toxicity of cycloxydim on a ciliate protozoan: *Paramecium tetraurelia*, by monitoring some physiological and antioxidant responses of cells exposed to the commercial formulation of Focus Ultra.

Concerning physiological responses, our results demonstrated that the toxicity of Focus Ultra was expressed by an inhibition of the cell growth with an IC<sub>50</sub> value of about 7.53 mg L<sup>-1</sup>. Further, it induced an inhibition effect on cellular division. This inhibition provokes an important increase in

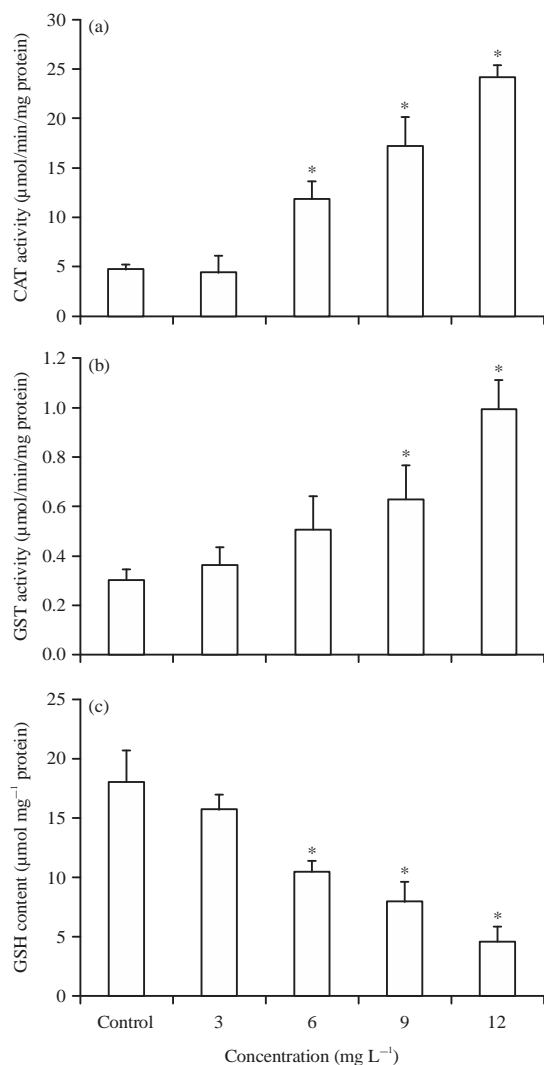


Fig.6(a-c): Variation of oxidative stress biomarkers depending on different concentrations of Focus Ultra (a) CAT activity, (b) GST activity and (c) GSH rate. Significant differences from the control are indicated as: \* $p \leq 0.05$

generation time with a decrease of the number and the velocity of generation. This can be explained by the fact that increasing concentrations of toxicants in the cell may affect survival and cellular division of protists thereby causing cell death (Madoni, 2000; Mountassif *et al.*, 2007). Ma *et al.* (2006) also studied the acute toxicity of 40 herbicides with nine modes of action on the freshwater unicellular green algae *Raphidocelis subcapitata* and pointed out that acetyl CoA carboxylase inhibitors (clethodim, diclofop-P, fenoxaprop, fluazifop-P, haloxyfop-R and quizalofop-P), which have the same mode of action of our experimental herbicide (cycloxydim) occupied the third place in the descending

order of the average acute toxicity, with a 96 h EC<sub>50</sub> range of 0.2-5.3 mg L<sup>-1</sup>. Similarly, the results are in accordance with those of Azzouz *et al.* (2011) and Rao *et al.* (2006) that demonstrated an inhibition in cell growth and proliferation of paramecia exposed to increased concentrations of amistar xtra and acephate, respectively. Recently, the same results were also observed by Shubhamsingh and Tejashree (2014).

A dose dependent stimulatory effect of the rate of phagocytosis was also ascertained during treatment with Focus Ultra. Thus, our results showed a significant increase in the number of food vacuoles along with increasing concentrations of the herbicide. It has been demonstrated previously that formation and movement of food vacuoles in the cell is assured by ciliary motility. In fact, factors affecting the ciliary action should necessarily influence the rate of food vacuole formation (Nilsson, 2003). The results are consistent with those of Nilsson (1981) that noted a stimulation of phagocytosis in *Tetrahymena* cells treated with increased concentrations of copper and attributed this increase to a possible correlation with increasing cell motility. This is the case of the present study where an increase in swimming velocity of *Paramecium* cells exposed to Focus Ultra was observed. These findings can be also explained by the fact that the presence of a high content of organic matter in the culture medium can increase the tolerance of ciliates to higher concentrations of Focus Ultra, as it was shown earlier by Nilsson (1981). Stefanidou *et al.* (1990) reported even a stimulation in the phagocytic ability of protozoans exposed to amphetamine and interpreted this result by a probable increase in the energy level caused by the drug. In addition, Amanchi and Hussain (2008) suggested that the presence of pesticides in the external environment of the cell can modify the pH of the medium and consequently change the food vacuole formation. A disturbance of the phagocytosis was similarly discerned by Nilsson (2005) in *Tetrahymena pyriformis* treated with cigarette extracts and ethanol, respectively. On the other hand, the results disagreed with those of Jaleel (2002), Hussain *et al.* (2008) and Amanchi and Hussain (2012). These authors pointed out that the inhibition of phagocytosis could be due to a damage in cell membrane or cilia structure.

Osmoregulation in *Paramecium* is provided by the activity of the Contractile Vacuole Complex (CVC) and depended on both regulatory mechanisms controlling the cytosolic osmolarity and water permeability of the plasma membrane (Stock *et al.*, 2001). The contractile vacuole was one of the first organelles to be visualized within *Paramecium* and has stimulated more research than any other protozoan organelle, beginning with the earliest microscopists, in order

to understand the structure and functioning mechanisms of this complex (Patterson, 1980). It has been previously agreed that contractile vacuole complex of ciliates is very highly sensitive to changes in the cell's environment and the frequency of expulsion can be modified, particularly, by the osmotic pressure of the external medium (Patterson, 1980). Effectively, the addition of Focus Ultra to the culture medium has caused a dose dependent decrease in vacuolar activity of *P. tetraurelia*. This can be a response to the sudden change in the external osmolality as it was described already by Amanchi and Hussain (2008). They suggested even that disruption of the vacuolar apparatus can be a probable reason to the decrease of contractile vacuole activity. Recently, Shubhamsingh and Tejashree (2014) reported also that the insecticide dimethoate has an inhibitory effect on the contractile vacuole complex of *Paramecium* sp.

In environmental studies, biomarkers were considered as early warning signals usually employed in the field of risk assessment and biomonitoring to identify and predict effects of toxicants on biological organisms (Van der Oost *et al.*, 2003; Jemec *et al.*, 2012). Thus, the use of biomarkers of oxidative stress provides detailed information on the potential toxicity of pollutants (Barata *et al.*, 2005).

In this study, interest was focused evenly on antioxidant responses of *P. tetraurelia* in the presence of Focus Ultra. Results revealed a strong antioxidant enzyme activity resulting in an increase of GST and CAT activities, known for their role in the detoxification of free radicals, parallel to the decrease of GSH level which is considered as an excellent biomarker of toxicity. These enzymatic and non-enzymatic antioxidant reactions provide to the cell a state of equilibrium and protection against oxidized reactive species (Mofredj *et al.*, 1999).

As the vital first-line defenses against oxidative stress, CAT is a key antioxidant enzyme mainly located in peroxisomes (Yu, 1994) and designed to reduce hydrogen peroxide resulting from the metabolism of long chain fatty acids (Yi *et al.*, 2007). In the present study, CAT activity was significantly increased at higher concentrations of Focus Ultra. This increase might be contributed to the elimination from the cell of Reactive Oxygen Species (ROS) induced by pesticide exposure, which converts oxygen free radical ( $O_2^-$ ) into  $H_2O_2$  and then into  $H_2O$  and  $O_2$  (Barata *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2010). These results are supported by the findings of Bouaricha (2013) and Sbartai (2013) who recorded an intensification of CAT activity in *Paramecium* cells treated with bifenthrin and prochloraz. According to Yu *et al.* (2009), the higher enzyme activity could efficiently protect against potential increased production of ROS and may reflect an adaptation in response to the oxidative conditions to which freshwater organisms are exposed.

At the cellular level, the antioxidant defense system consisting of both small molecule free radical scavengers and antioxidant enzymes has as function the detoxification and elimination of ROS. Glutathione S-transferase is just one of the multicomponent enzymes interfered in the detoxification of different toxicants and protecting tissues from oxidative damage (Khurana *et al.*, 2002). Its activity was notified to be upregulated by induction of the antioxidant/electrophile responsive element during oxidative stress (Ahlgren-Beckendorf *et al.*, 1999). In our investigation, a higher GST activity was observed following exposure to most of the concentrations of Focus Ultra. This can be understood in view of the fact that pesticides consume GSH through a GST-catalyzed reaction as a major way of detoxification and these chemicals are expected to induce the activity of GST as a potent protection mechanism of the organism (Timur *et al.*, 2002). Similarly, GST was significantly induced in *P. tetraurelia* cells exposed to the highest concentration of cypermethrin insecticide (Amamra *et al.*, 2015).

The GSH and GSH-related enzymes are considered as the vital second-line defenses against oxidative damage and play a major role in cellular metabolism and free radical scavenging (Pena-Llopis *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008). The marked decline in GSH level in the present work might be due to its massive utilization to challenge the prevailing oxidative stress resulting from excess generation of ROS (Ranjbar *et al.*, 2005; Ansari and Ansari, 2014). Likewise, the depletion of GSH level may be attributed to detoxification process depending on glutathione-S-transferase (GST) enzyme which is one of the enzyme systems that consume GSH molecules as a substrate (Farag *et al.*, 2010). The experimental results are in agreement with earlier studies (Grara *et al.*, 2012; Saib *et al.*, 2014) that elucidated a significant depletion of the GSH content in *paramecia* exposed to polymethyl methacrylate (dental resin) and amidophosphonate (organophosphorus insecticide), respectively.

## CONCLUSION

Based on experimental data obtained throughout this study, it appears that *Paramecium tetraurelia* cells are sensitive to cycloxydim. This sensitivity is manifested by a disturbance in the physiological state of *Paramecium* cells, accompanied with a global change in responses of antioxidant biomarkers. Given their sensitivity and particular cellular organization, it was confirmed that these ciliates are ideal alternative models for biomonitoring programs and assessing chemical toxicity. However, further detailed studies should be focused on better understanding the cycloxydim mechanism of action, as well as

evaluating his genotoxic effects in *Paramecium* cells. It would also be interesting to explore the long-term effects of this herbicide or else test it on other aquatic organisms.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank J. Bohatier (from Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France) for kindly providing us *P. tetraurelia*.

### REFERENCES

- Ahlgren-Beckendorf, J.A., A.M. Reising, M.A. Schander, J.W. Herdler and J.A. Johnson, 1999. Coordinate regulation of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase and glutathione-S-transferases in primary cultures of rat neurons and glia: Role of the antioxidant/electrophile responsive element. *Glia*, 25: 131-142.
- Amamra, R., M.R. Djebbar, N. Grara, O. Moumeni, H. Otmani, A. Alayat and H. Berrebbah, 2015. Cypermethrin-induces oxidative stress to the freshwater ciliate model: *Paramecium tetraurelia*. *Annu. Res. Rev. Biol.*, 5: 385-399.
- Amanchi, N.R. and M.M. Hussain, 2008. Cytotoxic effects of delfin insecticide (*Bacillus thuringiensis*) on cell behaviour, phagocytosis, contractile vacuole activity and macronucleus in a protozoan ciliate *Paramecium caudatum*. *Afr. J. Biotechnol.*, 7: 2637-2643.
- Amanchi, N.R., 2010. A low cost microbiotest for screening behavioural and ecotoxicological responses of *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax* to azadirachtin. *Adv. Appl. Sci. Res.*, 1: 124-131.
- Amanchi, N.R. and M.M. Hussain, 2012. Ecophysiological and cytopathological impact of delfin insecticide (*Bacillus thuringiensis*) to an unicellular ciliate protozoan, *Euplotes patella*. *Res. J. Recent Sci.*, 1: 64-67.
- Ansari, S. and B.A. Ansari, 2014. Temporal variations of CAT, GSH and LPO in gills and livers of zebrafish, *Danio rerio*, exposed to dimethoate. *Arch. Polish Fish.*, 22: 101-109.
- Azzouz, Z., H. Berrebbah and M.R. Djebbar, 2011. Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5: 3243-3250.
- Azzouz, Z., 2012. Study of toxic effects of a fungicide (Amistar Xtra) and a herbicide (Glyphosate) on the biology and comportment of *Paramecium tetraurelia*. Ph.D. Dissertation Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria.
- Barata, C., I. Varo, J.C. Navarro, S. Arun and C. Porte, 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 140: 175-186.
- Benbouzid, H., H. Berrebbah, M. Berredjem and M.R. Djebbar, 2012. Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium* sp. with special emphasis on respiratory metabolism, growth and generation time. *Toxicol. Environ. Chem.*, 94: 557-565.
- Bouaricha, H., 2013. Evaluation of oxidative stress induced by Proclaim: Comparative test on two biological models (*Helix aspersa* and *Paramecium* sp.). Ph.D. Dissertation, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria.
- Burton, J.D., J.W. Gronwald, R.A. Keith, D.A. Somers, B.G. Gengenbach and D.L. Wyse, 1991. Kinetics of inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by sethoxydim and haloxyfop. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 39: 100-109.
- Carter, A., 2000. How pesticides get into water-and proposed reduction measures. *Pestic. Outlook.*, 11: 149-156.
- Claiborne, A., 1985. Catalase Activity. In: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, Greenwald, R.A. (Ed.). 3rd Edn., CRC Press, Boca Raton, FL., USA., ISBN-13: 9780849329364 pp: 283-284.
- Collavo, A., S. Panozzo, G. Lucchesi, L. Scarabel and M. Sattin, 2011. Characterisation and management of *Phalaris paradoxa* resistant to ACCase-inhibitors. *Crop Protect.*, 30: 293-299.
- Cruz-Hipolito, H., J.A. Dominguez-Valenzuela, M.D. Osuna and R. De Prado, 2012. Resistance mechanism to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Phalaris paradoxa* collected in Mexican wheat fields. *Plant Soil*, 355: 121-130.
- Dagnelie, P., 1999. *Theoretical and Applied Statistics: Statistical References to One and Two Dimensional*. University of Minnesota Press, Minneapolis pages: 659.
- Delye, C., E. Calmes and A. Matejcek, 2002. SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl CoA-carboxylase inhibiting herbicides. *Theoret. Applied Genet.*, 104: 1114-1120.
- Devine, M.D. and R.H. Shimabukuro, 1994. Resistance to Acetyl Coenzyme A Carboxylase Inhibiting Herbicides. In: *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*, Powles, S.B. and J.A.M. Holtum (Eds.). Chapter 5, Lewis Publishers, Boca Raton, FL., USA. ISBN 13: 9780873717137 pp: 141-169.
- Di Giulio, R.T., W.H. Benson, B.M. Sanders and P.A. Van Veld, 1995. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation and Toxicity. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*, Rand, G.M. (Ed.). 2nd Edn., Chapter 17, Taylor and Francis Inc., Boca Raton, FL., USA., ISBN-13: 978-1560320913, pp: 523-562.
- EFSA., 2010. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cycloxydim. *EFSA J.*, Vol. 8, No. 7. 10.2903/j.efsa.2010.1669
- Farag, A.G.A., M.E.A. Elhalwagy and H.E.A. Farid, 2010. Effect of ginger supplementation on developmental toxicity induced by fenitrothion insecticide and/or lead in albino rats. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 97: 267-274.

- Fawole, O.O., T.A. Yekeen, A.A. Ayandele, A. Akinboro, M.A. Azeed and S.O. Adewoye, 2008. Polluted Alamuyo River: Impacts on surrounding wells, microbial attributes and toxic effects on *Allium cepa* root cells. Asian J. Biotechnol., 7: 450-458.
- Garad, U., S.N. Desai and P.V. Desai, 2007. Toxic effects of monocrotophos on *Paramecium caudatum*. Afri. J. Biotechnol., 6: 2245-2250.
- Gowland, B.T.G., C.F. Moffat, R.M. Stagg, D.F. Houlihan and I.M. Davies, 2002. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. Mar. Environ. Res., 54: 169-177.
- Grara, N., B. Houda, B. Mounir, A. Amira, B. Houria, D.M. Reda and Z. Chafica, 2012. Evaluation of the potential toxicity of the polymethyl methacrylate (dental resin) on a cellular model alternate *Paramecium*. Adv. Environ. Biol., 6: 1392-1399.
- Habig, W.H., M.J. Pabst and W.B. Jakoby, 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem., 249: 7130-7139.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th Edn., Clarendon Press, Oxford, UK, ISBN-13: 9780198568698, Pages: 888.
- Hochberg, O., M. Sibony and B. Rubin, 2009. The response of ACCase-resistant *Phalaris paradoxa* populations involves two different target site mutations. Weed Res., 49: 37-46.
- Hussain, M.M., N.R. Amanchi, V.R. Solanki and M. Bhagavathi, 2008. Low cost microbioassay test for assessing cytopathological and physiological responses of ciliate model *Paramecium caudatum* to carbofuran pesticide. Pestic. Biochem. Physiol., 90: 66-70.
- Jaleel, M.A., 2002. *In vitro* toxicity evaluation of some pesticides using certain protozoa. Ph.D. Dissertation, Osmania University, Hyderabad, India.
- Jemec, A., T. Tisler, B. Erjavec and A. Pintar, 2012. Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. Ecotoxicol. Environ. Saf., 86: 213-218.
- Jiang, Y., H. Xu, M. Zhu and K.A.S. Al-Rasheid, 2013. Temporal distributions of microplankton populations and relationships to environmental conditions in Jiaozhou Bay, Northern China. J. Mar. Biol. Assoc. UK., 93: 13-26.
- Jin, Y., X. Zhang, L. Shu, L. Chen and L. Sun *et al.*, 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, 78: 846-852.
- Khurana, S., M.T. Corbally, F. Manning, T. Armenise, B. Kierce and C. Kilty, 2002. Glutathione S-transferase: A potential new marker of intestinal ischemia. J. Pediatr. Surg., 37: 1543-1548.
- Kukorelli, G., P. Reisinger and G. Pinke, 2013. ACCase inhibitor herbicides-selectivity, weed resistance and fitness cost: A review. Int. J. Pest Manage., 59: 165-173.
- Liu, Y., J. Wang, Y. Wei, H. Zhang, M. Xu and J. Dai, 2008. Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver. Aquatic Toxicol., 89: 242-250.
- Livingstone, D.R., 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. Revue Medecine Veterinaire, 154: 427-430.
- Ma, J., S. Wang, P. Wang, L. Ma, X. Chen and R. Xu, 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 63: 456-462.
- Madoni, P., 2000. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. Environ. Pollut., 109: 53-59.
- Miyoshi, N., T. Kawano, M. Tanaka, T. Kadono and T. Kosaka, 2003. Use of *Paramecium* species in bioassays for environmental risk management: Determination of IC<sub>50</sub> values for water pollutants. J. Health Sci., 49: 429-435.
- Mofredj, A., J.F. Cadranet, B. Darchy, J.C. Barbare, A. Cazier, V. Pras and M. Biour, 1999. [Hepatotoxicity caused by therapeutic doses of paracetamol in alcoholics. Report of 2 cases of fatal hepatitis in cirrhosis]. Annales Medecine Interne, 150: 507-511, (In French).
- Mohassel, M.H.R., A. Aliverdi, H. Hamami and E. Zand, 2010. Optimizing the performance of diclofop-methyl, cycloxydim and clodinafop-propargyl on littleseed canarygrass (*Phalaris minor*) and wild oat (*Avena ludoviciana*) control with adjuvants. Weed Biol. Manage., 10: 57-63.
- Morange, M., 2006. What history tells us IV. Ciliates as models of what? J. Biosci., 31: 27-30.
- Mountassif, D., M. Kabine, R. Manar, N. Bourhim, Z. Zaroual, N. Latruffe and M.H.S. El Kebbaj, 2007. Physiological, morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vivo cytotoxicity assessment of metallic pollution: Impact on D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase. Ecol. Indicators, 7: 882-894.
- Naitoh, Y., T. Tominaga and R.D. Allen, 1997. The contractile vacuole fluid discharge rate is determined by the vacuole size immediately before the start of discharge in *Paramecium multimicronucleatum*. J. Exp. Biol., 200: 1737-1744.
- Nilsson, J.R., 1981. Effects of copper on phagocytosis in *Tetrahymena*. Protoplasma, 109: 359-370.
- Nilsson, J.R., 2003. Lanthanum affects proliferation and motility of *Tetrahymena*. Eur. J. Protistol., 39: 468-474.
- Nilsson, J.R., 2005. Ethanol affects endocytosis and proliferation of *Tetrahymena pyriformis* GL and promotes encystment. Acta Protozoologica, 44: 293-299.
- Park, K., J. Park, J. Kim and I.S. Kwak, 2010. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol., 151: 439-446.

- Patterson, D.J., 1980. Contractile vacuoles and associated structures: Their organization and function. *Biol. Rev.*, 55: 1-46.
- Pena-Llopis, S., M.D. Ferrando and J.B. Pena, 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by *N*-acetylcysteine. *Aquat. Toxicol.*, 65: 337-360.
- Ranjbar, A., H. Solhi, F.J. Mashayekhi, A. Susanabdi, A. Rezaie and M. Abdollahi, 2005. Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 20: 88-91.
- Rao, J.V., K. Srikanth, S.K. Arepalli and V.G. Gunda, 2006. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour and generation time. *Pest. Biochem. Physiol.*, 86: 131-137.
- Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Applic.*, 15: 618-627.
- Rouabhi, R., H. Berrebbah and M.R. Djebbar, 2006. Toxicity evaluation of flucycloxuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium* sp. *Afr. J. Biotechnol.*, 5: 45-48.
- Saib, A., H. Berrebbah, M. Berredjem and M.R. Djebbar, 2014. Cytotoxic study of three derivatives amidophosphonates on alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia*. *Toxicol. Res.*, 3: 395-399.
- Sandin-Espana, P., S. Llanos, J.O. Magrans, J.L. Alonso-Prados and J.M. Garcia-Baudin, 2003. Optimization of hydroponic bioassay for herbicide tepraloxym by using water free from chlorine. *Weed Res.*, 43: 451-457.
- Sbartai, I., H. Berrebbah, R. Rouabhi, H. Sbartai, S. Guy and M.R. Djebbar, 2009. Behavior of *Paramecium* sp., treated with bifentazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *Am.-Eurasian J. Toxicol. Sci.*, 1: 13-18.
- Sbartai, I., 2013. Toxicity of a hydrazine carboxylate (Bifenazate) and an oxadiazine (Indoxacarb) observed in a cellular freshwater model: *Paramecium* sp. Ph.D. Dissertation, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria.
- Shubhamsingh, T. and S. Tejashree, 2014. Effect of neurotoxic insecticide dimethoate on unicellular freshwater protozoan ciliate *Paramecium* sp. *Int. Res. J. Biol. Sci.*, 3: 62-66.
- Silva, E., S. Batista, P. Viana, P. Antunes, L. Serodio, A.T. Cardoso and M.J. Cerejeira, 2006. Pesticides and nitrates in groundwater from oriculture areas of the Baixo Sado region (Portugal). *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 86: 955-972.
- Stefanidou, M., M. Georgiou, C. Maravelias and A. Koutselinis, 1990. The effects of morphine, cocaine, amphetamine and hashish on the phagocytosis of the protozoan *Tetrahymena pyriformis* strain W. *Toxicol. In vitro*, 4: 779-781.
- Stock, C., R.D. Allen and Y. Naitoh, 2001. How external osmolarity affects the activity of the contractile vacuole complex, the cytosolic osmolarity and the water permeability of the plasma membrane in *Paramecium multimicronucleatum*. *J. Exp. Biol.*, 204: 291-304.
- Takahashi, T., M. Yoshii, T. Kawano, T. Kosaka and H. Hosoya, 2005. A new approach for the assessment of acrylamide toxicity using a green *Paramecium*. *Toxicol. In vitro*, 19: 99-105.
- Timur, S., S. Onal, U.N. Karabay, F. Sayim and F. Zihniogul, 2002. *In vivo* effects of malathion on glutathione-S-transferase and acetylcholinesterase activities in various tissues of neonatal rats. *Turk. J. Zool.*, 27: 247-252.
- Toyama, K., C.H. Bae, J.G. Kang, Y.P. Lim and T. Adachi *et al.*, 2003. Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Cells.*, 31: 19-27.
- Uri, N.D., 1999. The implications of US Government policy on the development and use of biopesticides. *Int. J. Environ. Pollut.*, 11: 117-132.
- Van der Oost, R., J. Beyer and N.P.E. Vermeulen, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57-149.
- Weckberker, G. and J.G. Cory, 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells *in vitro*. *Cancer Lett.*, 40: 257-264.
- Weisse, T., 2006. Freshwater ciliates as ecophysiological model organisms-lessons from *Daphnia*, major achievements and future perspectives. *Arch. Hydrobiol.*, 167: 371-402.
- Yi, X., H. Ding, Y. Lu, H. Liu, M. Zhang and W. Jiang, 2007. Effects of long-term alachlor exposure on hepatic antioxidant defense and detoxifying enzyme activities in crucian carp (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 68: 1576-1581.
- Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 74: 139-162.
- Yu, M., S.H. Wang, Y.R. Luo, Y.W. Han, X.Y. Li, B.J. Zhang and J.J. Wang, 2009. Effects of the 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids on the antioxidant defense system of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72: 1798-1804.