

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

BADJI MOKHTAR -ANNABA
UNIVERSITY
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
ANNABA



جامعة باجي مختار
- عنابة -

Faculté des Sciences

Année : 2020

Département de Biologie

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

**EFFETS POPULATIONNELS DE CERTAINES
MOLECULES TOXIQUES SUR DES MICROCRUSTACES
CLADOCERS (DAPHNIES) D'EAU DOUCE**

Option
Toxicologie

Par
M^{elle} BELAID Chahrazad

DIRECTEUR DE THÈSE :

Dr. SBARTAI Ibtissem M.C.A. Université Badji Mokhtar. ANNABA

Devant le jury

PRESIDENTE :	BERREBBAH H.	Prof.	Université Badji Mokhtar. ANNABA
EXAMINATRICE :	KHATI W.	Prof.	Université Chadli Bendjedid. ELTARF
EXAMINATRICE :	GASMI Y.	M.C.A.	Université Chadli Bendjedid. ELTARF
EXAMINATEUR :	AZZOUZ Z.	M.C. A.	Université Badji Mokhtar. ANNABA

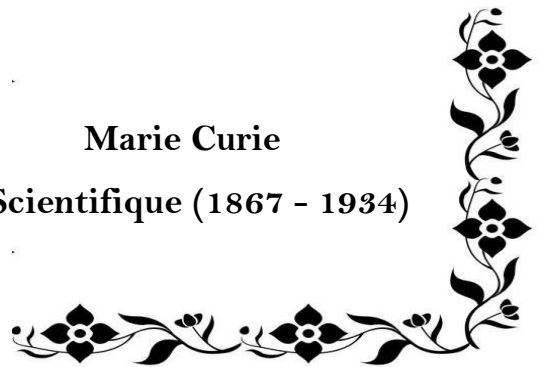
بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.

Marie Curie

Physicienne, Scientifique (1867 - 1934)



Dédicaces

*Je dédie cet événement marquant de ma vie
A la mémoire de mon très cher grand-père Ali*

A la mémoire de mon oncle Mohand

« Que Dieu Leurs accorde sa grâce et sa miséricorde »

A ma très chère mère à qui je dois tout ;

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme
il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta
présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter
les différents obstacles.*

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

J'espère que tu seras toujours fière de moi Maman

A mon père pour son soutien et ses encouragements,

A Sihem et Souhila mes très chères sœurs ;

*Pour le soutien moral et les conseils précieux tout au long de mes
études. Sans votre aide, je n'aurais pu mener ce travail à bien.*

A toute ma famille

A tous mes amis

Chahrazad

Remerciements

A Dieu, pour le réveil de chaque matin, les challenges de chaque journée et pour m'avoir donné l'opportunité de mener à terme ce travail de thèse.

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) de l'Université Badji Mokhtar Annaba, sous la direction du **Pr. Mohamed Réda DJEBAR** et je profite ainsi de cette occasion pour lui adresser mes vifs remerciements pour sa disponibilité et son souci constant de manière à ce que cette thèse se passe dans les meilleures conditions possibles.

C'est aussi avec une profonde sincérité, que j'adresse toute ma reconnaissance au **Dr.SBARTAI IBTISSEM**, Maitre de conférences à l'Université Badji-Mokhtar, pour m'avoir confié cette thèse et pour s'être pleinement investi à la réalisation de ce travail. Ses qualités humaines, sa disponibilité à toute épreuve et ses remarquables compétences en la matière ont été le garant de ce travail particulièrement enrichissant. Je voudrais aussi la remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ces années et pour m'avoir communiqué la passion pour la recherche, que ce soit en terme de résultats théoriques ou de leur mise en œuvre concrète.

Je tiens à remercier **Pr. BERRABBAH HOURIA**, de l'Université Badji Mokhtar – Annaba-, non seulement pour avoir accepté de présider ce jury, mais aussi et surtout pour l'intérêt et l'attention qu'elle accordera à ce travail.

*Mes remerciements au **Pr. KHATI WILYA**, de l'Université Chadli Bendjedid -El-Tarf-, pour avoir accepté d'examiner ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.*

*Mes remerciements au **Dr. GASMI YOUSRIA**, Maitre de conférence à l'Université Chadli Bendjedid -El-Tarf-, pour avoir également accepté de faire partie de ce jury et pour l'intérêt qu'elle accordera à ce travail.*

*Mes vifs remerciements vont au **Dr. AZZOUZ ZOUBIR**, Maitre de conférences à l'Université Badji Mokhtar –Annaba-, non seulement pour avoir accepté d'examiner mon travail mais aussi pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté lors de la collecte des daphnies. Merci infiniment Monsieur.*

*Par la même occasion, j'aimerais remercier **Pr. KHEBBEB Med El-Hadi** pour la qualité de la formation doctorale qu'il nous a donné et qui m'a permis d'acquérir énormément de connaissances dans un domaine qui n'était pas le mien au départ.*

*Je ne saurais terminer sans souligner le soutien chaleureux de : **Dr. Benbouras M. A., Dr. Boutiche M. A., Pr. Benarba B., Dr. Hariri W.**, ainsi que **Djribi A.***

*Aux collègues du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire qui ont contribué, chacun à sa façon, à l'exécution de ce travail. Un grand merci à **Lynda, Medina, Amira, Khadidja**, pour les innombrables et inoubliables moments de plaisir, de joie, de détente, de fous rires, de stress, de peine... que nous avons partagé ensemble. J'en garde un souvenir de profonde complicité et mon sincère dévouement. Sachez simplement que votre amitié m'est précieuse et indispensable.*



SOMMAIRE

Sommaire

المخلص

Résumé

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION.....7

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. POLLUTION ENVIRONNEMENTALE.....	13
1.1. DYNAMIQUE DES PESTICIDES DANS L'ENVIRONNEMENT	14
1.2. DEVENIR DES PESTICIDES DANS L'ENVIRONNEMENT	16
1.2.1. DEGRADATION DES PESTICIDES	16
A. Biodégradation.....	16
B. Dégradation abiotique.....	16
1.2.2. PRODUITS DE DEGRADATION DES PESTICIDES	16
1.2.3. PERSISTANCE DES PESTICIDES	17
1.3. TOXICITE DES PESTICIDES.....	17
1.4. IMPACT DES PESTICIDES SUR L'ECOSYSTEME AQUATIQUE	17
2. PESTICIDES UTILISES.....	18
2.1. COMPOSITION.....	19
2.2. CLASSIFICATION.....	19
A. Classification selon la cible.....	20
B. Classification chimique	21
C. Classification par mode d'action	21
2.3. PROPRIETES ET MECANISME D'ACTION DU THIRAME.....	22
2.3.1. Propriétés du Thirame	22
2.3.2. Mode d'action.....	23
2.3.3. Présence et comportement dans l'environnement.....	23
2.3.4. Toxicité du Thirame	24
2.4. PROPRIETES ET MECANISMES D'ACTION DE LA BOUILLIE BORDELAISE	25
2.4.1. Propriétés de la Bouillie bordelaise	25
2.4.2. Mode d'action.....	26
2.4.3. Présence et comportement dans l'environnement.....	27
2.4.4. Toxicité de la Bouillie bordelaise	28
3. STRESS OXYDANT ET MECANISMES DE DEFENSE.....	30
3.1. RADICAUX LIBRES ET ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ROS)	30
3.1.2. DIFFERENTS DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE	31
A. Dérivés primaires non radicalaires de l'oxygène	31
B. Les dérivés primaires, radicaux libres oxygénés	32
C. Dérivés secondaires de l'oxygène.....	34
3.2. CONSEQUENCES DES ROS SUR LES CIBLES BIOLOGIQUES.....	35
3.2.1. OXYDATION DES PROTEINES.....	35
3.2.2. OXYDATION DES LIPIDES.....	35
3.2.3. DOMMAGE DE L'ADN.....	36
3.3. SYSTEMES DE DEFENSES ANTIOXYDANTS	38
3.3.1. DIFFERENTS TYPES D'ANTIOXYDANTS	38
A. Systèmes enzymatiques.....	39
A.1. Superoxyde dismutase (SOD)	39
A.2. Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR)	39
A.3. Catalase (CAT)	40
A.4. Glutathion-S-Transférase (GST).....	40

B.	Systèmes non-enzymatiques	41
B.1.	Glutathion (GSH)	41
B.2.	Métallothionéines.....	42
B.3.	Autres antioxydants	42
4.	BIO-SURVEILLANCE DE LA QUALITE DE L'ENVIRONNEMENT	45
4.1.	NOTION DE BIO-INDICATEURS	47
4.2.	NOTION DE BIOMARQUEUR.....	48
4.3.	MARQUEURS BIOCHIMIQUES DU STRESS OXYDATIF	49
4.4.	NEUROTOXICITE (CAS DE L'ACETYLCHOLINESTERASE)	49
5.	ESPECE BIO-INDICATRICE ETUDIEE.....	51
5.1.	DESCRIPTION DE <i>DAPHNIA MAGNA</i>	52
A.	Morphologie	53
B.	Nutrition	55
C.	Cycle de vie.....	56
D.	Développement.....	58
5.2.	UTILISATION DES DAPHNIES DANS LES TESTS DE TOXICITE.....	59
A.	Etude des effets au niveau de l'individu.....	59
B.	Etude des effets au niveau énergétique	60
C.	Etude des effets au niveau de la population.....	61

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

1.	MATERIEL CHIMIQUE.....	62
1.1	THIRAME	62
1.2	BOUILLIE BORDELAISE	63
2.	MATERIEL BIOLOGIQUE	63
3.	CONDUITE DE L'ESSAI	64
3.1	APERÇU SUR LA ZONE DE PRELEVEMENT	64
3.2	CONDITIONS DE CULTURE DES DAPHNIES	65
4.	EXPERIMENTATION	66
4.1	PARAMETRES ECOTOXICOLOGIQUES.....	66
A.	Test de toxicité aigüe	66
B.	Test de toxicité chronique	67
4.2	PARAMETRES BIOCHIMIQUES	69
4.2.1	<i>Dosage des métabolites</i>	69
A.	Taux des protéines totales	70
B.	Taux des lipides totaux.....	70
C.	Taux des glucides totaux	70
4.2.2	<i>Dosage des biomarqueurs</i>	70
A.	Taux de Glutathion (GSH).....	70
B.	Taux de Malondialdéhyde (MDA).....	71
C.	Mesure de l'activité Catalase (CAT).....	71
D.	Mesure de l'activité Glutathion -S- transférase (GST).....	72
4.3	ETUDE POLAROGRAPHIQUE	72
4.4	NEUROTOXICITE	73
•	Mesure de l'activité Acétylcholinestérase (AChE)	74
4.5	MODELISATION DE LA DYNAMIQUE DE POPULATION	74
4.5.1	<i>Modélisation de la dynamique d'une population de Daphnia magna structurée en classes d'âges (Matrice de Leslie)</i>	76
A.	Pas de temps.....	78
B.	Classes d'âge	79
5.	ANALYSE STATISTIQUES.....	79

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

Volet 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

1.	EFFETS SUR LES PARAMETRES ECOTOXICOLOGIQUES	80
1.1	EFFET SUR LE TAUX D'IMMOBILISATION DES DAPHNIES (TEST AIGÛE)	80
A.	Effet du Thirame sur l'immobilisation des daphnies.....	80
B.	Effet de la Bouillie bordelaise sur l'immobilisation des daphnies.....	82

1.2	EFFET CHRONIQUE DU THIRAME ET DE LA BOUILLIE BORDELAISE SUR DAPHNIA	86
1.2.1	<i>Paramètres de croissance</i>	86
A.	Longévité	86
B.	Taux de survie.....	88
C.	Nombre de mue.....	90
1.2.2	<i>Paramètres de reproduction</i>	92
A.	Jour de la première ponte	92
B.	Nombre de ponte.....	94
C.	Nombre cumulé de nouveaux nés	96
2.	EFFETS SUR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES.....	98
A.	Effets sur la variation du taux de protéines totales	99
B.	Effets sur la variation des teneurs en lipides totaux.....	100
C.	Effets sur la variation des taux des glucides totaux	103
3.	EFFET SUR LES BIOMARQUEURS DU STRESS OXYDANT	106
A.	Effet sur l'évolution du taux de Glutathion (GSH)	106
B.	Effet sur l'évolution du taux du Malondialdéhyde (MDA)	110
C.	Effet sur la variation de l'activité Catalase (CAT).....	113
D.	Effet sur la variation de l'activité Glutathion-S-transferase (GST)	116
4.	EFFETS SUR LE METABOLISME RESPIRATOIRE.....	120
5.	EFFETS SUR LE SYSTEME NERVEUX.....	124

Volet 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE LA POPULATION

1.	EFFETS SUR LA DYNAMIQUE DE LA POPULATION.....	132
1.1.	DAPHNIES TEMOINS A 100% DE SURVIE.....	132
1.2.	DAPHNIES TEMOINS A 80% DE SURVIE.....	134
1.3.	DAPHNIES EXPOSEES A 0,004 MG/L DU THIRAME	137
1.4.	DAPHNIES EXPOSEES A 0,004 MG/L DU BOUILLIE BORDELAISE	139
1.5.	DAPHNIES EXPOSEES A 0,008 MG/L DU THIRAME	141
1.6.	DAPHNIES EXPOSEES A 0,008 MG/L DU BOUILLIE BORDELAISE	144
1.7.	DAPHNIES EXPOSEES A 0,016 MG/L DU THIRAME	146
1.8.	DAPHNIES EXPOSEES A 0,016 MG/L DU BOUILLIE BORDELAISE	149
1.9.	DAPHNIES EXPOSEES A 0,032 MG/L DU THIRAME	152
1.10.	DAPHNIES EXPOSEES A 0,032 MG/L DU BOUILLIE BORDELAISE	154

PARTIE IV : CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSION.....	157
PERSPECTIVES	161

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	163
----------------------------------	-----

الملخص

تتعرض الكائنات المائية بصورة دائمة للتلوث البيئي الكيميائي بسبب النشاط البشري. وبالتالي فهي تتعرض لعوامل ضغط متعددة مما يحتم عليها على التصدي لها. تم اعتماد النوع *Daphnidae* وخاصة *Daphnia magna* منذ عدة سنوات في اختبارات سمية معتمدة لأنها تعتبر نوع رئيسي في الانظمة البيئية المائية ومؤشر بيولوجي لتلوث المياه الناتج عن المخلفات الصناعية وكذلك الاستخدام العشوائي للمبيدات.

تطرقنا في هذه الأطروحة لفرعين أساسيين: الأول على المستوى الفردي و الثاني على مستوى المجموعات، حيث يتمحور هدف هذا العمل حول دراسة آثار مبيدات الفطريات ، التي تستخدم على نطاق واسع، الثيرام غير المعدني والتوتيا الزرقاء المحتوية على النحاس ، على احد الأنواع التي تعتبر مؤشر بيولوجي للمياه العذبة المعتمد في علم السموم الإيكولوجية و هو متفرع القرون *دافنيا ماجنا*. حيث لم تنحصر هذه الدراسة على اختبار آثار المبيدات من خلال المنهج التجريبي في المختبر، والذي يتألف من تقييم تأثير هذه الجزيئات على السلوك والنمو والتكاثر، وقياس مستويات الدفاعات الأنزيمية ومضادة لأكسدة فحسب، ولكن أيضاً اتباع نهج ديناميكي، من خلال دراسة لتقدير الآثار على المجموعات.

أظهرت الاختبارات المعيارية على سمية الثيرام و التوتيا آثاراً مثبطة على حركة صغار الدافنيا أثناء الاختبارات الحادة. كذلك، أظهرت التراكيز الضعيفة لمبيدات الفطريات انها تؤثر على النمو والتكاثر، هذا ما تكشف عنه اختبارات السمية المزمنة. كما لوحظت اضطرابات كبيرة في التمثيل القاعدي (محتوى الكربوهيدرات الكلية والدهون الكلية والبروتينات الكلية) و اختلال التمثيل التنفسي بعد تعريضها سواء للثيرام او للتوتيا الزرقاء، دلالة على السمية الخلوية.

بالنسبة لمضادات الأكسدة، فنتائجنا تكشف عن اثاره نظام إزالة السموم الناتج عن الجزيئات التي تم اختبارها. حيث ان الثيرام والتوتيا الزرقاء، تحفز بشكل كبير CAT و GST و اكسدة الدهون عن طريق زيادة معدل MDA مع انخفاض ملحوظ في معدل GSH. هذه النتائج تدل على أن مبيدات الفطريات المختبرة تسبب الإجهاد التأكسدي.

إضافة الى ذلك ، فإن متابعة تغيرات نشاط AchE يُظهر تثبيطه بعد التعريض الحاد للدافنيا لكل من الثيرام والتوتيا الزرقاء، ما يؤشر على السمية العصبية للمبيدات الفطريات المدروسة.

أخيراً مكنت النمذجة باستخدام طرق محددة أو نظام مصفوفة Leslie لرصد ديناميكية المجموعة مكنت من التنبؤ بالآثار السلبية على مستوى المجموعات التي يمكن ان تؤدي الى انقراض النوع في اطار دراسة الاستشرافية وهذا ناتج عن تعرض دافنيا على المدى الطويل للدافنيا لمبيدات الفطريات حتى عند أدنى التركيز التي تم اختبارها.

الكلمات الدالة : *دافنيا ماجنا* ، الثيرام ، التوتيا الزرقاء، اختبار السمية الحاد ، اختبار السمية المزمن ، المؤشرات الحيوية ، الإجهاد التأكسدي ، التأثير على المجموعات.

Résumé

Les organismes aquatiques, sont exposés régulièrement à des contaminations chimiques du milieu dû aux activités anthropiques. Ils sont donc sujets à des stress multiples auxquels ils doivent faire face. Le genre de Daphnidae et spécialement *Daphnia magna* a été adopté depuis de longues années dans les essais de toxicité normalisée. Ils constituent en effet une espèce clé dans les écosystèmes aquatiques et un bioindicateur de la contamination des eaux par les rejets industriels ainsi que l'utilisation anarchique des pesticides.

Nous avons abordé dans cette thèse deux volets importants : un à l'échelle individuelle et un autre à l'échelle populationnelle. Dont le but était d'étudier les effets de deux fongicides, à large spectre d'utilisation, le Thirame non métallique et la Bouillie bordelaise à base de cuivre sur une espèce bioindicatrice en écotoxicologie, le cladocère *Daphnia magna* d'eau douce. Leurs effets ont été étudiés non seulement par une approche ciblée au laboratoire, consistant à évaluer l'effet de ces molécules : le comportement, la croissance, la reproduction, à mesurer les niveaux de défenses enzymatiques anti-oxydantes, mais aussi par une approche dynamique, au moyen d'une étude à estimer les effets populationnels.

Les tests standardisés sur la toxicité du Thirame et la Bouillie bordelaise ont montré des effets inhibiteurs et dose dépendant sur la mobilité des juvéniles lors des tests aigüe. Aussi, les concentrations les plus faibles des fongicides pour chaque, affectent la croissance et la reproduction révèlent les tests de toxicité chronique. Des perturbations significatives sont également notées au niveau du métabolisme basal (contenu en glucides totaux, en lipides totaux et en protéines totales) et des fluctuations ont été observées au niveau du métabolisme respiratoire après traitement au Thirame et la Bouillie bordelaise, signe de cytotoxicité.

Quant aux antioxydants, nos résultats révèlent une induction du système de détoxification des molécules testées. En effet, le Thirame et la Bouillie bordelaise, induisent de manière significative la GST, CAT et la peroxydation lipidique en augmentant le taux de MDA, et diminuent de façon significative le taux de GSH. Ces résultats témoignent que les fongicides testés induit un stress oxydatif.

Ainsi, le suivi des variations de l'AchE montre son inhibition suite à l'exposition aigüe des daphnies au Thirame et de la Bouillie bordelaise signe de neurotoxicité des deux fongicides.

Enfin, la modélisation en utilisant des tests spécifique ou système matricielle de Leslie pour suivre la dynamique de la population, révèle des effets négatives aux niveaux populationnel qui peut conduire à l'extinction suite à une prédiction à des expositions à long terme des daphnies aux fongicides dès les plus faibles concentrations testées.

Mots clés : *Daphnia magna*, Thirame, Bouillie bordelaise, test aigüe, test chronique, biomarqueurs, stress oxydant, effets populationnels.

Abstract

Aquatic organisms, regularly exposed to chemical contamination of the environment due to anthropogenic activities, are subject to multiple stresses that they must assume. The Daphnidae, and especially *Daphnia magna* have been used in standardized toxicity tests since they are considered key species in aquatic ecosystems and a bioindicator of water contamination by industrial waste as well as the uncontrolled use of pesticides.

In the present thesis, two important aspects have been addressed, the first at individual level whereas the second at the level of population. The main purpose of this work was to investigate the effect of two broad-spectrum fungicides: Thiram (non metallic) and Bordeaux mixture (copper-based) on the freshwater water cladoceran *Daphnia magna*, a bioindicator species in ecotoxicology. The effects of these two fungicides were investigated by two approaches: a) targeted approach in the laboratory, consisting in evaluating the effect of these molecules on the behavior, growth, and reproduction of daphne, as well as in measuring the levels of anti-oxidant enzymatic defenses; b) a dynamic approach, by estimating the population effects.

Our results of standardized tests for the acute toxicity of Thiram and Bordeaux mixture showed dose-dependent inhibitory effects on the mobility of young individuals. Chronic toxicity results revealed significant effects of the lower concentrations on growth and reproduction. In addition, we observed significant disturbances in the biochemical composition (total carbohydrate, total lipids and total proteins content), moreover, variations in the basal and respiratory metabolism were observed after treatment with Thiram and Bordeaux mixture, and a sign of cytotoxicity.

Regarding antioxidants, our results showed an induction of the detoxification system of the molecules tested. Indeed, both Thiram and Bordeaux mixture significantly induce GST, CAT and lipid peroxidation by increasing the level of MDA, and significantly lower the level of GSH. Taken together, these results clearly show that both fungicides induce oxidative stress.

Likewise, by following variations in AchE levels, we found that acute exposure of daphnids to Thiram and Bordeaux mixture was associated with the development of neurotoxicity.

Finally, modeling using specific tests or Leslie matrix system for monitoring population dynamics revealed a detrimental effect of the two fungicides on the population level that could lead to extinction, and this following a prediction of exposures to long-term fungicide at the lowest concentrations tested.

Keywords: *Daphnia magna*; Thiram; Bordeaux mixture; acute toxicity; chronic toxicity; biomarkers; oxidative stress; population effects.

Liste des figures



Figure 1. Schéma synthétique des mécanismes influençant la dynamique des pesticides dans l'environnement (Arias-Estévez et al., 2008 ; Fenner et al., 2013)	15
Figure 2. Processus de diffusion des pesticides dans l'environnement (Arias-Estévez et al., 2008)	15
Figure 3. Classification des pesticides selon la cible (Hachter et al., 2008)	20
Figure 4. Formule du Thirame, disulfure de tétraméthylthiurame (Kang et al., 2002)	22
Figure 5. Formule de sulfate de cuivre sulfate de cuivre pentahydraté (Varade, 2016)	26
Figure 6. Structure du radical peroxy (Belkheiri, 2010)	34
Figure 7. Les molécules enzymatiques et non enzymatiques qui interviennent dans la détoxification cellulaire (Lallement, 2014)	38
Figure 8. Représentation schématique des voies majeures conduisant à la toxification et la détoxification des xénobiotiques organiques chez les animaux (Michel, 1993)	44
Figure 9. Evaluation de la qualité de l'environnement par une approche globale –chimique et biologique (Lagadic et Caquet, 1996)	45
Figure 10. Relations entre les principaux contaminants et les marqueurs biologiques (Narbonne et al., 1999)	48
Figure 11. Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones avec les cibles principales des insecticides (Raymond-Delpech et al., 2005)	50
Figure 12. Anatomie de Daphnia magna femelle adulte vue latérale (Amoros, 1984)	54
Figure 13. Schéma du cycle de vie de la daphnie (Ebert, 2005)	56
Figure 14. Reproduction des daphnies par parthénogénèse (Plaire, 2013)	57
Figure 15. Photographie d'une éphippie (A), la membrane de l'oeuf intérieure (B) et les œufs dormants (C) apparaissent (Cambronero, 2018)	57
Figure 16. Diverses phases de la durée de vie d'une daphnie. (Tj) période juvénile ; (Tn) la période inter-mue (Soares, 1989)	58
Figure 17. Modèle énergétique au niveau individuel (Zeman, 2008)	60
Figure 18. Zone de prélèvement (Hafsaoui et al., 2016)	64
Figure 19. Aquarium et équipement pour l'élevage des daphnies (Lawrence, 1982)	65
Figure 20. Protocole expérimental du test aiguë (après 24 et 48 h)	67
Figure 21. Protocole expérimental du test chronique (21 jours)	68
Figure 22. Schéma de l'électrode à oxygène (Djebar et Djebar, 2000)	72
Figure 23. Schéma représentant la structure d'une population (Zeman, 2008)	76
Figure 24. Taux d'immobilisation de Daphnia magna après 24-48h d'exposition au Thirame	80
Figure 25. Taux d'immobilisation de Daphnia magna après 24-48h d'exposition à la Bouillie bordelaise	82
Figure 26. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur la longévité de Daphnia magna durant 21 jours	86
Figure 27. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur le taux de survie de Daphnia magna durant 21 jours	88
Figure 28. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur le nombre de mues de Daphnia magna après 21 jours	90
Figure 29. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur le jour de première ponte chez Daphnia magna durant 21 jours	92
Figure 30. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur le nombre cumulé de ponte de Daphnia magna durant 21 jours	94
Figure 31. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur le nombre cumulé de nouveaux nés produites par femelle adulte durant 21 jours	96
Figure 32. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur l'évolution du taux des protéines totales	99
Figure 33. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur l'évolution du taux des lipides totaux	101
Figure 34. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur l'évolution du taux des glucides totales	103

Figure 35. Variation du taux de GSH chez <i>Daphnia magna</i> exposée aux concentrations croissantes du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise.....	106
Figure 36. Variation du taux de MDA chez <i>Daphnia magna</i> exposée aux concentrations croissantes du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise.....	110
Figure 37. Effets des concentrations croissantes du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur la variation de l'activité CAT chez <i>Daphnia magna</i>.....	113
Figure 38. Variation de l'activité GST chez <i>Daphnia magna</i> traitées par (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise	116
Figure 39. Effet du Thirame sur le métabolisme respiratoire de <i>Daphnia magna</i>	120
Figure 40. Effet de la Bouillie bordelaise sur le métabolisme respiratoire de <i>Daphnia magna</i>	121
Figure 41. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur la variation de l'activité AChE chez <i>Daphnia magna</i>	124
Figure 42. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas	133
Figure 43. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population témoin et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	134
Figure 44. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas	136
Figure 45. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	136
Figure 46. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas	138
Figure 47. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	139
Figure 48. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas	140
Figure 49. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	141
Figure 50. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas	143
Figure 51. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	143
Figure 52. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas	145
Figure 53. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	146
Figure 54. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas	148
Figure 55. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	148
Figure 56. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas	150
Figure 57. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	150
Figure 58. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge	153
Figure 59. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	153
Figure 60. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	155
Figure 61. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas	155

Liste des tableaux



<i>Tableau 1. Concentrations du Thirame (mg/L).....</i>	<i>63</i>
<i>Tableau 2. Concentrations de la Bouillie bordelaise (mg/L)</i>	<i>63</i>
<i>Tableau 3. Classification de Daphnia magna (Balvay, 2009)</i>	<i>64</i>
<i>Tableau 4. Classes d'âge des daphnies constituant la matrice de Leslie</i>	<i>79</i>
<i>Tableau 5. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps</i>	<i>132</i>
<i>Tableau 6. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps</i>	<i>135</i>
<i>Tableau 7. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps</i>	<i>137</i>
<i>Tableau 8. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps</i>	<i>140</i>
<i>Tableau 9. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps</i>	<i>142</i>
<i>Tableau 10. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps</i>	<i>144</i>
<i>Tableau 11. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps</i>	<i>147</i>
<i>Tableau 12. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps</i>	<i>149</i>
<i>Tableau 13. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps</i>	<i>152</i>
<i>Tableau 14. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps</i>	<i>154</i>

Liste des abréviations



A

ACCCase · : Acétyl CoA carboxylase
AChE · : Acétylcholinestérase
ADN · : Acide désoxyribonucléique
AFNOR · : Association française de normalisation
AGPI · : Acides gras polyinsaturés
ANOVA · : Analysis of variance
ASTM · : American Society for Testing and Materials

B

BSA · : Serum Albumin Bovin

C

CAT · : Catalase
CE · : Commission Européenne
CE50 · : Concentration efficace médiane, : La concentration efficace médiane
CEx · : Concentration efficace à x %
CI₅₀ · : La concentration inhibitrice médiane
COX · : Cytochrome C Oxidase Copper Chaperone
CS₂ · : Disulfure de carbone

D

DEBtox · : Dynamic Energy Budget in toxicology
DL 50 · : Dose létale 50
DMDC · : Diméthylthiocarbamate
DTNB · : Acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque, : Acide 5,5''Dithiodis-2-Nitrobenzoïque

G

GPx · : Glutathione peroxidase
GR · : Glutathion réductase
GSH · : γ -L-Glutamyl-L-cystéinylglycine
GSSG · : Disulfure de glutathion
GST · : Glutathion-S-transférase

H

H₂O₂ · : peroxyde d'hydrogène
HDL · : Lipoprotéine de haute densité
HNE · : Hydroxynonanal
HSP · : Heat shock protein

I

IRPeQ · : Indicateur de risque des pesticides du Québec
ISO · : Organisation internationale de normalisation

L

LDH · : Lactate deshydrogénase
LDL · : Lipoprotéine de basse densité
LOEC · : Concentration minimale avec effets observés

M

MDA · : Malonyldialdéhyde
MF · : Matière fraîche
MT · : Métallothionéines

N

NADPH · : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NOEC · : La concentration sans effets observés
NPC · : Cellules progénitrices neurales

O

OCDE · : Organisation de coopération et de développement économiques

P

pH · : Potentiel d'Hydrogène

R

ROS · : Reactifs oxygen species

S

SM · : Sphingomyéline
SOD · : superoxyde dismutase
STEP · : Station d'épuration des eaux usées

T

T.M.T.D · : Tétraméthylthiuram disulfide
TBA · : Acide thiobarbiturique
TBARS · : Acides thiobarbituriques
TBAS · : Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique.
TCA · : Acide trichloroacétique
TNB · : Acide 5-thio-2 nitrobenzoïque

INTRODUCTION



INTRODUCTION

INTRODUCTION

La révolution industrielle, depuis la fin du 19^{ème} siècle, a considérablement augmenté les activités anthropiques, industrielles, urbaines et agricoles et a introduit différentes substances dans l'environnement entraînant ainsi la pollution de ses différents compartiments (atmosphérique, terrestre et aquatique). En parallèle le développement des produits phytosanitaires et l'usage des pesticides est en constante augmentation à travers le monde entier ce qui a pour avantage d'augmenter les productions agricoles d'un côté et d'un autre coté présenter un risque pour l'environnement.

Concernant les fongicides, le soufre et le cuivre ont été les produits les plus utilisés dans la première moitié du XX^{ème} siècle, au moment où le mildiou, une maladie fongique faisait des ravages. Pierre Millardet a découvert que la Bouillie bordelaise et les produits cupriques présentaient une bonne efficacité sur ce champignon. Cette dernière est encore beaucoup utilisée actuellement, en partie parce qu'elle bénéficie d'une méthode de préparation simple et par conséquent un cout pas trop élevé. Par la suite, la découverte des dithiocarbamates dont appartient le Thirame en 1934 fût une grande avancée dans la lutte contre les champignons pathogènes mais leur utilisation ne se généralisera qu'après les années 1950 (ACTA, 2006 ; Mohamed, 2011). La présence ubiquitaire de ces produits chimiques dans l'environnement peut mettre en danger d'autres espèces vivantes non cibles dont l'homme soit directement lors de leur application, soit par suite de la consommation d'aliments où ils persistent à l'état de résidus. (OMS, 1990 ; OMS, 2004 ; OMS, 2006 ; OMS et FAO, 2001).

L'écosystème aquatique joue un rôle essentiel dans la conservation de la biodiversité, le fonctionnement des organismes et les cycles des matières organiques. À travers des activités agricoles qui ont été accompagnées par une altération de plus en plus accentuée des ressources naturelles et compte tenu de son statut de réceptacle final, le milieu aquatique regroupe les écosystèmes les plus touchés, directement ou indirectement, par les effets délétères des polluants. Ces pollutions, d'abord locales, se répandent dans les systèmes aquatiques via divers processus naturels tels que le lessivage et l'érosion des sols (Belfiore et Anderson, 2001). Les réseaux hydrographiques du monde entier sont tous plus ou moins perturbés par l'activité humaine qui provoquent la régression d'espèces, la

INTRODUCTION

diminution des stocks de poissons, l'épuisement des eaux souterraines, la dégradation de la qualité de l'eau et des crues de plus en plus fréquentes et intenses (Everard et Powell, 2002 ; Sahli, 2017). Dans ce contexte, le devenir des polluants dans l'environnement et leurs effets sur les organismes vivants est une préoccupation grandissante des gouvernements, en raison des nombreux impacts possibles et des réponses inattendues. Il apparaît donc nécessaire de développer des indicateurs précoces de perturbations ainsi que des outils permettant de mieux comprendre la contamination chimique de l'eau en termes d'impact pour mieux gérer le risque que représente cette contamination chimique tant pour l'homme que pour l'environnement.

C'est ainsi que plusieurs approches physiques, chimiques, biologiques et microbienne ont été développées par les scientifiques dans le but de surveiller la qualité de l'environnement (Oertel et Salánki, 2003). La biosurveillance est un outil important qui évalue les changements de l'environnement sur la base des réponses biologiques. Elle présente une prédominance évidente qui en fait un outil attrayant exerçant des fonctions inégalées dans l'évaluation de la pollution de l'environnement, en particulier pour la pollution de l'écosystème aquatique (Zhou et *al.*, 2008). De nombreux organismes ont été désignés comme bioindicateurs parmi lesquels chacun montre les mérites particuliers pour la biosurveillance de la pollution dans l'écosystème par rapport aux autres depuis différents niveaux trophiques : producteurs (algues), consommateurs primaires (daphnies) ou secondaire (poissons) et décomposeurs (bactéries) (Weber, 1991). Les daphnies, représentants des invertébrés d'eau douce, constituent en effet une espèce clé dans les écosystèmes aquatiques. La survie, la croissance et la reproduction des daphnies dans de bonnes conditions assurent la pérennité des environnements aquatiques (Shaw et *al.*, 2008). Ainsi le genre Daphnidae est parmi les animaux d'essai les plus favorables en toxicologie aquatique, spécialement *Daphnia magna* qui a été adopté depuis de longues années dans les essais de toxicité normalisés. La daphnie est un organisme commun utilisé comme bioindicateur dans la surveillance aquatique en raison de ses caractéristiques exceptionnelles qui lui permet d'être utilisé par différentes instances internationales pour l'évaluation du potentiel toxique des différents polluants de l'environnement grâce à de nombreux avantages (la sensibilité aux substances toxiques, la reproduction parthénogénétique, le court cycle de reproduction et la durée de vie) qui peuvent

INTRODUCTION

difficilement être trouvés en combinaison chez d'autres espèces (Bodar, 1988 ; Weber, 1991 ; OCDE, 1998 ; Sancho, 2001 ; US EPA, 2002).

Le test d'immobilisation de *Daphnia magna* (ISO 6341, 2012 ; OECD, 2004) est l'un des tests les plus utilisés comme test standard pour l'évaluation des dangers chimiques et la surveillance de la qualité des eaux. Cependant ce dernier ne révèle pas autres effets que l'immobilisation après deux périodes d'exposition définit (24h et 48h). Dans certains cas de toxicité ce test n'est pas le compatible moyen pour évaluer la qualité de l'eau et ce depuis que les effets sub-létaux peuvent se manifester à des faibles concentrations. Ces analyses doivent être impérativement complétées par des tests à long terme depuis des tests chroniques qui sont utilisés pour évaluer les réponses à long terme aux contaminants. Bien que la létalité puisse être utilisée comme critère d'évaluation dans les tests d'exposition chronique, l'inhibition de la reproduction et le retard de croissance sont généralement considérés comme des mesures plus sensibles, en particulier pour l'estimation de la réponse sub-létale (Sancho et *al.*, 2001).

L'intégration des données chimiques aux réponses biologiques (biomarqueurs) est fortement recommandée pour caractériser les effets des contaminants sur les organismes. Au niveau biochimique, les biomarqueurs comprennent des études sur la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en tant que voie générale de toxicité induite par de nombreux produits chimiques et d'autres composés conduisant à une condition de stress oxydatif (Han et *al.*, 2003) permettant ainsi l'évaluation des dommages généraux induits sur des biomolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN (Barata et *al.*, 2005). Pour minimiser ces dommages, les organismes ont développé des défenses antioxydantes et l'échec de ces derniers pour détoxifier la production excessive de ROS peut entraîner l'inactivation des enzymes, la dégradation des protéines ainsi que de l'ADN et la peroxydation des lipides (Halliwell et Gutteridge, 1999). La plupart des études qui ont démontré un potentiel de production de ROS, de réponses de défense antioxydante et de dommages oxydatifs chez les invertébrés aquatiques se sont limitées à quelques espèces, et les informations concernant les effets biochimiques avec les réponses au niveau individuel sont rares ou absentes (Di Giulio et *al.*, 2020; Livingstone, 2001). Par conséquent, la validation des biomarqueurs biochimiques prooxydants et antioxydants en

INTRODUCTION

tant qu'indicateurs précoces de stress toxique pour le biote aquatique nécessite que ces systèmes soient caractérisés dans plus d'espèces d'invertébrés et que leur pertinence écologique soit établie. Chez *Daphnia*, des études récentes ont rapporté des informations sur les systèmes défensifs antioxydants contre les contaminants prooxydants mais qui restent insuffisants. Cette espèce offre donc une occasion unique d'évaluer la relation entre les défenses antioxydantes et les réponses de toxicité, ce qui peut aider à comprendre le rôle physiologique de ces systèmes chez les espèces apparentées (Han *et al.*, 2003).

Il est connu que les réponses biologiques peuvent être divisées en 3 niveaux d'organisation biologique : génotoxiques, toxicologiques et réponses écologiques, qui sont liés ou non entre eux (Jha, 2008). Pour cela, l'évaluation des impacts liés aux contaminants s'appuie généralement sur des expérimentations au laboratoire dans lesquelles les dommages cellulaires observés sont dus aux effets sur les traits de vie des individus. Dans ce contexte, une compréhension mécanistique des liens unissant les différentes perturbations observées est nécessaire pour prédire les conséquences sur la survie, la croissance et la reproduction, processus essentiels pour la dynamique de population (Swain *et al.*, 2010; Massarin *et al.*, 2011; Wren *et al.*, 2011; Biron *et al.*, 2012). Cependant, les effets d'un polluant ne sont pas directement comparables entre le niveau individuel et populationnel (Stark *et al.*, 2004; Lance *et al.*, 2012). C'est la raison pour laquelle l'écotoxicologie se tourne de plus en plus vers la modélisation pour étudier l'influence de contaminants sur la dynamique de population qui est un outil incontournable pour extrapoler les effets observés au niveau individuel aux échelles d'organisation supérieures, critères plus pertinents d'un point de vue écologique (Manar, 2008 ; Massarin, 2010).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre thématique relative à l'évaluation des effets de deux fongicides à large spectre d'utilisation et notamment dans la région Nord-Est algérienne. Il s'agit donc d'un fongicide organique «Thirame» un dithiocarbamate et un autre à base de cuivre «Bouillie bordelaise», via l'utilisation d'un modèle bio-indicateur représentatif des écosystèmes aquatiques intermédiaire dans la chaîne trophique : *Daphnia magna* (consommateur primaire).

INTRODUCTION

Les études qui se sont penchées sur l'évaluation de l'écotoxicité du Thirame et la Bouillie bordelaise surtout à long terme sont très rares et anciennes. Ces études se sont basées sur l'étude des effets à court terme alors que la toxicité des deux fongicides se manifeste à long terme aussi. En plus, beaucoup d'auteurs se sont intéressés à l'étude de l'effet sur les poissons dans un souci de protection de la santé humaine.

Pour le Thirame, plusieurs études ont été réalisées sur différents organismes à savoir : Etude de la toxicité aiguë sur le poisson *Ictalurus punctatus*; les effets sub-létaux sur *Salmo gairdneri* ; l'embryotoxicité chez *Brachydanio rerio* et *Salmo gairdneri* ; sur les enzymes antioxydants dans le foie des *Oncorhynchus mykiss* et sur l'enzyme Acétylcholineestérase de *Pimephales promelas* (Mochida et Fujii ,2009 ; Van Leeuwen et *al.*, 1990 ; Babo et Vasseur, 1992 ; Van Leeuwen et *al.*, 1986 ; Olson et Christensen, 1980).

Aussi, et concernant la Bouillie bordelaise, des tests aigus ont été réalisés chez le poisson *Ictalurus punctatus* (Straus et Tucker, 1993), des tests semi-statiques aigus (96 h) et subaigus (14 jours) ont été aussi mis en place pour suivre l'activité de certaines enzymes fonctionnelles chez le poisson *Cyprinus carpio* (Karan, 1998). Le suivi de la survie, le développement, la mue dans le but d'étudier les effets chroniques chez *Penaeus monodon* (Chen, 2001) ; induction du stress oxydatif chez trois espèces du genre *Gasterosteus* (Sanchez et *al.*, 2005) et l'activité Acétylcholineestérase chez le poisson *Cyprinus carpio* (Balambigai et Aruna, 2011).

Cependant, les invertébrés notamment *Daphnia magna* semblent être le meilleur taxon parmi les organismes aquatiques. A cet effet nous avons privilégié une approche biologique à différents échelles d'organisation biologique en étudiant les variations de plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques individuels et populationnels. Dans le but d'évaluer les effets de ces produits toxiques sur ces organismes aquatiques, nous avons abordé dans cette thèse deux volets importants : un à l'échelle individuelle et un autre à l'échelle populationnelle.

INTRODUCTION

• **Le premier volet (individuel)** est dédié aux expérimentations réalisées sur les effets du Thirame et de la Bouillie bordelaise chez *Daphnia magna* en utilisant différentes techniques d'évaluation de l'effet toxique à savoir :

✓ Etudier l'effet à court terme des deux fongicides, chez *Daphnia magna* afin de déterminer les concentrations critiques inhibitrices de la mobilité (CI₅₀) pour ces espèces dulçaquicoles.

✓ Suivre les paramètres de survie, croissance et de reproduction au niveau de la population exposée à travers des essais chroniques.

✓ Estimer les changements biochimiques et les perturbations du métabolisme cellulaires chez *Daphnia magna* en présence de ces xénobiotiques via le suivi du taux de protéines, lipides et glucides totaux. Ces éléments fondamentaux du métabolisme basal sont des sources énergétiques qui participent à la production de l'énergie et sont indispensable pour le fonctionnement cellulaire.

✓ Mesurer les variations du métabolisme respiratoire qui donne des informations sur le budget énergétique cellulaire.

✓ Evaluation de la sensibilité de *Daphnia magna* aux conditions de stress sous l'effet du Thirame et de la Bouillie bordelaise en se focalisant sur la capacité de ces fongicides à générer un stress oxydatif à travers le suivi des variations des biomarqueurs impliqués dans les systèmes de défense et qui peuvent nous renseigner sur l'état de l'organisme suite à cette exposition.

✓ Tester le pouvoir neurotoxique de ces deux fongicides à travers le dosage d'un biomarqueur spécifique (l'activité AChE).

• **Le deuxième volet (populationnel)** est consacré, quant à lui, à modéliser le mode d'action des molécules choisies pour extrapoler ces effets observés du niveau de la population via des modèles matriciels permettant ainsi de prédire les conséquences à long terme, par des données de la survie et la reproduction, paramètres fondamentaux en dynamique de population.



PARTIE I

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. POLLUTION ENVIRONNEMENTALE

Les pesticides représentent une part importante des pollutions environnementales actuelles. Le terme « pesticide » possède une définition étendue, comprenant les : « Produits phytosanitaires », les « produits phytopharmaceutiques » ou les « biocides ». Ils concernent donc toutes les substances naturelles ou synthétiques utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes (micro-organismes, animaux ou végétaux) jugés indésirables ou nuisibles, non seulement en contexte agricole, mais également dans les domaines de l'hygiène et de la santé publique, de la santé animale et dans les traitements de surfaces non-agricoles (Aubertot *et al.*, 2005).

Ils se propagent dans l'environnement lors des applications en zones agricoles (protection des cultures), en zones urbaines (entretien des jardins, parcs...) et sur les voies de circulation (réseaux routiers, ferrés...). Bien que les principales cibles des pesticides soient les végétaux, il est estimé que seulement 0,1% des quantités appliquées atteignent ceux-ci (Arias-Estévez *et al.*, 2008). Leurs spectres touchent plusieurs niveaux à savoir :

➤ **Pollution du sol**

Les origines peuvent provenir des activités agricoles mais également des activités d'entretien des espaces verts et jardins ou de désherbage des réseaux routiers et ferrés. La vitesse d'infiltration des pesticides dans le sol dépend du sol (humidité, taux de matière organique, pH et du pesticide lui-même (Swarcewicz et Gregorczyk, 2012).

A l'heure actuelle les insecticides utilisés (organophosphorés, pyréthriinoïdes, carbamates et autres) se dégradent rapidement, par contre les herbicides sont assez persistants dans les sols et leurs produits de dégradation sont souvent stables. La pollution chronique par certaines substances minérales persistantes (cuivre dans les fongicides employés en viticulture) (Chaignon *et al.*, 2003) et l'existence éventuelle de résidus liés, pose la question du risque environnemental à long terme (Barraclough *et al.*, 2005), notamment dans le cas d'une réallocation des terres agricoles à d'autres usages. D'autres sources de contamination des sols proviennent des industries produisant et/ou procédant au stockage des substances phytosanitaires.

➤ Pollution de l'air

- **Air extérieur** : La contamination est chronique dans toutes les phases atmosphériques en concentrations variables dans le temps et dans l'espace. L'air peut être contaminé, de manière locale, mais aussi à distance des lieux de traitement (Bouvier et *al.*, 2006).
- **Air intérieur** : Les pesticides peuvent contaminer l'air intérieur non seulement suite à leur application ou leur stockage dans les logements mais également du fait du transport des produits utilisés à l'extérieur (agriculture, jardins, parcs) par l'intermédiaire des chaussures, des vêtements, des animaux domestiques ou par l'air (Bouvier et *al.*, 2006).

➤ Pollution de l'eau

Leurs origines sont également diverses : urbaine, industrielles, agricoles notamment. Les pollutions de l'eau ne peuvent pas être nettement séparées des autres contaminations comme celles de l'air, des sols ou de la chaîne alimentaire. Les pesticides peuvent facilement pénétrer dans le sol et les sources d'eau entraînent la dégradation de la qualité des eaux (Ippolito et *al.*, 2012) qui se traduit, pour les eaux de surface comme pour les eaux souterraines, par une pollution liée à la dissémination des produits phytosanitaires, des engrais minéraux azotés et phosphatés ou encore des effluents d'élevage (Ait-hamlet, 2013).

1.1. Dynamique des pesticides dans l'environnement

La dispersion atmosphérique, ou dérive, intervient directement lors de l'épandage lorsqu'une partie des molécules n'atteint pas la cible et sont entraînées par le vent hors de la parcelle cultivée. La volatilisation, s'effectue après le dépôt du produit à la surface du sol ou des plantes. Le produit est alors entraîné par l'évaporation de l'eau, ou bien sous l'effet du vent s'il est adsorbé sur des particules du sol pouvant être elles-mêmes entraînées (Pimentel, 1995 ; Rial- Otero et *al.*, 2003 ; Serra, 2015).

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La dynamique des pesticides est régulée par différents processus et les différents mécanismes influençant cette dynamique sont illustrés dans la figure 1.

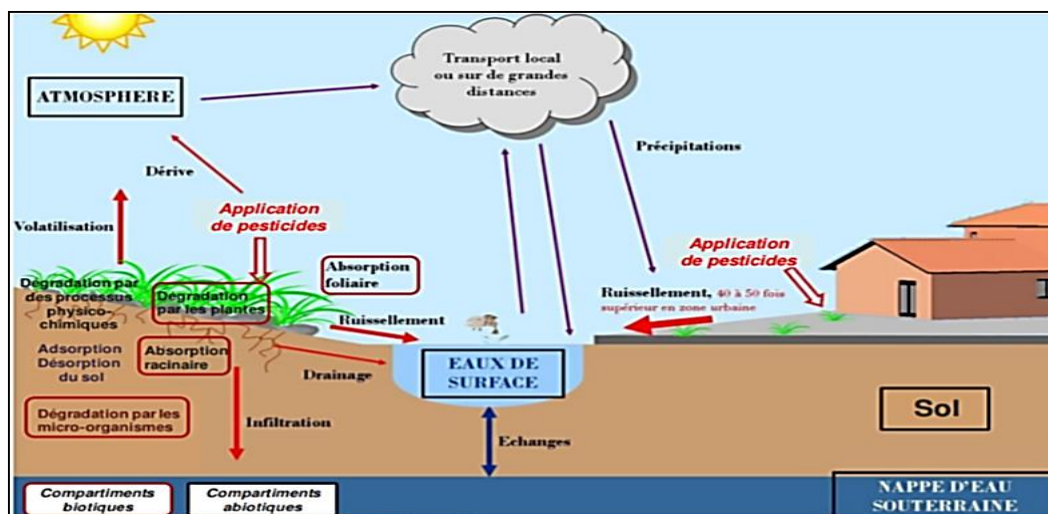


Figure 1. Schéma synthétique des mécanismes influençant la dynamique des pesticides dans l'environnement (Arias-Estévez et al., 2008 ; Fenner et al., 2013)

L'eau reste le principal moteur des transferts, par ruissellement en sub-surface, ou en drainage profond vers les nappes phréatiques. Les pesticides transférés sont alors, soit emportés avec les particules érodées auxquelles ils sont adsorbés, soit directement dissous dans l'eau (López-Blanco et al., 2005). La pluviométrie et les caractéristiques physicochimiques de l'eau du sol influencent de ce fait fortement ces modes de diffusion. Au niveau du sol, le relargage de molécules provenant de granulats est l'un des processus majeurs influençant la dynamique des pesticides (Fig. 2) (López-Pérez et al., 2006).

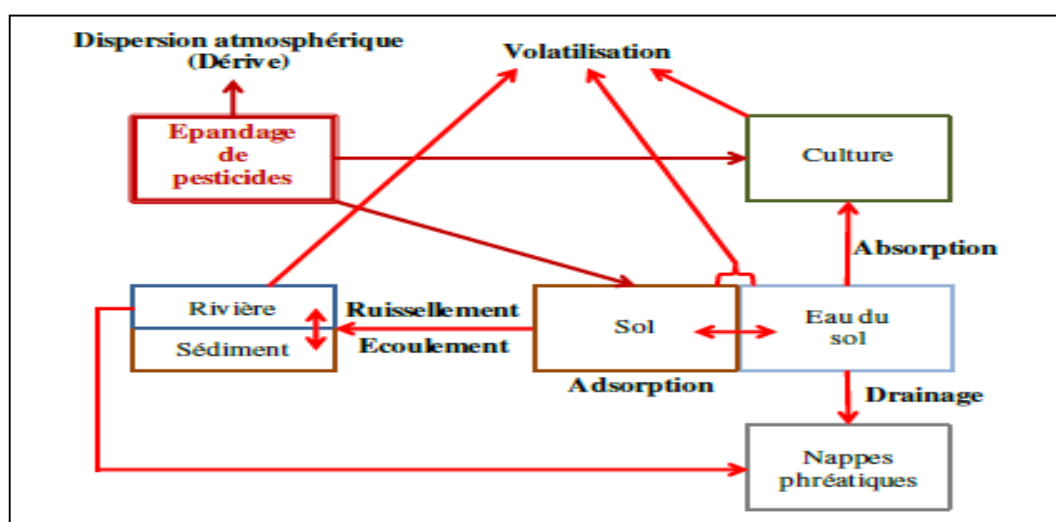


Figure 2. Processus de diffusion des pesticides dans l'environnement (Arias-Estévez et al., 2008)

1.2. Devenir des pesticides dans l'environnement

Une fois dans le compartiment aérien, les pesticides sont dégradés principalement sous l'effet des rayonnements lumineux. Ils sont transportés par l'atmosphère et retombent sous forme humide dans les pluies, les neiges ou les brouillards et vont de ce fait pouvoir contaminer l'ensemble d'un territoire, y compris le milieu urbain (Hayo et *al.*, 1997).

1.2.1. Dégradation des pesticides

Dès qu'ils atteignent le sol ou la plante, les pesticides commencent à disparaître, ils sont dégradés ou sont dispersés. Les matières actives peuvent se volatiliser, ruisseler ou être lessivées et atteignent les eaux de surface ou souterraines. Elles peuvent aussi être absorbées par des plantes ou des organismes du sol ou rester dans le sol, rarement plus de 5 à 10 ans (Leonard, 1990 ; Schiavon et *al.*, 1995).

A. Biodégradation

Cette dégradation a pour origine l'activité des microorganismes, le pesticide est utilisé comme substrat nutritif et dégradé grâce à des enzymes. Généralement la biodégradation est plus importante que la dégradation abiotique exception faite des pesticides récalcitrants (Calvet et Charnay, 2002).

B. Dégradation abiotique

Elle correspond à une dégradation physique ou chimique du produit sans intervention de la biomasse. L'oxydation, réduction, hydrolyse et photolyse, la dégradation peut mener à des molécules plus petites ou à des modifications de structure (Calvet et Charnay, 2002).

1.2.2. Produits de dégradation des pesticides

Une fois entrés dans l'environnement, la connaissance des produits de dégradation des pesticides est très importante afin d'évaluer leur toxicité pour la santé de l'homme et l'environnement (Zamy et *al.*, 2004). En général les produits de dégradation sont moins toxiques que leurs composés parents (Day et *al.*, 1990) sauf pour certaines exceptions (Lányi et Dinya, 2005).

1.2.3. Persistance des pesticides

Elle correspond donc à la stabilité des composés dans l'environnement, à leur résistance à une décomposition ou à une transformation dans la nature. Selon Bliefert et Perraud (2001), il n'existe pas de mesure absolue de la persistance des composés mais sur les caractéristiques physicochimiques liées à la stabilité ou la réactivité des substances (comme la vitesse de réaction, le temps de demi-vie).

1.3. Toxicité des pesticides

En 1975, l'OMS a établi une classification des pesticides en fonction de leur toxicité. Le degré de toxicité des pesticides est étudié sur des rats et animaux de laboratoire au moyen de la DL 50 (dose létale 50) qui correspond à la quantité de pesticide ingérée nécessaire pour provoquer la mort de 50% des rats participant à une expérience en laboratoire et qui est exprimée en ppm. On distingue différents degrés de toxicité (El-Azzouzi, 2013).

- *Toxicité aiguë* : mort de l'animal.
- *Toxicité subaiguë* : trouble du métabolisme, du comportement, de la fécondité.
- *Toxicité chronique* : résulte de l'absorption répétée de petites doses de produits.
- *Effets cancérogènes* : provoquant des tumeurs.
- *Effets mutagènes* : modifications du matériel génétique de la cellule.
- *Effets tératogènes* : entraînant des malformations de l'embryon.

1.4. Impact des pesticides sur l'écosystème aquatique

Les contaminants se répartissent entre les différents compartiments de l'environnement aquatique (eau, matières en suspension, sédiments, biote). En plus d'avoir des effets négatifs sur les espèces aquatiques, la présence de pesticide dans l'eau des rivières a également un impact direct sur la qualité des sources d'approvisionnement en eau potable. Les petits cours d'eau agricole échantillonnés se jettent dans des rivières plus grandes. Une autre problématique ciblée est celle de la présence de pesticides dans les eaux souterraines, causée par leur fort potentiel de lessivage. Ces pesticides vont se retrouver dans les eaux souterraines et représentent une menace de la qualité de ces eaux par leur taux de solubilité (Giroux, 1999).

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les matières organiques rejetées avec les eaux usées domestiques, industrielles et parfois agricoles consomment l'oxygène en étant décomposées de multiples bactéries. Le taux d'oxygène diminue, puis finit par augmenter quand la réoxygénation l'emporte sur la consommation d'oxygène. La désoxygénation, l'apport et la production d'azote ammoniacal dont la toxicité augmente avec le pH et la température, ainsi que de divers composés de dégradation, surtout près du fond, perturbent le peuplement en invertébrés aquatiques et en poissons (Servais, 1999 ; Le Coz et *al.*, 1996 ; Boulton, 1998).

La salissure mécanique et le colmatage des fonds modifient aussi les biocénoses. Les espèces exigeantes en oxygène, ou demandant des fonds propres, ou sensibles à l'azote ammoniacal comme à d'autres toxiques, disparaissent et d'autres espèces prolifèrent. Globalement, il y a diminution de la diversité faunistique. Par épisodes, surtout à l'étiage et en période de fortes chaleurs, la chute de l'oxygène dissous et/ou la toxicité ammoniacale peuvent entraîner des mortalités brutales des poissons (Wood et Armitage, 1997 ; Dahm et *al.*, 1987 ; Descloux, 2011).

Les effets de la pollution organique se conjuguent souvent avec ceux de l'eutrophisation des cours d'eau. Celle-ci se prolonge plus en aval avec des algues filamenteuses fixées pour les eaux plus vives, et un plancton très abondant dans les eaux lentes (Soulard, 2007).

2. PESTICIDES UTILISES

Le Codex Alimentarius (FAO/OMS, 1994) définit comme pesticide toute substance destinée à prévenir, détruire, attirer, repousser ou lutter contre tout élément nuisible, plante ou insecte, pendant la production, l'entreposage, le transport, la distribution et la transformation de denrées alimentaires, de produits agricoles ou d'aliments pour animaux. (Jawich, 2006).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à deux fongicides très utilisés dans notre région, il s'agit du **Thirame** et de la **Bouillie bordelaise**.

2.1. Composition

Un pesticide est composé de différents types de substances :

- **Un ou plusieurs aditifs** : Ces additifs renforcent l'efficacité et la sécurité du produit. Exemple : répulsif, vomitif, anti moussant, solvant ... etc.
- **Une ou plusieurs matières actives** : Ce sont ces matières actives qui confèrent au produit l'effet poison désiré. Exemple de matières actives : le glyphosate que l'on trouve dans de très nombreux désherbants totaux, le métaldéhyde que l'on trouve dans la plupart des anti-limaces, l'atrazine la matière active du désherbant du maïs ...etc. (MCE, 2003).

Les propriétés de pesticide découlent pour l'essentiel de la structure de sa matière active, celle-ci présente 3 parties :

- Une structure active, qui assure le pouvoir pesticide.
 - Des fonctions chimiques assurant la plus ou moins grande solubilité dans l'eau.
 - Une partie support conditionnant la solubilité dans l'huile (Errami, 2012).
- **Un diluant** : qui est une matière solide ou un liquide incorporé à une préparation et destiné à en abaisser la concentration en matière active. Ce sont le plus souvent des huiles végétales dans le cas des liquides, de l'argile ou du talc dans le cas des solides. Dans ce dernier cas le diluant est dénommé charge (Errami, 2012).

2.2. Classification

Il existe une grande diversité de pesticides, leur classification peut ainsi s'effectuer selon la nature de l'organisme nuisible sur lequel ils doivent agir, leurs caractéristiques chimiques ou leurs mode et période d'action (Calvet et *al.*, 2005 ; Fréry et *al.*, 2010 ; Lachambre et Fisson, 2007). Ils sont toxiques pour les insectes et, dans une moindre mesure, pour les organismes aquatiques et les mammifères. De ce fait, ils sont couramment classés en fonction des organismes ciblés et/ou de leur mode d'utilisation (Hachter et *al.*, 2008).

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les pesticides regroupent cinq familles de molécules dont les modes d'action sont très variés dont : les fumigants, les fongicides, les herbicides, les rodenticides et les insecticides (Figure 3).

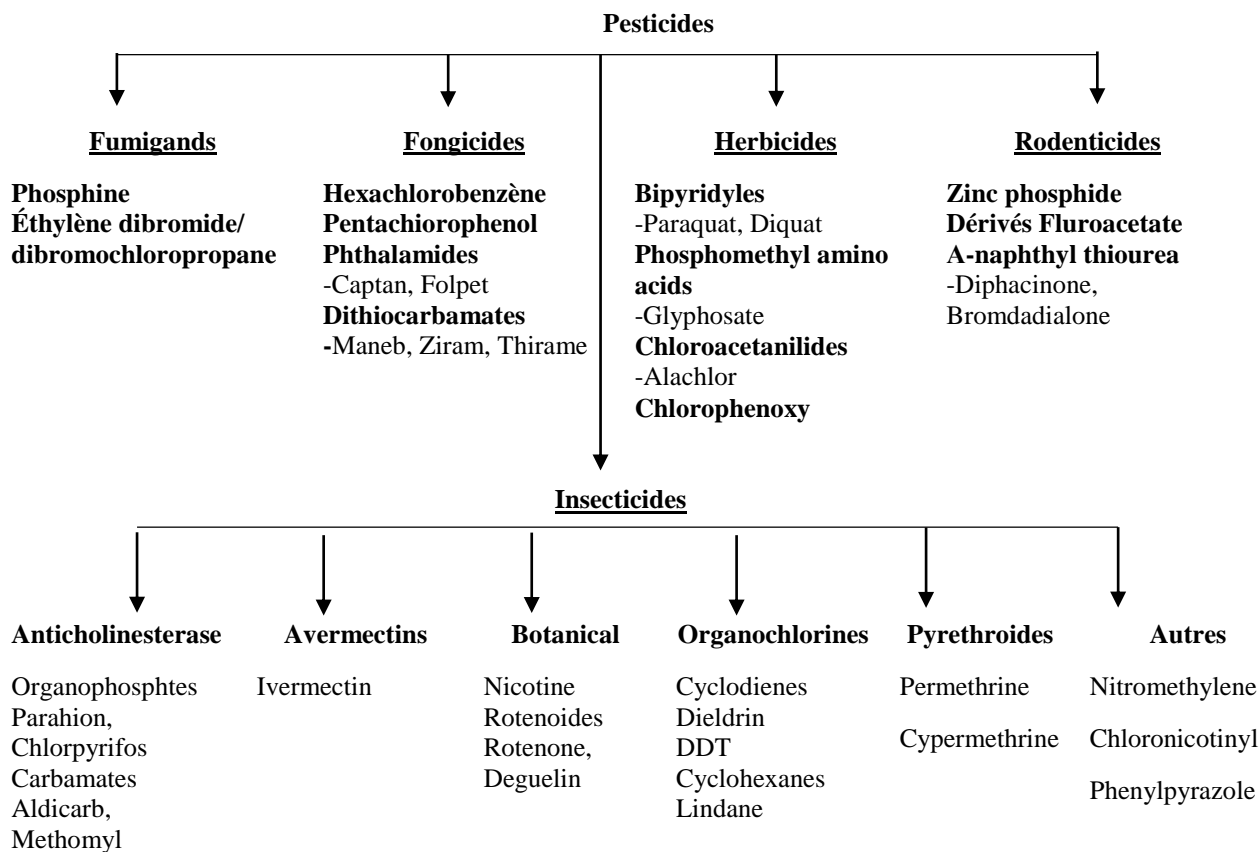


Figure 3. Classification des pesticides selon la cible (Hachter et al., 2008)

A. Classification selon la cible

Les fongicides ou anticryptogamiques sont destinés à lutter contre les champignons parasites, les bactéries, les virus et autres micro-organismes pouvant affecter le bon développement des plantes (Ramade, 2011). Ils peuvent agir différemment sur les plantes soit en inhibant le système respiratoire ou la division cellulaire, soit en perturbant la biosynthèse des acides aminés, des protéines ou le métabolisme des glucides (Aubertot et al., 2005). Les fongicides regroupent des familles chimiques très diversifiées : des carbamates, des dérivés du benzène, des quinones, des amines, etc.

B. Classification chimique

Trois catégories se distinguent : les pesticides organiques, organo-métalliques et inorganiques (Calvet et *al.*, 2005).

- **Pesticides organiques** : Ils présentent un squelette carboné. Les principales familles sont les organochlorés, organophosphorés, pyréthrinoïdes et les dithiocarbamates dont appartient le **Thirame**.
- **Pesticides organo-métalliques** : ce sont principalement des fongicides dont la molécule est constituée d'un complexe entre un métal, tel que le zinc ou le manganèse, et un composé carboné.
- **Pesticides inorganiques** : ils dérivent de composés minéraux stables dans le milieu naturel tels que le soufre et le cuivre. Ce dernier est appliqué de manière importante en tant que fongicide, sous forme de sulfate de cuivre dont la **Bouillie bordelaise** (Komárek et *al.*, 2010).

C. Classification par mode d'action

La grande variété de molécules étant associée à une grande diversité de cibles biochimiques, les formulations commerciales de pesticides sont généralement présentées selon une classification par type d'organismes cibles afin de faciliter leur choix par les utilisateurs (Calvet et *al.*, 2005).

Les fongicides s'attaquent aux spores des champignons en empêchant leur germination ou bloquent les divisions cellulaires (El-Azzouzi, 2013). Ils inhibent la synthèse des lipides (exemple du boscalide) ou des stérols (exemple du tébuconazole). Certains fongicides perturbent aussi les processus respiratoires (exemple du chlorothalonil) ou inhibent la synthèse des microtubules (Serra, 2015).

2.3. Propriétés et mécanisme d'action du Thirame

2.3.1. Propriétés du Thirame

Il s'agit d'un fongicide à action préventive homologué pour supprimer les maladies par traitement des semences (céréales, oléagineux, légumineuses à grain, légumes, fruits et cultures destinées à la consommation animale) pour contrôler le *Pythium spp.* Son application par pulvérisation foliaire sur les arbres fruitiers (pomme, pêche, prune), les fraises et le céleri (planches de culture), trempage des racines pour la patate douce, et comme répulsif à animaux afin de protéger les plantes ornementales d'extérieur en dormance et les jeunes arbres fruitiers pour contrôler le *Botrytis spp.* (ARLA, 2016).

Le Thirame est le nom d'origine américaine donné à un dithiocarbamate dont la formule brute est : $C_6H_{12}N_2S_4$. Il est appelé par les chimistes : Tétraméthylthiuram disulfide (T.M.T.D) ou Bis Diméthylthiocarbamate disulfide. Il s'agit d'une poudre cristalline, grisâtre ou jaunâtre, selon la pureté (Lhoste, 1960). Il comprend des matières actives connexes que sont le zirame et le ferbame.

Avec une masse moléculaire 240,4 et une solubilité dans l'eau à la température ambiante 18 mg/L (ARLA, 2016). La formule développée du Thirame (disulfure de tétraméthylthiurame) est illustrée dans la figure ci-dessous.

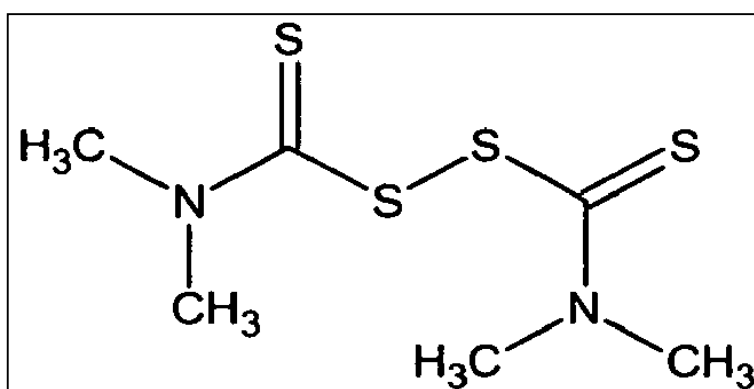


Figure 4. Formule du Thirame, disulfure de tétraméthylthiurame (Kang et al., 2002)

2.3.2. Mode d'action

Les dithiocarbamates dont le Thirame ont une action inhibitrice sur la respiration des champignons. Ils agiraient également par le biais d'espèces réactives de l'oxygène à l'origine d'un stress oxydant (De Meester et *al.*,1967). Son action sur les activités enzymatiques cellulaires est complexe : tantôt activateur des nucléases hépatiques, il est aussi inhibiteur des enzymes respiratoires. Ce toxique bloquerait chez *Tetrahymena pyriformis* l'évolution de l'activité totale de la malate déshydrogénase et de la succinate déshydrogénase sans provoquer aucune réduction d'activité. Ainsi, il inhibe les enzymes respiratoires en bloquant de façon réversible les fonctions thiol de ces enzymes. Néanmoins, le Thirame ne possède pas une seule cible moléculaire, mais touche, à des degrés divers, l'ensemble des fonctions cellulaires qualifié de ses effets multi-site (Mereau, 1983 ; Testud et Marcotullio ,2001).

2.3.3. Présence et comportement dans l'environnement

L'utilisation du Thirame entraîne sa pénétration dans les habitats terrestres et aquatiques non visés par la dérive de pulvérisation et dans les habitats aquatiques par ruissellement. Il est soluble dans l'eau et il ne se vaporise pas lorsqu'il est pulvérisé sur les cultures. Il ne se retrouve probablement pas dans l'atmosphère et soit transporté sur de grandes distances à partir de son point d'utilisation. Il se dégrade rapidement et s'accumule très peu dans les tissus des poissons. Il peut se déplacer dans le profil pédologique et contaminer les eaux souterraines dans certains types de sol (ASC, 2016).

Ce fongicide présente des risques potentiels pour les oiseaux et les mammifères en affectant le fonctionnement des gonades et de la thyroïde et peut être toxique pour de nombreux organismes autres que les cibles d'utilisation en agriculture (Mereau, 1983).

Il est bactériostatique à l'égard de certaines cocci et modifie profondément la microflore du sol par son action bactéricide sélective. Il est inactif envers les bactéries symbiontes des végétaux. Il est également algicide par l'inhibition de la photosynthèse chez certaines algues (ASC, 2016).

Les organismes aquatiques peuvent également être à risque s'ils sont exposés au Thirame. L'évaluation des risques pour l'environnement a tenu compte du profil d'emploi actuellement homologué, ainsi que des mesures d'atténuation sous forme de zones tampons pour l'application par pulvérisation et des mises en garde sur les étiquettes soulignant les risques de ruissellement ; cependant, les risques pour les oiseaux et les organismes aquatiques ne peuvent être entièrement atténués (ASC, 2016).

2.3.4. Toxicité du Thirame

Le Thirame peut être absorbé à partir du tractus gastro-intestinal, par inhalation de brouillard de pulvérisation ou de poussières, et à travers la peau intacte. Parmi les symptômes précoces d'intoxication, on peut mentionner : sensation vertigineuse, confusion, somnolence, léthargie, ataxie, céphalées ou coma, nausées, vomissements, diarrhée et douleurs stomacales ; faiblesse musculaire et paralysie (ascendante) ; paralysie respiratoire ; rash cutané et irritation oculaire (OMS, 1994 ; Tomlin, 2009).

Il inhibe la croissance des protozoaires ciliés. Il est toxique envers la Daphnie et les limnées *Lymnae stagnazis*, alors que l'un de ses catabolites (la diméthylamine) corrode la peau et les branchies des poissons (Mereau, 1983).

Plusieurs études ont été réalisées sur différents organismes non cibles afin de mettre en évidence l'effet toxique et délétère du Thirame à savoir *Dugesia gonocephala*, *Daphnia magna*, *Asellus aquaticus*, *Gammarus pulex*, *Cleon dipteron*, *Xenopus laevis*, *Tetrahymen thermophila* et plusieurs espèces d'amibes (Bluzat et al., 1982 ; Seuge et Marchal-Ségault, 1983; Dive et al., 1984).

Des études antérieures ont démontré des effets toxiques et tératogènes chez des animaux de laboratoire exposés au Thirame. Une alimentation chronique de Thirame a causé des effets néfastes sur la reproduction (Prasad et al., 1987; Stoker et al., 1996; Mishra et al., 1998) et sur le développement (Korhonen et al., 1982; Stoker et al., 1996), la neurotoxicité (Lee et Peters, 1976; Maita et al., 1991), le dysfonctionnement rénal et hépatique se traduisant par l'inhibition des enzymes microsomaux hépatiques et l'élévation de certaines activités enzymatiques sériques (Dalvi et al., 1984; Maita et al., 1991).

De plus, un certain nombre d'essais *in vitro* à court terme, y compris le test d'Ames et des essais sur des systèmes de cellules de mammifères, ont montré une activité génotoxique du Thirame (Zdzienicka *et al.*, 1979; Paschin et Bakhitova, 1985; Franekic *et al.*, 1994; Agrawal *et al.*, 1997; Ardito *et al.*, 1997).

Chez l'homme en contact permanent avec ce produit, des lésions cutanées dont l'eczéma des mains ou la dermatite ont été reconnues chez les travailleurs exposés (Stasiowska *et al.*, 1981; Edwards *et al.*, 1991). La quasi-totalité des organes sont touchés : modification de la formule sanguine, dérèglements hormonaux, lésions du système nerveux central, de l'appareil vasculaire, du système hépatobiliaire, des dermatites et allergies, une embryotoxicité se manifeste notamment par des anomalies morphologiques fœtales, une stérilité secondaire et des avortements (Mereau, 1983).

2.4. Propriétés et mécanismes d'action de la Bouillie bordelaise

2.4.1. Propriétés de la Bouillie bordelaise

La Bouillie bordelaise est un fongicide cuivrique découvert vers les années 1880 pour protéger le feuillage des plantes (Lhoste, 1960) et pour contrôler le mildiou. Pendant de très nombreuses années, la « Bouillie bordelaise », fut employée pour les soins apportés à la vigne. Avec l'essor des produits phytosanitaires de synthèse dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, le cuivre a été utilisé en combinaison avec d'autres fongicides organiques. Mais récemment, avec l'essor de la viticulture biologique, la restriction des produits utilisables (aucun fongicide de synthèse) se traduit par l'utilisation unique de cuivre comme protection phytosanitaire contre le mildiou (Gilbin, 2001).

Cent ans après sa découverte, ce produit demeure très utilisé, à cause de son bas prix, et à sa capacité de contrôler un grand nombre de pathogènes. Nous citons également des applications marginales de sulfate de cuivre dans les plans d'eau - réservoirs pour contrôler le développement algal et la maladie tropicale de la bilharziose (Haughey *et al.*, 2000).

Elle est constituée de 80% en masse de sulfate de cuivre pentahydraté $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et de 20% en masse de chaux éteinte $\text{Ca}(\text{OH})_2$. La chaux éteinte résulte de l'hydratation contrôlée de la chaux vive CaO (Narayan, 1949 ; Mukerjee et Srivastava, 1957).

La formule développée de la Bouillie est illustrée dans la figure ci-dessous.

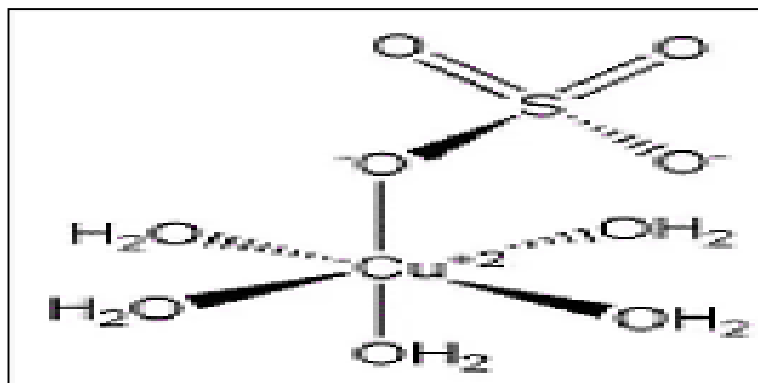


Figure 5. Formule de sulfate de cuivre sulfate de cuivre pentahydraté (Varade, 2016)

La composition exacte des Bouillies bordelaises est souvent difficile à connaître, notamment quand les mélanges sont faits artisanalement ou parce que différents sels de sulfates de cuivre sont utilisés. Il s'agit de granulés bleus, dépressible dans l'eau ayant. Ses éléments se combinent entre eux pour donner la réaction suivante (Lhoste, 1960 ; INERIS, 2014) : $\text{SO}_4\text{Cu}, 5\text{H}_2\text{O} + \text{CaO} = \text{SO}_4\text{Ca} + 5\text{H}_2\text{O} + \text{CuO}$

2.4.2. Mode d'action

Le mildiou est une maladie cryptogamique qui cause la mort du pied de la plante, le seul traitement consiste en une pulvérisation répétée de « Bouillie bordelaise » (agent destructeur des sporocystes) (AVC, 2001).

Le cuivre est un produit de contact uniquement préventif. Il a un effet fongicide dû à la destruction des spores de mildiou et de black-rot. Sous l'action de l'eau, l'ion Cu^{2+} présent dans les préparations à base de cuivre va se libérer plus ou moins lentement et peut agir sur les spores des champignons. Il exerce son effet par le biais des ions cuivre (Cu^{2+}) du mélange. Ces ions affectent des enzymes dans les spores des champignons (bénéfiques ou parasites) bloquant leur germination (Shoja et al., 1998).

Un autre effet indirect moins connu est que le cuivre intervient également dans le métabolisme des protéines de la plante ce qui favoriserait entre autres la synthèse de certains composés (resvératrol, peroxydases, phénols totaux, anthocyanes) (Berriau, 2012).

Il aurait également un rôle dans le métabolisme de l'azote. Il est connu que le cuivre est un oligo-élément essentiel à la nutrition des plantes, une carence en cuivre de la plante conduirait à un excédent d'azote soluble, attirant ainsi les ravageurs et permettant le développement des maladies (Berriau, 2012).

2.4.3. Présence et comportement dans l'environnement

Le cuivre est présent naturellement dans la croûte terrestre et dans les océans, les lacs, les rivières sous différentes formes et concentrations. C'est un des rares métaux existant à l'état natif, cependant il est majoritairement présent sous la forme de minerais (Szymanowski, 1993).

La majorité du cuivre rejeté dans l'eau est sous forme particulaire et tend à se déposer, à précipiter ou à s'adsorber à la matière organique, au fer hydraté, aux oxydes de manganèse ou aux argiles (INERIS, 2014).

L'ion Cu^{+2} est instable dans l'eau sauf en présence d'un ligand stabilisateur comme les sulfures, les cyanures ou les fluorures. Le cuivre migre en profondeur dans des conditions particulières de drainage ou en milieu très acide et risque donc de contaminer l'eau souterraine (Dameron et Howe, 1998).

Les sources agricoles de cuivre dans l'environnement sont liées les épandages des fumiers et lisiers de bovins, porcins et de volailles ; les traitements phytosanitaires des cultures et des arbres ; l'utilisation d'engrais minéraux ; l'épandage de composts et des boues issues des STEP qui émettent principalement vers les sols.

Il est à noter qu'une des sources d'émission dans l'environnement des composés du cuivre est leur présence dans les insecticides, molluscicides destinés aux filets de pêche et coques de bateaux, bactéricides, herbicides et fongicides (anti-mildiou) (oxyde cuivreux et cuivrique, acétate de cuivre et sulfate de cuivre), dans la Bouillie bordelaise (sulfate de cuivre avec de l'hydroxyde de calcium) et dans la Bouillie bourguignonne (sulfate de cuivre avec du carbonate de sodium (Dameron et Howe, 1998 ; INERIS, 2014).

2.4.4. Toxicité de la Bouillie bordelaise

La Bouillie bordelaise est employée mais elle n'a pas fait l'objet d'études d'impact et de sécurité obligatoires pour les pesticides modernes. Sa toxicité est paradoxalement encore mal cernée. Elle est étiquetée comme produit « *dangereux pour les organismes aquatiques* » (ANSES, 2011).

La toxicité du cuivre pour la flore et la faune aquatiques est principalement due à des formes solubles, telles que l'ion libre Cu^{2+} , forme la plus toxique du cuivre pour les algues, les protozoaires, les crustacés et les poissons et certains complexes d'hydroxy et de carbonates (US EPA, 1992; Nor, 1987; Flemming et Trevors, 1989).

Des essais de toxicité similaires, qui ont exposé différents organismes aquatiques au cuivre, ont démontré que les cladocères (*Ceriodaphnia* et *Daphnia*) étaient les espèces les plus sensibles à ce métal (Schubauer- Berigan et al., 1993; Dobbs et al., 1994).

Mastin et Rodgers (2000) ont étudié la toxicité et la biodisponibilité des pesticides à base de cuivre sur des animaux d'eau douce et ils ont classé : *Daphnia magna*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca*, et *Chironomus tentans*, respectivement selon leurs sensibilités au sulfate de cuivre.

Le cuivre étant un élément phytotoxique, son accumulation dans le végétal pourrait conduire à des modifications morphologiques, biochimiques ou physiologiques dans les différentes parties de la plante, perturbant les interactions plante-bio-agresseur (Denaix et al., 2016). Pour les végétaux, algues et plantes supérieures, le cuivre inhibe la photosynthèse qui est liée à des processus biochimiques qui peuvent aussi être utilisés comme indicateurs de la toxicité : formation d'ATP, fixation du CO_2 (incorporation de ^{14}C), production d'oxygène...etc (Yruela, 2005; Gilbin, 2001).

Les métaux comme le cuivre peuvent être des inhibiteurs de l'incorporation de manganèse dans le phytoplancton marin (Sunda and Huntsman, 1996). Lors de sa pulvérisation, une partie des ions cuivre doivent être actifs (sous forme soluble) pour avoir une efficacité curative immédiate. L'autre partie, plus importante, doit être inactive à cet instant pour avoir une efficacité préventive. Dans le cas contraire, si tous les ions étaient solubilisés, la solution pourrait sur le moment brûler les organes végétaux (Reynier, 2011).

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Pour les animaux (par exemple les poissons), au moins deux voies de pénétration du cuivre sont à considérer : les voies respiratoires et le système digestif. L'incorporation dans les cellules par l'une ou l'autre des voies va suivre les mêmes règles que pour un organisme unicellulaire : adsorption à la surface puis transport et diffusion à travers la membrane. En plus ils ne sont pas équipés de système de protection pour les complexes lipophiles qui peuvent se bio-accumuler dans les tissus adipeux et se bio-concentrer le long de la chaîne alimentaire (Gilbin, 2001).

Le cuivre est un oligoélément nécessaire à très faible dose chez les mammifères. Il devient toxique pour l'homme avec des effets aigus au-delà de 0,3 à 1,4 g/kg de poids corporel, le sulfate de cuivre étant le plus toxique, les yeux, les muqueuses et la peau qui sont les plus couramment touchés, les problèmes respiratoires et irritations nasales peuvent être observés (Nagaraj et al., 1985; Patel et al., 1976; Chowdhury et al., 1961; Chugh et al., al 1975; Chuttani et al., 1965).

Un syndrome pulmonaire dit *Vineyard Sprayers' Lung* a été décrit chez des ouvriers viticulteurs manipulant la Bouillie bordelaise ; une pneumopathie interstitielle (parfois fibrosante), caractérisée par l'apparition de granulomes histiocytaires et de nodules fibrohyalins contenant du cuivre. Une forte incidence d'adénocarcinomes (surtout des carcinomes des cellules alvéolaires) a été rapportée chez ces patients, et aussi dans certains cas des lésions hépatiques (fibrose, cirrhose micronodulaire, angiosarcome) et une hypertension portale. Le cuivre a été aussi trouvé dans les macrophages prélevés dans les expectorations d'ouvriers chargés de pulvériser la Bouillie bordelaise sur la vigne (Plamenac et al., 1985).

Les risques liés à l'inhalation ne semblent pas avoir été étudiés chez l'homme, mais l'OMS en 1998 relève qu'une exposition chronique à des aérosols ou vapeurs de "Bouillie bordelaise" induit une augmentation de l'absorption et de l'accumulation de cuivre dans l'organisme, sous certaines formes (organique ou inorganique) complexées (par exemple quand il se lie au diéthylthiocarbamate ou au diethyldithiocarbamate , il devient très lipophile ce qui lui permet de pénétrer les organismes et de s'accumuler dans les membranes plasmiques (Campbell, 1994).

Claro (2001) mentionne qu'un excès de cuivre peut être néfaste à la santé humaine et nuire à la biologie du sol, la dose maximale de cuivre permise est de 50 ppm dans les cultures de plantes horticoles et fourragères.

Enfin, Chez les bactéries coliformes, le cuivre inhibe les enzymes respiratoires de la membrane cellulaire (Domek et *al.*, 1984). Des dommages de la paroi cellulaire et la lyse cellulaire en fonction de la concentration et du temps d'exposition ont été observées au microscope (Zevenhuizen et *al.*, 1979).

3. STRESS OXYDANT ET MECANISMES DE DEFENSE

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.

L'organisme possède des systèmes protectifs, cependant lorsque ces derniers ne peuvent plus faire face aux radicaux libres qui deviennent incontrôlables, conduisant ainsi à des dommages au niveau des molécules, des cellules et des organes pouvant mener potentiellement à la mort de l'organisme (Ďuračková et *al.*, 2008).

3.1. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes, ions ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capables d'existence indépendante (Close, 2007). Les espèces réactives de l'oxygène sont une famille d'entités chimiques regroupant les dérivés non radicalaires (ne possédant pas d'électron célibataire) dont la toxicité est importante, anion peroxyde O_2^{2-} , peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxydinitrite ($ONOO^-$) et les radicaux libres oxygénés (espèces chimiques possédant un électron célibataire non apparié) qui intéresse notre propos, anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), radical hydroxyle (HO^{\bullet}), monoxyde d'azote (NO^{\bullet})...etc (Novelli, 1997). Les origines des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont diverses, ils sont produits par le métabolisme cellulaire basal et également sous différentes conditions environnementales en présence de xénobiotiques.

Chez les organismes aérobies l'oxygène est indispensable pour leur survie, le métabolisme énergétique aérobie dépend de la phosphorylation oxydative, un processus par lequel l'ATP est formé. Cependant, il a été estimé qu'environ 1 à 3 % de l'O₂ consommé par les animaux est converti en ROS dans la mitochondrie ou des métabolites de l'O₂ fortement réactifs peuvent se former pendant des réactions de transfert d'électrons. (Thannickal et Fanburg, 2000).

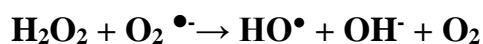
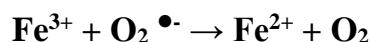
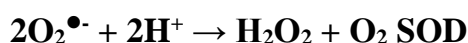
Différents xénobiotiques sont capables d'initier la formation de ROS : les contaminants organiques tels que les composants du cycle redox, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, hydrocarbures halogénés, dioxines et pentachlorophénol; métaux (aluminium, arsenic, cadmium, chrome, mercure, nickel, vanadium) ; contaminants volatiles (NO₂, O₃, SO₂), peroxydes ; radiation UV ; hypoxie et hyperoxie. Ces contaminants peuvent stimuler la production de ROS par différents mécanismes (Arumugam et al., 1999; Halliwell et Gutteridge, 1999; Schlezinger et al., 1999; Strolin-Benedetti et al., 1999).

3.1.2. Différents dérivés réactifs de l'oxygène

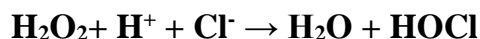
A. Dérivés primaires non radicalaires de l'oxygène

Ils ne possèdent pas d'électrons non appariés mais sont des précurseurs des radicaux libres et sont aussi réactifs que ceux-ci.

- ✓ **Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂** : Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est formé par dismutation de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) sous l'action de la super oxyde dismutase (SOD). Il participe à la production d'espèces très réactives comme le radical hydroxyle (OH[•]) et son action est plus importante comme initiateur de la cytotoxicité des radicaux libres plutôt qu'en tant qu'espèce réactive. Bien qu'il est moins réactif que certains autres ROS, en réagissant avec l'anion superoxyde, il fournit l'hydroxyle (Halliwell et Gutteridge, 1985; Yu, 1994 ; Belkheiri, 2010).



- ✓ **L'acide hypochloreux HOCl** : Essentiellement produit à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ion chlorure (Belkheiri, 2010), il se produit selon la réaction suivante :



- ✓ **L'oxygène singulet (1O_2)** : Il est très instable, il peut apparaître durant les cycles de peroxydation lipidique, amplifiant ainsi les processus d'autoxydation. A partir de l'oxygène moléculaire, chaque réduction aboutit à la formation des espèces appelées espèces actives de l'oxygène (ROS) : le radical anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et sa forme protonée le radical hydroperoxyde (HO_2^{\bullet}), l'ion peroxyde (O_2^{2-}) et ses formes protonées l'anion hydroperoxyde (HO_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical O^{\bullet} et sa forme protonée le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) et enfin O_2^- et sa forme protonée, l'eau H_2O , $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et HO^{\bullet} . Il peut diffuser à travers les membranes et peut accepter deux électrons simultanément pour former des peroxydes. Il a pour cibles biologiques les membranes, les acides nucléiques et les protéines (Belkheiri, 2010 ; Bonnot, 2009 ; Oueslati, 2017 ; Redmond et Kochevar, 2006).



- ✓ **Le peroxydinitrite (ONOO^-)** : Chez les organismes supérieurs qui synthétisent du monoxyde d'azote (NO) par l'activité de NO synthase (NOS), le superoxyde peut réagir avec NO pour former l'anion peroxydinitrite (ONOO^-) très délétère vis-à-vis des composés biologiques (Bonnot, 2009). En présence de dioxygène, le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) donne des oxydes d'azote (ONOO^{\bullet} , N_2O^3) qui sont généralement des agents nitrosants conduisant à la formation de nitrites et de nitrosothiols dans les milieux biologiques. Par contre en présence de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le couplage avec NO^{\bullet} produit l'anion oxoperoxonitrate appelé couramment peroxydinitrite (ONOO^-) (Beckman et Koppenol, 1996 ; Belkheiri, 2010).

B. Les dérivés primaires, radicaux libres oxygénés

Ils possèdent un électron libre non apparié et sont extrêmement réactifs.

- ✓ **L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$)** : Il peut se former par réaction de l'oxygène avec un électron (généralement cet électron provient d'une fuite au niveau de la chaîne

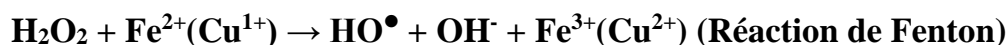
respiratoire mitochondriale, plus précisément l'accepteur terminal : le cytochrome oxydase du complexe IV de la chaîne de transport électronique de la membrane interne mitochondriale) (Han et *al.*, 2001 ; Babcock, 1999).

Ainsi l'oxygène n'est réduit que partiellement : 2% de l'oxygène subit une réduction mono électronique au niveau de l'ubiquinone. (Cadenas et Davies, 2000). L'efficacité de l'activité antioxydante de l'ubiquinone (Q) dépendrait du sort de la semiquinone (SQH) qui peut exercer une activité contraire (c'est-à-dire pro-oxydante) via la formation d'anion superoxyde (Belkheiri, 2010). La NADPH oxydase se trouve dans la membrane plasmique est également une source importante d'anion superoxyde (Cross et *al.*, 1999).



Le radical superoxyde est moins réactif que le radical hydroxyle, mais sa durée de vie est plus longue et il peut diffuser loin de son lieu de production. Ce radical a peu de cibles privilégiées (les superoxyde dismutases, le cytochrome c, l'ascorbate), il réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour fournir le radical hydroxyle en présence de fer (Fe) (Belkheiri, 2010 ; Halliwell et Gutteridge, 1986 ; Keyer et Imlay, 1996).

- ✓ **Le radical hydroxyle HO[•]** : Le radical hydroxyle (OH[•]) résulte de la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène (Halliwell et Gutteridge, 2015). Il peut se former par réaction du peroxyde d'hydrogène avec un ion ferreux (réaction de Fenton), ou par réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde (réaction de Haber-Weiss) ou sous l'effet de radiations ionisantes (rayons X ou gamma), les rayonnements UV (rupture homolytique de H₂O₂), les ultrasons (cassures des liaisons de l'eau) et les radiations ionisantes (radiolyse de l'eau) sont également capables de générer (HO[•]). De par sa demi-vie courte environ une nanoseconde, il diffuse peu et agit directement sur le site de production (Belkheiri, 2010 ; Wink, 1994 ; Von Sonntag, 2008). Il peut être généré en présence de cations métalliques tels que Fe²⁺ (réaction de Fenton), ou de Cu⁺².



- ✓ **Le radical hydroperoxyde (HO₂•)** : C'est la forme protonée de l'anion superoxyde. L'anion superoxyde est en équilibre constant avec le radical perhydroxyle (HO₂•) qui est beaucoup plus oxydant que lui. L'anion superoxyde peut être alors transformé soit spontanément, soit par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Hool et Clin, 2006; Bonnot, 2009).
- ✓ **Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO•)** : C'est un agent vasodilatateur. Il est synthétisé par les Nitroso Synthases (NOS) selon la réaction ci-dessous. Le peroxyde nitrite est cytotoxique et oxydant pour les résidus méthionine, les thiols et les thioéthers (Moncada et *al.*, 1993 ; Cosentino, 2002 ; Sennequier et Vadon, 1998).



C. Dérivés secondaires de l'oxygène

Ces radicaux se forment par réaction des radicaux primaires ci-dessus avec certains composés biochimiques de la cellule.

- ✓ **Le radical peroxyde (ROO•)** : C'est un radical très réactif avec la plupart des molécules, il est impliqué notamment dans la propagation de l'oxydation des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires (Belkheiri, 2010). Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO•) (Fig. 6), suffisamment réactif pour arracher un H⁺ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (Atkin et *al.*, 2005).

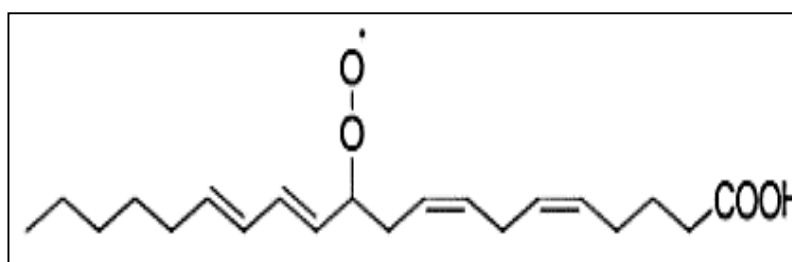


Figure 6. Structure du radical peroxyde (Belkheiri, 2010)

3.2. Conséquences des ROS sur les cibles biologiques

3.2.1. Oxydation des protéines

Les protéines sont des constituants cellulaires structurels et fonctionnels, dont l'oxydation des acides aminés, surtout les soufrés et les aromatiques, entraînent des déformations structurales, facilitant de ce fait leur agrégation ou leur dégradation par les protéases (Squier, 2001) entraînant par la suite le dysfonctionnement des organes (Levine et Stadtman, 2001).

L'oxydation des acides aminés est généralement induite par le radical hydroxyle mais peut aussi l'être par H_2O_2 . Ces modifications peuvent intervenir sur la chaîne carbonée principale (Berlett et Stadtman, 1997) ou des chaînes latérales (Uchida et *al.*, 1990).

L'oxydation des acides aminés soufrés entraîne une perte des groupements thiols (Davis et *al.*, 2001). Elle concerne particulièrement les enzymes antioxydantes qui contiennent très souvent des groupements thiols (-SH). L'intégrité GSH des membranes cellulaires est également menacée par l'oxydation des protéines du fait de la modification du caractère antigénique et des propriétés fonctionnelles et des protéines membranaires (récepteurs ou enzymes) (Gruber et *al.*, 2006 ; Jacob et *al.*, 2006).

La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes tels que la non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand ou la perte d'activité enzymatique. Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Lehucher-Michel et *al.*, 2001 ; Haleng et *al.*, 2007). Ils peuvent même à terme entraîner la mort cellulaire (Droge, 2002).

3.2.2. Oxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) entrent dans la composition des membranes phospholipidiques et sont particulièrement sensibles à l'attaque par l'oxygène singulet et par les radicaux hydroxyles donnant des hydroperoxydes lipidiques (Halliwell et Gutteridge, 1999). L'attaque oxydative par l'hydroxyle, est appelée «peroxydation lipidique» (Farmer et Davoine, 2007).

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des AGPI : c'est la **phase d'initiation**. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO^\bullet), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, **propageant** ainsi la réaction (Atkin et *al.*, 2005). Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Chaque radical R^\bullet peut être à l'origine d'une centaine de molécules d'hydroperoxyde avant que survienne la phase de terminaison. La réaction en chaîne peut être interrompue (**phase de terminaison**) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Delattre et *al.*, 2005). Les peroxydes générés seront neutralisés par le glutathion (Lehucher-Michel et *al.*, 2001).

L'hydroperoxyde lipidique (ROOH) formé peut être oxydé en présence de métaux de transition divalents de Fe^{2+} ou Cu^{2+} entraînant ainsi la formation d'alcalanes et d'aldéhydes toxiques dont le malonyldialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonanal (4-HNE), des acides thiobarbituriques (TBAS), issues de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques, dont ces produits du stress oxydative ont été classés comme des marqueur de la peroxydation lipidique (Esterbauer et *al.*, 1991 ; Niki, 2008 ; Tsikas, 2017).

La peroxydation lipidique provoque une désorganisation des membranes (cellulaire, HDL, LDL), entraînant une inactivation des systèmes enzymatiques membranaires, une diminution de la fluidité et une perte de la perméabilité sélective, pouvant conduire à la mort de la cellule (Hatta et Frei, 1995).

3.2.3. Dommage de l'ADN

Une fois endommagée, la molécule d'ADN ne peut pas être remplacée et doit être réparée. Toute modification de la structure chimique de l'ADN risque d'entraîner un changement dans l'information génétique. Quatre classes principales de dommages : les coupures simples et doubles brins, les pontages ADN-ADN et ADN-protéines et les sites abasiques (Favier, 2003). Ces attaques sont essentiellement causées par le HO^\bullet .

Les dommages sont de différents types :

- Modification de base azotée, en particulier la guanine qui peut être transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) ou encore la thymine en thymine glycol. Cela entraîne un non-appariement des bases, ou un mauvais appariement, ou encore un blocage de la réplication de l'ADN.
- Destruction de la liaison entre la base et le désoxyribose, à l'origine d'un site dépourvu de base ou « abasique », qui s'avère être non fonctionnel.
- Destruction du désoxyribose, responsable d'une cassure de brin, létale pour la cellule.
- Formation de pontages avec des protéines, ou avec des dérivés d'oxydation lipidique, des aldéhydes mutagènes tel que le MDA, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine (Cadet et *al.*, 2002 ; Haleng et *al.*, 2007).

Les protéines synthétisées pourront alors être non-fonctionnelles dans la cellule initialement endommagée, mais aussi dans toute la descendance. Le radical hydroxyle (OH[•]) présente la plus importante réactivité avec les bases et les sucres constituant la molécule d'ADN (Evans et *al.*, 2004), tandis que l'oxygène singulet attaque en priorité la guanine pour la convertir en thymine (Miller et Sweatt, 2007).

Les bases modifiées comme la 8-OHdG qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN. Les mutations au sein de l'ADN conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Lehucher-Michel et *al.*, 2001 ; Henle et *al.*, 1996).

L'ADN mitochondrial est la cible privilégiée des oxydations par les ROS du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources des ROS cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADN mitochondriale par rapport à l'ADN nucléaire (Stevnsner et *al.*, 2002).

3.3. Systèmes de défenses antioxydants

Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Pastre et Priymenko, 2007). Ils peuvent empêcher ou retarder les processus d'oxydation causés par les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (Heo et al, 2007). Ils ont la capacité de contrecarrer les effets néfastes des radicaux libres dans les tissus (Bandyopadhyay et al, 2007).

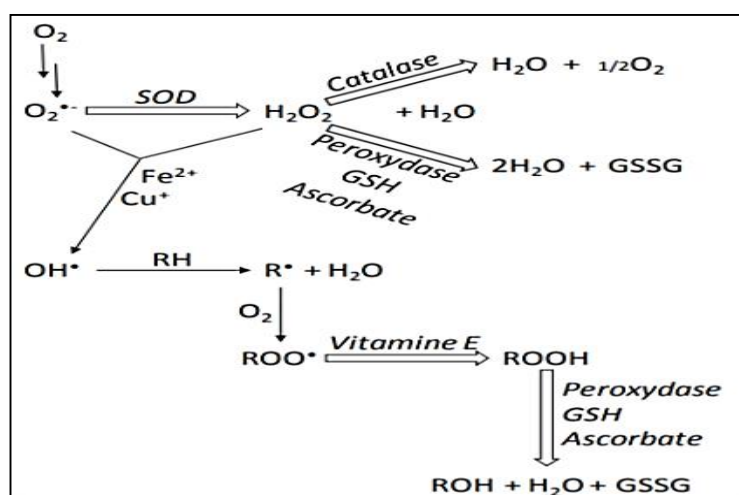


Figure 7. Les molécules enzymatiques et non enzymatiques qui interviennent dans la détoxification cellulaire (Lallement, 2014)

3.3.1. Différents types d'antioxydants

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes distribuées dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveau d'espèces réactives de l'oxygène (Sen et Goldfarb, 2000). Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Delattre et al., 2005). Dans le cas où les ROS continuent à s'accumuler, une adaptation plus consistante de la cellule est nécessaire avec l'induction de gènes codant des enzymes anti oxydantes, des protéines chaperons, des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN et des protéines. La répression des systèmes susceptibles de libérer des ROS, notamment la chaîne respiratoire, les cytochromes P450 et la NADPH oxydase (Morel et Barouki, 1998; Morel et Barouki, 1999).

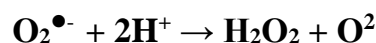
A. Systèmes enzymatiques

Les enzymes existent à l'état endogène, les antioxydants primaires, qui sont pour la plupart des enzymes, vont limiter la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les antioxydants secondaires, qui peuvent être des substances lipo- ou hydrosolubles, vont piéger les ROS sous une forme peu réactive (Zielinski et Portner, 2000).

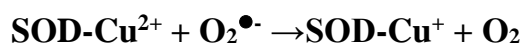
Les antioxydants enzymatiques SOD, CAT, GPx et GR sont considérés comme la première ligne de défense contre les ROS.

A.1. Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD intervient en première ligne contre le stress oxydant car le superoxyde est le premier radical libre formé lors d'un stress et assure ainsi sa dismutation en peroxyde d'hydrogène (McCord et Fridovich, 1969; Nordberg et Arnér, 2001; Mates, 2000 ; Haleng et *al.*, 2007).



Il existe trois types de SOD chez l'homme notamment : la SOD à cuivre-zinc présente dans le cytoplasme (Cu-ZnSOD), la SOD à manganèse (Mn-SOD) présente dans les mitochondries et une SOD extracellulaire qui est la SOD à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD) (Zelko et *al.*, 2002). Les différentes SODs catalysent la même réaction avec une efficacité comparable (Desideri et Falconi, 2003; Rahman et *al.*, 2006; Garrel et *al.*, 2007). La dismutation des $\text{O}_2^{\bullet-}$ par la CuZn-SOD se décompose en deux étapes (mécanisme pingpong) (Goldstein et Czapski, 1991).



A.2. Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (Mates et *al.*, 1999; Powers et Lennon, 1999).

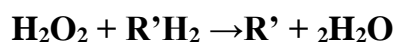
Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Mates et *al.*, 1999 ; Nomura et *al.*, 2000). La réaction catalysée par les GPx peut s'écrire :



La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries (Garait, 2006).

A.3. Catalase (CAT)

La catalase (CAT) est une enzyme cytosolique inductible dont la fonction est de protéger les systèmes biologiques contre les espèces réactives de l'oxygène (Romeo et *al.*, 2000). Elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Arora et *al.*, 2002). C'est une enzyme hémique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003) et entre en compétition avec la GSH-Px pour l' H_2O_2 . Son induction est de plus en plus importante quand les quantités d' H_2O_2 sont élevées (Sayre et *al.*, 2005; Finaud et *al.*, 2006). La CAT peut également catalyser la détoxification de substrats tels que les alcools et les phénols dans le cadre de la réaction de réduction de peroxyde d'hydrogène (Akyilmaz et Dinçkaya, 2003).



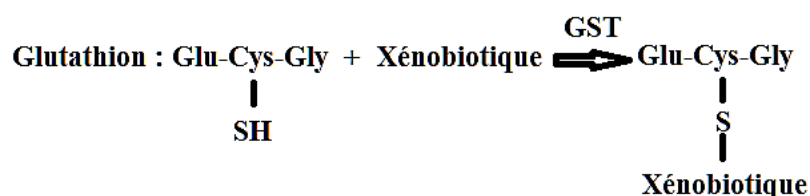
A.4. Glutathion-S-Transférase (GST)

Enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés électrophiles. Elles sont aussi impliquées dans des opérations diverses de transports et de biosynthèses intracellulaires (George et Buchanan, 1990).

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

La GST a une action indirecte sur la détoxification des ROS puisqu'elle permet le transport du GSH vers les compartiments cellulaires subissant des dommages oxydatifs. Avec la GR et la GPx, elle joue un rôle central dans la détoxification des ROS par le GSH. (Tan et *al.*, 1986 ; Béguel, 2012).

La GST fait partie des enzymes de la phase II, son rôle essentiel est de coupler un groupement hydrosoluble à un xénobiotique préalablement métabolisé ou non par les enzymes de la phase I afin de le rendre lui-même plus hydrosoluble et donc plus facilement excrétable par l'organisme. Les GSTs catalysent la conjugaison d'un tripeptide, le glutathion réduit GSH à une multitude de substrats hydrophobes présentant un centre électrophile (Beckett et Hayes, 1993). Ci-dessous, le mécanisme de détoxification des GST:



Outre leur capacité à former des conjugués thioéthers avec le GSH, les GSTs peuvent également catalyser d'autres réactions telles que la lyse des groupements thiols, la réduction d'hydroperoxydes organiques (réaction de type peroxydase) ou l'isomérisation de certains stéroïdes (Van Bladeren, 1988).

B. Systèmes non-enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C (Haleng et *al.*, 2007).

B.1. Glutathion (GSH)

Le glutathion (L- γ -glutamyl-L-cystéinyl-glycine) est un tripeptide ubiquitaire endogène dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection et la détoxification qui résulte principalement de sa fonction de co-substrat des GPx et de la GSH-S Transférase. La protection des tissus et des protéines transporteuses d'ions redox actifs comme l'hémoglobine, la transferrine, la ferritine, l'albumine,

détoxifiant au niveau hépatique et peut se lier aux métaux toxiques (mercure, arsenic... etc.) (Clarkson et Thompson, 2000 ; Hargreaves et *al.*, 2002; Lyn Patrick, 2006).

Dans les conditions physiologiques, le glutathion réduit (GSH) résistant à l'oxydation spontanée est maintenu en équilibre dans le cytosol avec sa forme oxydée disulfure (GSSG). Le glutathion neutralise les ROS comme les radicaux hydroxyles comme il peut réduire le peroxyde d'hydrogène et les lipoperoxydes et inactive l'oxygène singulet à PH=7. Il est utilisé dans la photosynthèse des phytochélatines et se trouve dans les membranes et les chloroplastes (Cadenas, 1989).

B.2. Métallothionéines

Les métallothionéines sont des protéines non-enzymatiques, riches en soufre et en métaux et possédant les propriétés suivantes : Faible masse moléculaire (environ 10 kDa); 60 à 75 acides aminés ; Forte teneur en cystéine (30% des acides aminés); Absence d'acides aminés aromatiques et d'histidine ; Absence de ponts disulfures ; Forte inductibilité par les métaux ; Localisation cytoplasmique ; Présence de motifs (Cys – X – Cys, Cys – X – X – Cys et Cys – Cys) où X est un acide aminé autre que la cystéine; Présence de complexe métal-thiolate tétraédrique (Fowler et *al.*, 1987). A ce jour, les MT ont été identifiées chez environ 50 espèces d'invertébrés aquatiques différents, la majorité étant des mollusques et des crustacés. La fonction principale des MT est de réguler les concentrations intracellulaires de certains métaux essentiels à l'organisme, tels que le cuivre et le zinc, en les séquestrant afin d'éviter leur circulation à l'état libre dans les tissus et leur fixation sur d'autres protéines vitales (Winge et Miklossy, 1982).

B.3. Autres antioxydants

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation.

- **Oligoéléments** : Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium.

Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (Garait, 2006 ; Haleng et *al.*, 2007).

- **Vitamines** : La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l'O₂[•] et l'OH[•]. Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Haleng et *al.*, 2007 ; Packer et *al.*, 1997).
- **Caroténoïdes** : Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés. Les fruits et les légumes en sont les principales sources alimentaires. Le chef de file des caroténoïdes est cependant le β -carotène, également appelé provitamine A (Haleng et *al.*, 2007).
- **L'acide urique** : un piègeur puissant de radicaux (OH[•], ROO[•], NOO[•]...). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C) (Belkheiri, 2010).
- **Coenzyme Q10** : Appelé ubiquinone avec une longue chaîne latérale isoprénique. A une chaîne latérale lui confère un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E (Garait, 2006 ; Haleng et *al.*, 2007).
- **Bilirubine** : Est un produit terminal de la dégradation de l'hème, la bilirubine est capable de piéger ROO[•] et l'oxygène singulet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neužil et Stocker, 1993 ; Haleng et *al.*, 2007 ; Dwassy, 2014).
- **Les polyphénols** : Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des espèces oxygénées activées, et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Manach et *al.*, 2005; Kaliora et *al.*, 2006).

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

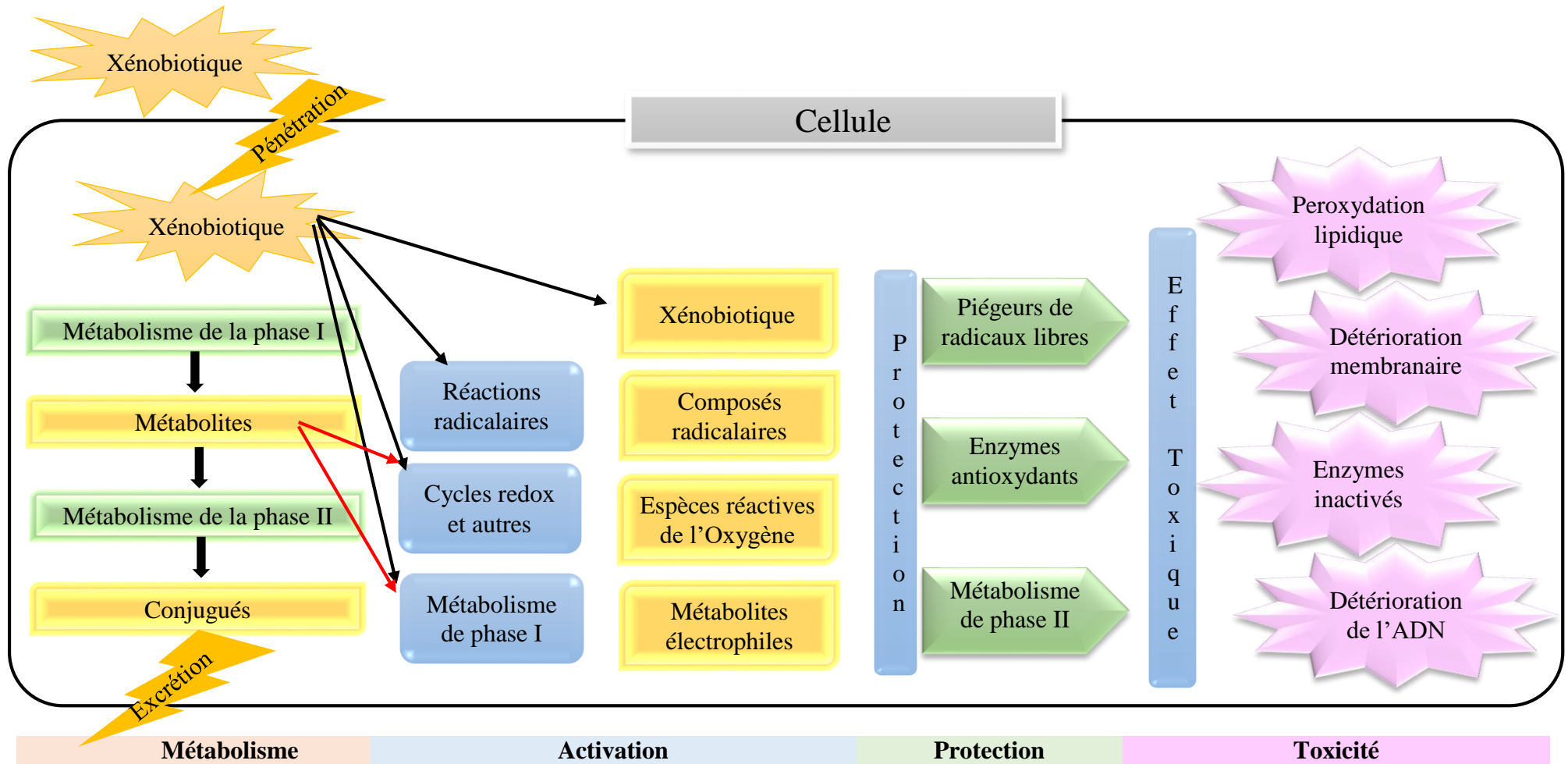


Figure 8. Représentation schématique des voies majeures conduisant à la toxification et la détoxification des xénobiotiques organiques chez les animaux (Michel, 1993)

4. BIO-SURVEILLANCE DE LA QUALITÉ DE L'ENVIRONNEMENT

La qualité de l'environnement est évaluée par plusieurs approches et elle est essentiellement concentrée sur les mesures physiques, chimiques, biologiques et microbiennes. Les méthodes de surveillance conventionnelles «ne peuvent pas refléter l'intégration de nombreux facteurs environnementaux et la durabilité à long terme de l'écosystèmes pour leur nature instantanée » (Le et al., 2016).

Par conséquent, il est largement reconnu que l'utilisation d'autres indicateurs, en plus et en complément des techniques de surveillance physique et chimique, peuvent augmenter et améliorer l'évaluation et la gestion des écosystèmes aquatiques (Metcalf, 1989 ; Ouyang, 2005; Li, 2010 ; Zhou,2008 ; Le, 2016).

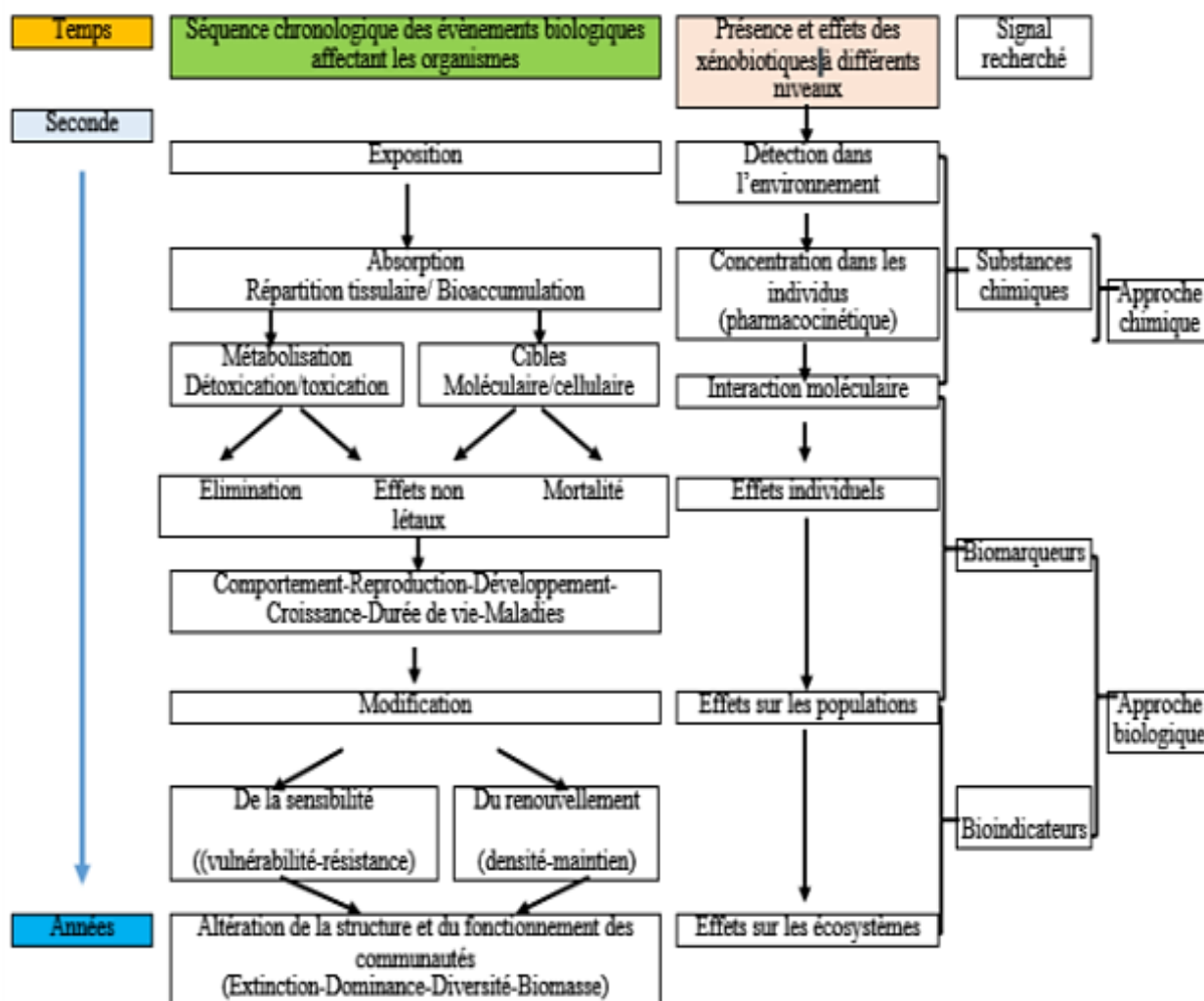


Figure 9. Evaluation de la qualité de l'environnement par une approche globale – chimique et biologique (Lagadic et Caquet, 1996)

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Un test d'écotoxicité peut se définir comme l'utilisation de tout ou partie d'un ou de plusieurs organisme(s) vivant(s) comme « réactif(s) biologique(s) » pour mettre en évidence un effet écotoxicologique mesurable et interprétable à la suite d'une exposition (par exemple aigüe, chronique) à un (ou plusieurs) agent(s) chimique(s) ou physique(s) (Férard, 2013). Le bio-essai est un test expérimental réalisé pour identifier le potentiel toxique d'une substance ou d'un mélange de substances par la réponse biologique de l'organisme test, et déterminer les concentrations avec effets (*CEx*, *LOEC*...) ou sans effet (*NOEC*) (OECD, 2003).

Les paramètres mesurés ou observés sont la survie, la taille, la croissance, le nombre de petits ou n'importe quel paramètre biochimique ou physiologique facilement quantifiable.

Parmi les tests les plus utilisés en écotoxicologie dans l'étude de la toxicité à court terme, nous citons le test d'inhibition de la mobilité du crustacé *Daphnia magna*. Le test daphnie appliqué selon la norme ISO 6341 est applicable pour déterminer la toxicité aigüe des substances chimiques solubles ou pouvant être maintenues en suspension ou en dispersion stable dans les conditions d'essai, des effluents industriels et urbains épurés ou non et des eaux de surface ou souterraines naturelles (ISO 6341, 1996).

Pour l'étude de la toxicité chronique, les essais sur la croissance algale et le test de reproduction chez les daphnies restent les plus utilisés. Le test sur algue est une méthode de détermination de la toxicité chronique par le suivi de la croissance sur plusieurs générations applicables aux effluents aqueux industriels et urbains, aux lixiviats ou extraits aqueux ainsi qu'aux eaux douces de surface ou souterraines (ISO 8692, 1996).

Il existe deux tests de reproduction normalisés chez les daphnies. Il s'agit du test de reproduction 21 jours sur *Daphnia magna* (OCDE 211, 1998) et le test 7 jours sur *Ceriodaphna dubia* (AFNOR NF T90-376, 2000). Ces deux tests consistent à évaluer l'effet des toxiques sur la capacité reproductrice des daphnies exposées (Manar, 2008).

L'extrapolation des effets au niveau populationnel consiste en l'évaluation des effets liés aux contaminants et s'appuie généralement sur des expérimentations au laboratoire dans lesquelles les effets observés sont des dommages cellulaires aux effets sur les traits

de vie des individus. Néanmoins l'interprétation ciblée porte sur des niveaux d'organisation biologiques supérieurs (populations, écosystèmes). C'est la raison pour laquelle l'écotoxicologie se tourne de plus en plus vers la modélisation pour étudier l'influence de contaminants sur la dynamique de population. Elle est en effet un outil incontournable pour extrapoler les effets observés au niveau individuel aux échelles d'organisation supérieures, critères plus pertinents d'un point de vue écologique (Massarin, 2010).

4.1. Notion de bio-indicateurs

Les bioindicateurs sont définis comme espèces ou groupes d'espèces qui, par leur présence et/ou leur abondance, sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie (Guelorget et Perthuisot, 1984).

Les invertébrés sont utilisés comme bioindicateurs de pollution. Il en est ainsi des mollusques bivalves et des gastéropodes terrestres et aquatiques, les annélides (Polychètes, Achètes) et surtout les oligochètes et certains arthropodes (les crustacés) (Beeby, 2001).

Les tests daphnie aigus et chroniques objet de notre étude sont utilisés dans le cadre réglementaire. Les espèces bioindicatrices sont généralement divisées en 3 catégories selon Champeau (2005) :

- ✓ **Indicateurs biologiques** : Qui renseignent sur la composition et la structure des écosystèmes en observant la simple présence ou absence d'espèces.
- ✓ **Organismes tests** : Utilisés dans des procédures standardisées dans les laboratoires de recherche en écotoxicologie.
- ✓ **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).

4.2. Notion de biomarqueur

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). Ils permettent ainsi de prédire les dommages potentiels pouvant menacer l'écosystème et prendre des mesures nécessaires pour remédier à la situation avant que celle-ci ne devienne trop critique (Den Besten *et al.*, 2001).

La figure ci-dessous illustre les différentes relations entre les principaux contaminants les marqueurs biologiques associés :

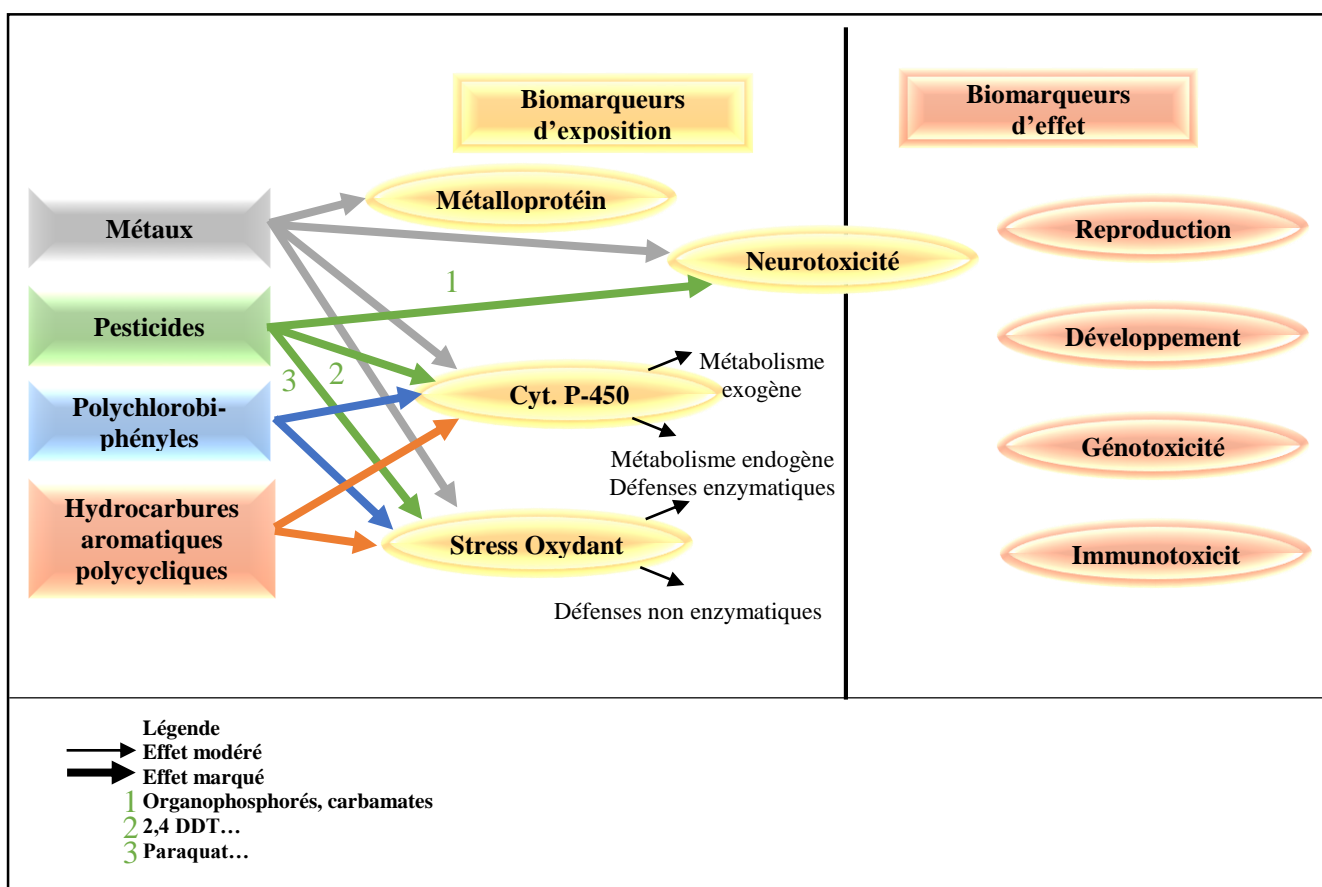


Figure 10. Relations entre les principaux contaminants et les marqueurs biologiques (Narbonne et al., 1999)

Les biomarqueurs peuvent être classés en trois catégories :

- ✓ **Biomarqueurs d'exposition** : Caractérisés par leur réponse précoce et leur spécificité de réaction. Ils sont induits par un type spécifique de polluants.
- ✓ **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.
- ✓ **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).

4.3. Marqueurs biochimiques du stress oxydatif

En fonction de l'espèce réactive (O_2 , O_2^- , H_2O_2 , OH) et de la cible moléculaire (protéines, lipides, glucides, acides nucléiques), qui peut présenter des sensibilités marquées (lipides insaturés, acides aminés et composés aromatiques, fonctions $-SH$ et CH_3-S-), les modes d'action des ROS et les produits terminaux d'oxydation formés seront différents. Parmi les produits terminaux obtenus, certains sont souvent utilisés comme marqueurs du stress oxydatif. C'est le cas du malondialdéhyde (MDA) et des phytoprostanes pour les lipides, des protéines carbonylées pour les protéines et de la 8-oxo-guanine ou 8-oxo-désoxyguanosine pour l'ADN (Lopresti et *al.*, 2014 ; Charissou, et *al.*, 2004 ; Armstrong et *al.*, 2002). Toutefois, il existe un grand nombre de produits d'oxydation autres que ceux précédemment cités, ce qui rend difficile le choix de marqueurs caractéristiques (Ramel, 2009).

4.4. Neurotoxicité (cas de l'Acétylcholinestérase)

Le transfert du flux nerveux au niveau de la synapse est assuré par un médiateur chimique : l'acétylcholine qui se libère dans la fente synaptique inter-neuronale ou neuromusculaires. Ce neurotransmetteur se fixe sur les récepteurs cholinergiques au niveau de la membrane post-synaptique. L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur entraîne une dépolarisation membranaire à l'origine du potentiel d'action qui se propage tout au long d'axone (figure 11) (Bocquené et Galgani, 1998).

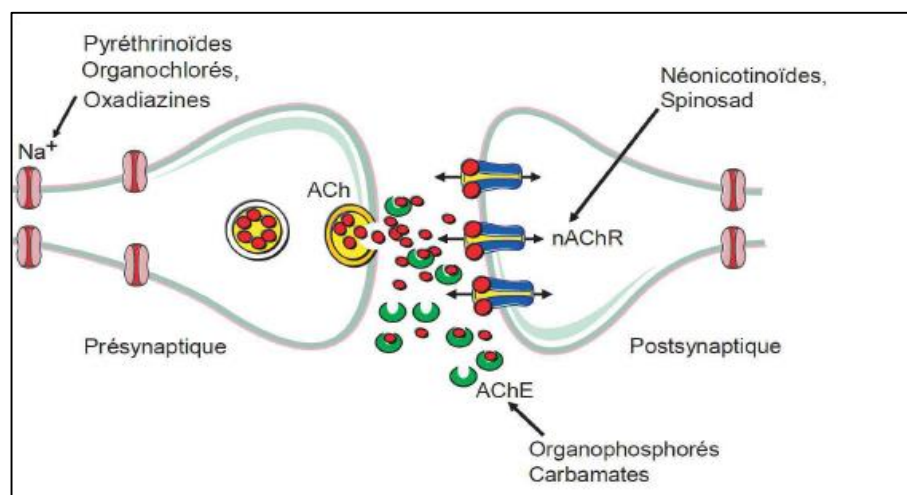


Figure 11. Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones avec les cibles principales des insecticides (Raymond-Delpech et al., 2005)

Légendes : ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase ; nAChR : récepteur cholinergique de type nicotinique ; Na : canal sodium.

Le transport synaptique est un processus qui s'achève dès l'intervention de l'acétylcholinestérase, c'est l'enzyme qui dégrade par hydrolyse ce médiateur chimique, afin de stopper rapidement la stimulation du récepteur (Bocquené et Galgani, 1998).

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE), sont les carbamates et les organophosphorés qui sont connues par leur haute toxicité vis-à-vis des organismes non cibles dont les invertébrés aquatiques par exemple et qui ont soulevé des préoccupations environnementales très importante (Mdegela et al., 2010 ; Martin et al., 2011; Van Dyk et Pletschke, 2011).

Les inhibiteurs de l'AChE perturbent la transmission nerveuse en se liant au site estérique de l'AChE (Fukuto, 1990 ; Main, 1969) qui inhibe la dégradation du neurotransmetteur acétylcholine à en acétate et choline. L'accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques entraîne une paralysie (immobilisation) et éventuellement à la mort (Zinkl et al., 1991 ; Saglio et al., 1996).

Pour un toxique ayant un site cible spécifique, par exemple AChE, le temps l'évolution de l'activité enzymatique est étroitement liée aux effets au niveau de l'organisme, par exemple l'immobilisation. Il est connu que les carbamates se lient de manière réversible à la cible enzyme AChE. Cela les rend moins toxique que les organophosphorés qui se lient de manière irréversible (Fukuto, 1990).

L'activité acétylcholinestérase met en évidence l'effet perturbateur d'un toxique sur une activité enzymatique. Cependant ce n'est pas le cas pour les biomarqueurs du système de biotransformation, qui permettent la prise en charge de ce xénobiotique dans une voie de métabolisation (Lagadic et *al.*, 1997) souvent à la base de la détoxification. De ce fait, les acétylcholinestérases sont considérées comme étant des biomarqueurs en puissance de l'état des fonctions neurologiques (Grue et *al.*, 1997).

Pour une évaluation précise de la toxicité, en particulier dans des conditions d'exposition réalistes sur le plan environnemental, il est important de comprendre la dépendance temporelle des effets toxiques sur l'échelle de l'organisme et sur le l'échelle moléculaire.

5. ESPECE BIO-INDICATRICE ETUDIEE

Les méthodes d'analyses physico-chimiques, ne prennent généralement pas en compte la notion de spéciation ou de biodisponibilité des polluants. Il est donc apparu nécessaire de compléter ces mesures par «bio-monitoring» permettant d'évaluer l'effet potentiel global des substances présentes dans le milieu vivant (Ladhar et *al.*, 2009).

Certaines espèces sont très sensibles aux variations des conditions environnementales, qu'elles soient d'origine biotique ou abiotique et y répondent proportionnellement par des changements mesurables à différents niveaux d'intégration (spatial, morphologique, physiologique, cellulaire, ou bien encore moléculaire). Tous ces changements peuvent, s'ils sont bien utilisés, constituer des bio-indicateurs, outils précoces et sensible à une large gamme de polluants, pour détecter une dégradation comme une restauration du milieu (Wu et *al.*, 2005 ; Figueira et *al.*, 2009).

Les cladocères, et spécialement les daphnéidées, ont été largement utilisés dans la toxicologie aquatique. L'espèce choisie *Daphnia magna*, recommandée en tant qu'espèce modèle dans différents bio-essais standardisés pour l'évaluation des risques chimiques. Cette espèce est choisie pour des essais rapides en toxicologie moderne pour diverses raisons : une manipulation ainsi qu'un élevage facile au laboratoire du fait de sa taille relativement petite ; un court cycle de vie ce qui permet de suivre l'effet des polluants sur plusieurs générations ; un mode de reproduction asexuée (population génétiquement stable)

et une fécondité élevée (pontes abondantes) et enfin une sensibilité à une large gamme de produits chimiques (Adema, 1978; Slooff et *al.*, 1983 ; Kimerle, 1985 ; Persoone et Janssen, 1993).

Aussi, son immobilisation constitue une réponse facile à observer sachant que l'inhibition de la mobilité précède la mort dans la majorité des cas (Chèvre, 2000 ; Santiago et *al.*, 2002 ; Cauzzi, 2007 ; Boillot, 2008 ; Manar, 2008 ; Zeman, 2008 ; Massarin, 2010 ; Toumi, 2013).

En plus, sa large distribution et son rôle dans la chaîne trophique lui confère un grand intérêt écologique pour les milieux dulçaquicoles (Haney et Buchanan, 1987). En comparaison avec les autres zooplanctons, les daphnies peuvent atteindre des taux de filtration élevés (Muck et Lampert, 1984; Reynolds , 1984) et peuvent réaliser une filtration totale du milieu si les conditions sont favorables (Thompson et *al.*, 1982; Köthe et Benndorf, 1994).

Toutes ces raisons ont encouragé l'adoption de cette espèce pour la normalisation au niveau international dans les essais de toxicité à court et à long terme. Ces tests incluent des tests aigus qui se déroulent sur 24 h ou 48 h et des tests chroniques qui se déroulent sur 14 ou 21 jours (OECD, 1998 ; US EPA, 2001 ; ISO, 1996 ; ASTM, 2001).

Son utilisation a largement augmenté dans les tests réglementaires pour l'évaluation des risques des substances nouvellement mises sur le marché (Liu et *al.*, 2006). Plusieurs travaux ont utilisé cette espèce dans l'évaluation de l'impact des polluants (effluents domestiques, rejets industriels, stations d'épuration...) sur l'environnement.

5.1. Description de *Daphnia magna*

Daphnia magna Straus, connu également sous le nom de "puces d'eau" est un microcrustacé de l'ordre des cladocères fréquemment rencontré dans les eaux douces des climats tempérés. Largement répandu dans l'hémisphère nord, cet organisme est susceptible de coloniser une variété importante de types d'eaux douces : mares (temporaires ou non), étangs, lacs, canaux, cours d'eau à faibles débits et bassins riches en matière organique et peu oxygénés (Santiago et *al.*, 2002 ; Cauzzi, 2007 ; Boillot, 2008).

Herbivore ou décomposeur, ce cladocère assure une fonction importante dans les transferts de matière et d'énergie des écosystèmes aquatiques. Ils prennent part à l'alimentation des poissons planctonophages ou omnivores, mais également à celle des alevins et invertébrés aquatiques (Santiago *et al.*, 2002).

A. Morphologie

La taille de la daphnie adulte varie entre 3 et 5 mm et est subdivisée en deux parties :

- ✓ **Tête** : Comporte un œil composé l'organe sensitif des daphnies, il est composé de 22 lentilles et 4 muscles qui tiennent l'œil en position et le garde continuellement en mouvement de rotation partielle, et dont le rôle est d'aider l'animal à s'orienter au cours de la nage, une bouche, deux antennes qui aident à sa locomotion saccadée et deux antennules qui, chez le mâle, servent de crochets généralement lors de l'accouplement (Amoros, 1984).
- ✓ **Corps** : Recouvert par une carapace transparente qui se renouvelle à chaque mue marquée par un doublement du volume de l'organisme pendant une minute dû essentiellement à une brusque entrée d'eau dans l'animal. Il est composé de quelques segments thoraciques avec 4 ou 6 paires de pattes et d'un abdomen entouré d'une carapace et terminé par deux crochets (Green, 1956).

La couverture externe de *Daphnia*, appelée cuticule, est rigide et mue à chaque fois que la taille de l'animal augmente laissant place à une nouvelle peau sous l'ancienne. L'intervalle entre deux mues est appelé « Instar » (Lawrence, 1982). La carapace transparente est sur le dos et représente simplement un pli de base du cou qui s'étend sur le reste du corps. Chez les femelles l'espace dorsale entre la carapace et le corps et la poche incubatrice où à l'intérieur de laquelle reposent les œufs et les petits avant naissance (Manar, 2008).

Les membres thoraciques battent en avant et en arrière dans la carapace et créent un courant qui balaye des petites particules d'eau dans l'espace entre les membres dotés de poils très fins assure la filtration du plancton (Massarin, 2010). Les pattes, sont localisées sur les bords externes des membres thoraciques qui peuvent aussi être utilisé par leur production de courant pour la respiration ; elles ont des parois lisses et fines et qui servent de réservoir d'oxygène. Elles sont foliacées (pour la plupart des espèces) et munies

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

d'appareils branchiaux et de système de filtration qui permet d'isoler les algues et les amener à la bouche (Beaumont et Cassier, 2004)

Le système digestif est assez simple, avec un tube digestif et deux diverticules, il est composé de trois parties : l'œsophage, une partie médiane et une partie terminale de l'intestin. Il débute ventralement par la bouche et se termine, dans le poste-abdomen, par un rectum qui précède l'anus (Ebert, 2005).

Le système nerveux est caractérisé par un ganglion cérébral, qui est situé près du système digestif et de l'œil (Amoros, 1984).

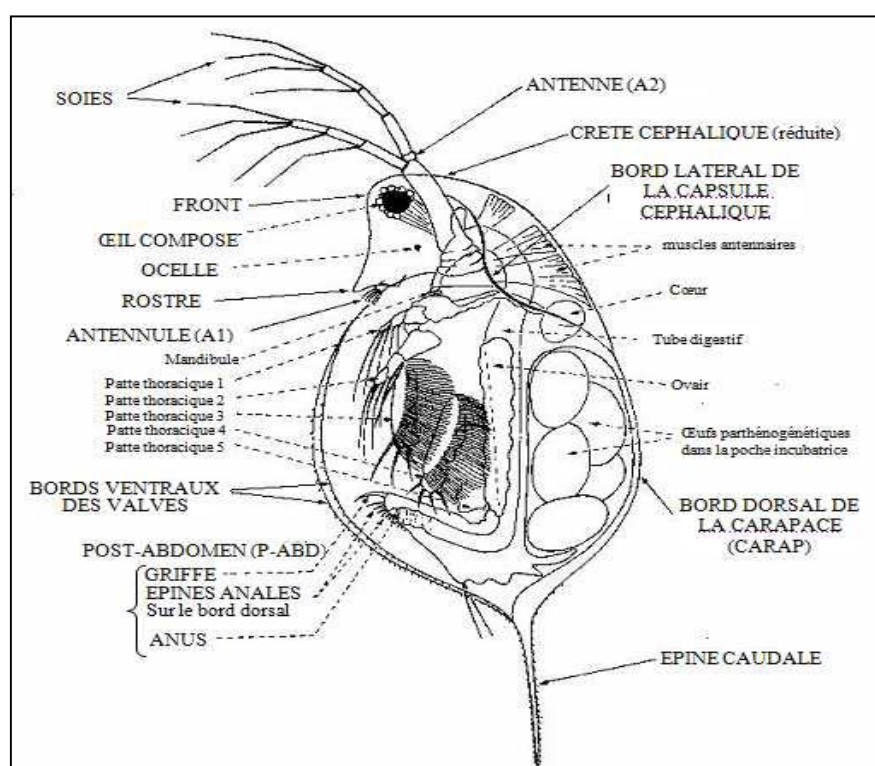


Figure 12. Anatomie de *Daphnia magna* femelle adulte vue latérale (Amoros, 1984)

Les ovaires sont disposés de chaque côté du tube digestif. La partie dorsale constitue une chambre de maturation où sont déposés les œufs lors de chaque ponte où se transforment en juvéniles qui sont ensuite relâchés dans le milieu extérieur (Ebert, 2005). Il existe un dimorphisme sexuel très net chez les daphnies. En effet, les mâles se distinguent des femelles par : la forme de la tête, une taille plus petite, la présence d'antennules plus développées, la partie antérieure du post-abdomen (située avant la griffe post-abdominale) plus proéminente ainsi que l'absence de poche incubatrice (Toumi, 2013).

Le cœur de *Daphnia* situe au niveau dorsal et il est antérieur à la chambre de ponte, c'est un petit sac avec deux trous à travers lequel le sang entre et une sortie principale vers le haut. Il n'y a pas de vaisseaux sanguins, aussi le sang circule librement entre différents organes (Ebert, 2005).

Le sang est un liquide clair dans lequel circule un seul type de cellule dont la fonction est similaire à celle de nos globules blancs. Un pigment respiratoire rouge, l'hémoglobine est dissoute dans le sang de *Daphnia*, ce dernier est aussi identique à la nôtre. L'hémoglobine absorbe une grande quantité d'oxygène qui peut être prise par les tissus et utilisée pour la respiration. Le fer constitue également une partie essentielle de l'hémoglobine (Green, 1956 ; Fox, 1957).

B. Nutrition

Daphnia magna se nourrit en filtrant de petite particules en suspension dans la colonne d'eau qui est constituée de particules d'algues planctoniques, généralement vertes. L'acheminement des particules vers l'organisme est assuré par les pattes thoraciques (phyllopoodes) (Ebert, 2005).

La nourriture est collectée plus particulièrement à l'aide des 3èmes et 4èmes pattes thoraciques foliacées garnies d'un peigne de longues soies (Amoros, 1984). Les particules ainsi piégées sont transférées via un sillon alimentaire jusqu'à la bouche (Toumi, 2013). De petits diverticules sont présents dans la partie médiane du tube digestif. Cette même partie est composée d'un épithélium et de microvillosités permettant l'absorption des particules. Les fèces sont excrétées par la partie terminale du tube digestif grâce à des mouvements péristaltiques (Ebert, 2005).

La digestion est rapide et la nourriture reste dans le boyau seulement une demi-heure à une température de 18°C à 20°C. Toutefois, il est important de signaler que la quantité et la qualité de la nourriture joue un rôle primordial pour la reproduction et influence nettement la dynamique de population de la daphnie (Lynch et Ennis, 1983; Cowgill et al., 1985). La qualité et la quantité de la nourriture semblent aussi influencer la sensibilité des daphnies aux toxiques (Winner et al., 1977; Enserink et al., 1995).

C. Cycle de vie

Selon les conditions environnementales, le cycle de vie de la daphnie suit un des deux modes de reproduction : l'un asexuée et l'autre sexuée (figure 13).

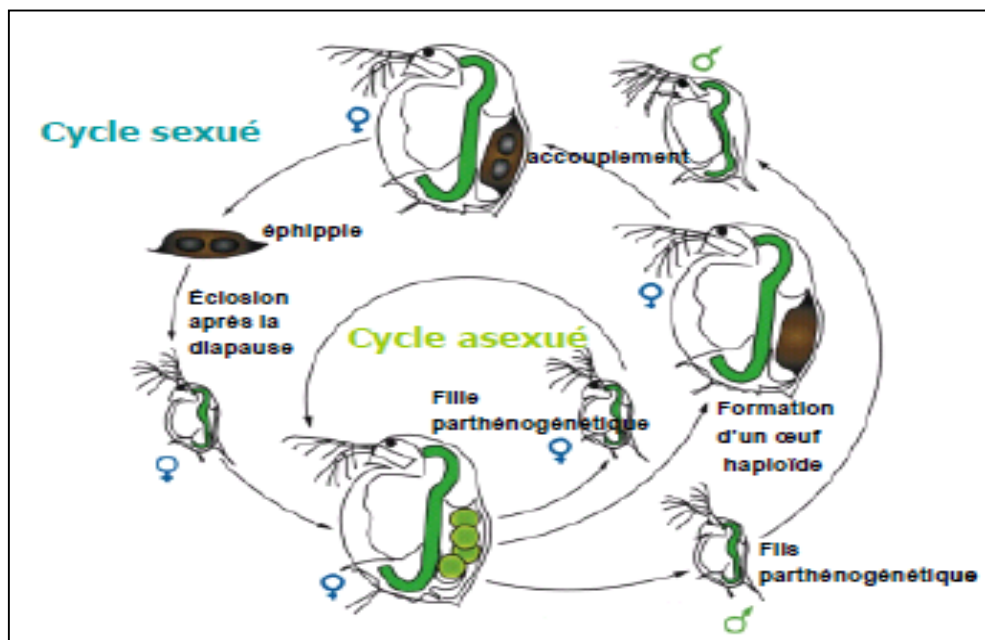


Figure 13. Schéma du cycle de vie de la daphnie (Ebert, 2005)

✓ Cycle de vie asexué

Lors des périodes de reproduction asexuée, les femelles existent seules et engendrent à partir d'ovules (non fécondés) d'autres daphnies filles génétiquement identiques à leur mère. La femelle produit une ponte après chaque mue et les œufs sont déposés dans sa poche incubatrice (Ebert, 2005). Les générations parthénogénétiques, sans apparition de mâles, se succèdent tant que les conditions du milieu restent favorables.

Les daphnies deviennent matures, c'est-à-dire ont leur 1^{ère} ponte, au bout de 6-7 jours. Les juvéniles de cette première ponte restent dans la poche incubatrice pendant 3 à 4 jours, le temps de leur développement. Les juvéniles issus de la 1^{ère} ponte sont donc libérés lorsque la daphnie est âgée de 9 à 10 jours.

Au plus tard une heure après cette libération, la daphnie mue et dépose une nouvelle ponte dans sa poche incubatrice. Une fois la daphnie devenue mature, elle pond tous les 3 à 4 jours jusqu'à sa mort (50-70 jours) (Chèvre, 2000).

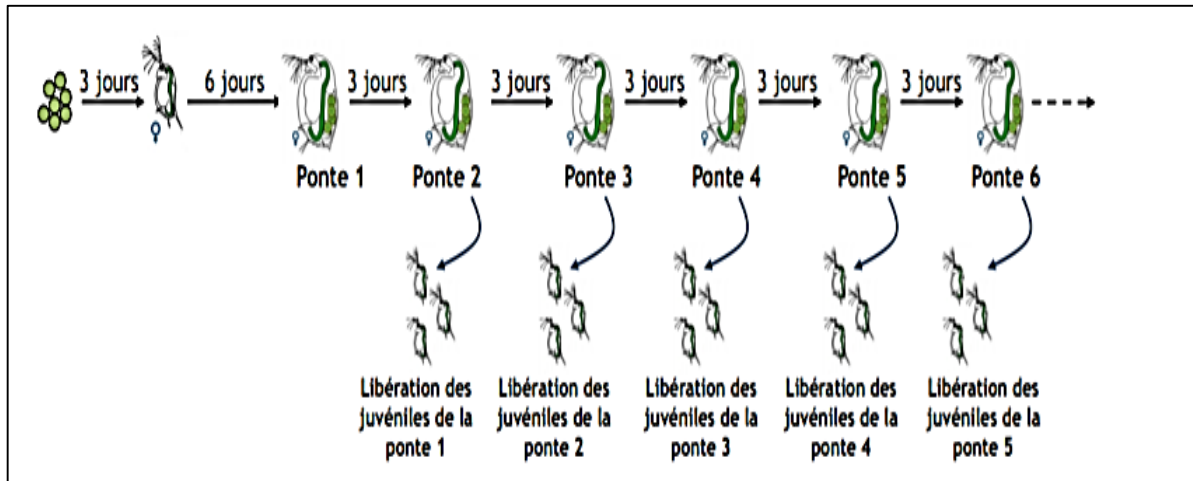


Figure 14. Reproduction des daphnies par parthénogénèse (Plaire, 2013)

✓ **Cycle de vie sexué**

La reproduction sexuée se met en place lorsque les conditions deviennent défavorables (manque de nourriture, pollution chimique, densité excessive, assèchement du volume d'eau, désoxygénation sévère, abaissement de la température, etc....) (Toumi, 2013).

Lors de ces périodes, les populations donnent naissance à une génération composée de mâles (diploïdes) et de femelles dont l'accouplement aboutit à la production d'œufs de résistance, qui éclosent lors du retour des conditions favorables de l'environnement (Chèvre, 2000).

Les mâles sont nécessaires à la fertilisation de ces œufs de résistance (haploïdes). Les femelles produisent deux œufs à la fois (un pour chaque ovule), encapsulés dans une structure protectrice nommée *éhippium*. Cette carapace modifiée permet aux éhippies (œufs de résistance) d'être résistants au froid ainsi qu'à la dessiccation (Innes, 1997; Ebert, 2005).

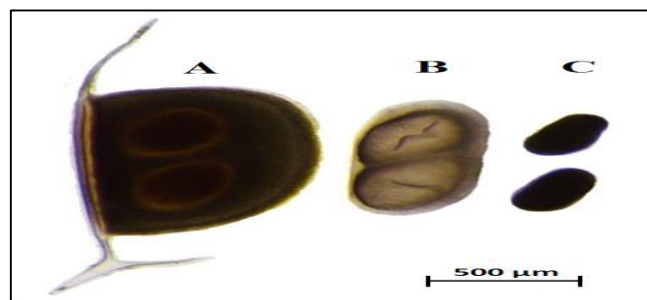


Figure 15. Photographie d'une éhippie (A), la membrane de l'œuf intérieure (B) et les œufs dormants (C) apparaissent (Cambronero, 2018)

D. Développement

Quatre périodes distinctes peuvent être reconnues dans l'histoire de la vie de *Daphnia magna* : œuf, juvénile, adolescence et adulte. La durée de vie moyenne de *D. magna* est approximativement 40 jours à 25°C, et 56 jours à 20°C (Pennak, 1989).

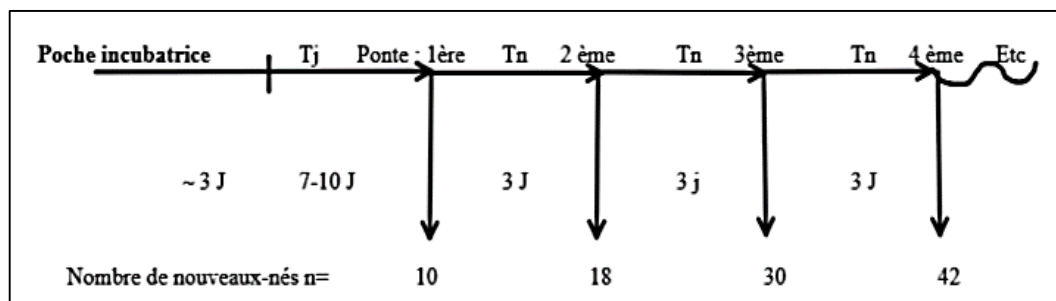


Figure 16. Diverses phases de la durée de vie d'une daphnie. (Tj) période juvénile ; (Tn) la période inter-mue (Soares, 1989)

La croissance des jeunes est rapide. La maturité sexuelle est atteinte après environ 7 jours. La longévité est d'environ 35 jours durant lesquels s'opèrent de 20 à 30 mues successives. La température optimale pour la croissance et la reproduction est d'environ 20 °C (Unestam, 1973).

Les étapes du développement d'un embryon normal chez les daphnies sont divisées en 6 stades distincts (Kast-Hutcheson et *al.*, 2001). Le terme néonates est un anglicisme faisant référence aux daphnies nouvellement écloses expulsées de la poche incubatrice de leur mère.

- ✓ **Stade 1** : clivage, l'embryon est parfaitement sphérique, pas de différenciation cellulaire, ce stade se déroule entre 0 et 15 heures.
- ✓ **Stade 2** : gastrulation, début de la différenciation cellulaire, présence du blastopore et l'embryon devient asymétrique, ce stade se déroule entre 15 et 25 heures.
- ✓ **Stade 3** : maturation embryonnaire précoce, la tête et l'antenne secondaire sont différenciés, ce stade se déroule entre 25 et 35 heures.
- ✓ **Stade 4** : maturation embryonnaire moyenne, présence de l'œil pigmenté et développement des antennes qui restent collés à la seconde membrane embryonnaire, ce stade se déroule entre 35 et 45 heures.

- ✓ **Stade 5** : maturation embryonnaire tardive, rupture de la seconde membrane embryonnaire, extension partielle de l'antenne secondaire et l'épine est pliée sous la carapace, ce stade se déroule entre 45 et 50 heures.
- ✓ **Stade 6** : développement complet du nouveau-né et se déroule de 50 à 72h, développement des antennules et l'épine est bien décollée de la carapace. L'organisme commence à nager (Kast-Hutcheson et *al.*, 2001).

5.2. Utilisation des daphnies dans les tests de toxicité

Malgré la diversité des espèces disponibles (*Daphnia sp.*, *Gammarus*, *Brachionus*, *Ceriodaphnia*), le développement des bioessais normalisés, par les instances internationales dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique, s'est basé préférentiellement sur le cladocère : *Daphnia magna*. L'usage de cette espèce a été recommandé aussi bien pour les tests aigus que pour les tests chroniques (Grandy, 1995).

A. Etude des effets au niveau de l'individu

On peut distinguer les études réalisées sur les œufs, les juvéniles et celles sur les daphnies adultes. Les tests classiques réalisés sur les juvéniles visent à évaluer les effets aigus d'une substance. Ces tests sont normalisés (ASTM, 2004 ; ISO 1996).

Ils consistent à déterminer la concentration de l'échantillon qui cause 50% de mortalité après 24h et 48h d'exposition (CE50 : concentration conduisant à 50% d'effet) dans un système statique et dans des conditions contrôlées. Ces tests sont très couramment utilisés dans une première approche pour évaluer les effets aigus de substances sur les écosystèmes aquatiques car ils présentent de nombreux avantages : ils sont relativement faciles à mettre en œuvre et permettent dans des temps très courts (24 ou 48h) de tester un très grand nombre de conditions.

Effets sur la croissance et la reproduction pour évaluer la toxicité chronique d'une substance, des tests sont classiquement réalisés sur les 21 premiers jours de la vie de daphnies. Comme pour les tests aigus, ces tests sont normalisés (OCDE, 1998). Différents paramètres peuvent être étudiés comme la mortalité, la fécondité ou la croissance, plus particulièrement, le nombre de juvéniles produits par daphnie en 21 jours est le critère d'effet couramment utilisé pour évaluer les effets chroniques.

B. Étude des effets au niveau énergétique

Chez tous les organismes vivants, l'ensemble des processus biochimiques et physiologiques est étroitement lié au métabolisme énergétique. Chez les animaux, l'énergie qu'ils acquièrent vient de la nourriture qui est ingérée puis assimilée. Cette énergie acquise par les organismes est allouée à différentes fonctions biologiques telles que la maintenance, le stockage de réserves, la reproduction et la croissance somatique (Baillieul et *al.*, 2005, Glazier et Calow, 1991 ; Knops et *al.*, 2001). Ces différents processus peuvent donc être reliés au sein de modèles énergétiques (figure 17).

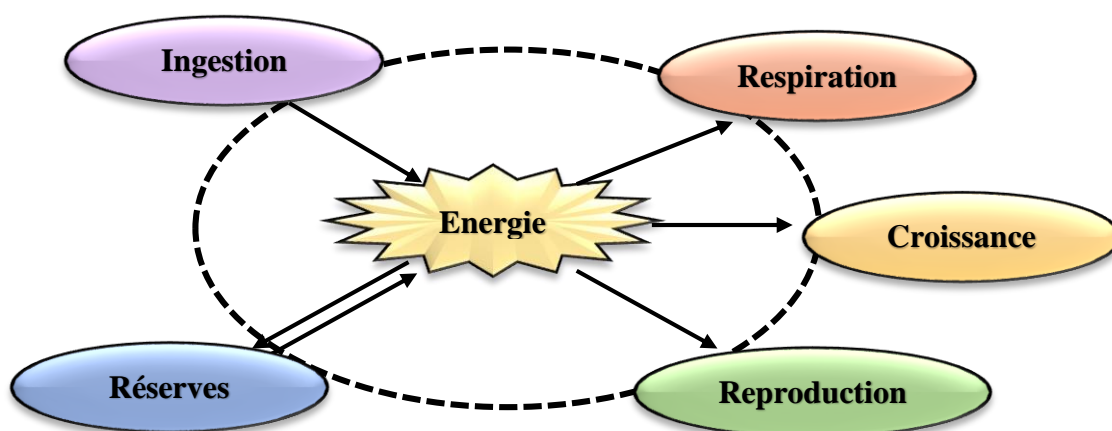


Figure 17. Modèle énergétique au niveau individuel (Zeman, 2008)

Chez les animaux, les principales formes de stockage de l'énergie sont représentées par le glycogène et les lipides. Lorsque les besoins sont importants, par exemple en période de reproduction ou à la suite d'un stress, ces réserves énergétiques peuvent être mobilisées (Thompson et Couture, 1991 et 1993).

Lors d'un stress, une mobilisation des réserves pour alimenter des mécanismes de compensation ou de défense peut entraîner une réduction des réserves d'un organisme (Mayer et *al.*, 2002). Les mesures de réserves énergétiques peuvent alors être utilisées pour évaluer l'effet d'un stress.

Généralement l'assimilation par individu et la consommation d'oxygène liée au métabolisme de base par individu changent en fonction de la taille des organismes. En accord avec l'hypothèse du coût métabolique, la croissance est affectée par un stress environnemental, les animaux stressés sont donc généralement plus petits (Kooijman, 2001).

C. Étude des effets au niveau de la population

L'histoire de vie des organismes peut être décrite par différents traits de vie comme la longévité, l'âge à la maturité sexuelle et la fécondité. Ces mesures au niveau de l'individu peuvent être intégrées dans des modèles de dynamique de population, comme par exemple dans des matrices de Leslie, afin d'évaluer les effets au niveau de la population.

Depuis fort longtemps, de nombreux savants s'intéressent à la dynamique de populations que ce soit l'intérêt écologique, économique ou encore épidémiologique.

La plupart des modèles mathématiques servant à décrire l'évolution temporelle du nombre d'habitants (humains ou animaux). La dynamique de population traite de la variation dans l'espace et le temps de la taille et de la densité de la population d'une ou plusieurs espèces. Ils sont généralement continus, en ce sens que la variable temporelle peut y prendre n'importe quelle valeur d'un intervalle de la droite numérique réelle, ils font alors appel à des équations différentielles. Mais, ils ne sont pas toujours fiables, notamment parce qu'ils négligent les durées de gestation et ne distinguent pas les taux de fécondité selon les âges (Bourlière, 1949 ; Turchin, 2003 ; Juliano, 2007; Bacaër, 2008; Rechenmann, 2010 ; Cailly, 2011 ; Bair, 2012).

Une altération des traits de vie des organismes peut donc avoir des effets rapides et directs sur la population comme une diminution de l'effectif, de la biomasse ou une altération de la structure de la population (Caswell, 2001; Durou et *al.*, 2008).

En 1945, Leslie publie, dans la réputée revue *Biometrika*, un article intitulé (*On the use of matrices in certain population mathematics*) ; il y développe un modèle pour décrire l'évolution temporelle du nombre de femelles dans des populations de souris et de rats. Il existe divers modèles de dynamique de population plus ou moins complexes. Le modèle de Leslie présente l'avantage d'être simple et facile à mettre en œuvre. Ce modèle est un modèle de dynamique de population structurée en classes d'âge qui permet de suivre l'évolution de l'effectif d'une population au cours du temps (Zeman, 2008).

Grâce à ce modèle assez simple, il est possible de mettre en évidence les effets mesurés d'une substance sur des paramètres à l'échelle de l'individu (fécondité, survie ...) qui ont le plus d'impact sur la dynamique des populations (Stark et *al.*, 2004).



PARTIE II

MATERIEL
&
METHODES



PARTIE II : MATERIEL & METHODES

Au niveau individuel, les effets toxiques des contaminants sur les processus physiologiques des invertébrés peuvent apparaître par une altération de plusieurs fonctions vitales et leurs spectre peuvent atteindre les performances individuelles impliquées dans la dynamique des populations (taux de ponte, taux de mortalité, âge de première reproduction) (Forbes et Forbes, 1994). Ces effets sont les conséquences de changements métaboliques, cellulaires, tissulaires et aussi de modifications comportementales. Les effets éco-physiologiques et les modifications comportementales peuvent se répercuter aux niveaux d'organisation supérieurs et être en partie responsables des perturbations populationnelle, communautaire et écosystémique.

Les études expérimentales menées tout au long de notre travail ont été réalisées au sein du *Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC)* –Université Badji Mokhtar -Annaba-

1. MATERIEL CHIMIQUE

En raison de leur large spectre d'utilisation dans les zones humides et spécialement en Algérie, notre choix s'est porté sur deux fongicides «Thirame» et «Bouillie bordelaise».

1.1 Thirame

Il s'agit d'un fongicide à contact basique appartenant à la famille des dithiocarbamates avec action protectrice appliqué aux feuillages pour contrôler plusieurs pathogènes : le *Botrytis spp.* sur les raisins, les fruits mous, les salades, les légumes, la rouille sur les végétaux décoratifs ; la gale et maladies d'entreposage sur les pommes et les poires ; enrroulement des feuilles et *Monilia* sur les fruits à noyaux. Il aussi utilisé pour les traitements de semences seules ou en combinaison avec des insecticides ou fongicides pour contrôler les maladies de fonte des semis (ex : *Pythium spp.*), et d'autres maladies comme le *Fusarium spp.*, du maïs, du coton, des céréales et des légumes. Par ailleurs, il peut être utilisé comme répulsif pour les oiseaux (Lhoste, 1960).

Une gamme de concentrations a été testée, comme des essais préliminaires, afin de cerner les concentrations inhibitrices de la mobilité comprises entre 0 et 100%, et une autre gamme afin de déterminer les concentrations affectant la croissance et la reproduction.

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

Les concentrations choisies dans les deux tests sont représentées dans le tableau (1) :

Tableau 1. Concentrations du Thirame (mg/L)

Test	Concentrations (mg/L)				
Test de toxicité aigüe (3 répliquas)	0	0,05	0,10	0,25	0,50
Test de toxicité chronique (10 répliquas)	0	0,004	0,008	0,016	0,032

1.2 Bouillie bordelaise

Il s'agit d'un fongicide protecteur à base de cuivre utilisé à l'origine pour protéger les vignes contre le mildiou ainsi que pour protéger le feuillage contre les maladies qui menacent la viticulture.

La Bouillie bordelaise est une suspension colloïdale résultant du mélange d'une solution de sulfate de cuivre, composé inorganique qui combine le soufre et le cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), avec une suspension de chaux hydratée ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) formant ainsi le sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) qui est le plus largement utilisé. En réalité, il ne tue pas les champignons mais il empêche la germination de leurs spores, responsables de maladies (Leduc, 1925).

Une gamme de concentrations a été testée, comme des essais préliminaires, afin de cerner les concentrations inhibitrices de la mobilité comprises entre 0 et 100%, et une autre gamme afin de déterminer les concentrations affectant la croissance et la reproduction.

Les concentrations choisies dans les deux tests sont représentées dans le tableau (2) :

Tableau 2. Concentrations de la Bouillie bordelaise (mg/L)

Test	Concentrations (mg/L)				
Test de toxicité aigüe (3 répliquas)	0	0,05	0,10	0,20	0,40
Test de toxicité chronique (10 répliquas)	0	0,004	0,008	0,016	0,032

2. MATERIEL BIOLOGIQUE

Daphnia magna est un micro-crustacé d'eau douce, recommandé en tant qu'espèce modèle dans différents bio-essais standardisés pour l'évaluation de risques chimiques (OCDE, 1998).

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

Ce modèle biologique a été choisi en raison de la facilité de la manipulation et de l'élevage qui sont dus à sa taille relativement petite, son cycle de vie court, sa fécondité élevée et son mode de reproduction par parthénogenèse (Koivisto, 1995). La daphnie obéie à la classification taxonomique suivante :

Tableau 3. Classification de *Daphnia magna* (Balvay, 2009)

Règne	Animalia	Linnaeus, 1758
Phylum	Arthropoda	Latreille, 1829
Classe	Branchiopoda	Latreille, 1817
Sous-Classe	Phyllopoda	Preuss, 1951
Super-Ordre	Cladocera	Latreille, 1829
Ordre	Anomopoda	Sars, 1865
Famille	Daphniidae	Straus, 1820
Genre	Daphnia	O.F. Müller, 1785
Espèce	<i>Daphnia magna</i>	Straus, 1820

3. CONDUITE DE L'ESSAI

3.1 Aperçu sur la zone de prélèvement

Les daphnies sont collectées suivant un protocole bien précis et en utilisant un matériel approprié. Notre zone de prélèvement est située à *Sidi Salem*, à quelques kilomètres près du golf d'Annaba, et à 4 km à l'est du chef-lieu de la wilaya qui est située au Nord-est du pays. Elle est limitée par le Nord : mer Méditerranée, l'Est : wilaya d'El-Tarf, l'Ouest : wilaya de Skikda et au Sud : wilaya de Guelma.

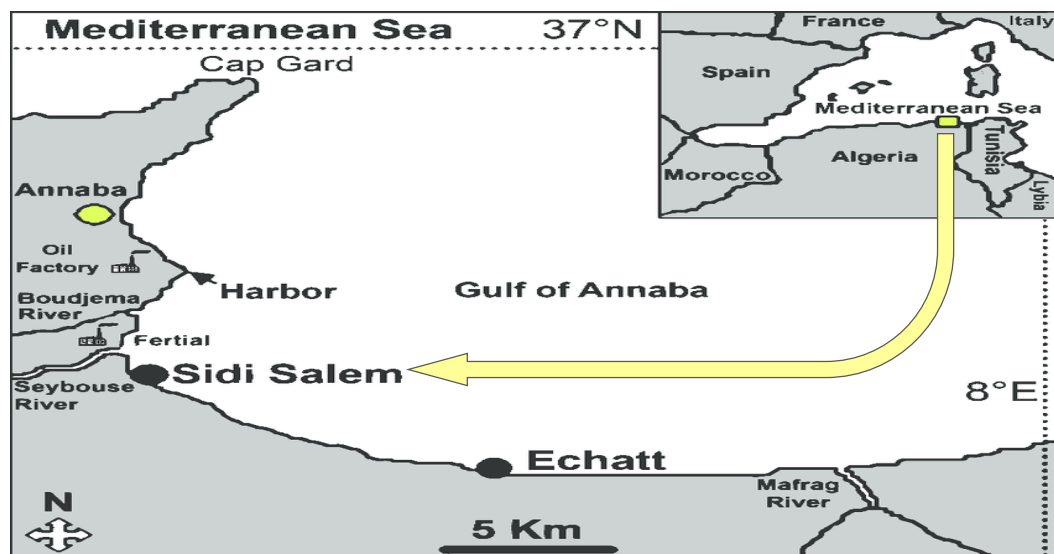


Figure 18. Zone de prélèvement (Hafsaoui et al., 2016)

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

Le point de prélèvement est un étang d'eau douce. La plage *Sidi Salem* se trouve à mi-distance. Elle est caractérisée par l'embouchure de l'Oued Seybouse et l'existence de cône évacuant les déchets du complexe ASMIDAL spécialisé dans la fabrication d'engrais et de produits phytosanitaires.

3.2 Conditions de culture des daphnies

Les daphnies sont transportées au niveau du laboratoire ; maintenues dans un aquarium en verre de 16 litres contenant de l'eau déchlorée (dureté totale 250 ± 25 mg/L; $\text{pH} = 7,9 \pm 0,2$) renouvelée deux fois par semaine à une température et une photopériode contrôlée (20 ± 2 °C ; 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) (Ferrando et *al.*, 1995).

Les daphnies sont nourries quotidiennement avec une mixture d'algues (*Chlorella vulgaris*) et de levure (*Saccharomyces cerevesiae*), une reproduction asexuée ou parthénogénétique se déclenche et donne naissance à des juvéniles qui sont l'objet des tests, l'appareil d'aération assure l'oxygénation du milieu.

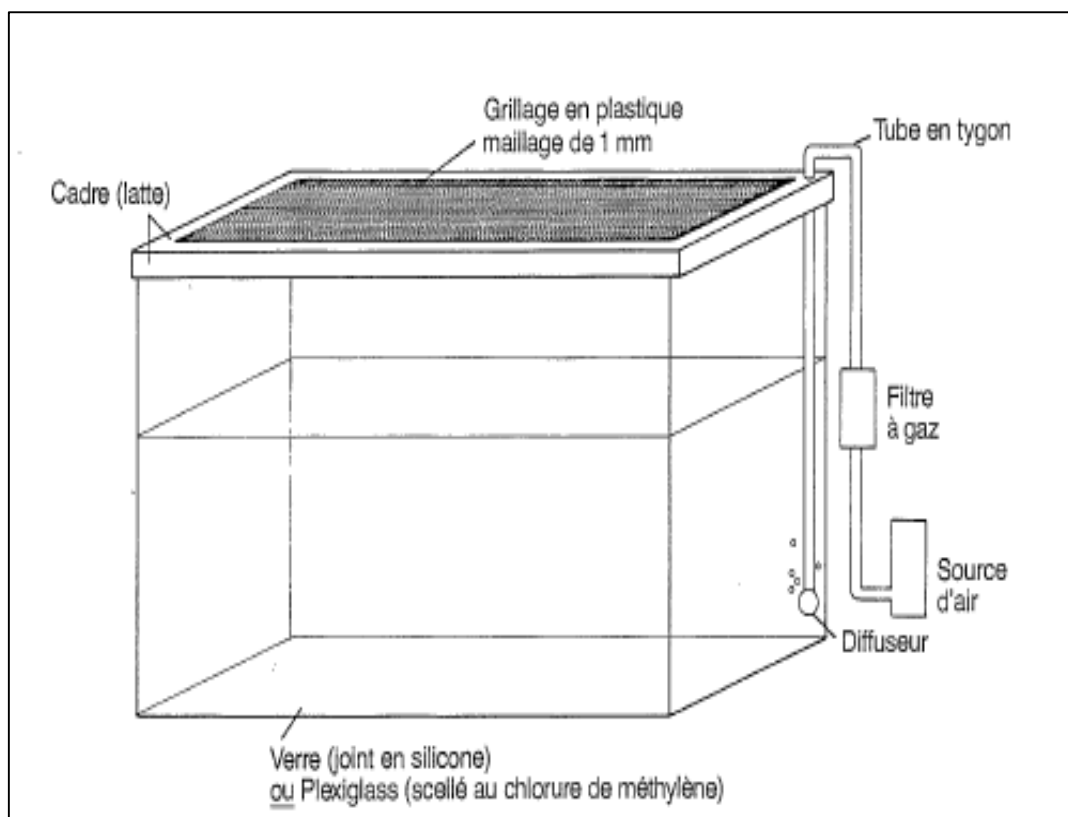


Figure 19. Aquarium et équipement pour l'élevage des daphnies (Lawrence, 1982)

4. EXPERIMENTATION

4.1 Paramètres écotoxicologiques

A. Test de toxicité aigüe

Il s'agit d'un test à court terme après administration d'une dose unique de xénobiotique afin de déterminer la concentration qui provoque l'immobilité des jeunes daphnies au bout de 24h et 48h d'exposition selon la norme internationale ISO 6341 (1996).

Pour ce faire, cinq jeunes daphnies de moins de 24h sont introduites dans un tube à essai à usage unique (30 ml) contenant 10 ml de milieu ISO.

Durant ce test, les jeunes daphnies ne sont pas nourries et sont placées à l'abri de la lumière. Le test est validé si, et seulement si, le pourcentage d'immobilisation dans les témoins est inférieur ou égal à 10%.

Après 24h et 48h d'exposition, les daphnies immobiles sont dénombrées visuellement. Pour chaque concentration du fongicide, le pourcentage d'immobilité est calculé.

Pour caractériser la toxicité, on détermine la concentration inhibitrice 50% (CI_{50}) qui, dans des conditions standard, inhibe 50% de l'accroissement d'une population.

Les taux d'immobilité sont corrigés par la formule d'Abbott (1925) ce qui permet de connaître la toxicité réelle du xénobiotique et sont transformés en Probits permettant ainsi d'établir une droite de régression en fonction des logarithmes décimaux des doses utilisées.

Depuis la courbe, on détermine toutes les doses remarquables (CI_{50}), selon les procédés mathématiques de Finney (1971).

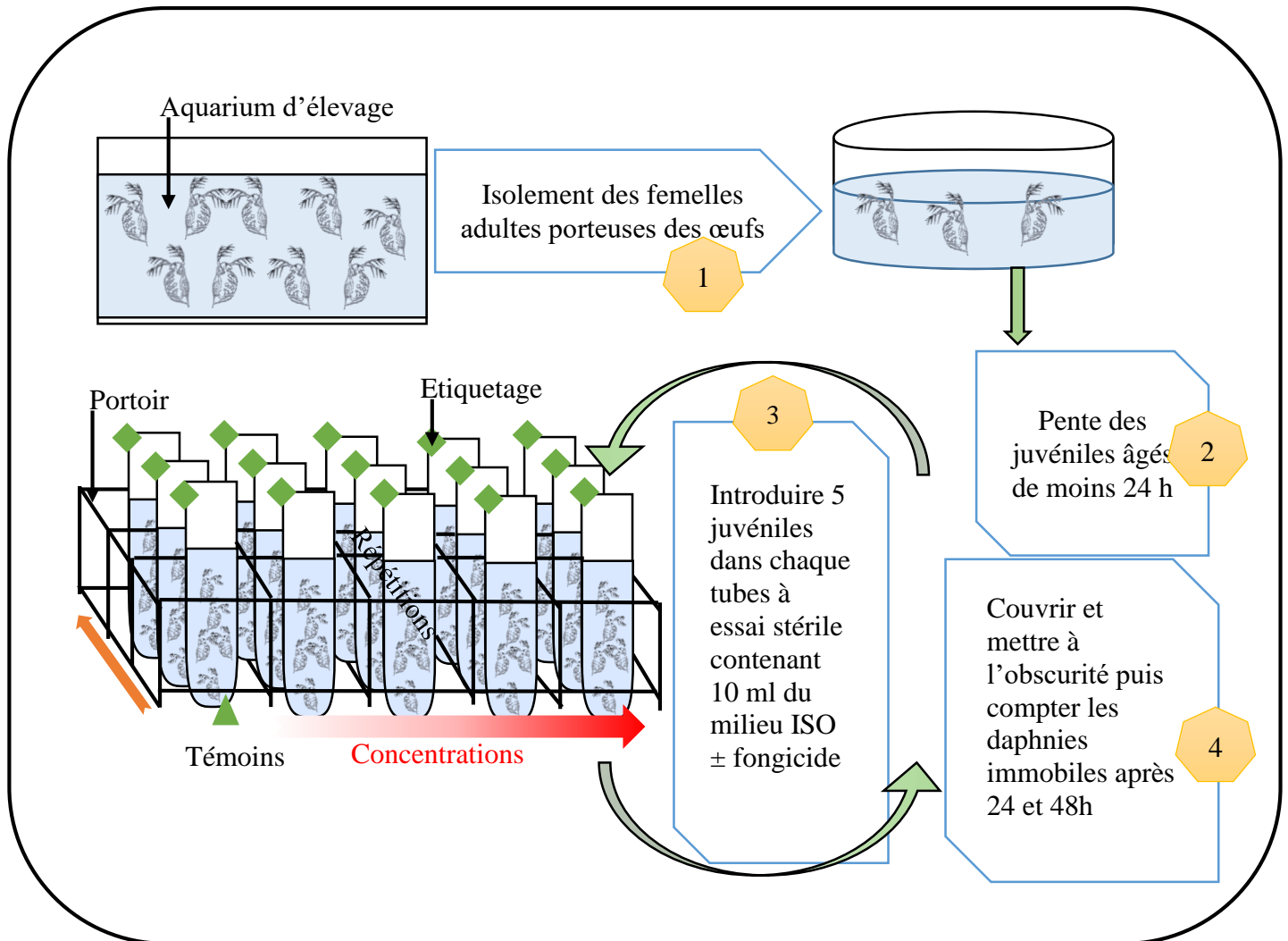


Figure 20. Protocole expérimental du test aiguë (après 24 et 48 h)

B. Test de toxicité chronique

La durée du test chronique est de 21 jours, soit environ 20 % de la durée de vie moyenne de la daphnie. Il inclut deux stades de vie important chez les animaux à savoir la phase juvénile et la phase de reproduction et ce dans les conditions définies et basées sur la Norme internationale ISO 10706 (2000).

Des jeunes femelles de *Daphnia magna*, âgées de moins de 24 h au début de l'essai, sont placées individuellement dans des béciers en verre de 60 ml contenant 40 ml de solution constituée de milieu de culture, de la nourriture et de la concentration désirée pour chaque fongicide.

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

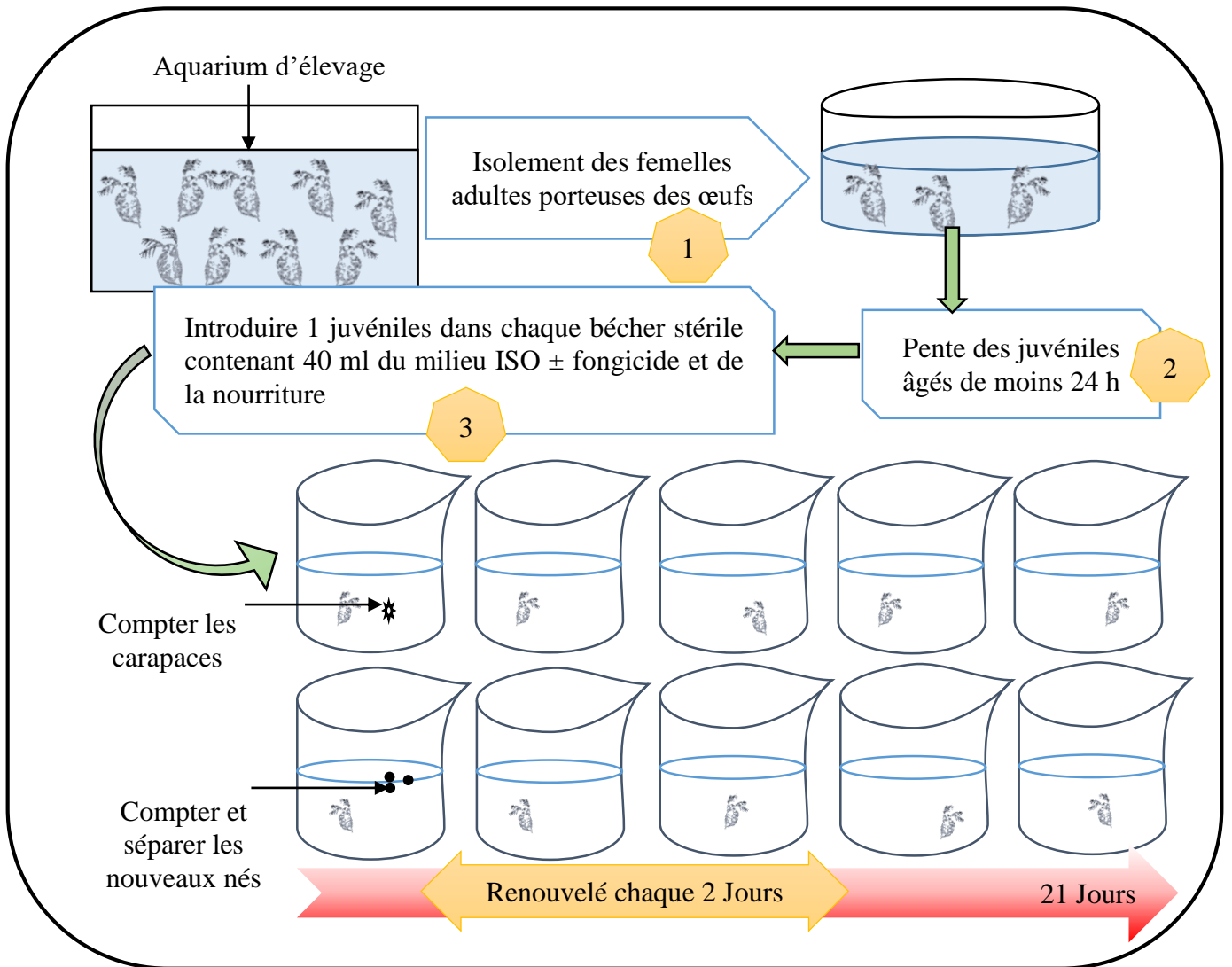


Figure 21. Protocole expérimental du test chronique (21 jours)

Les nouveau-nés des répliquas sont séparés des daphnies adultes et comptés chaque jour, on utilise 10 répliquas par concentration ainsi que pour le témoin, le milieu est renouvelé chaque deux jours pendant toute la durée du test. Les conditions d'incubation sont les mêmes que celle pour les cultures mères (Manar, 2008).

A partir de ce test nous pouvons calculer :

- La longévité (nombre de jours durant lesquels les daphnies adultes restent en vie)
- Le taux de survie des animaux parents (les daphnies mères vivantes après 21 j)
- Le nombre cumulé de mues par daphnie adulte
- Le jour de la première ponte (en moyenne)
- Le nombre cumulé de pontes par daphnie adulte
- Le nombre cumulé de nouveaux nés produit par daphnie adulte

4.2 Paramètres biochimiques

La surveillance de la qualité de l'environnement suit deux approches, chimique et biologique en utilisant des indicateurs qui peuvent jouer un dépistage précoce d'une contamination, il s'agit donc de chercher à caractériser les perturbations des organismes exposés aux pesticides par des outils biochimiques à travers le suivi de biomarqueurs. Certains biomarqueurs peuvent être à la fois des biomarqueurs d'exposition et d'effet, voire de susceptibilité (Timbrell *et al.*, 1994).

Dans cette partie, nous avons voulu mettre en évidence la capacité des individus à mobiliser des systèmes de défense en présence de toxiques : biotransformation, métabolisation ou détoxication enzymatique via le dosage de certains biomarqueurs à savoir : glutathion-S-transférase (GST) ; Catalase (CAT), glutathion (GSH) ainsi que le dosage du malonedialdehyde (MDA) en tant que conséquence d'une éventuelle peroxydation lipidique liée à la présence des fongicides. Parallèlement, déterminer les teneurs en macromolécules biochimiques (Protéines totales, lipides totaux et glucides totaux) afin de déceler une probable altération de ces derniers.

La préparation des échantillons pour le dosage est une phase importante. Dans des tubes à essai stériles et propres et remplis par 10 ml de milieu ISO pour les témoins et les différentes doses croissantes des fongicides étudiées où une vingtaine de daphnies adultes sont exposées pendant 24 heures aux différentes concentrations. Le dosage s'effectue après 24h de traitement des individus aux concentrations suivantes :

- Pour le Thirame (0,05-0,10-0,25-0,50 mg/L)
- Pour la Bouillie bordelaise (0,05-0,10-0,20-0,40 mg/L)

4.2.1 Dosage des métabolites

Suite à une exposition de 24h, le dosage des différents métabolites (protéines totales, glucides totales et lipides totales) a été réalisé selon le procédé de Shibko *et al.* (1966) sur des daphnies témoins et traitées transportées dans 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20 %. Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes de 100 µL et sont exprimés en µg/mg de matière fraîche analysée et ont été quantifiés grâce aux équations des droites de régression déterminées à partir des courbes de références.

A. Taux des protéines totales

La teneur en protéines totales a été quantifiée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de coomassie (G250) comme réactif et la solution (BSA 1mg/ml) Serum Albumin Bovin comme standard de référence pour une gamme d'étalonnage. La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm.

B. Taux des lipides totaux

Est effectué selon la méthode de Goldsworthy et *al.* (1972) utilisant la vanilline comme réactif et une solution mère de lipides comme standard. Les absorbances sont obtenues, après 30 mn d'obscurité, à une longueur d'onde de 530 nm.

C. Taux des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux est réalisé selon la méthode de Duchateau et Florkin (1959) qui utilise l'Anthrone comme réactif et une solution mère de glucose (1g/L) comme standard. La lecture des absorbances est réalisée à 620 nm.

4.2.2 Dosage des biomarqueurs

A. Taux de Glutathion (GSH)

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

$$GSH * = \frac{\Delta DO}{13,1} \times \frac{Vd}{Vh} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de prot}$$

* : micromoles de substrat hydrolysé par mg de protéines,

ΔDO : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat,

13.1 : coefficient d'extinction molaire du groupement thiol (-SH),

Vd : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1ml (0.2 ml d'ASS + 0.8 ml d'homogénat),

Vh : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0.8 ml,

Vt : volume total dans la cuve : 1.525 ml (0.5 ml de surnageant + 1 ml de Tris/EDTA + 0.025ml de DTNB),

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0.5 ml,

mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg.

B. 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 :

$$MDA * = \frac{DO \times Vt}{e \times Vs \times mg \text{ de prot}}$$

* micromoles par mg de protéines

DO : densité Optique

Vt : volume total de la cuve (1 ml)

e : coefficient d'extinction du TBA (156 mM /1cm)

Vs : volume du surnagent (0,5 ml)

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg

C. Mesure de l'activité Catalase (CAT)

La mesure de l'activité catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de Claiborne (1985). Son principe repose sur la variation de la densité optique consécutive à la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une longueur d'onde de 240 nm. Le dosage s'effectue en suivant la cinétique de la réaction suite à une lecture chaque 15 secondes pendant une minute à 240 nm dans des cuves UV en quartz au spectrophotomètre déclenchée par l'addition de l'eau oxygénée.

L'activité catalase de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante et exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines :

$$CAT * = \frac{\Delta DO}{0,004 \times l \times mg \text{ de prot}}$$

* : micromoles d' H_2O_2 consommées par minute et par mg de protéines

ΔDO : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat

0,004 : coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène à 240 nm ($0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l : longueur de la cuve utilisée (1 cm)

mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg

D. Mesure de l'activité Glutathion -S- transférase (GST)

Le dosage de la GST est réalisé selon la méthode de Habig et *al.* (1974) basée sur la mesure photométrique de la cinétique de conjugaison entre la GST et un substrat, le 1-chloro-2-4 dinitrobenzène (CDNB) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH).

La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5 min à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée à la place du surnageant et les résultats sont exprimées en µmol/min/mg de protéines. L'activité spécifique de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante :

$$GST * = \frac{\Delta DO \times Vt}{e \times Vs \times mg \text{ de prot}}$$

- * : micromoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines,
- ΔDO : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps
- e : coefficient d'extinction molaire du CDNB (9.6 mM⁻¹ cm⁻¹),
- Vh : volume de l'homogénat (200 µL),
- Vt : volume totale de la cuve (1 400 µL),
- mg de prot** : quantité de protéines exprimée en mg.

4.3 Etude polarographique

L'activité respiratoire des daphnies est mesurée grâce à une électrode à oxygène de type Hansentech selon la méthode de Djebbar et Djebbar (2000). Elle permet de mesurer la production ou la consommation de l'oxygène.

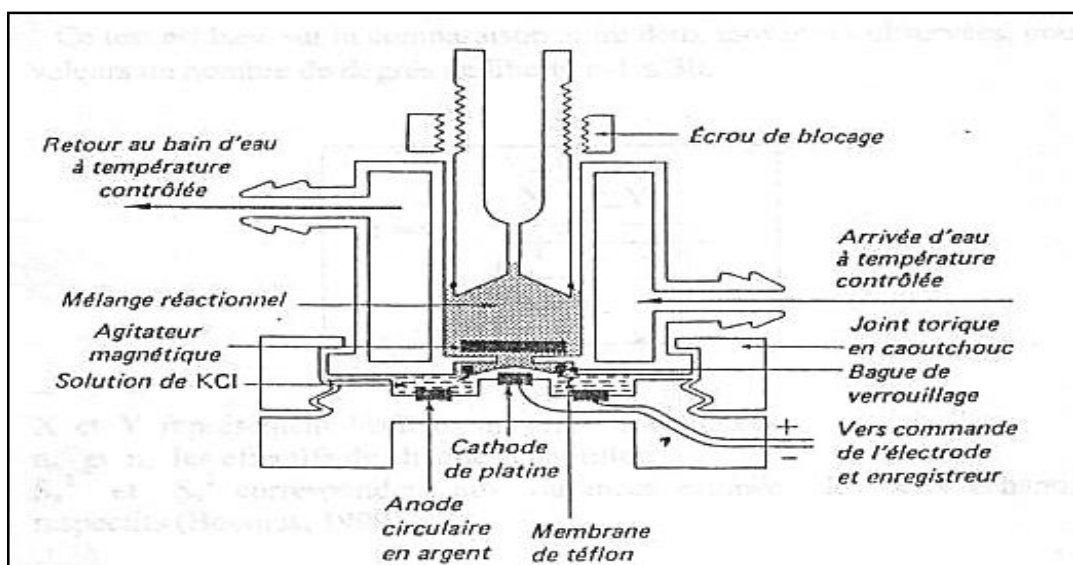


Figure 22. Schéma de l'électrode à oxygène (Djebbar et Djebbar, 2000)

Cet appareil est composé d'une jaquette thermostatée avec un volume total de 1,5ml du milieu contenant nos daphnies, et deux électrodes, une cathode (-) de platine et une anode (+) d'argent, reliées par un pont contenant du chlorure de potassium (KCl). Les deux jaquettes sont séparées par une membrane semi-perméable, permettant la diffusion de l'oxygène dissous du milieu de culture vers les électrodes. Le courant généré est proportionnel à la quantité d'oxygène dissous en fonction du temps. L'oxygraphe est relié à un micro-ordinateur qui permet de visualiser les différents spectres.

4.4 Neurotoxicité

De nombreuses études ont montré que plusieurs pesticides exercent une action neurotoxique (manifestations neurocomportementales, amnésiques...). L'effet de basses concentrations de pesticides chez des populations exposées chroniquement est plus difficile à appréhender, notamment en raison des difficultés à modéliser ce type d'exposition d'où l'intérêt de réaliser ces tests à court terme. Des études épidémiologiques ont néanmoins permis de retrouver fréquemment un lien potentiel entre l'exposition à certains pesticides et certaines maladies tel que la maladie de Parkinson, bien que de nombreuses données concernant par exemple la durée ou l'intensité de l'exposition restent imprécises (Baldi et al., 2013 ; Alavanja et al., 2004 ; Keifer et al., 2007 ; Costa et al., 2008).

Les pesticides neurotoxiques ont une action dite anticholinérasique, autrement dit les métabolites issus de la biotransformation des pesticides (cas des organophosphorés) entrent en compétition avec l'acétylcholine pour s'accrocher à l'enzyme Acétylcholinestérase pour donner une Acétylcholinestérase phosphorylée qui n'agit plus en provoquant ainsi l'accumulation de l'acétylcholine au niveau des synapses avec une hyperstimulation du système cholinergique (Thany et al., 2013).

L'activité acétylcholinestérase met en évidence l'effet perturbateur d'un toxique sur le système nerveux et de ce fait, elle est considérée comme étant un biomarqueur en puissance de l'état des fonctions neurologiques (Grue et al., 1997). De nombreuses études ont confirmé l'utilisation de *Daphnia magna* comme modèle pour les études de neurotoxicité. Cette espèce offre un excellent système pour relier les modèles d'inhibition de la B-estérase avec des effets de niveau individuel vu sa sensibilité aux pesticides (Guilhermino et al., 1996; Barata et al., 2001).

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

- **Mesure de l'activité Acétylcholinestérase (AChE)**

Le dosage de l'activité AChE a été mené selon la méthode d'Ellman et *al.* (1961), qui consiste à fournir à l'enzyme (AChE) un substrat artificiel analogue, l'acétylthiocholine, qui sera hydrolysé en acide acétique et thiocholine. Cette dernière en présence de DTNB (acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) donne un produit jaune le TNB (acide 5-thio-2-nitrobenzoïque) que l'on dose à une longueur d'onde de 412 nm.

La lecture des absorbances a lieu toutes les 4 min pendant 20 min à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. L'activité AChE est calculée selon la formule suivante :

$$AChE^* = \frac{\Delta DO_{min}}{1,36 \times 10^4} \times \frac{Vt}{Vh} / \text{mg de prot}$$

* : micromoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines,
 ΔDO : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat,
 $1,36 \times 10^4$: coefficient d'extinction molaire du DTNB ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$),
 Vh : volume de l'homogénat (100 μL),
 Vt : volume totale de la cuve (1 300 μL),
mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg.

4.5 Modélisation de la dynamique de population

La biologie de la conservation s'intéresse aux moyens d'empêcher l'extinction à court terme d'une ou plusieurs populations ou espèces. Par ce fait, elle fait parfois l'objet d'une certaine réticence de la part de gens qui lui reprochent de vouloir fixer l'état actuel du monde alors que, la paléontologie nous montre qu'à une grande échelle de temps, des espèces se forment et disparaissent sans arrêt. Il faut voir que l'on se situe, en biologie de la conservation, à une toute autre échelle de temps : de l'ordre du millier d'années au grand maximum, le plus souvent de l'ordre de la dizaine d'années (Burgman, 1993).

Les modèles de populations matriciels type Leslie se sont avérés être des outils puissants (Caswell, 2001) et ont été récemment appliqués en écotoxicologie au cas de la daphnie (Duchet et *al.*, 2010 ; Bøhn et *al.*, 2010 ; Massarin, 2010) pour déduire différents critères d'effet démographiques, tels que le taux de croissance de la population et la distribution en âge asymptotiques (c'est-à-dire en conditions constantes quand la structure en classes est stabilisée (Caswell, 2001).

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

Ces modèles supposent que la population est constituée de plusieurs classes d'âges différentes. A intervalles de temps discrets, les effectifs de chacune des classes d'âges évoluent de façon indépendante et sont calculées à partir de leurs taux de survie et de fécondité respectifs. En comparaison, les modèles logistiques et malthusiens supposent que les taux de reproduction sont identiques pour tous les individus de la population, ce qui n'est pas réaliste d'un point de vue biologique chez la daphnie (Massarin, 2010).

Bien entendu, certaines hypothèses régissent cette modélisation, Notamment :

- L'espace et la quantité de nourriture disponibles sont illimités
- Il n'y pas de migrations
- La population est divisée en classes d'âges correspondant à des intervalles de temps de même durée (par exemple, l'année)
- Les fécondités nettes et les probabilités de survie de chaque classe sont supposées, pour cette modélisation, être les mêmes pour toutes les femelles (en moyenne) et indépendantes du temps
- La probabilité de dépasser l'âge de la dernière classe est supposée négligeable

Dans ce modèle matriciel, le système est considéré comme fermé ; la population n'est pas limitée par les ressources du milieu et il n'y a pas de phénomènes de densité-dépendance (Bair, 2012 ; Bair et Mawhin, 2012).

Ce modèle repose sur trois variables (Charles-Bajard, 2004) :

- L'âge (variable continue), divisé en classes qui sont numérotées de 1 à n ,
- Le temps (variable discrète), noté (t) ,
- Le pas de temps, égal à la durée de chacune des classes d'âge, c'est-à-dire que de t à $t+1$ tous les individus de la classe d'âge i passent à la classe d'âge $(i+1)$.

Le cycle de vie se schématise simplement en représentant chaque classe d'âge par un nœud, et les transferts d'individus d'une classe d'âge à l'autre par des flèches. On obtient alors un schéma comme celui présenté ci-après pour une population subdivisée en trois classes d'âge, dont les classes d'âge 2 et 3 se reproduisent, 3 étant l'âge maximum des individus (Charles-Bajard, 2004 ; Zeman, 2008).

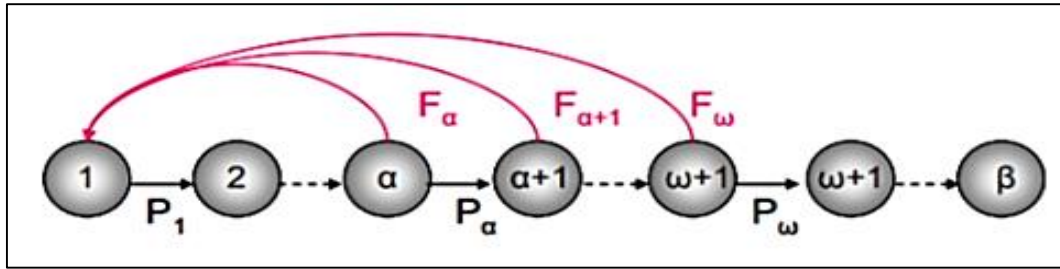


Figure 23. Schéma représentant la structure d'une population (Zeman, 2008)

α : l'âge de la première reproduction,
 ω : l'âge de la dernière reproduction
 β : la longévité maximum.
 $F\alpha$ à $F\omega$: représentent les taux de fécondité et les termes
 $P1$ à $P\omega$: les taux de survie.

Grâce à ce modèle assez simple, il est possible de mettre en évidence les effets mesurés d'une substance, pesticide par exemple, sur des paramètres à l'échelle de l'individu (fécondité, survie ...) qui ont le plus d'impact sur la dynamique des populations (Stark *et al.*, 2004).

Cette modélisation est dédiée à l'extrapolation des effets toxiques du Thirame et de la Bouillie bordelaise du niveau individuel où ils sont mesurés au laboratoire, au niveau de la population, plus pertinent du point de vue écologique. Ce changement d'échelle repose sur des modèles de populations de type matrice de Leslie.

Dans un premier temps, il vise à extrapoler directement les données de survie et de reproduction observées dans les conditions particulières testées lors des expérimentations.

Dans un second temps, l'utilisation d'un modèle matricielle de Leslie au niveau individuel va permettre d'extrapoler les effets au niveau populationnel aux valeurs intermédiaires de la gamme de concentrations en fongicides.

4.5.1 Modélisation de la dynamique d'une population de *Daphnia magna* structurée en classes d'âges (Matrice de Leslie)

Les matrices de Leslie ont été construites à partir des données des tests chroniques (21 jours) sur des daphnies traitées par le Thirame ou la Bouillie bordelaise ainsi qu'en fonction d'une expérience sur des daphnies témoins avec un suivi quotidien de la mortalité et de la fécondité jusqu'à 21^{ème} jour.

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

Dans les deux expériences sur 21 jours, la mortalité, la fécondité ainsi que les jours de ponte, le nombre de pontes et le nombre de nouveaux nés ont été suivis quotidiennement. Nous avons réalisé à partir de ce suivi quotidien des matrices de Leslie avec un pas de temps de (7 jours) pour pouvoir prendre en compte l'âge de la maturité ainsi que les retards de ponte. Pour estimer la fécondité des daphnies après 21 jours, nous nous sommes basés sur les observations recueillies lors des expériences. Toujours comme pour la fécondité, nous avons pu établir un pourcentage de mortalité au cours du temps que nous avons utilisés pour estimer à partir des données obtenues avec les tests de 21 jours.

Toutes les données observées et estimées ont été intégrées dans des matrices de Leslie et ont permis de montrer l'évolution de l'effectif des populations de daphnies témoins ou en fonction de leur exposition au Thirame ou à la Bouillie bordelaise pour une prévision du nombre des individus par classes d'âge ainsi le nombre total après plusieurs générations successives.

Le modèle de Leslie décrit la dynamique d'une population animale composée de femelles reproductrices réparties dans $K+1$ classes formées selon les âges. Dans notre étude qui s'étale sur 21 jours, la population initiale commence avec 10 juvénile de la classe 1 :

$$\vec{N}_0 = \begin{pmatrix} 10 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

La connaissance des effectifs $x_i(t)$ dans la classe numéro i (pour $i = 0, 1, \dots, K$) au temps t (supposé entier) permet de prévoir ceux à l'instant $t + 1$ grâce à l'égalité matricielle.

$$\mathbf{N}_{(t+1)} = \mathbf{A} \times \mathbf{N}(t)$$

Où $\mathbf{N}(t)$ est un vecteur colonne contenant les effectifs des m classes d'âge de la population au temps t , et \mathbf{L} est une matrice carrée (de taille $m \times m$), appelée matrice de Leslie \mathbf{L} égale à :

$$\mathbf{L} = \begin{bmatrix} \overrightarrow{\hspace{10em}} \\ f_0 & f_1 & f_2 & \dots & f_{K-1} & f_K \\ S_0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & S_1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & S_{K-1} & 0 \end{bmatrix}$$

- Les éléments de la première ligne représentent les fécondités nettes : (f_i) correspond au nombre moyen de femelles mises au monde, entre deux instants successifs (t) et $(t + 1)$, par chaque femelle appartenant à la classe numéro (i) ;

- Au sein de la sous-matrice diagonale située sous la première ligne et comprenant les k premières colonnes, les éléments diagonaux sont les probabilités de survie : (S_i) est la probabilité qu'une femelle appartenant à la classe numéro i au moment (t) soit vivante dans la classe numéro $(i+1)$ à l'instant $(t+1)$ (Bair, 2012a).

Le théorème de Perron-Frobenius permet de déterminer la valeur propre dominante de L , appelée (λ) , correspondant au taux asymptotique d'accroissement de la population. Ce paramètre, de dimension (t^{-1}) , représente le facteur par lequel la population est multipliée à chaque pas de temps (Caswell, 2001 ; Lehning, 2008).

La dynamique de la population dans son ensemble et de chaque classe d'âge en particulier est une dynamique malthusienne où le taux de croissance r est égal à $\ln(\lambda)$.

La dynamique de population, en régime asymptotique, peut être décrite à partir de la plus grande valeur propre de la matrice L , λ et qui correspond au taux de croissance asymptotique de la population.

- $\lambda > 1$ signifie que la population va croître sur le long terme.
- $\lambda = 1$ signifie que la population va se stabiliser sur le long terme.
- $\lambda < 1$ signifie que la population va décroître sur le long terme, ce qui est synonyme d'extinction de la population (Burgman, 1993).

A. Pas de temps

Le pas de temps est exactement égal à la durée de chacune des classes d'âge, dans notre étude le pas de temps égale à 7 jour, ce qui implique que de t à $t + 1$ tous les individus passent de la classe d'âge i à la classe d'âge $(i + 1)$, dans notre étude le pas de temps égale à 7 jour. C'est-à-dire que les daphnies passe de la classe des juvéniles à la classe des adultes matures qui se reproduisent pour la première fois, et de même pour ces derniers à la classe des matures qui se reproduisent pour la deuxième ou la troisième fois.

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

B. Classes d'âge

Le modèle de Leslie permet donc de décrire la dynamique de populations structurées en classes d'âge, est subdivisé en classes d'âge numérotées, les classes d'âge ont été divisées en 3 catégories comme le montre le tableau suivant :

Tableau 4. Classes d'âge des daphnies constituant la matrice de Leslie

1	2	3
Classe des juvéniles qui ne sont pas mature ou incapable de se reproduire, leurs âge s'étale entre 1 et 7 jours, sont notées <u>(1 : Juvéniles non matures).</u>	Classe des daphnies adultes matures et capable de se reproduire de manière parthénogénétique et pondent des juvéniles pour la première fois issues du développement des juvéniles de la classe précédente, leurs âge s'étale entre 7 et 14 jours, notées <u>(2 : adultes matures pond pour la première fois).</u>	Classe des daphnies adultes matures et capable de se reproduire de manière parthénogénétique et pondent des juvéniles pour la deuxième ou troisième fois issues du développement des daphnies de la classe précédente, leurs âge s'étale entre 14 et 21 jours, notées <u>(3 : adultes matures pond pour la n^{ème} fois).</u>

5. ANALYSE STATISTIQUES

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique grâce au logiciel **GraphPad Prisme** (*Version 7.00*). Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart type ($m \pm SD$).

L'analyse de la variance à un critère de classification (**ANOVA**) a été réalisé pour déterminer le degré de significativité des différences pour les résultats enregistrés chez les daphnies témoins et les traitées.

Les moyennes des groupes témoins et traités ont été comparés deux à deux en utilisant le **test t de Student**, qui permet de mettre en évidence les différences entre les groupes étudiés au cours des tests effectués sur les différents paramètres.

Les différences sont considérées comme suit :

- ✓ Significatives lorsque $p \leq 0,05$ (*)
- ✓ Hautement significatives lorsque $p \leq 0,01$ (**)
- ✓ Très hautement significatives lorsque $p \leq 0,001$ (***)

PARTIE III
RESULTATS
&
DISCUSSION

VOLET 1

EFFETS
TOXICOLOGIQUES
A L'ECHELLE
INDIVIDUELLE



1. EFFETS SUR LES PARAMETRES ECOTOXICOLOGIQUES

1.1 Effet sur le taux d'immobilisation des daphnies (Test aiguë)

A. Effet du Thirame sur l'immobilisation des daphnies

L'objectif du test a été d'étudier les effets aigus du Thirame et de la Bouillie bordelaise sur *Daphnia magna*. Ces tests réalisés sur des solutions préparées au préalable ont donc permis d'établir des courbes dose-réponse pour chaque fongicide. Les concentrations létales entraînant 50% de l'immobilisation (CI₅₀) des daphnies sont calculées à partir de ces tests.

La figure (24) illustre l'effet à court terme des concentrations croissantes du Thirame sur le taux d'immobilisation des juvéniles de *Daphnia magna* après une durée d'exposition 24h et 48h.

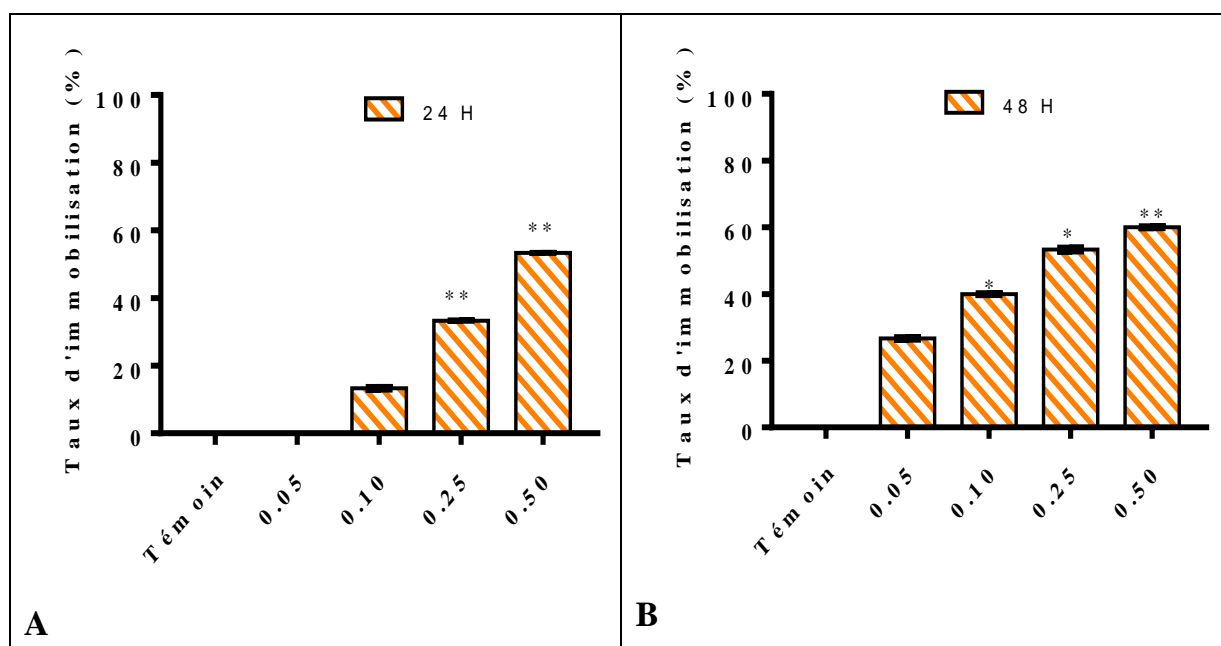


Figure 24. Taux d'immobilisation de *Daphnia magna* après 24-48h d'exposition au Thirame

Nous remarquons que le taux d'immobilisation des daphnies augmente significativement ($p \leq 0,01$) chez les daphnies traitées par les différentes concentrations du Thirame et ce après 24h d'exposition. Cependant, ce taux est nul à la plus faible concentration (0,05mg/L) et atteint son maximum à la plus forte concentration (0,5mg/L) soit 53,33 % où plus de la moitié de la population est inhibée.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Après 48h d'exposition, nous enregistrons une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du taux d'inhibition des daphnies traitées par rapport aux témoins et ce en fonction des concentrations croissantes du Thirame. Cette augmentation est observée dès la plus faible concentration (0,05mg/L) où elle est de 26,67% et atteint son maximum à la plus forte concentration soit 60%. Parallèlement, le calcul de la CI_{50} a révélé des valeurs deux fois plus supérieures après 24h (0,35 mg/L) qu'après 48h (0,19 mg/L).

Pour le Thirame, nous signalons que les valeurs de la CI_{50} (0,19 mg/L) obtenues après 48h d'exposition sont inférieures à celles fixées par le règlement de la commission Européenne (CE : n°1907/2006 de 2017) ainsi que de la démarche de sélection de données et les classifications d'effets développées pour l'indicateur de risque des pesticides du Québec (IRPeQ) sous un projet de décision de réévaluation (PRVD 2016-07). Aussi, les études de Van Leeuwen, (1985) sur les dithiocarbamates relatives aux effets aigus du Thirame ainsi que ceux de Martins et *al.*, (2007) ont notés des valeurs de CI_{50} -48 h égales à 0,21 mg/L chez les nouveau-nés des daphnies (<24 h) ce qui démontre l'extrême sensibilité des daphnies à cette formulation commerciale.

Il existe plusieurs rapports sur la toxicité aigüe du Thirame, par exemple, Saugé et *al.*,(1983) montrent une sensibilité variable au Thirame suite à des durées d'exposition de 24, 48,72 et 96 h sur plusieurs espèces d'eau douce : *Dugesia gonocephala* (plathelminthe); *Asellus aquaticus* (crustacés), *Xenopus laevis* (amphibien stade 47, et 53). Les CI_{50} évoluent en fonction du temps d'exposition et de la dose, et que dans des conditions identiques de méthodologie, ils enregistrent une grande variation de la sensibilité d'animaux d'un même biotope vis-à-vis du Thirame en suspension aqueuse éventuellement modifié par l'état physiologique de l'organisme.

Les dithiocarbamates (mancozèbe, Thirame, zineb et maneb) font partie des premiers fongicides organiques synthétiques apparus dans les années 1930 et sont connus pour avoir une faible persistance et une toxicité élevée à l'égard des organismes aquatiques. A titre d'exemple, le triadiméfon est hautement toxique pour les crustacés (Wightwick et *al.*, 2010), alors que la formulation la plus toxique pour toutes les espèces d'eau douce est celle du Thirame 80% WG. Cependant *Daphnia magna* semble être l'espèce la plus sensible à cette famille de fongicide avec des CI_{50} -(24h) trois fois plus élevés après 48h d'exposition.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

certain auteurs (Kyriakopoulou et *al.*, 2009) ce qui vient appuyer nos résultats. Nos résultats corroborent ceux de Toumi et *al.*, (2013) ; Manar (2009) et Moumeni, (2016) qui évaluaient respectivement la toxicité aigüe de la Deltaméthrine ; le Chlordane et la Cyclohexanedione sur *Daphnia magna*, confirmant dans tous les cas que l'immobilisation des daphnies augmente de manière dose- dépendante avec la dose du xénobiotique testé lors du test aigu.

B. Effet de la Bouillie bordelaise sur l'immobilisation des daphnies

L'effet aigu des concentrations croissantes de la Bouillie Bordelaise sur le taux d'immobilisation des juvéniles de *Daphnia magna*, après une durée d'exposition de 24h et 48h, est représenté dans la figure 25.

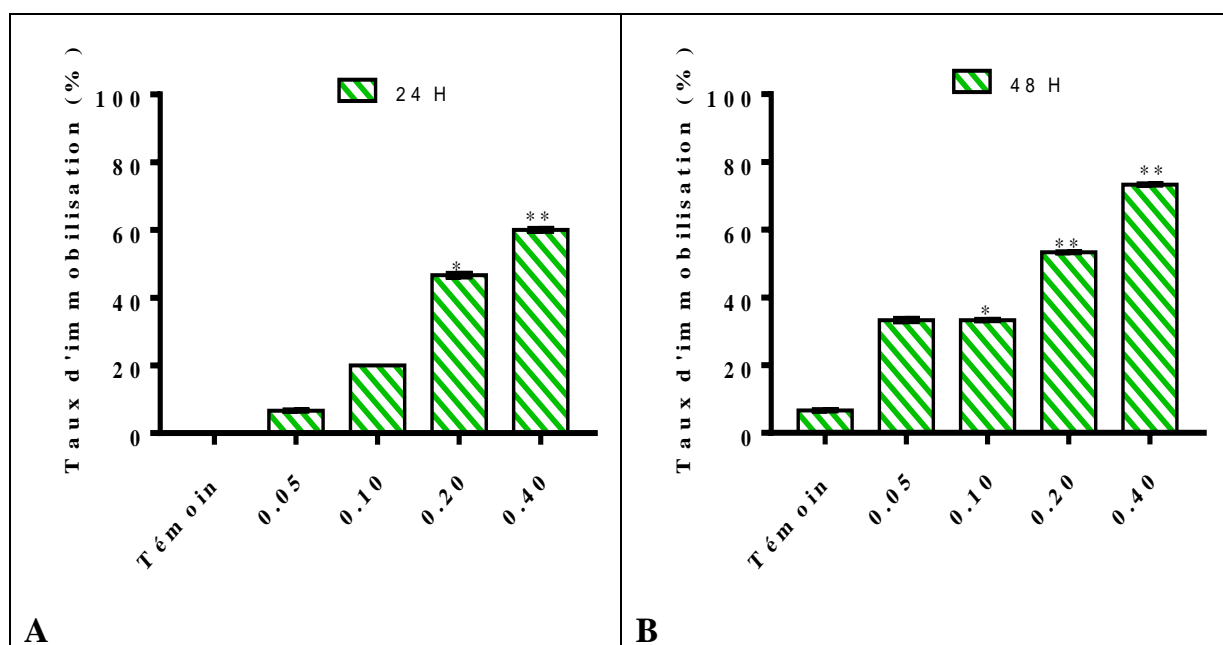


Figure 25. Taux d'immobilisation de *Daphnia magna* après 24-48h d'exposition à la Bouillie bordelaise

D'après nos résultats, on constate que le taux d'immobilisation des daphnies traitées par les différentes concentrations de la Bouillie bordelaise augmente significativement ($p \leq 0,01$) comparé aux daphnies témoins et ce après 24h d'exposition. Il se manifeste à la plus faible concentration (0,05mg/L) avec un taux de 6,67 % et atteint plus de la moitié (60%) à 0,40 mg/L.

Après 48h, la Bouillie bordelaise exerce un effet accru où nous relevons une augmentation significative ($p \leq 0,01$) du taux d'inhibition des daphnies traitées par rapport aux témoins et ce en fonction des concentrations croissantes du fongicide.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Ainsi une immobilisation remarquable est observée pour les faibles concentrations (0,05 et 0,10 mg/L) et atteint plus de la moitié (53,33%) à 0,20 mg/L. Un pic maximal est noté à la plus forte concentration testée (0,40 mg/L) soit 73,33%.

Parallèlement, le calcul de la CI 50%, qui représente la concentration inhibitrice de 50% de la population, a révélé des valeurs de 0,26 mg/L et 0,15 mg/L après 24 et 48 h respectivement.

La fiche de données de sécurité révisée en 2014 et conforme aux exigences du règlement de la commission Européenne (CE : No. 1907/2006) indique que la Bouillie bordelaise se classe comme très toxique pour les organismes aquatiques pouvant entraîner des effets néfastes à long terme sur l'environnement aquatique. La CI₅₀-(24h) de la Bouillie Bordelaise obtenue dans notre étude est de 0,26 mg/L. Ce résultat est en accord avec la valeur mentionnée par Kovács et *al.*, (2012) qui ont mentionnée une valeur standard d'immobilisation de 0,24 mg/L. Cependant, après 48h d'exposition (CI₅₀ = 0,15 mg/L), cette valeur est très variable selon la littérature. Ferrando et *al.*, (1992) révèlent que *Daphnia magna* est très sensible au sulfate de cuivre avec une CI₅₀-48h égale à 0,34 mg/L, alors que selon Mohammed (2007) la CI₅₀ est de 0,28 mg/L soit deux fois plus que les valeurs obtenus dans notre étude. Cependant Reboleira et *al.*, (2013) ont trouvé une CI₅₀-48h égale à 0,12 mg/L, cette valeur est celle qui se rapproche le plus de nos résultats.

Il est connu que les invertébrés aquatiques sont plus sensibles à la toxicité du cuivre que les poissons. Cependant, *Daphnia magna* est considéré parmi les espèces cladocères les moins sensible à ce métal (Bossuyt et *al.*, 2005). Ce degré de sensibilité dépend au même temps de l'espèce et du stade de vie de cette dernière. Les ions Cu²⁺ libres sont considérés comme les espèces fondamentales du cuivre responsables de la toxicité. Les ions Cu⁺ sont peu solubles ou insolubles en générale alors que le sulfate de cuivre (CuSO₄) a une solubilité de l'ordre de 14,3 (Weast et Astle, 1980). Cette toxicité du sulfate de cuivre dépend de deux facteurs : la dureté et le PH de l'eau et les changements comportementaux sont les indications d'une potentielle toxicité. Dès les premières heures d'exposition au CuSO₄, des comportements natatoires anormaux et difficultés respiratoires sont observés chez les poissons *Capoeta Fusca* aboutissant à la mort de l'animal (Zarei et *al.*, 2013).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

La bouillie bordelaise est une préparation à base de sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) et de chaux éteinte ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). La chaux éteinte résulte de l'hydratation contrôlée de la chaux vive (CaO). D'après Di Toro et *al.*, (2001), les concentrations croissantes du Ca^{2+} disponible en CaCO_3 (liée à la dureté) augmentent les valeurs des CI_{50} du cuivre. Cela peut expliquer nos résultats, la $\text{CI}_{50-48\text{h}}$ est de l'ordre de 0,15 mg/L, trois hypothèses peuvent être émises :

- Une interaction compétitive avec les cations et, plus particulièrement le calcium, peut être la cause d'une augmentation de la toxicité, entraînant une hausse de l'activité ionique du métal
- La formation de complexes insolubles carbonates/métaux lourds ; cette hypothèse n'est cependant plus valable si ces complexes ne sont pas ingérés par les daphnies.
- La disponibilité de Cu solubles (Sulfate de cuivre en excès) qui donne une réaction faiblement acide, celui-ci est un sel acide, un sel résultant de l'union d'un acide fort avec une base faible.

Indépendamment de son interaction avec les métaux, le calcium peut lui-même exercer des effets importants sur l'état physiologique des daphnies. Winner et Gauss (1986), Paulauskis et Winner (1988) indiquent par exemple, qu'en plus de l'effet antagoniste entre le Zinc et le Calcium en solution, une proportion indéterminée de la diminution de la toxicité du zinc peut résulter des différences dans l'état physiologique des bioindicateurs.

Parallèlement, Hyne et *al.*, (2005) ont démontré que plusieurs facteurs de qualité d'eau peuvent déterminer la toxicité du cuivre entre autres le pH. Par exemple, la toxicité du Cu chez *Ceriodaphnia dubia* diminue avec l'augmentation du pH (de 5,5 à 7,5) avec une $\text{EC}_{50-48\text{h}}$ passant de 1,6 $\mu\text{g/L}$ à 2,2 $\mu\text{g/L}$, ce qui est expliqué par la sensibilité aux ions cupriques libres (Cu^{+2}) qui sont dominantes à des faibles pH (acide). En pH élevé, les fractions de cuivre disponibles forment des complexes carbonate de cuivre ce qui réduit sa toxicité (Di Toro et *al.*, 2001).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Plusieurs auteurs ont montré que les métaux lourds sont généralement plus toxiques dans une eau douce que dans une eau dure (Abel, 1974). Biesinger et Christensen (1972) ont montré que la toxicité du cuivre est moindre dans un milieu de faible dureté. L'étude de Yim *et al.*, (2006) qui porte sur l'effet de la dureté de l'eau sur la toxicité de métaux lourds, notamment le cuivre, a révélé une toxicité plus élevée de ces métaux dans l'eau douce que dans l'eau dure. Cela signifie que la dureté d'une solution d'essai peut affecter la toxicité des métaux lourds. Dans le même contexte chez *Ceriodaphnia dubia*, Kim *et al.*, (2001) ont montré que la toxicité du cuivre diminuait avec l'augmentation de la dureté de l'eau ; ce qui corrobore notre hypothèse concernant la biodisponibilité du cuivre.

Parallèlement, Offem et Ayotunde (2008) ont suggéré que le temps d'exposition et la taille corporelle sont responsables des différences dans la toxicité des xénobiotiques, plus la taille du corps est petite, plus les taux de métabolisation et d'accumulation sont élevés, ce qui pourrait rendre cette espèce sensible aux facteurs de stress environnementaux. En vue des études précédentes, *Daphnia magna* utilisée dans la présente étude semble être sensible au Thirame et à la Bouillie bordelaise avec des CI_{50} -48 h inférieures aux valeurs précédemment rapportées. Cette sensibilité entre les mêmes espèces peut expliquer les différences entre nos résultats et la littérature, par exemple Toumi *et al.*, (2013) ont étudié la toxicité du deltaméthrine sur deux souches de daphnies fournies par différents laboratoires en utilisant des tests de toxicité aiguë (immobilisation) et ont révélé des CI_{50} -48h différentes soit 0,32 et 0,63 $\mu\text{g/L}$ pour deux souches de *D. magna*.

Il semble que les valeurs de la CI_{50} chez *D. magna* varie dans différentes conditions, telles que la température, la population, la taille et la pré-exposition, ce qui indique que différents processus c'est-à-dire le niveau de tolérance intrinsèque et la capacité du système de détoxification contribuent à la toxicité du Thirame dans certaines conditions. En outre, les milieux et les conditions de culture, y compris le pH, la dureté, la lumière et l'alcalinité, sont probablement aussi des causes de toxicité différente pour les xénobiotiques, démontrant la sensibilité des daphnies à la molécule commerciale. Ces résultats impliquent que des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'effet toxique aigu des xénobiotiques sur cette espèce, dans différentes conditions (Friberg-Jensen *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010 ; Okamoto *et al.*, 2015).

1.2 Effet chronique du Thirame et de la Bouillie bordelaise sur daphnia

Les résultats obtenus concernant les paramètres de croissance et de reproduction chez les daphnies exposées aux différentes concentrations du Thirame et de la Bouillie bordelaise durant 21 jours sont illustrés dans les figures ci-dessous. Il faut savoir que les études à long terme pour l'évaluation de l'écotoxicité du Thirame et la Bouillie bordelaise sont très rares ou anciennes. Les études antérieures sont basées sur l'étude des effets à court terme alors que la toxicité des deux fongicides se manifeste aussi à long terme. L'originalité de ce travail réside dans la batterie des manifestations des paramètres de croissance et de reproduction des daphnies suite à une exposition à long terme et ces résultats sont utilisés plus tard pour l'étude populationnel. Cependant et selon la littérature, aucune étude n'a fait l'objet de la toxicité chronique du Thirame chez *Daphnia magna*.

1.2.1 Paramètres de croissance

A. Longévitité

La figure (26) illustre l'effet à long terme des concentrations croissantes du Thirame et de la Bouillie bordelaise sur la longévitité des daphnies mères après une durée d'exposition de 21 jours.

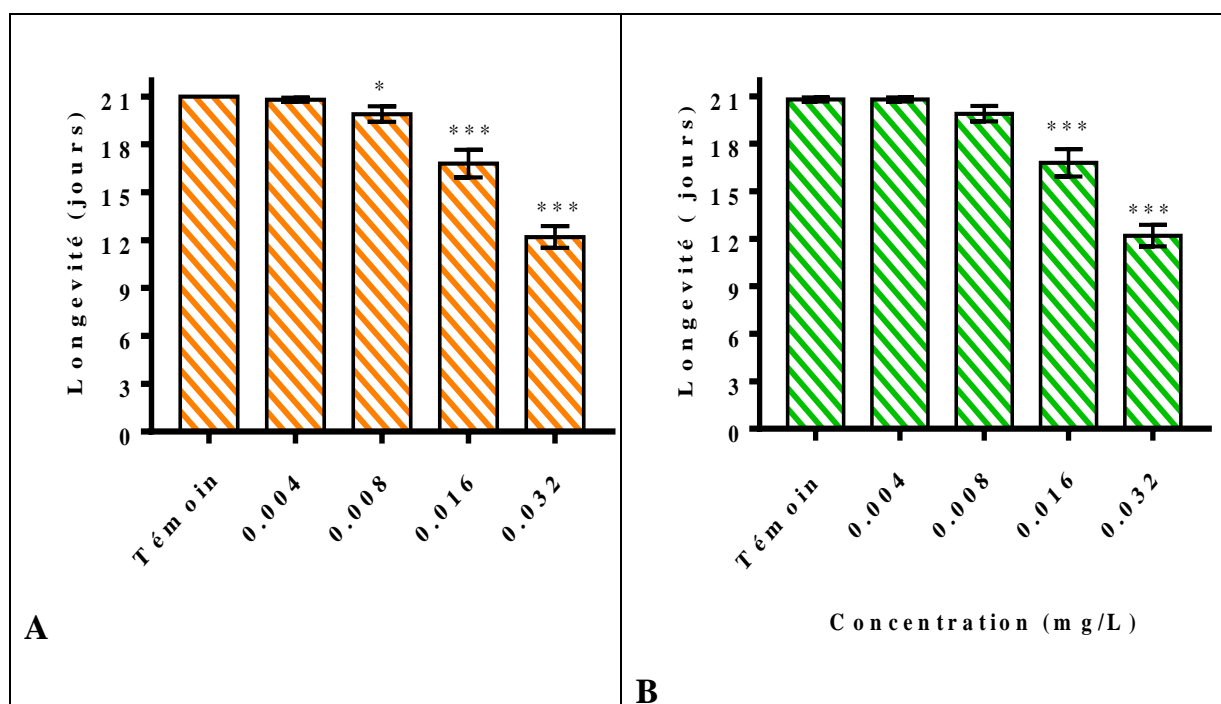


Figure 26. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur la longévitité de *Daphnia magna* durant 21 jours

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

On remarque que la longévité des daphnies exposées aux deux fongicides diminue significativement ($p \leq 0,001$) en fonction des différentes concentrations par rapport aux daphnies témoins. Cette longévité passe de 20,8 jours à la plus faible concentration et atteint presque la moitié à la plus forte concentration (0,032 mg/L) soit une diminution de 12,2 jours par rapport aux témoins. Ainsi on constate que les deux pesticides ont un effet, à long terme, similaire sur la longévité des daphnies durant les 21 jours d'exposition.

D'après nos résultats, la longévité des daphnies diminue avec l'augmentation des concentrations des deux fongicides, mais cette diminution de la longévité n'a été significative ($p < 0,001$) qu'au-delà de 0,008 mg/L et 0,016 mg/L du Thirame et de la Bouillie bordelaise respectivement. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études qui montre la sensibilité de la durée de vie de *Daphnia magna* exposées à différents xénobiotiques, citons par exemple : le Carbendazim (Silva et al., 2019) ; le ZnO et amine-functionalized ZnO (Gonçalves et al., 2018) ; Buprofezin (Liu et al., 2012), Rac- et S-metolachlor (Liu et al., 2006), Diazinon (Fernández et al., 1995). Des résultats similaires ont été observé par Ferrando et Andreu (1995) avec le Fénitrothion et par Fernández-Casalderrey et al., (1995) à 0,20 mg/L d'Endosulfan et 0,25 mg/L de Méthylparathion chez la même espèce.

La longévité est liée aux facteurs de stress et aux concentrations de métaux dont le cuivre comme dans le cas de la Bouillie bordelaise. Nos résultats sont en accord avec celle de Winner (1981) qui a enregistré une diminution significative de la longévité suite à des tests de la toxicité chronique du sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) chez quatre espèces des daphnies (*D. magna*, *D. pulex*, *D. paruula*, *D. ambigua*). Aussi, la longévité peut être fortement influencée par l'alimentation. Ce phénomène peut être lié à une occlusion mécanique de l'appareil de filtration chez *D. magna*, qui réduit la bonne utilisation des aliments présents dans le milieu de culture (Porter et al., 1982). Des apports alimentaires accru en cuivre peuvent diminués l'assimilation alimentaire ce qui induit un stress nutritionnel chez *Daphnia magna* (winner et al., 1977).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

B. Taux de survie

Le pourcentage des daphnies mères vivantes témoins et traitées, après 21 jours d'expositions aux différentes concentrations des deux fongicides, est illustré dans la figure ci-dessous.

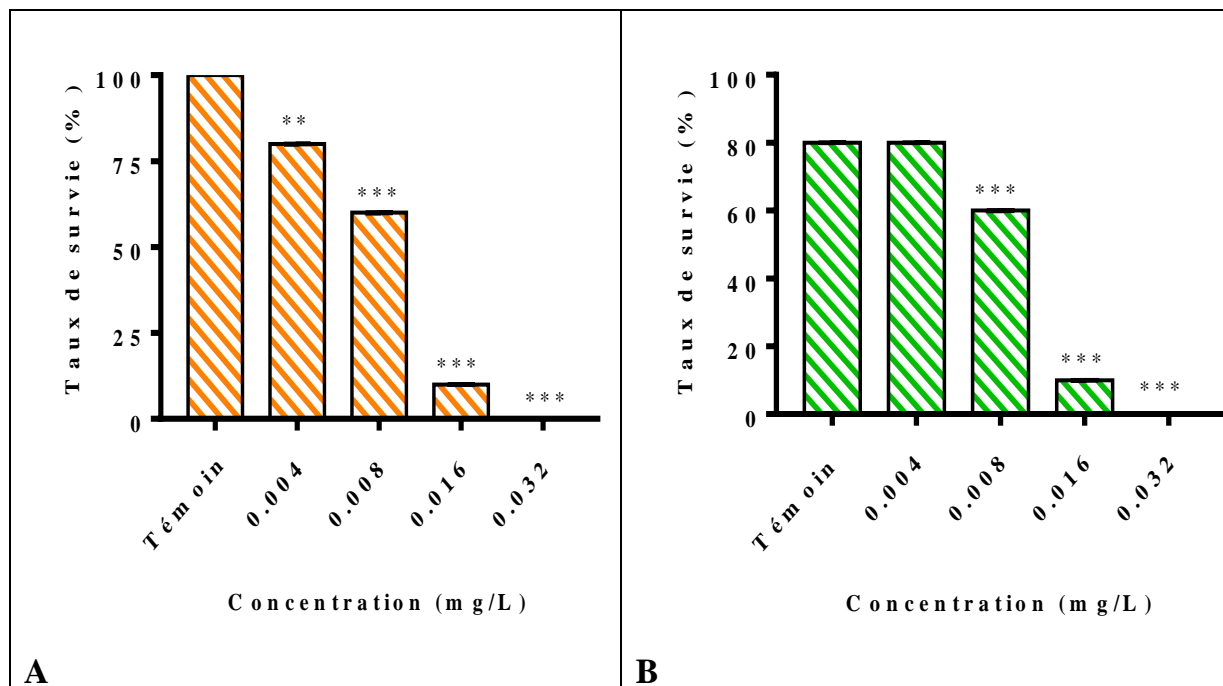


Figure 27. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur le taux de survie de *Daphnia magna* durant 21 jours

D'après nos résultats, on constate que le taux de survie des animaux parents traités tend à diminuer en fonction des concentrations croissantes du Thirame et ce par rapport aux témoins d'où la différence est très hautement significative ($p \leq 0,001$). Un pourcentage de 60% est enregistré chez les daphnies traitées à 0,008 mg/L et diminue nettement chez celles traitées à 0,016 mg/L où il est de 10%. Cependant aucune daphnie n'a survécu pour la plus forte concentration au bout de 21 jours d'exposition.

Parallèlement, le taux de daphnies mères vivantes après 21 jours d'exposition aux différentes concentrations de la Bouillie bordelaise diminue significativement ($p \leq 0,001$) comparé aux témoins et devient nul à la plus forte concentration (0,032 mg/L). Cependant, un contacte directe avec la Bouillie bordelaise affecte peu la survie des daphnies aux faibles concentrations qui est presque similaire à celui des témoins 80%, toute fois à 0,016 mg/L seulement 10% de la population a survécu jusqu'au 21^{ème} jour tandis qu'aucune daphnie n'a survécu pour la plus forte concentration au bout du test.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Plusieurs chercheurs (Daniels et Allan, 1981; Ingersoll et Winner, 1981) ont suggéré que la survie dans les tests de toxicité chronique est le meilleur indice de toxicité car elle est plus sensible et moins variable que les paramètres de reproduction. Day et Kaushik (1987) ont cependant suggéré que la survie n'est qu'un bon indicateur lorsque l'exposition aux toxiques se poursuit tout au long du cycle de vie de l'organisme.

Fernández et *al.*, (1993) ont constaté une diminution de la survie du 11 à 8 jours chez *D. magna* lorsqu'elles étaient exposées au méthylparathion au cours d'un cycle de vie de 21 jours, mais seules les deux concentrations de pesticides les plus élevées indiquaient une diminution significative de ce paramètre après 10 jours d'exposition au toxique. De même résultats ont été enregistré avec des concentrations supérieures à 0,009 mg/L de Fénitrothion (Ferrando et *al.*, 1996) et d'Aniline supérieurs à 46,7 µg/L et 2,4-dichlorophénol supérieurs à 1,48 mg/L (Gersich et *al.*, 1988).

Parallèlement, la Bouillie bordelaise présente les mêmes effets. Dave (1984) a montré une réduction de la survie des daphnies à long terme, les valeurs au-delà de 0,013 mg/L de cuivre ajouté ont enregistré un taux de survie de 0%. Ces résultats sont en accord avec notre étude où on enregistre zéro survie à la plus forte concentration (0,032 mg/L) de la Bouillie bordelaise. Ceci peut être expliqué par la différence de la quantité de cuivre nette inclut dans la préparation de la Bouillie à base de sulfate de cuivre utilisée dans notre étude.

Aussi l'étude de Flickinger et *al.*, (1982) mais sur un intervalle plus étendu de 88 jours ont enregistré un taux de survie de 85% au 21^{ème} jour d'exposition à 0,04 mg/L de sulfate de cuivre mais de 10% au 65^{ème} jour indiquant ainsi que la durée de l'exposition à une concentration donnée augmente le taux de mortalité. Aussi, une étude sur plusieurs Dithiocarbamates ont révélé une diminution des taux de survie de *Daphnia magna* (Van Leeuwen et *al.*, 1985).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

C. Nombre de mue

Le comptage quotidien des carapaces libérées par les Daphnies témoins et traitées par les deux xénobiotiques, durant 21 jours, permet d'estimer le nombre de mues comme le montre la figure (28).

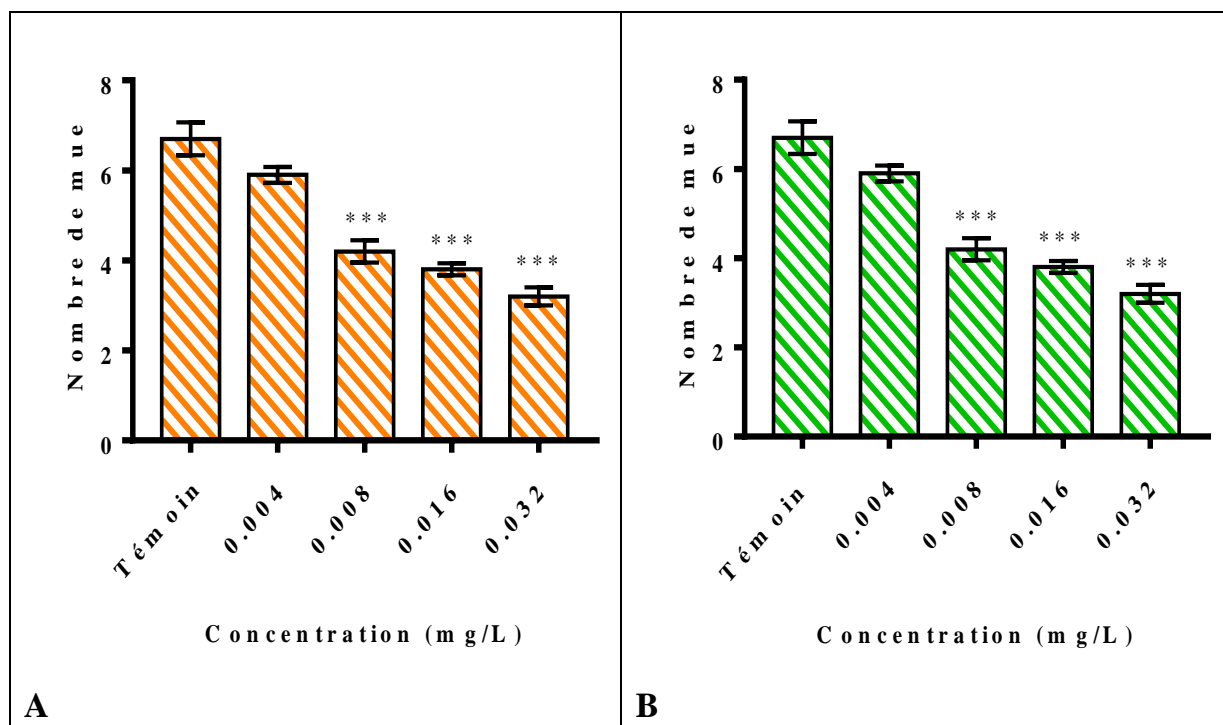


Figure 28. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur le nombre de mues de *Daphnia magna* après 21 jours

D'après ces figures, on constate que le nombre de mues diminue significativement ($p \leq 0,001$) en fonction des concentrations croissantes des deux fongicides comparativement aux daphnies témoins. Il est de 6,7 chez les daphnies témoins et atteint 3,2 à la plus forte concentration (0,032 mg/L) soit 50% de réduction du nombre de mues et ce pratiquement pour les deux fongicides.

Le nombre des mues obtenu dans notre étude se situe dans un intervalle de [7 et 3] où la valeur la plus élevée est enregistrée pour les témoins et la plus basse pour la plus forte concentration (0,032 mg/L) et ce pour les deux fongicides testés indiquant ainsi une inhibition de développement des daphnies qui a une influence par la suite sur la reproduction.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Price et Uglow (1979) ont enregistré une inhibition du développement post-mue chez *Crangon crangon* (Crustacé) traités au cuivre suite à l'inhibition de l'ecdyse. Ceci peut être expliqué par le fait que les solutions métalliques inhibent la progression du cycle de mue ce qui justifie nos résultats concernant la toxicité de la Bouillie bordelaise qui affecte le nombre des mues des daphnies. Aussi, la prise d'eau à la mue est cruciale pour une croissance réussie d'un crustacé, le taux de croissance dépend du nombre de mues et de l'augmentation de croissance par mue pendant la saison de croissance (Vernberg, 2012). Chez les crevettes, immédiatement après l'ecdyse, ces crustacés absorbent un volume appréciable d'eau qui pourrait être à l'origine de la mortalité prématurée (autres stades de mue) observée dans les stades post-mue des groupes traités par le cuivre en raison de la perméabilité accrue de la cuticule à la post-mue (Djangmah et Grove, 1970).

Parallèlement, les besoins énergétiques augmentent lors des stades de mue des daphnies et dépassent largement ceux des autres stades (Skinner, 1962 ; Hagerman, 1976) ce qui nécessite la consommation accrue de l'oxygène dissout dans l'eau du milieu de culture que ce soit propre ou contaminée par les résidus du toxique. Les résultats obtenus dans notre travail concernant la diminution du nombre de mues pourraient être liée à la diminution de la consommation d'oxygène enregistrée chez les daphnies traitées par le Thirame ou bien par la Bouillie bordelaise surtout pour les fortes concentrations après une courte exposition (voir les résultats de respiration). Ceci est en accord avec plusieurs auteurs : Kerkut et Munday, 1962; Skidmore, 1970; Burton et *al.*, 1972; Thurberg et *al.*, 1973.

D'un autre côté, des études ont été menées sur les effets des contaminants sur les hormones processeur de la mue chez les crustacés notamment *Daphnia magna*. Ces dernières indiquent que le stress exogène entraîne l'échec non seulement de la mue, mais aussi de l'ovulation (Sumiya et *al.*, 2014) et affecte la reproduction en provoquant des anomalies, de la différenciation sexuelle et des perturbations du cycle de mue chez les invertébrés (Zou et *al.*, 1997 ; Macek et *al.*, 1976). Ces perturbations ont été associées à une altération du métabolisme des hormones stéroïdes, ou bien à des interactions de ces produits chimiques avec le récepteur de l'ecdysone (Bettin et *al.*, 1996; Baldwin et *al.*, 1997, Cheek et *al.*, 1998). Il y'a peu d'information sur l'effet toxique de ces fongicides sur la mue, ce retard de croissance est probablement en relation avec une perturbation

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

endocrinienne qui influe sur les ecdystéroïdes, qui régulent la mue chez les insectes et qui interviennent avant la mue et l'ovulation chez *Daphnia magna* (Hosmer et al., 1998, Hassold et Backhaus, 2014).

1.2.2 Paramètres de reproduction

À partir des tests de reproduction effectués, deux paramètres ont été suivis : la fraction des daphnies qui se reproduisent ainsi que la fécondité (nombre de juvéniles par daphnie par ponte).

A. Jour de la première ponte

La maturité des daphnies se manifeste par une première ponte. L'enregistrement du jour de la première ponte des daphnies, témoins et traitées par les deux fongicides, est illustré dans la figure ci-dessous.

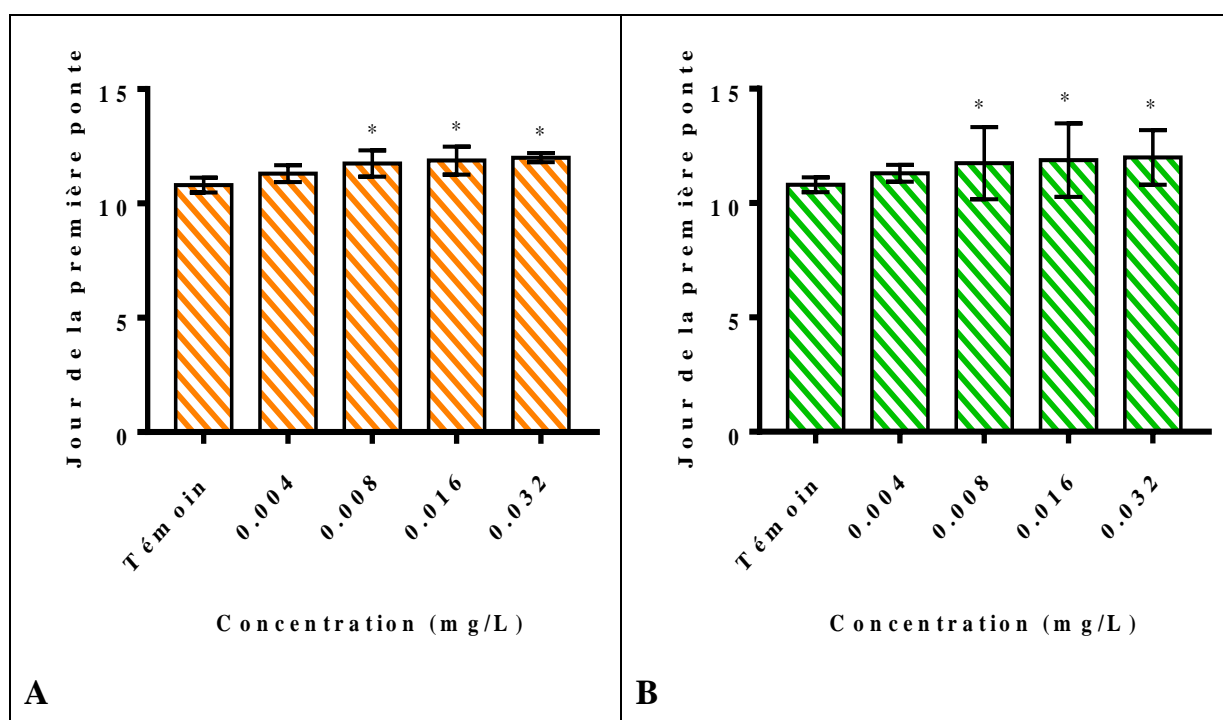


Figure 29. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur le jour de première ponte chez *Daphnia magna* durant 21 jours

Les observations quotidiennes des daphnies traitées nous ont permis de mettre en évidence un retard significative ($p \leq 0,05$) pour le Thirame et non significative pour Bouillie bordelaise de la maturité de ces micro-crustacés (jour de la 1^{ère} ponte) qui est d'une moyenne d'1 à 2 jours et qui se situe aux alentours du 12^{ème} jour d'exposition et ce en

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

fonction des concentrations croissantes des deux xénobiotiques par rapport aux daphnies témoins.

Un léger retard de maturation de 1 à 2 jours au maximum a été enregistré chez les daphnies exposées au Thirame et à la Bouillie bordelaise par rapport aux témoins, ce qui pourrait signifier probablement la faible sensibilité de ce paramètre aux effets toxiques des fongicides. De tels résultats ont été rapportés par Hu et *al.*, (2018), qui ont montré que l'effet des nanoparticules d'argent sur la ponte des daphnies était beaucoup plus faible et largement négligeable sauf pour les concentrations élevées où le temps de la première ponte a été décalé du 13^{ème} jour chez les témoins au 14^{ème} jour chez les traités. Winner et Farrell (1976), en utilisant le CuSO₄- 5H₂O, ont enregistré un retard de maturation chez *Daphnia magna* exposées à des doses supérieures à 0,04 mg/L. Une autre étude, axée sur les phospholipides, a révélé que le triclosan réduisait le métabolisme de la sphingomyéline (SM) en céramides ou sphingosine favorisant ainsi l'accumulation de SM chez les adultes et les nouveau-nés (Sengupta et *al.*, 2017). Ces effets étaient associés à un retard de développement chez les nouveau-nés et à une maturation retardée et à une fécondité réduite chez les adultes.

L'augmentation du nombre de jours avant la première ponte est conditionnée par les fortes concentrations des xénobiotiques, ce fait est probablement une stratégie d'acclimatation, qui pourrait être appliquée aux situations de stress chimique. La maturité est liée au nombre de mue, ce qui justifie nos résultats, pour chaque instar la taille des daphnies augmente pour atteindre la maturation et arrivent à une dimension ultime pour pondre. Le "délai de la première reproduction" est un bon paramètre pour estimer l'effet des pesticides sur la population de *Daphnia magna*, car la population des daphnies exposées aux toxiques aura un retard dans leur première reproduction et produira une progéniture plus grande et avec une capacité de survie plus élevée que les populations à première reproduction précoce. Ainsi, après que les conditions du milieu seront favorables, la progéniture des parents avec un début de reproduction retardé, survivra plus longtemps et se développera plus rapidement que la progéniture plus courte et avec une capacité de survie plus faible des parents avec un début de reproduction précoce (Villarroel et *al.*, 2000 ; Cleuvers et *al.*, 1997).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

B. Nombre de ponte

La figure (30) illustre la variation du nombre de pontes (indice de fertilité des daphnies mères) chez les daphnies exposées (21 jours) aux différentes concentrations de Thirame et de Bouillie bordelaise.

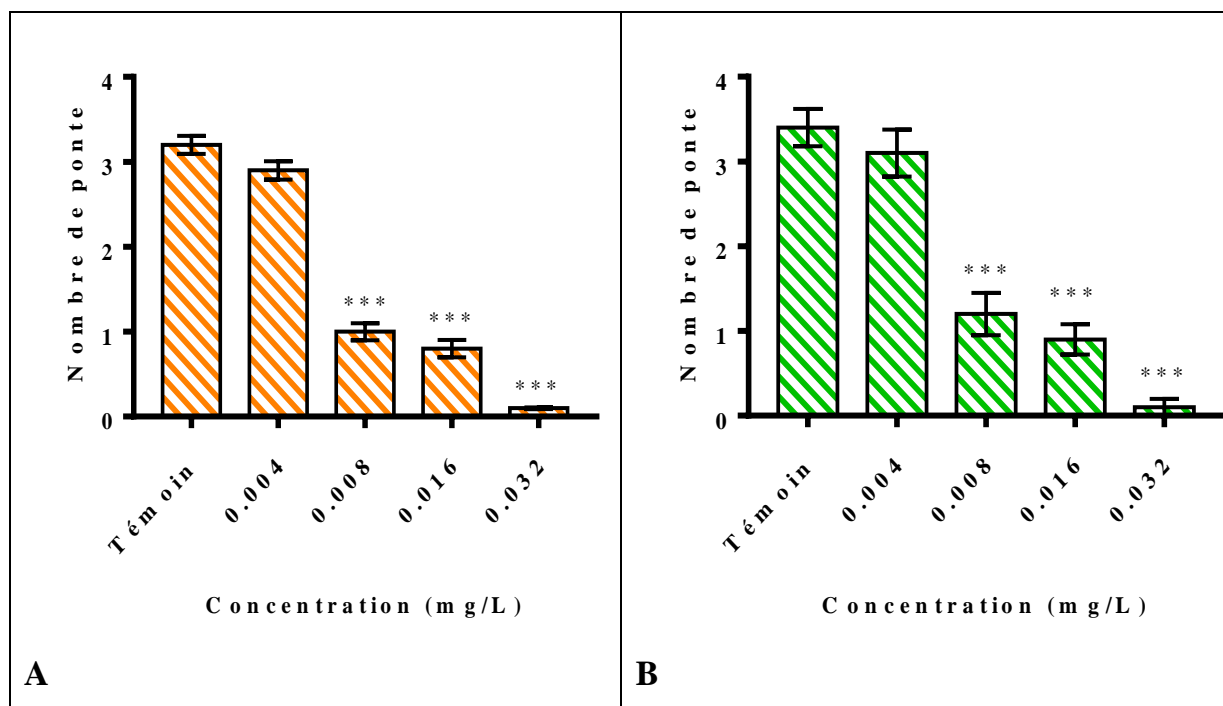


Figure 30. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur le nombre cumulé de ponte de *Daphnia magna* durant 21 jours

Nous notons une diminution significative ($p \leq 0,001$) du nombre cumulé de ponte chez les daphnies traitées par les deux fongicides, plus exactement à partir de la concentration 0,008 mg/L et atteint son maximum à la plus forte concentration (0,032 mg/L) qui est de l'ordre de 30 fois moins que le témoin (3,1) chez celles exposées au Thirame. D'après ces résultats, il ressort que la fertilité des daphnies est fortement affectée aux fortes concentrations des deux pesticides utilisés.

Le rendement de reproduction peut être affecté directement par un toxique (entraînant un changement dans la taille de ponte ou dans la fréquence de reproduction) ou, indirectement, en raccourcissant la durée de vie de la femelle (moins de pontes) ou en modifiant la durée de la maturation reproductive (Winner et Farrell, 1976). Il a été démontré que la faible quantité de nourriture et les facteurs de stress chez *D. magna* affectent la production d'œufs, où les conditions prénatales et postnatales affectent le

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

processus de maturation (Enserink et *al.* 1995). Pendant la période inter-mue, les femelles consomment beaucoup d'algues riches en acides gras dont les Triglycérides puis les stockent dans des gouttelettes lipidiques et sont par la suite allouées à la mue et la formation d'œufs (Goulden et Place, 1990 ; Tessier et Goulden, 1982 ; Sengupta, 2016) sous le contrôle des ecdystéroïdes et les juvénoïdes (Tessier et Goulden, 1982 ; Zaffagini et Zeni, 2009). Il est donc probable que les deux fongicides testés dans notre étude altèrent le métabolisme lipidique chez *Daphnia magna*. Dans une étude récente, sur les effets du tributylétain sur le profil lipidique entier des daphnies au cours d'un cycle de reproduction, il a été démontré que ce composé altérerait l'allocation des Triglycérides aux œufs (Jordão et *al.*, 2015).

D'un autre côté, le stress affecte le budget énergétique qui commence généralement par une mauvaise assimilation des aliments qui réduit ou inhibe la capacité de *D. magna* à croître, à se reproduire, à se maintenir et à se métaboliser (Pane et *al.*, 2003). Le maintien de *D. magna* a été observé comme une priorité plus élevée pour l'allocation d'énergie que la reproduction ou la croissance. Les juvéniles concentrent leurs budgets énergétiques sur la respiration et la croissance, qui sont des paramètres connus pour être affectés par l'exposition aux substances toxiques. Les jeunes adultes *D. magna* accordent autant ou plus de priorité à la reproduction qu'à la croissance, tandis que les adultes plus âgés peuvent accorder plus de priorité à la croissance (Glazier et Calow 1992).

Ces résultats sont en accord avec nos observations lors du test chronique, puisque les daphnies matures qui pondent pour la première fois produisent plus de juvéniles que les mères âgées, que ce soit pour les daphnies témoins ou bien pour celles exposées aux très faibles concentrations du Thirame et de la Bouillie bordelaise. Des résultats similaires ont été rapportés par Day et Kaushik (1987) chez *Daphnia galeata mendotae* exposée au fenvalérate mais aussi par Ferrando et *al.*, (1995) et Toumi et *al.*,(2015) chez des daphnies exposées au lindane et au carbaryle.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

C. Nombre cumulé de nouveaux nés

Lors des changements quotidiens du milieu, les juvéniles libérés par les mères sont récupérés et comptés. Ce suivi nous a permis de calculer la moyenne du nombre cumulé de nouveaux nés témoins et traités durant 21 jours d'exposition comme le montre la figure (31).

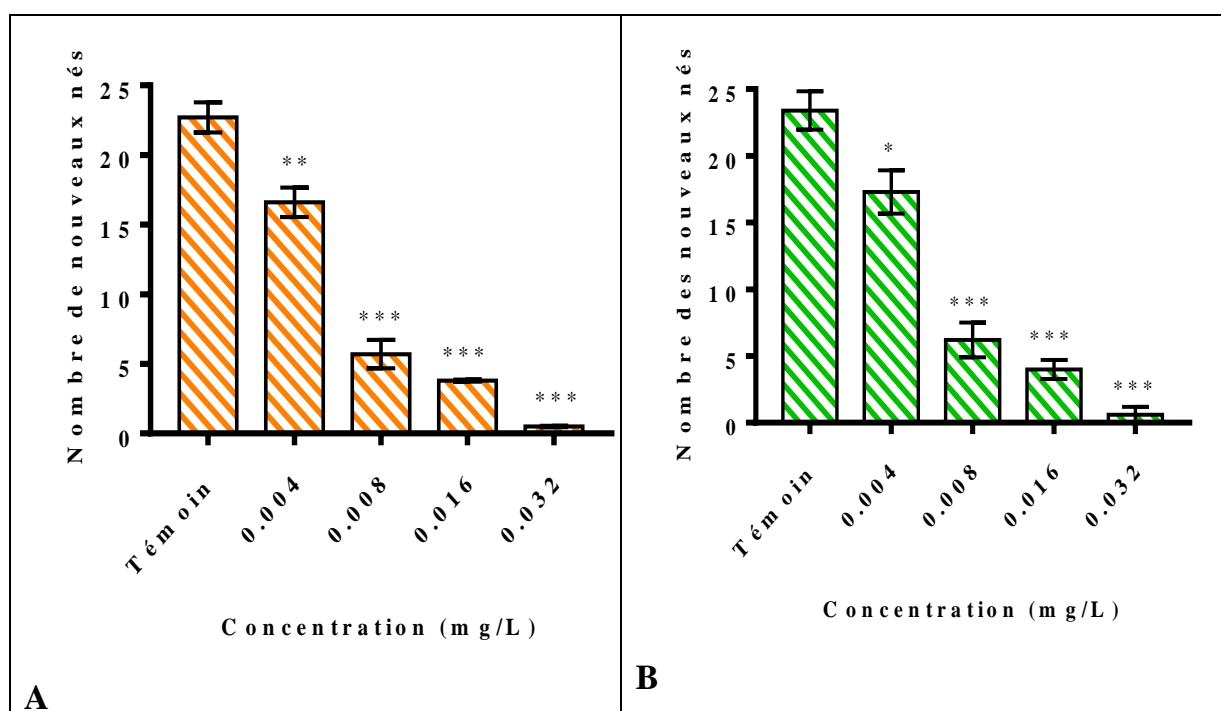


Figure 31. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur le nombre cumulé de nouveaux nés produites par femelle adulte durant 21 jours

Nous remarquons une diminution progressive dose-dépendante et significative ($p \leq 0,001$) de la reproduction des daphnies adultes, à savoir le nombre cumulé de nouveaux nés, qui atteint en moyenne 22,7 néonates chez les témoins. Cependant la fécondité est affectée dès le contact direct avec les fongicides où le nombre de nouveaux née est en moyenne de 16,6 et 17,3 respectivement pour le Thiram et la Bouillie bordelaise à la plus faible concentration (0,004 mg/L), soit une diminution de 27%, et atteint 0,5 néonates chez les daphnies exposées à la plus forte concentration (0,032 mg/L) soit une réduction de 98%.

La reproduction de *D. magna* est un critère d'évaluation très fiable pour de nombreux produits chimiques qui présentent des effets modulateurs endocriniens, en particulier les hormones juvéniles (Wang et al., 2005; Tatarazako et Oda, 2007).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Le pouvoir reproducteur de daphnies exposées aux Thirame et à la Bouillie bordelaise a été significativement influencé et ce surtout au-delà de 0,008 mg/L, le nombre total des néonates produites par daphnies mère est très réduit par rapport au témoin. Il n'est pas surprenant que les paramètres de croissance sont liés à la reproduction (le nombre de nouveau-nés par adulte et le nombre de mues). Les nouveau-nés sont libérés de la poche incubatrice quelques heures avant la mue et que le nombre des nouveau-nés est associé au nombre de ponte (Green, 1963).

Nos résultats peuvent être expliqués par la relation entre le nombre de juvéniles produite et la taille des femelles adultes lors de la ponte par l'incapacité des mères à accueillir des œufs à cause de leur petite taille (taille réduite à cause du nombre limité des mues) suite à l'effet toxiques du Thirame et la bouille bordelaise sur la croissance des daphnies. La relation entre le nombre de juvéniles et la taille des adultes a été bien illustrée par Hanazato (1998).

Cependant, Baird et *al.*, (1991) et Pereira et *al.*, (2007) ont noté que le bromure de sodium, la 3,4-dichloroaniline et le propanil affectent les œufs dans la poche incubatrice. Ces deux phénomènes pourraient expliquer nos résultats. De plus, Eybe et *al.*, (2009) ont découvert la présence du deltaméthrine chez les daphnies exposées à ce dernier dans tous les tissus. Ainsi, il est supposé que l'effet sur la reproduction pourrait également être lié au transport du Thirame ou de la bouille bordelaise ou de leurs métabolites vers les cellules souches dans les ovaires en affectant ainsi la reproduction. Plusieurs études ont mis en évidence le même effet sur la fécondité et la reproduction chez *Daphnia magna* en présence de cuivre, de thiobencarbe et de deltaméthrine (Blaylock et Frank, 1985, Biesinger et Christensen, 1972 ; Winner, 1976 ; Sancho et *al.*, 2001 ; Toumi et *al.*, 2013).

Une autre explication possible des résultats actuels pourrait être attribuée à l'effet potentiel perturbateur de ces fongicides sur les voies métaboliques de *D. magna*. L'augmentation des dépenses énergétiques associée aux conditions de stress, si elle n'est pas compensée par une production d'énergie, va induire une diminution de l'énergie disponible pour les autres fonctions physiologiques.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

En effet, l'énergie va être allouée essentiellement aux processus de maintenance et ne sera donc pas disponible pour la croissance ou la reproduction, ce qui influencera la « fitness » des organismes c'est-à-dire leur capacité à survivre et à transmettre leurs gènes (Durou et *al.*, 2008; Sancho et *al.*, 2009).

Nos résultats semblent être en accord avec ces explications, où les daphnies exposées à long terme au Thirame ou à la Bouillie bordelaise surtout pour les fortes concentrations testés (0,016 et 0,032 mg/L) ont présenté la plus faible performance reproductrice contrairement à des taux élevés de mortalité. Ces situations de stress induisent une augmentation des dépenses énergétiques des individus mobilisant les réserves énergétiques pour la maintenance (voir les résultats du métabolisme basal et la respiration) et vont de ce fait perturber le métabolisme chez les animaux exposés qui vont réagir en diminuant leur production de progéniture, ce qui indique que la reproduction est un paramètre plus sensible chez *D. magna*.

2. EFFETS SUR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES

Comme la survie des animaux dépend de la disponibilité de l'énergie nécessaire pour assurer des fonctions physiologiques telles que l'entretien, la croissance et la reproduction, les marqueurs des perturbations du métabolisme énergétique apparaissent comme de bons outils prédictifs pour détecter les perturbations physiologiques liées aux contaminants, en particulier en ce qui concerne le métabolisme énergétique cellulaire (Maes et *al.*, 2016).

Différents paramètres énergétiques simplifiés sont couramment utilisés en écotoxicologie, tels que les teneurs en réserves énergétiques (glucides, lipides, protéines), comme biomarqueur d'une exposition aux différents toxiques (Choi et *al.*, 2001 ; Le Gal et *al.*, 1997; Mayer et *al.*, 2002 ; Durou et *al.*, 2008).

Le suivi des variations du métabolisme basal des daphnies ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF) traitées aux différentes concentrations des deux fongicides après 24h d'exposition sont illustrées dans les graphiques suivants.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

A. Effets sur la variation du taux de protéines totales

D'après la figure (32), nous constatons que le taux de protéines totales augmente chez les daphnies traitées par le Thirame en fonction des concentrations croissantes et ce par rapport aux témoins où on enregistre une valeur de 2,27 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MF. Cette teneur en protéines double (4,49 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MF) pour la concentration de 0,25 mg/L, et atteint un maximum de 5,29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MF à la plus forte concentration (0,50 mg/L).

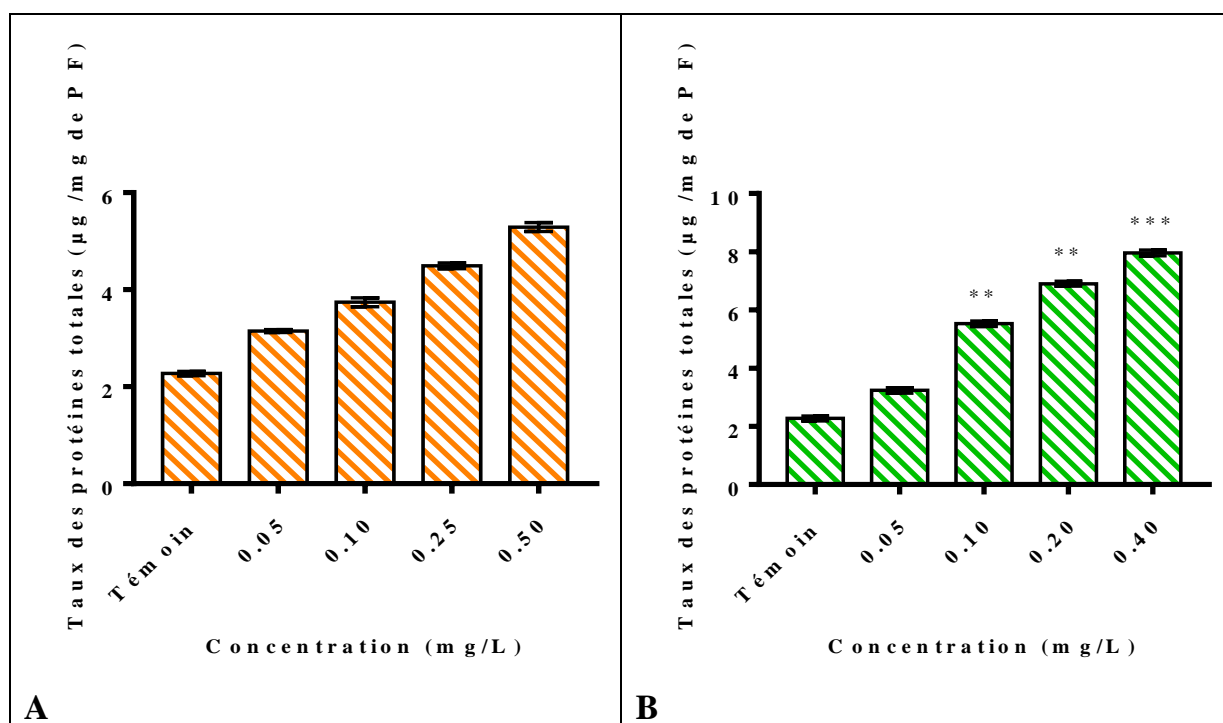


Figure 32. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur l'évolution du taux des protéines totales

De même chez les daphnies traitées par la Bouillie bordelaise où on observe une augmentation significative ($p \leq 0,001$) du taux de protéines totales en fonction des concentrations croissantes du fongicide comparé aux daphnies témoins. Il est de 3,23 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MF à la plus faible concentration et atteint son maximum (7,96 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MF) à la plus forte concentration soit le quadruple du témoin.

Les protéines sont la dernière source d'énergie utilisée lors d'un stress, l'énergie peut être fournie par le catabolisme des protéines (Ribeiro et al., 2001). Chez *Daphnia magna*, bien que les concentrations d'exposition soient élevées, elles ne sont pas suffisantes pour entraîner la mobilisation de ces réserves.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Les résultats obtenus concernant les taux de protéines lors de notre travail sont en accord avec les observations de Bouaricha et *al.*, (2012) et Sbartai (2013) qui ont démontré l'effet stimulateur de l'Emamectine Benzoate et le Bifénazate sur la synthèse des protéines chez le protiste cilié *Paramecium sp.* Cette augmentation pourrait éventuellement représenter une réponse adaptative pour contrer l'augmentation du taux d'oxydation des protéines résultant du stress oxydatif induit par l'exposition au cuivre, comme l'ont noté Giacomini et *al.*, (2014) et / ou peuvent être dus à l'activation de la synthèse protéique impliquée d'une part dans les mécanismes de défense, tels que les métallothionéines (De Boeck et *al.*, 2003 ; Carvalho et *al.*, 2004; Amiard et *al.*, 2006 ; Santos et *al.*, 2010) et d'autre part dans l'expression des protéines de choc thermique (HSP) qui sont des protéines chaperonnes impliquées dans les processus de maintien homéostatique (Ritossa, 1996). Plus récemment, plusieurs travaux ont rapporté une amplification de l'expression des HSP après une exposition à un stress toxique (Lindquist, 1986 ; Clayton et *al.*, 2000) notamment Morales et *al.*, (2011) qui ont indiqué que le cuivre est un perturbateur endocrinien métallique.

Par ailleurs, des études précédentes ont montré que le Thirame et d'autres thiocarbamates sont métabolisés *in vivo* en disulfure de carbone, qui à son tour peut modifier les protéines cellulaires et former des produits d'adduction de lysine (De Caprio et *al.*, 1992), altérant ainsi la membrane cellulaire en provoquant l'agrégation des protéines.

B. Effets sur la variation des teneurs en lipides totaux

Afin de suivre le développement et l'implication des lipides cellulaires structuraux, énergétiques ou bien fonctionnels au cours de l'exposition aux deux fongicides, nous avons procédé en parallèle à l'évaluation des teneurs en lipides totaux comme l'indique les figures (33. A) et (33. B).

Les résultats de la teneur des lipides totaux enregistrés chez les daphnies traitées par le Thirame révèlent une diminution dose-dépendante et très hautement significative de cette dernière. Nous constatons que cette diminution est mieux appréciable qu'à partir de la concentration de 0,25 mg/L soit 2,31 µg/mg MF, pour atteindre son minimum à la plus forte concentration (0,5 mg/L) avec une valeur de 0,97 µg/mg MF soit une diminution de 3 fois le témoin (3,215 µg/mg MF).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

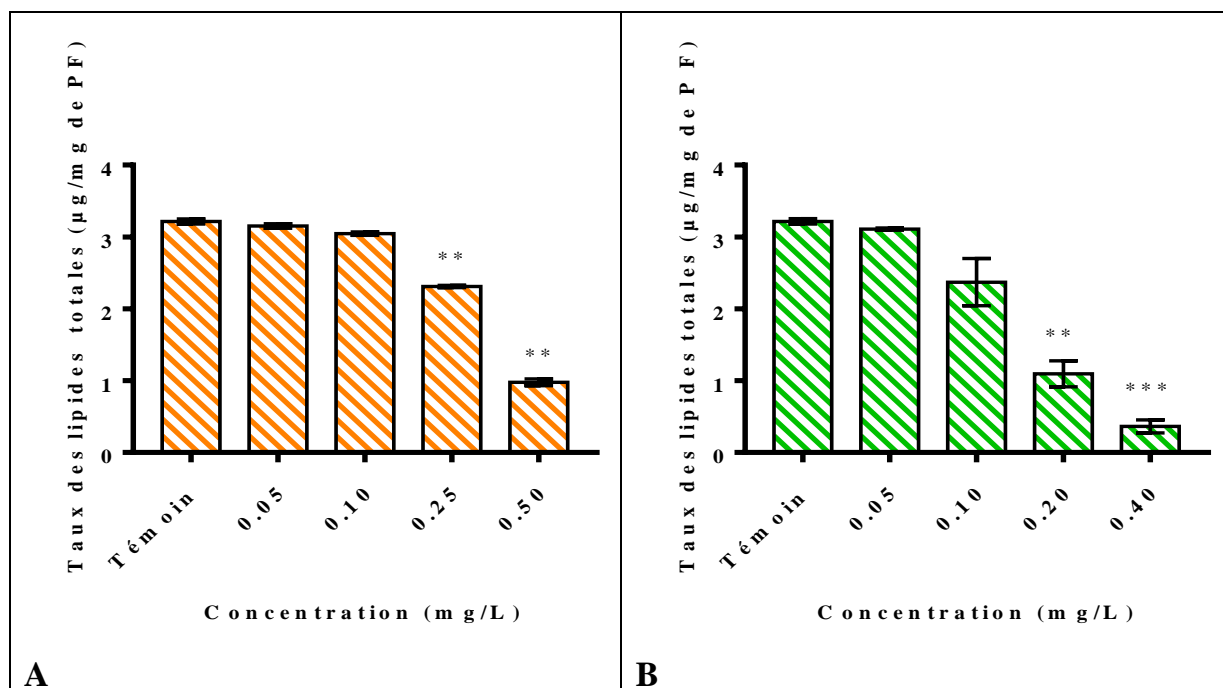


Figure 33. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur l'évolution du taux des lipides totaux

Idem pour les daphnies traitées par la Bouillie bordelaise où on constate que la diminution significative ($p \leq 0,001$) de la teneur en lipides est plus remarquable qu'à partir de la 3^{ème} concentration (0,20 mg/L) qui est de l'ordre de 1,09µg/mg MF soit le tiers de celle des témoins (3,21 µg/mg MF) pour atteindre un maximum à la plus forte concentration qui est de 0,3µg/mg MF soit une diminution de 90%.

Les lipides sont la seconde source d'énergie utilisée lors d'un stress (Sujatha *et al.*, 1996 ; Bhavan et Geraldine, 1997), cependant ils peuvent être mobilisés en premier lorsque la nourriture devient rare (Hashemi *et al.*, 2008). De plus, les premières cibles des ROS sont les lipides et notamment ceux présents dans les membranes cellulaires, ce qui peut induire une modification de la fluidité et de la perméabilité des membranes (Rikans et Hornbrook, 1997 ; Hermes-Lima, 2004).

Chez *Daphnia magna*, les premières réserves énergétiques mobilisées au cours d'un stress toxique sont les réserves lipidiques selon De Coen et Janssen (1997), les réserves sous forme de protéines et de glycogène ne seraient affectées que pour des concentrations d'exposition élevées. Arambourou (2013) suggère que l'augmentation tissulaire en glycogène compense la réduction d'énergie inhérente à la diminution des lipides chez

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Chironomus riparius soumis à un stress toxique. Les lipides seraient, par conséquent, la principale source d'énergie mobilisée en réponse à une exposition métallique.

Dans notre travail, la diminution des teneurs en lipides totaux enregistrée peut être expliqué par le fait que les daphnies, traitées par les fongicides, ont mobilisé les lipides lors d'une privation alimentaire puisque au cours de l'exposition les organismes restent à jeun. De pareils résultats ont été mis en évidence chez certaines espèces de poissons (Sargent et *al.*, 1989 ; Hashemi et *al.*, 2008 ; Binner et *al.*, 2008).

D'autre part, le catabolisme des lipides peut être dû à la formation de lipoprotéines qui sont utilisées pour réparer les dommages causés aux cellules ou aux organites et/ou à leur utilisation par les cellules pour leurs besoins énergétiques (Rambabu et Rao, 1994 ; Ribeiro et *al.*, 2001 ; Sancho et *al.*, 2009). Parallèlement, l'effet réducteur des fongicides testés sur les lipides membranaires pourrait être due à leur 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).

Par ailleurs, l'augmentation des dommages des membranes cellulaires lipidiques, mise en évidence grâce à la mesure du malonealdéhyde (MDA), pourrait également se traduire par une diminution du contenu tissulaire en lipides (Voir résultats de la peroxydation lipidique) et que la propriété lipophile du Thirame peut en outre faciliter sa rétention dans les tissus adipeux, et peut ainsi exercer des effets cytotoxiques en modifiant la membrane cellulaires (Rath et *al.*, 1995).

Plusieurs auteurs (Cowgill et *al.*, 1984; Elendt, 1989) ont souligné l'importance de la fraction lipidique pour le développement des embryons et ont suggéré que chez les daphnies adultes, la majorité de la teneur en lipides est impliquée dans la production d'œufs. On peut donc émettre l'hypothèse que, si le statut énergétique d'une femelle est altéré (plus précisément les réserves lipidiques sont consommées) pour résister à l'exposition au toxique, un mécanisme de compromis pourrait exister entre la survie de la mère et le nombre total de descendants produits. Ces paramètres démographiques des individus sont des éléments clés dans la détermination de la dynamique des populations de l'organisme

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

(Barber et *al.*, 1990). Nos résultats (Voir les résultats de toxicité chronique, le suivie de la reproduction) sont conformes à la réduction de la fécondité des femelles adultes de *Chironomus riparius* constatée par Ducrot et *al.* (2004) après exposition des larves au cuivre, suggérant ainsi un lien possible entre les lipides et la fécondité.

C. Effets sur la variation des taux des glucides totaux

La variation des taux glucidiques chez les daphnies traitées aux différentes concentrations du Thirame et de la Bouillie bordelaise, après 24h d'exposition, est rapportée dans les graphiques ci-dessous.

Nos résultats révèlent que chez les daphnies traitées par le Thirame, la teneur en glucides totaux augmente significativement ($p \leq 0,01$) en fonction des concentrations croissantes comparée aux daphnies témoins où on enregistre une valeur de 3,22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MF. Le taux maximal (5,60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MF) des teneurs en glucides est enregistré chez les daphnies exposées à la plus forte concentration (0,50 mg/L).

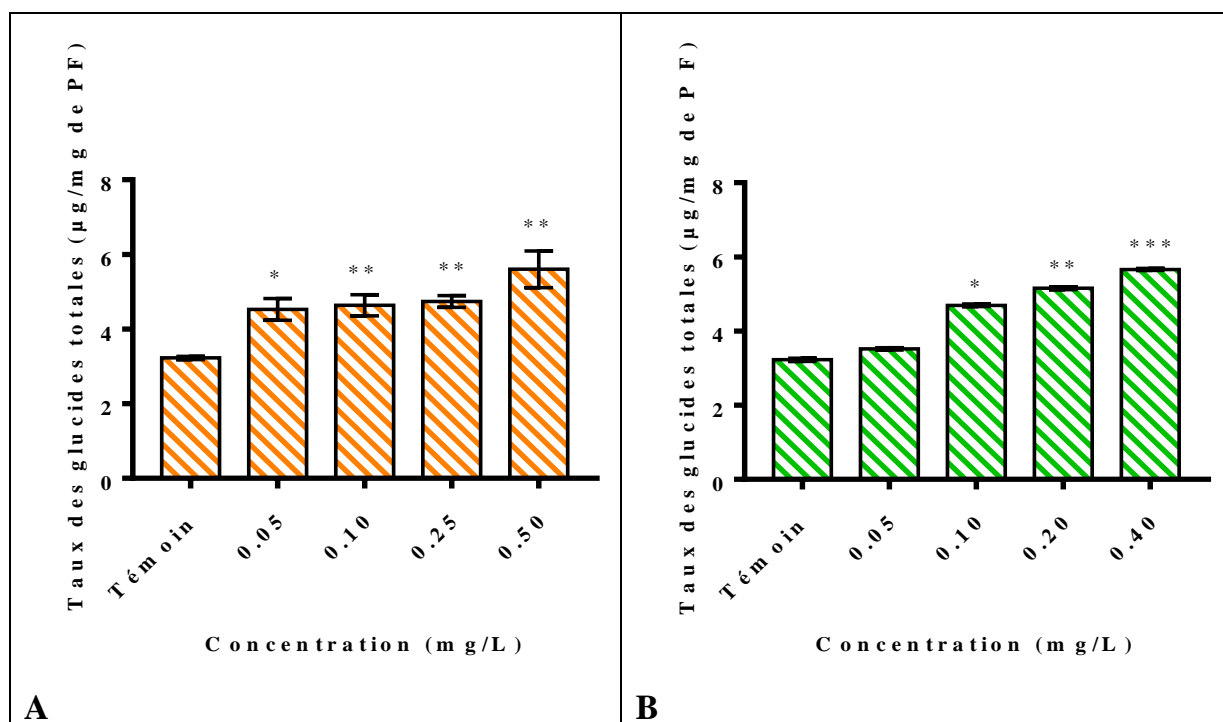


Figure 34. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur l'évolution du taux des glucides totales

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Chez celles traitées par la Bouillie bordelaise, nos résultats révèlent que la teneur en glucides totaux tend à augmenter significativement ($p \leq 0,001$) et de manière dose-dépendante comparé aux daphnies témoins. L'augmentation est mieux appréciable à partir de la 2^{ème} concentration (0,10 µg/mg MF) où on enregistre 4,69 µg/mg MF et atteint un maximum à la plus forte concentration (0,40 mg/L) avec une valeur de 5,66 µg/mg MF et ce comparé aux témoins (3,22 µg/mg MF).

Dans la littérature scientifique, les effets des pesticides sur les réserves énergétiques induisent, de manière générale, une diminution de chaque type de réserve énergétique (Rambabu et Rao, 1994 ; Ribeiro et *al.*, 2001 ; Dutra et *al.*, 2009), avec en parallèle une augmentation de la concentration en glucose sanguin (Bhavan et Geraldine, 1997 ; Sancho et *al.*, 1998).

Dans notre étude, l'exposition aux fongicides a entraîné une augmentation significative et dose dépendante du taux des glucides totaux. Cette augmentation peut être due à une augmentation de la concentration en sucres libres, ou est probablement liée au besoin énergétique de l'organisme, c'est-à-dire que lors d'un stress, l'organisme a besoin de glucose afin de produire de l'ATP via le métabolisme aérobie, comme observé chez des tilapias du Nil (*Oreochromis niloticus*) exposés à du cadmium (Almeida et *al.*, 2001) ou bien chez des poissons exposés au cuivre et au éthofumésate (Maes, 2014).

Pour les vertébrés, les effets des contaminants sur la teneur des réserves énergétiques vont essentiellement dépendre de l'organe, tandis que chez les invertébrés les réserves énergétiques sont quantifiées sur l'individu entier (Ribeiro et *al.*, 2001 ; Dutra et *al.*, 2009). Donc il faut distinguer la différence entre les glucides (sucres simples) forme utilisable et le glycogène (sucre complexe) forme de stockage. Les résultats de la littérature mettent en évidence une diminution du glycogène en présence d'un stress toxique chez *Gammarus roeseli* (Gismondi et *al.*, 2012) et chez *Lymnea acuminata* (Tripathi et Singh, 2002).

Cette augmentation des glucides totaux est liée probablement à la dégradation du glycogène en sucres et à son utilisation pour fournir de l'énergie afin de lutter contre un stress. Cette hypothèse est cohérente avec l'étude de Maes et *al.*, (2016) chez les Juvenile de *Rutilus rutilus* , mais la voie anaérobie est moins efficace en terme de production

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

d'énergie cellulaire qui peut entraîner une utilisation intensive des réserves d'énergie. En outre, les daphnies pourraient privilégier l'utilisation des lipides et non du glycogène pour lutter contre un stress toxique. Tout d'abord, le Thirame ou la Bouillie bordelaise peut éventuellement induire une hypoxie cellulaire. En effet, le métabolisme anaérobie est mis en place, ce qui permet une augmentation de la glycolyse dans les cellules. Plusieurs contaminants sont connus pour induire une activation du métabolisme anaérobie, suite à une hypoxie cellulaire, comme les organophosphorés (Begum et Vijayaraghavan, 1999), le carbofuran (carbamate) (Dutra et *al.*, 2009), l'endosulfan (organochloré) (Ribeiro et *al.*, 2001), le tébuconazole (fongicide) (Sancho et *al.*, 2009) et le cuivre (De Boeck et *al.*, 1997 ; Hashemi et *al.*, 2008).

Le glycogène constitue, en effet, une réserve importante d'énergie pour les phases de mue et de métamorphose ainsi que pour le stade adulte, au cours duquel l'organisme vivant ne s'alimente pas (Hamburger et *al.*, 1996). Une perturbation du métabolisme des glucides peut être induite indirectement par un stress environnemental via un effet sur les glandes endocrines. En effet, certaines hormones sont impliquées dans le métabolisme des glucides, comme par exemple les catécholamines peuvent provoquer une augmentation de la concentration du glucose sanguin en mobilisant les réserves en glycogène et les corticostéroïdes contribuent à la maintenance de l'hyperglycémie via la stimulation de la gluconéogenèse (Nakano et Tomlinson, 1967).

3. EFFET SUR LES BIOMARQUEURS DU STRESS OXYDANT

A. Effet sur l'évolution du taux de Glutathion (GSH)

L'évolution du taux de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines) chez *Daphnia magna* témoins et traitées avec les différentes concentrations des deux fongicides est représentée dans les figures suivantes.

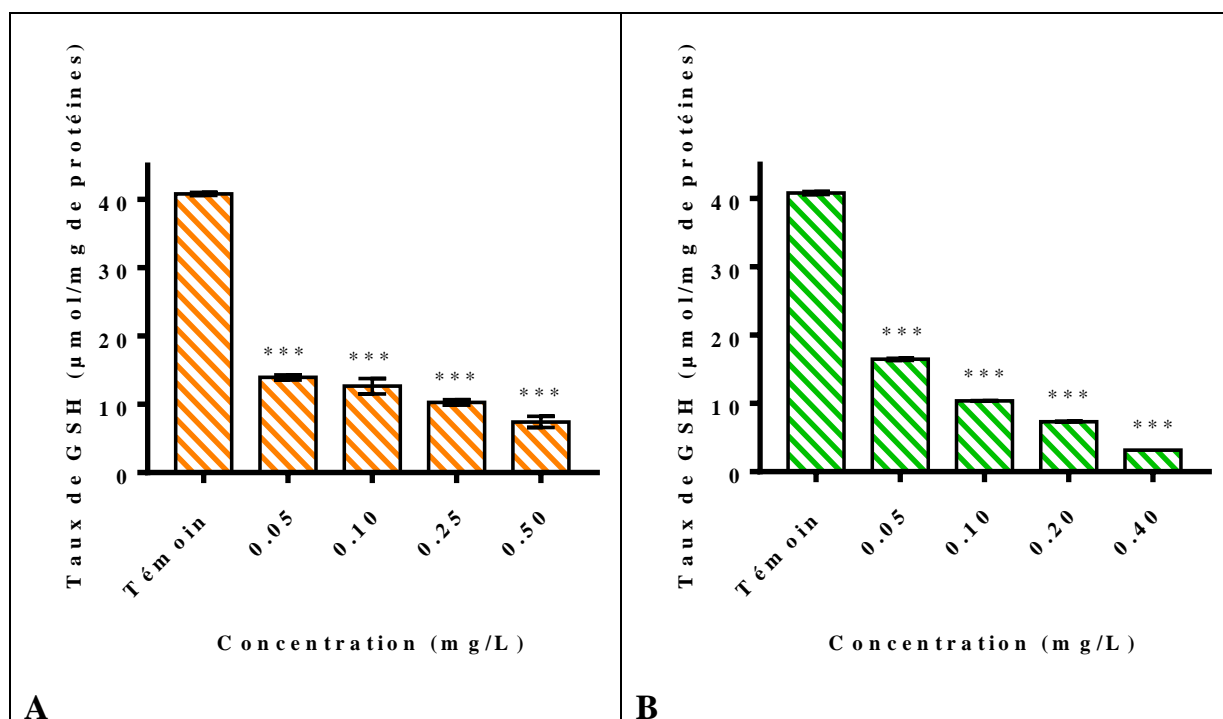


Figure 35. Variation du taux de GSH chez *Daphnia magna* exposée aux concentrations croissantes du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise

D'après la figure (35), une diminution significative ($p \leq 0,001$) du taux de GSH est enregistrée chez les daphnies traitées par le Thirame par rapport aux témoins où on enregistre une valeur de l'ordre de 40,81 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines. Cette diminution est appréciable dès le premier contact avec le fongicide (0,05 mg/L) où on note une réduction de plus de la moitié par rapport aux témoins (10,30 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protéines) et qui atteint un taux (7,41 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Protéines) à la plus forte concentration soit plus de 80%.

De même pour les daphnies traitées par la Bouillie bordelaise où on observe une diminution du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes du fongicide et ce par rapport aux daphnies témoins. La valeur minimale est enregistrée pour la plus forte concentration qui est de l'ordre de 3,17 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines soit une réduction de près de

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

90% par rapport aux témoins (40,81 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines). Des différences très hautement significatives ont été décelées suite à l'utilisation de l'ANOVA.

De nombreuses études *in vivo* ont été menées sur la toxicité du Thirame, cependant très peu d'études ont été effectuées pour évaluer les dommages spécifiques au niveau cellulaire, ainsi les connaissances détaillées sur le mécanisme moléculaire et les dégâts biochimiques responsables de sa cytotoxicité induite restent mal comprises (Cereser *et al.*, 2001). Beaucoup de recherches traitent de la toxicité du Thirame, notamment sur les gonades des rats par Mishra *et al.*, (1998) et Stoker *et al.*, (2003) et sur le foie par Dalvi et Deoras (1986) mettant en évidence son hépatotoxicité. Les dithiocarbamates tels que le Thirame sont des chélateurs de métaux, il a été démontré qu'ils induisent un stress oxydatif chez les mammifères (Heikkila *et al.*, 1976; *et al.*, 1979; Kelner *et al.*, 1989) en utilisant des fibroblastes d'hamsters chinois (Grosicka *et al.*, 2005) ; des poules (Shahzad *et al.*, 2014) et des mollusques (Emmanouil, 2008). Concernant la Bouillie bordelaise qui est à base de cuivre, il a été démontré que le cuivre peut interférer avec plusieurs voies métaboliques.

L'effet du cuivre sur la production de ROS et des réponses antioxydantes a été observé dans plusieurs études et chez de nombreuses espèces aquatiques, chez le poisson zèbre *Danio rerio* (Paris-Palacios *et al.*, 2000 ; Craig *et al.*, 2007) ; chez les bivalves *Corbicula fluminea* (Bigot *et al.*, 2011), chez *Diplodon chilensis* (Sabatini *et al.*, 2011) et chez les cladocères comme *Daphnia magna* (Mwaanga, *et al.*, 2014 ; Bae *et al.*, 2016).

A l'état réduit (GSH), le glutathion protège les cellules contre un changement dans le statut redox et sa concentration reflète le potentiel antioxydant des cellules. Toutefois, une augmentation de la forme oxydée (GSSG) est indicative d'un stress oxydant (Jin *et al.*, 2010 ; Akerboom et Sies, 2017). Il intervient également comme substrat des glutathion peroxydases ainsi que dans la conjugaison des substances électrophiles catalysée par les glutathion transférases. Il joue aussi un rôle dans la synthèse des protéines, le transport des acides aminés, la réserve et le transport de la cystéine, sert de cofacteur pour plusieurs enzymes et permet le maintien du statut thiol des protéines en empêchant l'oxydation des groupes -SH (Meister et Anderson, 1983 ; Bray et Taylor, 1993; Lu, 1999). La diminution du taux de GSH enregistrée chez les daphnies traitées par les deux fongicides indique son

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

utilisation comme antioxydant contre le flux important d' H_2O_2 ou bien son utilisation en tant que substrat d'enzymes antioxydantes (Ji et *al.*, 1992 ; Sun et *al.*, 2009).

Après administration du Thirame aux cellules, ce dernier se dégrade en métabolites toxiques à savoir diméthylthiocarbamate, disulfide de carbone et diméthylamine (Elskens et Penninckx, 1997 ; Dalvi et *al.*, 2002 ; Pocsi et *al.*, 2004). Deux effets sont liés à la structure du Thirame : i) les effets oxydants dus au pont disulfure de la molécule qui peuvent être responsables des échanges thiol-disulfure avec les groupes SH de protéines cellulaires et cofacteurs expliquant ainsi sa forte interaction avec les groupes sulfhydryles des molécules cellulaires critiques comme le GSH, et ii) l'effet réducteur due à la fonction SH de l'anion diméthylthiocarbamate. Il est probable que d'autres thiol-protéines et thiol-enzymes pourraient être les molécules cibles de l'oxydation par le Thirame (Cereser et *al.*, 2001). L'anion dithiocarbamate, est considéré comme la fraction active à effet fongicide en raison de ses propriétés chélatantes. Elskens et Penninckx (1997) ont pu expliquer cette épuisement en GSH par le fait que ce dernier peut réagir avec le Thirame pour donner l'acide diméthylthiocarbamique et du GSSG.

Bien que l'acide diméthylthiocarbamique ne réagit pas avec le GSH, le mécanisme de son effet implique apparemment l'oxydation de l'acide diméthylthiocarbamique en Thirame, donc la voie de régénération du GSH catalysée par la Glutathion réductase (GR) et le NADPH comme donneur d'électrons au ferricytochrome qui est inhibé, ce qui justifie cette déplétion du GSH chez les daphnies traitées, donc la disparition de l'acide diméthylthiocarbamique du système pourrait contribuer à la diminution du GSH. Ceci a été confirmé par les tests de Elskens et Penninckx (1997) sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le maintien et la régénération des GSH dans la cellule sont contrôlés principalement par sa biosynthèse de novo à partir des acides aminés à travers le cycle glutamyl, et par la réduction du GSSG par la glutathion réductase (GR) grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons (Elskens et Penninckx, 1997 ; Garait, 2006). On peut donc émettre l'hypothèse que le Thirame abaisse le niveau intracellulaire du GSH en influençant les étapes de sa synthèse, ou bien en diminuant l'activité de la GR, suggérant ainsi que la régénération du GSH à partir du GSSG est inhibée dans les cellules des daphnies traitées conduisant à un déséquilibre oxydatif entraînant ainsi la mort cellulaire.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Aussi, Cereser et *al.*, (2001) ont enregistré une déplétion du GSH suite à son interaction avec le Thirame, et une augmentation remarquable du GSSG conduisant par la suite à la mort cellulaire. Pour leur part, Elskens et Penninckx, (1995) ont révélé que le Thirame est un inactivateur irréversible de la GR qui interagit spécifiquement avec le groupe distal de son site actif (Cys58) qui interagit avec le substrat. De même pour Grosicka-Maciąg et *al.* (2008) qui ont rapporté de pareils résultats avec une carbonylation des groupes thiol actifs de l'enzyme réduite dans les cellules fibroblastiques traitées au Thirame.

Concernant la Bouillie bordelaise, le cuivre se lie aux molécules contenant du thiol, tel que le GSH ou les métallothionéines (MT), où il est piégé (Roesijadi, 1996). La réduction du glutathion est considérée comme une première ligne de défense cellulaire contre les métaux en les chélatant et en les détoxifiant, en éliminant les oxyradicaux et en participant aux réactions de détoxification catalysées par les glutathion peroxydases (Sies, 1999). De plus, il est connu que le cuivre est capable de se lier au GSH pour former un complexe stable GS-Cu(I) (Sanchez et *al.*, 2005 ; Eyckmans et *al.*, 2011).

Le pool GS – Cu (I) est la source de la synthèse d'autres métalloenzymes telles que la SOD ou la cytochrome oxydase, ainsi que pour la production de ROS par oxydation de GS – Cu (I) (Freedman et *al.*, 1989). Il est donc probable que la formation de ce complexe GS-Cu(I) a un effet inhibiteur sur le système de régénération du GSH (sur l'activité de la GR et/ou synthétase), comme le suggère Maes, (2014). Cet épuisement du GSH peut avoir contribué à la toxicité précoce observée aux concentrations élevées du cuivre, comme le suggèrent Connors et Ringwood (2000) chez *Crassostrea virginica* et Mwaanga et *al.*, (2014) sur *Daphnia magna*. Le cuivre engendre les ROS par la réaction de Fenton, d'abord le superoxyde qui peut également être généré par réaction de Cu (I) avec O₂, et Cu (I) peut être généré par réduction de Cu (II) avec du glutathion et les Cu/ZnSOD et Mn-SOD les convertissent en peroxyde. Ensemble, le peroxyde et le superoxyde forment la forme des ROS la plus réactive et destructrice (Linder, 2012). De ce fait le cuivre réagit avec du GSH pour donner sa forme oxydée GSSG ce qui entraîne au cours des processus de détoxification la diminution du taux GSH cellulaires chez les daphnies traitées par la Bouillie bordelaise.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

En fin, la capacité des cellules à maintenir les niveaux de GSH est essentielle pour la fonction cellulaire et la survie. L'épuisement du GSH cellulaire peut perturber de nombreuses fonctions cellulaires et, en particulier, réduire la capacité de piéger les radicaux libres et les ROS, surtout les superoxydes, augmentant ainsi le potentiel oxydant général des cellules. La preuve que des processus oxydatifs se produisent chez les daphnies traitées au Thirame et à la Bouillie bordelaise est suggérée par l'évaluation de la peroxydation lipidique (voir le taux MDA).

B. Effet sur l'évolution du taux du Malondialdéhyde (MDA)

La figure (36) illustre l'évolution du taux d'MDA, signe de peroxydation lipidique, chez *Daphnia magna* témoins et traitées en présence des différentes concentrations des deux xénobiotiques.

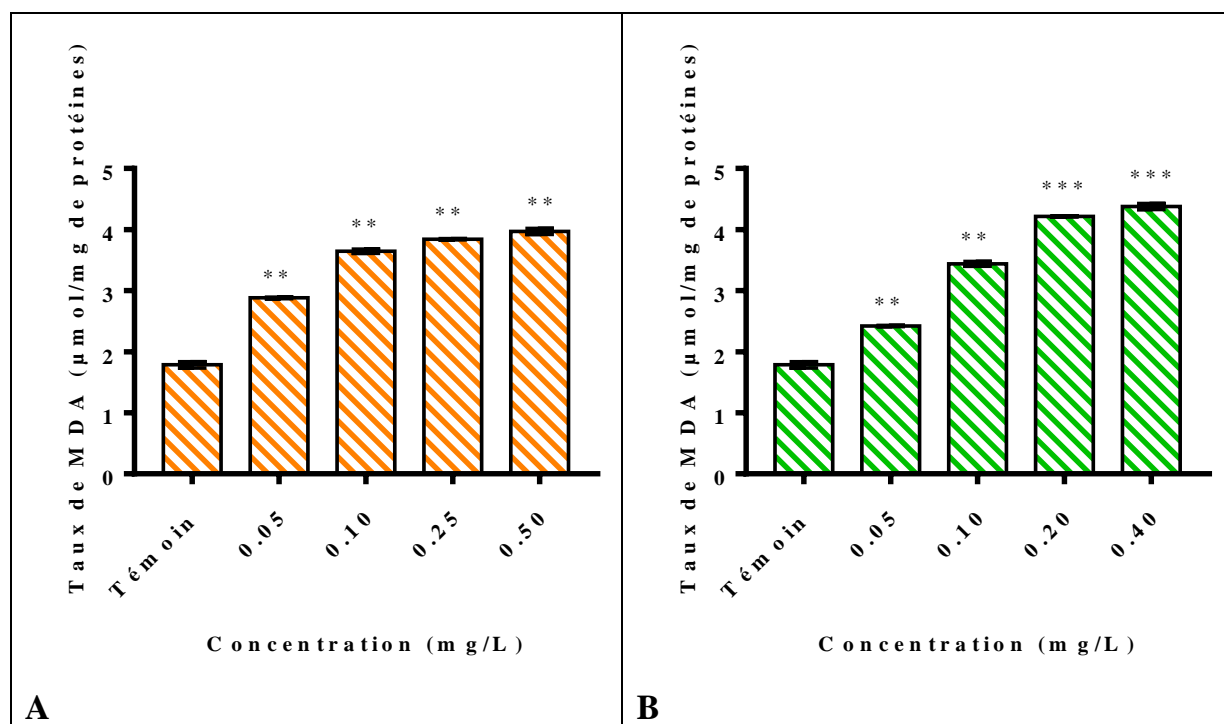


Figure 36. Variation du taux de MDA chez *Daphnia magna* exposée aux concentrations croissantes du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise

Nos résultats montrent qu'en présence du Thirame, le taux de MDA augmente significativement ($p \leq 0,01$) en fonction des concentrations croissantes. Ce taux est deux fois plus élevé (2,88 µM/mg protéines) à 0,05 mg/L par rapport au témoin où on enregistre une valeur de 1,78 µM/mg protéines. La valeur maximale est notée pour la plus forte concentration (0,50 mg/L) avec un taux de 3,97 µg/mg protéines.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Pareil pour les daphnies traitées par la Bouillie bordelaise, où on observe une augmentation significative ($p \leq 0,001$) du taux de MDA par rapport aux daphnies témoins. Le maximum est noté pour la plus forte concentration (0,40 mg/L) qui est de l'ordre de 4,37 μ M/mg de protéines.

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré d'insaturation élevé (Pamplona et *al.*, 2000 ; Hulbert, 2005). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, l'acide thiobarbiturique (TBARS), le 4-hydroxynonanal (4- HNE) et le malondialdéhyde (MDA) sont considérés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Cadenas et Sies, 1998; Gutteridge, 1995 ; Garait, 2006 ; Li et *al.*, 2007). Le MDA est l'un des aldéhydes cellulaires les plus toxiques, car il présente des effets métaboliques, génotoxiques et mutagènes ainsi qu'une activité inhibitrice sur la prolifération cellulaire (Esterbauer et *al.*, 1991).

L'augmentation des taux de MDA enregistrée chez les daphnies traitées par le Thirame et la Bouillie bordelaise indique que les défenses antioxydantes sont altérées ou surmontées. La nature lipophile des Dithiocarbamates les rend aptes à passer à travers la membrane cellulaire et de se lier aux entités structurales et fonctionnelles cruciales des cellules, ce qui finit par entraîner des perturbations métaboliques (Rath et *al.*, 2011). Des études métaboliques sur le Thirame ont montré que ce produit chimique subit une désintoxication ou une biodégradation pour donner différents métabolites comme le disulfure de carbone (CS₂) et le thiourea. (Edwards et *al.*, 1991 ; Sun et *al.*, 2009). Suite à la biotransformation du (CS₂), plusieurs produits thiol sont produits. Il a été démontré que ces composés favorisent la production de radicaux libres et la peroxydation lipidique dans plusieurs systèmes in vitro, de plus, les aminothiols tels que l'homocystéine et la cystéine peuvent fonctionner comme pro-oxydants et induire une modification oxydative des LDL (Heinecke et *al.*, 1987 ; Wronska-Nofer et *al.*, 2002).

Lorsque les ROS, tels que les anions superoxyde, les radicaux hydroxyles et les radicaux peroxyde sont générés, ils sont, dans des conditions normales, détoxifiés par des voies antioxydantes telles que le piégeage du GSH et de la GST, suivies par la peroxydation

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

de la catalase et du glutathion (Gill et Tuteja, 2010). Cependant, lorsque ces voies sont débordées ou inactivées, une accumulation de H₂O₂ peut se produire ainsi qu'une production plus élevée de radical OH[•]. Cette molécule est hautement réactive et peut oxyder les constituants cellulaires en lipides (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Barata et al., 2005 ; Grosicka, 2008), qui à son tour peut conduire à des lésions cellulaires (Kaizer et al., 2005; Moraes et al., 2007; Samanta et al., 2014). Le résultat de la diminution en GSH reflète un stress oxydant dans les cellules comme il a été démontré par Cereser et al. (2001) et que son épuisement a conduit à des dommages cellulaires oxydatifs comme le témoigne l'augmentation du taux de MDA.

Plusieurs études ont montré une peroxydation des membranes lipidiques médié par le Thirame. Il a été démontré par Grosicka et al., (2008) que le traitement des cellules fibroblastiques du hamster Chinois V79 au Thirame a entraîné un déséquilibre oxydatif, des diminutions de l'activité CAT et des taux GSH, et finis par une augmentation de la peroxydation lipidique. De leurs côté, Cereser et al., (2001) et Li et al., (2007) révèlent une mort cellulaire nécrotique avec destruction caractéristique de la membrane cellulaire chez les fibroblastes cutanés humaines et chez les cellules tibiales des poules respectivement. Aussi, Salam et al., (2019) ont montré que le Thirame augmente la génération des ROS ainsi que le taux d'MDA dans les érythrocytes, cela provoque une modification oxydative des composants cellulaires, en particulier l'hémoglobine, endommage la membrane plasmique et modifie la morphologie des érythrocytes, et nuis à la capacité du sang à détoxifier les composés nocifs. Une hémolyse accrue peut entraîner une anémie, et une hypoxie comme l'ont rapporté Maita et al., (1991) chez des chiens et des rats traités au Thirame ce qui justifie aussi la diminution de la consommation de l'oxygène dans notre étude chez les daphnies traitées (voir les résultats de la respiration).

Cependant, le mécanisme de toxicité de la Bouillie bordelaise est basé sur le fait que le cuivre est une molécule connue pour induire la peroxydation lipidique (Viarengo et al., 1988 ; Varo et al., 2007 ; Vieira et al., 2009 ; Machado et al., 2013) et comme étant un promoteur du stress oxydant en catalysant les réactions de Haber-Weiss générant ainsi une peroxydation lipidique (Stohs et Bagghi, 1995 ; Matés, 2000).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO•) suffisamment réactif pour arracher un H⁺ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (Atkin et al., 2005). Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la GPX ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéanal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues (Haleng et al., 2007). L'augmentation des taux de MDA suite à la production excessive des ROS induite par le cuivre a été signalé dans plusieurs études chez plusieurs espèces aquatiques comme par exemple chez *Daphnia magna* (Fan et al., 2012 ; Mwaanga et al., 2014); chez le poisson *Dicentrarchus labrax* (Roméo et al., 2000) et les bivalves *Chlamys farreri* (Zhang et al., 2010).

C. Effet sur la variation de l'activité Catalase (CAT)

Les résultats concernant l'évolution de l'activité CAT chez les daphnies témoins et traitées par les concentrations croissantes du Thirame et de la Bouillie bordelaise sont représentées dans la figure 37.

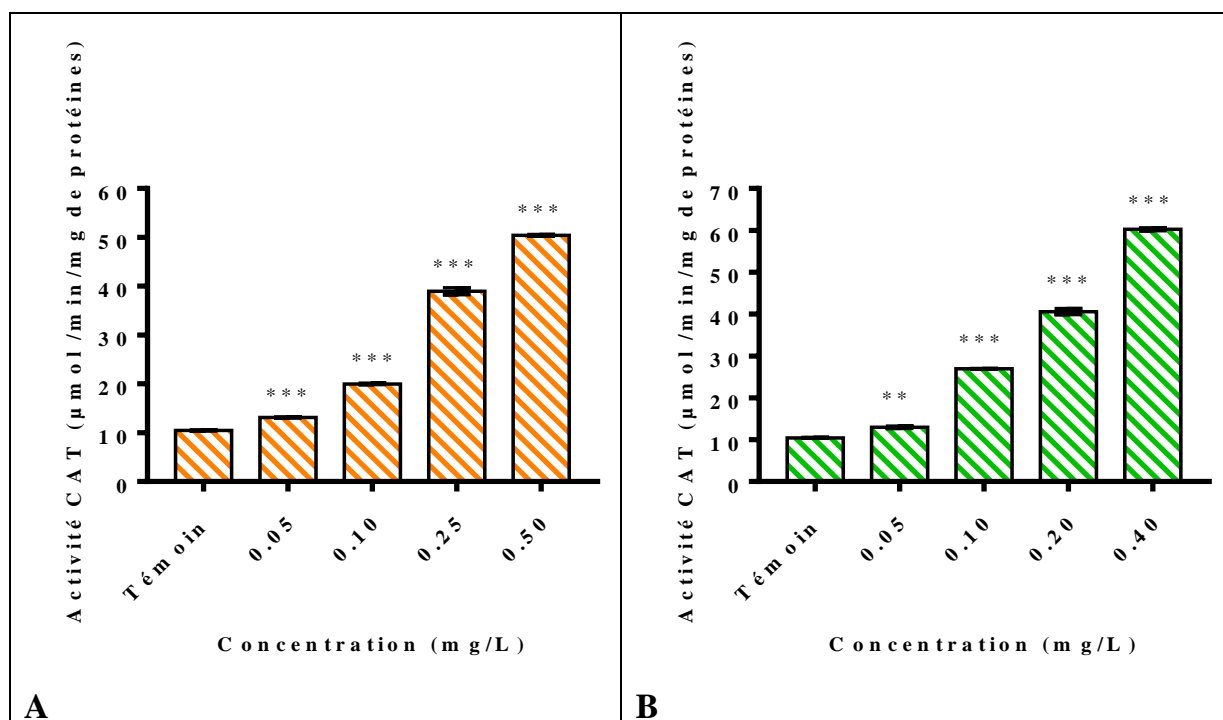


Figure 37. Effets des concentrations croissantes du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur la variation de l'activité CAT chez *Daphnia magna*

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

D'après la figure (37. A), nous remarquons que le Thirame induit une augmentation dose -dépendante et significative ($p \leq 0,001$) de l'activité CAT chez les daphnies traitées par rapport aux témoins. Cette augmentation est de quatre fois le témoin (10,46 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) à 0,25 mg/L, et atteint son maximum à la plus forte concentration (0,50 mg/L) où on enregistre une valeur de 50,42 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines soit cinq fois le témoin.

De même, chez les daphnies exposées à la Bouillie bordelaise (figure 37. B), nous constatons que l'activité CAT augmente en fonction des concentrations croissantes de ce fongicide comparativement aux daphnies témoins se traduisant ainsi par des différences très hautement significatives. Ainsi, l'activité catalase atteint respectivement 40,59 et 60,25 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines pour les concentrations 0,20 et 0,40 mg/L.

La catalase (CAT) est une hémoprotéine, cytosolique ou peroxysomale, elle intervient dans la défense cellulaire contre les ROS et catalyse la réduction de l' H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire. L'affinité de cette dernière pour l' H_2O_2 est élevée uniquement lorsque les teneurs en H_2O_2 sont fortes (Powers et Lennon, 1999 ; Maes, 2014). L'augmentation de l'activité CAT enregistrée lors de notre travail peut être due à la production de H_2O_2 stimulée par la SOD, car la CAT est responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène (Farombi et *al.*, 2008). Le système SOD-CAT est considéré comme la première ligne de défense contre le stress oxydatif (Pandey et *al.*, 2003).

Plusieurs études sur le Thirame ont démontré son impact sur l'activité du système antioxydant et suggèrent sa responsabilité dans la production des ROS forçant les cellules à réagir afin de les neutraliser. Salam et *al.*, (2019) ont mis en évidence une forte production d' H_2O_2 chez les érythrocytes causés par l'induction de l'activité SOD cytosolique. Aussi une augmentation de l'activité catalase comme chez Grosicka et *al.*, (2008) et Yüzbaşıoğlu et Dalyan (2019). Cette induction pourrait être due à l'activité potentielle du Thirame en tant que chélateur des métaux en interagissant avec les enzymes cytoplasmiques dépendantes de Cu / Zn comme la SOD (Marikovsky 2002).

La SOD catalyse la dismutation des radicaux superoxydes en O_2 et en espèces moins réactives H_2O_2 , ce dernier peut participer, par la réaction de Fenton, à la génération d'un radical hydroxyle hautement réactif (OH^\bullet), qui est capable d'initier la peroxydation

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

lipidique en formant un radical peroxyde (LOO^\bullet). Si le superoxyde n'est pas converti efficacement en eau par un niveau adéquat de CAT et de GPx, il peut être préjudiciable à la cellule (Grosicka et *al.*, 2008 ; Yang et *al.*, 2006). Le mécanisme d'interaction du Thirame à ce type d'enzyme reste mal connu, cependant il entraîne à la fin un dysfonctionnement cellulaire et par conséquent la mort de l'organisme. Cattaneo et *al.*, (2012) ont suggéré qu'une augmentation de l'activité de la CAT était positivement corrélée au niveau des TBARS (indicateur de la peroxydation lipidique) et donc qu'elle était liée à une accumulation de ROS dans les cellules.

Parallèlement, nous avons enregistré une induction de la CAT chez les daphnies traitées par la Bouillie bordelaise suggérant ainsi l'élévation de la production des ROS due probablement au cuivre. Ce métal actif est connu pour générer non seulement du H_2O_2 mais aussi des anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et des radicaux hydroxyle ($\text{OH}^{\bullet-}$) en catalysant une variété de réactions (Avery, 2001).

Dans une étude sur une espèce fongique *Beauveria bassiana*, Martins et *al.*, (2014) ont mis en évidence une corrélation entre la Bouillie bordelaise et l'augmentation de l'activité SOD et la production de H_2O_2 conduisant à un déséquilibre oxydatif dans les cellules fongiques. De plus, le cuivre en tant que métal ou bien de sels (CuSO_4) est également connu pour augmenter l'activité CAT chez les espèces aquatiques y compris les crustacés *Callinectes sapidus* et *Daphnia magna* (Brouwner et Brouwner, 1998; Barata et *al.* 2002), les poissons *Brachydanio rerio* (Paris-Palacios e *al.*, 2000) et trois espèces des épinoches épineuses (Sanchez et *al.*, 2005).

Au terme de ces résultats, on peut déduire que le stress oxydatif induit par le Thirame et la Bouillie bordelaise entraîne un déséquilibre entre la SOD productrice de H_2O_2 dans le cytoplasme et les enzymes d'élimination de ce dernier (GPX et CAT) et qui pourrait jouer un rôle dans la peroxydation lipidique des membranes cellulaires.

D. Effet sur la variation de l'activité Gluthation-S-transferase (GST)

La figure (38) met en évidence la variation de l'activité GST chez les daphnies témoins et traitées par les concentrations croissantes du Thirame et de la Bouillie bordelaise.

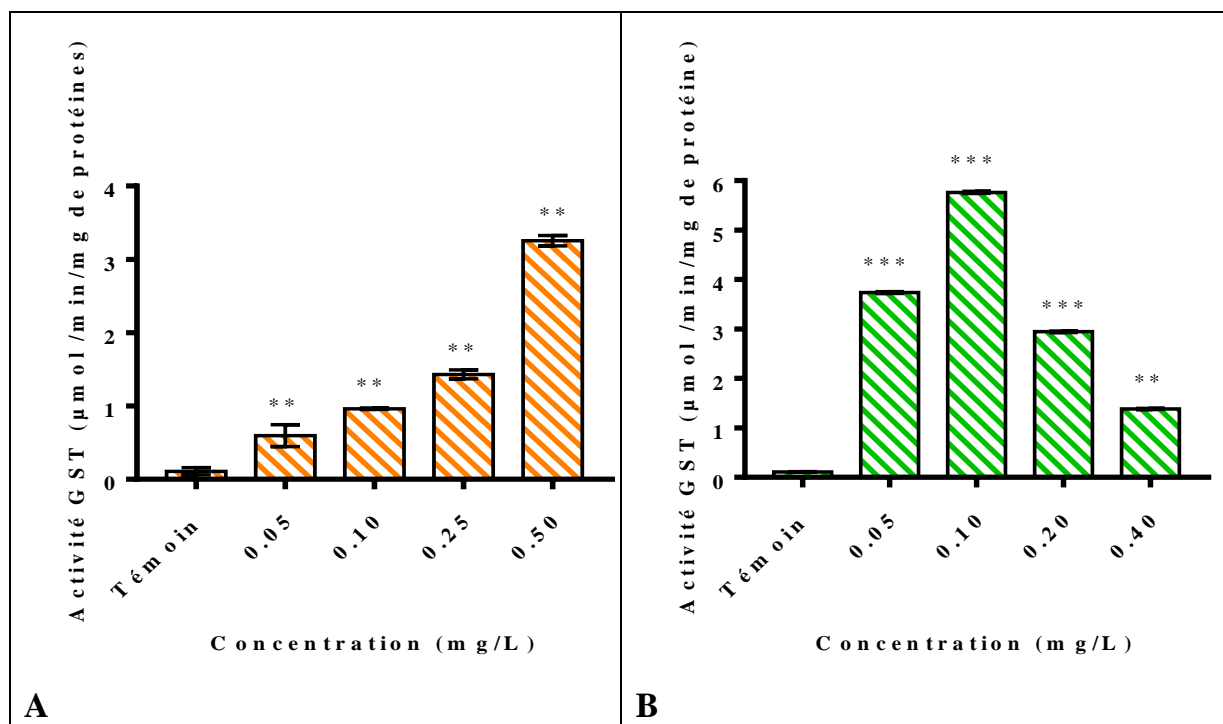


Figure 38. Variation de l'activité GST chez *Daphnia magna* traitées par (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise

D'après la figure (38. A), nous constatons une stimulation significative ($p \leq 0,01$) et dose-dépendante de l'activité GST chez les daphnies exposées au Thirame par rapport aux témoins où on enregistre une valeur de l'ordre de 0,1 µmol/min/mg de protéines. Ainsi cette activité atteint, à 0,25 mg/L, une valeur de 1,43 µmol/min/mg de protéines soit 10 fois le témoin et le maximum est enregistré à la plus forte concentration (0,50 mg/L) avec une valeur de 3,25 µmol/min/mg de protéines soit 30 fois le témoin.

Parallèlement, les résultats de l'activité GST obtenues chez les daphnies exposées à la Bouillie bordelaise révèlent une augmentation significative ($p \leq 0,001$) de cette activité comparée aux témoins. Cependant, un pic est enregistré (5,76 µmol/min/mg de protéines) à la 2^{ème} concentration (0,10 mg/L) où il est 50 fois le témoin (0,1 µmol/min/mg de protéines).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

A partir de la concentration de 0,20 mg/L, on note une diminution de cette même activité qui atteint une valeur de 1,36 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines à la plus forte concentration (0,4 mg/L) mais qui reste toujours supérieure à celle enregistrée chez les témoins.

La GST est une enzyme multifonctionnelle de phase II qui joue un rôle essentiel dans la conjugaison des composés électrophiles (métabolites de phase I) (Van der Oost et *al.*, 2003) et catalyse la conjugaison du GSH avec des substances de nature endogènes ou exogènes (Moreira et Guilhermino, 2005). Elle est considérée en toxicologie comme un biomarqueur enzymatique de la toxicité par les xénobiotiques notamment chez les invertébrés d'eau douce (Domingues et *al.*, 2010).

Dans notre étude, nous avons enregistré deux réponses différentes des deux fongicides testés. L'exposition des daphnies au Thirame a provoqué une induction continue de l'activité GST alors que pour la Bouillie bordelaise nous avons enregistré des différences significatives partagée en deux phases : l'une augmente dépendamment de la dose et l'autre caractérisée par une diminution. Les différences observées peuvent être justifiées par des différences dans les mécanismes de protection contre la toxicité des métaux et les ROS, notamment les GST, cela indique que la réponse des daphnies est différente et dépend des concentrations ou du xénobiotique dont elles sont exposées.

L'augmentation de l'activité GST indique à la fois une forte concentration des xénobiotiques présents dans l'environnement et l'induction du stress oxydatif suite à la production croissante des ROS (Bhagat et *al.*, 2016). Elle est considérée comme un critère d'effet de la population ainsi que de la mortalité chez les invertébrés (Canesi et *al.*, 2010), et peut expliquer l'épuisement du GSH dans les processus de détoxification (Lee et *al.* 2012). En fait Vieira et *al.*, (2009) ont proposés deux hypothèses qui peuvent expliquer cette augmentation : étant donné que la GST est un cofacteur de la GPX, l'augmentation de cette dernière pour faire face au stress oxydatif nécessite plus de cofacteur et par conséquent l'augmentation des niveaux GST. La deuxième hypothèse propose que les GST ont la capacité de lier, stocker ou de transporter des substances pour surmonter le stress par les métaux en produisant une grande quantité d'enzymes qui sera ensuite disponible pour

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

lier les métaux en diminuant leur concentration locale, et par conséquent, leur absorption par l'organisme.

Les xénobiotiques sensibles à la conjugaison du GSH comprennent les pesticides électrophiles tels que les thiocarbamates (Cole et *al.*, 1997). Les GST ont la capacité de catalyser la formation de conjugués GSH-xénobiotiques, dans la phase II, qui sont conjugués à des molécules endogènes solubles dans l'eau, qui est une étape clé de leur détoxification métabolique suivie par l'élimination. Les anions dithiocarbamates sont très réactifs et peuvent se conjuguer avec d'autres molécules contenant des groupes SH et former des chélates métalliques. L'interaction multi-site des dithiocarbamates leur donnent l'avantage d'influencer les activités biologiques de différentes protéines, enzymes et exercent des effets toxiques (Morrison et *al.*, 2010).

Comme le Thirame provoque l'épuisement du GSH lors de sa transformation en acide diméthylthiocarbamique, on peut déduire que l'augmentation des taux GST chez les daphnies traitées est due probablement suite au processus de conjugaison afin de détoxifier le fongicide. Plusieurs études ont démontré l'augmentation de la GST comme réponse au stress oxydatif, citons : *Daphnia magna* après l'exposition au TiO₂ (Kim et *al.*, 2010) ; au Bisphenol A (Jemec et *al.*, 2012) et au différents pesticides Chlorpyrifos, Chlorothalonil et Trifluralin (Song, et *al.*, 2017) et chez *Solanum lycopersicum* après différentes période d'exposition 1, 5 et 11 jours au Thirame (Yüzbaşıoğlu et Dalyan, 2019).

En ce qui concerne l'effet des métaux notamment le cuivre sur ce groupe d'enzymes (GSTs), divers mécanismes d'action et d'effets contradictoires ont été signalés. Certains auteurs ont signalé leurs induction (Regoli et Principato, 1995) et d'autres leurs inhibition (Moreira et Guilhermino, 2005), aussi Ma et *al.*, (2014) ont rapporté une augmentation de l'activité GST lors des premières périodes de traitement chez les escargots *Physa acuta* exposés à l'abamectine et une inhibition à la fin du test. Certaines hypothèses ont été avancées pour expliquer l'inhibition de la GST : elle peut avoir eu lieu soit par action directe du métal sur l'enzyme ou indirectement via la production de ROS qui interagissent directement avec l'enzyme, l'épuisement de son substrat (glutathion - GSH) et / ou la régulation à la baisse des gènes de la GST par différents mécanismes (Shumilla et *al.*, 1998; Roling et Baldwin, 2006).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

De ce fait, la variation de l'activité enzymatique GST observée suite à l'exposition à la Bouillie bordelaise peut être expliquée de la manière suivante : l'accumulation du métal dans les cellules peut entraîner une diminution de la disponibilité du GSH en raison de la liaison et de l'oxydation (Canesi et *al.*, 1999). Le GSH est capable de chélater les métaux peu de temps après leur entrée dans la cellule avant de se complexer aux métallothionéines (MT). Bien que les MT soient des chélateurs du cuivre plus efficaces, l'accumulation de MT à un niveau suffisant pour empêcher la toxicité des métaux nécessite plusieurs heures et par conséquent le GSH et la GST peuvent avoir un rôle déterminant au cours de cette période (Freedman et *al.*, 1989). Lorsque les ROS sont générées, les GST sont engagées pour la détoxification grâce à leur activité peroxydase, mais ce mécanisme de détoxification implique l'oxydation des groupes thiol sur l'enzyme et la destruction des liaisons disulfures, ce qui fait que l'enzyme perd sa fonctionnalité (Letelier et *al.*, 2006).

Afin de restaurer sa fonctionnalité, la GST nécessite que le GSH change chimiquement les groupes thiol oxydés dans leur état réduit d'origine (Klaassen, 2008). Cependant, le GSH est également sensible à l'oxydation (Gill et Tuteja, 2010) et est susceptible d'être simultanément oxydé lorsque les isoformes de la GST sont également oxydées. Dans ce cas, la GST et la GSH seront désactivées. Cela pourrait notamment être le cas lorsque la production de ROS augmente et que la capacité anti-oxydante de l'organisme est dépassée (Barata et *al.*, 2005), conduisant à une inactivation complète des enzymes et à une destruction des protéines. Nos résultats sont en accord avec plusieurs auteurs où plusieurs espèces ont été exposés au cuivre comme par exemple Cunha, et *al.* (2007) sur l'escargot *Nucella lapillus* ; Barata et *al.*, (2005) et Mwaanga et *al.*, (2014) sur *Daphnia magna* exposées respectivement au $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et CuO .

4. EFFETS SUR LE METABOLISME RESPIRATOIRE

Les figures (39 et 40) illustrent l'effet des différentes concentrations du Thirame et de la Bouillie bordelaise sur le métabolisme respiratoire des daphnies.

D'après ce graphique (39), nous constatons que les cellules témoins présentent une respiration tout à fait normale avec une consommation d'O₂ constante et régulière. Cependant, chez les daphnies traitées par les faibles concentrations 0,05 et 0,1 mg/L, nos résultats mettent en évidence une diminution dose-dépendante de la consommation d'O₂.

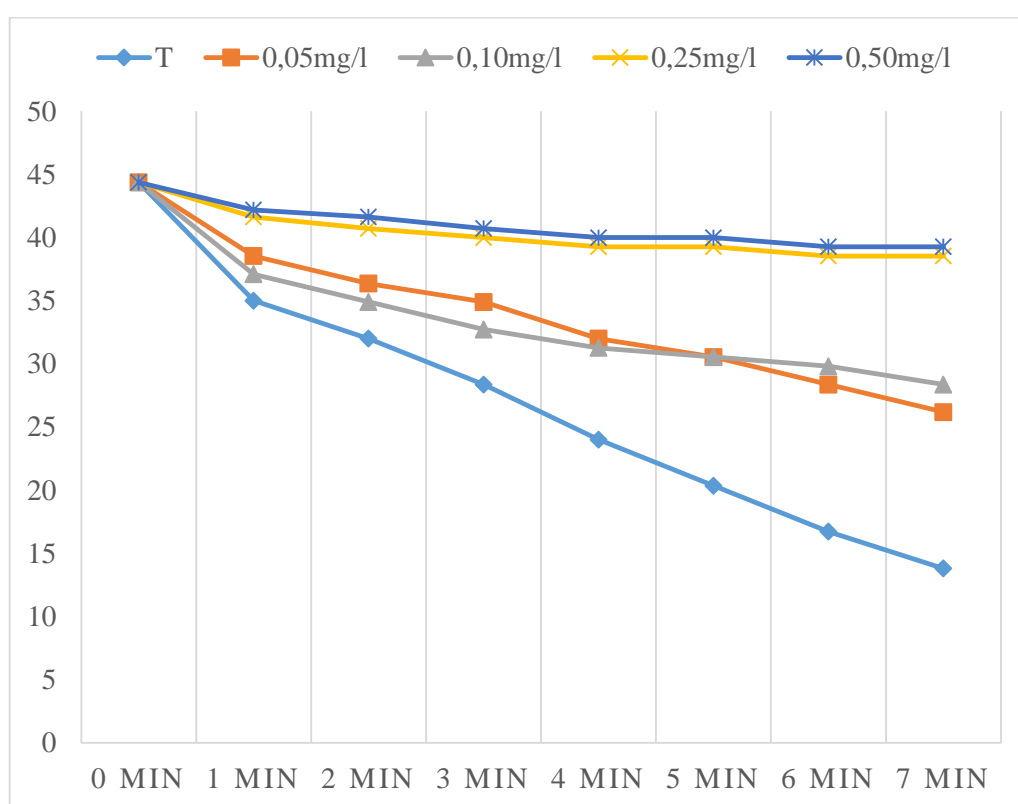


Figure 39. Effet du Thirame sur le métabolisme respiratoire de *Daphnia magna*

Cependant, chez les individus traités par contre, nous notons une inhibition dose dépendante du métabolisme respiratoire, cette consommation devient de plus en plus faible voire négligeable aux fortes concentrations (0,25 et 0,5 mg/L). La consommation d'oxygène passe lentement de 44 $\mu\text{mol/ml}$ ($t=0$) à 39,27 et 38,54 $\mu\text{mol/ml}$ ($t=7$ min) pour les daphnies exposées aux deux plus fortes concentrations du Thirame respectivement.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Parallèlement, les daphnies exposées aux concentrations croissantes de la Bouillie bordelaise (figure 40) révèlent une diminution dose-dépendante de la consommation d'O₂ qui devient de plus en plus faible aux plus fortes concentrations du fongicide ou elle est de 43,63 µmol/ml (t=0) à 38,54 et 39,27 µmol/ml (t=7 min) respectivement à (0,2 et 0,4 mg/L) et ce comparé aux daphnies témoins dont la respiration est tout à fait normale et régulière. La comparaison entre les effets des différentes concentrations des deux fongicides par l'analyse de la variance (ANOVA), indique des différences très hautement significatives ($p \leq 0,001$).

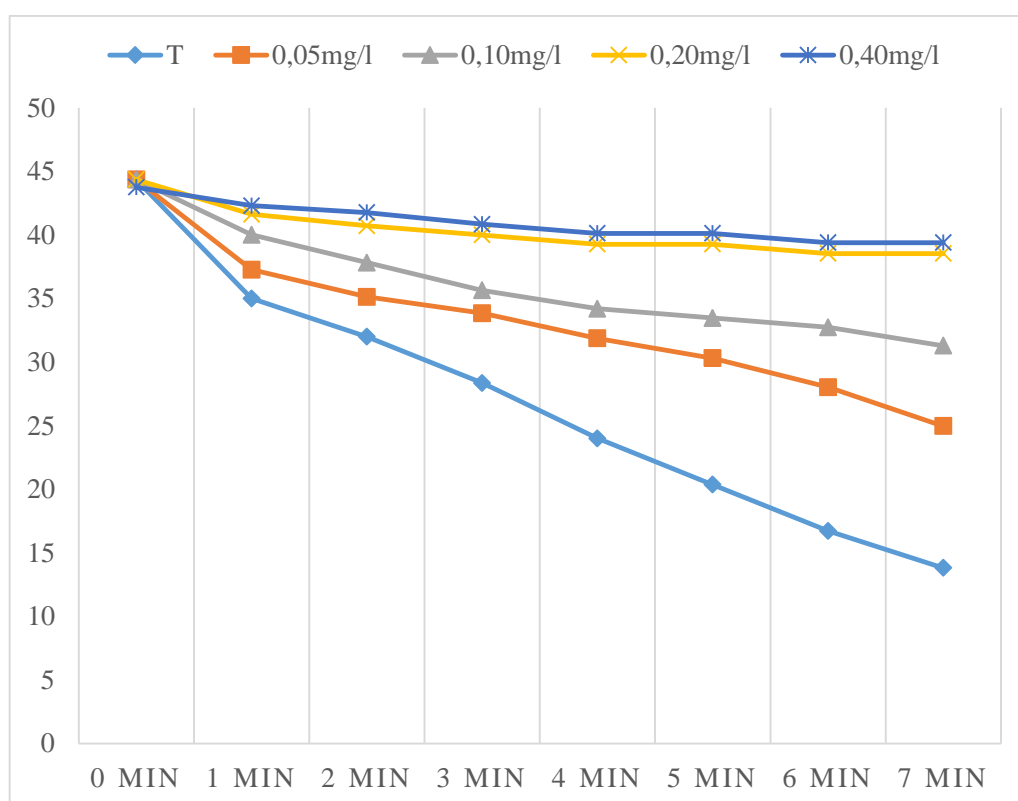


Figure 40. Effet de la Bouillie bordelaise sur le métabolisme respiratoire de *Daphnia magna*

Un changement de la consommation en oxygène dissous peut entraîner une modification de la réponse métabolique des organismes aquatiques, qui peut être notamment perturbée par la présence de contaminants (De Boeck et *al.*, 1995, 2006 ; St-Amand et *al.*, 1999). Les réponses respiratoires ont été utilisées pour surveiller le stress causé par les polluants et la mesure de la consommation d'oxygène chez *Daphnia magna* comme biomarqueur pour la mise en évidence de la présence et la toxicité des polluants trouvés dans les environnements d'eau douce et marins (Martains et *al.*, (2007).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Chez les crustacés, les variations des taux de respiration peuvent dépendre des facteurs intrinsèques (l'âge, la taille et sexe) ou extrinsèques (la température, lumière, pH, présence ou absence de nourriture) (Armitage et Lei, 1979). La respiration mitochondriale au sein des cellules eucaryotes correspond au catabolisme oxydatif de molécules organiques (glucides ou lipides) et génère de l'énergie sous forme d'ATP, qui est assuré par des coenzyme Q ou le cytochrome c sont relativement mobiles alors que d'autres sont inclus dans des complexes protéiques réparties en 4 unités fonctionnelles (complexes I, II, III et IV), là où ces fongicides agissent (Catherine, 2014). Au niveau du catabolisme glucidique, ces produits « multi-sites » (fongicide de contact comme le Thirame et Bouillie bordelaise) sont susceptibles d'inactiver des enzymes de la glycolyse (hexokinase, triose-P-deshydrogénase, pyruvate deshydrogénase), du cycle de Krebs (fumarase, cétooglutanate deshydrogénase) et de la chaîne respiratoire (complexes II et III) (Leroux, 2003).

Duan et *al.*, (2012) ont démontré que le Thiram inhibe la respiration pendant tous les temps d'exposition après l'étude *in vitro* sur *Sclerotinia sclerotiorum*, et il est qualifié d'inhibiteur du complexe mitochondrial III (Leroux, 2003) en inhibant l'activité de la succinate déshydrogénase et de la phosphorylation oxydative mitochondriale entraînant une dégradation du stockage d'énergie (Lowy et *al.*, 1980) ainsi qu'une inhibition d'enzymes LDH impliquées dans le métabolisme des glucides conduisant aux dommages des membranes cellulaires (Elskens et Penninckx, 1997 et Rasaputra et *al.*, 2013). La métabolisation du Thirame engendre l'apparition de trois métabolites entre autres le diméthylthiocarbamate (DMDC), cytotoxique, dont les groupements thiols et le soufre élémentaire entrent en compétition avec l'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire inhibant ainsi les processus respiratoires en générant de l'H₂S.

Concernant la Bouillie bordelaise, l'efficacité du cuivre est corrélée avec un blocage de la consommation d'oxygène et du catabolisme des substances de réserve (lipides, glucides). Aussi diverses formes de sel de cuivre (CuSO₄) libèrent des ions Cu²⁺ directement responsables de la fongi-toxicité (Leroux, 2003). Maes (2014) explique l'effet toxique du cuivre sur le métabolisme respiratoire des daphnies à plusieurs niveaux. D'abord au niveau de la chaîne respiratoire, le cuivre influence l'activité de la COX (enzyme appartenant au dernier complexe de la chaîne respiratoire qui contrôle la

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

phosphorylation oxydative). Une de ces protéines (COX-17) est chaperonne et se lie au cuivre cytoplasmique libre et le transporte dans l'espace inter-membranaire mitochondrial où elle le cède à une autre protéine chaperonne pour assembler les sous-unités de la COX (Horng et *al.*, 2004). Donc un excès de cuivre dans les cellules peut avoir un impact sur l'assemblage des sous-unités de la COX. Quant au niveau membranaire, le cuivre agit sur les lipides en augmentant la perméabilité des membranes mitochondriales induisant ainsi une diminution de la force des protons et par conséquent une diminution de la concentration en ATP provoquant potentiellement la perturbation de la chaîne respiratoire et de la matrice mitochondriale et éventuellement le cycle de Krebs. Plusieurs études ont observé l'effet du cuivre sur les nucléotides énergétiques avec en général une diminution de la concentration en ATP et de la charge énergétique chez les individus exposés (Heath, 1984, 1991 ; Viarengo et *al.*, 1980 ; Johnson et *al.*, 1995).

De leur côté, Sbartaï et *al.*, (2009), Benbouzide et *al.* (2012) et Moumeni (2016) ont également montré une inhibition de la respiration des paramécies et des daphnies en présence de Bifenazate, de Phosphoramidate et de Cyclohexanedione respectivement. Aussi chez des rats nourris par un excès en cuivre ont présenté une augmentation des niveaux de produits de peroxydation lipidique mitochondriale, une diminution de la respiration mitochondriale et une diminution de l'activité du complexe IV (cytochrome c oxydase) (Sokol et *al.*, 1990). Tous ces travaux sont en accord avec nos résultats où nous avons mis en évidence une réduction de la consommation de l'oxygène chez les daphnies particulièrement aux fortes concentrations du Thirame et de la bouille bordelaise. Ce résultat rend compte d'une perturbation de l'activité respiratoire probablement via l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale et peut être interprétée comme une stratégie de survie liée à des lésions des muscles respiratoires comme l'ont suggéré plusieurs études sur *Daphnia magna* exposées aux pesticides (Hyne et Maher, 2000 ; Reyes et *al.*, 2002 ; Rodrigues et *al.*, 2004 ; Martins et *al.*, 2007). D'autre part, loin des fongicides, il est possible que la consommation réduite d'oxygène soit liée à une absence de nourriture au cours de la durée d'exposition entraînant une activité métabolique réduite (Armitage et Lei, 1979).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Ainsi, ce stress chimique induit une forte consommation d'énergie, la charge énergétique des individus contaminés au cuivre continue de diminuer ce qui suggère que les daphnies n'arrivent pas à compenser l'utilisation de l'énergie cellulaire et qu'ils sont dans l'incapacité de garder une charge énergétique à un niveau acceptable. Cette diminution de la charge énergétique suggère que la quantité d'énergie disponible est suffisante uniquement pour les processus de maintenance et par conséquent on peut dire que le cuivre agit sur les branchies et/ou sur le transfert de l'oxygène aux cellules, causant des altérations de la fonction respiratoire ce qui induirait une hypoxie cellulaire.

5. EFFETS SUR LE SYSTEME NERVEUX

La figure (41) illustre les effets des différentes concentrations du Thirame et de la Bouillie bordelaise sur l'évolution de l'activité acétylcholinestérase (AChE).

D'après la figure (41. A), nous constatons une diminution significative ($p \leq 0,001$) et dose-dépendante de l'activité AChE chez les daphnies traitées par le Thirame par rapport aux témoins où nous notons une valeur de $0,57 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Le maximum est observé à la plus forte concentration ($0,5 \text{ mg}/\text{L}$) avec une valeur de $0,11 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines soit une réduction de près de 80% par rapport aux daphnies témoins.

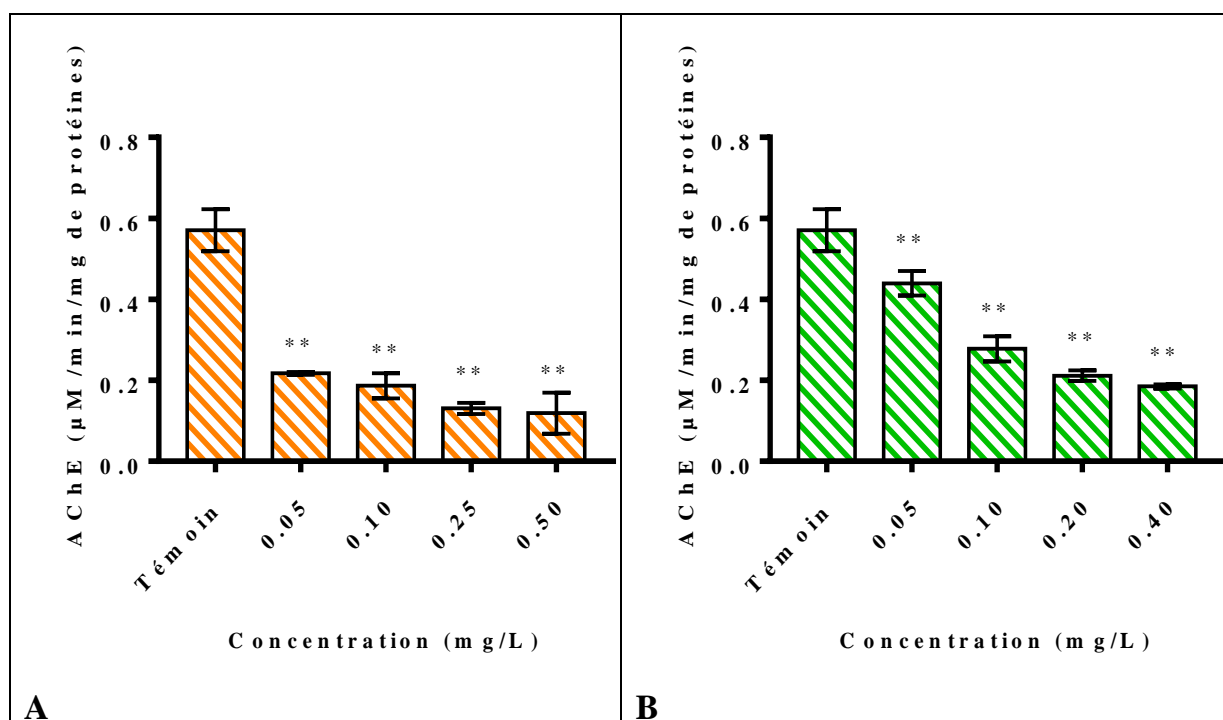


Figure 41. Effets du (A) Thirame et (B) Bouillie bordelaise sur la variation de l'activité AChE chez *Daphnia magna*

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

De même, et d'après la figure (41. B), nous remarquons une inhibition significative ($p \leq 0,001$) et dose-dépendante de cette même activité chez les daphnies traitées par la Bouillie bordelaise par rapport aux témoins ($0,57 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines). Cependant, cette diminution n'est pas très importante à la plus faible concentration ($0,05 \text{ mg}/\text{L}$) où on enregistre une réduction de seulement 10 %. A partir de $0,10 \text{ mg}/\text{L}$, cette activité est réduite de moitié ($0,27 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protéines) et atteint son maximum à la plus forte concentration ($0,4 \text{ mg}/\text{L}$) avec une valeur de $0,18 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protéines soit une réduction de près de 77%.

Les pesticides sont connus pour leur haute toxicité vis-à-vis des organismes non cibles comme les invertébrés aquatiques et ont soulevé beaucoup de préoccupations environnementales (Mdegela *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2011; Van Dyk et Pletschke, 2011).

Parmi eux, les cladocères possèdent un système nerveux primitif incluant l'AChE qui peut être inhibé sous l'influence des contaminants multiples. Contrairement aux arthropodes, chez les daphnies (crustacés), une fois la détermination de l'emplacement et des limites du neuroectoderme achevée, la seconde étape de la neurogenèse est la détermination des cellules progénitrices neurales (NPC). Cette étape permet la sélection, au sein du neuroectoderme, des cellules pluripotentes qui donneront naissance aux neurones grâce à l'activation d'une cascade de gènes appelés gènes proneuraux. Chez *Daphnia magna*, il n'existe pas de sélection d'un seul neuroblaste parmi un groupe proneural. Ce sont des groupes entiers de précurseurs neuraux qui sont sélectionnés et disposés en anneaux dans le neuroectoderme (Ungerer *et al.*, 2011). Plus tard, les neuroblastes ne subissent pas de délamination et restent à la surface du neuroectoderme (Ungerer et Scholtz, 2008 ; Ungerer *et al.*, 2011).

De nombreuses études ont montré que l'inhibition de l'activité de l'AChE était directement liée aux mécanismes toxicologiques de certains contaminants tels que les pesticides (Sanchez-Hernandez *et al.*, 2018; Guimarães *et al.*, 2019), les métaux (Mkhinini *et al.*, 2019) et des matériaux manufacturés (Chen *et al.*, 2017). Elle est aussi considérée comme un biomarqueur spécifique des pesticides organophosphorés (Mazzia *et al.*, 2011) et des carbamates (Laguerre *et al.*, 2009). D'autres auteurs indiquent que l'AChE peut être inhibée par les métaux mais aussi par des composés indéterminés de mélanges complexes de polluants (Olson et Christensen, 1980; Gill *et al.*, 1990, 1991; Schmidt et Ibrahim, 1994;

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

Labrot et *al.*, 1996; Martínez-Tabche et *al.*, 1996; Payne et *al.*, 1996; Guilhermino et *al.*, 2000). Des études ont montré que l'AChE est également exprimée dans les tissus dépourvus de réponses cholinergiques (Park et *al.*, 2004) et aussi dans les membranes des globules rouges où il constitue un antigène de groupe sanguin (Colovic et *al.*, 2002).

L'utilisation d'AChE de *Daphnia magna* en tant que biomarqueur de la toxicité des insecticides anti-Cholinestérasiques a déjà été relaté par plusieurs auteurs. Cependant, on sait peu sur les relations entre l'inhibition de l'AChE et la toxicité chez les daphnies et les autres invertébrés aquatiques (Printes et Callaghan 2004). D'après nos connaissances et la littérature, il y a aucune publication qui traite de l'impact du Thirame sur l'activité AChE chez l'espèce *Daphnia magna* d'où notre intérêt pour cette enzyme.

La diminution de l'AChE enregistrée lors de notre travail suggère une action neurotoxique du Thirame sur ces organismes non cibles et ce dès les plus faibles concentrations (0,05 mg/L) et à court terme. Cette inhibition par le Thirame est en accord avec plusieurs autres recherches réalisées sur *Daphnia magna*. En effet, selon Barata et *al.*, (2004), une inhibition de l'activité de l'AChE a été enregistrée après exposition au Carbofuran (carbamate) et les mêmes résultats ont également été rapportés par Jeon et *al.*, (2013) avec la même espèce après exposition au Carbaryl. De même Najimi et *al.* (1997), Toumi et *al.* (2016) ont décrit respectivement une inhibition cholinestérasique importante des branchies de la moule de mer *Mytilus galloprovincialis* à l'Acétaminophène et l'Acephate chez deux souches de daphnies après un test aigu. Dans des études complémentaires, des rates ayant reçu un régime alimentaire riche en dose élevée de Thirame ont présenté une ataxie et une paralysie des pattes postérieures associées à la démyélinisation et à une dégénérescence des cylindres des axones, ainsi qu'à la présence de macrophages dans le faisceau du nerf sciatique (Lee et Peters, 1976).

Parallèlement, l'exposition aiguë à la Bouillie bordelaise a entraîné une inhibition de l'activité AChE chez *D. magna* notamment aux concentrations élevées suggérant ainsi que les changements de comportement des néonates peuvent être attribués à un effet inhibiteur du cuivre de l'activité de cette enzyme. Nos résultats vont dans le même sens de plusieurs travaux qui ont rapportées une diminution de l'AChE suite à une exposition au cuivre chez

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

plusieurs espèces comme par exemple le poisson zèbre (Tilton *et al.*, 2011 ; Haverroth *et al.*, 2015) et chez les invertébrés aquatiques *Carcinus maenas* (Brown *et al.*, 2004).

Dans notre étude, nous avons essayé de mettre en évidence la relation étroite entre la diminution de l'AChE et les effets néfastes sur la mobilité des néonates ; (Voir les résultats des tests de toxicité aigüe standard sur 24 h / 48 h) ; car ces fongicides inhibent cette enzyme en se liant au site estérique de cette dernière et perturbe ainsi la transmission nerveuse (Fukuto, 1990 ; Main, 1969) et par conséquent inhibition de la dégradation de l'acétylcholine en acétate et choline, dont son accumulation entraîne une paralysie (immobilisation) et éventuellement la mort (Boelsterli, 2007). D'après Casida, (1964), l'inhibition de l'activité AChE entraîne une activation non régulée de la terminaison nerveuse et une paralysie dans les organismes, et pourrait induire des réponses comportementales anormales.

De plus, le taux d'alimentation et le comportement locomoteur des organismes aquatiques pourraient être affectés par l'inhibition de l'activité de l'AChE lors d'une exposition à court terme de (Xuereb *et al.*, 2009). Ces résultats montrent clairement que l'inhibition de l'activité AChE est l'un des facteurs les plus importants qui induit des troubles du comportement et que les changements de cette activité peuvent provoquer des réponses comportementales progressives des organismes d'essai (Ren *et al.*, 2015). Nos résultats sont en accord avec plusieurs études chez daphnia telles que celles de Sturm et Hansen (1999) avec le Parathion et le Dichlorvos ainsi que celles de Printes et Callaghan, (2004) sur quatre organophosphorés (Parathion, Chlorpyrifos, Malathion et Acéphate) et un carbamate (Propoxur).

Aussi et selon certains auteurs, l'effet inhibiteur des métaux comme le cuivre dépend également du temps. L'implication des systèmes cholinergiques dans l'activité locomotrice est bien établie chez les vertébrés (Pepeu et Giovannini, 2004). Ceci suggère que l'exposition à la Bouillie bordelaise entraîne l'inhibition de la mobilité des néonates lors des tests aigus (immobilisation 24h/48h). Dans plusieurs recherches, le cuivre s'est révélé toxique pour les cellules des lignées latérales et les neurones olfactifs des poissons à des faibles concentrations de 5 mg/L et moins que ça (Baldwin *et al.*, 2003; Sandahl *et al.*,

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

2004 et Linbo et *al.*, 2006), et peut affecter le comportement qui détermine la survie et le succès reproducteur des poissons exposés (Scott et Sloman, 2004 ; Vieira et *al.*, 2009).

En fait, il existe une certaine controverse concernant le degré d'inhibition de l'activité de l'AChE et son lien avec la mort d'un organisme. Certaines études ont montré que l'inhibition de l'AChE après une exposition à des concentrations létales de composés anti-Cholinestérasiques se situe généralement entre 70% et 100% (Barata et *al.*, 2001). Les dithiocarbamates ne sont pas connus pour inhiber l'AChE et leurs mécanismes d'action pourraient conduire à la mort des neurones dopaminergiques via plusieurs processus dérégulés. Cependant, il est difficile d'identifier un mécanisme d'action commun à tous les dithiocarbamates. (Doerge, 1990; Marinovich, 1997). L'impact des dithiocarbamates sur le système nerveux central paraît plausible par une perturbation du transport vésiculaire du glutamate principal neurotransmetteur excitateur du cerveau, qui, en cas d'excès, peut causer une toxicité sur ses neurones cibles. Une déplétion en ATP due à un dysfonctionnement mitochondrial (inhibition d'un ou plusieurs complexes de la chaîne respiratoire) limite l'activité de la pompe membranaire Na^+/K^+ ATPase, essentielle au maintien de la polarité de la membrane plasmique. Cette inhibition facilite l'ouverture et le passage des ions calciques. Un influx trop élevé de Ca^{2+} peut ainsi conduire à la mort des cellules dopaminergiques (Greenamyre et *al.*, 1999). Ce changement de potentiel membranaire affecte l'absorption de glutamate dépendant de l'ATP dans les vésicules synaptiques et empêche le glutamate de se lier à ses récepteurs, ce qui entraîne des effets toxiques dans le cerveau (Nagendra et *al.*, 1997; Vaccari et *al.*, 1999). Ceci est en accord avec nos résultats où le taux d'oxygène des daphnies exposées au Thirame diminue (voir variation de métabolisme respiratoire). En plus, les dithiocarbamates bloquent le groupement $-\text{SH}$ des enzymes qui jouent un rôle fondamental dans le transport d'énergie au sein des êtres vivants (ex : pyruvate déshydrogénase) et spécialement inhibiteur des systèmes enzymatiques métal dépendant (Siegwart, 2017).

D'un autre côté, l'effet possible neurotoxique du Thirame ou bien de la Bouillie bordelaise peut être causé par le stress oxydatif. Les travaux de Weiner et *al.* (1994) sur le poisson *Torpedo californica* et Oliveira (2015) sur *Daphnia magna*, ont clairement établi le lien entre le stress oxydatif et l'inhibition cholinestérasique, en précisant que les

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

conditions oxydantes pouvaient modifier le statut conformationnel de l'AChE avec des effets délétères évidents sur ses capacités hydrolytiques.

Les dithiocarbamates sont très réactifs et peuvent se conjuguer avec d'autres molécules contenant des groupes SH en formant des chélates métalliques. L'effet multi-site des dithiocarbamates lui donnent l'avantage d'influencer les activités biologiques de différentes protéines, enzymes, et d'exercer des effets toxiques. Lorsque les dithiocarbamates chélate les métaux lourds tels que Cu, Zn, et Fe, conduisant à leurs accumulations intra-neuronales, ces métaux ont été impliqués dans la promotion de la peroxydation lipidique, stress oxydatif, et les inhibitions enzymatiques causant des effets neurotoxiques (Nobel et *al.*, 1995; Valentine et *al.*, 2009; Viquez et *al.*, 2009). La stimulation non sélectif des canaux cationiques par le Thirame, provoquent l'afflux de Ca^{++} et Cu^{++} dans les mitochondries augmentant le stress oxydatif qui induit l'apoptose des cellules et des dommages neuronaux dopaminergiques (Sook Han et *al.*, 2003; Barlow et *al.*, 2005). Les mixtures dithiocarbamate et métaux forment des complexes induisant l'oxydation de la dopamine et produisent ainsi un stress oxydant intra-neuronal menant aux dommages neuronaux (Fitsanakis et *al.*, 2002).

Cependant, la diminution de l'activité AChE suite à l'exposition à la Bouillie bordelaise peut s'expliquer par le fait que les métaux (Cu) peuvent se lier aux groupes fonctionnels de la protéine, tels que les groupes sulfhydryle, imidazole et carboxyle comme l'indique Najimi et *al.*,(1997). Une fois que l'enzyme est liée à certains de ces groupes fonctionnels, son activité catalytique pourrait être compromise, entraînant une perte de la fonction enzymatique. De Lima et *al.* (2012) ont proposé un effet dénaturant des protéines dû au métal lorsqu'il est en contact direct avec l'enzyme. Plus la protéine perd sa conformation native, plus il est difficile pour la protéine de récupérer son activité enzymatique.

Dans notre étude, le cuivre sous forme de $CuSO_4$ dans la formulation de la Bouillie bordelaise a inhibé AChE de *Daphnia magna*, ce qui augmente l'utilisation de la voie anaérobie pour la production d'énergie, et induit un stress oxydatif provoquant une peroxydation lipidique à des concentrations sub-létales. De plus, des corrélations significatives et positives ont été enregistrées entre l'AChE et les paramètres

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

comportementaux (immobilisation), tandis que des corrélations négatives ont été trouvées entre MDA ainsi les enzymes anti-oxydantes. Dans une étude sur des poissons exposés à 15 mg/L de CuSO₄ pendant 24 h (traitement aigu) ont montré une diminution significative de l'hydrolyse de l'ATP (Rosemberg et al., 2007). Chez *Carassius auratus* exposée à la sertraline, Xie et al. (2015) ont observé une corrélation significative entre l'activité de nage et l'activité AChE. Nous suggérons que l'inhibition de l'activité AChE pourrait être en quelque sorte impliquée dans les altérations locomotrices des néonates après une exposition à la Bouillie bordelaise, son effet néfaste sur le budget énergétique est expliqué par la diminution de taux de respiration des daphnies traitées, cette énergie est utilisée pour la neurotransmission et les mouvement natatoires.

Nos résultats sont en accord avec ces travaux, notamment la diminution du GSH et l'augmentation du MDA, CAT, GST ; ce qui témoigne que le Thirame et la Bouillie bordelaise induisent un stress oxydatif chez *Daphnia magna*. Le Thirame a deux groupes alkyles liés à un atome d'azote, qui à son tour est fixé à une molécule de disulfure de carbone qui peuvent ainsi être reliées avec du soufre pour former des mono, di ou tétrasulfures de thiurame. Ces derniers se décomposent à leur tour lorsqu'ils sont exposés à la chaleur ou à des conditions alcalines en disulfure de carbone (CS₂) et en condition acides en amine (ACC, 2003). Le CS₂ est neurotoxique (Bonnal, 1994 ; Johnson et al. (1998) ont montré une liaison croisée des protéines neuro-filamenteuses induites par le disulfure de carbone (CS₂) comme mécanisme de ses effets axonopathiques et neurotoxiques. Toutefois, les études métaboliques avec différents dithiocarbamates n'ont pas confirmé le rôle du CS₂ comme seul mécanisme de leurs effets neurotoxiques (SAP, 2001). De son côté, le cuivre peut induire l'apoptose des cellules réceptrices via un processus de stress oxydatif accru, car ce métal de transition, comme les autres métaux, est connu pour participer aux réactions d'oxydo-réduction et peut ainsi changer les états d'oxydation des systèmes biologiques (Julliard et al., 1996)

Des études antérieures ont prouvé que la diminution de l'activité AChE était corrélée aux effets sur le comportement de nage, et certains pesticides pouvait affecter le niveau d'acétylcholine, l'activité AChE et le taux de synthèse de l'acétylcholine, et induit la perte de la capacité de conduction nerveuse (Nordgren et al., 1978). La diminution de la capacité de détoxification, des demandes énergétiques supplémentaires pour faire face au stress

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 1 : EFFETS TOXICOLOGIQUES A L'ECHELLE INDIVIDUELLE

chimique et des dommages oxydatifs peuvent contribuer à diminuer les performances de nage des daphnies. Étant donné qu'une capacité de nage réduite des néonates et/ou adultes peut réduire leur capacité à capturer des proies, à éviter les prédateurs et à interférer avec le comportement social et reproductif, ce qui explique la diminution du pouvoir reproductif des daphnies mises en test chronique suite à l'exposition des daphnies à des concentrations faibles de Thirame ou bien de Bouillie bordelaise. Les fongicides peuvent influencer ses aptitudes sensoriels (vision, attraper la proie ou éviter les prédateurs dans la nature ou suivre les femelles lors de l'accouplement lors des conditions défavorables du milieu aquatique à savoir les polluants) ou bien aptitudes comportementales c'est-à-dire la locomotion et le mouvement des pattes natatoire.

Cependant des divergences pourraient également être dues à divers facteurs tels que diversité génétique, divers composés de réserve testés, le nombre de ponte ou le milieu d'exposition pouvant influencer les variations de l'activité spécifique de la CE50-48h et de l'AChE, comme le montrent Toumi *et al.*, (2015) après une exposition au Malathion avec les trois souches de *Daphnia magna*. Signalons que l'activité de l'AChE dans différentes parties d'un organisme peut réagir différemment en cas de perturbation externe. Par exemple, l'Atrazine réduit l'activité de l'AChE dans le cerveau, altérant ainsi les comportements défensifs du poisson zèbre, alors que l'activité musculaire de l'AChE n'était pas affectée (Schmidel *et al.*, 2014).

PARTIE III
RESULTATS
&
DISCUSSION

VOLET 2

MODELISATION EN
DYNAMIQUE DE LA
POPULATION



1. EFFETS SUR LA DYNAMIQUE DE LA POPULATION

En commençant avec une population initiale de 10 juvéniles de la classe 1 qui se développe en femelle adulte féconde qui peuvent par parthénogénèse engendrer des juvéniles de la classe 1, et qui se développent en daphnies de la classe 3 qui pondent pour la deuxième ou la troisième fois puis meurent (on admet que la durée de vie des daphnies est de 21 jours, durée du teste chronique).

1.1. Daphnies témoins à 100% de survie

Le taux de survie des daphnies témoins dans ce modèle est 100%. Le tableau ci-dessous illustre la dynamique de la population des daphnies de chaque classe d'âge ainsi que le nombre total de population pour une durée de temps de 25 pas.

Tableau 5. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps

Population output				
Time	1	2	3	Total pop
0	10	0	0	10
1	0	10	0	10
2	76	0	10	86
3	151	76	0	227
4	572	151	76	799
5	2288	572	151	3012
6	6618	2288	572	9479
7	25971	6618	2288	34878
8	84681	25971	6618	117270
9	296584	84681	25971	407236
10	1033456	296584	84681	1414721
11	3524584	1033456	296584	4854624
12	12304376	3524584	1033456	16862416
13	42295957	12304376	3524584	58124916
14	146397186	42295957	12304376	200997519
15	506090287	146397186	42295957	694783429
16	1747282862	506090287	146397186	2399770335
17	6043043756	1747282862	506090287	8296416904
18	20873545538	6043043756	1747282862	28663872156
19	72145827781	20873545538	6043043756	99062417075
20	249318196260	72145827781	20873545538	342337569579
21	861525962163	249318196260	72145827781	1182989986204
22	2977402826436	861525962163	249318196260	4088246984859
23	10288744511765	2977402826436	861525962163	14127673300365
24	35555886910612	10288744511765	2977402826436	48822034248813
25	122871903920210	35555886910612	10288744511765	168716535342587

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

On prédit une croissance continue de la population témoin qui atteint une charge abondante d'individus et tend au total à plus de 160000 milliards d'individus, pour une durée de temps de 25 pas, comme le montre le tableau (5).

On remarque que les trois classes d'âge sont présentes avec la prédominance des juvéniles âgés entre (1et 7 jours) ça explique la régénération de cette classe d'âge pour chaque pas de temps, d'une part la survie des daphnies jusqu'au la 2^{ème} ou la 3^{ème} ponte d'autre part.

La figure ci-dessous illustre les variations des différentes premières proportions selon les différentes classes d'âges jusqu'à la stabilisation où les juvéniles seront la classe dominante, suivit par la classe des adultes matures âgés entre 7 et 14 jours, puis les femelles adultes âgées entre 14 et 21 jours.

Stable Distribution	
Proportion	Class
0,7283	1
0,2107	2
0,0610	3
$\lambda = 3,45607$	

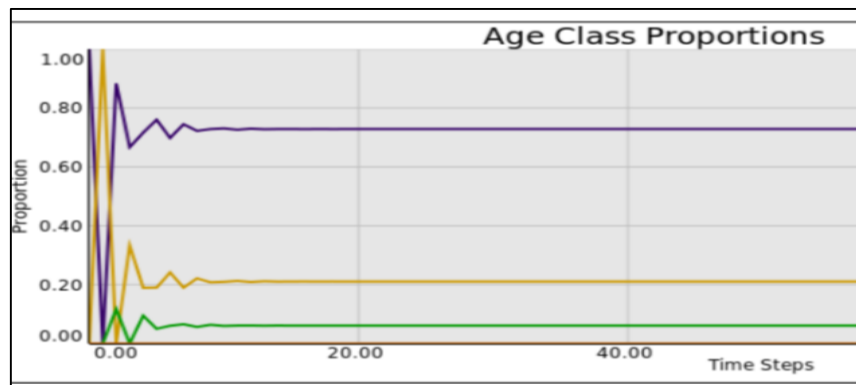


Figure 42. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas

On enregistre 73,83% de la charge populationnelle qui est constituée de juvéniles qui se développent en adulte de classe 2 reproductrices présentant 21,07% de la charge. Ainsi, ces derniers (classe 2) se développent pour produire plus de juvéniles et de pontes pour mourir ensuite, cette classe (3) représente seulement 6,10% de la charge totale.

L'évolution du nombre total des daphnies ainsi que les différentes proportions selon les classes d'âge au cours de 25 pas de temps nous permet d'enregistrer des populations abondantes de l'ordre des milliards. Leurs proportions pour la même durée sont variables jusqu'aux 13^{ème} pas et prennent des proportions relatives et stables par la suite. En plus $\lambda=3,45607$ ce qui signifie que la population témoin va croître sur le long terme.

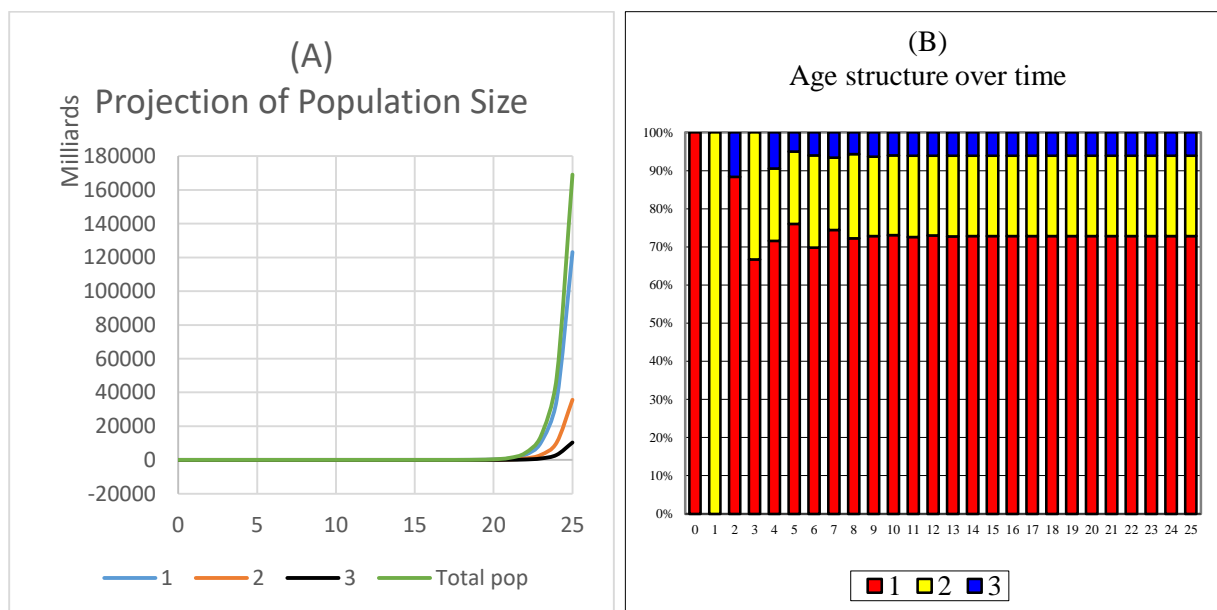


Figure 43. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population témoin et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

1.2. Daphnies témoins à 80% de survie

Les daphnies témoins dans ce modèle enregistrent un taux de survie différent de celui des témoins précédents puisque les tests ont été effectués dans des périodes différentes, et que le test chronique nécessite un témoin propre à la génération mise en test, ce taux est le témoin propre au test chronique des daphnies exposées à la Bouillie bordelaise.

On prédit une croissance continue de la population témoin qui atteint au total à plus de 900000 milliards d'individus, pour une durée de temps de 25 pas. On remarque que les trois classes d'âge sont présentes avec la prédominance des daphnies de la classe 1, du fait de la régénération de cette classe d'âge pour chaque pas de temps, d'une part la survie des daphnies jusqu'au la 2^{ème} ou la 3^{ème} ponte d'autre part. L'évolution de la taille totale de la population au cours du temps selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps est démontrée dans le tableau (6).

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

Tableau 6. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps

Population output				
Time	1	2	3	Total pop
0	10	0	0	10
1	0	10	0	10
2	78	0	8	86
3	120	78	0	198
4	608	120	62	791
5	1872	608	96	2576
6	6186	1872	487	8544
7	21902	6186	1498	29586
8	70711	21902	4948	97562
9	245065	70711	17522	333298
10	814375	245065	56569	1116009
11	2760039	814375	196052	3770466
12	9292905	2760039	651500	12704444
13	31300807	9292905	2208031	42801744
14	105605130	31300807	7434324	144340261
15	355661156	105605130	25040646	486306932
16	1199329702	355661156	84484104	1639474962
17	4041418573	1199329702	284528925	5525277200
18	13622705545	4041418573	959463762	18623587879
19	45915021292	13622705545	3233134858	62770861696
20	154754126124	45915021292	10898164436	211567311852
21	521609632618	154754126124	36732017034	713095775776
22	1758062439278	521609632618	123803300899	2403475372795
23	5925604647908	1758062439278	417287706094	8100954793281
24	19972202617782	5925604647908	1406449951423	27304257217113
25	67316465525023	19972202617782	4740483718327	92029151861132

La figure (44) illustre les variations des différentes premières proportions selon les différentes classes d'âges jusqu'à la stabilisation où les juvéniles seront la classe dominante suivi par la classe des adultes matures âgées entre 7 et 14 jours, puis les femelles adultes âgées entre 14 et 21 jours.

On enregistre 73,15% de la charge populationnelle qui est constituée de juvéniles qui se développent en adulte de classe 2 reproductrices présentant un taux de 21,70% de la charge. Cependant, les daphnies de la classe 3 représentent seulement 5,15% de la charge totale.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

Stable Distribution	
Proportion	Class
0,7315	1
0,2170	2
0,0515	3
$\lambda = 3, 3705$	

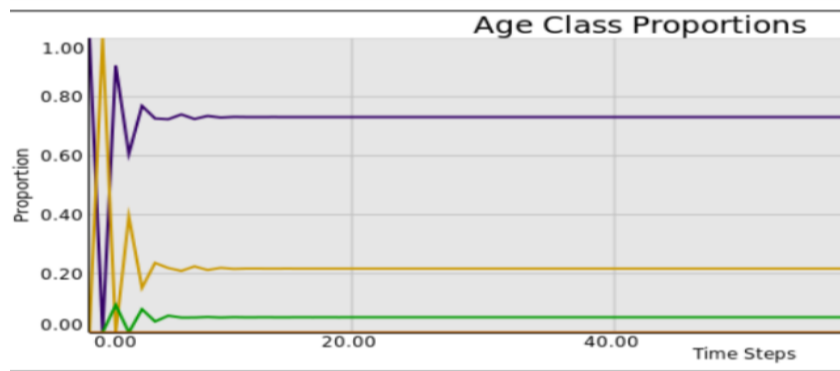


Figure 44. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas

L'évolution du nombre total des daphnies ainsi que les différentes proportions, selon les classes d'âge au cours de 25 pas de temps, a enregistré des populations abondantes de l'ordre des milliards. Leurs proportions pour la même durée sont variables jusqu'aux 10^{ème} pas pour qu'elles prennent par la suite des proportions relatives et stables. En plus $\lambda=3, 3705$ ce qui signifie que la population témoin va croître sur le long terme.

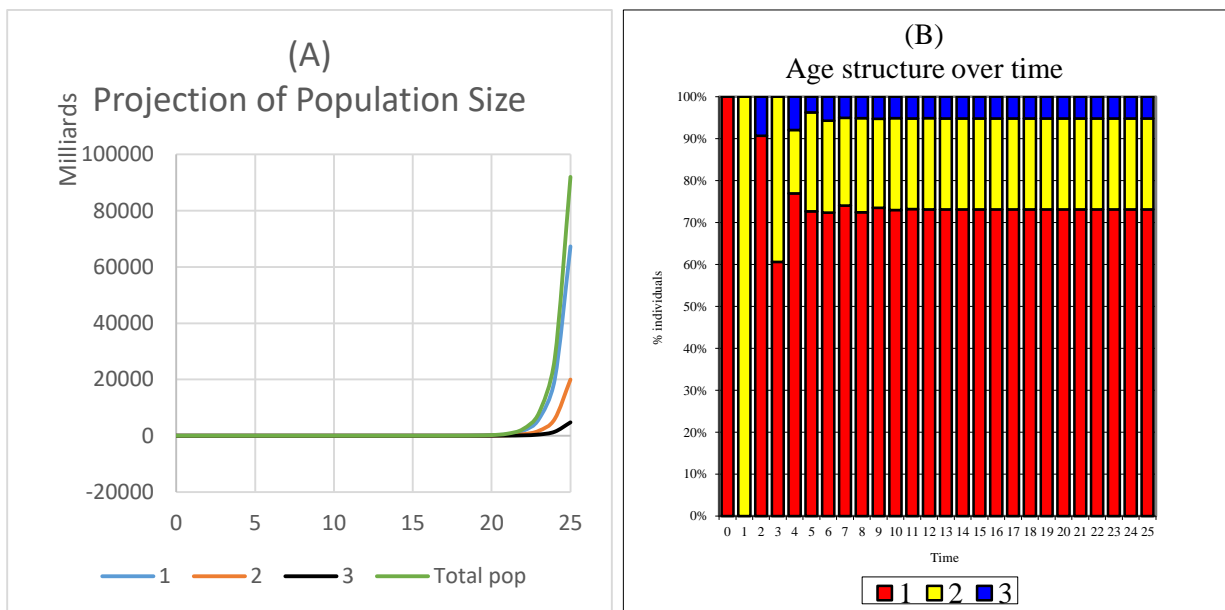


Figure 45. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

1.3. Daphnies exposées à 0,004 mg/L du Thirame

Le taux de survie des daphnies traités dans ce modèle est 80%. Le tableau (7) illustre la dynamique de la population des daphnies de chaque classe d'âge ainsi le nombre total de population pour une durée de temps de 25 pas. Commenant avec une population initiale de 10 juvéniles qui est exposé durant 21 jours à 0,004 mg/L du Thirame.

Tableau 7. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps

Time	Population output			Total pop
	1	2	3	
0	10	0	0	10
1	0	10	0	10
2	55	0	8	63
3	88	55	0	144
4	306	88	44	439
5	979	306	71	1356
6	2477	979	245	3701
7	8126	2477	783	11386
8	22367	8126	1981	32475
9	66877	22367	6501	95745
10	195658	66877	17894	280428
11	567932	195658	53501	817091
12	1674298	567932	156526	2398757
13	4873549	1674298	454346	7002193
14	14288957	4873549	1339439	20501944
15	41779538	14288957	3898839	59967334
16	122181957	41779538	11431165	175392660
17	357594873	122181957	33423630	513200460
18	1045698118	357594873	97745565	1501038557
19	3059638386	1045698118	286075899	4391412403
20	8949847128	3059638386	836558495	12846044009
21	26181316144	8949847128	2447710709	37578873981
22	76591184602	26181316144	7159877702	109932378448
23	224049469612	76591184602	20945052915	321585707129
24	655431309645	224049469612	61272947682	940753726938
25	1917344516723	655431309645	179239575690	2752015402057

Comme le montre le tableau, les trois classes d'âge sont présentes avec la prédominance des juvéniles âgés (1 et 7 jours) ça explique la régénération de cette classe d'âge pour chaque pas de temps, d'une part la survie des daphnies jusqu'au la 2^{ème} ou la 3^{ème} ponte d'autre part.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

On prédit une croissance continue de la population et on enregistre au total moins que celle du témoin, avec une charge totale moins de 28000 milliards d'individus pour une durée de temps de 25 pas. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le taux de survie des daphnies diminue à 80% et que 20% des daphnies de la classe 2 meurent d'une part avant leurs deuxième ponte et d'autre part le nombre des juvéniles produits par les daphnies matures, que ce soit des femelles de la classe 2 ou 3, est réduit par rapport aux femelles témoins, cela est dû à l'effet négatif du fongicide sur la survie et la reproduction.

La figure ci-après illustre les variations des différentes premières proportions selon les différentes classes d'âges jusqu'à la stabilisation où les juvéniles seront la classe dominante avec 69,67% suivi par la classe des adultes matures âgées entre 7 et 14 jours (23,82%) puis les femelles adultes âgées de plus de 14 jours et qui présente 6,51%.

Stable Distribution	
Proportion	Class
0,6967	1
0,2382	2
0,0651	3
$\lambda = 2,92534$	

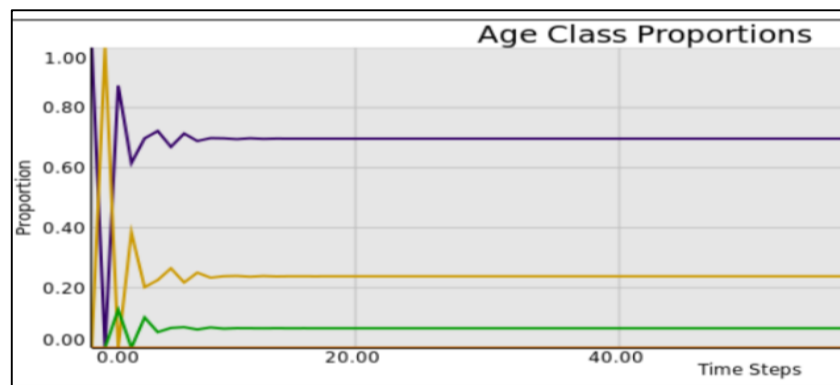


Figure 46. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas

L'évolution de la taille totale de population ainsi que les différentes classes d'âge des daphnies au cours de 25 pas de temps enregistre des populations abondantes. Leurs proportions pour la même durée sont variables jusqu'aux 9^{ème} à partir duquel elles se stabilisent. Aussi, $\lambda = 2,92534$ ce qui signifie que la population exposée à 0,004 mg/L du Thirame va croître sur le long terme.

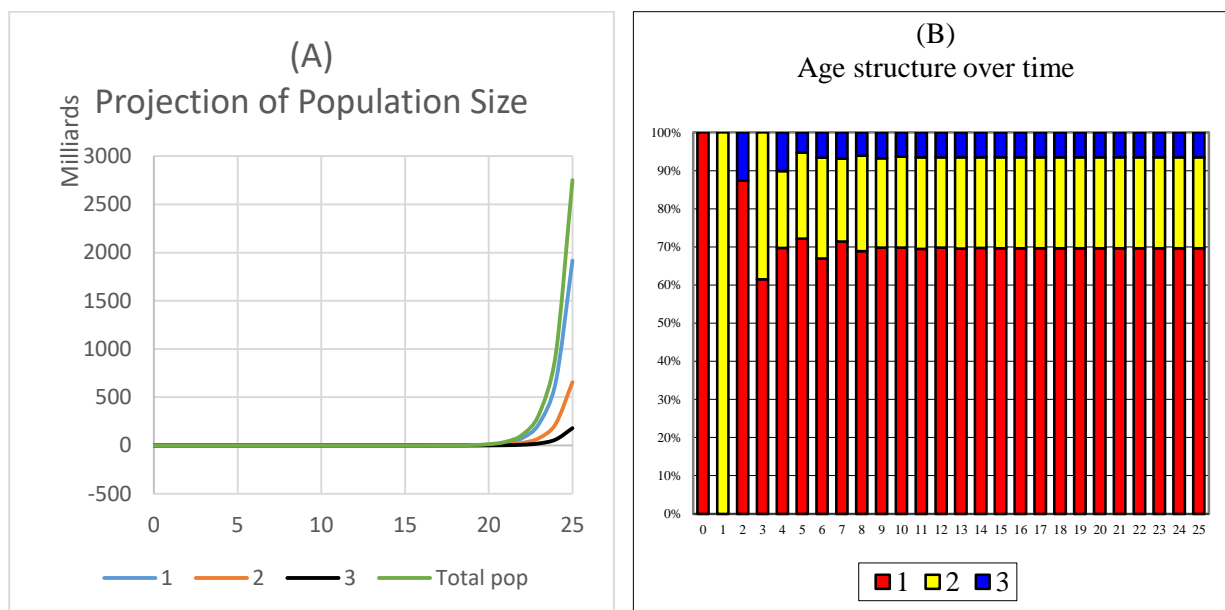


Figure 47. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

1.4. Daphnies exposées à 0,004 mg/L du Bouillie bordelaise

Le tableau (8) illustre la dynamique de la population des daphnies de chaque classe après une exposition au 0,004 mg/L de Bouillie bordelaise. Le taux de survie des daphnies traités dans ce modèle est 80%. On prédit une croissance continue de la population et on enregistre au total moins que celle du témoin avec une charge totale moins de 4500 milliards d'individus pour une durée de temps 25 pas.

Une perte de 20% des daphnies de la classe 2 qui meurent avant leur deuxième ponte, aussi le nombre des juvéniles produits par les daphnies matures réduit à 17,3 explique ces résultats, cela est dû à l'effet négatif du fongicide sur la survie et la reproduction.

La présence des trois classes d'âge est bien clair, avec prédominance des juvéniles âgés (1 et 7 jours) puisque les daphnies adultes et matures régénèrent à chaque pas de temps cette classe. Aussi la survie de 80% des daphnies de la 2^{ème} classe en daphnies reproductrice ou de la 3^{ème} classe.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

Tableau 8. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps

Population output				
Time	1	2	3	Total pop
0	10	0	0	10
1	0	10	0	10
2	58	0	8	66
3	92	58	0	150
4	332	92	46	471
5	1064	332	74	1470
6	2768	1064	266	4098
7	9200	2768	851	12819
8	25771	9200	2214	37185
9	78578	25771	7360	111709
10	233457	78578	20617	332651
11	690792	233457	62862	987111
12	2070914	690792	186765	2948471
13	6136510	2070914	552633	8760057
14	18312752	6136510	1656731	26105993
15	54485223	18312752	4909208	77707183
16	162194492	54485223	14650202	231329917
17	483078621	162194492	43588178	688861292
18	1437785142	483078621	129755594	2050619357
19	4281513327	1437785142	386462897	6105761365
20	12746186326	4281513327	1150228113	18177927767
21	37949335990	12746186326	3425210662	54120732978
22	112987189286	37949335990	10196949061	161133474337
23	336386693992	112987189286	30359468792	479733352070
24	1001528808593	336386693992	90389751429	1428305254014
25	2981799511534	1001528808593	269109355194	4252437675321

La figure ci-après illustre les variations des différentes premières proportions selon les différentes classes d'âges jusqu'à la stabilisation.

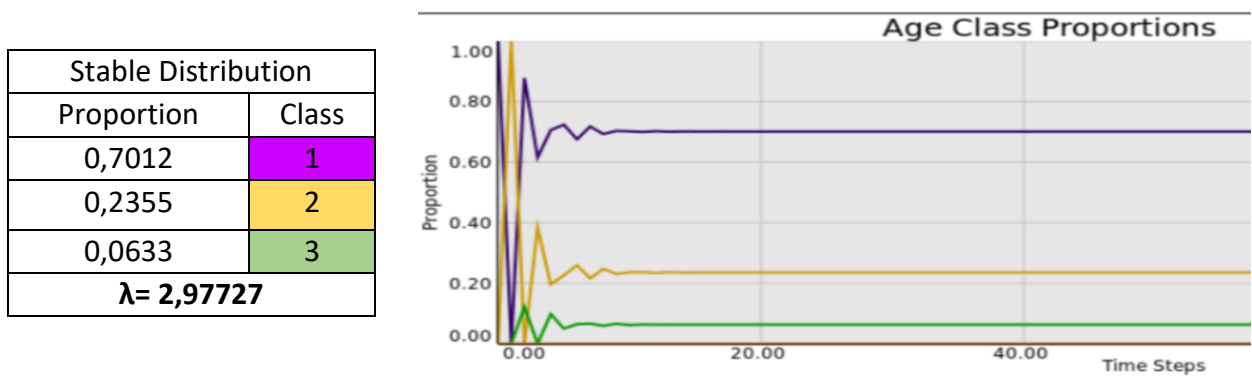


Figure 48. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

Les juvéniles est la classe dominante avec 70,12% suivi par la classe des adultes matures âgées entre 7 et 14 jours avec 23,55%, puis les femelles adultes âgées de plus de 14 jours avec 6,33%.

L'évolution de la taille totale de population ainsi les différentes classes d'âge des daphnies au cours de 25 pas de temps enregistre des populations abondantes. Leurs proportions pour la même durée sont variables jusqu'aux 14^{ème} pas à partir duquel elles se stabilisent. Aussi $\lambda = 2,97727$ ce qui signifie que la population exposée à 0,004 mg/L de Bouillie bordelaise va croître sur le long terme.

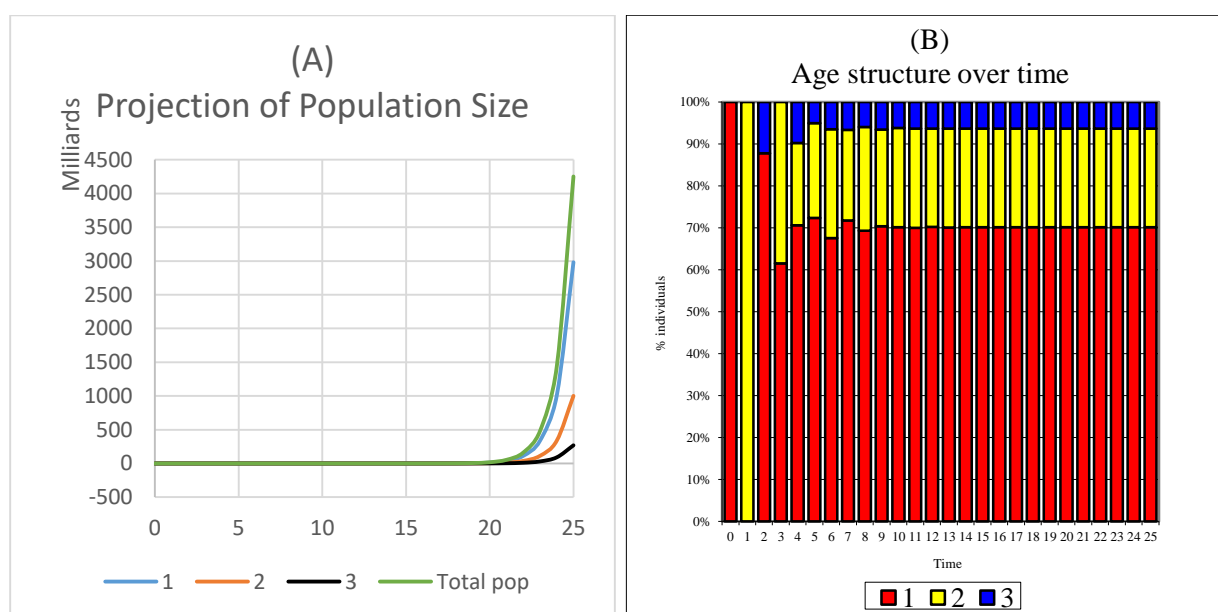


Figure 49. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

1.5. Daphnies exposées à 0,008 mg/L du Thirame

Pour un taux de survie de 60% des daphnies traités, le tableau (9) illustre la dynamique de la population des daphnies de chaque classe d'âge ainsi que le nombre total de population exposées à 0,008 mg/L du Thirame pour une durée de temps de 25 pas.

On prédit une croissance continue de la population qui atteint au total moins de 14 milliards d'individus pour une durée de temps 25 pas. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le taux de survie des daphnies diminue à 60%.

Aussi, 40% des daphnies de la classe 2 meurent après leur première ponte et elles n'arrivent pas à survivre pour une deuxième ponte et le nombre des juvéniles produits par

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

les daphnies matures, que ce soit des femelles de la classe 2 ou 3, est réduit jusqu'à 5,7 juvéniles en moyenne, c'est-à-dire le quart du nombre total des nouveaux nés produits par femelle adulte du témoin suggérant ainsi l'effet toxique du Thirame sur la survie et la reproduction des daphnies.

Tableau 9. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps

Population output				
Time	1	2	3	Total pop
0	10	0	0	10
1	0	10	0	10
2	57	0	6	63
3	0	57	0	57
4	325	0	34	359
5	0	325	0	325
6	1852	0	195	2047
7	0	1852	0	1852
8	10556	0	1111	11667
9	0	10556	0	10556
10	60169	0	6334	66503
11	0	60169	0	60169
12	342964	0	36102	379066
13	0	342964	0	342964
14	1954897	0	205779	2160676
15	0	1954897	0	1954897
16	11142916	0	1172938	12315854
17	0	11142916	0	11142916
18	63514620	0	6685749	70200369
19	0	63514620	0	63514620
20	362033331	0	38108772	400142103
21	0	362033331	0	362033331
22	2063589989	0	217219999	2280809988
23	0	2063589989	0	2063589989
24	11762462939	0	1238153994	13000616933
25	0	11762462939	0	11762462939

La figure ci-après illustre les variations des différentes premières proportions selon les différentes classes d'âges jusqu'à la stabilisation où les daphnies de la classe 2 seront la classe dominante suivi par la classe des juvéniles, tandis que les adultes matures âgées entre 14 et 21 jours représente la proportion la plus faible.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

Cela peut être expliqué par le fait que la population se compose entre les juvéniles de la classe 1 qui se développe en daphnies classe 2 qui régénère la classe 1, et que la classe 3 représente un pont de passage vers la disparition de la classe 2, suite à la mort des daphnies après leur première ponte.

Stable Distribution	
Proportion	Class
0,0000	1
1,0000	2
0,0000	3
$\lambda = 2,38747$	

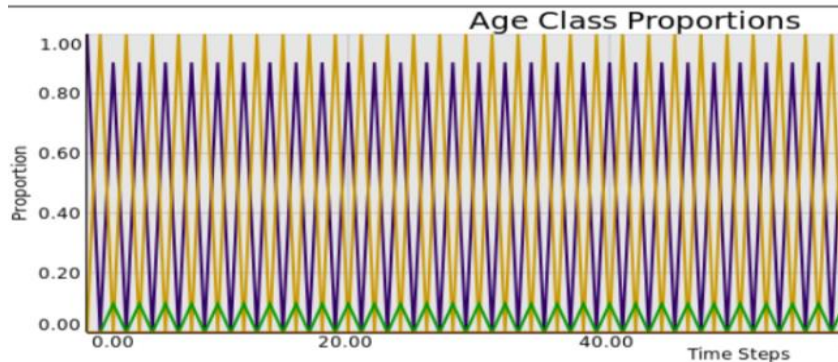


Figure 50. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas

L'évolution de la taille totale de la population ainsi que les différentes classes d'âge enregistre des charges populationnelles moins abondantes. Leurs proportions se stabilisent dès le 2^{ème} pas. La valeur propre de $\lambda = 2,38747$ ce qui signifie que la population exposée à 0,008 mg/L du Thirame va croître sur le long terme.

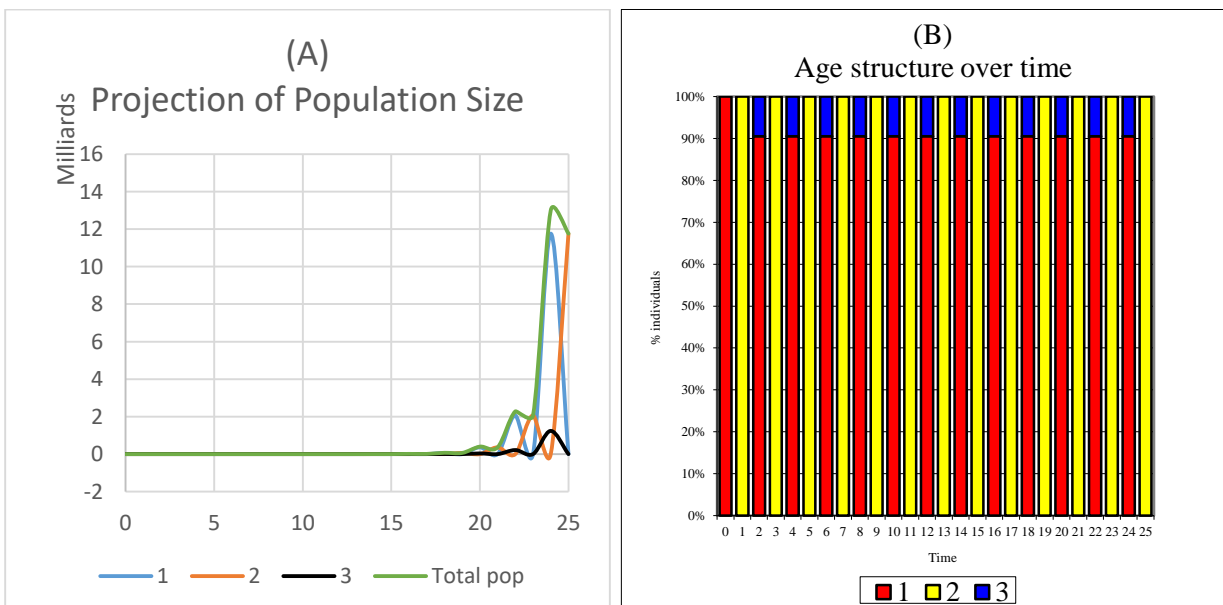


Figure 51. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

1.6. Daphnies exposées à 0,008 mg/L du Bouillie bordelaise

Pour un taux de survie de 60% des daphnies traitées, le tableau (10) illustre la dynamique de la population des daphnies de chaque classe d'âge ainsi que le nombre total de population pour une durée de temps de 25 pas.

On prédit une croissance continue de la population qui atteint au total de moins de 2 milliards d'individus pour une durée de temps 25 pas. Ces résultats peuvent être expliqués par les 40% daphnies de la classe 2 qui meurent après leur première ponte et qui n'arrivent pas à survivre pour une deuxième ponte.

Tableau 10. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps

Population output				
Time	1	2	3	Total pop
0	10	0	0	10
1	0	10	0	10
2	41	0	6	47
3	12	41	0	54
4	171	12	25	208
5	102	171	7	281
6	721	102	102	926
7	635	721	61	1418
8	3108	635	433	4176
9	3520	3108	381	7009
10	13634	3520	1865	19019
11	18400	13634	2112	34146
12	60714	18400	8181	87294
13	92947	60714	11040	164700
14	273737	92947	36428	403112
15	459410	273737	55768	788916
16	1246573	459410	164242	1870225
17	2238067	1246573	275646	3760286
18	5721570	2238067	747944	8707581
19	10795182	5721570	1342840	17859593
20	26421556	10795182	3432942	40649681
21	51708947	26421556	6477109	84607613
22	122582001	51708947	15852934	190143882
23	246465240	122582001	31025368	400072609
24	570729820	246465240	73549201	890744261
25	1170593486	570729820	147879144	1889202450

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

D'autre part le nombre des juvéniles produits par les daphnies matures, que ce soit des femelles de la classe 2 ou 3, est réduit à 6,20 juvéniles en moyenne c'est-à-dire approximativement le quart du nombre total des nouveaux nés produits par femelle adulte du témoin, conséquence de l'effet toxique de la Bouillie bordelaise sur la survie et la reproduction des daphnies.

La figure ci-après illustre les variations des différentes premières proportions selon les différentes classes d'âges jusqu'à la stabilisation.

Stable Distribution	
Proportion	Class
0,6196	1
0,3021	2
0,0783	3
$\lambda = 2,16899$	

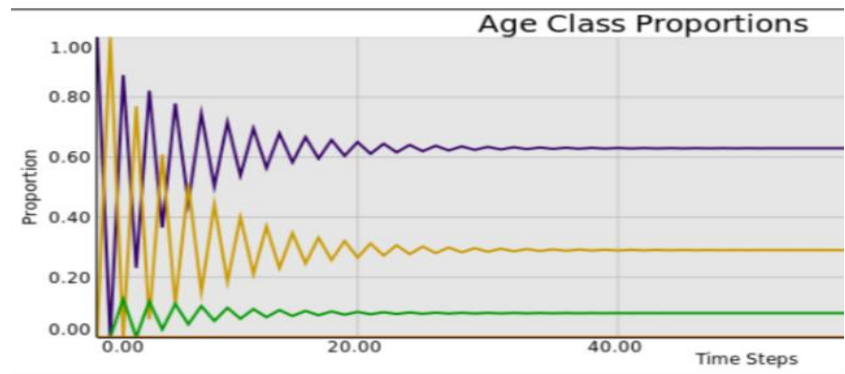


Figure 52. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas

Les daphnies de la classe 1 est la classe dominante suivi par la classe des adultes matures de la classe 2, tandis que les adultes matures âgées entre 14 et 21 jours représentent la proportion la plus faible avec 7,83%.

On remarque des taux typiques comme étant une suite géométrique dans laquelle chaque terme permet de déduire le suivant par multiplication par un raison égale à 2.

L'évolution de la taille totale de population ainsi les différentes classes d'âge enregistre des charges populationnelles moins abondantes. Leurs proportions se stabilisent après une longue période. La valeur propre $\lambda = 2,16899$ ce qui signifie que la population exposée à 0,008 mg/L du fongicide va croître sur le long terme.

On explique ces résultats par les taux élevés des nouveaux nés produits par les daphnies de la classe 2 par rapport aux daphnies de la classe 3 en terme exact reliés à la fertilité des daphnies qui pondent pour la première fois. Ceci pourrait être dû à l'effet négatif de la Bouillie bordelaise (à cette concentration) sur le pouvoir reproducteur lors du développement.

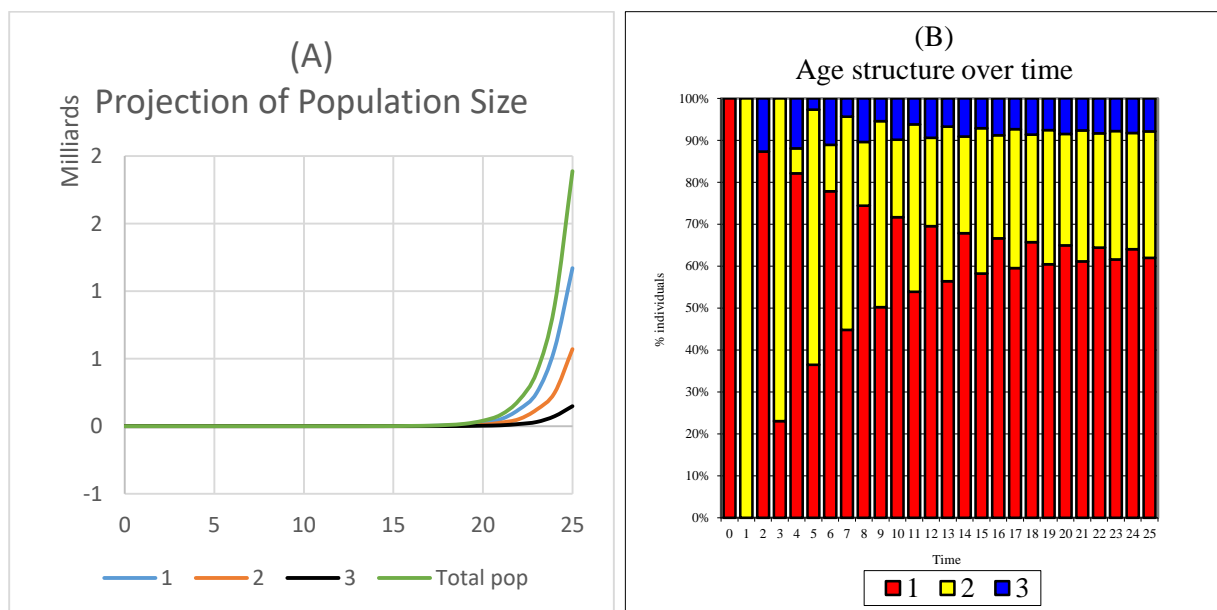


Figure 53. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

1.7. Daphnies exposées à 0,016 mg/L du Thirame

On prédit une croissance continue de la population qui arrive au total de moins de 100 millions d'individus pour une durée de temps de 25 pas. On justifie ces résultats par le fait que le taux de survie des daphnies traitées, avec 0,016 mg/L du Thirame, représente le dixième de celui des témoins comme l'indique les résultats du test chronique accompagné d'une diminution de la fécondité. Le tableau ci-après illustre la dynamique de la population des daphnies de chaque classe d'âge ainsi que le nombre total de population pour une durée de temps de 25 pas.

90% des daphnies de la classe 2 meurent après leur première ponte et n'arrivent pas à survivre pour une deuxième ponte. D'autre part, le nombre des juvéniles produits par les daphnies matures, soit des femelles de la classe 2, est réduit à 3,8 juvéniles en moyenne. Le Thirame commence à affecter sérieusement la dynamique de la population de façon critique à partir de cette dose.

Les variations des différentes premières proportions selon les différentes classes montrent que les daphnies de la classe 2 apparaissent séparément tandis que les classes 1 et 3 apparaissent simultanément, cela peut être expliqué par la mort excessive des daphnies de la classe 2 juste après leur première ponte. Tandis que les juvéniles issues des daphnies

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

de la classe 2 représente seulement 10% de la classe 2 qui ont survécus en daphnie de la classe 3 ce qui implique que la régénération des daphnies de la classe 2 aura lieu de façon alternative avec les classe 1 et 3 qui apparaissent simultanément avec prédominance des juvéniles.

Tableau 11. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps

Population output				
Time	1	2	3	Total pop
0	10	0	0	10
1	0	10	0	10
2	38	0	1	39
3	0	38	0	38
4	144	0	4	148
5	0	144	0	144
6	549	0	14	563
7	0	549	0	549
8	2085	0	55	2140
9	0	2085	0	2085
10	7924	0	209	8132
11	0	7924	0	7924
12	30109	0	792	30902
13	0	30109	0	30109
14	114416	0	3011	117427
15	0	114416	0	114416
16	434779	0	11442	446221
17	0	434779	0	434779
18	1652161	0	43478	1695639
19	0	1652161	0	1652161
20	6278212	0	165216	6443428
21	0	6278212	0	6278212
22	23857205	0	627821	24485026
23	0	23857205	0	23857205
24	90657379	0	2385721	93043100
25	0	90657379	0	90657379

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

La figure ci-dessous illustre les variations des différentes premières proportions selon les différentes classes d'âges jusqu'à la stabilisation.

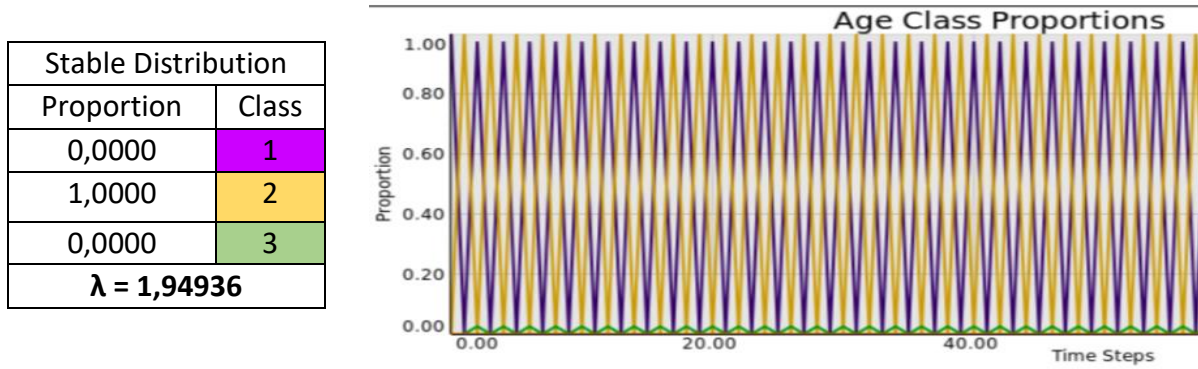


Figure 54. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas

L'évolution de la taille totale des daphnies ainsi que les différentes classes d'âge enregistre des populations moins abondantes. Leurs proportions se stabilisent dès le 2^{ème} pas. La valeur propre $\lambda = 1,94936$ ce qui signifie que la population exposée à 0,016 mg/L du Thirame va croître sur le long terme.

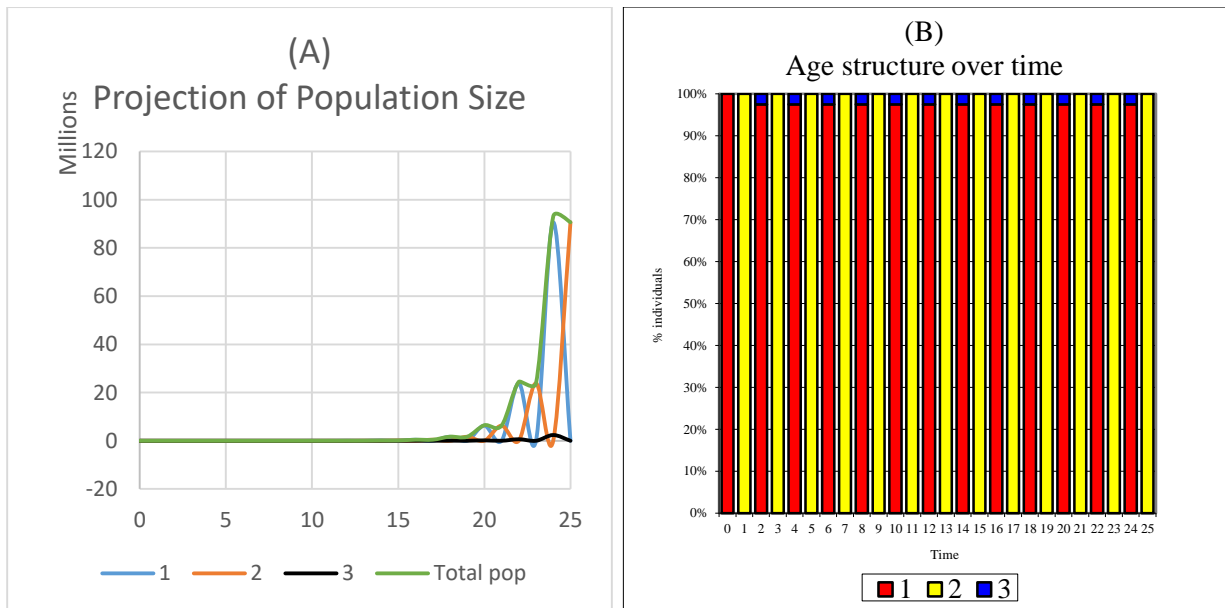


Figure 55. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

1.8. Daphnies exposées à 0,016 mg/L du Bouillie bordelaise

On prédit une croissance continue de la population qui arrive au total à moins de 180 millions d'individus pour une durée de temps 25 pas. On justifie ces résultats du fait que le taux de survie des daphnies traitées avec 0,016 mg/L de la Bouillie bordelaise est faible (10%) comme l'indique les résultats du test chronique accompagné d'une diminution de la fécondité (4 néonates produites en moyenne).

Le tableau ci-après illustre la dynamique de la population des daphnies de chaque classe d'âge ainsi que le nombre total de population pour une durée de temps de 25 pas.

Tableau 12. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps

Population output				
Time	1	2	3	Total pop
0	10	0	0	10
1	0	10	0	10
2	40	0	1	41
3	0	40	0	40
4	160	0	4	164
5	0	160	0	160
6	640	0	16	656
7	0	640	0	640
8	2560	0	64	2624
9	0	2560	0	2560
10	10240	0	256	10496
11	0	10240	0	10240
12	40960	0	1024	41984
13	0	40960	0	40960
14	163840	0	4096	167936
15	0	163840	0	163840
16	655360	0	16384	671744
17	0	655360	0	655360
18	2621440	0	65536	2686976
19	0	2621440	0	2621440
20	10485760	0	262144	10747904
21	0	10485760	0	10485760
22	41943040	0	1048576	42991616
23	0	41943040	0	41943040
24	167772160	0	4194304	171966464
25	0	167772160	0	167772160

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

Un taux élevé de 90% des daphnies de la classe 2 meurent après leur première ponte, d'autre part le nombre des juvéniles produites par les daphnies matures soit des femelles de la classe 2 est réduit. La Bouillie bordelaise commence à affecter sérieusement la dynamique de la population de façon critique à partir de cette dose.

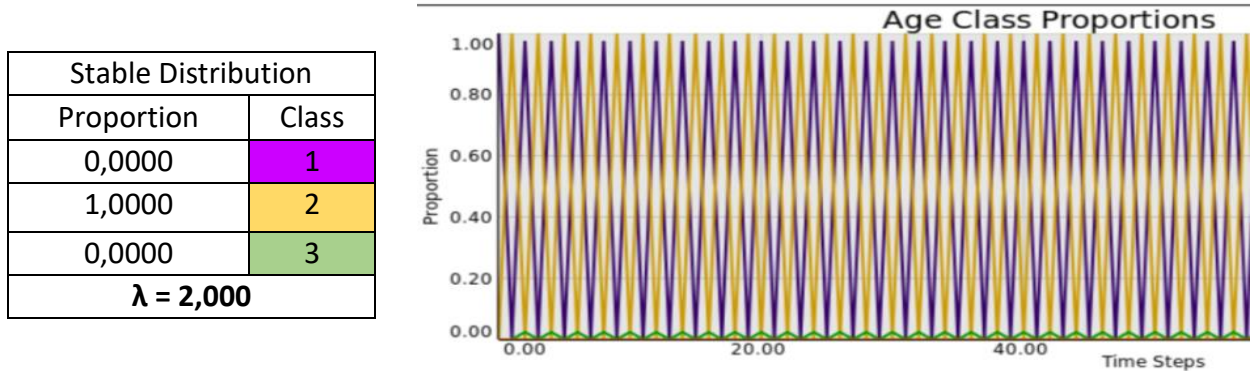


Figure 56. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge pour 25 pas

L'évolution de la taille totale des daphnies ainsi que les différentes classes d'âge enregistre des populations moins abondantes. Leurs proportions se stabilisent dès le 2^{ème} pas de façon alternative. La valeur propre $\lambda = 2,000$ ce qui signifie que la population exposée à 0,016 mg/L de Bouillie bordelaise va croître sur le long terme.

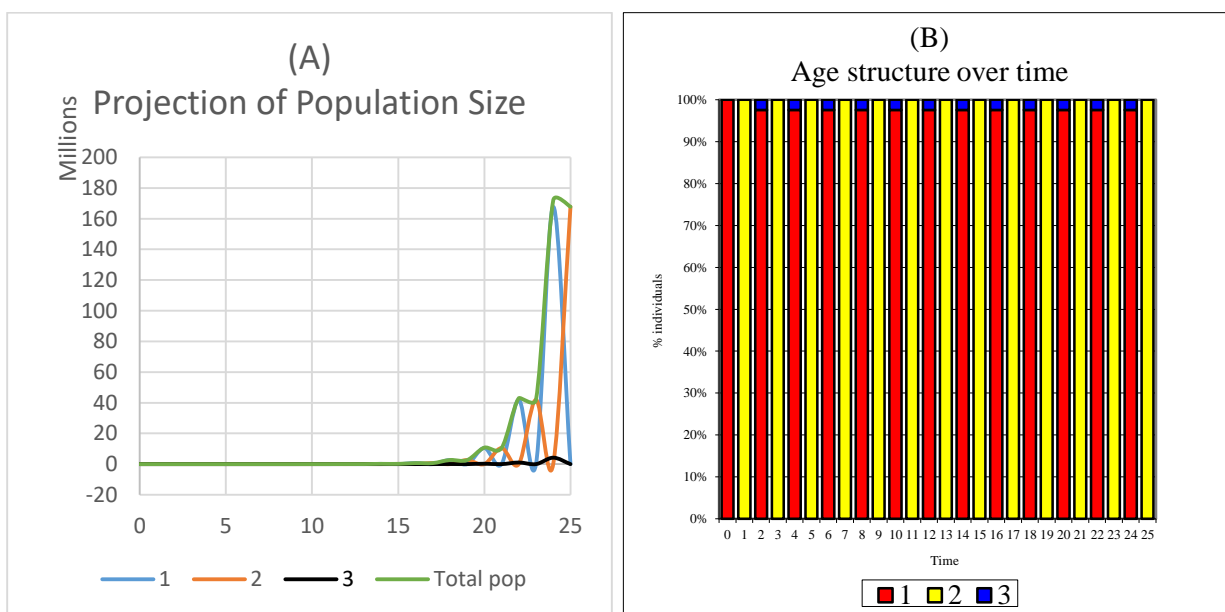


Figure 57. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

Les variations des différentes premières proportions selon les différentes classes, montrent que les daphnies de la classe 2 apparaissent séparément tandis que la classe 1 et 3 (taux approximativement 2%) apparaissent simultanément avec prédominance des juvéniles (approximativement 98%). Ceci pourrait être expliqué par la mort excessive des daphnies de la classe 2 juste après leurs premières pontes. Tandis que les juvéniles issues des daphnies de la classe 2 représentent seulement 10% de la classe 2 qui ont survécus en daphnie de la classe 3. Ce qui implique que la régénération des daphnies de la classe 2 aura lieu de façon alternative avec les classe 1 et 3 qui apparaissent simultanément avec prédominance des juvéniles. Les hypothèses proposées avant sont aussi possibles pour ce cas.

Dans la nature, et dans le cas où les conditions deviennent défavorables, que ce soit par l'effet toxique de ces fongicides ou bien par manque d'oxygène ou de nourriture, la situation devient grave ce qui nous laisse penser aux hypothèses suivantes :

➤ Les daphnies de la classe 3 ne survivent pas pour une deuxième ponte, et au même temps leurs nombres sont restreints et pour produire des œufs résistants avec une reproduction sexuée la présence des mâles est nécessaire.

- Les mâles issus de la même génération que les femelles de la classe 3, et avec des facteurs négatifs : taux de survie faible, présence de prédateurs, présence de malformations, inhibition de mobilité, ou difficulté de trouver la femelle ...etc, même s'ils arrivent à féconder les femelles, le taux de survie de ces dernières est très faible (10%) et par conséquent la probabilité de produire des œufs de résistance sera très faible arrivant ainsi à l'extinction.

- Les daphnies de la classe 1 immatures se trouvent avec les femelles de la 3^{ème} classe, la probabilité de produire un œuf de résistance ici est encore plus faible et elle aura lieu si et seulement si la maturité des mâles a lieu juste avec le passage des femelles à la classe 3 et que le lâchement de l'œuf de résistance aura lieu avant la mort de ces femelles arrivant ainsi à l'extinction ce qui n'est pas le cas.

➤ Les daphnies femelles et mâles de la classe 2 sont de la même génération donc la période de maturité sexuelle est approximativement identique, se reproduisent de façon sexuée et survivront ainsi pour produire des œufs de résistance. Le nombre des femelles fécondées est le facteur décisif.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

1.9. Daphnies exposées à 0,032 mg/L du Thirame

Le taux de survie des daphnies traités dans ce modèle est de 0% car les daphnies adultes meurent juste après la première ponte. Le tableau ci-après illustre la dynamique de la population des daphnies. On prédit une décroissance continue de la population qui arrive à l'extinction au 10^{ème} pas.

Tableau 13. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps

Time	Population output			Total pop
	1	2	3	
0	10	0	0	10
1	0	10	0	10
2	5	0	0	5
3	0	5	0	5
4	3	0	0	3
5	0	3	0	3
6	1	0	0	1
7	0	1	0	1
8	1	0	0	1
9	0	1	0	1
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0

L'évolution de la charge totale des daphnies ainsi que les différentes classes d'âge au cours de 25 pas de temps révèle une décroissance des populations. Les 10 daphnies mises en test comme population initiale arrive à pondre très peu de néonates et n'arrivent plus à survivre et à se développer en daphnies de la classe 3 (absence totale des daphnies adultes

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

et fécondes capable de pondre pour la 2^{ème} fois), en plus une daphnie sur deux de la classe 2 pond un seul juvénile d'après les résultats du test chronique de reproduction. Les proportions pour la même durée sont stables dès le 1^{er} pas où on enregistre qu'une seule classe populationnelle, l'extinction aura lieu au 8^{ème} pas de temps.

La figure (58) illustre les variations des différentes premières proportions où une absence totale des femelles adultes de la classe 3, tandis que la classe des juvéniles et les adultes de la classe 2 sont présentes de façon alternative.

Stable Distribution	
Proportion	Class
0,0000	1
1,0000	2
0,0000	3
$\lambda = 0,707107$	

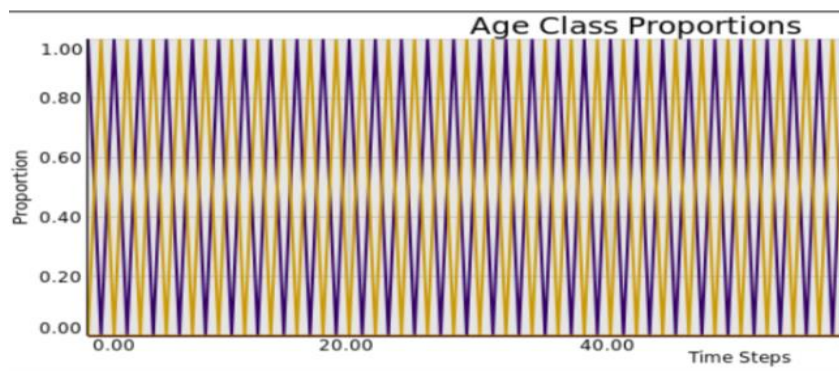


Figure 58. Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge

La valeur propre $\lambda = 0,707107$ est inférieure à 1 ce qui signifie que la population exposée à 0,032 mg/L du Thirame va décroître sur le long terme, ce qui est synonyme d'extinction de la population.

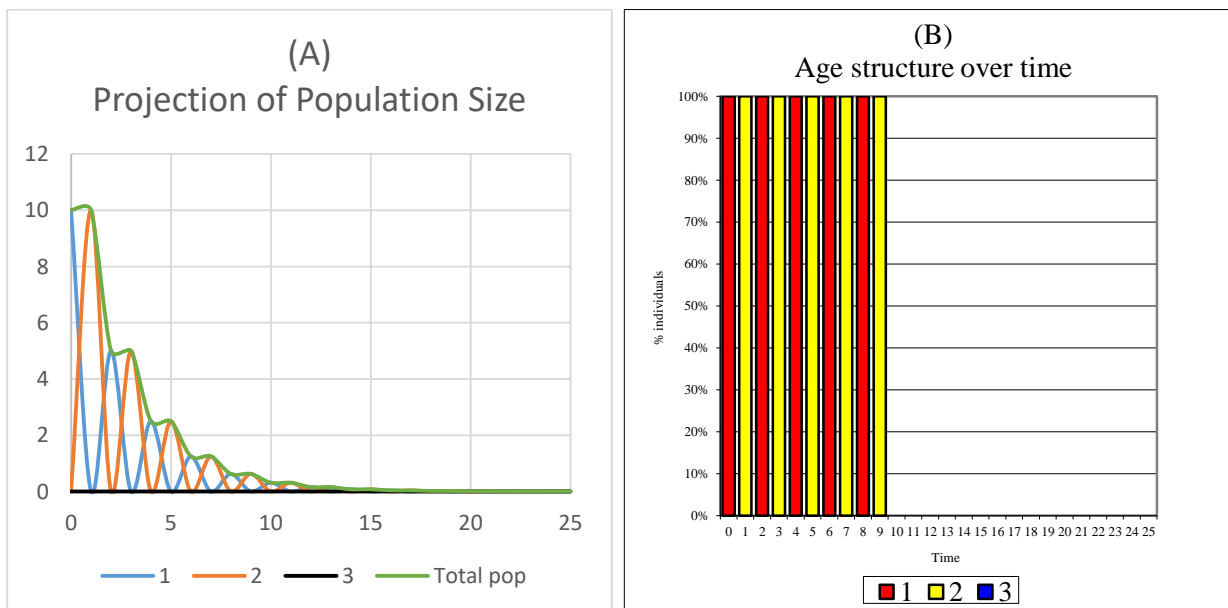


Figure 59. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

1.10. Daphnies exposées à 0,032 mg/L du Bouillie bordelaise

Le taux de survie des daphnies traitées dans ce modèle est 0% car les daphnies adultes meurent juste après la première ponte. On suit la dynamique d'une population initiale de 10 juvéniles qui ont été exposés durant 21 jours (toute la durée de vie) à 0,032 mg/L de Bouillie bordelaise. On applique le même principe de modélisation matricielle de Leslie précédente, les valeurs de survie et de fécondité sont apportées aux résultats des daphnies traitées lors du test chronique.

Tableau 14. Evolution de la taille totale de la population au cours du temps, selon le modèle de Leslie pour 25 pas de temps

Population output				
Time	1	2	3	Total pop
0	10	0	0	10
1	0	10	0	10
2	6	0	0	6
3	0	6	0	6
4	4	0	0	4
5	0	4	0	4
6	2	0	0	2
7	0	2	0	2
8	1	0	0	1
9	0	1	0	1
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0

On prédit contrairement aux cas précédents une décroissance continue de la population initiale qui arrive à l'extinction au 10^{ème} pas.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION
VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

La figure ci-après illustre les variations des différentes premières proportions selon les différentes classes d'âges jusqu'à la stabilisation ou l'extinction totale.

Stable Distribution	
Proportion	Class
0,0000	1
1,0000	2
0,0000	3
$\lambda = 0,774597$	

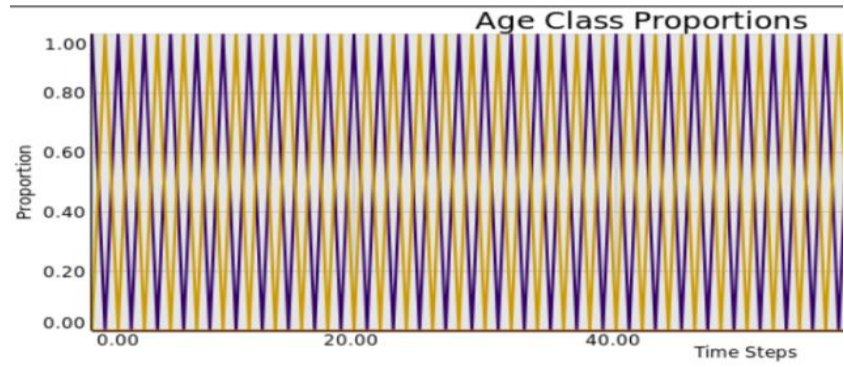


Figure 60. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

La valeur propre $\lambda = 0,774597$ est inférieure à 1 ce qui signifie que la population exposée à 0,032 mg/L de Bouillie bordelaise va décroître sur le long terme, ce qui est synonyme d'extinction de la population.

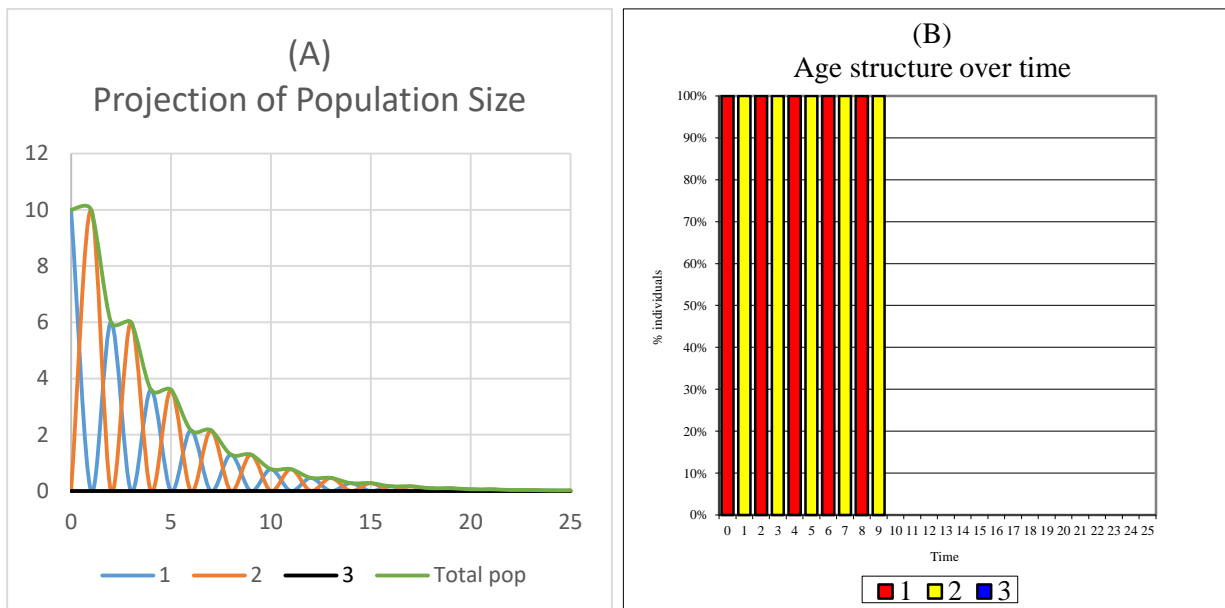


Figure 61. (A)- Evolution au cours du temps de la taille totale de la population traité et (B)- Evolution des proportions relatives des différentes classes d'âge au cours 25 pas

On remarque une absence totale des femelles adultes de la classe 3, tandis que la classe des juvéniles et les adultes de la classe 2 sont présents de façon alternative.

L'évolution de la taille totale des daphnies ainsi que les différentes classes d'âge au cours de 25 pas de temps montre une décroissance des populations.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION

VOLET 2 : MODELISATION EN DYNAMIQUE DE POPULATION

Les 10 daphnies mises en test comme population initiale arrivent à pondre très peu de néonates et n'arrivent plus à survivre et à se développer en daphnies de la classe 3 (absence totale des daphnies adultes et fécondes capables de pondre pour la 2^{ème} fois).

En plus le nombre moyen des néonates produits est de 0,6 d'après les résultats du test chronique de reproduction. Les proportions pour la même durée sont stables dès le 1^{er} pas où on enregistre qu'une seule classe populationnelle.

Si la quantité du Thirame ou de la Bouillie bordelaise ou même leurs mixture s'accumule ou bien se verse pour qu'elle soit en telle concentration dans les écosystèmes où vivent les daphnies, la population colonisant le lac ou le bassin va disparaître tôt ou tard quel que soit la population initiale. Dans la nature, et à force d'accumulation des pesticides jusqu'ils atteignent des concentrations faibles mais aussi critiques, les daphnies seront exposées de façon chronique et continue ce qui influe négativement sur leurs taux de survie et leurs pouvoir reproducteur. Finalement, peu importe la charge populationnelle en daphnie dans son biotope, et si la quantité de ces fongicides se présente en une telle concentration, la population colonisant les écosystèmes clos subira une disparition tôt ou tard.



PARTIE IV

CONCLUSION & PERSPECTIVES



CONCLUSION

La problématique initiale de ce travail était divisé en deux volets bien différenciés où le premier consiste en un suivi de la toxicité à l'échelle individuelle et le second à l'échelle populationnelle dans le but d'étudier plusieurs aspects toxicologiques de deux fongicides connus pour leur large spectre d'utilisation dans le domaine agricole : Thirame et Bouillie bordelaise et ce afin de mieux comprendre le mode d'action de ces xénobiotiques sur une espèce représentative des écosystèmes aquatiques d'eau douce.

Pour ce faire, le suivi d'une approche biologique via un outil puissant qui est «la bio-surveillance » a pour but d'évaluer les risques environnementaux, ce qui nous permet de choisir les daphnies comme modèle biologique. Les cladocères, et spécialement les daphnéidées, ont été largement utilisés dans la toxicologie aquatique et leur sélection a été favorisée par leur sensibilité envers une large gamme de xénobiotiques. *Daphnia magna*, qui occupe une position cruciale dans l'écosystème en tant que bioindicateur/bioaccumulateur et comme consommateurs primaires des milieux dulçaquicoles, a été choisi car elle alliait plusieurs avantages tels que son rôle important dans la chaîne trophique ainsi que sa sensibilité et sa facilité d'utilisation pour des essais à long terme au laboratoire. Ces caractéristiques nous ont permis d'étudier les différents aspects de la toxicité des deux fongicides précités au niveau comportementales, physiologiques et populationnel et qui ont été extrapolées à l'aide de tests standardisés au laboratoire ainsi que par des modèles matriciels à l'échelle de la population, niveau d'organisation plus pertinent d'un point de vue écologique.

Dans la première partie de cette étude, nous avons essayé de mettre en évidence le potentiel toxique de ces deux fongicides sur *Daphnia magna* qui s'est révélée être encore une fois un excellent bio-indicateur et ce à travers l'utilisation de différents tests. Le test d'immobilisation des juvéniles suite à l'exposition aiguë aux fongicides a permis de cerner la CI_{50} . Ce test a été adopté comme un témoignage du potentiel toxique depuis qu'il est devenu un test standardisé où nous avons enregistré dans notre cas des valeurs de la CI_{50} inférieures à celles rapportées par la réglementation ou la littérature. Cette variabilité est liée à plusieurs facteurs entre autres l'extrême sensibilité de ces espèces à ces formulations

commerciales et aux adjuvants, aux émulsifiants et / ou d'autres ingrédients inertes. Il semble donc probable que les formulations soient la principale cause de toxicité et non le composant pure, d'autres part et dans le cas de la Bouillie bordelaise, il s'agirait de la disponibilité du cuivre sous différentes formes formant ainsi un gradient de toxicité sans oublier les changements du pH du milieu qui peuvent influencer la toxicité de ce dernier.

Depuis que les effets sub-létaux peuvent se manifester à des faibles concentrations, l'estimation des effets chroniques sur les espèces aquatiques à partir des données de toxicité aiguë est souvent indispensable, ceci s'est avéré nécessaire dans notre étude vue que les tests chroniques sur ces deux molécules sont rares ou bien ancienne. Ces analyses ont été utilisées pour évaluer les réponses à long terme aux faibles doses de contaminants.

L'altération de la survie et la reproduction suite à l'exposition à long terme a montré que *Daphnia magna* est une des espèces d'invertébrés d'eau douces les plus sensibles vis-à-vis de la toxicité du Thirame et de la Bouillie bordelaise. Ainsi il ressort de nos résultats, que les daphnies ont répondu d'une manière quasi similaire au traitement par les deux types de fongicides. Pour une durée d'exposition de 21 jours, la longévité, la survie et le nombre de mue ont diminué, alors que ces paramètres permettent d'habitude d'évaluer l'état de croissance et de santé de ces organismes. Parallèlement, la perturbation de la maturation, la fécondité et la fertilité, ont indiqué l'altération des performances reproductrices de *Daphnia* sous les conditions du stress chimique appliqué à partir d'une concentration dite seuil qui est de l'ordre de 0,016 mg/L. Cette étude offre donc un résultat prometteur permettant ainsi de réduire le seuil préconisé dans le cadre de l'évaluation du risque lié à la présence de ces fongicides dans l'environnement aquatique et la protection des espèces qui y vivent.

Pour compléter ces observations il nous a semblé intéressant d'étudier les effets de ces molécules sur le métabolisme basal. En effet, chez tous les organismes vivants, l'ensemble des processus biochimiques et physiologiques sont dépendants de la quantité d'énergie disponible. La perturbation de la composition biochimique en protéines, glucides et lipides, qui sont utilisée comme biomarqueur de contamination, pourrait avoir un impact sur des processus physiologiques tels que l'assimilation, la croissance ou la reproduction qui sont indispensables au maintien et à la survie de l'espèce.

PARTIE IV : CONCLUSION & PERSPECTIVES

Par ailleurs la consommation de l'oxygène, par le suivi du métabolisme respiratoire, est une technique qui rend compte de l'intensité de l'activité respiratoire à travers la consommation d'O₂ et c'est là où réside l'intérêt de la technique utilisée où nous avons mis en évidence une diminution de la consommation d'O₂ en présence des deux fongicide. Ces perturbations sont liées à l'interaction de ces molécules chimiques avec les enzymes clés du métabolisme entraînant une augmentation ou à une diminution de l'utilisation de l'énergie. Cette approche intégrée permet de relier les différents paramètres étudiés et d'avoir une vision plus globale des effets et ainsi d'estimer les effets sur l'état de santé des organismes et la capacité de ces derniers à résister à un stress supplémentaire.

D'un autre côté, les manifestations au niveau individuel ne sont que la somme des interactions cachées derrière une échelle plus petit qui est la cellule et dont les effets se reflètent sur l'ensemble de l'organisme. La cellule constitue l'unité fonctionnelle et élémentaire d'organisation et les xénobiotiques acheminés vers elle doivent faire face aux systèmes de défense, ce qui nous amène à concentrer notre recherche vers les causes de ces manifestations individuelles via des études cytotoxiques.

En effet, l'exposition des daphnies à des concentrations croissantes des fongicides a révélé une augmentation de la sévérité des effets cytotoxiques de ces derniers. L'étude des biomarqueurs de stress ont révélé le potentiel pouvoir de ces molécules à induire le système de détoxification, et de stimuler le système antioxydant par le biais d'une augmentation des activités GST et celle de la CAT, la déplétion du taux de GSH et l'augmentation des taux de MDA qui témoigne d'une peroxydation lipidique traduisant ainsi une dégradation de la membrane cellulaire. Ces modifications sont probablement liées à une augmentation de la libération des ROS et par conséquent l'induction du stress oxydant.

Parallèlement, nos résultats ont révélé une corrélation entre l'exposition et l'inhibition de l'AChE. Cette dernière n'est pas une enzyme qui intervient dans les systèmes de défense, cependant il est connu qu'elle est inhibée par les molécules neurotoxiques comme les organophosphorées et les carbamates suggérant ainsi une atteinte du système nerveux de nos espèces par ces fongicides et par conséquent la mise en évidence de leur potentiel neurotoxique. Ces perturbations nerveuses peuvent expliquer, au moins en partie, l'immobilisation observée chez les néonates lors du test aigüe.

PARTIE IV : CONCLUSION & PERSPECTIVES

Dans la deuxième partie de ce travail, l'étude populationnel par l'application de nos données de survie et de fécondité au modèle matriciel de Leslie a permis de quantifier les conséquences de l'exposition à long terme au Thirame et à la Bouillie bordelaise aux futures générations. L'approche « modélisation » souligne le fait que l'impact au niveau de la dynamique de la population peut prédire les effets observés sur une durée de 21 jours et l'appliquer sur plusieurs générations. Pour une durée de 25 pas de temps nous avons pu prédire l'influence de ces fongicides sur les populations des daphnies qui a révélé la possible extinction si ces xénobiotiques existent ou rajoutés en une concentration critique qui équivaux 0,032 mg/L dans les milieux aquatiques où vivent les daphnies surtout s'il s'agit d'un biotope clos. Ces résultats montrent l'importance de ce modèle matricielle dans la protection de l'environnement.

Enfin et dans un souci de protection de la santé humaine et de l'environnement, et comme étant des scientifiques en écotoxicologie, on se préoccupe à trouver des solutions depuis que l'utilisation des fongicides de synthèse est la méthode de lutte la plus utilisée mais la pratique de ces produits par le non-respect des doses préconisées ainsi que les périodes d'utilisation restent toujours le majeur problème. L'agriculteur par ignorance peut penser qu'en traitant plus, il protège mieux sa culture. Toutefois on ne peut pas écarter la possibilité d'existence sur le marché de produits contrefaits ou fabriqués frauduleusement et qui peuvent être écoulés en proposant des prix qui défient toute concurrence ce qui est due à la rareté et le coût élevé des produits de bonne qualité sur les marchés locaux mais aussi à la présence de souches de champignon de plus en plus résistantes aux fongicides. Ainsi, les produits phytosanitaires de synthèse ont révélé à travers le temps leur toxicité élevée en fonction des concentrations utilisées ce qui a incité les scientifiques à trouver des solutions alternatives à ces problèmes.

Ces dernières années le recours à la phytothérapie, par l'utilisation des extraits de plantes tels que les huiles essentielles seules ou en mixtures avec des fongicides de synthèse pour réduire les concentrations abusives dans l'environnement, ou bien par l'utilisation d'antagonistes microbiens (levures, champignons et bactéries) sont assez prometteurs et se présente ainsi comme une solution peu coûteuse avec un moindre impact sur l'environnement et le consommateur.

PARTIE IV : CONCLUSION & PERSPECTIVES

A cet effet nous recommandant dans les prochains travaux d'études à élargir notre spectre de recherche sur cette application «Bio». A titre d'exemple l'activité antifongique des huiles essentielles issues des plantes telles que : *Melaleuca quinquenervia L.* (*Myrtaceae*) et *Eucalyptus platyphylla F. Muell.* (*Myrtaceae*) ou bien l'utilisation des antagonistes appartenant à différentes espèces biologiques : levures (*Pichia guilliermondii Wiskerham*, *Candida oleophila Montrocher ...etc*), bactéries (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae...etc*) ou bien champignons (*Myrothecium roridum*, *Trichoderma viride...etc*).

PERSPECTIVES

Une des principales limites de nos études est l'état plutôt descriptif des résultats, lié pour beaucoup, au temps qui nous était impartis, pour mettre en place, au laboratoire, la démarche conceptuelle ainsi que les approches techniques pour la développer.

En perspectives, chaque résultat obtenu dans ce travail constitue une ébauche à part entière pour entreprendre de nouvelles recherches, de ce fait, il serait judicieux de :

→ Améliorer le maintien de la culture des daphnies qui nécessite une grande précaution et un suivi rigoureux notamment la contamination par des bactéries ou autres, le niveau d'oxygénation, les facteurs de stress, la surpopulation, le manque de nourriture... etc. La mortalité abusive, la pigmentation rougeâtre des daphnies signe d'une hypoxie ou encore l'apparition des éphippies (œufs de résistance) indique que les conditions deviennent défavorables.

→ Il est aussi préférable de sélectionner une clone mise en culture sur plusieurs années, propre au laboratoire pour éviter les variations inter-clonales entre et/ou inter laboratoires, ce qui confère aux résultats une crédibilité et une certitude avec les tests de répétabilité et de reproductibilité.

→ De tester la mixture de ces deux fongicides, du fait qu'ils sont mélangés pour réduire certaines maladies fongiques.

PARTIE IV : CONCLUSION & PERSPECTIVES

- D'autres tests complémentaires surtout propre aux daphnies sont utiles pour mieux éclaircir nos connaissances sur la toxicité de ces fongicides tels que : les activités des mandibules et des appendices thoraciques, test phototaxie, rythme cardiaque...etc.
- De développer les dosages d'autres biomarqueurs (GPX, LDH, GR, SOD et le ratio GSH/GSSG).
- Utiliser d'autres modèles matricielles combinées, comme la combinaison des modèles DEBtox et des matrices de Leslie.
- De comparer les effets des fongicides testés sur d'autres modèles biologiques aquatiques proches ou lointains des daphnies. Toutes ces études permettraient de mieux comprendre les interactions entre les différents stressors auxquels sont soumis les organismes pour ensuite mieux évaluer les risques qui leur sont associés dans le cadre d'évaluation du risque écologique.



PARTIE V

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



A

- ARLA. (Agence de réglementation de lutte antiparasitaire de Santé Canada). (2016). *Projet de décision et préévaluation PRVD2016-07.Thirame.Ottawa.canada.46p*
- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, 18(2), 265-267.
- Abel, P. D. (1974). Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *Journal of fish Biology*, 6(3), 279-298.
- ACC. (2003). *Rubber and Plastic Additives Panel of the American Chemistry Council. Thiuram Category Justification and Testing Rationale, CAS Registry Numbers 97-77-8, 97-74-5 and 137-26-8. US EPA document 201-14587A.*
- ACTA. (Association de Coordination Technique Agricole). (2006). *Index phytosanitaire. Paris: Action de Coordination des Techniques Agricoles, 824 p.*
- Adema, D. M. M. (1978). *Daphnia magna as a test animal in acute and chronic toxicity tests. Hydrobiologia*, 59(2), 125-134.
- Agrawal, R. C., Shukla, Y., & Mehrotra, N. K. (1997). Assessment of mutagenic potential of thiram. *Food and chemical toxicology*, 35(5), 523-525.
- Ait-hamlet, B. S. (2013). *Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols Helix aspersa (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en Biologie Animale, Université Badji Mokhtar-Annaba, 177p).*
- Akerboom, T., & Sies, H. (2017). *Glutathione transport and its significance in oxidative stress. In Glutathione (1990) (pp. 45-56). CRC Press.*
- Akyilmaz, E., & Dinçkaya, E. (2003). Development of a catalase based biosensor for alcohol determination in beer samples. *Talanta*, 61(2), 113-118.
- Alavanja, M. C., Hoppin, J. A., & Kamel, F. (2004). Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health*, 25, 155-197.
- Alimentarius Codex. (1994). *Joint FAO/WHO food standards programme. Codex Committee on methods of Analysis and Sampling: 19th session, Budapest, Hungary, Criteria for evaluating acceptable methods for evaluating acceptable methods for codex purposes.*
- Almeida, J. A., Novelli, E. L. B., Silva, M. D. P., & Júnior, R. A. (2001). Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution*, 114(2), 169-175.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., & Rainbow, P. S. (2006). *Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology*, 76(2), 160-202.
- Amoros, C. (1984). *Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises-5. Crustacés Cladocères. Publications de la Société Linnéenne de Lyon*, 53(3), 72-107.
- ANSES. (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). (2011). *Dossier n°2007-1911 – BOUILLIE BORDELAISE CAFFARO WG. Maisons-Alfort. 18 P.*
- Arambourou, H., Gismondi, E., Branchu, P., & Beisel, J. N. (2013). Biochemical and morphological responses in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae exposed to lead-spiked sediment. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(11), 2558-2564.
- Ardito, G., Bigatti, P., & Lamberti, L. (1997). Increased frequencies of sister chromatid exchanges and micronuclei in "in vitro" lymphocyte cultures treated with the fungicides thiram and ziram. *Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale*, 73(1-2), 1.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto J-C et García-Río L. (2008). "The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources." *Agriculture Ecosystems & Environment* 123(4):247-260.
- Armitage, K. B., & Lei, C. H. (1979). Temperature acclimatization in the filtering rates and oxygen consumption of *Daphnia ambigua* Scourfield. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 62(4), 807-812.
- Armstrong, D. (Ed.). (2002). *Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols* (Vol. 186). New Jersey: Humana Press.
- Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science*, 1227-1238.
- Arumugam, S., Jang, Y. C., Chen-Jensen, C., Gibran, N. S., & Isik, F. F. (1999). Temporal activity of plasminogen activators and matrix metalloproteinases during cutaneous wound repair. *Surgery*, 125(6), 587-593.
- ASC. (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada). (2016). *Projet de décision de réévaluation PRVD2016-07 Thirame*. 1925-0983.
- AFNOR NF T90-376. (Association Française de Normalisation). (2000). *Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité chronique vis à vis de Ceriodaphnia dubia en 7 jours, Essai d'inhibition de la croissance de la population*.
- AFNOR XP X33-012. (Association Française de Normalisation). (2000). *Characterisation of sludges—determination of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB)*.
- ASTM. (American Society for Testing and Materials). (2001). *Standard guide for conducting Daphnia magna life-cycle toxicity tests*. In: *Annual book of ASTM standards*, E 1193-97, Philadelphia, 418-433.
- Atkin, M. A., Gasper, A., Ullegaddi, R., & Powers, H. J. (2005). Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma: response to antioxidants in vitro and to antioxidant supplementation. *Clinical Chemistry*, 51(11), 2138-2144.
- Aubertot, J. N., Barbier, J. M., Carpentier, A., Gril, J. J., Guichard, L., Lucas, P., ... & Voltz, M. (2005). *Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective, INRA et Cemagref (France)*.
- AVC (2001). *La protection raisonnée du vignoble en Champagne*. Association Viticole Champenoise <http://www.avc.net/>.
- Avery, S. V. (2001). Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Advances in applied microbiology*, 49, 111-142.

B

- Babcock, G. T. (1999). How oxygen is activated and reduced in respiration, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12971-12973.
- Babo, S., & Vasseur, P. (1992). In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 22(1), 61-68.
- Babo, S., & Vasseur, P. (1992). In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 22(1), 61-68.
- Bacaër N. 2008. *Histoire de mathématiques et de populations*, Cassini, Paris.
- Bae, E., Samanta, P., Yoo, J., & Jung, J. (2016). Effects of multigenerational exposure to elevated temperature on reproduction, oxidative stress, and Cu toxicity in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 132, 366-371.
- Baghestani, M. A., Zand, E., Soufizadeh, S., Beheshtian, M., Haghghi, A., Barjasteh, A., ... & 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 protection*, 27(1), 104-111.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baillieul, M., Smolders, R., & Blust, R. (2005). *The effect of environmental stress on absolute and mass-specific scope for growth in Daphnia magna Straus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140(3-4), 364-373.
- Bair J. (2012). *La matrice de Leslie et la dynamique des populations*, Tangente Horssérie no 42, Mathématiques et biologie, éditions Pole, Paris, 2012, p. 90-94.
- Bair, J. (2012 a). *Matrice de Leslie. Pour modéliser la dynamique d'une population structurée en classes d'âges*. *Bulletin de l'APMEP*, (501), 527-533.
- Baird, D. J., Barber, I., Soares, A. M., & Calow, P. (1991). *An early life-stage test with Daphnia magna Straus: an alternative to the 21-day chronic test?*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 22(1), 1-7.
- Balambigai, N., & Aruna, D. (2011). *Impact of copper sulphate, an essential micronutrient on ACh, AChE and Na⁺K⁺ATPase in various tissues of the fish Cyprinus carpio (L.)*. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5(2), 141-146.
- Baldi, I., Cordier, S., Coumoul, X., Elbaz, A., Gamet-Payraastre, L., Lebailly, P., ... & van Maele-Fabry, G. (2013). *Pesticides: effets sur la santé*.
- Baldwin, D. H., Sandahl, J. F., Labenia, J. S., & Scholz, N. L. (2003). *Sublethal effects of copper on coho salmon: impacts on nonoverlapping receptor pathways in the peripheral olfactory nervous system*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(10), 2266-2274.
- Baldwin, J., Eddleman, C. D., Giblin-Davis, R. M., Williams, D., Vida, J., & Thomas, W. (1997). *The buccal capsule of Aduncospiculum halicti (Nemata: Diplogasterina): an ultrastructural and molecular phylogenetic study*. *Canadian Journal of Zoology*, 75(3), 407-423.
- Balvay, G. (2009). *La biodiversité du zooplancton d'eau douce*. *Archives des sciences*, 62, 87-100.
- Bandyopadhyay, M., Chakraborty, R., & Raychaudhuri, U. (2007). *A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh)*. *LWT-Food Science and Technology*, 40(5), 842-851.
- Barata, C., Baird, D. J., Soares, A. M. V. M., & Guilhermino, L. (2001). *Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of Daphnia magna Straus exposed to ethyl parathion*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(2), 155-163.
- Barata, C., Solayan, A., & Porte, C. (2004). *Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to Daphnia magna*. *Aquatic toxicology*, 66(2), 125-139.
- 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*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140(2), 175-186.
- Barber I., Baird D.J., Calow P. (1990) *Clonal variation in general responses of Daphnia magna Straus to toxic stress. II. Physiological effects*. *Functional Ecology*, 4, p. 409-414.
- Barlow, B. K., Lee, D. W., Cory-Slechta, D. A., & Opanashuk, L. A. (2005). *Modulation of antioxidant defense systems by the environmental pesticide maneb in dopaminergic cells*. *Neurotoxicology*. Vol. 26, pp. 63-75.
- Barraclough, D., Kearney, T., & Croxford, A. (2005). *Bound residues: environmental solution or future problem?*. *Environmental Pollution*, 133(1), 85-90.
- Beaumont, A., Cassier, P. (2004). *Biologie animale : Des protozoaires aux métazoaires épithélienneuriens*, Tome 2. Eds, Sciences Sup, Dunod.
- Beckett, G. J., & Hayes, J. D. (1993). *Glutathione S-transferases: biomedical applications*. In *Advances in clinical chemistry* (Vol. 30, pp. 281-380). Elsevier.
- Beckman, J. S. et Koppenol, W. H. (1996). *Nitric oxide, superoxide, and peroxyntirite: The good, the bad, and the ugly*, *American Journal of Physiology* 40, C1424-C1437.
- Beeby, A., 2001. *What do sentinels stand for?* *Environmental Pollution*, 112, 285-298.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Béguel, J. P. (2012). *Étude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse Crassostrea gigas* (Doctoral dissertation, Brest).
- Begum, G., & Vijayaraghavan, S. (1999). *Effect of Acute Exposure of the Organophosphate Insecticide Rogor on Some Biochemical Aspects of Clarias batrachus (Linnaeus)*. *Environmental Research*, 80(1), 80-83.
- Belfiore, N. M., & Anderson, S. L. (2001). *Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 489(2-3), 97-122.
- Belkheiri, N. (2010). *Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Benbouzid, H., Berrebbah, H., Berredjem, M., & Djebar, M. R. (2012). *Toxic effects of phosphoramidate on Paramecium sp. with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94(3), 557-565.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316.
- Berriau, G. (2012). *L'utilisation du cuivre en viticulture: réduction de doses, seuil de toxicité et réglementation*. *Viticulture*, 4, 115.
- Bettin, C., Oehlmann, J., & Stroben, E. (1996). *TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level*. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 50(3), 299-317.
- Bhagat, J., Ingole, B. S., & Singh, N. (2016). *Glutathione S-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails: A review*. *Invertebrate Survival Journal*, 13(1), 336-349.
- Bhavan, P. S., & Geraldine, P. (1997). *Alterations in Concentrations of Protein, Carbohydrate, Glycogen, Free Sugar, and Lipid in the Prawn Macrobrachium malcolmsonii on Exposure to Sublethal Concentrations of Endosulfan*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 58(2), 89-101.
- Biesinger, K. E., & Christensen, G. M. (1972). *Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of Daphnia magna*. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 29(12), 1691-1700.
- Biesinger, K. E., & Christensen, G. M. (1972). *Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of Daphnia magna*. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 29(12), 1691-1700.
- Bigot, A., Minguez, L., Giambérini, L., & Rodius, F. (2011). *Early defense responses in the freshwater bivalve Corbicula fluminea exposed to copper and cadmium: transcriptional and histochemical studies*. *Environmental toxicology*, 26(6), 623-632
- Binner, M., Kloas, W., & Hardewig, I. (2008). *Energy allocation in juvenile roach and burbot under different temperature and feeding regimes*. *Fish physiology and biochemistry*, 34(2), 103-116.
- Biron, P. A., Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Charles, S., & Billoir, E. (2012). *Population-level modeling to account for multigenerational effects of uranium in Daphnia magna*. *Environmental science & technology*, 46(2), 1136-1143.
- Blair, A., Zheng, T., Linos, A., Stewart, P. A., Zhang, Y. W., & Cantor, K. P. (2001). *Occupation and leukemia: A population-based case—control study in Iowa and Minnesota*. *American journal of industrial medicine*, 40(1), 3-14.
- Blaylock, B. G., Frank, M. L., & McCarthy, J. F. (1985). *Comparative toxicity of copper and acridine to fish, Daphnia and algae*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 4(1), 63-71.
- Bliefert, C., & Perraud, R. (2007). *Chimie de l'environnement: air, eau, sols, déchets*. De Boeck Supérieur.
- Bluzat, R., Jonot, O., & Seugé, J. (1982). *Toxicité aiguë d'un fongicide, le thirame (dithiocarbamate), chez le crustacé amphipode d'eau douce Gammarus pulex*. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 29(3), 225-233.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bocquené, G., Carbamates, & Galgani, F. (1998). *Biological effects of contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds* (pp. 1-13). Copenhagen,, Denmark: International Council for the Exploration of the Sea.
- Bodar, C. W. M., Van Leeuwen, C. J., Voogt, P. A., & Zandee, D. I. (1988). *Effect of cadmium on the reproduction strategy of Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 12(4), 301-309.
- Boelsterli, U. A. (2002). *Mechanistic toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets*. CRC press.
- Bøhn T., Traavik T., Primicerio R. (2010) *Demographic responses of Daphnia magna fed transgenic Bt-maize*. *Ecotoxicology*, 19, p. 419-430.
- Boillot, C. (2008). *Evaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques : Contribution à l'amélioration de la phase "caractérisation des effets"*. Thèse en Sciences de l'Environnement Industriel et Urbain. Lyon: INSA de Lyon et LSEENTPE, 292 p.
- Boillot, C. (2008). *Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Contribution à l'amélioration de la phase «caractérisation des effets»* (Doctoral dissertation).
- Bonnal, F. (1994). *Méthomyl et thirame: influence de deux pesticides à pouvoir électrodonneur sur l'iode et sur les systèmes peroxydasiques* (Doctoral dissertation).
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., & Delattre, J. (2003). *Radicaux libres et anti-oxydants. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Paris: Flammarion, 59-81.
- Bonnot, F. (2009). *Superoxyde réductase: Mécanisme de transfert d'électrons vers le site actif et rôle de la lysine 48 dans la catalyse* (Doctoral dissertation).
- Bossuyt, B. T., Muysen, B. T., & Janssen, C. R. (2005). *Relevance of generic and site-specific species sensitivity distributions in the current risk assessment procedures for copper and zinc*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(2), 470-478.
- Bouaricha, H. (2013). *Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim: Essai comparatif sur deux modèles biologiques (Helix aspersa et Paramecium sp)* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en Toxicologie, Université Badji Mokhtar–Annaba, 131p).
- Boulton A. J., Findlay S., Marmonier P., Stanley E. H. & Valett H. M. (1998). *The functional signifi cance of the hyporheic zone in streams and rivers*. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 59–81.
- Bourlière, F. (1949). *Structure et dynamique des populations sauvages de vertébrés. Population (french edition)*, 645-670.
- Bouvier, G., Blanchard, O., Momas, I., & Seta, N. (2006). *Environmental and biological monitoring of exposure to organophosphorus pesticides: application to occupationally and non-occupationally exposed adult populations*. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 16(5), 417-426.
- Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bray, T. M., & Taylor, C. G. (1993). *Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress*. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 71(9), 746-751.
- Brouwer, M., & Brouwer, T. H. (1998). *Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, Callinectes sapidus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 351(2), 257-264.
- 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*. *Aquatic toxicology*, 66(3), 267-278.
- Burgman, M. A., Ferson, S., & Akçakaya, H. R. (1993). *Risk assessment in conservation biology* (Vol. 12). Springer Science & Business Media.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Burton, D. T., Jon~, A. H. & Cairns, J. R. (1972). Acute zinc toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdnerii*): Confirmation of the hypothesis that death is related to tissue hypoxia. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 29, 1463-6.
- Buzio, L., Tondel, M., De, G. P., Buzio, C., Franchini, I., Mutti, A., & Axelson, O. (2002). Occupational risk factors for renal cell cancer. An Italian case-control study. *La Medicina del lavoro*, 93(4), 303-309.

C

- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 79-110.
- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology and medicine*, 29(3-4), 222-230.
- Cadenas, E., & Sies, H. (1998). The lag phase. *Free radical research*, 28(6), 601-609.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., & Ravanat, J. L. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1-2), 5-23.
- Cailly, P. (2011). *Modélisation de la dynamique spatio-temporelle d'une population de moustiques, sources de nuisances et vecteurs d'agents pathogènes* (Doctoral dissertation, UNAM [Université Nantes Angers Le Mans]).
- Calow, P. (1991). Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 100(1-2), 3-6.
- Calvet R, Barriuso E, Bedos C, Benoit P, Charnay MP, Coquet Y. (2005). *Les pesticides dans le sol: Conséquences agronomiques et environnementales*. Ed : France Agricole. 641pp.
- Calvet, R., & Charnay, M. P. (2002). *Le devenir dans le sol des substances phytopharmaceutiques*. In : *Pesticide et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement*. Paris : ACTA, p. 805-833.
- Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M. P., & Coquet, Y. (2005). *Rétention des pesticides dans le sol*. Ch 4. *Les Pesticides dans le Sol: Conséquences Agronomiques et Environnementales*, 161-233.
- Cambroner, M. C., & Orsini, L. (2018). Resurrection of dormant *Daphnia magna*: Protocol and applications. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (131), e56637.
- Campbell, P. G. (1994). Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. *Metal Speciation and bioavailability*, 45-102.
- Canesi, L., Fabbri, R., Gallo, G., Vallotto, D., Marcomini, A., & Pojana, G. (2010). Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquatic Toxicology*, 100(2), 168-177.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., & Gallo, G. (1999). Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, 46(1), 67-76.
- Carvalho, C. S., Araujo, H. S. S., Fernandes, M. N. (2004). Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and 8.0. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 137: 225–234.
- Casida, J. E. (1964). Esterase Inhibitors as Pesticides: Because of favorable biological properties they are displacing other types of established compounds. *Science*, 146(3647), 1011-1017.
- Caswell H. (2001) *Matrix Population Models. Construction, Analysis, and Interpretation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2nd Edition. 722p.
- Cattaneo, R., Moraes, B. S., Loro, V. L., Pretto, A., Menezes, C., Sartori, G. M. S., ... & Zanella, R. (2012). Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 62(1), 97-106.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cauzzi, N. (2007). *Evaluation de l'éco-compatibilité de sédiments contaminés, traités ou non par un procédé physico-chimique, dans le cadre d'un scénario de dépôt en gravière* (Doctoral dissertation, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon).
- Cereser, C., Boget, S., Parvaz, P., & Revol, A. (2001). *Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death*. *Toxicology*. Vol. 163, pp. 153-162
- Chaignon, V., Sanchez-Neira, I., Herrmann, P., Jaillard, B., & Hinsinger, P. (2003). *Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area*. *Environmental pollution*, 123(2), 229-238.
- Champeau, O. (2005). *Biomarqueurs d'effets chez C. Fluminea: du développement en laboratoire à l'application en mésocosme* (Doctoral dissertation, Bordeaux 1).
- Charissou, A. M., Cossu-Leguille, C., & Vasseur, P. (2004). *Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve Unio tumidus*. *Science of the total environment*, 322(1-3), 109-122.
- Charles-bajard, S. (2004). *Les modèles matriciels de type Leslie: Une approche couplée Mathématiques et Statistiques*. HDR, Université Claude Bernard-LYON I.
- Cheek, A. O., Vonier, P. M., Oberdörster, E., Burow, B. C., & McLachlan, J. A. (1998). *Environmental signaling: a biological context for endocrine disruption*. *Environmental Health Perspectives*, 106(suppl 1), 5-10.
- Chen, J.-C., & Lin, C.-H. (2001). *Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 192(1), 55–65.
- Chen, Q., Yin, D., Jia, Y., Schiwy, S., Legradi, J., Yang, S., & Hollert, H. (2017). *Enhanced uptake of BPA in the presence of nanoplastics can lead to neurotoxic effects in adult zebrafish*. *Science of the Total Environment*, 609, 1312-1321.
- Chèvre N. (2000). *Etude et modélisation des effets écotoxicologiques d'un micropolluant organique sur Daphnia magna et Pseudokirchneriella subcapitata*. Thèse de doctorat de l'école polytechnique fédérale de Lausanne, 206p.
- 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*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(1), 11-17.
- Chowdhury AK, Ghosh S, & Pal D (1961). *Acute copper sulphate poisoning*. *J Indian Med Assoc*, 36: 330-336.
- Chugh KS, Singhal PC, Sharma BK (1975). *Methemoglobinemia in acute copper sulphate poisoning*. *Ann Int Med* 82: 226-227.
- Chuttani HK, Gupta PS, Gulati S, Gupta DN (1965). *Acute copper sulphate poisoning*. *Am. J. Med.*39: 849-854.
- Claiborne, A. (1985). *Catalase activity In: Greenwald RA (ed) Handbook of methods for oxygen free radical research*.
- Clarkson, P. M., & Thompson, H. S. (2000). *Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?*. *The American journal of clinical nutrition*, 72(2), 637S-646S.
- Claro Soel Antonio. (2001). *Referencias tecnológicas para agricultura familiar ecologica : a experiencia da Regio Centeo-Serra de Rio Grande do Sul*. Porto Alegre/ Emater/RS-ASCAR, 250p.
- Clayton, M. E., Steinmann, R., & Fent, K. (2000). *Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (Dreissena polymorpha) exposed to copper and tributyltin*. *Aquatic Toxicology*, 47(3-4), 213-226.
- Cleuvers, M., Goser, B., & Ratte, H. T. (1997). *Life-strategy shift by intraspecific interaction in Daphnia magna: change in reproduction from quantity to quality*. *Oecologia*, 110(3), 337-345.
- Close, G. L., & McArdle, F. (2007). *Antioxidants and free radicals*. *Nutrition and Sport*, 153.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cole, D. J., Cummins, I., Hatton, P. J., Dixon, D., & Edwards, R. (1997). *Glutathione transferases in crops and major weeds. Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*. NATO ASI Series. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 139-154.
- Cole, D. C., Carpio, F., Julian, J., and Leon, N. (1998). Assessment of peripheral nerve function in an Ecuadorian rural population exposed to pesticides. *J Toxicol Environ Health A*. 55(2); 77-91.
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. doi:10.2174/1570159x11311030006
- Conners, D. E., & Ringwood, A. H. (2000). Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquatic Toxicology*, 50(4), 341-349.
- Cosentino, F. (2002). LTF, Les mécanismes moléculaires de la dysfonction endothéliale dans le diabète, *Journées de Diabétologie*.
- Costa, L. G., Giordano, G., Guizzetti, M., & Vitalone, A. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci*, 13(4), 1240-1249.
- Cowgill, U. M., Hopkins, D. L., Applegath, S. L., Takahashi, I. T., Brooks, S. D., & Milazzo, D. P. (1985, January). Brood size and neonate weight of *Daphnia magna* produced by nine diets. In *Aquatic toxicology and hazard assessment: Eighth Symposium*. ASTM International.
- Cowgill, U. M., Williams, D. M., & Esquivel, J. B. (1984). Effects of maternal nutrition on fat content and longevity of neonates of *Daphnia magna*. *Journal of crustacean biology*, 4(2), 173-190.
- Craig, P. M., Wood, C. M., & McClelland, G. B. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(5), R1882-R1892.
- Cross, A. R., Erickson, R. W. et Curnutte, J. T. (1999). The mechanism of activation of NADPH oxidase in the cell-free system: the activation process is primarily catalytic and not through the formation of a stoichiometric complex, *The Biochemical journal* 341, 251-255.
- Cunha, I., Mangas-Ramirez, E., & Guilhermino, L. (2007). Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(4), 648-657.
- Czapski, G., & Goldstein, S. (1991). Requirements for SOD mimics operating in vitro to work also in vivo. *Free radical research communications*, 12(1), 167-171.

D

- Dahm, C. N., Trotter, E. H., & Sedell, J. R. (1987). Role of anaerobic zones and processes in stream ecosystem productivity. *Chemical Quality of Water and the Hydrologic Cycle*.
- Dalvi, P. S., Wilder-Kofie, T., Mares, B., Dalvi, R. R., & Billups, L. H. (2002). Toxicologic implications of the metabolism of thiram, dimethyldithiocarbamate and carbon disulfide mediated by hepatic cytochrome P450 isozymes in rats.
- Dalvi, R. R., & Deoras, D. P. (1986). Metabolism of a dithiocarbamate fungicide thiram to carbon disulfide in the rat and its hepatotoxic implications. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 58(1), 38-42.
- Dalvi, R. R., Robbins, T. J., Williams, M. K., Deoras, D. P., Donastorg, F., & Banks, C. (1984). Thiram-induced toxic liver injury in male sprague-dawley rats. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 19(8-9), 703-712.
- Dameron, C., & Howe, P. D. (1998). *Environmental health criteria 200. Copper*. World Health Organization, Geneva.
- Daniels, R. E., and Allan, J. D. (1981). Life table evaluation of chronic exposure to a pesticide. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38, 345–494.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dave, G. (1984). *Effects of copper on growth, reproduction, survival and haemoglobin in Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 78(2), 439–443.
- Davis, W., Ronai, Z. E., & Tew, K. D. (2001). *Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(1), 1-6.
- Day, K., and Kaushik, N. K. (1987). *An assessment of the chronic toxicity of synthetic pyrethroid, fenvalerate, to Daphnia galeata mendotae, using life tables*. *Environ. Pollut.* 44, 13–26.
- Day, K. E., & Maguire, R. J. (1990). *Acute toxicity of isomers of the pyrethroid insecticide deltamethrin and its major degradation products to Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 9(10), 1297-1300.
- De Boeck, G., De Smet, H., Blust, R. (1995). *The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, Cyprinus carpio*. *Aquat. Toxicol.*, 32: 127–141.
- De Boeck, G., Ngo, T. T. H., Van Campenhout, K., Blust, R. (2003). *Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure*. *Aquat. Toxicol.*, 65: 413–424.
- De Boeck, G., Van der Ven, K., Hattink, J., Blust, R. (2006). *Swimming performance and energy metabolism of rainbow trout, common carp and gibel carp respond differently to sublethal copper exposure*. *Aquat. Toxicol.*, 80: 92–100.
- De Caprio, A. P., Spink, D. C., Chen, X., Fowke, J. H., Zhu, M., & Bank, S. (1992). *Characterization of isothiocyanates, thioureas, and other lysine adduction products in carbon disulfide-treated peptides and protein*. *Chemical Research in Toxicology*. Vol. 5, pp. 496-504
- De Coen, W. M., & Janssen, C. R. (1997). *The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed Daphnia populations*. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6(1), 43-55.
- De Meester, C., Lambert, R., & Wiaux, A. (1967). *Effect of Some Dithiocarbamates on Respiration Activity of a Myxomycete*. *Physiologia Plantarum*, 20(3), 697-701.
- Delattre, J., Beaudeau, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). *Radicaux libres et stress oxydant(aspects biologiques et pathologiques)*. 1ère édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 547 pages.
- De Lima, D., Roque, G. M., & de Almeida, E. A. (2013). *In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (Danio rerio)*. *Marine Environmental Research*, 91, 45-51.
- Den Besten, P. J., Valk, S., Van Weerlee, E., Nolting, R. F., Postma, J. F., & Everaarts, J. M. (2001). *Bioaccumulation and biomarkers in the sea star Asterias rubens (Echinodermata: Asteroidea): a North Sea field study*. *Marine environmental research*, 51(4), 365-387.
- Denaix, L., Anatole-Monnier, L., & Thiery, D. (2016). *Effet de l'utilisation répétée de bouillie bordelaise sur la contamination des sols, la biodisponibilité du cuivre et son accumulation dans la vigne*.
- Descloux, S. (2011). *Le colmatage minéral du lit des cours d'eau: méthode d'estimation et effets sur la composition et la structure des communautés d'invertébrés benthiques et hyporhéiques (Doctoral dissertation)*.
- Desideri, A., & Falconi, M. (2003). *Prokaryotic Cu, Zn superoxide dismutases*. *Biochemical Society transactions* .2003; 31: 1322-1325.
- Di Giulio, R. T., Benson, W. H., Sanders, B. M., & Van Veld, P. A. (2020). *Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity*. In *Fundamentals of aquatic toxicology* (pp. 523-561). CRC Press.
- Di Toro, D. M., Allen, H. E., Bergman, H. L., Meyer, J. S., Paquin, P. R., & Santore, R. C. (2001). *Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(10), 2383-2396.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dive, D., Fourmaux, M. N., Vasseur, P., Pussard, M., Pons, R., & Marais, B. (1984). Thiram toxicity to non-target organisms: a comparative study with protozoan and mammalian cells. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 36(2), 121-131.
- Djangmah, J. S. & Grove, D. J. (1970). Blood and hepatopancreas copper in *Crangon vulgaris* (Fabricius). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 32, 733-45.
- Djebbar, M. R., & Djebbar, H. (2000). Bioénergétique, les mitochondries végétales. *Revue des Sciences et Technologies. Synthèse*.
- Dobbs MG, Farris JL, Reash RJ, Cherry DS, Cairns J (1994). Evaluation of the resident-species procedure for developing site-specific water quality criteria for copper in Blaine Creek, Kentucky. *Environ Toxicol Chem* 13(6):963–971
- Doerge, D. R., & Takazawa, R. S. (1990). Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. *Chemical research in toxicology*, 3(2), 98-101.
- Domek, M. J., LeChevallier, M. W., Cameron, S. C., & McFETERS, G. A. (1984). Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(2), 289-293.
- Domingues, I., Agra, A. R., Monaghan, K., Soares, A. M., & Nogueira, A. J. (2010). Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(1), 5-18.
- Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 421-431). Academic press.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Duan, Y., Liu, S., Ge, C., Feng, X., Chen, C., & Zhou, M. (2012). In vitro inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* by mixtures of azoxystrobin, SHAM, and thiram. *Pesticide biochemistry and physiology*, 103(2), 101-107.
- Duchateau G. & Florkin M., (1959). Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives of Insect Physiology and Biochemistry* 67: 306-314.
- Duchet C., Coutellec M.A., Franquet E., (2010) Population-level effects of spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* : comparison of laboratory and field microcosm exposure conditions. *Ecotoxicology*, 19(7), p. 1224-1237.
- Ducrot, V., Péry, A. R., Mons, R., & Garric, J. (2004). Energy-based modeling as a basis for the analysis of reproductive data with the midge (*Chironomus riparius*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(1), 225-231.
- Ďuračková, Z., & Gvozdjaková, A. (2008). Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In *Mitochondrial medicine* (pp. 19-54). Springer, Dordrecht.
- Durou, C., Mouneyrac, C., Pellerin, J., & Péry, A. (2008). Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Paris: Lavoisier, 273-289.
- Dutra, B. K., Fernandes, F. A., Lauffer, A. L., Oliveira, G. T. (2009). Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 149: 640–646.
- Dwassy, A. (2014). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques (Doctoral dissertation).

E

- Ebert, D. (2005). Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. National Library of Medicine. (US), National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Edwards, I. R. (1991). Fungicides and related compounds. *Handbook of pesticide toxicology*, Vol 3. Classes of pesticides, 1446-1452.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- El-Azzouzi El Habib, E. H. (2013). *Les processus physico-chimiques de l'élimination des pesticides dans l'environnement: cas de l'herbicide Imazethapyr*.
- Elendt, B. P. (1989). *On the ultrastructure of the intestine of Daphnia magna*. *Zoologischer Anzeiger*, 223(3-4), 186-197.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Elskens, M. T., & Penninckx, M. J. (1997). *Thiram and dimethyldithiocarbamic acid interconversion in Saccharomyces cerevisiae: a possible metabolic pathway under the control of the glutathione redox cycle*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63, pp. 2857-2862
- Emmanouil, C., Kypriotakis, S., Kungolos, A., & Machera, K. (2008). *Effects of Thiram or MCPA acid on mussel gill DNA*. *Discussion Paper Series*, 14(24), 455-468.
- Enserink, E. L., Kerkhofs, M. J. J., Baltus, C. A. M., & Koeman, J. H. (1995). *Influence of food quantity and lead exposure on maturation in Daphnia magna; evidence for a trade-off mechanism*. *Functional Ecology*, 175-185.
- Errami, M. (2012). *Devenir atmosphérique de bupirimate et transfert de ses métabolites (les diazines) dans l'atmosphère, sa dissipation dans les fruits de tomate et sa dégradation électrochimique (Doctoral dissertation, Reims)*.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. *Free radical Biology and medicine*, 11(1), 81-128.
- European Community. (1992). *Method for the determination of ecotoxicity, part C.2: Acute toxicity for Daphnia (Directive 92/69/EEC (Annex ;V 1992 adaptation to 67/548/EEC))*, *Official Journal of European Community*, L 383, 172-178.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). *Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(1), 1-61.
- Everard M. and Powell A. 2002. *Rivers as living systems*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 12, 329-337
- Eybe, T., Bohn, T., Audinot, J. N., Udelhoven, T., Cauchie, H. M., Migeon, H. N., & Hoffmann, L. (2009). *Uptake visualization of deltamethrin by NanoSIMS and acute toxicity to the water flea Daphnia magna*. *Chemosphere*, 76(1), 134-140.
- Eyckmans, M., Celis, N., Horemans, N., Blust, R., De Boeck, G. (2011). *Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species*. *Aquat. Toxicol.*, 103: 112–20.

F

- Fan, W., Wang, X., Cui, M., Zhang, D., Zhang, Y., Yu, T., & Guo, L. (2012). *Differential oxidative stress of octahedral and cubic Cu₂O micro/nanocrystals to Daphnia magna*. *Environmental science & technology*, 46(18), 10255-10262.
- Farmer, E. E., & Davoine, C. (2007). *Reactive electrophile species*. *Current opinion in plant biology*, 10(4), 380-386.
- Farombi EO, Ajimoko YR, Adelowon OA (2008). *Effect of butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water African catfish, (Clarias gariepinus)*. *Int J Environ Res Public Health*. 5: 423–427.
- 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.
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P., & Elsner, M. (2013). *Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities*. *science*, 341(6147), 752-758.
- Féraud, J. F. (2013). *Ecotoxicology: historical overview and perspectives*. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, 377-386.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fernández, A., and Ferrando, M. D., and Andreu, E. (1993). Effects of endosulfan on survival, growth and reproduction of *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 106(2), 437–441.
- Fernández-Casalderrey A., Ferrando M. D. and Andreu-Moliner E., (1995). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54(1), 43-49.
- Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M. D., & Andreu-Moliner, E. (1995). Chronic toxicity of diazinon to *Daphnia magna*: Effects on survival, reproduction and growth. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 49(1-2), 25–32.
- Ferrando M. D. and Andreu E. (1995). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, (submitted) (1995)
- Ferrando, M. D., Andreu-Moliner, E., & Fernández-Casalderrey, A. (1992). Relative sensitivity of *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus* to five pesticides. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 27(5), 511-522.
- Ferrando, M. D., Sancho, E., & Andreu-Moliner, E. (1996). Chronic Toxicity of Fenitrothion to an Algae (*Nannochloris oculata*), a Rotifer (*Brachionus calyciflorus*), and the Cladoceran (*Daphnia magna*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35(2), 112–120.
- Figueira, R., Tavares, P. C., Palma, L., Beja, P., & Sérgio, C. (2009). Application of indicator kriging to the complementary use of bioindicators at three trophic levels. *Environmental Pollution*, 157(10), 2689-2696.
- Finaud J, Lac G, Filaire E. *Oxidative Stress. (2006). Relationship with Exercise and Training. Sports med.*; 36 (4): 327-358.
- Finney, D. J. (1971). *Probit analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press UK, 333 pp.
- Fitsanakis, V. A., Amarnath, V., Moore, J. T., Montine, K. S., Zhang, J., & Montine, T. J. (2002). Catalysis of catechol oxidation by metal-dithiocarbamate complexes in pesticides. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 33, pp. 1714-1723.
- Flemming, C. A., & Trevors, J. T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 44(1-2), 143-158.
- Flickinger, A. L., Bruins, R. J. F., Winner, R. W., & Skillings, J. H. (1982). Filtration and phototactic behavior as indices of chronic copper stress in *Daphnia magna* straus. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 11(4), 457–463.
- Forbes, V. E., & Forbes, T. L. (1994). *Integrated ecotoxicology: linking fate and effect within a biological hierarchy. Ecotoxicology in Theory and Practice*, 149-183.
- Fowler, B. A., Hildebrand, C. E., Kojima, Y., & Webb, M. (1987). Nomenclature of metallothionein. In *Metallothionein II* (pp. 19-22). Birkhäuser, Basel.
- Fox, H. M. (1957). Haemoglobin in the Crustacea. *Nature*, 179 (4551), 148-148.
- Franekić, J., Bratulić, N., Pavlica, M., & Papeš, D. (1994). Genotoxicity of dithiocarbamates and their metabolites. *Mutation Research Letters*, 325(2-3), 65-74.
- Freedman, J. H., Ciriolo, M. R., & Peisach, J. (1989). The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 264(10), 5598-5605.
- Fréry, N., Saoudi, A., Garnier, R., Zeghnoun, A., Falq, G., & Guldner, L. (2010). Exposition de la population française aux polluants de l'environnement—Volet environnemental de l'Étude nationale nutrition santé—Premiers résultats. Institut de veille sanitaire. 12pp.
- 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. *Environmental toxicology and chemistry*, 29(10), 2371-2378.
- Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental health perspectives*, 87, 245-254.

G

- Garait, B. (2006). *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin® (Doctoral dissertation)*.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Garrel, C., Ceballos-Picot, I., Germain, G., & Al-Gubory, K. H. (2007). Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F_{2α}-induced luteal cell death in vivo. *Free radical research*, 41(3), 251-259.
- George, S. G., & Buchanan, G. (1990). Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione-S-transferases. *Fish Physiology and Biochemistry*, 8(6), 437-449.
- Gersich F. M. and Milazzo D. P. (1988). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 40, 1-7.
- Giacomini, M., Jorge, M. B., & Bianchini, A. (2014). Effects of copper exposure on the energy metabolism in juveniles of the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Aquatic toxicology*, 152, 30-37.
- Gilbin, R. (2001). Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires: spéciation, biodisponibilité et toxicité. Exemple du cuivre dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles (Roujan, Hérault, France) (Doctoral dissertation).
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gill, T. S., Tewari, H., & Pande, J. (1990). Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 97(2), 287-292.
- Gill, T. S., Tewari, H., & Pande, J. (1991). In vivo and in vitro effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoniensis* Ham.(rosy barb). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(3), 501-505.
- Giroux, I. (1999). Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec. *Direction des écosystèmes aquatiques, Ministère de l'environnement et de la faune*.
- Gismondi, E., Cossu-Leguille, C., & Beisel, J. N. (2012). Does the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* modify the energy reserves and antitoxic defences of its intermediate host *Gammarus roeselii*? *Parasitology*, 139, 1054-1061.
- Glazier, D. S., & Calow, P. (1992). Energy allocation rules in *Daphnia magna*: clonal and age differences in the effects of food limitation. *Oecologia*, 90(4), 540-549.
- Goldstein, B. D., Rozen, M. G., Quintavalla, J. C., & Amoruso, M. A. (1979). Decrease in mouse lung and liver glutathione peroxidase activity and potentiation of the lethal effects of ozone and paraquat by the superoxide dismutase inhibitor diethyldithio-carbamate. *Biochemical pharmacology*, 28(1), 27-30.
- Goldsworthy, G. J., Mordue, W., & Guthkelch, J. (1972). Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*, 18(3), 545-551.
- Gonçalves, R. A., Rossetto, A. L. D. O. F., Nogueira, D. J., Vicentini, D. S., & Matias, W. G. (2018). Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests. *Aquatic Toxicology*, 197, 32-40.
- Goulden, C. E., & Place, A. R. (1990). Fatty acid synthesis and accumulation rates in daphniids. *Journal of Experimental Zoology*, 256(2), 168-178.
- Grandy N.J. (1995). Role of the OECD in chemicals control and international harmonization of testing methods In *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (Edited by G. M. Rand). Taylor & Francis Publ., Washington, D.C. pp. 763-774.
- Green J. (1963). *A biology of Crustacea*. London: Withersby Ltd.
- Green J., (1956). Growth, size and reproduction in *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Proc. Zool. Soc. London*, 126, 173-204.
- Greenamyre, J. T., MacKenzie, G., Peng, T. I., & Stephans, S. E. (1999). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. In *Biochemical Society Symposia* (Vol. 66, pp. 85-97). Portland Press Limited.
- Grosicka, E., Sadurska, B., Szumilo, M., Grzela, T., Łazarczyk, P., Niderla-Bielińska, J., & Rahden-Staroń, I. (2005). Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in Chinese hamster fibroblasts. *International immunopharmacology*, 5(13-14), 1945-1956.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Grosicka-Maciąg, E., Kurpios, D., Czczot, H., Szumilo, M., Skrzycki, M., Suchocki, P., & Rahden-Staroń, I. (2008). Changes in antioxidant defense systems induced by thiram in V79 Chinese hamster fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 22(1), 28-35.
- Gruber, C. W., Čemažar, M., Heras, B., Martin, J. L., & Craik, D. J. (2006). Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in biochemical sciences*, 31(8), 455-464.
- Grue, C. E., Gibert, P. L., & Seeley, M. E. (1997). Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: thermoregulation, food consumption, and reproduction. *American zoologist*, 37(4), 369-388.
- Guelorget, O., & Perthuisot, J. P. (1984). Indicateurs biologiques et diagnose écologique dans le domaine paralique. *Bulletin d'écologie*, 15(1), 67-76.
- Guilhermino, L., Lacerda, M. ., Nogueira, A. J. ., & Soares, A. M. V. (2000). In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Science of The Total Environment*, 247(2-3), 137-141.
- Guilhermino, L., Lopes, M. C., Carvalho, A. P., & Soared, A. M. (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 32(4), 727-738.
- Guimarães, B., Maria, V. L., Römbke, J., & Amorim, M. J. B. (2019). Multigenerational exposure of *Folsomia candida* to ivermectin—Using avoidance, survival, reproduction, size and cellular markers as endpoints. *Geoderma*, 337, 273-279.
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 41(12), 1819-1828.

H

- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Hafsaoui, I., Draredja, B., Lasota, R., Como, S., & Magni, P. (2016). Population dynamics and secondary production of *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) in the Gulf of Annaba (Northeast Algeria). *Mediterranean Marine Science*, 17(3), 738-750.
- Hagerman, L. (1976). The respiration during the moult cycle of *Crangon vulgaris* (Fabricius). (Crustacea: Natantia). *Ophelia*, 15, 15-21
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. C. (1986). Oxygen free-radicals and iron in relation to biology and medicine. Some problems and concepts, *Archives of biochemistry and biophysics* 246, 501-514.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free radicals in biology and medicine*, 2nd edn. Clarendon.
- Hamburger, K., Lindegaard, C., & Dall, P. C. (1996). The role of glycogen during the ontogenesis of *Chironomus anthracinus* (Chironomidae, Diptera). *Hydrobiologia*, 318(1-3), 51-59.
- Han, D., WILLIAMS, E., & CADENAS, E. (2001). Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochemical Journal*, 353(2), 411-416.
- Han, M. S., Shin, K. J., Kim, Y. H., Kim, S. H., Lee, T., Kim, E., ... & Suh, P. G. (2003). Thiram and ziram stimulate non-selective cation channel and induce apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology*, 24(3), 425-434.
- Hanazato, T. (1998). Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. *Chemosphere*, 36(8), 1903-1909.
- Haney, J. F., & Buchanan, C. (1987). Distribution and biogeography of *Daphnia* in the arctic. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol*, 45, 77-105.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hargreaves, B. J., Kronfeld, D. S., Waldron, J. N., Lopes, M. A., Gay, L. S., Saker, K. E., ... & Harris, P. A. (2002). Antioxidant status and muscle cell leakage during endurance exercise. *Equine Veterinary Journal*, 34(S34), 116-121.
- Hashemi, S., Blust, R., & De Boeck, G. (2008). Combined effects of different food rations and sublethal copper exposure on growth and energy metabolism in common carp. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(2), 318-324.
- Hassold, E., & Backhaus, T. (2014). The predictability of mixture toxicity of demethylase inhibiting fungicides to *Daphnia magna* depends on life-cycle parameters. *Aquatic toxicology*, 152, 205-214.
- Hatcher, J. M., Pennell, K. D., & Miller, G. W. (2008). Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends in pharmacological sciences*, 29(6), 322-329.
- Hatta, A., & Frei, B. (1995). Oxidative modification and antioxidant protection of human low density lipoprotein at high and low oxygen partial pressures. *Journal of lipid research*, 36(11), 2383-2393.
- Haughey, M. A., Anderson, M. A., Whitney, R. D., Taylor, W. D., & Losee, R. F. (2000). Forms and fate of Cu in a source drinking water reservoir following CuSO₄ treatment. *Water research*, 34(13), 3440-3452.
- Haverroth, G. M., Welang, C., Mocelin, R. N., Postay, D., Bertoncetto, K. T., Franscescon, F., ... & Dalla Corte, C. L. (2015). Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 122, 440-447.
- Hayo, M., & Van der Werf, G. (1997). Évaluer l'impact des pesticides sur l'environnement. *Courr. l'environnement l'INRA*, (31), 1-20.
- Heath, A. G. (1984). Changes in tissue adenylates and water content of bluegill, *Lepomis macrochirus*, exposed to copper. *Journal of fish biology*, 24(3), 299-309.
- Heath, A. G. (1991). Effect of water-borne copper on physiological responses of bluegill (*Lepomis macrochirus*) to acute hypoxic stress and subsequent recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(3), 559-564.
- Heikkila, R. E., Cabbat, F. S., & Cohen, G. E. R. A. L. D. (1976). In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *Journal of Biological Chemistry*, 251(7), 2182-2185.
- Heinecke, J. W., Rosen, H., Suzuki, L. A., & Chait, A. (1987). The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 262(21), 10098-10103.
- Henle, E. S., Luo, Y., & Linn, S. (1996). Fe²⁺, Fe³⁺, and oxygen react with DNA-derived radicals formed during iron-mediated Fenton reactions. *Biochemistry*, 35(37), 12212-12219.
- Heo, H. J., Kim, Y. J., Chung, D., & Kim, D. O. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104(1), 87-92.
- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*, 1, 319-366.
- Hool, L. C. (2005). Reactive oxygen species in cardiac signalling—from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Proc. Aust. Physiol. Soc*, 36, 55-61.
- Horng, Y. C., Cobine, P. A., Maxfield, A. B., Carr, H. S., & Winge, D. R. (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35334-35340.
- Hosmer, A. J., Warren, L. W., & Ward, T. J. (1998). Chronic toxicity of pulse-dosed fenoxycarb to *Daphnia magna* exposed to environmentally realistic concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(9), 1860-1866.
- Hu, Y., Chen, X., Yang, K., & Lin, D. (2018). Distinct toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna* in M4 medium and surface water. *Science of The Total Environment*, 618, 838-846.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hulbert, A. J. (2005). *On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. Journal of theoretical biology*, 234(2), 277-288.
- Hyne, R. V., & Maher, W. A. (2001). *Macroinvertebrate biomarkers: Links to toxicosis and changes in populations or communities. Cooperative Research Centre for Freshwater Ecology.*
- Hyne, R. V., Pablo, F., Julli, M., & Markich, S. J. (2005). *Influence of water chemistry on the acute toxicity of copper and zinc to the cladoceran Ceriodaphnia cf dubia. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(7), 1667-1675.

I

- INERIS. (2014). *Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : cuivre, composés et alliages, DRC-14-136881-02236A, 91 p.*
- Ingersoll, C. G., and Winner, R. W. (1982). *Effect on Daphnia pulex of daily pulse exposure to copper or cadmium. Environ. Toxicol. Chem. 1*, 321–327.
- Innes D. J. (1997) *Sexual reproduction of Daphnia pulex in a temporary habitat. Oecologia*, 111 (1) 53-60.
- Ippolito, A., Carolli, M., Varolo, E., Villa, S., & Vighi, M. (2012). *Evaluating pesticide effects on freshwater invertebrate communities in alpine environment: a model ecosystem experiment. Ecotoxicology*, 21(7), 2051-2067.
- ISO. (International Standard Organization). (ISO 6341). (2012). *Water quality—determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)—acute toxicity test. EN ISO, 6341.*
- ISO. (International Standard Organization). (ISO 10706) (2000). *Water quality—determination of long term toxicity of substances to Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea). ISO/TC, 147.*
- ISO. (International Standard Organization) (ISO 8692), (1996). *Water quality-freshwater algal growth inhibition test with Scenedesmus subspicatus and Selenastrum capricornutum.*
- ISO. (International Standards Organisation). (ISO 6341) (1996). *Water quality-Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)- Acute toxicity test. ISO 6341. Geneva, Switzerland.*

J

- Jacob, C., Knight, I., & Winyard, P. G. (2006). *Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. Biological chemistry*, 387(10/11), 1385-1397.
- Jawich D, (2006). *Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire, Article de thèse*
- Jemec, A., Tišler, T., Erjavec, B., & Pintar, A. (2012). *Antioxidant responses and whole-organism changes in Daphnia magna acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. Ecotoxicology and environmental safety*, 86, 213-218.
- Jeon, J., Kretschmann, A., Escher, B. I., & Hollender, J. (2013). *Characterization of acetylcholinesterase inhibition and energy allocation in Daphnia magna exposed to carbaryl. Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 28-35.
- Jha, A. N. (2008). *Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. Mutagenesis*, 23(3), 207-221.
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z. (2010). *Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (Danio rerio). Chemosphere*, 78: 846–852.
- Johnson, D. J., Graham, D. G., Amarnath, V., Amarnath, K., & Valentine, W. M. (1998). *Release of Carbon Disulfide Is a Contributing Mechanism in the Axonopathy Produced by N, N-Diethyldithiocarbamate. Toxicology and applied pharmacology*, 148(2), 288-296.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Johnson, W. T., Dufault, S. N., & Newman Jr, S. M. (1995). Altered nucleotide content and changes in mitochondrial energy states associated with copper deficiency in rat platelets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 6(10), 551-556.
- Jordão, R., Casas, J., Fabrias, G., Campos, B., Piña, B., Lemos, M. F., ... & Barata, C. (2015). Obesogens beyond vertebrates: lipid perturbation by tributyltin in the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental health perspectives*, 123(8), 813-819.
- Juliano, A. J. 2007 Population dynamics. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23: 265-275
- Julliard, A. K., Saucier, D., & Astic, L. (1996). Time-course of apoptosis in the olfactory epithelium of rainbow trout exposed to a low copper level. *Tissue and Cell*, 28(3), 367-377.
- Kaizer, R. R., Corrêa, M. C., Spanevello, R. M., Morsch, V. M., Mazzanti, C. M., Gonçalves, J. F., Schetinger, M. R. C. (2005). Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *J. Inorg. Biochem.*, 99: 1865–1870.

K

- Kaliora, A. C., Dedoussis, G. V. Z., & Schmidt, H. (2006). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, 187(1), 1-17.
- Kang, J. S., Hwang, S. Y., Lee, C. J., & Lee, M. S. (2002). SERS of dithiocarbamate pesticides adsorbed on silver surface; Thiram. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 23(11), 1604-1610.
- Karan, V., Vitorović, S., Tutundžić, V., & Poleksić, V. (1998). Functional Enzymes Activity and Gill Histology of Carp after Copper Sulfate Exposure and Recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40(1-2), 49–55.
- Kast-Hutcheson K., Rider C.V., LeBlanc G.A. (2001) The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(3), p. 502-509.
- Keifer, M. C., & Firestone, J. (2007). Neurotoxicity of pesticides. *Journal of agromedicine*, 12(1), 17-25.
- Kelner, M.J., Bagnell, R., Hale, B., Alexander, N.M., (1989). Inactivation of intracellular copper-zinc superoxide dismutase by copper chelating agents without glutathione depletion and methemoglobin formation. *Free Rad. Biol. Med.* 6, 355-360.
- Kerkut, G. A. & Munday, K. A. (1962). The effect of copper on tissue respiration of the crab, *Carcinus maenas*. *Cahiers de Biologie Marine*, 3, 27-35.
- Key, P. B., Wirth, E. F., & Fulton, M. H. (2006). A review of grass shrimp, *Palaemonetes spp.*, as a bioindicator of anthropogenic impacts. *Environmental Bioindicators*, 1(2), 115-128.
- Keyer, K. et Imlay, J. A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13635-13640.
- Kim, K. T., Klaine, S. J., Cho, J., Kim, S. H., & Kim, S. D. (2010). Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Science of the Total Environment*, 408(10), 2268-2272.
- Kim, S. D., Gu, M. B., Allen, H. E., & Cha, D. K. (2001). Physicochemical factors affecting the sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* to copper. *Environmental monitoring and assessment*, 70(1-2), 105-116.
- Kimerle, R. A., Werner, A. F., & Adams, W. J. (1985). Aquatic hazard evaluation principles applied to the development of water quality criteria. In *Aquatic toxicology and hazard assessment: Seventh Symposium*. ASTM International.
- Klaassen, C. D., & Amdur, M. O. (Eds.). (2013). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons* (Vol. 1236, p. 189). New York: McGraw-Hill.
- Knops, M., Altenburger, R., & Segner, H. (2001). Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquatic Toxicology*, 53(2), 79-90.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Koivisto, S., & Ketola, M. (1995). Effects of copper on life-history traits of *Daphnia pulex* and *Bosmina longirostris*. *Aquatic Toxicology*, 32(2-3), 255–269.
- Komárek, M., Čadková, E., Chrástný, V., Bordas, F., & Bollinger, J. C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environment international*, 36(1), 138-151.
- Kooijman, S. A. L. M. (2001). Quantitative aspects of metabolic organization: a discussion of concepts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1407), 331-349.
- Korhonen, A., Hemminki, K., & Vainio, H. (1982). Application of the chicken embryo in testing for embryotoxicity: thiurams. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 63-69.
- Köthe, A., & Benndorf, J. (1994). Top-down impact of *Daphnia galeata* on pelagic heterotrophic flagellates in a whole-lake biomanipulation experiment. *Marine microbial food webs*, 8(1-2), 325-335.
- Kovács, A., Abdel-Hameid, N. A., Ács, A., Ferincz, Á., & Kováts, N. (2012). A novel protocol for assessing aquatic pollution, based on the feeding inhibition of *Daphnia magna*. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (404), 07.
- Kyriakopoulou, K., Anastasiadou, P., & Machera, K. (2009). Comparative toxicities of fungicide and herbicide formulations on freshwater and marine species. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 82(3), 290.

L

- Labrot, F., Ribera, D., Denis, M. S., & Narbonne, J. F. (1996). In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, 1(1), 21-28.
- Lachambre, M., & Fisson, C. (2007). La contamination chimique: quel risque en estuaire de Seine. *Rapport Seine-Aval : quel risque en estuaire de Seine? Fiche Substanceµ Introduction Pesticides. Groupement D'intérêt Public, Seine Aval. 6pp.*
- Ladhar-Chaabouni, R., Gargouri, R., & Hamza Chaffai, A. (2007). Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus*: metallothionein quantification using two techniques. *International Journal of Environment and Pollution*, 30(3-4), 593-605.
- Lagadic, L., Caquet, T., & Amiard, J. C. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, Paris, 1-9.*
- Lagadic, L., Caquet, T., (1996). Marqueurs biologiques de pollution: des outils au service de l'écotoxicologie. *Phytoma - La Défense des Végétaux*, 480, p.10-13.
- Laguerre, C., Sanchez-Hernandez, J. C., Köhler, H. R., Triebkorn, R., Capowiez, Y., Rault, M., & Mazzia, C. (2009). B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: an enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. *Environmental Pollution*, 157(1), 199-207.
- Lallement, P. A. (2014). Caractérisation biochimique et fonctionnelle de glutathion transférase à cystéine catalytique de peuplier (*Populus trichocarpa*) (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Lance, E., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Beaugelin-Seiller, K., & Garnier-Laplace, J. (2012). Modelling population-level consequences of chronic external gamma irradiation in aquatic invertebrates under laboratory conditions. *Science of the total environment*, 429, 206-214.
- Lányi, K., & Dinya, Z. (2005). Photodegradation study for assessing the environmental fate of some triazine-, urea- and thiolcarbamate-type herbicides. *Microchemical journal*, 80(1), 79-87.
- Lawrence, S.G. (1982). *Manuel d'élevage d'invertébrés dulçaquicoles choisis, Publ. spéc. can. sci. halieut. aquat.*, 54 F : 181 p.
- Le Coz, C., Tassin, B., & Thevenot, D. (1996). *Transfert des polluants dans les hydrosystèmes: Actes des sixièmes journées du Diplôme d'études approfondies Sciences et techniques de l'environnement, organisées les 11 et 12 mai 1995 à Créteil et Paris.*

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S., & Caquet, T. (1997). Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique.
- Le, Q. A. V., Sekhon, S. S., Lee, L., Ko, J. H., & Min, J. (2016). *Daphnia* in water quality biomonitoring-“omic” approaches. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 8(1), 1-6.
- Leduc, A. (1925). *La Bouillie Bordelaise et sa Composition Chimique*. *Scientific Agriculture*, 6(2), 60-66.
- Lee, C. C., & Peters, P. J. (1976). Neurotoxicity and behavioral effects of thiram in rats. *Environmental health perspectives*, 17, 35-43.
- Lee, B., Duong, C. N., Cho, J., Lee, J., Kim, K., Seo, Y., ... & Yoon, J. (2012). Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). *BioMed Research International*, 2012.
- Lee, J., Ji, K., Kim, J., Park, C., Lim, K. H., Yoon, T. H., & Choi, K. (2010). Acute toxicity of two CdSe/ZnSe quantum dots with different surface coating in *Daphnia magna* under various light conditions. *Environmental toxicology*, 25(6), 593-600.
- Lehning H. (2008). *Le théorème de Perron – Frobenius, Tangente Sup, Supplément au no 125 de Tangente, septembre – octobre 2008, p. 16 – 17 cité in Bair, J. (2012). Matrice de Leslie. Bulletin de l'APMEP, (501), 527-533.*
- Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., & Prost, M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines: Bilan et perspectives préventives. *La Presse médicale*, 30(21), 1076-1081.
- Leonard, R., (1990). Pesticide movement into surface waters. *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling*, 303-349.
- Leroux, P. (2003). Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus Biologies*, 326(1), 9-21.
- Letelier, M. E., Martinez, M., Gonzalez-Lira, V., Faúndez, M., & Aracena-Parks, P. (2006). Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper. *Chemico-biological interactions*, 164(1-2), 39-48.
- Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*, 36(9), 1495-1502.
- Lhoste, J. (1960). *Fungicides. Fungicides. Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer. Paris, 144p.*
- Li, J., Bi, D., Pan, S., & Zhang, Y. (2007). Effect of diet with thiram on liver antioxidant capacity and tibial dyschondroplasia in broilers. *British poultry science*, 48(6), 724-728.
- Li, L., Zheng, B., & Liu, L. (2010). Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Procedia environmental sciences*, 2, 1510-1524.
- Linbo, T. L., Stehr, C. M., Incardona, J. P., & Scholz, N. L. (2006). Dissolved copper triggers cell death in the peripheral mechanosensory system of larval fish. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(2), 597-603.
- Linder, M. C. (2012). The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1-2), 83–91. doi:10.1016/j.mrfmmm.2012.03.010
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 1151-1191.
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., & Liu, W. (2006). A comparative study of rac-and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(3), 451-455.
- Liu, Y., Qi, S., Zhang, W., Li, X., Qiu, L., & Wang, C. (2012). Acute and chronic toxicity of buprofezin on *Daphnia Magna* and the recovery evaluation. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(5), 966-969.
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin*, 42(8), 656-666.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- López-Blanco C, Gómez-Álvarez S, Rey-Garrote M, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. (2005). Determination of carbamates and organophosphorus pesticides by SDME-GC in natural water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383, 557-561.
- López-Pérez GC, Arias-Estévez M, López-Periago E, Soto-González B, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. (2006). Dynamics of pesticides in potato crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 1797-1803.
- Lopresti, A. L., Maker, G. L., Hood, S. D., & Drummond, P. D. (2014). A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48, 102-111.
- Lowy, R., Griffaton, G., Dupuy, F., Ardouin, B., & Manchon, P. (1980). Dietary no-effect level of a dithiocarbamate fungicide, thiram, evaluated from measurement data on rats. I. Choice of the model of the dose-response relationship. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 6(2), 403-419.
- Lu, S. C. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *The FASEB Journal*, 13(10), 1169-1183.
- Lynch, M., & Ennis, R. (1983). Resource availability, maternal effects, and longevity. *Experimental gerontology*, 18(2), 147-165.

M

- Ma, J., Zhou, C., Li, Y., & Li, X. (2014). Biochemical responses to the toxicity of the biocide abamectin on the freshwater snail *Physa acuta*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 101, 31-35.
- Macek, K. J., Buxton, K. S., Der, S. K., Dean, J. W. And S. Sauter. (1976). *Ecol. Res. Ser., Epa-600/3-76-046*.
- Machado, A. A. D. S., Hoff, M. L. M., Klein, R. D., Cardozo, J. G., Giacomini, M. M., Pinho, G. L. L., Bianchini, A. (2013). Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. *Aquat. Toxicol.*, 138-139: 60–69.
- Maes, V. (2014). *Le métabolisme énergétique chez un cyprinidé d'eau douce, le gardon *Rutilus rutilus*: vers le développement de nouveaux biomarqueurs en lien avec la contamination par des produits phytosanitaires (Doctoral dissertation, Reims)*.
- Maes, V., Betoulle, S., Jaffal, A., Dedourge-Geffard, O., Delahaut, L., Geffard, A., ... & David, E. (2016). Juvenile roach (*Rutilus rutilus*) increase their anaerobic metabolism in response to copper exposure in laboratory conditions. *Ecotoxicology*, 25(5), 900-913.
- Main, A. R. (1969). Kinetic evidence of multiple reversible cholinesterases based on inhibition by organophosphates. *Journal of Biological Chemistry*, 244(4), 829-840.
- Maita, K., Tsuda, S., & Shirasu, Y. (1991). *Chronic Toxicity Studies with Thiram in Wistar Rats and Beagle Dogs. Toxicological Sciences*, 16(4), 667–686.
- Manach, C., Mazur, A., & Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current opinion in lipidology*, 16(1), 77-84.
- Manar, R. (2008). *Effets populationnels du chlordane sur les microcrustacés cladocères *Daphnia* sp. dans une perspective d'évaluation des risques (Doctoral dissertation, Université Paul Verlaine-Metz)*.
- Manar, R., Bessi, H., & Vasseur, P. (2009). Reproductive effects and bioaccumulation of chlordane in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(10), 2150-2159.
- Marikovsky, M., Nevo, N., Vadai, E., & Harris-Cerruti, C. (2002). Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *International journal of cancer*, 97(1), 34-41.
- Marinovich, M., Guizzetti, M., Ghilardi, F., Viviani, B., Corsini, E., & Galli, C. L. (1997). Thyroid peroxidase as toxicity target for dithiocarbamates. *Archives of toxicology*, 71(8), 508-512.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Martin, C. A., Schier, J., Chang, A., Gurley, E., Hossain, M. J., Rahman, M., ... & Husain, M. M. (2011). Investigation of an outbreak of unintentional acute pesticide poisoning: assessment of exposure to carbamate and organophosphate insecticides, rural Bangladesh, 2009. *Epidemiology*, 22(1), S115.
- Martínez-tabche, L., Germán-faz, C., Galar-castelán, I., Ramírez-mora, B., & Cardona-hinojosa, G. (1996). Efecto tóxico del carbaril y del plomo sobre los lípidos, la clorofila y los azúcares reductores de la microalga *ankistrodesmus falcatus*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 12(2), 61-67.
- Martins, F., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2014). Oxidative stress response of *Beauveria bassiana* to Bordeaux mixture and its influence on fungus growth and development. *Pest management science*, 70(8), 1220-1227.
- Martins, J. C., Saker, M. L., Teles, L. F. O., & Vasconcelos, V. M. (2007). Oxygen consumption by *Daphnia magna* Straus as a marker of chemical stress in the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(9), 1987-1991.
- Martins, J., Soares, M. L., Saker, M. L., OlivaTeles, L., & Vasconcelos, V. M. (2007). Phototactic behavior in *Daphnia magna* Straus as an indicator of toxicants in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3), 417-422.
- Massarin S., Beaudouin R., Zeman F., Floriani M., Gilbin R., Alonzo F. et Pery A. R. R. (2011) Biology-based modeling to analyze uranium toxicity data on *Daphnia magna* in a multigeneration study. *Environmental Science and Technology*, 45 (9) 4151-4158.
- Massarin, S. (2010). Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna* (Doctoral dissertation, Aix-Marseille 2).
- Mastin, B. J., & Rodgers Jr, J. H. (2000). Toxicity and bioavailability of copper herbicides (Clearigate, Cutrine-Plus, and copper sulfate) to freshwater animals. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 39(4), 445-451.
- Mates JM, Perez-Gomez C and Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32, 595-603.
- Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153: 83-104.
- Mayer, F. L., Versteeg, D. J., McKee, M. J., Folmar, L. C., Graney, R. L., McCume, D. C., & Rattner, B. A. (1992). Physiological and nonspecific biomarkers. In: Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M.J., Bergman, H.L. biomarkers: Biochemical, physiological and Histological Markers of Arthropogenic Stress. SETAC Publication Series, Lewis Publishers, Boca Raton, Chelsea, USA, 5-85.
- Mazzia, C., Capowicz, Y., Sanchez-Hernandez, J. C., Köhler, H. R., Triebkorn, R., & Rault, M. (2011). Acetylcholinesterase activity in the terrestrial snail *Xeropicta derbentina* transplanted in apple orchards with different pesticide management strategies. *Environmental pollution*, 159(1), 319-323.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- MCE, (2003), les pesticides : réglementation et effet sur la santé et l'environnement Maison de consommation et de l'environnement
- Mdegela, R. H., Mosha, R. D., Sandvik, M., & Skaare, J. U. (2010). Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of organophosphate and carbamate exposure. *Ecotoxicology*, 19(5), 855-863.
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.
- Mereau, M. (1983). Utilisation de *Tetrahymena pyriformis* synchrone en écotoxicologie: contribution à l'étude des effets du thirame (fongicide dithiocarbamate) sur l'ultrastructure cellulaire (Doctoral dissertation).
- Metcalfe, J. L. (1989). Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environmental pollution*, 60(1-2), 101-139.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Michel, X. (1993). *Contribution à l'étude des interactions entre les contaminants chimiques organiques et les organismes marins: bases moléculaires et applications à la biosurveillance de l'environnement côtier (Doctoral dissertation, Bordeaux I)*.
- Miller, C. A., & Sweatt, J. D. (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, 53(6), 857-869.
- Mishra, V. K., Srivastava, M. K., & Raizada, R. B. (1998). Testicular toxicity in rat to repeated oral administration of tetramethylthiuram disulfide (Thiram). *Indian journal of experimental biology*, 36(4), 390-394.
- Mkhinini, M., Boughattas, I., Bousserhine, N., & Banni, M. (2019). Biochemical and transcriptomic response of earthworms *Eisenia andrei* exposed to soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(3), 2851-2863.
- Mochida, K., & Fujii, K. (2009). Toxicity in plankton and fish. In *Ecotoxicology of antifouling biocides* (pp. 364-382). Springer, Tokyo.
- Mohamed, A. A. A. E. (2011). *Etude du mode d'action neurotoxique d'un répulsif, le Deet utilisé seul et en association avec un insecticide sur l'acetylcholinesterase des dum neurones d'un insecte la blatte periplaneta americana (Doctoral dissertation)*.
- Mohammed, A. (2007). Comparative sensitivities of the tropical cladoceran, *Ceriodaphnia rigaudii* and the temperate species *Daphnia magna* to seven toxicants. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 89(2), 347-352.
- Moncada, S., & Higgs, A. (1993). Mechanisms of disease: the L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine*, 329(27), 2002-2012.
- Moraes, B. S., Loro, V. L., Gluszcak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E., De Oliveira Machado, S. (2007). Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere*, 68: 1597–1601.
- Morales, M., Planelló, R., Martínez-Paz, P., Herrero, O., Cortés, E., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2011). Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(1), 150-158.
- Moreira, S. M., & Guilhermino, L. (2005). The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest Portuguese coast. *Environmental monitoring and Assessment*, 105(1-3), 309-325.
- Morel Y., Barouki R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Med. Sci.* 14: 713-21.
- Morel Y., Barouki R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* 342:481-96.
- Morrison, B. W., Doudican, N. A., Patel, K. R., & Orlow, S. J. (2010). Disulfiram induces copper-dependent stimulation of reactive oxygen species and activation of the extrinsic apoptotic pathway in melanoma. *Melanoma Research*. Vol. 20, pp. 11-20
- Moumeni ouissem (2016) *Etude de la toxicité d'un cyclohexanedione (herbicide) sur deux modèles biologiques d'eau douce :paramecium tetraurelia et Daphnia magna. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar–Annaba, 171p.*
- Muck, P., & Lampert, W. (1984). An experimental study of the importance of food conditions for the relative abundance of calanoid copepods and cladocerans. I. Comparative feeding studies with *Eudiaptomus gracilis* and *Daphnia longispina*. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Monographische Beiträge*, 66(2), 157-179.
- Mukerjee, L. N., & Srivastava, S. N. (1957). Bordeaux mixture and related compounds as emulsifiers. *Kolloid-Zeitschrift*, 150(2), 148-151.
- Mwaanga, P., Carraway, E. R., & van den Hurk, P. (2014). The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. *Aquatic toxicology*, 150, 201-209.

N

- Nagaraj MV, Rao PV, Susaraia S (1985). Copper sulphate poisoning, hemolysis and methaemoglobinemia. *J Assoc Physicians India* 33:308-309
- Nagendra, S. N., Faiman, M. D., Davis, K., Wu, J. Y., Newby, X., & Schloss, J. V. (1997). Carbamoylation of brain glutamate receptors by a disulfiram metabolite. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 272, pp. 24247-24251
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubeze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J. F., & Moukrim, A. (1997). Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 58(6), 901-908.
- Nakano, T., & Tomlinson, N. (1967). Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbance. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 24(8), 1701-1715.
- Narayan, G. (1949). Studies on the chemistry of Bordeaux mixture—part I. In *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section A* (Vol. 29, No. 5, p. 367). Springer India.
- Narbonne, J. F., Daubeze, M., Clerandau, C., & Garrigues, P. (1999). Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers*, 4(6), 415-424.
- Neužil, J., & Stocker, R. (1993). Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS letters*, 331(3), 281-284.
- Niki, E. (2008). Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors*, 34(2), 171-180.
- Nobel, C. I., Kimland, M., Lind, B., Orrenius, S., & Slater, A. F. (1995). Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 270, pp. 26202-26208
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Kobayashi, T., & Nakagawa, Y. (2000). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochemical Journal*, 351(1), 183-193.
- Nor YM. (1987). Ecotoxicity of copper to aquatic biota: a review. *Environ Res* 43:274–282
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Nordgren, I., Bergström, M., Holmstedt, B., & Sandoz, M. (1978). Transformation and action of metrifonate. *Archives of toxicology*, 41(1), 31-41.
- Novelli, G. P. (1997). Role of free radicals in septic shock. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 48(4), 517-527.

O

- OECD. (Organization for Economic Cooperation and Development).(1998). OECD guidelines for testing of chemicals. Guideline 211. *Daphnia magna* Reproduction test. OECD Environment Directorate, Paris (<http://www.oecd.org/ehs/>), pp 211–221
- OECD. (Organization for Economic Cooperation and Development). (2004). *Guidelines for Testing of Chemicals: Essay of immediate immobilization. Procedure 202*. Paris, France.
- OECD. (Organization for Economic Cooperation and Development). (2003). *Draft guidance document for the statistical analysis of ecotoxicity data*. OECD, Paris.
- Oertel, N., & Salánki, J. (2003). *Biomonitoring and bioindicators in aquatic ecosystems. In Modern trends in applied aquatic ecology* (pp. 219-246). Springer, Boston, MA.
- Offem, B. O., & Ayotunde, E. O. (2008). Toxicity of lead to freshwater invertebrates (*Water fleas; Daphnia magna* and *Cyclop sp*) in fish ponds in a tropical floodplain. *Water, air, and soil pollution*, 192(1-4), 39-46.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Okamoto, A., Yamamuro, M., & Tatarazako, N. (2015). Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna*. *Journal of applied toxicology*, 35(7), 824-830.
- Oliveira, L. L., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O., & Nunes, B. (2015). Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 123-131.
- Olson, D. L., & Christensen, G. M. (1980). Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro). *Environmental Research*, 21(2), 327-335.
- OMS (1990). *Public Health Impacts of Pesticides Used in Agriculture*. PIS.
- OMS (1994) *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and to Classification 1994-1995*, Genève, Organisation mondiale de la santé, WHO/PCS/94 .2.
- OMS (2004). *Dangers des pesticides pour l'homme. Rapport technique*. P 1-28.
- OMS (2006). *The WHO Recommended Classification of P by Hazard and Guidelines to Classification 2004*. 2e Ed.
- OMS/FAO (2001). *Les quantités de pesticides de mauvaise qualité vendus dans les pays en développements sont alarmantes*. Communiqué de presse OMS/04, Genève. Disponible sur le site Internet à l'adresse suivante: <http://www.who.int/inf-pr-2001/fr/pr2001-04.html>.
- Oueslati, K. (2017). *Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres oxygénés par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de la viande* (Doctoral dissertation).
- Ouyang, Y. (2005). *Evaluation of river water quality monitoring stations by principal component analysis*. *Water research*, 39(12), 2621-2635.

P

- Packer L, Tritschler HJ and Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22, 359-378.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A and Barja G (2000) Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 112, 169-183.
- Pandey S, Ahmad I, Parvez S, Bin-Hafeez R, Naque R, Raisuddin S (2001). Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper pre-exposure. *Arch Environ Contam Toxicology*. 41: 345-352.
- Pane, E. F., Smith, C., McGeer, J. C., & Wood, C. M. (2003). Mechanisms of acute and chronic waterborne nickel toxicity in the freshwater cladoceran, *Daphnia magna*. *Environmental science & technology*, 37(19), 4382-4389.
- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., & Vernet, G. (2000). Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquatic Toxicology*, 50(1-2), 109-124.
- Park, S. E., Kim, N. D., & Yoo, Y. H. (2004). Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer research*, 64(8), 2652-2655.
- Paschin, Y. V., & Bakhitova, L. M. (1985). Mutagenic effects of thiram in mammalian somatic cells. *Food and chemical toxicology*, 23(3), 373-375.
- Pastre, J., & Priymenko, N. (2007). Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de médecine vétérinaire*, 1(4), 180-189.
- Patel KC, Kulkarni BS, Acharya VN. (1976). Acute renal failure and methaemoglobinaemia due to copper sulphate poisoning. *J Postgrad Med* 22: 180-184.
- Patrick, L. (2006). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative medicine review*, 11(2).
- Paulauskis, J. D., & Winner, R. W. (1988). Effects of water hardness and humic acid on zinc toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, 12(3), 273-290.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., & Fancey, L. L. (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, 32(2), 225-231.
- Pennak, R. W. (1989). *Fresh-water invertebrates of the United States. Protozoa to mollusca*. 3rd ed. Protozoa to Mollusca, John Wiley & Sons, New York, NY.
- Pepeu, G., & Giovannini, M. G. (2004). Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learning & memory*, 11(1), 21-27.
- Pereira, J. L., Mendes, C. D., & Gonçalves, F. (2007). Short-and long-term responses of *Daphnia* spp. to propanil exposures in distinct food supply scenarios. *Ecotoxicology and environmental safety*, 68(3), 386-396.
- Persoone, G., & Janssen, C. R. (1993). *Freshwater invertebrate toxicity tests*. P. Colow (Ed.), *Handbook of Ecotoxicology*. (Edited by P. Calow), Blackwell Scientific Publisher, p. 55, Ambleside, UK
- Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and environmental Ethics*, 8(1), 17-29.
- Plaire, D. (2013). *Etude transgénérationnelle des altérations de l'ADN et de leurs conséquences sur les traits d'histoire de vie et le budget énergétique de Daphnia magna exposé à l'uranium appauvri* (Doctoral dissertation, Aix-Marseille).
- Plamenac, P., Santić, Z., Nikulin, A., & Serdarević, H. (1985). Cytologic changes of the respiratory tract in vineyard spraying workers. *European journal of respiratory diseases*, 67(1), 50-55.
- Pocsí, I., Prade, R. A., & Penninckx, M. J. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in microbial physiology*, 49(1), 1-76.
- Porter, K. G., Gerritsen, J., & Orcutt Jr, J. D. (1982). The effect of food concentration on swimming patterns, feeding behavior, ingestion, assimilation, and respiration by *Daphnia* I. *Limnology and Oceanography*, 27(5), 935-949.
- Powers, S. K., & Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(4), 1025-1033.
- Prasad, M. H., Pushpavathi, K., Rita, P., & Reddy, P. P. (1987). The effect of thiram on the germ cells of male mice. *Food and chemical toxicology*, 25(9), 709-711.
- 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), 533-541.
- Price, R. K. J., & Uglow, R. F. (1979). Some effects of certain metals on development and mortality within the moult cycle of crangon crangon (L.). *Marine Environmental Research*, 2(4), 287-299.
- Printes, L. B., & Callaghan, A. (2004). A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(5), 1241-1247.

R

- Rahman, I., Biswas, S. K., & Kode, A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European journal of pharmacology*, 533(1-3), 222-239.
- Ramade F. (2011). *Introduction à l'écochimie: Les substances chimiques de l'écosphère à l'homme*. Lavoisier Librairie. p. 311-312.
- Rambabu, J. P., & Rao, M. B. (1994). Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 53(1), 142-148.
- Ramel, F. (2009). *Implication des sucres solubles dans les réponses aux stress xénobiotique et oxydatif chez Arabidopsis thaliana* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat d'état en Sciences de la Vie et de l'environnement. Université de Rennes).

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rasaputra, K. S., Liyanage, R., Lay Jr, J. O., Slavik, M. F., & Rath, N. C. (2013). Effect of thiram on avian growth plate chondrocytes in culture. *The Journal of Toxicological Sciences*, 38(1), 93-101.
- Rath, N. C., Huff, W. E., Bayyari, G. R., & Balog, J. M. (1995). Effect of thiram on chick chondrocytes in culture. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 44(3), 369-376.
- Rath, N. C., Rasaputra, K. S., Liyanage, R., Huff, G. R., & Huff, W. E. (2011). Dithiocarbamate toxicity—an appraisal. *Pesticides in the Modern World—Effects of Pesticides Exposure, 2011*, 323-340.
- Raymond-Delpech V., Matsuda K., Sattelle B. M., Rauh J. J. and Sattelle D. B. (2005). Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci*, 5: 119-133.
- Reboleira, A. S. P., Abrantes, N., Oromí, P., & Gonçalves, F. (2013). Acute toxicity of copper sulfate and potassium dichromate on stygobiont *Proasellus*: general aspects of groundwater ecotoxicology and future perspectives. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(5), 1550.
- Rechenmann, F. (2010). *Modéliser la dynamique des populations animales: la prédation. Interstices*.
- Redmond, R. W., & Kochevar, I. E. (2006). Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology*, 82(5), 1178-1186.
- Regoli, F., & Principato, G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic toxicology*, 31(2), 143-164.
- Ren, Z., Zhang, X., Wang, X., Qi, P., Zhang, B., Zeng, Y., ... & Miao, M. (2015). AChE inhibition: one dominant factor for swimming behavior changes of *Daphnia magna* under DDVP exposure. *Chemosphere*, 120, 252-257.
- Reyes, J. G. G., Dalla-Venezia, L., & Alvarez, M. G. L. (2002). Effect of some organophosphorus pesticides on oxygen consumption of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(2), 134-136.
- Reynier, A. (2011). *Manuel de viticulture: guide technique du viticulteur*. Lavoisier. Paris, Éd. Tec & doc, dl 2011, 592 p.
- Reynolds, C. S. (1984). *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge university press. 384 pages
- Rial Otero, R., Cancho Grande, B., Arias Estévez, M., López Periago, E., & Simal Gándara, J. (2003). Procedure for the measurement of soil inputs of plant-protection agents washed off through vineyard canopy by rainfall. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(17), 5041-5046.
- Ribeiro, P. F., Johnson, B. K., Crow, M. L., Arsoy, A., & Liu, Y. (2001). Energy storage systems for advanced power applications. *Proceedings of the IEEE*, 89(12), 1744-1756.
- Ribeiro, S., Sousa, J. P., Nogueira, A. J. A., & Soares, A. M. V. M. (2001). Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(2), 131-138.
- Rikans, L. E., & Hornbrook, K. R. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1362(2-3), 116-127.
- Ritossa, F. (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell stress & chaperones*, 1(2), 97.
- Rodrigues da Silva, S. L., Oliveira Rodrigues, D., Sánchez Castillo, P., Conde-Porcuna, J. M., & Cruz-Pizarro, L. (2004). Alteraciones en la tasa de respiración de *Daphnia magna* bajo concentraciones subletales de anatoxina-a. *limnetica*, 23(1-2), 159-166.
- Rial Otero, R., Cancho Grande, B., Arias Estévez, M., López Periago, E., & Simal Gándara, J. (2003). Procedure for the measurement of soil inputs of plant-protection agents washed off through vineyard canopy by rainfall. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(17), 5041-5046.
- Roling, J. A., & Baldwin, W. S. (2006). Alterations in hepatic gene expression by trivalent chromium in *Fundulus heteroclitus*. *Marine environmental research*, 62, S122-S127.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Romeo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., & Girard, J. P. (2000). Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, 48(2-3), 185-194.
- Rosemberg, D. B., Rico, E. P., Senger, M. R., de Bem Arizi, M., Dias, R. D., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2007). Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain membranes. *Toxicology*, 236(1-2), 132-139.

S

- Sabatini, S. E., Rocchetta, I., Nahabedian, D. E., Luquet, C. M., Eppis, M. R., Bianchi, L., & De Molina, M. D. C. R. (2011). Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalve *Diplodon chilensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(4), 391-398.
- Saglio, P., Trijasse, S., & Azam, D. (1996). Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(2), 232-238.
- Sahli, L. (2017). Etude du comportement de quelques espèces floristiques et faunistiques des écosystèmes aquatiques vis-à-vis des éléments traces métalliques par des bioessais.
- Salam, S., Arif, A., & Mahmood, R. (2019). Thiram-induced cytotoxicity and oxidative stress in human erythrocytes: an in vitro study. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., & Ghosh, A. R. (2014). Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 107, 120-125.
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J. M., & Ait-Aissa, S. (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental toxicology and pharmacology*, 19(1), 177-183.
- Sanchez-Hernandez, J. C., Ríos, J. M., & Attademo, A. M. (2018). Response of digestive enzymes and esterases of ecotoxicological concern in earthworms exposed to chlorpyrifos-treated soils. *Ecotoxicology*, 27(7), 890-899.
- Sancho, D., Joffre, O. P., Keller, A. M., Rogers, N. C., Martinez, D., Hernanz-Falcón, P., ... & e Sousa, C. R. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*, 458(7240), 899-903.
- Sancho, E., Ferrando, M. D., Fernandez, C., & Andreu, E. (1998). Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(2), 168-175.
- Sancho, E., Sanchez, M., Ferrando, M. D., & Andreu-Moliner, E. (2001). Effects of thiobencarb herbicide to an alga (*Nannochloris oculata*) and the cladoceran (*Daphnia magna*). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 36(1), 55-65.
- Sandahl, J. F., Baldwin, D. H., Jenkins, J. J., & Scholz, N. L. (2004). Odor-evoked field potentials as indicators of sublethal neurotoxicity in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to copper, chlorpyrifos, or esfenvalerate. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(3), 404-413.
- Santiago, S., Becker van Slooten, K., Chèvre, N., Pardos, M., Benninghoff, C., Dumas, M., ... & Garrivier, F. (2002). Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement (No. REP_WORK).
- Santos, E. M., Ball, J. S., Williams, T. D., Wu, H., Ortega, F., Van Aerle, R., ... & Tyler, C. R. (2010). Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model. *Environmental science & technology*, 44(2), 820-826.
- SAP. (Report. Common mechanism of action of dithiocarbamates and thiocarbamates) (2001).
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R., (1989). The lipids. In: Halver, J. (Ed.), *Fish Nutrition*, 2nd edn. Academic Press, London, pp. 153-217.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sayre, L. M., Moreira, P. I., Smith, M. A., & Perry, G. (2005). Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 41(2), 143-164.
- 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.
- Schiavon, M., Perrin-Ganier, C., Portal, J., (1995). La pollution de l'eau par les produits phytosanitaires: état et origine. *Agronomie* 15, 157-170.
- Schlezinger, J. J., White, R. D., & Stegeman, J. J. (1999). Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl: production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As. *Molecular pharmacology*, 56(3), 588-597.
- Schmidel, A. J., Assmann, K. L., Werlang, C. C., Bertonecello, K. T., Francescon, F., Rambo, C. L., ... & Júnior, W. A. R. (2014). Subchronic atrazine exposure changes defensive behaviour profile and disrupts brain acetylcholinesterase activity of zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, 44, 62-69.
- Schmidt, G. H., & Ibrahim, N. M. M. (1994). Heavy metal content (Hg²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺) in various body parts: its impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adults. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 29(2), 148-164.
- Schubauer-Berigan, M. K., Dierkes, J. R., Monson, P. D., & Ankley, G. T. (1993). pH-dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyaella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 12(7), 1261-1266.
- Scott, G. R., & Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic toxicology*, 68(4), 369-392.
- Sen, C. K., & Goldfarb, A. H. (2000). Antioxidants and physical exercise. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*, Elsevier, 297-320.
- Sengupta, N., Gerard, P. D., & Baldwin, W. S. (2016). Perturbations in polar lipids, starvation survival and reproduction following exposure to unsaturated fatty acids or environmental toxicants in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 144, 2302-2311.
- Sengupta, N., Reardon, D. C., Gerard, P. D., & Baldwin, W. S. (2017). Exchange of polar lipids from adults to neonates in *Daphnia magna*: Perturbations in sphingomyelin allocation by dietary lipids and environmental toxicants. *PloS one*, 12(5), e0178131.
- Sennequier, N., & Vadon-Le Goff, S. (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO): mécanisme, régulation et contrôle. *MS. Médecine sciences*, 14(11), 1185-1195.
- Serra, A. A. (2015). Réponses écophysiologiques et moléculaires des plantes aux stress xénobiotiques complexes de faible intensité: implications dans les capacités de protection environnementale des bandes enherbées (Doctoral dissertation, Université Rennes 1).
- Servais, P. (1999). La matière organique dans les milieux naturels. *Presse de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées*, 49.
- Seugé, J., Marchal-Ségault, D., & Bluzat, R. (1983). Toxicité aiguë d'un fongicide dithiocarbamate, le thirame, vis à vis de plusieurs espèces animales d'eau douce. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 31(3), 177-189.
- Shahzad, M., Liu, J., Gao, J., Wang, Z., Zhang, D., Nabi, F., & Li, J. (2014). Hsp-90 inhibitor geldanamycin attenuates liver oxidative stress and toxicity in thiram-induced tibial dyschondroplasia. *Pak Vet J*, 34(4), 545-547.
- Shaw, J. R., Pfrender, M. E., Eads, B. D., Klaper, R., Callaghan, A., Sibly, R. M., ... & Colbourne, J. K. (2008). *Daphnia* as an emerging model for toxicological genomics. *Advances in Experimental Biology*, 2, 165-328.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyneck, C., Newhall, A., & Freidman, L. (1966). A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Anal. Biochem*, 19, 415-428.
- Shoja M., Gershon H., Bray D. et al.,(1998). Crystal structures of copper(II) complexes of some 2-methyl-8-quinolinols and implications for their antifungal activity. *Monatshefte für Chemie* 129(8-9):843-853.
- Shumilla, J. A., Wetterhahn, K. E., & Barchowsky, A. (1998). Inhibition of NF- κ B Binding to DNA by Chromium, Cadmium, Mercury, Zinc, and Arsenite in Vitro: Evidence of a Thiol Mechanism. *Archives of biochemistry and biophysics*, 349(2), 356-362.
- Siegwart, M. (2017). Journées d'Échanges sur les Résistances aux Produits de Protection des Plantes 2017. <https://colloque.inrae.fr/resistances-pesticides/content/download/3886/40232/version/1/file/11-MOA+insecticides-MSp.pdf>.
- Sies H., (1985). Oxidative stress: introductory remarks. H. Sies editor: Academic Press, London, 1-2.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 916-921.
- Silva, A. R. R., Santos, C. S., Ferreira, N. G., Morgado, R., Cardoso, D. N., Cruz, A., ... & Loureiro, S. (2019). Multigenerational effects of carbendazim in *Daphnia magna*: From a subcellular to a population level. *Environmental toxicology and chemistry*, 38(2), 412-422.
- Skidmore, J. F. (1970). Respiration and osmoregulation in the rainbow trout, with gills damaged by zinc sulphate. *Journal of Experimental Biology*, 52, 481-94.
- Skinner, D. M. (1962). The structure and metabolism of crustacean integumentary tissue during a moult cycle. *Biological Bulletin*, 123, 635-47.
- Slooff, W., Canton, J. H., & Hermens, J. L. M. (1983). Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I.(Sub) acute toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, 4(2), 113-128.
- Soares, A. M. V. M. (1989). Clonal variation in life-history traits in *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). Implications for ecotoxicology. University of Sheffield: Sheffield, UK.
- Sokol, R. J., Deverbaux, M., Mierau, G. W., Hambidge, K. M., & Shikes, R. H. (1990). Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload: modification by vitamin E deficiency. *Gastroenterology*, 99(4), 1061-1071.
- Song, Y., Chen, M., & Zhou, J. (2017). Effects of three pesticides on superoxide dismutase and glutathione-S-transferase activities and reproduction of *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Protection*, 43(1), 80–86.
- Sook Han, M., Shin, K. J., Kim, Y. H., Kim, S. H., Lee, T., Kim, E., Ho Ryu, S., & Suh, P. G. (2003). Thiram and ziram stimulate non-selective cation channel and induce apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology*. Vol. 24, pp. 425-434
- Soulard, B. (2007). *Ecologie fondamentale, eaux et milieux humides*. Séminaire européenne.
- Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental gerontology*, 36(9), 1539-1550.
- Stagg, R. M. (1998). The development of an international programme for monitoring the biological effects of contaminants in the OSPAR convention area. *Marine Environmental Research*, 46(1-5), 307-313.
- St-Amand, L., Gagnon, R., Packard, T. T., Savenkoff, C. (1999). Effects of inorganic mercury on the respiration and the swimming activity of shrimp larvae, *Pandalus borealis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 122: 33–43.
- Stark, J. D., Banks, J. E., & Vargas, R. (2004). How risky is risk assessment: The role that life history strategies play in susceptibility of species to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(3), 732-736.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Stasiowska, B., Sartoris, S., Goitre, M., & Benso, L. (1981). Rapp-Hodgkin ectodermal dysplasia syndrome. *Archives of disease in childhood*, 56(10), 793-795.
- Stevnsner, T., Thorslund, T., de Souza-Pinto, N. C., & Bohr, V. A. (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Experimental gerontology*, 37(10-11), 1189-1196.
- Stohs, S. J., Bagghi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18: 321-336.
- Stoker, T. E., Jeffay, S. C., Zucker, R. M., Cooper, R. L., & Perreault, S. D. (2003). Abnormal fertilization is responsible for reduced fecundity following thiram-induced ovulatory delay in the rat. *Biology of reproduction*, 68(6), 2142-2149.
- Stoker, T.E., Cooper, R.L., Goldman, J.M., Andrews, J.E., (1996). Characterization of pregnancy outcome following thiram-induced ovulatory delay in the female rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 18, 277-282.
- Straus, D. L., & Tucker, C. s. (1993). Acute Toxicity of Copper Sulfate and Chelated Copper to Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(3), 390-395.
- Strolin-Benedetti, M., Brogin, G., Bani, M., Oesch, F., & Hengstler, J. G. (1999). Association of cytochrome P450 induction with oxidative stress in vivo as evidenced by 3-hydroxylation of salicylate. *Xenobiotica*, 29(11), 1171-1180.
- Sturm, A., & Hansen, P. D. (1999). Altered Cholinesterase and Monooxygenase Levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* Exposed to Environmental Pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42(1), 9-15.
- Sujatha, M., & Mukta, N. (1996). Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44(2), 135-141.
- Sumiya, E., Ogino, Y., Miyakawa, H., Hiruta, C., Toyota, K., Miyagawa, S., & Iguchi, T. (2014). Roles of ecdysteroids for progression of reproductive cycle in the fresh water crustacean *Daphnia magna*. *Frontiers in Zoology*, 11(1), 60.
- Sun, D. Q., Li, A. W., Li, J., Li, D. G., Li, Y. X., & Gong, M. Z. (2009). Changes of lipid peroxidation in carbon disulfide-treated rat nerve tissues and serum. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), 110-117.
- Sunda, W. G., & Huntsman, S. A. (1996). Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitation in a coastal diatom. *Limnology and Oceanography*, 41(3), 373-387.
- Swain S., Wren J. F., Stürzenbaum S. R., Kille P., Morgan A. J., Jager T., Jonker M. J., Hankard P. K., Svendsen C., Owen J., Hedley B. A., Blaxter M. et Spurgeon D. J. (2010) Linking toxicant physiological mode of action with induced gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Systems Biology*, 4 1-19.
- Swarcewicz M.K., Gregorczyk A., (2012). The effects of pesticide mixtures on degradation of pendimethalin in soils. *Environmental Monitoring Assessment*. 184: 3077-3084.
- Szymanowski J. (1993). «Hydroxyoximes and copper hydrometallurgy». CRC Press. Boca Raton .159pp.

T

- Tan, K.H., Meyer, D.J., Coles, B., Ketterer, B., 1986. Thymine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes. *FEBS Lett* 207, 231-233.
- Tatarazako, N., & Oda, S. (2007). The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology*, 16(1), 197-203.
- Tessier, A. J., & Goulden, C. E. (1982). Estimating food limitation in cladoceran populations I. *Limnology and Oceanography*, 27(4), 707-717.
- Testud F., Marcotullio E., (2001). Les Dithiocarbamates. In : Testud F, Garnier R, Delemotte B, eds. *Toxicologie humaine des produits phytosanitaires*. Paris : Eska - Lacassagne, 2001:149- 159

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028.
- Thany, S. H., Reynier, P., & Lenaers, G. (2013). Neurotoxicité des pesticides-Quel impact sur les maladies neurodégénératives?. *médecine/sciences*, 29(3), 273-278.
- Thompson J., Ferguson A., Reynolds C., (1982), Natural filtration rates of zooplankton in a closed system: The derivation of a community grazing index, *Journal of Plankton Research*, 4, 545–560.
- Thompson, P.-A., Couture, P. (1991). Short- and Lon-terme changes in growth and biochemical composition of *Selenastrum capricornutum* populations exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*. 21: 135-144.
- Thompson, P.-A., Couture, P. (1993). Physiology of carbon assimilation in a green alga during exposure to recovery from cadmium. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 26: 205-215.
- Thurberg, F. P., Dawson, M. A., & Collier, R. S. (1973). Effects of copper and cadmium on osmoregulation and oxygen consumption in two species of estuarine crabs. *Marine Biology*, 23(3), 171-175.
- Tilton, F. A., Bammler, T. K., & Gallagher, E. P. (2011). Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(1), 9-16.
- Timbrell, J. A., Waterfield, C. J., & Draper, R. P. (1995). Use of urinary taurine and creatine as biomarkers of organ dysfunction and metabolic perturbations. *Comparative Haematology International*, 5(2), 112-119.
- Timbrell, J. A., Waterfield, C. J., & Draper, R. P. (1995). Use of urinary taurine and creatine as biomarkers of organ dysfunction and metabolic perturbations. *Comparative Haematology International*, 5(2), 112-119.
- Tomlin, C. D. (2009). *The pesticide manual: A world compendium (No. Ed. 15)*. British Crop Production Council.
- Toumi H, Boumaiza M, Millet M, Radetski C M, Felten V, Férard J F., (2015). Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure?. *Chemosphere*, 120, 351-356.
- Toumi, H. (2013). *Écotoxicité 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 (Doctoral dissertation, Université de Lorraine)*.
- Toumi, H., Bejaoui, M., Touaylia, S., Burga Perez, K. F., & Ferard, J. F. (2016). Effect of carbaryl (carbamate insecticide) on acetylcholinesterase activity of two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(11), 777-780.
- Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, 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). *Science of the total Environment*, 458, 47-53.
- Tripathi, P. K., & Singh, A. (2002). Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on carbohydrate metabolism of freshwater snail *Lymnaea acuminata*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 68(4), 606-611.
- Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical biochemistry*, 524, 13-30.
- Turchin, P. (2003). *Complex population dynamics: a theoretical/empirical synthesis*. Princeton university press.

U

- Uchida, K., Kato, Y., & Kawakishi, S. (1990). A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical. *Biochemical and biophysical research communications*, 169(1), 265-271.
- Unestam, T. (1973). Significance of diseases on freshwater crayfish. *Freshwater crayfish*, 1, 135-150.
- Ungerer, P., Eriksson, B.J., Stollewerk, A. (2011). Neurogenesis in the water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda) suggests different mechanisms of neuroblast formation in insects and crustaceans. *Dev Biol.* 357, 42-52.
- Ungerer, P., Scholtz, G. (2008). Filling the gap between identified neuroblasts and neurons in crustaceans adds new support for Tetraconata. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society.* 275, 369-376.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (1992) Interim guidance on interpretation and implementation of aquatic life criteria for metals. Washington, DC
- US EPA U.S. Environmental Protection Agency., (2002), *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth edition, Office of Water (4303T), EPA-821- R-02-012, Washington.*
- US EPA. (2001). Assessed February 2011.
http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2001/september7/dithiofinal_aug17.pdf.

V

- Vaccari, A., Saba, P., Mocci, I., & Ruiu, S. (1999). Dithiocarbamate pesticides affect glutamate transport in brain synaptic vesicles. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* Vol. 288, pp. 1-5
- Valentine, H. L., Viquez, O. M., Amarnath, K., Amarnath, V., Zyskowski, J., Kassa, E. N., & Valentine, W. M. (2009). Nitrogen substituent polarity influences dithiocarbamate-mediated lipid oxidation, nerve copper accumulation, and myelin injury. *Chemical Research in Toxicology.* Vol. 22, pp. 218-226.
- Van Bladeren, P. J. (1988). Formation of toxic metabolites from drugs and other xenobiotics by glutathione conjugation. *Trends in pharmacological sciences*, 9(8), 295-299.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. (2011). Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere*, 82(3), 291-307.
- Van Leeuwen, C. J., Grootelaar, E. M. M., & Niebeek, G. (1990). Fish embryos as teratogenicity screens: A comparison of embryotoxicity between fish and birds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20(1), 42-52.
- Van Leeuwen, C. J., Maas-Diepeveen, J. L., & Overbeek, H. C. M. (1986). Sublethal effects of tetramethylthiuram disulfide (thiram) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic toxicology*, 9(1), 13-19.
- Van Leeuwen, C. J., Maas-Diepeveen, J. L., Niebeek, G., Vergouw, W. H. A., Griffioen, P. S., & Luijken, M. W. (1985). Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. I. Short-term toxicity tests. *Aquatic toxicology*, 7(3), 145-164.
- Van Leeuwen, C. J., Moberts, F., & Niebeek, G. (1985). Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. II. Effects on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 7(3), 165-175.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Varade, A. (2016). Copper (II) sulphate pentahydrate $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, is a coordination compound and its structure. *Quora*. <https://www.quora.com/Why-is-copper-sulphate-pentahydrate-coloured>.
- Varo, I., Nunes, B., Amat, F., Torreblanca, A., Guilhermino, L., Navarro, J. C. (2007). Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings. *Aquat. Living Resour.*, 20: 263–270.
- Vernberg, W. B., & Vernberg, F. J. (2012). *Environmental physiology of marine animals*. Springer Science & Business Media.
- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Biasi, F., Cecchini, G., & Orunesu, M. (1988). Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues. *Marine Environmental Research*, 24(1-4), 354.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Palmero, S., & Orunesu, M. (1980). Rapid induction of copper-binding proteins in the gills of metal exposed mussels. In *Animals and environmental fitness* (pp. 81-82). Pergamon.
- Vieira, L. R., Gravato, C., Soares, A. M. V. M., Morgado, F., & Guilhermino, L. (2009). Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*, 76(10), 1416-1427.
- Vieira, L. R., Sousa, A., Frasco, M. F., Lima, I., Morgado, F., & Guilhermino, L. (2008). Acute effects of Benzo [a] pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Science of the total environment*, 395(2-3), 87-100.
- Villarroel, M. J., Ferrando, M. D., Sancho, E., & Andreu, E. (2000). Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. *Aquatic toxicology*, 49(1-2), 39-47.
- Viquez, O. M., Lai, B., Ahn, J. H., Does, M. D., Valentine, H. L., & Valentine, W. M. (2009). N,N-diethylthiocarbamate promotes oxidative stress prior to myelin structural changes and increases myelin copper content. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 239, pp. 71-79
- Von Sonntag, C. (2008). Advanced oxidation processes: mechanistic aspects, *Water Science and Technology* 58, 1015-1021.

W

- Wang, Y. H., Wang, G., & LeBlanc, G. A. (2007). Cloning and characterization of the retinoid X receptor from a primitive crustacean *Daphnia magna*. *General and Comparative Endocrinology*, 150(2), 309-318.
- Weast, R. C., & Astle, M. J. (1980). *CRC Handbook of Chem. and phys.* CRC, Boca Raton, FL.
- Weber, C. I. (Ed.). (1991). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms* (p. 197). Washington, DC: Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency.
- Weckbecker, G., & Cory, J. G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40(3), 257-264.
- Weiner, L., Kreimer, D., Roth, E., & Silman, I. (1994). Oxidative stress transforms acetylcholinesterase to a molten globule-like state. *Biochemical and biophysical research communications*, 198(3), 915-922.
- Wightwick, A., Walters, R., Allinson, G., Reichman, S., & Menzies, N. (2010). Environmental risks of fungicides used in horticultural production systems. *Fungicides*, 273-304.
- Winge, D. R., & Miklossy, K. A. (1982). Domain nature of metallothionein. *Journal of Biological Chemistry*, 257(7), 3471-3476.
- Wink, D. A., Nims, R. W., Saavedra, J. E., Utermahlen, W. E., & Ford, P. C. (1994). The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6604-6608.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Winner, R. W., & Gauss, J. D. (1986). Relationship between chronic toxicity and bioaccumulation of copper, cadmium and zinc as affected by water hardness and humic acid. *Aquatic Toxicology*, 8(3), 149-161.
- Winner R. W., Keeling T., Yeager R. & Farrel M.P., (1977). Effects of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Freshwat. Biol.*, 7, 343–349.
- Winner, R. W. (1981). A comparison of body length, brood size and longevity as indices of chronic copper and zinc stresses in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 26(1), 33-37.
- Winner, R. W., & Farrell, M. P. (1976). Acute and Chronic Toxicity of Copper to Four Species of *Daphnia*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33(8), 1685–1691.
- Winner, R. W., Keeling, T., Yeager, R., & Farrell, M. P. (1977). Effect of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Freshwater Biology*, 7(4), 343-349.
- Wood, P. J., & Armitage, P. D. (1997). Biological effects of fine sediment in the lotic environment. *Environmental management*, 21(2), 203-217.
- Wren J. F., Kille P., Spurgeon D. J., Swain S., Sturzenbaum S. R. et Jager T. (2011) Application of physiologically based modelling and transcriptomics to probe the systems toxicology of aldicarb for *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900). *Ecotoxicology*, 20 (2) 397-408.
- Wronska-Nofer, T., Chojnowska-Jezierska, J., Nofer, J.-R., Halatek, T., & Wisniewska-Knypl, J. (2002). Increased oxidative stress in subjects exposed to carbon disulfide (CS₂) - an occupational coronary risk factor. *Archives of Toxicology*, 76(3), 152–157.
- Wu, Y., Lin, C., & Yuan, L. (2007). Characteristics of six cladocerans in relation to ecotoxicity testing. *Ecological Indicators*, 7(4), 768-775.

X-Y

- Xie, Z., Lu, G., Li, S., Nie, Y., Ma, B., & Liu, J. (2015). Behavioral and biochemical responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to sertraline. *Chemosphere*, 135, 146–155.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., & Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology*, 94(2), 114-122.
- Yang, M. S., Chan, H. W., & Yu, L. C. (2006). Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*, 226(2-3), 126-130.
- Yim, J. H., Kim, K. W., & Kim, S. D. (2006). Effect of hardness on acute toxicity of metal mixtures using *Daphnia magna*: Prediction of acid mine drainage toxicity. *Journal of hazardous materials*, 138(1), 16-21.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 145-156.
- Yu, Y., Kalinowski, D. S., Kovacevic, Z., Sifakos, A. R., Jansson, P. J., Stefani, C., ... & Richardson, D. R. (2009). Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 52(17), 5271-5294.
- Yüzbaşıoğlu, E., & Dalyan, E. (2019). Salicylic acid alleviates thiram toxicity by modulating antioxidant enzyme capacity and pesticide detoxification systems in the tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Plant physiology and biochemistry*, 135, 322-330.

Z

- Zaffagnini, F., & Zeni, C. (1986). Considerations on some cytological and ultrastructural observations on fat cells of *Daphnia* (Crustacea, Cladocera). *Italian Journal of Zoology*, 53(1), 33-39.
- Zamy, C., Mazellier, P., Legube, B., (2004). Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. *Water research* 38, 2305-2314.
- Zarei, I., Pourkhabbaz, A., Alipour, H., & Khazaei, S. H. (2013). Acute Toxicity and the effects of copper sulphate (CuSO₄. 5H₂O) on the behavior of the black fish (*Capoeta fusca*). *Iranian Journal of Toxicology*, 6(19), 771-778.

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zdzienicka, M., Zeileńska, M., Tudek, B., & Szymczyk, T. (1979). Mutagenic activity of thiram in Ames tester strains of *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 68(1), 9-13.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349.
- 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 (Doctoral dissertation, Montpellier 2).
- Zevenhuizen, L. P. T. M., Dolfing, J., Eshuis, E. J., & Scholten-Koerselman, I. J. (1979). Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology*, 5(2), 139-146.
- Zevenhuizen, L. P. T. M., Dolfing, J., Eshuis, E. J., & Scholten-Koerselman, I. J. (1979). Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology*, 5(2), 139-146.
- Zhang, Y., Song, J., Yuan, H., Xu, Y., He, Z., & Duan, L. (2010). Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentrations of lead, mercury, copper. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30(1), 19-25.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., & Jiang, G. (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica chimica acta*, 606(2), 135-150.
- Zielinski, S., & Pörtner, H. O. (2000). Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 125(2), 147-160.
- Zinkl, J. G., Lockhart, W. L., Kenny, S. A., & Ward, F. J. (1991). The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *Cholinesterase-inhibiting insecticides, chemicals in agriculture*, 2, 151Á.
- Zou, E., & Fingerman, M. (1997). Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 38(3), 281-285.

Production scientifique (Publications et communications)

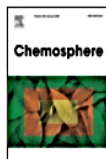
Une partie des travaux présentés dans ce mémoire a fait l'objet de publications ou de communications

- **Publications internationales (2)**

- BELAID, Chahrazad et SBARTAI, Ibtissem. Assessing the effects of Thiram to oxidative stress responses in a freshwater bioindicator cladoceran (*Daphnia magna*). *Chemosphere*, 2020, p. 128808.
- BELAID, Chahrazad, SBARTAI, Ibtissem, et DJEBAR, Mohammed Réda. Populational effect of a dithiocarbamate (thiram) fungicide on a freshwater cladocerus *Daphnia magna*. *Studia Universitatis" Vasile Goldis" Arad. Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)*, 2019, vol. 29, no 3, p. 121-128.

- **Communications (5)**

N°=	Séminaire	Titre de la communication	Auteurs	Institution
1	<u>SEMINAIRE INTERNATIONAL</u> «Environnement, Agriculture et Biotechnologie»	Impact d'un fongicide (Bouillie bordelaise) sur la croissance d'un microcrustacé d'eau douce : <i>Daphnia magna</i>	– BELAID Chahrazad, – SBARTAI Ibtissem, – SBARTAI Hana, – DJEBAR Med-Réda	Université Akli Mohand Oulhadj -Bouira-
2	<u>SEMINAIRE INTERNATIONAL</u> sur L'Agroalimentaire «SIA 2018»	Évaluation de la toxicité d'un fongicide (Thirame) sur la croissance et la reproduction d'un micro-crustacé d'eau douce : <i>Daphnia magna</i>	– BELAID Chahrazad – SBARTAI Ibtissem – DJEBAR Med-Réda	Université 08 Mai 1945 -Guelma-
3	<u>COLLOQUE INTERNATIONAL</u> Biosciences 2018 «Génie Enzymatique et Production de Métabolites»	Evaluation de l'effet toxique d'un fongicide (Thirame) sur la biologie d'un microcrustacé d'eau douce : <i>Daphnia magna</i>	– BELAID Chahrazad – SBARTAI Ibtissem – DJEBAR Med-Réda	Ecole supérieure en sciences biologiques -Oran-
4	<u>SEMINAIRE INTERNATIONAL</u> Environnement et Toxicologie «sinentox'2019»	Etude de la toxicité d'un fongicide -Bouillie bordelaise- chez un microcrustacé d'eau douce : <i>Daphnia</i>	– BELAID Chahrazad – SBARTAI Ibtissem – FERFAR Khadidja – YUBI Amira – DJEBAR Med-Réda	Université Frères Mentouri Constantine 1 -Constantine-
5	<u>1^{er} SEMINAIRE NATIONAL DE TOXICOLOGIE</u> « Perturbateurs Endocriniens : Risques et Impact sur la Santé »	Evaluation de l'effet toxique d'un fongicide sur un bioindicateur : <i>Daphnia magna</i>	– BELAID Chahrazad – SBARTAI Ibtissem – DJEBAR Med-Réda	Université Badji Mokhtar, Annaba Faculté de Médecine -Annaba-



Assessing the effects of Thiram to oxidative stress responses in a freshwater bioindicator cladoceran (*Daphnia magna*) ☆

Show more

Outline | Share | Cite

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128808>

Get rights and content

Highlights

- This study aimed to assess toxic effects of Thiram induced in *Daphnia magna*.
- Modifications were found in CAT and GST activity.
- Significant increases in MDA, and GSH depletion.
- Thiram induces oxidative stress on *Daphnia magna*.

Keywords

Thiram; *Daphnia magna*; Antioxidant systems; Lipid peroxidation; Oxidative stress

* Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The research is PhD study project proceeded in Laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

[View full text](#)

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



8.8

CiteScore

5.778

Impact Factor

Populational effect of a dithiocarbamate (thiram) fungicide on a freshwater cladocerus *Daphnia magna*

Chahrazad Belaid^{1*}, Ibtissem Sbartai¹, Mohammed Réda Djebar¹

¹Laboratory of Cellular Toxicology, Faculty of Sciences, Department of Biology, University of Badji Mokhtar, Annaba, B.P. 12, Annaba, 23000, Algeria

Abstract: Thiram is considered as a potential risk fungicide, which affects principally environment and aquatic organisms which are the most exposed victims. Literature studies have classified *Daphnia magna* from the key species as well as the water contamination's bioindicator. However, very limited studies have been published for treating the effects of thiram on daphnids. The current study aims to analyze the growth, reproduction, and neurotoxicity effects of thiram on *Daphnia magna* in order to obtain knowledge on the risk involved with the emission of these fungicide into the environment. The results obtained from the acute test after 24h-48h of thiram exposure (0.05- 0.10- 0.25- 0.50mg/L) showed an increase in the rate of immobilization. However, the chronic test of 21 days at lower concentration exposure (0.004- 0.008- 0.016- 0.032 mg/L) revealed a decrease in the different growth and reproductive parameters, this inhibition was confirmed by the results of the monitoring of the AchE activity, which decreases suggesting the thiram neurotoxic effect. thiram was found to be toxic to *Daphnia magna* as it is proved by standardized tests.

Keywords: Thiram, *Daphnia magna*, cytotoxicity test, acetylcholine esterase, biomonitoring

INTRODUCTION

The environment has been threatened for a long time by the excessive human activity. Generally, aquatic environment is the final receptacle of the chemical human activity, which gradually leads to deterioration and decomposition of water quality, aquatic balance and stability of ecosystems (Chevalier *et al.*, 2014). Among the most important contaminants, pesticides that represent a significant part of the current environmental pollution; although their main targets are plants, only a small proportion nearly to 0,1 reaches thereof; the rest enters the environment gratuitously, contaminating soil, water and air, where it can poison or otherwise adversely affect nontarget organisms (Arias-Estévez *et al.*, 2008). All these molecules, such as (thiram), are either acting directly on soils, contaminating food and affecting both biodiversity and human health, or indirectly by having an impact on the environment which could likewise poison organisms and cause rapid and harmful changes.

Physical, chemical, biological and microbial measurements are the basic approach for estimating freshwater environmental quality. Therefore, it is widely recognized that the use of indicators can greatly enhance the assessment and management of aquatic ecosystems. Bio-monitoring by using an indicator species *Daphnia magna* as predictive models and their responses, to determine the changes of water environment, is the typical technique in water quality assessment and ecosystem, due to the ability of representing the overall status of the environment, which permits the detection of trends through their sensitivity to a range of stressors, and to be measured and interpreted relatively easily. (Le *et al.*, 2016); (Li *et al.*, 2010); (Metcalf *et al.*, 1989); (Chen *et al.*, 2012) and (Neves *et al.*, 2015). However, according to the author's knowledge, there are relatively few published studies treating the long-term toxicity on crustaceans that have been found out in the literature, particularly in chronic effects of thiram on *Daphnia magna*. In the

Other hand, many researchers have used biomarkers as well as AChE, as practical and quick methods for evaluating in vivo cholinesterase-inhibiting compound. However, to the author's knowledge, no studies have been reported on *Daphnia magna* after thiram exposure using AChE. Therefore, we have focused in the current study on the AChE activity of *Daphnia magna* after acute thiram exposure in the sake of determining the observed effects concentrations inducing inhibition of AChE activities, and specific biomarker of pesticides neurotoxicity.

In view of the aforementioned background, this article contributes to establish data for the short and long-term toxicity of thiram, widely used in agriculture on freshwater bioindicator. The approach is based on analyzing the growth, reproduction, and neurotoxicity effects of thiram on *Daphnia magna* in order to obtain knowledge on the risk involved with the emission of these fungicide into the environment. Acute and chronic tests on *Daphnia magna* have been established to assess population sensitivity. Assessment endpoints were immobilization longevity, survival, number of cumulative molts, day to first brood, number of brood and number of viable juveniles per surviving female.

MATERIALS AND METHODS

Test chemical

A fungicide active substance of the dithiocarbamate family (Thiram) was used as the commercial preparation. It is mainly used as foliar surface treatment in orchards against e.g., apple scab and the peach leaf curl, *Botrytis spp.*, rust, monilia. Since drift is the main entry into surface waters of most pesticides used in orchards due to the height of treated trees. Solutions were prepared by dissolving the fungicide immediately before each experiment.

Test organisms

Daphnia magna was collected and transported to the laboratory. The culture was reared and maintained

in a 16-litre glass aquarium containing dechlorinated water (total hardness 250 ± 25 mg/L; pH= $7,9 \pm 0,2$) renewed twice a week at a controlled temperature and photoperiod ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), with a light/dark cycle of 16/08h (Ferrando et al., 1995). Daphnids are daily fed with a mixture of algae (*Chlorella vulgaris*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), a parthenogenetic reproduction is triggered and gives rise to juveniles that are the subject of tests.

Acute toxicity test

Acute tests were performed according to the ISO 6341 (1996) procedure to determine the concentration that causes the immobility of young daphnids at the end of 24 and 48 hours. Three replicates of five neonates (<24-h old), were placed in 30 mL glass test tubes containing 10 mL for each test concentration (0.05 - 0.10 - 0.25 - 0.50 mg/L) dissolved in ISO medium, were tested, and the neonates were not fed during the test and were placed away from light. The assessment endpoint was immobilization, more precisely, juveniles that were unable to swim were considered immobile and those which still moved their antennae but did not swim within 15s after a gentle shaking were considered immobile. The test is validated only if the percentage of immobilization in controls is less than or equal to 10%. Immobile juveniles were visually counted, to assess the 50 % inhibitory concentration (IC₅₀) which inhibits 50% of the population growth.

Chronic toxicity test

Based on acute results, *Daphnia magna* (<24-h old) were then exposed during 21 days to low concentrations of thiram (0.004- 0.008- 0.016- 0.032 mg/L). The test includes two important life stages' animals, namely the juvenile phase and the reproductive phase, under defined conditions based on the international standard ISO 10706 (2000) procedure. 10 replicates/concentration of juvenile were exposed individually in 60-mL glass beakers, containing 40 mL of culture solution, of the food and pesticide at desired nominal concentrations. The newborn are separated from adult daphnids, and counted daily. The test solution (with food) was renewed every 2 days. The examined assessment endpoints were longevity, survival, number of cumulative molts, day to first brood, number of brood and number of viable juveniles per female.

Determination of AChE activity

In order to mimic acute test conditions, 20 animals were placed in test solution at the desired nominal thiram concentrations (0.05 - 0.10 - 0.25 - 0.50 mg/L). After 24 h, rare immobile organisms were removed, and just alive animals were pooled. Before analysis, animals were rinsed for three times to remove thiram adsorbed on their carapace. AChE activity determined according to the method of Ellman *et al.* (1961) The aim is to provide the enzyme (AChE) with an analogous artificial substrate, acetyl thiocholine, which will be hydrolyzed into acetic acid and thiocholine. The latter in the presence of DTNB gives a yellow product TNB. Absorbance at 412 nm was measured at 25°C every each 4 min during 20 min. The results are expressed in $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ proteins. The protein concentration of the homogenized animal sample was determined in triplicate by the Bradford method bovine serum Albumin (BSA) as a standard.

Statistical analysis

To characterize toxicity, the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) which is under standard conditions inhibits 50% of population growth has been determined, immobility rates are corrected by the Abbott's (1925) formula; Transformed into Probits. Statistical analysis of the effects of the toxicant exposure on the different parameters tested has been compared by one-way ANOVA using GraphPad Prism 7 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Acute toxicity test

Exposure juveniles to thiram has a negative effect on survival/mobilization as is shown in Figure (1). Immobilization rate increases in a dose-dependent manner for organisms treated by increasing thiram concentrations for 24h exposure; it is nil (0.05 mg/L) but having 53.33% (0.5 mg/L). Statistical analysis showed highly significant differences. After 48h exposure, a significant increase immobilization rate of treated daphnids compared to controls. Inhibition was observed at (0.05 mg/L), there it is 26.67%, more than half of the population is inhibited 60% at (0.5 mg/L). Killing effects accentuated with time of exposure. This was reflected by the EC₅₀ values, which decreased from 0.35 mg/L after 24h to approximately the half 0.19 mg/L after 48h.

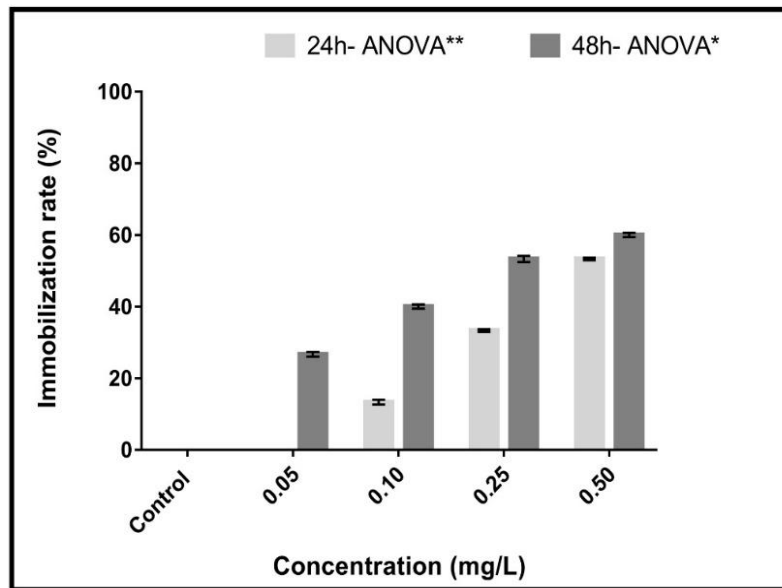


Fig. 1. Immobilization rate of *Daphnia magna* after 24h-48h of thiram exposure.

For instance, 48h-LC50 value of thiram was reported to be 0.21 mg/L, as signaled in 2017 regulation (EC) No. 1907/2006 and as it is found by Van Leeuwen *et al.* (1985) in short-term toxicity tests of dithiocarbamates. 48h-EC50 for thiram reported in the present study was near to that reported by regulation. Our results are in the same line with acute toxicity assessment of deltamethrin. (Toumi and al., 2013) and Chlordane (Manar *et al.*, 2009) on *D. magna*, it is confirmed in both cases the dose-dependent on the concentrations of xenobiotics tested and the effect on daphnia mortality. Moreover, several tested fungicides indicated that the most toxic formulation for all tested freshwater species was the thiram 80% WG formulation, the most sensitive organism was *D. magna* (24-EC50=0.03 mg/L) which was 3-fold higher for (48-EC50 with 0.01 mg/L) (Kyriakopoulou *et al.*, 2009). In comparison to previous studies, *D. magna* used in the present study was more sensitive to thiram. Moreover, the 48-h EC50 in our study was lower than the previously reported values. The EC50 value in *D. magna* varied under different conditions, such as temperature, population, body size, and pre-exposure, which indicated that different processes (i.e. intrinsic tolerances level and capability of detoxification system) contribute to thiram toxicity under certain conditions. In addition, media and culture conditions, including pH, hardness, light and alkalinity are also probably causes of different toxicity to xenobiotics demonstrating the sensitivity of daphnids to the commercial molecule. These findings imply that further studies are required to assess the acute toxic effect of xenobiotics on this species, under different conditions. Okamoto *et al.*, 2015); (Friberg-Jensen *et al.*, 2010) and (Lee *et al.*, 2010). Chemical exposure time and body size are responsible for these differences in the toxicity of xenobiotics; in particular, the smaller the body size is, the higher the metabolic and accumulation rate are, which could render these sensitive species to

environmental stressors (Offem and Ayotunde, 2008). Interclonal acute variation in *D. magna* was extensively reviewed as factors ranging (Baird *et al.*, 1991). Hence, it appears that clonal sensitivity is chemical-specific. Although environmental factors such as diet and culture conditions, remain the major cause of inter-laboratory variation.

Chronic toxicity test

All the studied parameters during the chronic experiments were influenced by thiram to which the organisms were exposed. To our Knowledge, there is no data concerning thiram using chronic test variation were found in the literature. Long-term thiram exposure affects survival, growth and different fecundity parameters on *D. magna* registered at the end of 21 days of time exposure. Barring the day to first brood, all other assessment endpoints generally decreased in a concentration dependent manner.

Figure (2a) shows concentration-response for population longevity of daphnids which declined with the increase of thiram concentrations, that were decreases significantly ($P \leq 0.001$), compared to controls a score of 21 days was observed. It reduces from 20.8 days at 0.004mg/L, and it was very affected by the highest concentration 0.032mg/L which decreases by almost half (12.2 days) justified by thiram exposure stress. Longevity linked to stressors, and Metal concentrations of Zinc copper caused a significant reduction in longevity (Winner, 1981).

Survival rate at the 21st day decreases significantly ($P \leq 0.001$) with increasing exposure concentration and time figure (2b), thiram showed a clear effect on survival during the test period, control survival was 100%, however no organism survives to the 21st day in (0.032 mg/L), it was approximatively the half (60%) survived in 0.008 mg/L. Several researchers have suggested that survival in chronic toxicity tests is the best index of toxicity because it is more sensitive and

less variable than reproductive parameters (Day and Kaushik, 1997).

Average number of molts, was decreased significantly ($P \leq 0.001$) with increasing exposure

concentration and time (Fig. 2c), compared to the control daphnids 6,7 mean, it was approximately the half 3.8 and 3.2 for 0.016 mg/L and 0.032 mg/L respectively.

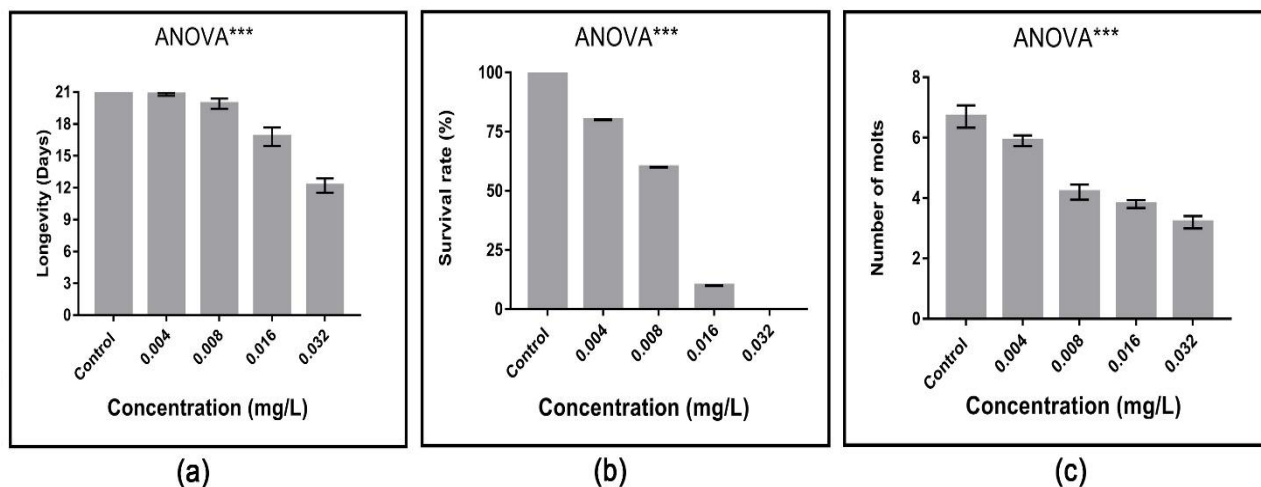


Fig. 2. Effects of thiram on longevity (a), on survival rate (b) and on number of molts (c) of *Daphnia magna* during 21 days of exposure.

Reproduction of the surviving adults exposed to low-dose and chronic exposure of thiram was significantly affected. The required time to each reproductive maturity increased progressively compared with control, but the differences were only statistically significant ($p < 0.05$). The age at first reproduction (Fig. 3a) was increased from 10,8 days for control might develop faster to 11,3 (0,004 mg/L), 11,75 (0,008 mg/L), 11,87 (0,016 mg/L) and delay to 12 days (0,032 mg/L).

The total average production of young per female (Fig. 3b) was also affected significantly ($P \leq 0.001$) at

all the thiram tested levels. Cumulative number brood control was 3,2 decreased 30 times for the highest concentration (0,032 mg/L). The lowest thiram concentration (0,004 mg/L) had also effected number of broods 2,9 at mean.

Reproduction was significantly reduced, as a result, the total number of neonates per living *D. magna* in 21 days decreased significantly ($P \leq 0.001$) and declined progressively from 22,7 young (control) to 0,5 young (0,032 mg/L), thiram significantly was reduced the total number of neonates per surviving female (Fig. 3c).

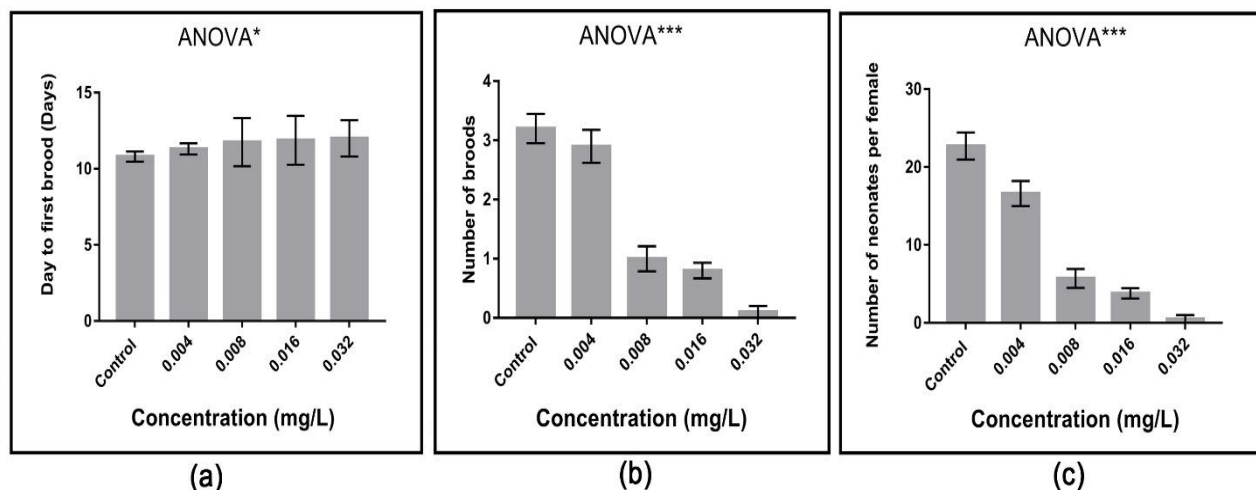


Fig. 3. Effects of thiram on reproductive maturity (a), on number of brood (b) and on total neonates produced by *D. magna* after 21 days of exposure.

Clear concentration-response relationships for the total number of neonates per surviving female were observed. A significant decrease has been observed in mean number of young per female and mean brood

size of *D. magna* exposed to concentration higher than 0.011 mg/L fenitrothion (Ferrando *et al.*, 1995). Similar effects on reproduction were described for *D. magna* exposed to sublethal levels of endosulfan and

methylparathion, a reduction in total young per female, number of broods and number of days to the first reproduction (Fernandez-Casalderrey et al., 1995). A decline in the total number of young per female, mean brood size and number of broods was also demonstrated when *D. galeata mendotae* was exposed to fenvalerate, but no observed effect in the number of days to the first reproduction (Day and Kaushik, 1997). Similar effects on reproduction were observed on *D. magna* exposed to sublethal levels of DCA, when observing an increase in the day of the first production of young (Crossland and Hillaby, 1985). It is well known that fecundity is the most sensitive trait to toxicity in the *D. similis* organism, which may be triggered to lower fertility rate under unfavorable environmental conditions (Toumi et al., 2013); (Crossland and Hillaby, 1985) and (Ebert, 2011). Villarroel et al. (2003) also found that the number of neonates per female was the most responsive parameter of the effect of propanil on daphnids when IC₅₀ was calculated. However, sodium bromide, 3,4-dichloroaniline and propanil affect the eggs in the brood pouch (Baird et al., 1991); (Pereira et al., 2007). A direct poisoning of eggs in the brood pouch phenomena could explain our results. Moreover, a significant energy proportion is allocated to the detoxification process set up by the organism and to

the physiological damage caused by the pesticides presence, thus leading to a reduction in the available energy for growth, reproduction and acquisition of food resources, which could potentially influence the survival chances (Leblanc and McLachlan, 1999). It is not surprising that parameters related to reproduction (i.e. number of neonates per live adult and the number of cumulative molts) were associated because neonates are liberated from the brood pouch few hours before molting (Toumi et al., 2013).

Reduction, in body length could explain our results, cause a decrease in fecundity of the daphnids because the reduced body size leads to the decrease of brood chamber and consequently limits the accommodation of the eggs.^[31] According to our results, thiram could cause lethal and sub-lethal effects on daphnids.

Acetylcholinesterase activity (AChE)

Figure 4 illustrates the effects of different thiram concentrations on acetylcholinesterase activity (AChE). We note a significant dose-dependent AChE activity decrease for treated daphnids compared to controls. In fact, the highest enzymatic activity 0.570 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mgP}$ in control of organisms decrease by half 0.217 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mgP}$ (0.05mg/L) reaches 0.118 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mgP}$ for 0.5mg/L.

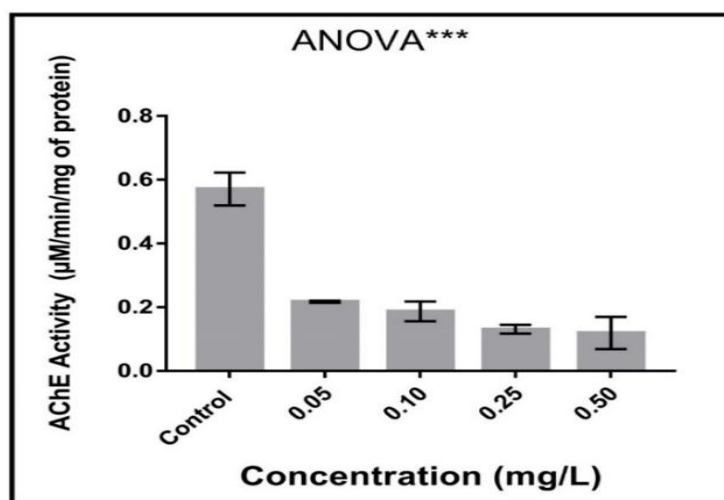


Fig. 4. Variation in acetylcholinesterase activity of *Daphnia magna* after 24h of thiram exposure.

Cladocerans have a primitive neural system and/or neurological responsive mechanism, including AChE that seems to be responsive inhibited to a multiplicity of contaminants. Pesticides especially organophosphate pesticides and carbamates are known to be the main contaminants in aquatic environments and are mostly neurotoxic inhibiting acetylcholinesterase (AChE) activity.

To our knowledge, there are no studies that tested the effect of thiram on *Daphnia magna* AChE activity. In our study, a decrease of AChE was observed suggesting a neurotoxic action of thiram on non-target organisms such as daphnids in our case. This neurotoxicity could be directly responsible for the

individuals immobility exposed to different xenobiotics concentrations. This relationship between the AChE inhibitions of *D. magna* was shown after an exposure to Parathion and Dichloroys (Sturm, and Hansen, 1999). Intermediate effects were found for the thiram to fish and are often considered to be neurotoxic, which were only mildly inhibiting to AChE (Olson and Christensen, 1980). In addition, female rats fed the high level of thiram developed hind limb ataxia or paralysis (Lee and Peters, 1980). AChE activity inhibition resulted in unregulated nerve ending activation and paralysis in organisms (Casida, 1964) which could induce the loss of nerve conduction ability, and then cause hyperactivity, loss of

coordination, convulsions, paralysis and other kinds of behavioral changes. All of these behavior disorders could bring about the stepwise behavioral response of organisms. The obtained results indicate that inhibition caused by thiram occurred at a concentration of 0,05 mg/L. Our results are in line with previously published data, namely those reported by Najimi *et al.* (1997) who described a significant cholinesterasic inhibition in gills of the seawater mussel species after acetaminophen acute exposure. In fact, some controversies exist regarding the degree of inhibition of AChE activity and its relation to the death of an organism. Some studies reported that AChE inhibition after exposure to lethal concentrations of anticholinesterasic compounds usually ranges from 70 % to 100 % (Barata *et al.*, 2001). A study established definitely the link between oxidations and cholinesterasic inhibition, by making clear that oxidant conditions were able to alter the conformational status of acetylcholinesterase of *Torpedo californica*, with obvious deleterious effects in its hydrolytic capabilities (Weiner *et al.*, 1994); (Oliveira *et al.*, 2015). Despite its undisputable ecological relevance, it is fundamental to increase the body of knowledge concerning the relation between neurotoxicity, and the pro-oxidative pathway, which seems to occur for environmental pollutants, which may have a potent but unsuspected neurotoxic effect, including thiram. The degrees of immobility of *D. magna* treated with different concentrations of thiram in standard 24h-48h acute toxicity tests see (Fig.1). There was a direct linkage of the biomarker to immobility of *D. magna* in our study. While immobility of *D. magna* was proportional to the concentration of the tested chemical in a dose-response manner, AChE activities changes were dependent on the tested concentration; this phenomenon is characterized as a dose-response with inhibition at low doses. Variations in the relationship between IC50-24h (related to AChE inhibition) and EC50-24h (related to immobility) in *D. magna* have been observed after parathion, dichlorvos and aldicarb exposure (Sturm and Hansen, 1999). Discrepancies could also be due to various factors such as genetic heterogeneity, diverse stocks compounds tested, and number of the brood or exposure medium, which could influence the EC50-48h and AChE specific activity variations as it was shown by Toumi *et al.* (2015) after Malathion exposure with the three strains of *D. magna*.

CONCLUSIONS

The aim of this study was to investigate on several toxic effects of thiram using an aquatic bio-monitoring method by toxicity assays on a bioindicator *Daphnia magna*. For achieving our object, acute and chronic tests have been performed for demonstrating harmful effects: immobilization, decrease of survive, longevity and number of molt. These experiments confirmed that the productivity was affected; thiram delays the maturity by affecting the day to first brood, the fertility by decreasing number of broods and total neonates produced. The findings enhance our understanding that these damages should be seriously considered, because

the use of AChE activity as biomarker proves neurotoxicity effects of thiram. Moreover, the results could classify thiram in the range of environmental stressor. This work has opened up several questions that need of further investigations in the future studies about the oxidative stress of thiram on *Daphnia magna* and more other freshwater species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors expand their considerable thanks to the Laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba, for giving all the necessary chemical and biological materials used in this study. We would like to thank Dr. BENBOURAS Mouhammed Amine and Ms. DJAIDJA Asma for their valuable comments, which helped to improve the quality of the paper, especially for the contribution in the linguistic parts.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Conceptualization: C. Belaid, I. Sbartai; Methodology: C. Belaid; Data collection: C. Belaid; Data validation: I. Sbartai; Data processing: C. Belaid; Writing—original draft preparation: C. Belaid I. Sbartai; Writing—review and editing: C. Belaid, I. Sbartai.

FUNDING

This research received no external funding.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no any competing financial, professional or personal interests from other parties.

REFERENCES

- Abbott W S, A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, 18, 265-267, 1925.
- Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto J C, García-Río L, The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 123, 247-260, 2008.
- Baird D J, Barber I, Bradley M, Soares, A M, Calow P, A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, 257-265, 1991.
- Barata C, Baird D J, Soares A M V M, Guilhermino L, Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49, 155-163, 2001.
- Casida J E, Esterase Inhibitors as Pesticides: Because of favorable biological properties they are displacing other types of established compounds. *Science*, 146, 1011-1017, 1964.
- Chen L, Fu X E, Zhang G, Zeng Y, Ren Z, Influences of Temperature, pH and Turbidity on the Behavioral Responses of *Daphnia magna* and Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) in the

- Biomonitor. Procedia Environmental Sciences, 13, 80-86, 2012.
- Chevalier J, Grote M, Keller M, Pandard P, Cachot J, A new multi-cell exposure system for continuous tracking of *Daphnia* behavior for toxicity assessments. *J Environ Anal Toxicol*, 5, 2161-0525, 2014.
- Crossland N O, Hillaby J M, Fate and effects of 3, 4-dichloroaniline in the laboratory and in outdoor ponds: II. chronic toxicity to *Daphnia* SPP. and other invertebrates. *Environmental toxicology and chemistry*, 4, 489-499, 1985.
- Day K, Kaushik N K, An assessment of the chronic toxicity of the synthetic pyrethroid, fenvalerate, to *Daphnia galeata mendotae*, using life tables. *Environmental Pollution*, 44, 13-26, 1987.
- Ebert D, A genome for the environment. *Science*, 331, 539-540, 2011.
- Ellman G L, Courtney K D, Andres Jr V, Featherstone R M, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7, 88-95, 1961.
- Fernandez-Casalderrey A, Ferrando M D, Andreu-Moliner E, Chronic toxicity of methylparathion to *Daphnia magna*: Effects on survival, reproduction, and growth. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 54, 43-49, 1995.
- Ferrando M D, Sancho E, Andreu-Moliner E, Effects of lindane on *Daphnia magna* during chronic exposure. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 30, 815-825, 1995.
- Ferrando M D, Sancho E, Andreu-Moliner E, Effects of lindane on *Daphnia magna* during chronic exposure. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 30, 815-825, 1995.
- Friberg-Jensen U, Nachman G, Christoffersen K S, Early signs of lethal effects in *Daphnia magna* (Branchiopoda, Cladocera) exposed to the insecticide cypermethrin and the fungicide azoxystrobin. *Environmental toxicology and chemistry*, 29, 2371-2378, 2010.
- International Standard Organisation ISO 10706, Water quality—Determination of Long Term Toxicity of Substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2000.
- International Standard Organisation ISO 6341, Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Switzerland: International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1996.
- Kyriakopoulou K, Anastasiadou P, Machera K, Comparative toxicities of fungicide and herbicide formulations on freshwater and marine species. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 82, 290, 2009.
- Le Q A V, Sekhon S S, Lee L, Ko J H, Min J, *Daphnia* in water quality biomonitoring-“omic” approaches. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 8, 1-6, 2016.
- Leblanc G A, Mclachlan J B, Molt-independent growth inhibition of *Daphnia magna* by a vertebrate antiandrogen. *Environmental toxicology and chemistry*, 18, 1450-1455, 1999.
- Lee C C, Peters P J, Neurotoxicity and behavioral effects of thiram in rats. *Environmental health perspectives*, 17, 35-43, 1976.
- Lee J, Ji K, Kim J, Park C, Lim K H, Yoon T H, Choi K, Acute toxicity of two CdSe/ZnSe quantum dots with different surface coating in *Daphnia magna* under various light conditions. *Environmental toxicology*, 25, 593-600, 2010.
- Li L, Zheng B, Liu L, Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Procedia environmental sciences*, 2, 1510-1524, 2010.
- Manar R, Bessi H, Vasseur P, Reproductive effects and bioaccumulation of chlordane in *Daphnia magna*. *Environmental toxicology and chemistry*, 28, 2150-2159, 2009.
- Metcalfe J L, Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environmental pollution*, 60, 101-139, 1989.
- Najimi S, Bouhaimi A, Daubeze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne J F, Moukrim A, Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 901-908, 1997.
- Neves M, Castro B B, Vidal T, Vieira R, Marques J C, Coutinho J A P, Gonçalves A M M, Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecological indicators*, 53, 220-230, 2015.
- Offem B O, Ayotunde E O, Toxicity of lead to freshwater invertebrates (Water fleas; *Daphnia magna* and *Cyclop* sp) in fish ponds in a tropical floodplain. *Water, air, and soil pollution*, 192, 39-46, 2008.
- Okamoto A, Yamamuro M, Tatarazako N, Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology*, 35, 824-830, 2015.
- Oliveira L L, Antunes S C, Gonçalves F, Rocha O, Nunes B, Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 123-131, 2015.
- Olson D L, Christensen G M, Effects of water pollutants and other chemicals on fish

- acetylcholinesterase (in vitro). Environmental Research, 21, 327-335, 1980.
- Pereir J L, Mendes C D, Gonçalves F, Short-and long-term responses of *Daphnia* spp. to propanil exposures in distinct food supply scenarios. Ecotoxicology and environmental safety, 68, 386-396, 2007.
- Pereira J L, Mendes C D, Gonçalves F, Short-and long-term responses of *Daphnia* spp. to propanil exposures in distinct food supply scenarios. Ecotoxicology and environmental safety, 68, 386-396, 2007.
- Sturm A, Hansen P D, Altered Cholinesterase and Monooxygenase Levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* Exposed to Environmental Pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 42, 9-15, 1999.
- Sturm A, Hansen P D, Altered Cholinesterase and Monooxygenase Levels in *Daphnia ma*; 127 *Chironomus riparius* Exposed to Environmental Pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 42, 9-15, 1999.
- Toumi H, Boumaiza M, Millet M, Radetski C M, Felten V, Féraud J F, Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure?. Chemosphere, 120, 351-356, 2015.
- Toumi H, Boumaiza M, Millet M, Radetski C M, Felten V, Fouque C, Féraud J F, Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). Science of the total Environment, 458, 47-53, 2013.
- Van Leeuwen C J, Maas-Diepeveen J L, Niebeek G, Vergouw W H A, Griffioen P S, Luijken M W, Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. I. Short-term toxicity tests. Aquatic toxicology, 7, 145-164, 1985.
- Villarroel M J, Sancho E, Ferrando M D, Andreu E, Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. Chemosphere, 53, 857-864, 2003.
- Weiner L, Kreimer D, Roth E, Silman I, Oxidative stress transforms acetylcholinesterase to a molten globule-like state. Biochemical and biophysical research communications, 198, 915-922, 1994.
- Winner R W, A comparison of body length, brood size and longevity as indices of chronic copper and zinc stresses in *Daphnia magna*. Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological, 26, 33-37, 1981.