



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi -Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie Appliquée



MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Science biologique

Option: Toxicologie: xénobiotique et risque toxicologique

Thème:

Effet du carbofuran sur l'activité enzymatique chez un poisson téléostéen *Gambusia affinis*

Présenté par:

HANNACHI Rabab et GOUSMI Radia

Devant le jury:

M ^{me} . BOUKAZOULA Fatima	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Président
M ^{me} . ROUACHDIA Roukaya	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Rapporteur
M ^{lle} . BEN AMMARA Amel	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Examineur

Date de soutenance: 29/05/2016.

Note :

Mention :



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



ملخص

تتركز هذه الدراسة التحريبية على نوع من المبيدات الحشرية "carbofuran" من عائلة "carbamate" والمتواجد غالبا في الأوساط المائية المجاورة للمناطق الزراعية, بهدف تقييم تأثيره على نوع من أنواع أسماك المياه العذبة "*Gambusiaaffinis*". ويعتمد العمل على مبدأ إماهة تراكيز مختلفة من هذا المبيد 5,75 (ملغ / ل و 7,66 ملغ / ل) في عدة مجموعات.

أجريت فحوصات بيوكيميائية أنزيمية (AChE, GPx). وأظهرت النتائج المحصل عليها أن نسبة المؤشرات الحيوية تختلف تبعا للجرعة و مدة العلاج (7, 15, 40 يوم), حيث أن تعرض هذه الأسماك إلى جرعتين مختلفتين من هذا المبيد أدى إلى تنشيط نظام إزالة السموم إنطلاقا من اليوم السابع, وذلك بالزيادة في معدل GPx , و إنخفاض نسبة الاستيل كولين استيراز للأسماك المعالجة مقارنة بالشواهد, و يظهر تحليل المعطيات أن "carbofuran" يسبب زيادة في تشكل النويات.

الكلمات الدالة: المؤشرات الحيوية، كربوفيران، نظام إزالة السموم، البنكرياس الكبدي، انزيمات، GPx، AChE

Résumé

Notre étude expérimentale, s'est intéressée au carbofuran, un insecticide de la famille de carbamates, fréquemment rencontré dans les écosystèmes aquatiques situés dans les zones agricoles, et vise à évaluer l'impact de ce pesticide sur des poissons d'eau douce *Gambusia affinis*.

Notre travail s'est basé sur la dilution de différentes doses de ce pesticide (5,75 mg/l et 7,66 mg/l) dans l'eau de divers lots. Des dosages enzymatiques (GPx et AchE) sont réalisés, avec les tests micronoyaux.

Les résultats des dosages montrent que les teneurs des biomarqueurs varient en fonction de la dose et la durée du traitement (7, 14, et 40 jours), l'exposition des poissons aux deux doses de ce polluant induit une activation du système de détoxification qui se traduit, à partir du 7^{ème} jour d'exposition.

1. une augmentation très significative et hautement significative de glutathion peroxydase (GPx) accompagné par le déclenchement d'un système de détoxification.
2. L'activité de l'AchE au niveau du système nerveux central montre une baisse très significative et hautement significative respectivement à 15j et 40j d'exposition à la dose de 7,66mg/l de carbofuran.
3. Une augmentation de formation des micronoyaux.

Mots clés: *Gambusia affinis*, le carbofuran, biomarqueurs, hépatopancréas, système de détoxification, AchE, GPx.

Abstract

This trial study concentrates on the type of pesticides carbofuran from a family carbamate that often inhabits in near water marshes next to agricultural areas. In order to assess its impact on a type of freshwater fish *Gambusia affinis*. And based on the principle of different hydration focus of this pesticide (5,75 mg/l, 7,66 mg/l) in groups.

Our work is based on dilution of the different doses of the pesticide (5.75mg / l and 7.66 mg / l) in water from various lots. tests enzymatic (GPx and AchE) and tests of micronoyaux.

The results showed that the percentage of biomarkers vary depending on the dose and duration of treatment (7, 14, 21 and 40 days), as the exposure of these fish to two different doses from this pesticide leads to detoxification system activation from the seventh day, and the increase in the rate.

1. When adult females are exposed to 7, 66 and 5,75mg/l of carbofuran induced hepatic level, a decrease of amount of GPx.
2. The activity of AchE at the level of central nervous system shows a very significant decrease and highly significant to 15 days, and 40 days of exposure to the amount of 7,66 mg/l of carbofuran
3. Highly formation of micronucleus.

Keywords: *Gambusia affinis*, the carbofuran, hepatopancreas, biomarkers, detoxification system, AchE, GPx.



Remerciement

*Premièrement et dernièrement, tout le remerciement à Dieu
qui nous a donné la patience, le courage
Et la force pour réaliser ce travail.*

*Nous remercions Mme Rouachdia Roukaya, notre
encadreuse de mémoire qui nous a permis de réaliser ce
travail dans les meilleures conditions ... Merci aussi pour
nous avoir fait partager votre expérience et votre culture
scientifique et pour votre confiance. Travailler sous votre
direction a été un plaisir et un honneur.*

Nous souhaitons remercier les membres de jury :

*À commencer par Mme Boukazoula Fatima, Nous sommes
très honorés de vous compter parmi les membres de jury et
pour avoir bien voulu juger ce travail.*

*À Mlle Ben Ammara Amel, d'avoir examiné notre travail
et pour son aide et sa gentillesse.*

*Notre sincères remerciements à l'ensemble des enseignants
qui ont contribué à notre formation au cours de mes
années universitaires surtout Mr Lahmer*

*Merci à tout les personnes qui nous ont aidés à arrive à
cette fin.*



Dédicace

Je dédie ce modeste travail en premier lieu

A

Mes parents, la lumière de mes yeux, qui ont été tout le temps présent à ma coté dans les moments assez difficiles parfois, mes souhaits de Bonheur et de bonne santé.

A

Mes frère et mes sœurs surtout Dalila

A

Ma famille

A

Mes Amies Radia, Sonia, Amna mes yeux, Amel.

Sans oublier tous ceux qui je connais, que j'aime et que j'apprécie énormément leur aide et leurs soutiens, que je ne pourrai citer.

RABAB





Dédicace

Grace à dieu, le tout puissant; j'ai accomplie ce travail dans l'effort et l'abnégation.

A tous ceux qui m'ont consacré temps, patience et conseils surtout dans le moment difficile.

la plus chère à mon cœur, la bougie qui a éclairé ma vie et qui a contribué à ma réussite, qui me toujours aidée avec sa d'Oaa ses conseils précieuses et j'espère rendre tout ce qu'elle a fait pour moi. Merci de tout cœur ma chère mère (Rabaa), que dieu vous accorde santé et longue vie.

Le plus grand amour dans mon cœur, à la prunelle de mes yeux, le meilleur guide dans ma vie et qui n'a jamais cessé de m'encourager, le meilleur père (lekhmissi).

Et je dédie ce travail spécialement à Mes chères sœurs la source du sourire dans ma vie qui me donne l'espoir de vivre et de réussite de mes études" : Fatma, Chadia, Khaoula, Sayeda, Salma, Amoula, Sihem, Yasmine M et G, Meriem et Zaineb, Samira, Naima, Zouhaira, Rabab, Amna, Amel, Salma.

A mes chers frères: Nounou, Mahdi, Dahmen, Mnaour, Abdou, Yacine.

A toute la famille surtout mes chères tantes : Zina, Samira, Heddi, que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santés, bonheur et longue vie.

A mes ancres, tout la famille : Gousmi, Rouba et Aziri.

Sans oublier mes collègues de la promotion toxicologie: Linda, Kawther, Ghzala, Karima, Madiha, Abd el krim et abdou.



RADIA

Liste des figures

01	Dissipation des pesticides et le taux de transfert vers le milieu aquatique (10)	05
02	les différents types de lésions primaires de l'ADN (42)	16
03	la formation des micronoyaux	18
04	Morphologie général de <i>Gambusia affinis</i> (52)	21
05	Le dimorphisme sexuel de <i>Gambusia affinis</i> (56)	21
06	Cycle Vital de la gambusie (64)	23
07	Présentation du site d'échantillonnage	24
08	Elevage de <i>Gambusia affinis</i> au laboratoire	24
09	Protocole expérimental	26
10	prélèvement des organes de <i>Gambusia affinis</i>	27
11	dissection des branchies	28
12	prélèvement d'hépatopancreas	29
13	dosage du GPx et protéines totale (71)	30
14	dosage de l'AChE (72)	32
15	observation microscopiques des micronoyaux (x 100)	34
16	Variation de l'activité enzymatique du GPx chez <i>G.affinis</i> traité par le carbofuran (DL50/4, DL50/3).	35
17	Variations de l'activité enzymatique de l' AChE chez <i>G.affinis</i> traité par le carbofuran (DL50/4, DL50/3) durant 7, 15 et 40 jours.	36

Liste des tableaux

01	Les pesticides les plus utilisés en Algérie	07
02	Les caractéristiques physico-chimiques du carbofuran	08
03	Principaux métabolites du carbofuran dans la bile et l'urine	09
04	Position systématique	20
05	variations du nombre des micronoyaux chez <i>Gambusia affinis</i> traité par deux doses du carbofuran (5,75 mg/l et 7,66 mg/l) durant 7, 15 et 40 jours.	34
06	Variation de l'activité enzymatique du GPx chez <i>G.affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7 ,66 et 5,75 mg /l.	35
07	Variation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase chez <i>G.affinis</i> traité par le carbofuran (DL50/4, DL50/3) durant 7, 15 et 40J.	36

Liste d'abréviation

%	pourcentage
AchE	Acétylcholinestérase
ADN	L'acide désoxyribonucléique
AGPI	acides gras poly-insaturés
ASCh	Substrat l'acétylthiocholine
BBC	bleu brillant de coomassie G250
BSA	Albumine de sérum de boeuf
C°	Degré Celsius
Cm	Centimètre
CYP	cytochrome p450
DL50	Dose létale de 50% de la population
Do	Densité optique
DTNB	Acide 5,5'-dithiol-bis-2 nitrobenzoïque.
EDTA	acide éthylène diamine tétra
EOA	d'espèces oxygénées activées
<i>G.affinis</i>	<i>Gambusia affinis</i>
GPx	Glutathion peroxydase
GS	Radical thiyle,
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
h	heur
H₂O	Eau
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HcL	Hydrogène chloride
HOONO	l'anion superoxyde le peroxynitrite
HSP	heat shock protein
J	jour
m	moyenne
M	mole
mg	milligramme

min	minute
ml	millilitre
mM	milli mole
Na Cl	chloride sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NO•	Le monoxyde d'azote radicalaire
OP	Organophosphoré
ROS	Espèces réactives oxygénées (Reactive oxygen species)
SCh	Substrat la thiocholine
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Tri chloro acétique
trs	tours
µg	microgramme
µl	microlitre

Table de matière

titre	page
ملخص	
Résumé	
Abstract	
Remerciements	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviation	
Table de matière	
Introduction	
I. Les pesticides	04
I.1. Généralité	04
I.1.1. Définition	04
I.1.2. Classification	04
I.1.3. Transfert de pesticide vers le milieu aquatique	05
I.1.4. Effet du pesticide sur l'environnement	06
I.1.5. La lutte antiparasitaire et l'usage agricole en Algérie	06
I.2. Le carbofuran	07
I.2.1 Présentation du carbofuran	07
I.2.2. Définition	07
I.2.3. Propriétés physicochimiques	08
I.2.4. Toxicocénitique	08
I.2.5. Données toxicologiques	09
I.2.6. Mode d'action	11
I.3. Le stress oxydatif	11
I.3.1. Définition	11
I.3.2. Principales cibles biologiques des EOA	12
I.4. Les Systèmes antioxydants	13

I.4.1. Définition	13
I.4.2. Quelques systèmes de défenses enzymatiques	14
I.5. La génotoxicité	14
I.5.1. Mode d'action et effets des génotoxiques	14
I.5.2. Les génotoxiques environnementaux	17
I.5.3. L'étude de la génotoxicité	17
II. Matériel et méthodes	20
II.1. Présentation du matériel biologique	20
II.1.1. Morphologie et anatomie	21
II.1.2. Comportement, reproduction et écologie	22
II.1.3. Présentation du site d'échantillonnage	23
II.1.4. Elevage des poissons	24
II. 2. Présentation du matériel chimique	25
II.2.1. Le carbofuran	25
II.2.2. Intérêt de la molécule	25
II.3. Le traitement	25
II.4. dissection des organes et dosages	26
II. 4.1. Prélèvement des branchies et leur dosage	27
II.4.2. Prélèvement d'hépatopancréas et leur dosage	28
II.4.3. Prélèvement du SN et le dosage d'acétyl choline estérase	30
II.5. Analyse statistique	32
III. 1. Résultats	34
III.1.1. Effet du carbofuran sur la formation des micronoyaux	34
III.1. 2. Effet du carbofuran sur l'activité enzymatique du GPx:	35
III.1. 3. Effet du carbofuran sur l'activité d'AchE :	36
III. 2. Discussions	37
III. 2. 1. Les effets du carbofuran sur l'activité de GPx chez <i>Gambusia</i>	37
III. 2. 2. Les effets du carbofuran sur l'activité de l'AchE chez <i>Gambusia affinis</i>	38
III. 2 .3. Les effets génotoxiques du carbofuran	39

Conclusion	42
Références bibliographiques	
Annexes	

INTRODUCTION

Introduction

Au cours du siècle dernier, les activités anthropiques, poussées par les avancées technologiques, ont conduit à des augmentations des niveaux de contaminants organiques dans l'environnement. La pollution de l'environnement est devenue en quelques décennies un des problèmes majeurs qui conditionnent l'avenir de la civilisation technologique moderne. L'agriculture en est une source importante en raison de l'usage généralisé de pesticides pour protéger les cultures et améliorer leur rendement. En effet, depuis les années 40, l'agriculture s'est intensifiée et les pratiques ont profondément changé. En particulier, la plupart des usages de pesticides inorganiques (cuivre, arsenic, fer, soufre, acides) ont progressivement été remplacés par des pesticides organiques. Ces derniers regroupent de nombreuses familles chimiques, aux comportements variés aussi bien dans leur action que dans le devenir environnemental.(1)

Cependant les pesticides peuvent être très nocifs, ils peuvent endommager l'environnement et s'accumuler dans les écosystèmes; comme ils possèdent le potentiel de causer toute une gamme d'effets toxiques envers la santé humaine, dépendamment de la dose appliquée, parmi lesquels le cancer, les dysfonctions des systèmes reproductifs, des systèmes endocriniens et immunitaires, les malformations congénitales, les insecticides carbamates sont des insecticides à large spectre utilisés couramment depuis leur mise au point dans les années cinquante. Ce sont des esters de l'acide carbamique généralement non hydrosolubles; cependant certaines molécules (aldicarbe, carbofurane) sont aliphatiques, ce qui leur confère un caractère hydrosoluble plus marqué et des propriétés systémiques. Ces insecticides sont généralement doués d'une toxicité marquée envers les Vertébrés et les Hyménoptères auxiliaires comme l'abeille.(2)

Le carbofuran est une molécule appartient à la famille des carbamates(3), peu stable dans le sol, mobile et soluble dans l'eau, est susceptible de migrer rapidement vers les eaux superficielles après application (4). Cette propriété peut causer des risques d'intoxication chez un grand nombre d'organismes aquatiques non-cibles(5).

Telle que les poissons qui sont utilisés comme indicateurs de la surveillance biologique pour évaluer la qualité et les niveaux de contamination des milieux aquatiques. (6)

Introduction

Les écosystèmes aquatiques sont menacés par le rejet dans l'environnement de nombreux polluants dont la toxicité souvent mal définie affecte les organismes marins qui y vivent et qui peuvent avoir un intérêt bénéfique pour l'homme tel que *Gambusia affinis* utilisé dans la lutte biologique contre les moustiques. Ce poisson est considéré comme un matériel médical et sert pour la démoustication (procédé de lutte biologique) surtout dans les régions menacées de Malaria. Pour cela il est impératif de prendre conscience de la nécessité de protéger cette espèce tout comme les autres organismes vivants. (6)

De nombreux chercheurs ont utilisé *Gambusia affinis* dans des travaux réalisés sur le plan cytologique (Russo *et al.*, 1999), biologique (Nakamura *et al.*, 1998; Sepencer *et al.*, 1999; Koya et Kamia, 2000; Roya *et al.*, 2003), endocrinologique (Drysdal et Bortone, 1989; Bortone et David, 1994; Rosa-Moliner *et al.*, 1998; Tolar *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2005), écologique et toxicologique (Orlando *et al.*, 2002; Sivagnaname et Kalyanasundaram, 2004).

En Algérie *Gambusia affinis* a fait l'objet de différentes études sur la physiologie et la reproduction. Ainsi Ouali (1997) a observé l'influence de quelques facteurs internes et externes sur les principales phases du cycle de reproduction, une étude sur l'écophysiologie de la reproduction a été réalisée par Drarja-Beldi (1993 et 2001); Tidjani (1997) a étudié la topographie et la structure des mécanorecepteurs. Des travaux réalisés sur la détermination de l'impact de quelques insecticides sur la reproduction et la croissance ont été réalisés par Aissaoui (1998), Soltani *et al.*, (1999), Bouzioukh (2000).

L'objectif général de cette étude est d'évaluer par une étude expérimentale les effets d'exemple d'insecticide de la famille des carbamates grâce à l'utilisation d'un modèle bioindicateur présent dans les écosystèmes aquatiques, *Gambusia affinis* un poisson prédateur de larves de moustiques.

Plusieurs aspects ont été testés :

- Test micronoyaux
- L'activité du GPx (glutathion peroxydase)
- La neurotoxicité par l'activité d'AchE (l'acétyle choline estérase)

CHAPITRE I

I. Les pesticides

I.1. Généralité

Les produits phytosanitaires contribuent depuis de nombreuses années à l'amélioration de la lutte contre les espèces nuisibles. Jusqu'au début des années 1980, leur présence dans les eaux était attribuée à des accidents ponctuels liés aux cycles industriels de fabrication, ou à des négligences de manipulation à l'exception de molécules comme le DDT. Désormais la contamination des eaux par les produits phytosanitaires est un fait, de nombreuses matières actives sont détectées à des concentrations très variables dans l'espace et dans le temps qui peuvent atteindre des valeurs critiques pour la santé des écosystèmes et les ressources en eau potable. Les résultats acquis en zone estuarienne et côtière font état d'une contamination des trois façades maritimes françaises (7)

I.1.1. Définition

Le terme "pesticides" est une appellation générique couvrant toutes les substances ou produits qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications. La substance ou le microorganisme qui détruit ou empêche les organismes nuisibles de s'installer sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux est dénommée substance active (anciennement dénommée matière active), à laquelle sont associés dans la préparation un certain nombre de « formulant » (solvants, anti-mousses, ...) qui la rendent utilisable par l'agriculteur (8).

I.1.2. Classification

Selon leur mode d'action

• Les herbicides

Destinés à limiter l'installation d'espèces végétales adventices. Peuvent être sélectifs ou totaux. Les familles de substances les plus importantes sont les acides aminophosphoriques (glyphosate), les urées (diuron, isoproturon), les triazines (atrazine, simazine). En France, plus de 300 spécialités contenant du glyphosate sont commercialisées.

• Les insecticides

Destinés à tuer les insectes ou à empêcher le déroulement normal de leur cycle de vie. Les familles les plus rencontrées sont les organophosphorés (malathion), les carbamates insecticides (carbaxyl), les pyréthrinoïdes (deltaméthrine) et les organochlorés (endosulfan).

• Les fongicides

Destinés à éliminer les champignons. On distingue trois modes d'action différents. Les multisites s'attaquent aux spores des champignons. Ils sont donc préventifs. Les unisites attaquent la perméabilité membranaire des champignons. Les antimitotiques bloquent la division cellulaire. La famille la plus présente est celle des carbamates.

• Les molluscicides et autres pesticides

Les molluscicides sont destinés à éliminer les escargots et les limaces. Ils sont épandus essentiellement sous forme de granulés. Les rotenticides agissent contre les rongeurs. Les anticoagulants représentent 85% du marché. Quelques produits de gazage sont encore utilisés. Les nématicides agissent sur les nématodes. (9)

I.1.3. Transfert de pesticide vers le milieu aquatique

Les pesticides peuvent être entraînés vers les eaux superficielles sous différentes formes, par des processus de diffusion, de désorption et de dissolution mais également par des mécanismes dus à l'érosion et l'entraînement des particules ou sont fixés les contaminants. Ces phénomènes peuvent potentiellement rendre la présence de pesticides effective toute l'année ou provoquer un passage rapide vers l'eau provoquant un pic de pollution à la première pluie suivant l'épandage. Le transfert par un vecteur aqueux est particulièrement efficace. (10) ont relaté la part de chaque voie de transfert comme exposé dans la figure 01.

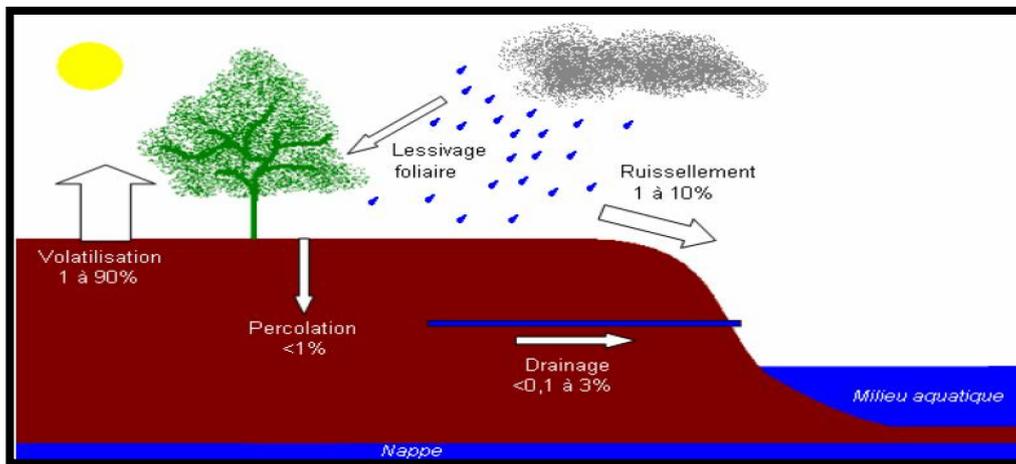


Figure 01: Dissipation des pesticides et le taux de transfert vers le milieu aquatique (10)

Une fois présent dans le milieu aquatique, les contaminants peuvent subir un transport horizontal de l'amont vers l'aval, emportés par les courants. Les eaux de ruissellement récupérées par les ruisseaux apportent les molécules issues du bassin versant aux rivières, étangs, lacs et océans. Ce transport amont / aval peut se faire, tout comme les eaux de ruissellement, sous formes dissoutes ou particulaire, selon les propriétés des molécules. Mais,

de par leur vitesse de courant plus importante, les ruisseaux et rivières peuvent, en plus de véhiculer les contaminants solubilisés ou fixés aux particules en suspension, charrier des particules de diamètres plus importants. (10)

La problématique des pesticides comme polluants concentrés et entraînés par les eaux de pluie et de ruissellement vers les cours d'eau et les nappes phréatiques est approfondie car les conséquences peuvent être majeures à la fois sur la santé de l'homme mais également sur la faune et la flore en provoquant des déséquilibres et des accumulations de toxiques tout le long de la chaîne alimentaire.(11)

I.1.4. Effet du pesticide sur l'environnement

Même si la plupart des traitements sont appliqués sur les parties aériennes des plantes, une bonne part du produit atteint toujours le sol, où vivent des bactéries, des champignons, des algues, des vers de terre et des insectes, entre autres(12). On doit faire particulièrement attention aux effets nocifs des pesticides sur la microflore du sol, laquelle est essentielle au maintien de la fertilité. De très nombreux travaux ont montré que les traitements faits correctement ont un effet limité sur le métabolisme microbien du sol, car les espèces les plus sensibles peuvent être remplacées par de plus résistantes (13).

Un changement qui peut n'être pas dépourvu de conséquences néfastes à long terme, à cause des espèces phytopathogènes qui se trouvent parmi cette microflore(14).

Les pesticides peuvent provoquer des dégâts importants dans la faune aquatique, les mortalités de poissons étant les plus spectaculaires.(15) estiment qu'entre 1977 et 1987, aux États-Unis, 6 à 14 millions de poissons sont morts, chaque année, à cause des pesticides. Les épreuves de toxicité aquatique portent sur les algues, les crustacés (daphnies) et les poissons, représentant 3 niveaux trophiques majeurs. On dispose de données sur la toxicité aquatique pour la plupart des matières actives (15).

I.1.5. La lutte antiparasitaire et l'usage agricole en Algérie

En Algérie, la fabrication des pesticides a été assurée par des entités autonomes de gestion des pesticides: Asmidal, Moubydal. Mais avec l'économie de marché, plusieurs entreprises se sont spécialisées dans l'importation des insecticides et divers produits apparentés (16).Les pesticides les plus utilisés par les agriculteurs dans notre pays sont le méthyle parathion, le sandofane, le Ripos, la Deltametrine et le Syperas, dans l'enquête réalisée par Y. Dahoum et K. Moussaoui (2001) qui a permis d'établir un état des lieux sur l'utilisation des pesticides par des agriculteurs et auprès des revendeurs.

Les résultats ont montré que sur 403 pesticides homologués en Algérie une quarantaine de produits phytosanitaires sont utilisés par les agriculteurs dont six sont très

largement utilisés. Selon le Cadastre National des déchets dangereux, il existe environ 2360 tonnes de pesticides périmés répartis sur sites détenus majoritairement par les anciennes Entreprises Nationales et Usines de produits phytosanitaires (ONAPSA, ASMIDAL...) (17).

Tableau 01. Les pesticides les plus utilisés en Algérie(17)

Nom commercial	Type	Matière active
Probinèbe	Fongicide	Probinèbe
Manèbe	Fongicide	Manèbe
Lannate	Insecticide	Méthomyl
Karaté	Insecticide	Lambda-cyhalathrine
Decis	Insecticide	Delthamitrine
2,4 D	Herbicide	acide dichloro-2,4 phenoxyacétique

I.2. Le carbofuran

I.2.1 Présentation du carbofuran

Le carbofuran est utilisé pour le traitement des semences dans le cadre de différentes cultures: cultures légumières, maïs, soja, arbres, arbustes d'ornement, cultures florales, fraisier, et d'autres produits alimentaires. (17)

I.2.2. Définition

Le carbofuran ($C_{12}H_{15}NO_3$) est un pesticide (Insecticide, Nematicide, Acaricide) à large spectre de la famille des carbamates. C'est un métabolite du carbosulfan. Il a été introduit en 1965 (18) et il a été homologué pour la première fois en 1969 aux USA. Il est utilisé en agriculture pour lutter contre une grande variété d'insectes défoliateurs et foreurs qui attaquent de nombreuses cultures fruitières, maraichères, (19) et la pomme de terre, le maïs, le soja, (20) la banane, le café, la betterave sucrière, et le riz (21). Il est utilisé, dans les forêts en application aérienne et terrestre sous forme d'aérosol et de granulée avec des taux d'application de 0,5 à 10 pounds. (226.795 à 4535.9 gr) de matière active par hectare. (19) Il agit par contact ou par ingestion. C'est un insecticide systémique (18). Il est utilisé en combinaison avec la plupart des herbicides et fongicides excepté le propanil(21). Il est vendu sous le nom commercial de Furadan par Food Machinery Corporation (FMC corporation), le principal fabricant aux USA. Le carbofuran est également vendu sous d'autres noms commerciaux comme Carbodan, Carbosip, Chinofur, Curaterr, Furacarb, Kenafuran, Pillarfuran, Rampart, Nex, et Yaltox, (18)Crisfuran, et par Crystal Chemical Inter America(21).

I.2.3. Propriétés physicochimiques

Tableau 02: Les caractéristiques physico-chimiques du carbofuran

Propriété	Information
Nom chimique	2,3-Dihydro-2,2-diméthyl-7-benzofuranyl-N-méthylcarbamate
Structure Chimique	<p style="text-align: center;">Carbofuran</p>
Formule chimique	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃
Nature	Insecticides
Famille	Carbamate
Poids Moléculaire (g /mol)	221,3
Numéro CAS	1563-66-2
Nom Commun	Carbofuran
Odeur/Forme /Couleur	Solide cristallin blanc avec la légère odeur phénolique
Pression de vapeur	3,4 x 10 ⁻⁶ mm Hg à 25 °C
Densité à 20°C (g cm ⁻³)	1,18
Solubilité dans l'eau (g/L)	0,7 à 25 °C
Seuils Goût Odeur	NA
Facteur de bioconcentration	117 dans une espèce de poisson, ne s'attend pas à bioconcentration dans les organismes aquatiques

I.2.4. Toxicocénitique

A. Absorption

D'après une étude réalisée sur les rats par l'absorption d'une dose orale unique de 4,4 à 21 mg/kg p.c de carbofuran marquée. Le produit est rapidement absorbé par le tube digestif (22).

B. Distribution

Le produit est concentré principalement dans le foie (22).

C. Biotransformation

Il est rapidement métabolisé par hydrolyse, oxydation et conjugaison. Les principaux métabolites sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 03. Principaux métabolites du carbofuran dans la bile et l'urine(22)

Métabolites retrouvés dans la bile	Métabolites retrouvés dans l'urine
✓ Conjugués glucuronides du 3-hydroxycarbofuran (~60 %)	✓ 3-hydroxycarbofuran
✓ Carbofuranphénol	✓ 3-cétocarbofuran
✓ 3-hydroxycarbofuranphénol	✓ carbofuranphénol
✓ 3-cétocarbofuranphénol	✓ 3-hydroxycarbofuranphénol
	✓ 3-cétocarbofuranphénol (~ 51 %)

D. L'excrétion

Chez les animaux dont le canal cholédoque est accessible à partir d'une canule : le produit est éliminé dans la bile (28,5 %), l'urine (65,4 %), les fèces (0,4 %) au cours des 48 h après le traitement. Chez les animaux dont le canal cholédoque n'est accessible à partir d'une canule: le composé au noyau marqué au C¹⁴ est éliminé dans l'urine (92 %) et les fèces (3 %) au cours des 120 h après le traitement; le composé au groupement carbonyle marqué au C¹⁴ est éliminé dans l'air expiré (45 %), l'urine (38 %) et les fèces (<4 %) au cours des 32 h après le traitement (22).

I.2.5. Données toxicologiques

A. Toxicité aiguë

Le Carbofuran appartient à la classe Ib (très dangereux) de l'OMS (18). Certaines de ses formulations appartiennent à la classe I (très dangereux ou extrêmement dangereux) ou sont de la classe II (modérément dangereux). Il est extrêmement toxique par voie orale et par inhalation (la DL50 est 5 à 13 mg/kg chez le rat, 2mg/kg chez la souris). La toxicité par la voie cutanée est faible. Il est peu irritant pour les yeux et la peau. Il n'est pas un sensibilisant cutané (23). La dégradation par la chaleur peut libérer des vapeurs toxiques (19).

De tous les pesticides utilisés sur les cultures, excepté l'aldicarb et le parathion, le carbofuran a la plus forte toxicité aiguë chez l'homme (18). C'est un neurotoxique du à son activité d'inhibiteur du cholinestérase (18)(19), (20). Cette activité est de courte durée et est réversible (19). Une personne exposée à des doses supérieures à 0,25 mg·kg⁻¹ du poids corporel peut présenter des symptômes tels que: salivation, douleurs abdominales, somnolence, étourdissement, anxiété, vomissement, perte de contrôle, voire coma et arrêt

cardiaque (20). C'est un puissant perturbateur endocrinien qui peut causer une altération de la concentration de plusieurs hormones de l'homme et de l'animal même à une dose infime. (20)

B. Toxicité chronique

✓ **Effets cancérigènes, tératogène ou mutagène**

Le carbofuran n'est pas connu pour induire des effets cancérigènes de même, il n'a pas été démontré que le carbofuran est tératogène ou mutagène (18).

✓ **Effets sur la reproduction et le développement**

L'administration subchronique du carbofuran aux rats peut présenter une toxicité pour les spermatozoïdes et les testicules (23). L'exposition prolongée ou répétée au carbofuran peut causer les mêmes effets qu'une exposition aiguë (23). Il n'a pas été démontré que le carbofuran a un effet sur la reproduction chez l'homme et l'animal au niveau d'exposition prévus (19). Cependant l'ingestion de doses élevées de manière chronique endommage les testicules chez les chiens (19). Les doses de 5mg/kg/jour données aux rats et aux souris pendant deux ans ont montré des diminutions de poids, le carbofuran est connu pour induire des effets sur la reproduction et le développement (18).

✓ **Comportement et devenir du carbofuran dans l'environnement**

Le carbofuran est soluble dans l'eau, et est classé comme mobile à très mobile dans les sols sablonneux et limoneux, et modérément dans les sols argileux (19).

Au sol, sa demi-vie relative à la photolyse est de 78 jours. Il est très persistant dans les sols en condition aérobie. Sa demi-vie varie selon le pH du sol (demi-vie = 149 j à pH 7,7 et demi-vie = 321j à pH 5,7) (22). Le carbofuran se dégrade assez lentement dans les sols non stériles, neutres ou acides dans des conditions aérobies avec une demi-vie de 1 à 8 semaines. Il est plus stable dans un sol stérile et instable dans des conditions alcalines. Dans des conditions anaérobiques, le carbofuran peut prendre deux fois plus de temps avant de se dégrader (24).

Il est aussi très persistant dans l'eau en condition anaérobie où sa demi-vie est de 189 jours (22). Du fait de sa grande mobilité, le carbofuran présente un risque de contamination des eaux superficielles dans les zones sablonneuses, le carbofuran est connu pour lixivier dans le sol, et il a été trouvé dans des eaux souterraines suite à des utilisations agricoles (24).

Dans l'air, le carbofuran existe à la fois sous forme de vapeur et adsorbé sur les particules en suspension (22).

✓ Effets sur les organismes non cibles

Plusieurs sources concordantes existent sur la haute toxicité du carbofuran envers les oiseaux (19). Une seule graine peut tuer un oiseau (DL50 orale de 0,4 mg/kg poids corporel (22)).

Le carbofuran est très toxique pour les invertébrés de l'eau douce et extrêmement toxique pour les oiseaux (24). Il est modérément à très toxique chez les poissons d'eau douce (CL50 96 h = 88 à 1 990 ppb) (22). Il est extrêmement toxique chez *la Daphnie magna*, la CL50 est de 0,015 mg/l, (20), chez les algues la DL 50 est de 19,9 mg/l (20). Le carbofuran est extrêmement toxique chez les abeilles (24), avec une DL50 aiguë par contact de 0,16µg/abeille (22).

I.2.6. Mode d'action

C'est un inhibiteur de l'enzyme Acétylcholinestérase (AChE). Cette enzyme a pour effet de rendre inactive l'ACh (l'acétylcholinestérase dégrade l'acétylcholine en choline et en acide acétique). Avec le carbofuran, l'acétylcholine se fixe continuellement sur son récepteur, ce qui a pour effet d'éliminer les insectes via son action neurotoxique (25).

I.3. Le stress oxydatif

I.3.1. Définition

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires. Dans un souci de prévention, il conviendra donc de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydant chez un individu afin d'apporter les corrections nécessaires pour optimiser nos défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs induits par les EOA au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides.(26)

Le rôle des EOA est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment,

de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'EOA pour percer la paroi membranaire de l'ovule. Formés en trop grande quantité, les EOA deviennent «pathologiques» en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion.

En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies (27).

I.3.2. Principales cibles biologiques des EOA

A. L'acide désoxyribonucléique ou ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les EOA. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\text{OH}\cdot$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement. (28)

B. Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, 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 (28).

C. Les lipides membranaires

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 peroxy ($\text{ROO}\cdot$), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (28).

Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues (28).

D. Les lipoprotéines

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) (29). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les macrophages (30).

I.4. Les Systèmes antioxydants

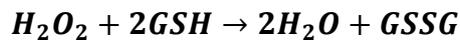
I.4.1. Définition

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 (31). Notre organisme a développé des défenses antioxydantes qui lui ont d'ailleurs permis de s'adapter à vivre dans un environnement riche en oxygène (32). C'est le système de la détoxification des agents oxydants qui est assurée par de nombreux antioxydants (33). La composition en anti-oxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires, et les mécanismes de protection sont différents dans les milieux intra- et extracellulaires. Notons dès à présent que, les systèmes de défense n'assurant pas une protection complète, l'organisme doit disposer de systèmes de réparation afin d'éliminer les molécules endommagées. (34).

I.4.2. Quelques systèmes de défenses enzymatiques

A. Glutathion peroxydase

Les peroxydases sont des enzymes capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (en particulier d'origine lipidique). En couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur. La dénomination des peroxydases dépend de la nature de ce substrat réducteur, dont chaque enzyme est spécifique (34). Deux molécules de glutathion cèdent deux H au peroxyde d'hydrogène. Les deux glutathions forment une liaison disulfure alors que le peroxyde d'hydrogène devient deux molécules d'eau (H₂O).



B. Glutathion S-Transférases

Les glutathion S-transférases (GSTs) représentent une famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés électrophiles. La fonction des GSTs la plus connue est leur activité de catalyser des réactions de conjugaison entre, le glutathion et des substances nocives pour diminuer leurs réactivités avec les macromolécules intracellulaires. Les GST complètent la fonction des glutathion peroxydases (GPx) dans la seconde ligne de défense enzymatique antioxydante, les GSTs préviennent les dommages cytotoxiques et génotoxiques causés par les composés électrophiles générés Comme produits de dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (35).

C. La catalase

La catalase est une enzyme hémique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, les érythrocytes, les hépatocytes et les reins (36).

I.5. La génotoxicité

I.5.1. Mode d'action et effets des génotoxiques

La génotoxicité, appelée également toxicité génétique, représente la capacité de certains agents physiques, chimiques ou biologiques à provoquer l'apparition de dommages à l'ADN* qui peuvent conduire à des mutations génétiques si ces lésions ne sont pas réparées. Ces agents sont qualifiés de mutagènes.(37)

On considère deux classes d'agents génotoxiques, les génotoxiques directs qui sont capables de modifier directement la structure de l'ADN, et ceux que l'on appelle des progénotoxiques qui nécessitent une activation métabolique préalable avant de pouvoir exercer leurs effets génotoxiques. On parle dans ce cas de processus de bioactivation. **(38)**

En raison de la grande variété de structures et de modes d'action des substances génotoxiques, il existe un grand nombre de dommages à l'ADN possibles. Ces altérations structurales de l'ADN appelées lésions primaires concernent principalement des modifications des bases constitutives de l'ADN ou des cassures affectant un seul ou les deux brins de l'ADN.**(39)**

Il y a tout d'abord les adduits encombrants qui correspondent à l'entité chimique résultant de l'établissement d'une liaison covalente entre une molécule chimique électrophile et un site nucléophile d'une base de l'ADN.**(40)**

Parmi les sites nucléophiles, les azotes aromatiques, les groupements hydroxyles et carbonyles des bases constitutives de l'ADN sont les cibles privilégiées des génotoxiques. Certains agents mutagènes tels que les HAP et les amines aromatiques sont capables de réaliser ce type de liaison entraînant la formation d'un complexe appelé adduit (pour produit d'addition). Cette lésion entraîne une modification de la structure spatiale de l'ADN au voisinage de l'adduit qui va perturber sa reconnaissance par l'ADN polymérase au cours du processus de réplication. La formation et la persistance de telles lésions de l'ADN sont des étapes clé vers la mutagenèse et le développement tumoral. **(39)**

Il y a ensuite les micro-adduits formés par l'alkylation d'une base azotée de l'ADN.**(41)** Ces modifications bien que minimes perturbent la reconnaissance de la base par l'ADN polymérase lors de la duplication de l'ADN. Les nitrosourées, les alkylsulfonates et les cyclophosphamides qui sont largement utilisés comme agents chimiothérapeutiques pour le traitement du cancer sont pour la plupart des agents alkylants.**(40)**

Il y a par ailleurs les lésions oxydatives de l'ADN qui sont générées lors de l'attaque des bases de l'ADN par les espèces réactives de l'oxygène. Ces lésions concernent notamment la guanine dont le produit d'oxydation majeur est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosine (8-oxodGuo). Il y a enfin les pertes, les insertions ou les modifications d'une ou plusieurs bases de l'ADN. **(41)**

Les agents génotoxiques impliqués sont pour la plupart des analogues de bases azotées, tels que le 5-bromo uracile ou la 2-amino purine, présentant des similitudes structurales avec les bases normales de l'ADN. Elles seront incorporées à l'ADN où elles provoquent des mutations en générant des appariements incorrects de bases. Ces analogues provoquent principalement des mutations de type A:T vers G:C ou G:C vers A:T (transitions). L'acide nitreux peut, quant à lui, provoquer la désamination de la cytosine ou de l'adénine pour produire respectivement de l'uracile ou de l'hypoxanthine qui présentent une forte homologie structurale avec la guanine.(42) Ces lésions provoquent là encore majoritairement des transitions de type A:T vers G:C ou G:C vers A:T. Les agents intercalants tels que le bromure d'éthidium ou la proflavine sont des molécules à géométrie plane qui peuvent s'insérer entre les paires de bases entraînant l'étirement de l'ADN et l'insertion d'une base surnuméraire.(43)

D'autres types de lésions sont possibles mais apparaissent moins fréquemment lors de l'exposition à des génotoxiques chimiques. Il s'agit des pontages intra ou inter-brins qui correspondent à des liaisons covalentes anormales établies entre bases de l'ADN et aux cassures simples et doubles brins générées essentiellement par les rayonnements ionisants.(42)

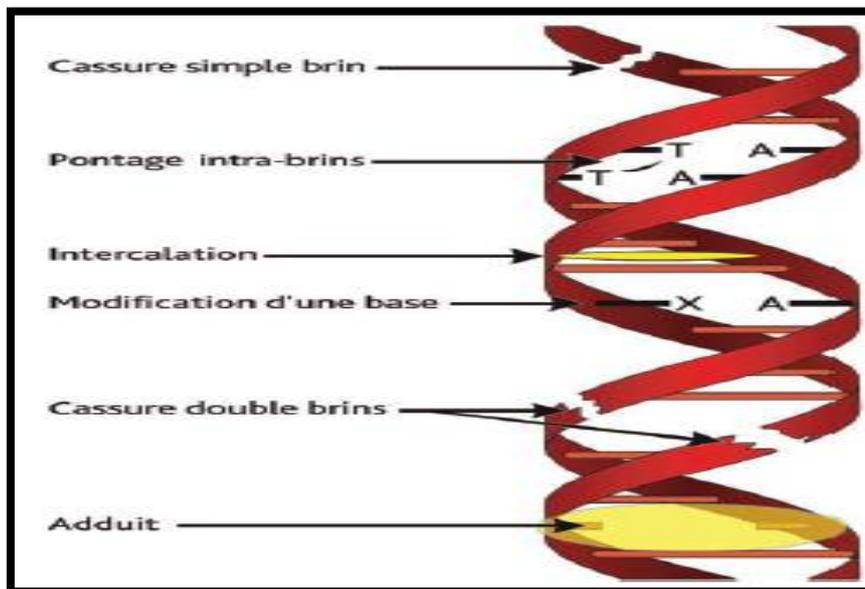


Figure 02: les différents types de lésions primaires de l'ADN (42)

I.5.2. Les génotoxiques environnementaux

Les agents génotoxiques peuvent être de nature physique, chimique ou biologique. Les mutagènes physiques sont principalement les radiations ionisantes hautement énergétiques telles que les rayons X ou gamma et les radiations non ionisantes comme la lumière ultraviolette. Les mutagènes biologiques sont notamment des virus tels que les rétrovirus.(43)

I.5.3. L'étude de la génotoxicité :

Différents types de tests de génotoxicité, explorant des stades variés de l'atteinte génotoxique, sont donc disponibles. Concernant la bio-surveillance du personnel, ils permettent de fournir soit des biomarqueurs stricts d'exposition (Test d'Ames sur urines) ou soit des biomarqueurs d'effet génotoxique (Test des comètes sur lymphocytes sanguins) ou d'effet mutagène (Test des micronoyaux ou Test des aberrations chromosomiques sur lymphocytes sanguins) et ils peuvent donc apparaître comme complémentaires.(44)

- **Test des micronoyaux**

Les micronoyaux sont des entités nucléaires indépendantes du noyau principal, provenant de la perte de fragments chromosomiques ou de chromosomes entiers pendant la division nucléaire, conséquences respectivement d'effets clastogènes (cassures double brin de la molécule d'ADN) ou d'effets aneugènes (altérations de l'appareil mitotique liées principalement à des interactions avec les protéines).

Les tests des micronoyaux a donc pour objet de détecter et numérer ces micronoyaux, dans des cellules traitées *in vitro* par l'agent génotoxique ou provenant d'une exposition *in vivo* (par exemple des lymphocytes de rongeurs ou de sujets humains exposés à l'agent génotoxique) (45).

Le test des micronoyaux a d'ailleurs été présenté récemment comme ayant une valeur prédictive pour le risque de cancer (46). Le test des micronoyaux peut être aussi utile pour évaluer une exposition récente (heures, jours). Il est applicable à toutes les cellules-cibles (cellules vésicales, en do Buccales, fibroblastes, kératinocytes, etc...) (47).

L'avantage de cette technique est de ne comptabiliser que les lésions génotoxiques héritables (micronoyaux dans les seuls lymphocytes binucléés) répondant seules à la définition stricte de la mutation. Le test est, de plus, associable à une étude de la qualité du matériel génétique contenu dans le micronoyau (présence ou non de centromères, type de chromosome altéré, nature exacte de l'altération) (47).

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le test des micronoyaux est relativement facile à mettre en œuvre. Il ne détecte cependant pas toutes les aberrations chromosomiques. Il requiert aussi nécessairement un prélèvement cellulaire est présent donc de ce fait un certain caractère invasif. L'analyse cellule par cellule permet néanmoins d'avoir un grand nombre de données, (47).

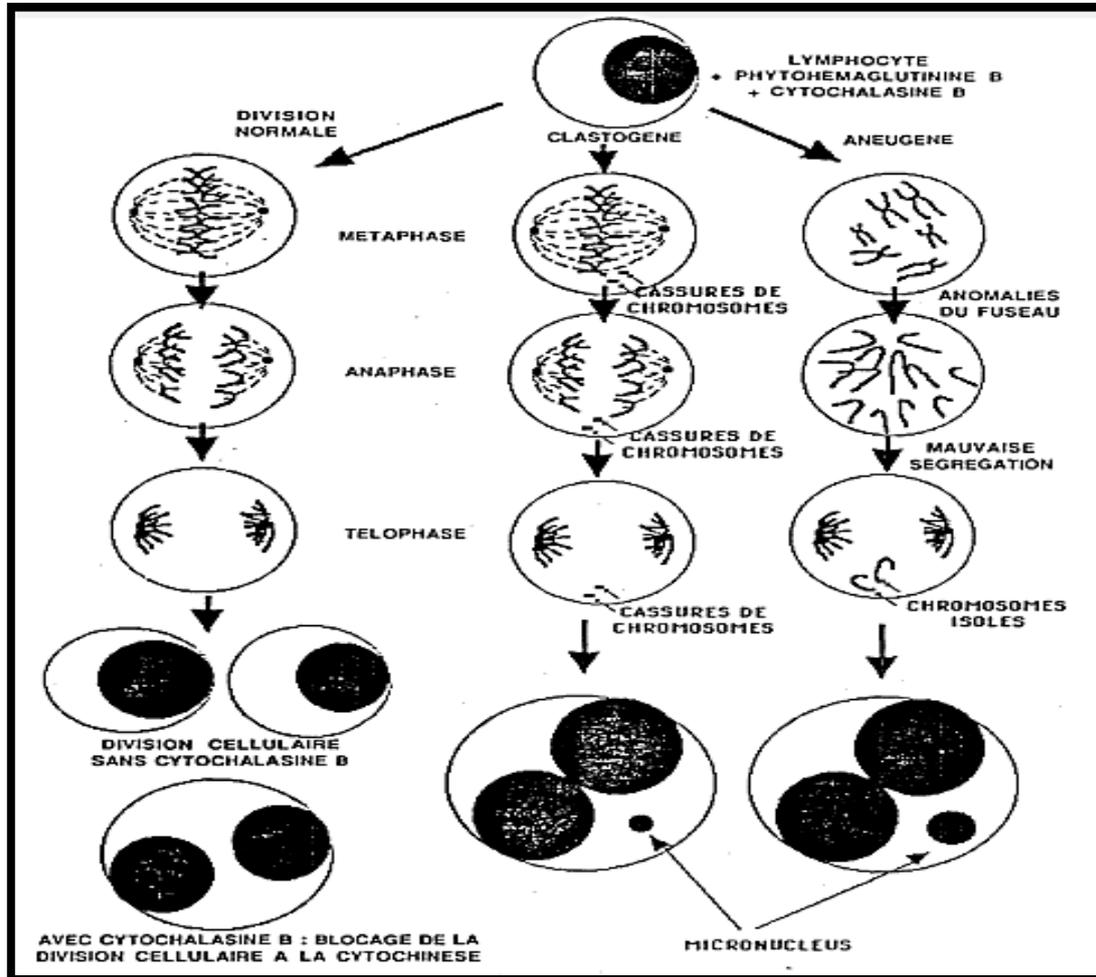


Figure 03: la formation des micronoyaux (47)

CHAPITRE III

II. Matériel et méthodes

II.1.Présentation du matériel biologique

Gambusia affinis (Baird & Gira), est un poisson appartenant à la grande famille des Poeciliidés, comprenant dans le monde 30 genres et 293 espèces, originaire des USA et du Mexique, introduit en France vers 1930. Il est d'après (48). Le prédateur naturel des moustiques le plus répandu et utilisé pour cela dans la lutte antipaludéenne (49). D'élevage facile, un des poissons les plus utilisé en laboratoire (50).

Le choix de cette espèce comme matériel biologique utilisé dans cette étude est motivé par :

- Son abondance dans les ruisseaux et les étangs de la région d'Annaba.
- Sa facilité d'élevage dans des aquariums grâce à ses capacités (robustesse et rusticité) qui lui Permettent de survivre et de s'adapter aux changements de pH et de température (50)

Tableau 04: Position systématique

Embranchement	<i>Vertébré</i>
Classe	<i>Poisson</i>
Sous classe	<i>Téléostoms</i>
Super ordre	<i>Téléostéens</i>
Ordre	<i>Cyprinodontiformes</i>
Famille	<i>Poeciliidae</i>
Genre	<i>Gambusia</i>
Espèce	<i>Affinis</i>

II.1.1. Morphologie et anatomie

Gambusia affinis est un petit poisson ovovivipare d'eau douce, de couleur gris argentée, originaire d'Amérique centrale et de Floride, lieux où il est connu sous le nom de 'mosquitofish'. (51)



Figure 04 : Morphologie général de *Gambusia affinis*(52)

Gambusia affinis présente un dimorphisme sexuel se manifestant par une différence de taille très nette à l'état mature. La femelle peut atteindre jusqu'à 6 cm (52)son corps est trapu avec une tache sombre plus au moins étendue se trouvant du côté de la nageoire anale, elle est plus nette au moment de la gestation et marque l'emplacement de l'ovaire unique qui est formé par les yeux des alevins qui apparaissent à travers la paroi ventrale (53).Sa nageoire anale est ronde et transparente. Le mâle en revanche, à l'état de Maturité sexuelle est plus petit, il ne dépasse pas les 3,5 cm (54), la nageoire anale est modifiée en une structure allongée qui constitue l'organe copulateur dite le gonopode assurant la fécondation interne des femelles grâce à des muscles associés permettant une grande mobilité (55). Le gonopode est utilisé lors du transfert du sperme dans l'organe génital femelle, durant la copulation (56).



Figure 05:Le dimorphisme sexuel de *Gambusia affinis*(56)

II.1.2. Comportement, reproduction et écologie

- **Comportement**

Gambusia affinis est une espèce diurne qui fait appel à ses capacités visuelles pour son alimentation, sa sélection sexuelle et son évitement des prédateurs. Extrêmement vorace elle consomme des crustacés, peut être prédatrice de ses alevins mais cesont les larves des moustiques présentes à la surface de l'eau qui représentent son alimentation préférée (57) d'où son nom mosquitofish.

Son cycle biologique et ses diverses activités sont sous contrôle thermique. La température optimale se situe à 25°C (58)

- **Reproduction**

Après maturation des jeunes alevins, les femelles sont fécondées. Leur période de fécondation s'étale du mois de mars à septembre et leur fécondité tend à augmenter avec la taille mais diminue avec l'âge (58). Elles peuvent faire 4 à 5 gestations sans nouvelle insémination et ceci grâce à la chambre ovarienne qui se trouve au centre de l'ovaire et des replis qui assurent la longue survie des spermatozoïdes donc les femelles ont la capacité de stocker le sperme dans le repli de l'épithélium ovarien et de le disperser pour une nouvelle fécondation sans l'implication des mâles (59).

La durée de ses cycles de gestations varie de 25 à 35 jours; celle du premier cycle dure plus longtemps (60), elle est d'environ 35 jours selon (61). Au moment de la gestation l'ovaire est plein d'alevins de taille homogène. Ces derniers quittent leur mère l'un après l'autre à des temps différents, alors que l'ovaire contient d'autres ovocytes déjà matures de la génération suivante (62). La taille des portées est généralement autour de 60 jeunes, mais les femelles peuvent transporter plus de 300 alevins (63).

Les adultes mâles atteignent la maturité sexuelle au bout de quatre semaines, par contre six semaines pour les adultes femelles (63). Wurtsbaugh & Cech. (1983) ont observé chez *G. affinis* une relation linéaire croissante entre la température de l'eau et la Croissance jusqu' à 30°C. Au-dessus de 35°C, la croissance est ralentie. Aussi, l'augmentation de la densité des poissons semble freiner la croissance (64).

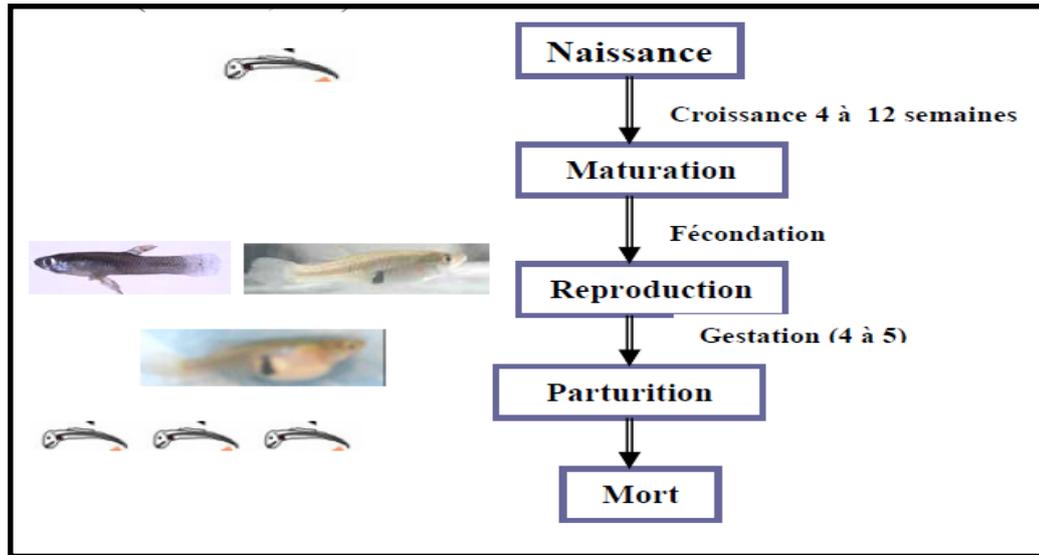


Figure 06: Cycle Vital de la gambusie (64)

- **Ecologie:**

La Gambusie (*Gambusia affinis*) est une espèce robuste vivant dans toute sortes de petits étangs, fossés et marais, elle fréquente les eaux peu profondes, dormantes ou faiblement courantes ;(ruisseaux, rivières), souvent éphémères, chaudes et riches en végétation. On les introduits dans les puits, les mares, les bassins... Ce sont des espèces euryhalines et eurythermes s'adaptent à tous les facteurs abiotiques, aux conditions climatiques et hydrologiques défavorables et même à des modifications considérables du contenu biologique et chimique de l'eau. (64).

II.1.3. Présentation du site d'échantillonnage

L'espèce étudiée a été pêché dans l'oued kherraza; cette oued est située à environ 11 Km à l'ouest de la ville d'Annaba. C'est un oued saisonnier qui se remplit en hiver et se trouve à sec durant l'été. La pêche (figure 07) a été pratiquée à l'aide d'une grande épuisette dont le filet fait 1mm de vide de maille. La collecte a été effectuée à l'aide d'un filet de 0,40 mm de vide de maille. La capture des poissons a été meilleure en matinée (entre 8 et 11 heures), car en cette période les poissons montent en surface pour s'alimenter. Ces poissons sont alors transportés au laboratoire et mis dans des enceintes d'élevage.



Figure 07: Présentation du site d'échantillonnage

II.1.4.Élevage des poissons

Avant l'expérimentation, les poissons ont été placés pendant des semaines. Au laboratoire, l'élevage des poissons est réalisé dans des aquariums d'une capacité de 25 litres, remplis d'eau de robinet préalablement exposée à l'air libre pendant 48 heures afin de la débarrasser des hypochlorites de sodium qui peuvent causer la mortalité des poissons.

Les aquariums sont munis de pompes à air (220-240 VOLTS. 50HZ) et d'un diffuseur, Les poissons sont nourris quotidiennement avec une préparation à base de crevettes et des poissons déshydratés, commercialisée sous le nom de Tetramin® (Tetrawerk, Allemagne). Elle a été distribuée quotidiennement et sont exposés pendant 12 à 13 heures à la lumière pour ne pas changer leur système naturel de photopériode.



Figure08: Elevage de *Gambusia affinis* au laboratoire

II. 2. Présentation du matériel chimique

II.2.1. Le carbofuran

Le carbofuran est un insecticide à large spectre utilisé pour le traitement des semences dans le cadre de différentes cultures : cultures légumières, maïs, soja, tournesol, arbres, arbustes d'ornement, cultures florales, fraisier (65) Cette molécule appartient à la famille des carbamates et agit par inhibition de l'activité des cholinestérases (65).

II.2.2. Intérêt de la molécule

Le carbofuran est une substance active utilisée comme insecticide et nématocide en agriculture pour lutter contre une grande variété d'insectes foliateurs et fousseurs. Il est considéré comme un des pesticides utilisés le plus souvent de façon anarchique. On le trouve en forte concentration dans les régions agricoles, dans l'atmosphère et dans les cours d'eaux, où il est fréquemment détecté dans les eaux superficielles (66)

Le Carbofuran peut être ingéré par voie orale ou par inhalation. Il est fortement toxique pour l'homme, la végétation et aussi pour les poissons car il est connu pour altérer les fonctions neurologiques et surtout l'acétylcholinestérase sa cible privilégiée qui est une enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans la transmission des cholinergiques (66)

II.3.Le traitement

Les poissons sont répartis en trois lots expérimentaux (45 poissons par lots); un lot témoin qui ne sera pas traité, deux traités avec le carbofuran, après 48 heures d'acclimatation des poissons, la moitié de l'eau de chaque aquarium est renouvelée, c'est pendant cette opération que nous introduisons le pesticide, les temps d'exposition sont 7j, 15j, et 45 jours à deux doses de 5.75 mg/l et 7.66 mg/l selon des essais précédemment réalisés (67)

II.4. dissection des organes et dosages

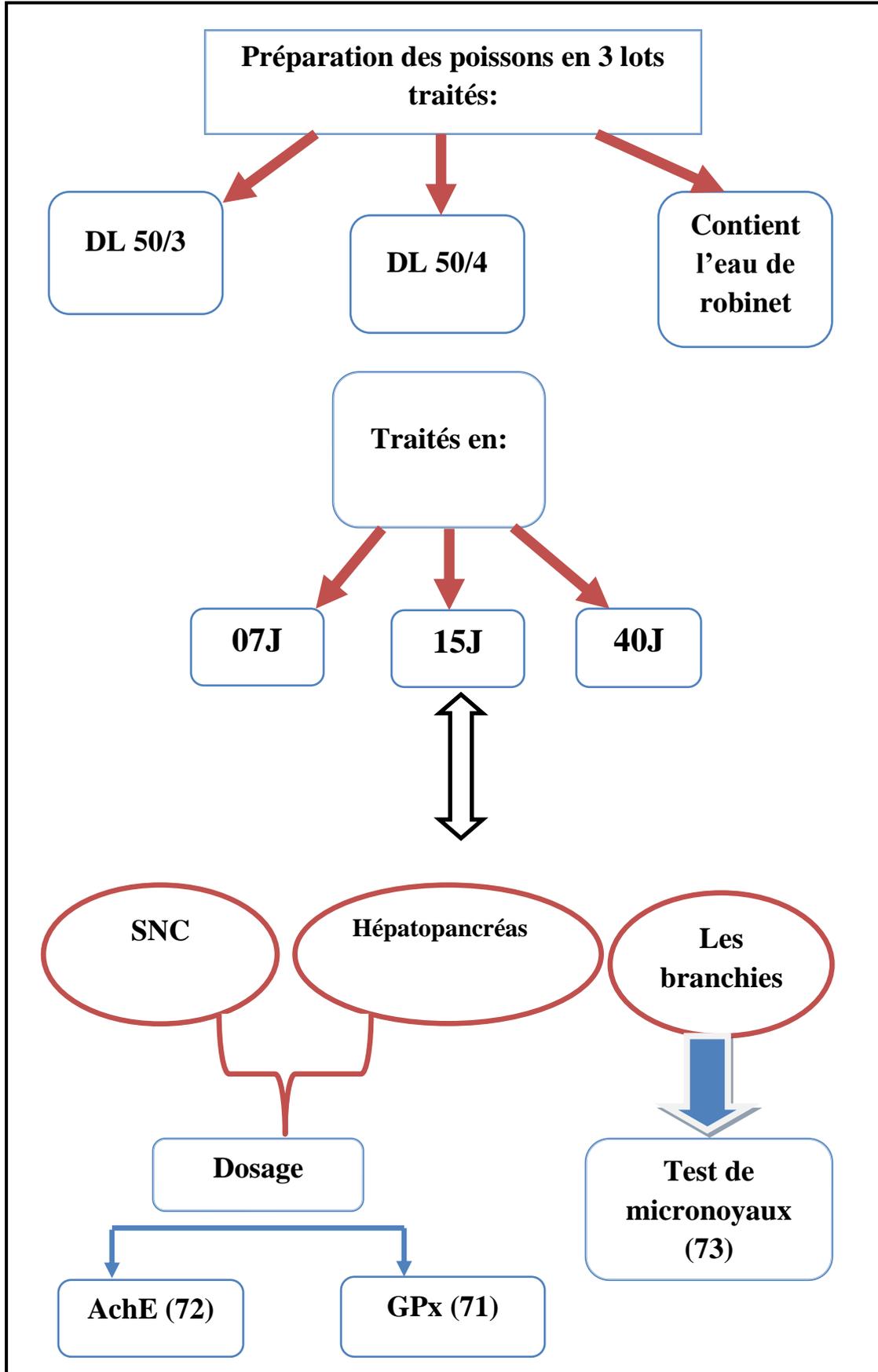


Figure 09: Protocole expérimental

Après anesthésie avec la glace, le poisson est fixé en position dorsale sur une plaque de liège, à l'aide d'épingles par l'orifice buccale et la nageoire anale, la dissection est réalisée sous loupe binoculaire, à l'aide d'un microciseau, une incision est faite de l'orifice urogénital jusqu'à la base des opercules pour le prélèvement des branchies, l'hépatopancréas et le système nerveux.

II. 4.1. Prélèvement des branchies et leur dosage



Figure 10: prélèvement des organes de *Gambusia affinis*

- **Les branchies**

Chacune des deux branchies est formée de deux hémibranchies, la plus interne étant la plus grande. Ces hémibranchies sont constituées de filaments branchiaux sur lesquels se trouvent les cils, à l'origine de l'activité ventilatoire qui permet les échanges respiratoires. L'eau pénètre dans la chambre infrabranche par le siphon inhalant, puis dans les chambres interlamellaires et quitte l'animal par le siphon exhalant *via* la chambre suprabranche (69).

Les particules transportées par l'eau ne peuvent pas pénétrer dans les chambres interlamellaires. Elles sont véhiculées grâce à l'action conjuguée de nombreux cils recouvrant les filaments. Il existe trois types de cils: les cils latéraux, qui créent le courant d'eau à travers les branchies ; les cils latéraux frontaux, qui retiennent les particules potentiellement nutritives et les conduisent vers les cils frontaux, qui les acheminent vers les palpes labiaux, puis vers la bouche. L'efficacité de rétention est de 100 % pour des particules comprises entre 4 et 20 μm (68). Les particules rejetées soit par les branchies, soit par les palpes labiaux, sont véhiculées par les cils recouvrant le manteau vers le siphon inhalant au niveau duquel elles sont libérées dans le milieu extérieur sous forme de pseudo-fèces. Les branchies possèdent un rôle capital dans la respiration, la nutrition, mais aussi dans la reproduction. Après fécondation, les oeufs sont incubés dans la cavité suprabranche, au niveau du feuillet interne de la branchie. (69)

a. Test micronoyaux

- **Méthode (73)**
- ✓ Prélever 0,1 mg de branchie
- ✓ Ajouter 1 ml de la solution dispas
- ✓ Incuber pendant 10 min a 37°C
- ✓ Centrifuger a 1000 rpm pendant 10 min
- ✓ Récupérera le surnagent et le culot cellulaire
- ✓ Fixer avec le mélange méthanol : acide acétique pendant 20 min
- ✓ Etaler sur une lame
- ✓ Faire sécher
- ✓ Colorer avec Giemsa 3 %
- ✓ Observation au microscope optique x100

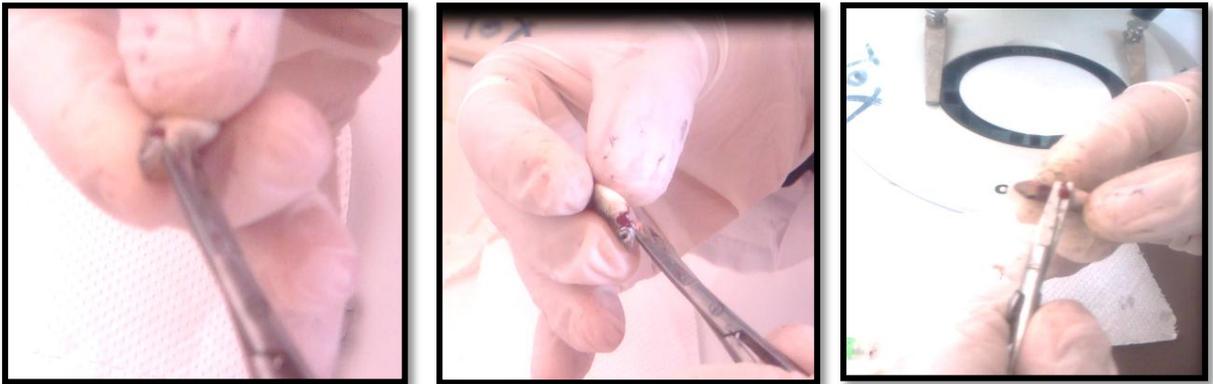


Figure 11: dissection des branchies

II.4.2. Prélèvement d'hépatopancréas et leur dosage

Les hépatopancréas du *Gambusia affinis* des différents lots et différentes périodes, sont mis séparément dans des tubes eppendorfs et additionnés du tampon TBS à pH = 7,4 puis broyés à l'aide d'un broyeur à ultrason en maintenant les tubes à basse température. Après avoir homogénéisé tous les tubes nous les avons placés dans la centrifugeuse à 9000 tours/15 min. Pour le dosage les surnageants récupérés sont fractionnés dans d'autres tubes eppendorfs et seront conservés abaisse température pour le dosage du GPx.

a. Dosage des protéines

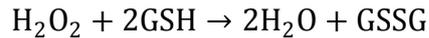
La concentration des protéines contenues dans les surnageants a été déterminée selon (70). Nous avons utilisé 100 µl du surnageant de chaque organe, homogénéisé avec 4 ml de bleu brillant de comassie (BBC) (G250), Merck) comme réactif. Le mélange est agité et laissé

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

à température ambiante (T°C) pendant 5 mn pour la stabilisation de la couleur . La lecture s'effectue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.

b. Dosage du Glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de (71) basée sur la réaction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Après la récupération de surnageant, prélever 0,2 ml d'homogénat puis ajouter 0,4 ml de GSH et 0,2 de tampon phosphate (pH = 7,8). Incubation au bain marie a 25°C pendant 5 min, ajouter 0,2 ml de H₂O₂ pour initier la réaction, laisser agir 10 min puis ajouter 1 ml de TCA pour arrêter la réaction. Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes. Centrifugation durant 10 min a 3000 tours/ 10 min.

Prélever 0,48 ml du surnageant, ajouter 2,2 ml de solution K₂HPO₄ et 0,32 ml de DTNB. Mélanger et après 5 min lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx fait a l'aide de la formule suivante :

$$X = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}}$$
$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH} / \text{mg protéine}) = \frac{\text{Quantité GSH disparu}}{[\] \text{ de protéine}}$$

X: Quantité de GSH réduit disparu (oxydé) dans 0,2 ml extrait dans 1ml.

DO échantillon: Densité optique de l'échantillon.

DO étalon: Densité optique de l'étalon.

0,04: Concentration de substrat.



Figure 12: prélèvement d'hépatopancreas

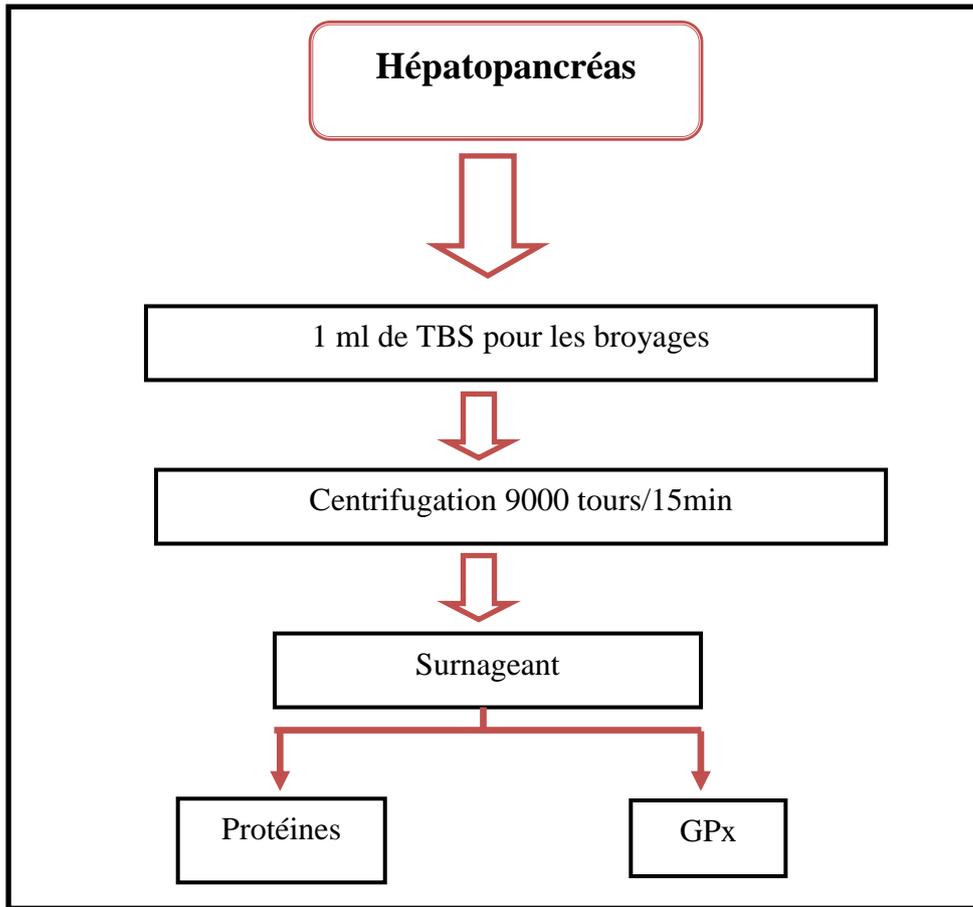


Figure 13: dosage du GPx et protéines totale(71)

II.4.3.Prélèvement du SN et le dosage d'acétyl choline estérase

a. Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE)

La méthode de dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) la plus courante (72) consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'acétylthiocholine (ASCh), dont l'hydrolyse libère de la thiocholine (SCh) et de l'acide acétique. La quantité de thiocholine obtenue est proportionnelle à l'activité enzymatique, on la révèle grâce à une méthode colorimétrique faisant intervenir un réactif (le dithiobisnitrobenzoate ou DTNB) qui se lie avec la thiocholine pour former un complexe de couleur jaune que l'on dose à 412 nm. Les échantillons sont homogénéisés pendant quelques secondes dans 1 ml de solution détergente (38,03 mg éthylène glycol tris- β -aminoéthyl éther ou EGTA, 1 ml triton X 100%, 5,845 g NaCl, 80 ml tampon tris 10mM) à l'aide d'un homogénéisateur à ultrasons puis centrifugés à 5000 tours/pendant 5 mn. Le surnageant est utilisé immédiatement pour la mesure de l'activité AChE.

Les étapes du dosage d'AChE sont les suivantes: 100 μ l de surnageant sont additionnées à 100 μ l de DTNB (0,1 M, pH 8) (39,6 mg de DTNB, 15 mg CO₃ Na, dans 10

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

ml tris 0,1 M pH 7) et 1 ml du tampon tris (0,1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes de repos nécessaire pour épuiser la réaction spontanée, 100 µl de substrat acétylthiocholineiodide (Sigma R) (118 mg ASCh dans 5 ml d'eau distillée) sont ajoutés. La lecture des densités optiques s'effectue à 412 nm toutes les 4 minutes pendant 20 minutes contre un blanc ou le surnageant a été remplacé par un volume équivalent de solution détergente (100 µl).

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

$$\text{AChE } (\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta D_0 / \text{mn} \times V_t}{1,36 \times 10^4 \times V_s} \text{ / mg de protéines}$$

X: nanomole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (nM/mn/mg de protéines).

ΔDO : pente de la droite de régressions obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps

1,36 × 10⁴ : coefficient d'extinction molaire du DTNB (M-1cm-1).

V_t : volume total dans la cuve : 1,3 ml [0,1 ml surnageant + 0,1 ml DTNB + 1 ml tampon tris (0,1 M, pH 7) + 0,1 acétylcholine].

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg

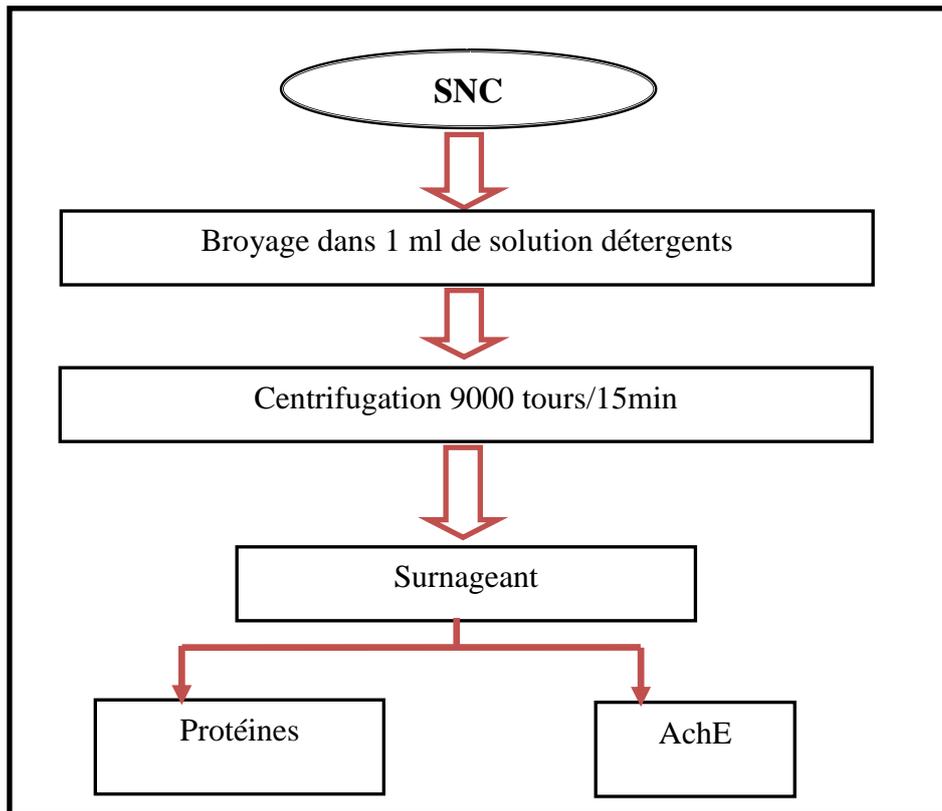


Figure 14: dosage de l'AChE(72)

II.5. Analyse statistique

Dans notre étude, pour mieux visualiser les résultats obtenus, la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant Microsoft Excel 2007. Du logiciel Minitab pour l'analyse statistique et du traitement des données version 13.31.

Chaque paramètre mesuré a fait l'objet d'une analyse de variance avec $\alpha \leq 0.05$ (TEST T). Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart-type ($m \pm s$). Une analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) a été effectuée en utilisant le test ANOVA.

CHAPITRE III

III. 1. Résultats

III.1.1. Effet du carbofuran sur la formation des micronoyaux

En comparaison avec les Gambusies témoins, chez les Gambusies traités pendant 7 et 15 jours aux doses de 5,75 mg/l et 7,66 mg/l de carbofuran, nous relevons qu'il n'existe pas une différence significative du nombre des micronoyaux.

Après 40 j de traitement à la DL50/3,(**tableau 05**) on note une augmentation très significative du nombre des micronoyaux (**tableau 05**)

L'ANOVA à deux critères montre un effet temps ($P \leq 0,05$) et un effet dose ($p=0,001$)

Tableau05: variation du nombre des micronoyaux chez *Gambusia affinis* traité par deux doses du carbofuran (5,75 mg/l et 7,66 mg/l) durant 7, 15 et 40 jours.

Temp	séries	Témoin N=8	DL50/4 N=8	DL50/3 N=8
7j		0,5± 0,5345	0,3750± 0,5175	0,6250± 0,744
15j		0,5 ± 0,5345	0,375 ± 0,5175	1,125 ± 1,2464
40j		0,5 ± 0 ,7559	0,75± 0,8864	2,375± ** 1,4078

NS: non significatif.

*significatif ($P \leq 0,05$).

** hautement significatif ($P \leq 0,01$).

*** très hautement significatif ($P \leq 0,001$).

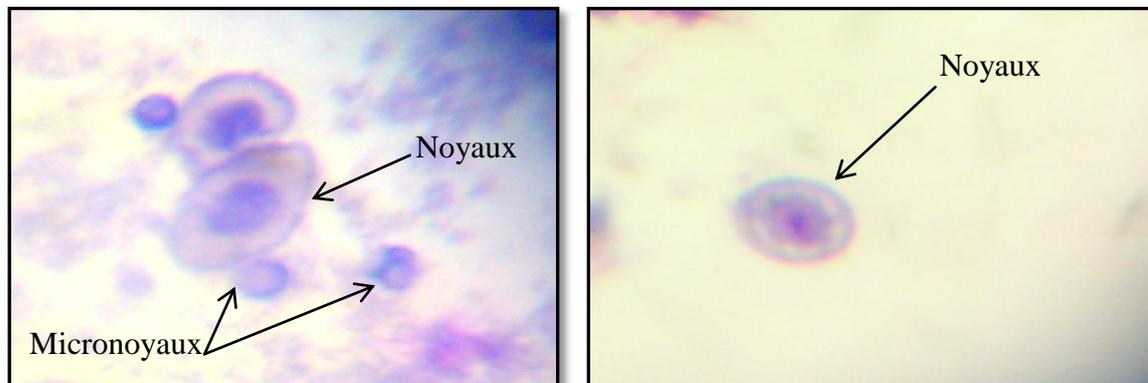


Figure 15: observation microscopiques des micronoyaux (x 100)

III.1. 2. Effet du carbofuran sur l'activité enzymatique du GPx:

Le tableau (07) et la figure (16) montrent qu'il y a une augmentation significative ($P \leq 0,001$; $P \leq 0,001$) de l'activité enzymatique du GPx chez les Gambusies traité par les 2 doses du carbofuran après 7 jours.

Après 15 jours de traitement la différence de l'activité enzymatique du GPx est significative et très significative respectivement à la DL50/4 et à la DL50/3 par rapport au témoin. Cette augmentation est très hautement significative après 40j pour les 2 doses.

L'analyse de la variance à deux critères (ANOVA) révèle un effet dose ($P \leq 0,001$), un effet temps ($P \leq 0,001$) et une interaction dose temps ($P \leq 0,001$)

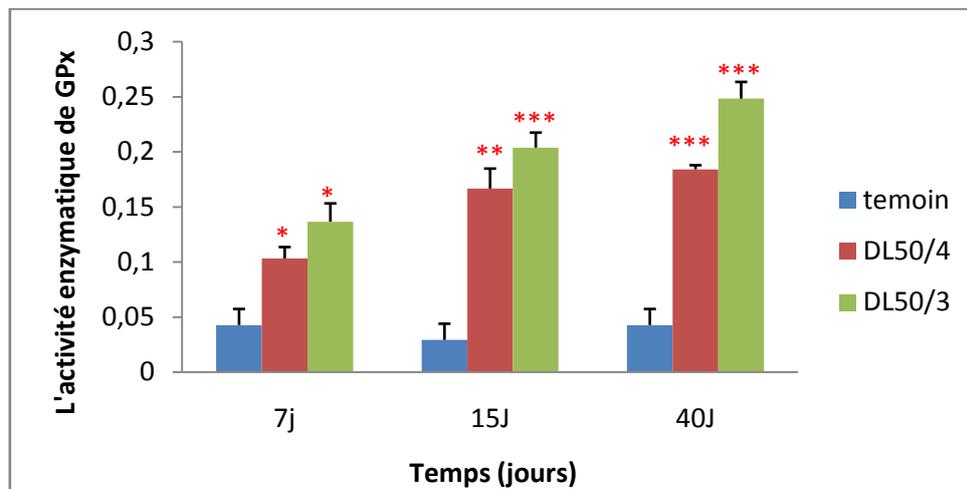


Figure16: Variation de l'activité enzymatique du GPx chez *G.affinis* traité par le carbofuran (DL50/4, DL50/3).

III.1. 3.Effet du carbofuran sur l'activité d'AchE :

Selon le tableau (08) et la figure (17), la comparaison des résultats du témoin par rapport à ceux des Gambusies traités pendant 7,15 et 40 jours révèle chez ces derniers, une diminution très significative, et très hautement significative de l'activité enzymatique de l'AChE après 15 j respectivement à la DL50/4 et à la DL50/3 . Il est également observé une diminution très hautement significative après 40 j pour les 2 doses.

L'ANOVA montre un effet dose ($P \leq 0,001$), un effet temps ($P \leq 0,001$) et une interaction dose –temps ($P \leq 0,001$)

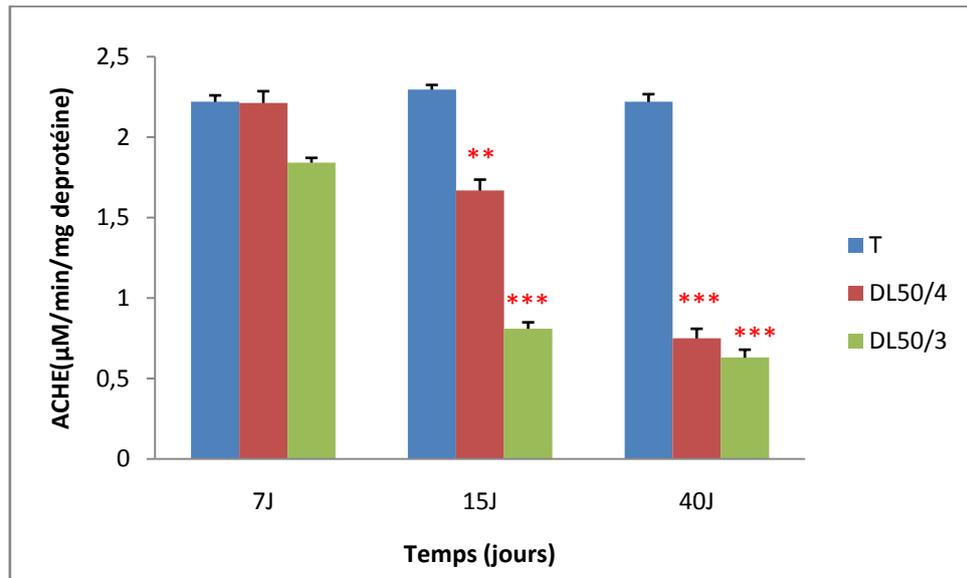


Figure17: Variations de l'activité enzymatique de l' AChE chez *G.affinis* traité par le carbofuran (DL50/4, DL50/3) durant 7, 15 et 40 jours.

III. 2. Discussions

La capacité d'adaptation d'un organisme à l'environnement dépend principalement des mécanismes efficaces de la détoxification de divers composés endogènes et exogènes (74); chez les organismes aquatiques ces mécanismes sont les premiers sollicités par la présence des xénobiotiques (75); de ce fait les biomarqueurs constituent un signal précoce d'effets de la contamination sur ces organismes. Ils permettent d'évaluer leur état de santé et celui des populations des écosystèmes (76).

Leur inhibition ou leur induction in vivo est un bon outil environnemental pour évaluer les effets potentiels des xénobiotiques et de leur niveau de toxicité à différents niveaux d'organisation biologique d'un organisme vivant (77, 78, 79, 80,81).

Afin de prendre en compte la multiplicité des effets des contaminants il est apparu nécessaire de recourir à une approche multi-biomarqueurs basée sur la mesure de plusieurs biomarqueurs complémentaires (82).

Les paramètres biochimiques et enzymatiques chez les organismes exposés aux contaminants toxiques ont été utilisés comme biomarqueurs et peuvent constituer un important outil de diagnostic pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (83).

Dans cette étude nous avons choisi de suivre le taux de GPx au niveau de l'hépatopancréas et l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau des têtes des poissons.

III. 2. 1. Les effets du carbofuran sur l'activité de GPx chez *Gambusia affinis*

L'organisme se protège en permanence contre la formation et les agressions des radicaux libres grâce à divers mécanismes de défense enzymatiques et non enzymatiques (84).

Le système de défense antioxydant est présent chez toutes les cellules aérobies et neutralisent les réactions chimiques intermédiaires produites par voie endogène et/ou le métabolisme des xénobiotiques. L'activité du système antioxydant subit une augmentation ou une inhibition sous l'effet d'un stress chimique (85).

Parmi ces systèmes de défense enzymatiques le glutathion peroxydase (GSH-Px ou GPx) joue un rôle principal dans la protection de l'organisme contre les dommages induits par le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, mais aussi des peroxydes organiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes dépend de l'apport nutritionnel en sélénium, son déficit entraînant une diminution de l'activité enzymatique (86).

Une augmentation progressive dans le taux de GPx a été observée chez les poissons traités en comparaison avec les témoins. Par ailleurs cet effet pourrait être dû à l'augmentation du stress oxydatif qui renforce l'activité des enzymes antioxydants chez les animaux(87). contrairement à l'étude de RAHMANI Basma au 2014 sur a l'activité

enzymatique de GPx qui montre une diminution non significative après le traitement par deux doses (DL50/4 et DL50/3) au différent temps (15 jours et 40 jours).(88) ont trouvé le même résultat et ils ont expliqués qu'il reflète un degré négligeable de toxicité et une production physiologique des ROS.

III. 2. 2. Les effets du carbofuran sur l'activité de l'AChE chez *Gambusia affinis*

L'acétylcholinestérase ne joue aucun rôle dans la détoxification des xénobiotiques chez les êtres vivants. Cette enzyme est impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme. Dans les jonctions interneuronales et neuromusculaires, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine (ACh), qui permet la transmission du message nerveux d'une cellule à l'autre. Une fois l'information transmise, l'acétylcholine est rapidement inactivée par l'inhibition de l'enzyme par de nombreux toxines entraînant une accumulation du médiateur chimique dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux, laquelle conduit généralement à la tétanie musculaire et à la mort (89,90). L'AChE est essentiellement inhibée par deux classes d'insecticides, les organochlorés et les carbamates (91, 92, 93,94). Cependant, certaines études ont mis en évidence l'inhibition de l'activité de l'AChE par d'autres contaminants environnementaux incluant certains agents sulfactants, les hydrocarbures combustibles et les métaux lourds (95, 96, 97,98).

L'inhibition de l'activité de l'AChE peut avoir des conséquences sur le comportement des êtres vivants:

La recherche de la nourriture, la recherche de partenaire sexuel et le soin des jeunes (99, 100, 101, 102,103). L'analyse de l'activité de l'AChE dans les différents tissus des organismes aquatiques est considérée comme biomarqueur de la contamination des milieux aquatiques par les pesticides anticholinestérasiques (104, 105,106).

Les mesures de l'activité de l'AChE que nous avons effectuées dans le cerveau de *G.affinis* après une durée d'exposition de 7, 15 à 40 jours aux doses sublétales testées, montrent que le carbofuran induit chez cette espèce une réponse significative se traduisant après 7 jours d'exposition, par une réduction de l'activité de l'AChE pour les *G.Affinis* traité par DL50/3 après 15 et 40 jours d'exposition au DL40/4 et DL50/3 nous remarquons une inhibition hautement significative. Nos résultats sont en accord avec ceux de (107) qui rapportent que le carbofuran inhibe après 24h d'exposition, l'activité de l'AChE dans le cerveau de *Gambusia yucatana*.

De nombreux autres travaux ont démontré la capacité de divers xénobiotiques à inhiber invitro et in vivo chez différentes espèces animales, l'activité de l'AChE. La durée d'exposition, la concentration du xénobiotique, l'âge de l'individu et le stress peuvent influencer la sensibilité de l'activité de cette enzyme (108, 109,110 ,111). Ainsi le dosage de l'AChE dans les têtes des alevins et les adultes de *G.affinis* exposées au halofénozide révèle

une inhibition de l'AChE après 60 jours de traitement.(107,112)Ont souligné aussi une diminution de l'AChE dans le cerveau de plusieurs familles de poissons exposées à un pesticide organophosphorés, dans le muscle et le cerveau d'*Anguilla anguilla* traité par différentes concentrations d'un herbicide (le thiobencarbe) et dans le muscle d'autres poissons(*Oreochromis moscambicus* et *Labeo umbratus*) au niveau d'un écosystème pollué par les insecticides organophosphorés.

Une exposition de 24h au Chloropyrifos inhibe l'activité de l'AChE dans le cerveau de *G. ucatama* (113).En effet, l'activité de l'AChE mesurée dans le muscle d'un autre poisson (*Carassius auratus*) a été inhibée suite à une exposition au carbofuran (114). Une diminution de l'activité de l'AChE au niveau de l'hépatopancréas chez les femelles adultes de *G. affinis* exposées au diflubenzuron a été également rapportée par (115).

L'exposition au cadmium entraîne une diminution de ce paramètre seulement chez les femelles adultes (114). Des résultats exprimant la diminution de l'activité de l'AChE dans les muscles et les cerveaux rapportés chez *Macoma balthica*, un mollusque bivalve dans le Nord de la mer baltique (115), chez *Cerastoderma edule* exposé aux métaux lourds dans le golfe de Gênes (116), chez *Hexaplex trunculus* exposé au carbofuran, cadmium et cuivre dans la lagune de Bizerte (117).

III. 2 .3. Les effets génotoxiques du carbofuran

Les substances chimiques génotoxiques sont capables de provoquer, sur l'ADN des cellules, des dommages qui, s'ils ne sont pas ou mal réparés, conduisent à des mutations; ces mutations sont ensuite inscrites dans le patrimoine génétique d'un individu et transmises à sa descendance. Un polluant génotoxique peut ainsi avoir un impact sur la survie d'un individu (phénomène de cancérisation), mais aussi sur la viabilité des générations issues de cet individu, si ce sont les cellules germinales, en charge de la reproduction, qui sont affectées.

Les cellules branchiales sont parfois utilisées. De par leur fonction de surface d'échange, elles sont particulièrement exposées aux contaminants présents dans le milieu. Associé à un fort indice mitotique, cette caractéristique contribue à la grande sensibilité du test sur ce type de tissus (118, 119,120). Cependant, la mise en suspension des cellules requiert des protocoles susceptibles d'endommager les cellules, et le taux de base de cellules micronuclées y est plus important que dans les autres tissus (121).

Une augmentation progressive de formation des micronoyaux a été observée chez les poissons traités en comparaison avec les témoins. Par ailleurs cet effet pourrait être dû à l'augmentation du stress oxydatif notre travail et en accord avec le test micronoyaux qui a été mis au point sur des érythrocytes circulants de poissons d'eau douce,*Oreochromis mossambicus*

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

(122) et sur les hépatocytes de truite-arc-en-ciel (123). Effectué couramment chez les amphibiens *Pleurodeles waltii* (124), il a permis la constitution d'une base de données. Son protocole a été standardisé par une norme AFNOR (125).

L'induction de micronucléus est observée chez les moules *Mytilus edulis* exposées à des génotoxiques ou vivant dans des zones de rejets (126). Ce test est effectué également chez les poissons marins (127) et chez les huîtres.

La fréquence de micronoyaux dans les érythrocytes circulants de poissons vivant dans des sites contaminés au sud de la Californie est augmentée(128).

Le test micronoyaux peut donc, en théorie, être mis en œuvre dans la plupart des tissus. En pratique, la fréquence de division, le degré d'exposition des cellules aux contaminants et l'accessibilité des cellules conditionnent le choix des tissus testés(128).

CONCLUSION

CONCLUSION

Conclusion

Les pollutions occasionnées par les activités agricoles induisent généralement une diminution de la biodiversité, une banalisation du milieu, voire même la destruction de certains maillons des écosystèmes. Depuis la révolution verte qui a débuté dans les années 60, les pesticides font partie intégrante du système agricole. Ils sont devenus le principal moyen de lutte contre les organismes nuisibles. Les pesticides jouent un rôle important dans le contrôle des divers parasites. Cependant, leurs utilisations intensives et conventionnelles ont causé des effets secondaires sur l'environnement.

Lorsque le carbofuran est rejeté dans l'environnement, il aboutit en partie dans les sols et les eaux de surface. Le carbofuran présente des risques tant pour les organismes terrestres qu'aquatiques. Il existe un risque pour les oiseaux, les poissons d'eau douce et les petits mammifères sauvages qui consomment des aliments contaminés sur le site d'application ou à proximité.

Notre travail a été réalisé dans le contexte général de l'étude des effets de la contamination chimique sur les écosystèmes d'eau douce, et aussi l'étude d'impacte d'une agression chimique induite par le carbofuran chez un poisson prédateur de larve de moustiques *Gambusia affinis*.

Les résultats obtenus, ont montré que l'exposition des *Gambusia affinis* à deux doses correspondants à la DL50/4 et DL50/3 aux différents temps testés (7, 15 et 40 jours) entraîne l'apparition d'un stress oxydatif qui se manifeste par:

- Une augmentation du taux de GPx proportionnelle à la dose et à la durée du traitement.
- une diminution significative de l'activité de l'AchE chez les séries traitées comparativement aux témoins.
- D'autre part, le carbofuran entraîne une augmentation de la formation des micronoyaux aux différents temps testés.

Ce travail mériterait d'être approfondi par des nouvelles voies d'approche (enzymologie, embryologie, génétique...) qui pourrait peut-être élucidé d'autres problèmes.

REFERENCES BIBLIOGR
APHIQUES

References bibliographiques

1. **Loos R., Gawlik B.M., Locoro G., Rimaviciute E., Contini S., Bidoglio G.** 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*. 157 (2), p.561-568.
2. **Bloomquist J.R.** (1996). Insecticides: chemistries and characteristics. In: E. B. Radcliffe and W. D.
3. **ACTA, 2005. Index Phytosanitaire ACTA 2005.** 41^{ème}éd. Paris. Association de Coordination Technique Agricole. France. 820 p.
4. **Gupta R.C.,** 1994. Carbofuran toxicity, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 4 (4), p 383-418.
5. **Juhasz A. L., and Naidu R.,** 2001. Extraction and recovery of organochlorine pesticides from fungal mycelia. *Journal of microbiology methods*, 39, p.149-158.
6. **Veillerette, F.,** 2005. « Le piège se referme ». *Terre et vie* : 94, p.113-0237
7. **SILVYC.,** 1992. Quantifions le phytosanitaire. *Courrier de la cellule environnement de L'INRA*, n° 18, décembre 1992
8. **ACTA, 2005. Index Phytosanitaire.** 41^{ème} éd. Paris. Association de Coordination Technique Agricole. France. p820.
9. **CBIP .**centre anti-poison belge,2007,Effets indesirables et intoxication par les pyrèthrinoides utilisés contre les ectoparasite chez le chat et chez le chien ,*Folia veterinaria*,P4.
10. **Balinova, A.** 1998. Multiresidue determination of pesticides in plants by highperformance liquid chromatography following gel permeation chromatographic clean-up. *J. Chromatogr. A*. 823, 1–16.
11. **Pr.Alain BOTTA. Laurence BELLON.** Pollution chimique de l'eau et santé humaine. Service de médecine en santé au travail. Laboratoire de biogénotoxicologie et mutagenèse environnementale. (EA 1784. IFR PMSE. 112). Avril 2004. Page : 18-19.
12. **Ah-Peng, C., Rausch de Traubenberg, C.** 2004. Bryophytes aquatiques bioaccumulateurs de polluants et indicateurs écophysologiques de stress: synthèse bibliographique. *Cryptogamie, Bryologie* 25(3), 205-248.
13. **Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C.** 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* 14(4): 257–297.
14. **Aubertot, J.-N., Barbier, J.-M., Carpentier, A., Gril, J.-J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Voltz, M., Savini, S.** 2005. Pesticides, agriculture et environnement Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Paris, INRA CEMAGREF, 64.
15. **Bach, M., Huber, A., Frede, H.G.** 2001. Modeling pesticide losses from diffuse sources in Germany. *Water Sci. Technol.* 44 (7), 189-196.
16. **Baïche L.,** 2008. L'usage des pesticides : Responsables de graves conséquences sur la santé. [ACCED.over-bloc.org].
17. **Bouziani M.,** 2007. L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. *Le guide de médecine et de la santé. Santémaghreb.* [consulté le, 11/12/2011].
18. **PPDB.** Pesticide Properties Data Base (consulté le 30 /05/2012).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

19. **Extoxnet** (consulté le 2 /05/ 2012).
20. <http://aanesan.wordpress.com/2009/11/22/carbofuran-in-thailand-a-public-health-risk> consulté le 18 /06/2012.
21. **Farm Chemical Handbook** 1990.
22. **Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 2009.** Projet de décision de réévaluation du carbofuran - PRVD2009-11, Santé Canada, CANADA. Pages: 11, 12, 53, 54.
23. **DRP.** (1995). Pesticide Use Report. Sacramento, California : Environmental Protection Agency California.departement of pesticide Regulation. P78.
24. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/cadusafos-cyromazine/carbofuran/insect-prof-carbofuran.html> (Consulté le 8 /06/2012).
25. **GUPTA R.C., 1994.** Carbofuran toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health*, 43 éme éd, Pages : 383-418.
26. **Delattre J, Beaudoux J-L, Bonnefont-Rousselot D.** Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 2005, 547 pages.
27. **Hare J.** Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 2004, 351, 2112-2114.
28. **Atkin MA, Gasper A, Ullegaddi R, et al.** Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma : response to antioxidants *in vitro* and to antioxidants supplementation. *Clin Chem*, 2005, **51**, 2138-2144.
29. Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta*, 2006, **367**, 36-47.
30. **Saad A, Virella G, Chassereau Ch, et al.** OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res*, 2006, page :**47**, 1975-1983.
31. **Halliwell,B** .(1989). Freeradicals,reactive oxygen species and human disease .*BrJ Exp Patol*.70. P: 737-757.
32. **Gimpel, J.A., Lahror, J. R. andVander –Molen, A.J.,**1995. Reduction of reperfusion injury of human myocardium by allopuriol.*J. MED*.19,P: 251-
33. **Kedderis, G. L.,**1986. Biochemical basic of hepatocellular injury. *J. Toxicol. Pathol*.24,P: 77-83.
34. **Dellatre, j.G,** Durant. Jardillier, j. 2003. *Biochimie Pathologique*.Flammarion médecine science édition. P :86,90,101,109-115 ,142 ,143,172.
35. **Hayes J.D,pulford D.J** (1995). The glutathione S-Transferase Supergene family : regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Biochemistry and Molecular Biology*.30:p445-600.
36. **Hudson BI, Wendt T, Bucciarelli LG, et al.** Diabetic vascular disease: it's all the RAGE. *Antioxid Redox Signal*, 2005, **7**, 1588-1600.
37. **Akcha F., Vincent-Hubert F., Leszkowicz A.,** 2003. Potential value of the Comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for the assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research, Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534, 21-32.
38. **Bickman, J.W.; Smolen, M.J.,** 1994 Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102, 25-28.
39. **Hawkins, W.E.; Walker, W.W.; Fournie, J.W.; Manning, C.S.; Krol,**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- R.M.,2003. Use of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and guppy (*Poecilia reticulata*) in carcinogenesis testing under national toxicology program protocols. *Toxicologic Pathology.*, 31 suppl., 88-91.
40. **Cachot J.**, 1998. Caractérisation et analyse de la mutagénèse du gène suppresseur de tumeur P53 chez le flet, *Platichthys flesus* (L.). Mémoire de thèse Université d'Aix-Marseille II, 196 p.
41. **Lyons B.P., Stentiford G.D., Green M., Bignell J., Bateman K., Feist S.W., Goodsir F., Reynolds W.J., Thain J.E.**, 2004. DNA adduct analysis and histopathological biomarkers in European flounder (*Platichthys flesus*) sampled from UK estuaries. *Mutation Research*, 552, 177-186.
42. **Cachot J., Geffard O., Augagneur S., Lacroix S., Le Menach K., Peluhet L., Couteau J., Denier X., Devier M.H., Pottier D., Budzinski H.**, 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology*, 79, 257-267.
43. **White P.A., Rasmussen J.B., Blaise C.**, 1998. Genotoxic substances in the St. Lawrence system I: industrial genotoxins sorbed to particulate matter in the St. Lawrence, St. Maurice, and Saguenay Rivers, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 286-303.
44. (**Mateuca et al.,2006**) Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I and Kirsch-Volders M (2006) Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* **88**:1515-1531. McClean MD, Wiencke JK, Kelsey KT, Varkonyi A, Ngo L, Eisen EA and Herrick RF (2007) DNA adducts among asphalt paving workers. *Ann Occup Hyg* **51**:27-34.
45. **Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulsk-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H and Fenech M** (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* **28**:625-631.
46. **Lewinska D, Palus J, Stepnik M, Dziubaltowska E, Beck J, Rydzynski K, Natarajan AT and Nilsson R** (2007) Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int Arch Occup Environ Health* **P** 371-380.
47. **WRISBERG M.N.** (1990). Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis*. Physiological and biochemical approaches to the toxicological assessment of environmental pollution, ESCPB, Utrecht, 27-31 août 1990.
48. **BELDI Hayette.** 2007. Étude de *Gambusia affinis* (poissons, téléostéen) et *Donax trunculus* (mollusque, pélecypode) : écologie, physiologie et impacts de quelques alteragènes. page : 9
49. **Howell, W. M. & Denton, T. E.** (1989). Gonopodial morphogenesis in females diseas. *Canserv Res.*, 14: 513-515.
50. **Pivincka K. & Cerny K., 1996.** Poissons : 256 illustrations en couleurs. Grund. P 303.
51. **Post G. & R.A. Leasure, 1974.** Sublethal effect to three salmonid species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12: 312-319.
52. **Bent M et Dahalstrom P., 1991.** Guide des poissons d'eau douce et pêche. Delachaux et Nistlé. Paris. P 152.
53. **Jaque bruslé- Jean pierre quignard , 2001.** Biologie des poissons d'eau douces europeenes- collection aquaculture. Pisciculture p 535-544.
54. **Pyke G.H., 2005.** A review of biology of *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rev. Fish. Biol. Fisher.*, 15: 339-365.
55. **Fralval A., 2002.** Elles aussi, elles aiment les insectes, les Gambusies. *Insectes*, 125(2): 14-16.
 56. **Sheldon L et Meffe G. K., 1993.** Multivariate analysis of feeding relationships of fishes in black water streams. *Environ. Biol. Fish.* 37,2: 161-171.
 57. **Swanson C, Cech JJ. Piedrahica RH.,1996.** *Mosquitofish :Biology, culture and use in mosquito control.* University of californie pp 88.
 58. **Robbins L.W., Hartman G.D. & Smith M.H., 1987.** Dispersal, reproductive strategies, and the maintenance of genetic-variabilityb in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Copeia* 1987: 156-164.
 59. **Draredja-Beldi H., 1993.** Contribution à l'étude de *Gambusia affinis* (Téléostéen, Poeciliidae), poisson prédateur des larves de moustiques, croissance des alevens, étude du cycle sexuel et corrélations métaboliques. Thèse magister en physiologie animale. Univ. Annaba : 107p.
 60. **Dreze V., Monod G., Cravedi J.P., Biagianti-Risbourg S. & Le Gac F., 2000.** Effects of 4- nonylphenol on sex differentiation and puberty in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Ecotoxicol. Kluwer. Acad. Pub.*, 9: 93-103.
 61. **Chambolle P., 1970.** Modalités du développement et analyse des facteurs physiologiques de la reproduction chez *Gambusia* sp. (Poisson Téléstéen) ; recherches descriptives et expérimentales. Thèse 3ème cycle. Univ. Bordeaux I : 192p.
 62. **McDowall R. M., 2000.** *New Zealand Feshwater Fishes.* Auckland, New Zealand: Reed Books.
 63. **Wurtsbaugh W.A. & Cech J.J.Jr., 1983.** Growth and Activity of Juvenile Mosquitifish: temperature and ration effects. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 112: 653-660.
 64. **Busack C. A. & Gall G. A. E., 1983.** An initial description of the quantative genetics of growth and reproduction in the mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Aquaculture.*, 32:123-140.
 65. **Mineau P. (1991).** *Cholinesterase-inhibiting Insecticides.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
 66. **Trotter, D.M., Kent, R.A., P, Wong. (1991).** Aquatic fate and effect of carbofuran. *Critic. Rev.Environ. Contr.*, 21: 137-176.
 67. **Williams D, R & Giesy J, P. (1978),** "Relative importance of food and water source to cadmium uptake by *Gambusia affinis* (Poecillidae) ", *Environmental Research.* 326-332.
 68. **Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002.** Xenobiotic-induced immunomodulation in,the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research*, 54(3-5): 585-589.
 69. **Babich, H. & Borenfreund, E., 1993.** Applications of the neutral red cytotoxicity assay to risk assessment of aquatic contaminants: an overview. in "*Environmental Toxicology and Risk Assessment*". Landis, W.G., Hughes, J.S.Lewis, M.A. (Eds.). Philadelphia, American Society for Testing and Materials. **STP 1179:** 215-229.
 70. **Bradford M.M. 1976.**A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry.* 72, 248-254.
 71. **Flohe L., Gunzler W.A. 1984.** Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.*105 : 114-121
 72. **Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Featherstone R.M. 1961.** A new and rapid colorimetricdetermination of acetylcholinesterase activity. *Biochem.*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pharmacol. 7, 88-95.
73. **D'après UNPE 1999 UNEP/RAMOGÉ. (1999). Manual on the biomarked commended for the MED. POL biomonitoring programme. UNEP. Athens**
 74. **Jakanovic M., 2001.** Biotransformation of organophosphorus compounds. *toxicology.*, **166** :139-160.
 75. **Roche H., Buet A., and Ramade F., 2003.** Mise en évidence et validation de biomarqueurs écotoxicologiques dans la population d'anguilles d'un étang de la réserve naturelle nationale de Camargue, le vaccares exposée a des polluants organiques persistants. *Rev. Ecol.*, **58** :127-141.
 76. **Flammarion P., Brion F., Palazzi X., Babut M., Garric J., Migeon B., Noury P., Thybaud E., Tyler C.R., 2000.** Estrogenic effects on chub (*Leuciscus cephalus*): induction of vitellogenin and effects on the testicular structure. *Ecotoxicology*, 9: 127-135.
 77. **Dembélé, K., Haubruge,E., Gaspar, Ch., 1999** ; Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp(*Ciprinus caprio*L.) after inhibition by organophosphate and carbamate Compounds. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 62, 731-742
 78. **Ozmen M., Sener S., Mete A. and Kucukbay H.,1999.** *In vitro* and *in vivo* acetylcholinesterase inhibiption effect of new classes of organophosphorus compounds. *Environmental Toxicology and chemistry.*, **18**:241-246
 79. **McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M. and Yu H.,2000.** Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environment Toxicology and Chimistry.*, 19:2085-2092.
 80. **Sturn A., Wogram J., Segner H. and Liess M., 2000.** Differebt sensitivity to organophosphate of acetylchlinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus vaculeatus*): application on biomonitoring. *Environmental Toxicology and chemistry.*,**19**: 1607-1617.
 81. **Varo L., Navarro J.C., Amat F and Guilhermino., 2001.** Characterization of cholinesterase and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere.*,**48**: 563-569.
 82. **Blaise, C, Gagne, F., Pellerin J., hansen, P.D., Trottier, S., 2002.** Molluscan shelfish biomarkers study of the quebec, canada saguenay fjord whith the soft-shell clau.
 83. **Forbes V.A., Forbes T.L., Rivière J.L. 1997.** *Écotoxicologie: théorie et applications.* Editions Quae, Paris. 424 p.
 84. **Eldafrawi A.T. 1985.** Acetylcholinesterase and anticholinesterase. In: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (Eds.). *Compresive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* New York, *Pregamon press.*12: 115-130.
 85. **Winston G.W. 1991.** Oxidants and antioxdants in aquatic animals. *Comparatives biochistry and physiology* 100 C : 173-176.
 86. **Zhu Y., Chang Y., Chen Y .S. 2010.** Toxicity and bioaccumulation of TiO2 nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*.
 87. **Halliwell and Chirico S. 1993.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition.* 57, p.715-724.
 88. Robert, T., Hutson, D., 2006. *Metabolic Pathways of Agrochemicals.* Part two :
- Roy, J.1997. *Environmental contaminants encyclopedia: Copper entry.* National Park Service, Water Resoures Divisions, pp.99
 89. **Bocquené G. (1996).** L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité : application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- organismes marins. Thèse de Doctorat, Ecole pratique des hautes études. 250p.
90. **Bainy A.C.D., 2000.** Biochemical responses in peneids caused by contaminant *Aquaculture.*, 191: 163-168.
 91. Toutant J.P., 1989. Insect acetylcholinesterase: C atalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog. Neurobiol.* , 32: 719-734.
 92. **Fournier D. & Mutero A., 1994.** Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C: 1-9
 93. Ecobichon D.J., 1996. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen C.D. (ed.). *Casarett and Doull's toxicology; the basic science of poisons* Mc Graw-Hill, New York: 643-689.
 94. **Tomita T., Hidoh O. & Kono Y., 2000.** Abence of protein polymorphism attributable to insecticide – insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotellix cincticeps* . *Insect Biochemistry and Molecular Biology* , 30: 325-333.
 95. **Bocquené G., Galgani F. & Walker H., 1997.** Les cholinestérasés, biomarqueurs de neurotoxicité. In : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F., (eds) *Biomarqueurs en écotoxicologie –Aspects fondamentaux.* Masson, Paris : 209-204.
 96. **Forget J., Pavillon J.F., Beliaeff B. & Bocquené G., 1999.** Joint action of pollutants combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 value) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(5): 912-918.
 97. **Kammenga J.E., Dallinger R., Donker H.M., Koheler H.R., Smønsen V., Triebkorn R. & Weeks M.J., 2000.** Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assesement. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 164: 93-147.
 98. **Dellali M., Gnassia-Barelli M., Romeo M. & Aissa P., 2001.** The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.*, 130: 227-235.
 99. **Little E.E., Archeski R.D., Flerov B.A. & Koslovskay V.I., 1990.** Bihavioural indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19: 380-385.
 100. **Richmonds C. & Dutta H.M., 1992.** Effect of malathion on optomotor behaviour of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102: 523-526.
 101. **Hart A.D.M., 1993.** Relationship between behaviour and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 321-336.
 102. **Saglio P., Trijasse S. & Azam D., 1996.** Behavioural effects of water-born carbofuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31: 232-238.
 103. **Khessiba U.N., Hoarau P., Magnassia B. Aissa P. & Roméo M., 2001.** Réponse biochimique de la moule *Mytilus galloprovincialis* du lac de Bizerte (Tunisie) à une exposition du polluant chimique. *Environ. Toxicol. Chem.*, 40 : 222-229.
 104. **Zinkl J.G., Lockhart W.L., Kenny S.A., & F.J. Ward, 1991.** The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In: Cholinesterase-Inhibiting Insecticides* (Mineau P., ed.), pp.233-254. New York: Elsevier
 105. **Fernández J., Otero J. & De Coa A., 1984.** Contribución al estudio de la coquina (*Donax trunculus* L.) en Galicia. *Actas do IV Simposio Ibérico do Estudos do Benthos Marinho*, II: 133-142.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

106. Dutta H.M. & Arends D.A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile blue gill sunfish. *Environmental Research*, 91: 157-162.
107. Renden-von Osten J., Ortiz-Arana A., Guirhermino L. and Soares A.M.V.M., 2005. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed to pesticides. *Chemosphère.*, 58:627-636. Renden-Vonosten *et al.*, 2005
108. Fairbrother A., Marden B.T., Bennet J.K and Hooper M.J., 1991; methods used in determination of cholinesterase activity in: Mineau p.(Ed), *Chemicals in Agriculture. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo*, Vol 2:35-71.
109. Chuiko G.M., Zhelnin Y.Y et Pod gornaya V.A., 1997. Seasonal fluctuations in brain acetylcholinesterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus L*) : a freshwater fish from Northwest Russia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107: 251-257
110. Fernandez-Vega C., Sancho E., Ferando M.D. & Andreu-Moliner E., 2002. Thiobencarb induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla Anguilla*. *Pestic. Biochem. and Physiol.*, 72: 55-63.
111. Bernhoorn I.E.J. & Van Vuren J.H.J., 2004. The use of different enzymes in feral freshwater as a tool for the assessment of water pollution in Africa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 59: 180-185
112. Bretaud S., Toutant J.P. & P. Saglio, 2000. - Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 47: 117-124.
113. Zaidi N., 2005. Effets secondaires d'un insecticide sélectif (Dimilin) sur un organisme non ciblé, *Gambusia affinis*: croissance, activités enzymatiques et analyse par CLHP des résidus. Mémoire de Magistère. Université d'ANNABA. Algérie.
114. Chouahda S., 2006. Impact de deux xenobiotiques (cadmium et halofénozide) sur *Gambusia affinis* et evaluation du stress environnemental dans le golf de ANNABA par l'utilisation de *Donax trunculus*. Mémoire de Magister. Université d'ANNABA.
115. Leineo S., Lehtoten K.K, 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma Balthica* from the northern Baltic sea. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 140: 408-21.
116. Machreki-Ajmi M., Ketata I., Ladhar-Chaabouni R., Hamza-Chaffai A., 2008. The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Ceratoderma glaucum*. *Ecotoxicology.*, 17:1-11
117. Roméo M., 2007. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Environ Int.*, 33:27-33.
118. Manna, G.K., Sadhukhan, A. 1986. Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT). *Curr. Sci. India*. 55 (10), 498-501.
119. Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat. Res.* 399, 125-133
120. Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538, 81-91.
121. Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271
- 122. HANNA G.K., BANERJEE G. & GUPTA S.** (1985). Micronucleus test in the peripheral erythrocytes of the exotic fish *Oreochromis massambica*. *The nucleus.*, 28 (3): 176-179.
- 123. WILLIAMS R.C. & METCALFE C.D.** (1992). Development of an *in vivo* hepatitic micronucleus assay with rainbow trout. *Aquatic Toxicology.*, 23: 193-202.
- 124. JAYLET A., GATHIER L. & FERNANDEZ M.** (1987). Detection of mutagenicity in drinking water using a micronucleus test in newt larvae (*Pleurodeles walt*), *Mutagenesis*, 2 (3): 211-214.
- 125. AFNOR** (1987). Essais des eaux. Détection en milieu aquatique de la génotoxicité d'une substance vis-à-vis de larves de batraciens (*Pleurodeles walt* et *Amphystoma mexicanum*). Essai des Micronoyaux. Association Française de Normalisation, T90-325
- 126. WRISBERG M.N.** (1990). Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis*. Physiological and biochemical approaches to the toxicological assessment of environmental pollution, ESCPB, Utrecht, 27-31 août 1990
- 127. IANDOLT M.L. & KOCAN R.M.** (1983). Fish cell cytogenetics: A measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. In *Aquatic toxicology* (Nriagu, J.R. Ed), New-York, John Wiley and Sons, 336-353.
- 128. HOSE J.E., CROSS J.N., SMITH S.G. & DIEHL D.** (1987). Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. *Mar. Environm. Resear.*, 22: 167-176.

ANNEXES

Annexes

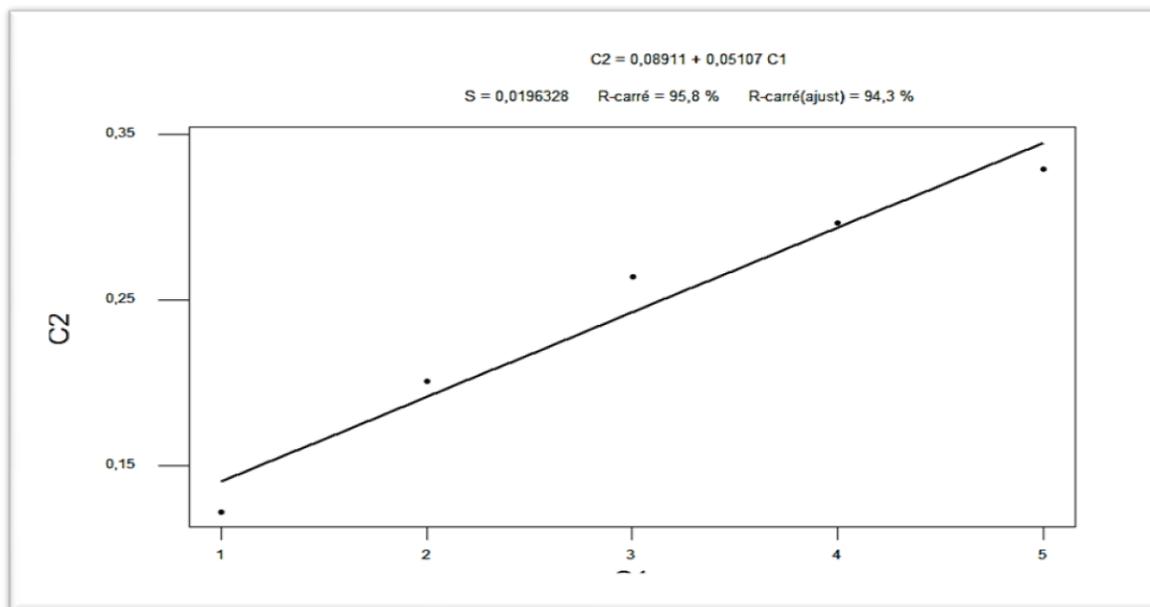
Annexe 01: réalisation de la gamme d'étalonnage

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA (μl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μl)	100	80	60	40	20	0
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

Annexe 02: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Quantité d'albumine BSA ($\mu\text{g/ml}$)	20	40	60	80	100
DO	0.1215	0.2007	0.2640	0.2964	0.3290

Annexe 03: courbe d'étalonnage des protéines tissulaire utilisant le sérum albumine bovine (BSA)



Annexes

Annexe 04 : Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) de l'activité spécifique de l'ACHE ($\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) chez *Gambusia Affinis* ($m \pm s$, $n=8$)

Source	DL	SC	CM	F	P
Dose	2	27,84598	13,92299	2,1E+06	0,000***
Temps	2	2,49856	1,24928	1,9E+05	0,000***
Interaction	4	2,23369	0,55842	8,6E+04	0,000***
Erreur	63	0,00041	0,00001		
Total	71	32,57863			

Annexe 05 : Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) de l'activité spécifique de GPx ($\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) chez *Gambusia Affinis* ($m \pm s$, $n=8$)

Source	DL	SC	CM	F	P
Dose	2	9,57903	4,78952	9,3E+05	0,000***
Temps	2	16,05315	8,02658	1,6E+06	0,000***
Interaction	4	5,99717	1,49929	2,9E+05	0,000***
Erreur	63	0,00033	0,00001		
Total	71	31,62968			

Annexe 06: Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) de la formation des micronoyaux ($\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) chez *Gambusia Affinis* ($m \pm s$, $n=8$)

Source	DL	SC	CM	F	P
Dose	2	12,250	6,125	8,41	0,001
Temps	2	6,583	3,292	4,52	0,015
Interaction	4	7,167	1,792	2,46	0,054
Erreur	63	45,875	1,792		
Total	71	71,875	0,728		

Annexes

Annexe 07: Variation de l'activité enzymatique du GPx chez *G.affinis* traité par le carbofuran à raison de 7,66 et 5,75 mg /l.

Séries Temps	Témoïn N=8	DL50/4 N=8	DL50/3 N=8
7j	0,0427±0,0146	0,1032±0,0103	0,1366±0,0166
15j	0,0292 ±0,0147	0,1666 ±0,0182	0,2046 ± 0,0136
40j	0,0427 ± 0 ,0146	0,1842± 0,0037	0,2212± 0,0152

NS: non significatif.

*significatif (P≤0,05).

** hautement significatif (P≤0,01).

*** très hautement significatif (P≤0,001).

Annexe 08: Variation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase chez *G.affinis* traité par le carbofuran (DL50/4, DL50/3) durant 7, 15 et 40 J.

Séries Temps	Témoïn N=8	DL50/4 N=8	DL50/3 N=8
7j	2,2193±0,0412	2,2126±0,0737	0,8421± 0,0298
15j	2,2954 ± 0,0296	1,6686±0,0682	0,8100 ± 0,04
40j	2,2193± 0 ,0485	0,7500± 0,06	0,6300± 0,05

NS: non significatif.

*significatif (P≤0,05).

** hautement significatif (P≤0,01).

*** très hautement significatif (P≤0,001).