



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 Des êtres vivants

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option: Santé et environnement

Thème :

Etude de l'impact d'un pesticide, le Décis sur une espèce bioindiatrice du pollution, vers de terre : Biochimie et biomarqueurs du stress environnemental.

Présenté par :

BRAHAM Aouatef

MANSOUR Loubna

Devant le jury :

Dr. TINE DJBBAR F.	M.C.A	Université de Tébessa	Présidente
Dr. TINE S.	M.C.A	Université de Tébessa	Rapporteur
Dr . BOUZERAA H.	M.C.B	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : 01/06/2017

Note : Mention :

Année 2016/2017

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier le tout puissant, notre DIEU, le clément et le miséricordieux, de nous avoir donné la clair voyance et la persévérance, pour mener à terme ce travail, prière et salut sur notre prophète MOHAMED.

A nos parents et tous nos frères et sœurs de leur soutien et leur grande affection et les grands efforts pour nous aider à réaliser ce travail.

Nos plus vifs remerciements à notre professeur et encadreur Dr. Tine-Samir, son savoir, son ouverture d'esprit, ses conseils ont marqué à jamais notre pensée.

Un grand remerciement aux honorables membres du jury : Dr. Tine Djebbar F, d'avoir accepté la présidence du jury de notre travail, qu'il trouve ici toutes nos expressions respectueuses.

Dr. Bouzeraa Hayette d'avoir accepté de faire partie des membres du jury

Nos remerciements s'adressent également à ceux qui ont contribué

De loin ou de près à la réalisation de ce travail.



BRAHAM AOUATEF

MANSOUR LOUBNA

*LISTE DES
MATIÈRES*

Liste des matières

1. RESUME.....	1
2. INTRODUCTION.....	4
3. MATERIEL ET METHODES.....	7
3.1. Présentation de matériel biologique.....	7
3.2. Technique d'élevage.....	7
3.3. Présentation du Décis et traitement	8
2.3.1. Propriétés du Décis	8
3.4. Essais toxicologique.....	9
3.5. Etude de la croissance des adultes.....	9
3.6. Dosage Biochimique.....	10
3.6.1. Dosage des protéines totales.....	12
3.6.2. Dosage des glucides totaux.....	12
3.6.3. Dosage des lipides totaux.....	13
3.7. Dosage des Biomarqueurs.....	13
3.7.1. Dosage des glutathion-S-transférases.....	13
3.7.2. Dosage de la catalase.....	15
4. RESULTATS.....	18
4.1.1. Essais toxicologiques du Décis par rapport au juvénile <i>A. caliginosa</i>	18
4.1.2. Essais toxicologiques du Décis sur les adultes <i>A. caliginosa</i>	19
4.2. Effet du Décis sur la croissance des adultes d' <i>A. caliginosa</i>	19
4.2.1. Effet du Décis sur la taille des adultes.....	19
4.2.2. Effet du Décis sur le poids des adultes d' <i>A. caliginosa</i>	20
4.3. Effet du Décis sur la composition biochimique d' <i>A. caliginosa</i>	22
4.3.1. Effet sur le contenu en protéines totales.....	22
4.3.2. Effet sur le contenu en glucides totaux.....	23
4.3.3. Effet sur le contenu en lipides totaux.....	25
4.4. Effet du Décis sur les biomarqueurs	27
4.4.1. Effet du Décis sur l'activité spécifique des GSTs	27

4.4.2. Effet du Décis sur la catalase	29
5. DISCUSSION.....	32
5.1. Toxicité du Décis.....	32
5.2. Effet du Décis sur la croissance.....	33
5.3. Effet du Décis sur la composition biochimique.....	34
5.4. Effet du Décis sur les biomarqueurs.....	36
5.4.1. Effet sur l'activité spécifique des GSTs.....	36
5.4.2. Effet sur l'activité spécifique de la catalase.....	37
6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	40
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	41

*LISTE DES
ABBREVIATIONS*

Liste des abréviations

DR/2 : dose recommander inferieur (moitie)

DR : dose recommandé

DR×2 : dose recommandé fois deux

DR×5 : dose recommandé fois cinq

DR×10 : dose recommander fois dix

CL25 : Concentration létale de 25 de la population

CL50 : concentration létale de 50 de la population

CL90 : concentration létale de 90 de la population

GST : glutathion S_ transférase

CAT : catalase

Trs : tours

1v/1V : deux solutions avec un même volume

m : moyenne

mm : milli mètre

mg : milligramme

min : minute

SEM : écart - moyen

n : nombre de répétitions

l : largeur

L : longueur

H : hauteur

h : heure

p : coefficient

μM : micro mole

μg/mg : micro gramme sur milligramme

μl : micro litre

*LISTE DES
TABLEAUX*

liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau01	Dosage des protéines totales chez les vers de terre : réalisation de la gamme d'étalonnage.	12
Tableau02	Dosage des glucides totaux chez les vers de terre : réalisation de la gamme d'étalonnage.	12
Tableau03	Dosage des lipides totaux chez les vers de terre : réalisation de la gamme d'étalonnage.	13
Tableau 04	Toxicité du Décis ($\mu\text{g}/\text{mg}$) administré à différentes doses appliquées sur des juvéniles d' <i>A.caliginosa</i> après un mois d'exposition : mortalité corrigée (%) ($m \pm \text{sem}$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 10 individus).	18
Tableau05	Efficacité du Décis ($\mu\text{g}/\text{mg}$) appliquées sur des juvéniles d' <i>A .caliginosa</i> à un mois : analyse de probits.	18
Tableau06	Effet du Décis sur la taille (mm) des adultes d' <i>A. caliginosa</i> ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune 5 individus).	20
Tableau07	Effet du Décis sur le poids corporel (mg) des adultes d' <i>A. caliginosa</i> ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune 5 individus).	21
Tableau08	Effet du Décis sur le contenu en protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> au cours de différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions).	22
Tableau09	Effet du Décis sur le contenu en glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> au cours de différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions).	24
Tableau10	Effet du Décis sur le contenu en lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez les adultes d' <i>A.caliginosa</i> au cours de différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions).	26
Tableau11	Effet du Décis sur l'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de	28

	protéine) chez les adultes d' <i>A.caliginosa</i> au cours de différentes périodes ($m \pm sem$, n=3 répétitions).	
Tableau12	Effet du Décis sur l'activité spécifique de la catalase ($\mu M/min/mg$ de protéine) chez les adultes d' <i>A. caliginosa</i> au cours de différentes périodes ($m \pm sem$, n=3 répétitions).	30

*LISTE DES
FIGURES*

liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 01	Site d'élevage (photo personnelle).	8
Figure02	Produit utilisé (photo personnelle).	8
Figure 03	Etude de la croissance des adultes <i>d'A. caliginosa</i> (photo personnelle).	10
Figure 04	Extraction des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko <i>et al.</i> , 1967).	11
Figure 05	Extraction et dosage des glutathion-S-transférases (Habig <i>et al.</i> , 1974).	15
Figure 06	Extraction et dosage de la catalase (Claiborne, 1985).	17
Figure 07	Courbe de référence exprimant le taux de mortalité corrigée() transfert des logs dose.	19
Figure 08	Effet du Décis sur la taille (mm) des adultes <i>d'A. caliginosa</i> (m ± sem, n=3 répétitions comportant chacune 5 individus).	20
Figure09	Effet du Décis sur le poids corporel (mg) des adultes <i>d'A. caliginosa</i> (m ± sem, n=3 répétitions comportant chacune 5 individus).	21
Figure10	Effet du Décis DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10 sur le contenu en protéines totales (µg/mg) chez les adultes <i>d'A. caliginosa</i> à différentes périodes (m ± sem, n=3 répétitions).	23
Figure11	Effet des Décis DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10 sur le contenu en glucides totaux (µg/mg) chez les adultes <i>d'A. caliginosa</i> à différentes périodes (m ± sem, n=3 répétitions).	25
Figure12	Effet des Décis DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10 sur le contenu en lipides totaux (µg/mg) chez les adultes <i>d'A. caliginosa</i> à différentes périodes (m ± sem, n=3 répétitions).	27
Figure13	Effet du Décis sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéine) chez les adultes <i>d'A. caliginosa</i> au cours de différentes périodes (m±sem , n=3 répétitions).	29

Figure14	Effet du Décis sur l'activité spécifique de la catalase (CAT) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes <i>d'A. caliginosa</i> au cours de différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions) .	31
----------	--	----

RESUME

Résumé

1. RESUME

Notre travail a pour but d'évaluer l'éventuel d'un insecticide le Decis sur un organisme bioindicateur de pollution un vers de terre *A. caliginosa*. Plusieurs aspects ont été déterminés :

Aspect toxicologique : a permis d'établir les concentrations létales, après un mois de traitement .l'insecticide Decis a montré une toxicité à l'égard des juvéniles de *A .caliginosa* avec une relation dose - réponse.

La croissance :l'insecticide Decis inhibent de manière significative la croissance des vers de terre *A.caliginosa*.

Aspect biochimique : a été déterminé par le dosage des réserves métabolique chez les adultes de *A. caliginosa* témoins et traitées à différentes temps. Les résultats montrent une variation de ces contenus après traitement.

Biomarqueurs : L'insecticide Decis provoque une déclenchement (induction) d'un système de détoxification (GST) et la stimulation de l'activité enzymatique anti- oxydant: la catalase est également observée au cours de la période de traitement (un,deux mois).

Mots clés : *Aporrectodea caliginosa*, Decis, toxicité, croissance, biochimie, biomarqueurs.

يهدف عملنا إلى تقييم مدى إمكانية تأثير مبيد الحشرات Décis تلوث مؤشرات بيولوجية دودة

: بإيجاد الجرعات المميتة بعد شهر من العلاج بمبيد الحشرات Décis اظهر سمية على

طرديا جرعة استجابة.

مبيد Décis يمنع إلى حد كبير نمو ديدان الأرض,

الجانب البيوكيميائي: تم تحديده بواسطة معايرة المدخرات الاستقلابية للبالغين و المعالين خلال , أظهرت
البيوكيميائي خلال فترات زمنية مختلفة .

المؤشرات الحيوية: مبيد الحشرات GST و تحفيز نشاط إنزيم

لوحظ أيضا خلال شهر شهرين من .

الكلمات المفتاحية: , الجانب البيوكيميائي. , Decis, Aporrrectodea caliginosa,

Abstract

Abstract

Our work aims to evaluate the possible of an insecticide the Decis on a bioindicating organism of pollution a worm *A.caliginisa*.Severl aspects have been identified:

Toxicological aspects: Established lethal concentrations after one month of treatment. Decis insecticide showed toxicity to *A.caliginosa* juveniles with a dose response relationship.

Growth: Decis insecticide significantly inhibits the growth of *A.caliginosa* worms.

Biochemical Aspect: was determinated by metabolic stoking in adults of *A.caliginosa* controls and treated at different times.The results show a variation of these contents after treatement .

Biomarkers :The Decis insecticide triggers a triggering (induction)of a detoxification system(GST) and stimulation of the antioxidant enzyme activity :catalase is also observed during the treatment period (one two months).

Keywords:*A.caliginosa*,Decis,toxicity,growth,biochemistry,biomarkers.

Introduction

2. INTRODUCTION

La propagation de l'industrialisation, la naissance de nouvelles technologies, l'accroissement de la population, le développement de l'agriculture et l'obligation de l'Algérie à améliorer ses productions agricoles dans le but de résoudre, les problèmes de nutrition (Ayad-Mokhtari, 2012). Pour atteindre cet objectif, les agriculteurs doivent utiliser des engrais et des pesticides afin d'améliorer la production de la biomasse.

En Algérie, l'utilisation des pesticides à usage agricole est de plus en plus fréquente, suite à l'augmentation des superficies cultivées. Ainsi, près de 400 substances actives de pesticides, dont environ 7000 spécialités, y sont commercialisées annuellement (Bouziani, 2007) et constituent des outils nécessaires, voire indispensables pour les agriculteurs, puisqu'ils assurent la rentabilité de la majorité de leurs productions (Louchahi, 2015).

L'utilisation abusive et non contrôlée des engrais et les produits phytochimiques par la plupart des agriculteurs, et dans l'absence pratiquement totale des structures de suivi et de contrôle sur l'utilisation et les effets secondaires des produits phytosanitaires et des engrais sur le sol, l'eau, le végétal et sur la santé des êtres vivants (Aissaoui, 2012). Tous ces facteurs présentent une menace qui pèse sur l'environnement.

La pollution du sol peut apparaître de différentes manières. Une grande partie des composés, qui ont l'influence sur le sol et sur les organismes qu'ils contiennent (Bliefert & Perraud, 1997). Les causes de la pollution des sols liées à l'activité agricole proviennent essentiellement de l'existence, dans les produits utilisés pour fertiliser ou traiter les cultures, différents composés toxiques (Mazoyer, 2002).

Les pesticides sont parmi les polluants les plus dangereux de l'environnement en raison de leurs stabilités, leurs mobilités et les effets à long terme sur les organismes vivants. Le devenir des pesticides concerne tous le milieu naturel dans son ensemble (sol, eau et air) mais le sol reste un compartiment clé car une grande proportion des pesticides appliqués lors du traitement des cultures arrive au sol, par application directe et /ou par lessivage du feuillage (R.calvet, 2005).

Les vers de terre représentent une composante majeure de la macrofaune du sol dans la plupart des écosystèmes terrestres. Ils peuvent constituer jusqu'à 90% de la biomasse des invertébrés dans les sols. Leurs populations varient de quelques individus à plus de 1000 individus par mètre carré (Edwards, 2004). Dans les sols de forêt tropicale humide, ils peuvent représenter plus de 50% de la biomasse totale de la macrofaune (Fragoso & Lavelle, 1992). Ils sont connus pour

Introduction

jouer un rôle clé dans la modification physico-chimique et biologique des sols. Ainsi, ils assurent de nombreuses fonctions dans les sols et sont à l'origine de nombreux services écosystémiques tels que l'incorporation de la matière organique dans les sols, le fonctionnement des cycles biogéochimiques, et le maintien des conditions physico-chimiques favorables pour les plantes et les autres organismes du sol, notamment les microorganismes (Brown *et al.*, 2000; Lavelle *et al.*, 2006; Blouin *et al.*, 2013).

On sait que les organismes du sol affectent la croissance des plantes, amélioration de la minéralisation de la matière organique du sol et modification des propriétés physiques et chimiques du sol (Bardgett *et al.*, 2005 Lavelle & Espagne, 2001) . Dans les organismes du sol, les vers de terre sont en terme de biomasse et activité parmi les plus importants détritvovores dans les écosystèmes terrestres (Edward, 2004).

Les vers de terre appartiennent à la macrofaune du sol et sont considérés comme des organismes « ingénieurs ». Selon Jones *et al.* (1994), « les ingénieurs des écosystèmes sont des organismes qui influencent directement ou indirectement la disponibilité des ressources pour les autres organismes, à travers des modifications physiques et chimiques du milieu. »

Donc, toute modification du sol due aux produits phytochimiques vont avoir un effet sur le ver de terre, ainsi que sur la santé des sols. La menace des sols contaminés par les produits phytochimiques pourrait être évalué à travers les vers de terre (Lukkari *et al.*, 2005) , qui sont utilisés comme des bioindicateurs dans les études d'écotoxicité. Par conséquent, ils ont été utilisés en tant qu'espèce indicatrice pour l'évaluation écotoxicologique, évaluation des risques et suivi de la qualité de l'environnement (Curry *et al.*, 2008; Mahajan *et al.*, 2007; Muthukaruppan *et al.*, 2005; Hund-Rinke *et al.*, 2003).

Un certain nombre d'études de toxicité ont été menés sur l'effet des produits phytochimiques sur les vers de terre. La plupart de ces études ont été menés sur l'effet des pesticides (Rallmbke *et al.*, 2007 ; Lagan & Shaw, 2006 ; Kalka *et al.*, 2002 ; Patnaik & Dash, 1990). La majorité des travaux ont été réalisés pour évaluer le risque potentiel des pesticides organophosphorés comme le malathion et le fenitrothion dans l'agro-écosystème tropical en utilisant le ver de terre comme espèce d'essai (Panda & Sahu, 1999, 2004; Patnaik & Dash, 1990). Peu d'études ont également été menés sur l'effet toxique de l'imidaclopride, un insecticide neonicotinoïde commun, sur le ver de terre (Capowiez *et al.*, 2005, 2006), dans l'agro-écosystème tropical. Très peu d'études ont été menés sur la toxicité des engrais sur les vers de terre. Par ailleurs, Estevez *et al.* (1996) et Curry *et al.* (2008) ont signalés des effets positifs des engrais sur les vers de terre en augmentant leur

Introduction

population. Par contre, Bunemann *et al.* (2006), Mahajan *et al.* (2007) et Tindaon *et al.* (2011) ont rapportés les effets négatifs des engrais sur les vers de terre.

Pour notre travail on voulait connaître l'effet d'un pesticide (insecticide) qui est le Décis sur une espèce dominante de vers de terre dans la région de Tébessa, *Aporrectodea caliginosa*.

Et pour cela, nous avons étudiés l'effet de ce produit au cours de deux mois, essai sur plusieurs aspects, à savoir :

- Aspect toxicologique pour déterminer les concentrations létales (CL 25, CL50 et CL90) de Décis sur les juvéniles et les adultes des vers de terre au cours d'un mois de traitement.
- Indice biologique de croissance des adultes *Aporrectodea caliginosa* après deux mois d'exposition.
- Aspect biochimique des adultes *Aporrectodea caliginosa* par la détermination du contenu biochimique en protéines, glucides et lipides au cours de la même période.
- Biomarqueurs de détoxification, les glutathions S-transférases (GSTs), et de catalase après le traitement.

*Matériels et
méthodes*

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Présentation de matériel biologique :

Le matériel biologique qu'on a utilisé pour effectuer notre travail est représenté par *Aporrectodea caliginosa* (Vigot & Cluzeau , 2014).

La position systématique d'*Aporrectodea caliginosa* selon la dernière classification est la suivante :

- Règne : Animalia
- Phylum : Annelida
- Classe : Clitellata
- Sous-classe : Oligochaeta
- Superordre : Megadrili
- Ordre : Opisthopora
- Sous-ordre : Lumbricina
- Superfamille : Lumbricoidea
- Famille : Lumbricidae
- Genre : *Aporrectodea*
- Espèce : *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826)

3.2. Technique d'élevage :

Les juvéniles et les adultes des vers de terre sont récoltés de 3 sites d'échantillonnages non traités de la ville de Tébessa (Fig. 01). Les vers de terre (adultes, juvéniles) sont élevés au laboratoire dans des boîtes en plastique de dimension (l: 26 × L : 16,5 × H :12 cm) contenant 500g de sol.

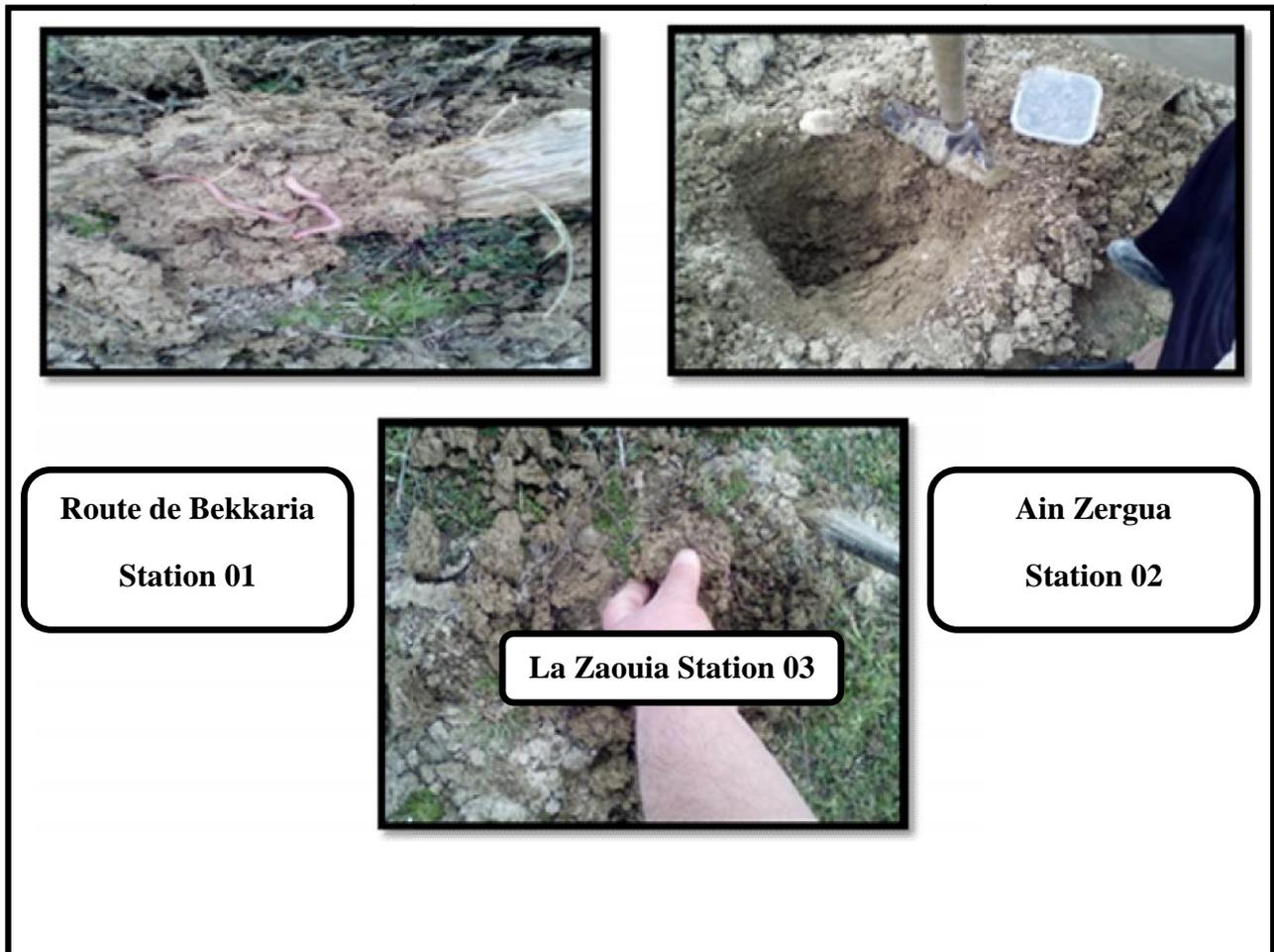


Figure 1 : Sites d'élevage (photo personnelle).

3.3. Présentation du Décis et traitement :

2.3.1. Propriétés du Décis :

Décis 25EC est un insecticide à base de Deltaméthrine, substance active de la famille des pyrethrinoides, de synthèse. Il possède un large spectre d'action et agit par contact et ingestion sur un grand nombre d'insectes suceurs et broyeur. Il est caractérisé par une action rapide (remarquable effet de choc) et un effet répulsif sur les insectes volants (Fig. 02).



Figure 2 : Le produit utilisé (photo personnelle).

Matériel et Méthodes

3.4. Essais toxicologique :

Pour réaliser l'essai toxicologique on a procédé comme suit:

- Trois lots de 10 individus avec trois répétitions ont été placés dans des boites en plastique de dimension (l : 26 × L : 16,5 × H : 12 cm) contenant 500 g du sol naturel.
- On a appliqué cinq (5) doses : DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10 avec un lot témoin (aucune dose n'a été appliquée).
- Le sol est renouvelé chaque trois jour avec le traitement pour éviter la contamination par les champignons, les levures et les moisissures.
- Conditions de laboratoire :
 - Photopériodes : 12 h de lumière / 12 h d'obscurité.
 - Température : 20±2 °C.
 - le PH : ajusté sur 6,0±0,5.
 - humidité : de 35 % .

3.5. Etude de la croissance des adultes :

Pour voir l'effet du Décis sur la croissance des adultes *d'Aporrectodea caliginosa* on a procédé comme suit :

- Trois lots de 5 individus avec trois répétitions ont été placés dans des boites en plastique de dimension (l : 26 × L : 16,5 × H : 12 cm) contenant du sol naturel (500g).
- Les lots témoins et les lots traités DR et D×2 sont disposés dans des conditions : Température : 20°C, PH : ajusté sur 6,0±0,5, l'humidité : 35 % , photo période 12 h de lumière/ 12 h d'obscurité.
- Le traitement a été appliqué tous les trois jours, les individus sont mesurés et pesés chaque semaine pendant 2 mois (Fig. 03).

Matériel et Méthodes

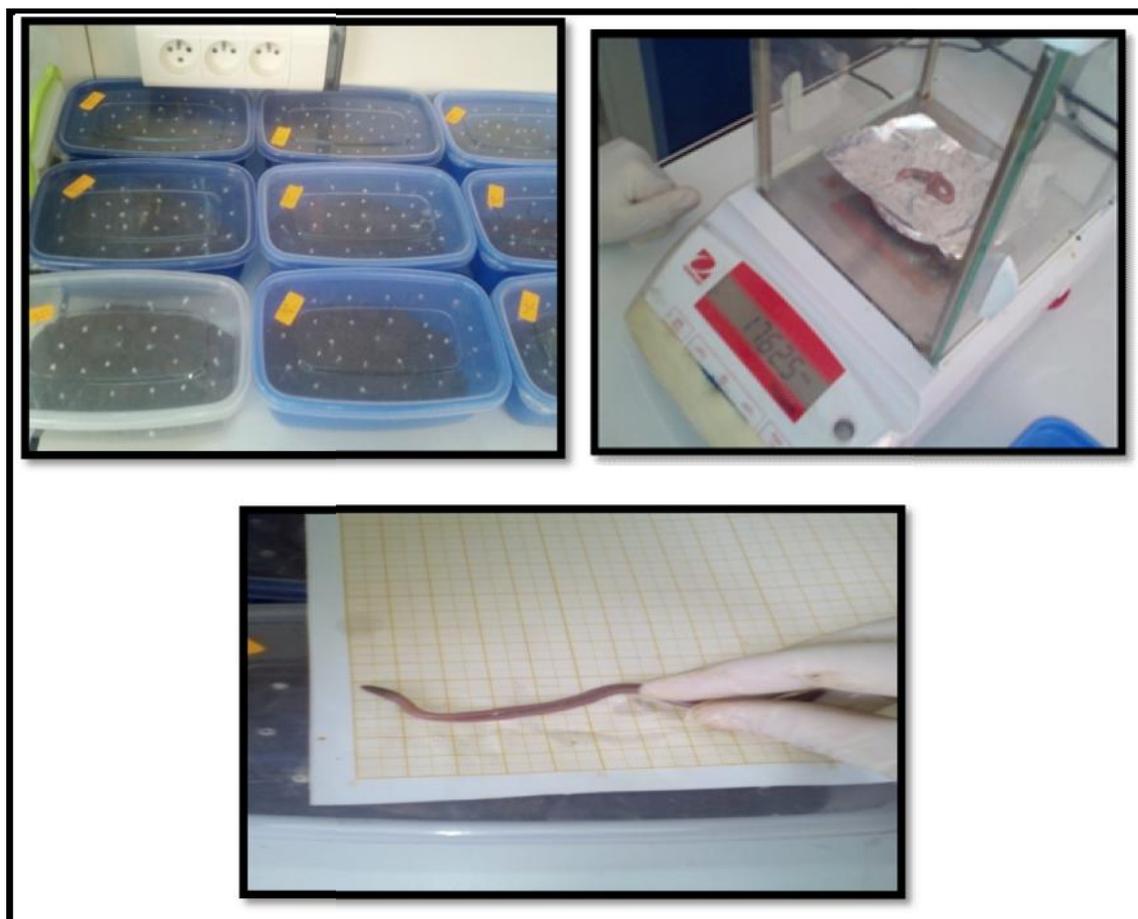


Figure 3: Etude de la croissance des adultes d'*Aporrectodea caliginosa*

(Photo personnelle).

3 .6. Dosage Biochimique :

L'extraction des différents métabolites a été réalisée selon le procédé de (Shibko *et al.*, 1966) et les principales étapes sont résumées dans la figure 04 . Les échantillons (100 mg de poids frais d'*Aporrectodea caliginosa*) sont placés dans des tubes eppendorf contenant 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 % et broyés. Après une première centrifugation (5000 trs / min, 10 min), le surnageant I obtenu est utilisé pour le dosage des glucides totaux selon la méthode de Duchateau & Florkin, (1959). Au culot I, on ajoute 1 ml de mélange éther/chloroforme et après une seconde centrifugation (5000 trs/min, 10 min), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides totaux (Goldworthy *et al.*, 1972) et le culot II dissout dans la soude (0,1 N), servira au dosage des protéines totales selon Bradford, (1976).

Echantillon (100 mg d'*A caliginosa*)

↓10

1ml de TCA (à20%)



Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

3.6.1. Dosage des protéines totales :

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976) dans une fraction aliquote de 100 μ l à laquelle on ajoute 4 ml de réactif du bleu brillant de comassie (BBC) G 250 (Merck). Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (BSA) titrant 1 mg/ml (Tab. 01).

Tableau 01 : Dosage des protéines totales chez les vers de terre : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution standard d'albumine (μ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μ l)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantité d'albumine (μ g)	0	20	40	60	80	100

3.6.2. Dosage des glucides totaux :

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de Duchateau & Florkin (1959). Cette méthode consiste à additionner 100 μ l du surnageant contenu dans un tube à essai, avec 4 ml du réactif d'antrone et de chauffer le mélange à 80 °C pendant 10 min, une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présente dans l'échantillon, la lecture de l'absorbance est faite à une longueur d'onde de 620 nm. La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de glucose (1 mg/ml).

Tableau 02 : Dosage des glucides totaux chez les vers de terre : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose (μ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μ l)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'antrone (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantité de glucose (μ g)	0	20	40	60	80	100

Matériel et Méthodes

3.6.3. Dosage des lipides totaux :

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972) en utilisant le réactif sulfophosphovanillinique. Le dosage des lipides se fait sur des prises aliquotes de 100 μ l des extraits lipidiques ou de gamme étalon auxquelles on évapore totalement le solvant puis on ajoute 1ml d'acide sulfurique concentré, les tubes sont agités et mis pendant 10 min dans un bain de sable à 100 °C. Après refroidissement, on prend 200 μ l de ce mélange au quel on ajoute 2,5 ml de réactif sulfophosphovanillinique. Après 30 min à l'obscurité, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide ortho phosphorique, des complexes roses. La solution mère des lipides est préparée comme suit : on prend 2,5 mg d'huile de table (tournesol 99% triglycérides) dans un tube eppendorf et on ajoute 1 ml d'éther chloroforme (μ l) (Tab. 03).

Tableau 03 : Dosage des lipides totaux chez les vers de terre : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tube	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (μ l)	0	20	40	60	80	100
Solvant (éter/chloroforme) (μ l)	100	80	60	40	20	0
Quantité de lipides (μ g)	0	50	100	150	200	250

3.7. Dosage des Biomarqueurs :

Les adultes d'*Aporrectodea caliginosa* des séries témoins et traitées aux Décis (DR/2, DR, DR \times 2, DR \times 5 et DR \times 10) ont fait l'objet d'un dosage des glutathion-S-transférases (GSTs) et de catalase (CAT) à différentes périodes après traitement (un mois, deux mois). Par ailleurs, le contenu en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminé, afin de pouvoir calculer les différentes activités spécifiques et le taux du glutathion.

3.7.1. Dosage des glutathion S-transférases :

Les glutathion-S-transférases (GSTs) représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles, essentiellement cytosoliques, impliquées dans diverses opérations de transports et de biosynthèse intracellulaire. Les GSTs, jouent un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques ; elles catalysent souvent la conjugaison des molécules électrophiles avec le glutathion réduit (GSH). Les produits sont ensuite métabolisés en acide mercapturique et excrétés au niveau de la bile et des urines (Habig *et al.*, 1974). Les adultes d'*Aporrectodea caliginosa* (100 mg de poids

Matériel et Méthodes

frais de l'individu) des témoins et traitées, sont prélevées à différentes périodes (un mois, deux mois), broyées dans 1ml de tampon phosphate de sodium (0,1 M, Ph 6). L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune de 100 mg de poids frais de l'individu (partie de corps) avec une série témoin. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé (14000 trs/min à 4°C pendant 30 min), le surnageant récupéré servira au dosage de l'activité des GSTs (Fig. 05). Le dosage est réalisé selon la méthode de Habig *et al*, (1974), il consiste à faire réagir 200µl de surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM)/GSH (5mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0,1 M, pH 6)]. La lecture des absorbances est effectuée toutes les 1 min pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant. L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante :

$$X = \frac{Do}{9.6} \times \frac{vt}{vs} \text{ /mg de proteine}$$

X : millimoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (mM/min/mg de Protéines).

Do : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du Temps.

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB (mM-1 cm-1).

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

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

Matériel et Méthodes

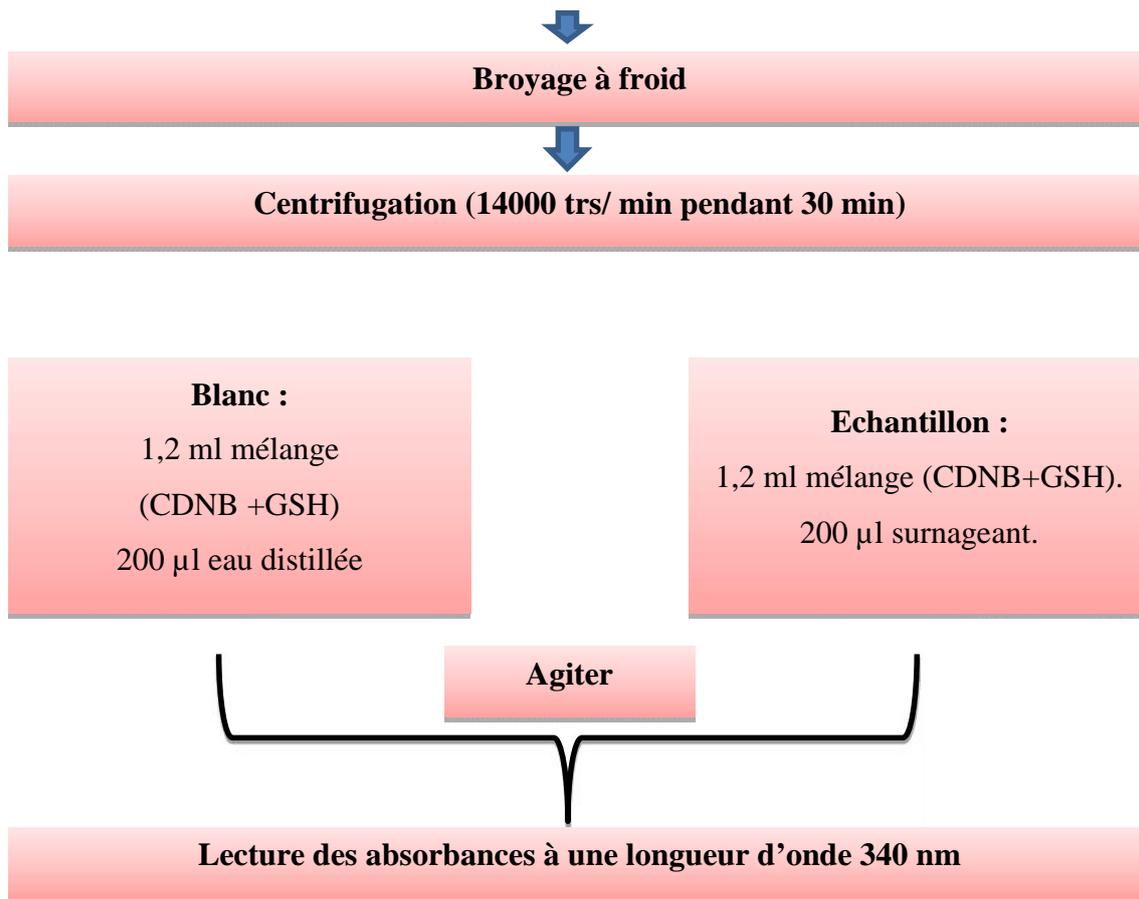
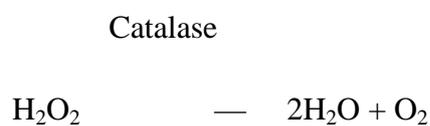


Figure 5: Extraction et dosage des glutathion S transférase (Habig *et al.*, 1974).

3.7.2. Dosage de la catalase :

Le dosage de la catalase (CAT) est réalisé selon la technique de Claiborne (1985). Cette technique est basée sur la mesure spectrophotométrique de la réduction de l'eau oxygénée (H_2O_2) en une molécule d'oxygène (O_2) et deux molécules d'eau (H_2O) en présence de la CAT à une longueur d'onde UV de 240 nm, selon la réaction suivante :



Les adultes d'*Aporrectodea caliginosa* témoins et traités, sont prélevés à différentes périodes (un mois, deux mois), l'essai est conduit avec 3 répétitions comportant 100 mg de poids frais de l'individu.

Les 100 mg sont homogénéisées dans 1ml de tampon phosphate (100 mM, pH 7,4), puis centrifugées à 15000 trs/min, pendant 10 min. Le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme. Le dosage de l'activité de la catalase s'effectue dans une cuve de spectrophotomètre

Matériel et Méthodes

en quartz à 25⁰C, sur une fraction aliquote de 50 µl du surnageant dilué de façon à se situer entre 1 et 1,5 mg de protéines/ml, soit 0,05 à 0,75 mg dans la cuve, à la quelle on ajoute 750 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7,4). Après agitation, la lecture est effectuée au spectrophotomètre. L'activité décroît rapidement, il est donc important de mettre toujours le même temps entre le pipetage du surnagent et le moment où on place la cuve dans le spectrophotomètre. La lecture des absorbances s'effectue après 15 secondes d'attente toutes les 5 secondes pendant 30 secondes à une longueur d'onde de 240 nm contre un blanc avec 800 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) et 200 µl de H₂O₂.

L'activité spécifique est calculée selon la formule suivante :

$$X = \frac{D_{0max} - D_{0min}}{0,04} \text{ mg de protéines}$$

X : micromole de substrat réduit par minute et par mg de protéines (µM/mn/mg de protéines).

D₀ max : densité optique maximum obtenue.

D₀ min : densité optique minimum obtenue.

0,04 : coefficient d'extinction molaire du H₂O₂ (cm⁻¹ .mM⁻¹).

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

Matériel et Méthodes

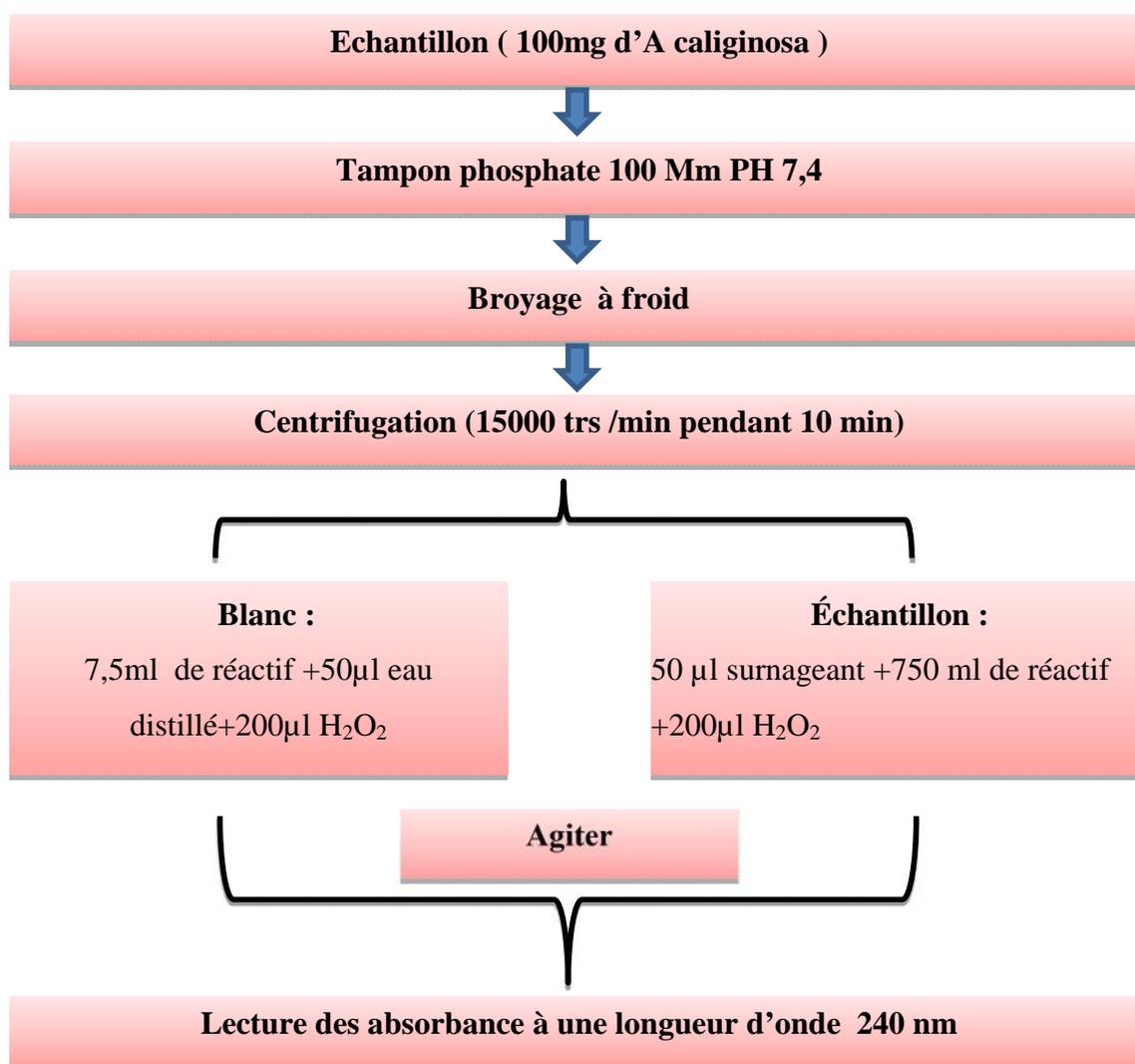


Figure 6 : Extraction et dosage de la catalase (Claiborne, 1985).

Résultats

Résultats

4. RESULTATS

4.1.1. Essais toxicologiques du Décis par rapport au juvénile *Aporrectodea caliginosa*

Après traitement avec le Décis à différentes doses (DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10), les résultats concernant la mortalité corrigée après un mois de traitement sont mentionnés dans le tableau 04. Il est de l'ordre de 0.00 ± 0.00 % chez les séries témoins et augmente chez les séries traitées jusqu'à 100% pour la dose la plus élevée DR×10.

Tableau 04: Toxicité du Décis ($\mu\text{g}/\text{mg}$) administré à différentes doses appliquées sur des juvéniles d'*A. caliginosa* après un mois d'exposition : mortalité corrigée (%) ($m \pm \text{sem}$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 10 individus).

Dose \ Répétition	Témoins	DR/2	DR	DR×2	DR×5	DR×10
R1	0	0	70	70	90	100
R2	0	30	50	90	100	100
R3	0	40	60	80	100	100
m ± sem	0.00±0.00	23.33±15.55	60.00±6.66	80.00±6.66	96.66±4.44	100.00±0.00

La détermination de CL25, CL50 et CL 90 sont fait grâce à un logiciel GRAPH PAD PRISM. Il ressorts les résultats que la CL 50 ($0.43\mu\text{g}/\text{mg}$) est presque le double de la CL25 ($0.24\mu\text{g}/\text{mg}$). La CL 90 affiche une valeur de $1.36 \mu\text{g}/\text{mg}$ avec un intervalle de confiance allait de 0.96 à 1.93.

Tableau 05: Efficacité du Décis ($\mu\text{g}/\text{mg}$) appliqué sur des juvéniles d'*A. caliginosa* à un mois : analyse de probits.

Insecticide	R ²	Slope	CL25 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) IC (95 %)	CL50 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) IC (95 %)	CL90 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) IC (95 %)
Décis	0,9931	1,50	0,24 (0,19- 0,31)	0,43 (0,37- 0,50)	1,36 (0,96- 1,93)

Résultats

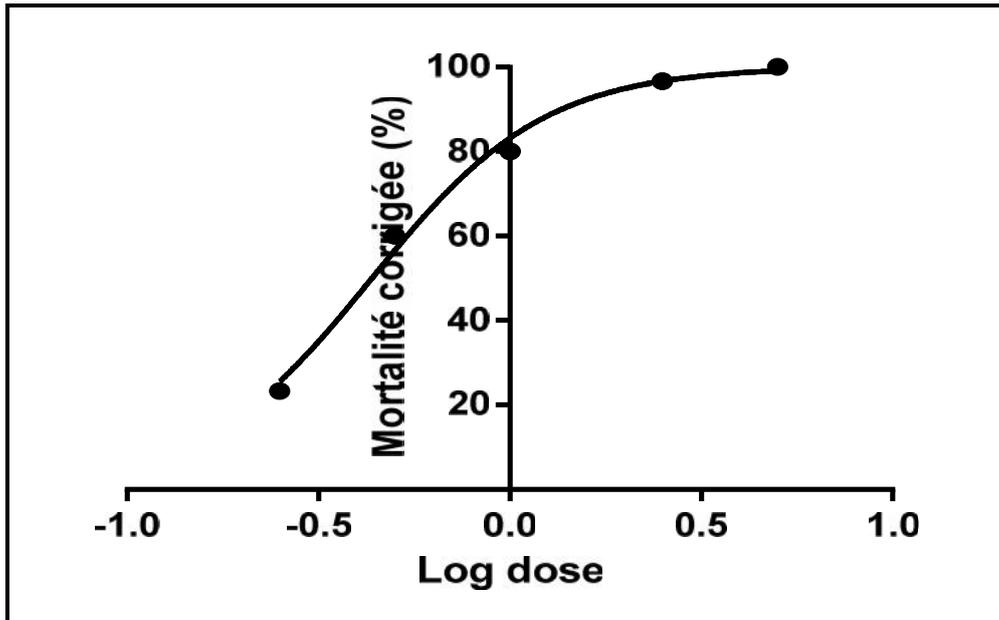


Figure 7 : Courbe de référence exprimant le taux de la mortalité corrigée (%) transfert des logs dose.

4.1.2. Essais toxicologiques du Décis sur les adultes *Aporrectodea caliginosa*

Différentes concentrations D/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ont été appliquées sur les adultes d'*A. caliginosa*. Aucun mort n'a été observé chez les adultes après un mois d'exposition.

4.2. Effet du Décis sur la croissance des adultes d'*A. caliginosa* :

4.2.1. Effet du Décis sur la taille des adultes :

La taille des adultes montre une variation non significative ($p > 0,05$) par rapport au témoin et cela au cours des 7 premières semaines de traitement, pour la dose DR, à la 8^{ème} semaine on note une différence significative ($p = 0,011$) et cela pour la même dose.

Concernant la taille corporelle des adultes pour la dose appliquée DR×2 montre une variation significative et cela pour les semaines 1, 3, 4, 5, 6 et 7 (S1 : $p = 0,031$, S3 : $p = 0,016$, S4 : $p = 0,036$, S5 : $p = 0,008$, S6 : $p = 0,006$, S7 : $p = 0,002$). Cette variation de taille est non significative ($p > 0,05$) pour les semaines 2 et 8. (Tab 06, fig. 08).

L'analyse de la variation à un critère nous a permis de constater qu'il n'existe pas de différence significative ($p > 0,05$) au cours du temps de traitement chez les séries témoins, par contre la

Résultats

taille corporel des adultes montre une différence très significative et cela aussi bien pour les séries traitées DR ($p=0.003$) et DR $\times 2$ ($p=0.000$).

Tableau 06 : Effet du Décis sur la taille (mm) des adultes d'*A. caliginosa* ($m \pm sem$, $n=3$ répétitions comportant chacune 5 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Temps dose	Semaine 1	Semaine2	Semaine3	Semaine4	Semaine 5	Semaine 6	Semaine7	Semaine 8
Témoin	12,50 \pm 2,27a A	12,93 \pm 2,34 a A	13,47 \pm 2,10 a A	13,67 \pm 1,91 a A	13,60 \pm 1,84 a A	13,87 \pm 1,99 a A	13,83 \pm 1,91 a A	12,87 \pm 1,88 a A
DR	11,27 \pm 1,62 a A	11,80 \pm 1,44 a B	12,20 \pm 2,24 a C	12,87 \pm 2,52 a D	13,33 \pm 2,22 a E	13,87 \pm 2,14 a F	13,83 \pm 2,24 a G	12,87 \pm 2,03 b H
DR $\times 2$	14,00 \pm 1,73 b A	14,40 \pm 2,11 a B	15,13 \pm 1,38 b C	15,43 \pm 1,59 b D	15,83 \pm 1,69 c E	15,93 \pm 1,93 c F	16,27 \pm 1,92 c G	12,47 \pm 1,83 a H

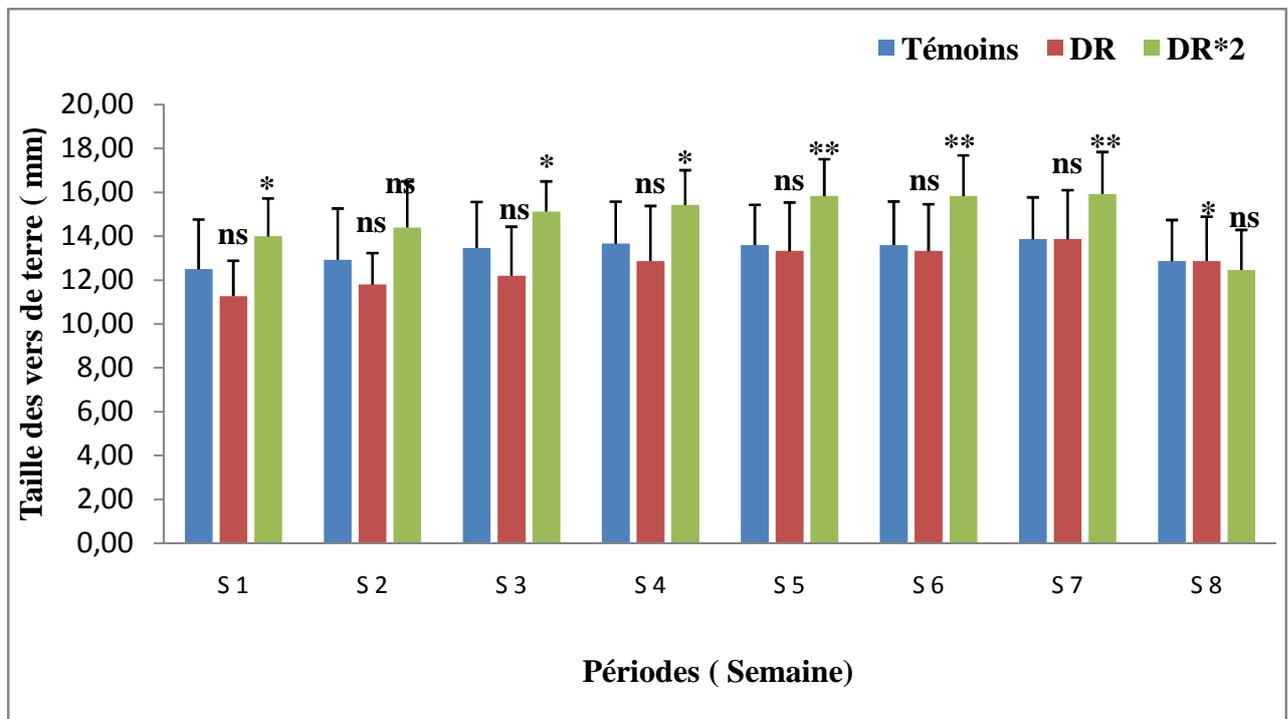


Figure 8 : Effet du Décis sur la taille (mm) des adultes d'*A. caliginosa* ($m \pm sem$, $n=3$ répétitions comportant chacune 5 individus).

4.2.2. Effet du Décis sur le poids des adultes d'*A. caliginosa* :

Les résultats de l'évolution du poids corporel des adultes d'*A. caliginosa* sont mentionnés dans le tableau 07 et la figure 09. Il ressort les résultats que l'évolution du poids dans la série témoin ne montre pas de différence au cours du temps, le poids corporel montre une variation significative ($p<0,05$) par rapport aux témoins et cela au après 8 semaine de traitement, par

Résultats

rapport à toutes les doses appliquées DR, DR×2, excepté à 5, 6 et 7 semaine où on note une variation non significative ($p>0,05$) de poids corporel des adultes d'*Aporrectodea caliginosa* chez les séries traités par la dose DR×2.

L'analyse de la variation à un critère nous a permis de constater qu'il n'existe pas de différence significative ($p>0,05$) au cours de temps de traitement chez les séries témoins, par contre le poids corporel des adultes montre une différence très significative et cela aussi bien pour les séries traitées DR ($p=0.000$) et DR×2 ($p=0.002$).

Tableau 07 : Effet du Décis sur le poids corporel (mg) des adultes d'*A. caliginosa* ($m \pm sem$, $n=3$ répétitions comportant chacune 5 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

temps \ Dose	Semaine 1	Semaine2	Semaine3	Semaine4	Semaine 5	Semaine 6	Semaine7	Semaine 8
Témoins	1,86±0.29 a A	1,90±0.34 c A	1,91±0.27 c A	1,92±0.31c A	1,92±0.49c A	1,94±0.53b A	1,94±0.56c A	1,68±0.29 c A
DR	0,99±0.16c A	1,07±0.14 c B	1,07±0.15 c C	1,10±0.16 c D	1,14±0.17 c E	1,18±0.20c F	1,18±0.15 c G	0,85±0.15 c H
DR×2	1,53±0.26b A	1,56±0.26 b B	1,62±0.24 b C	1,47±0.29b D	1,59±0.27 a E	1,94±0.31 a F	1,75±0.31 a G	1,23±0.25c H

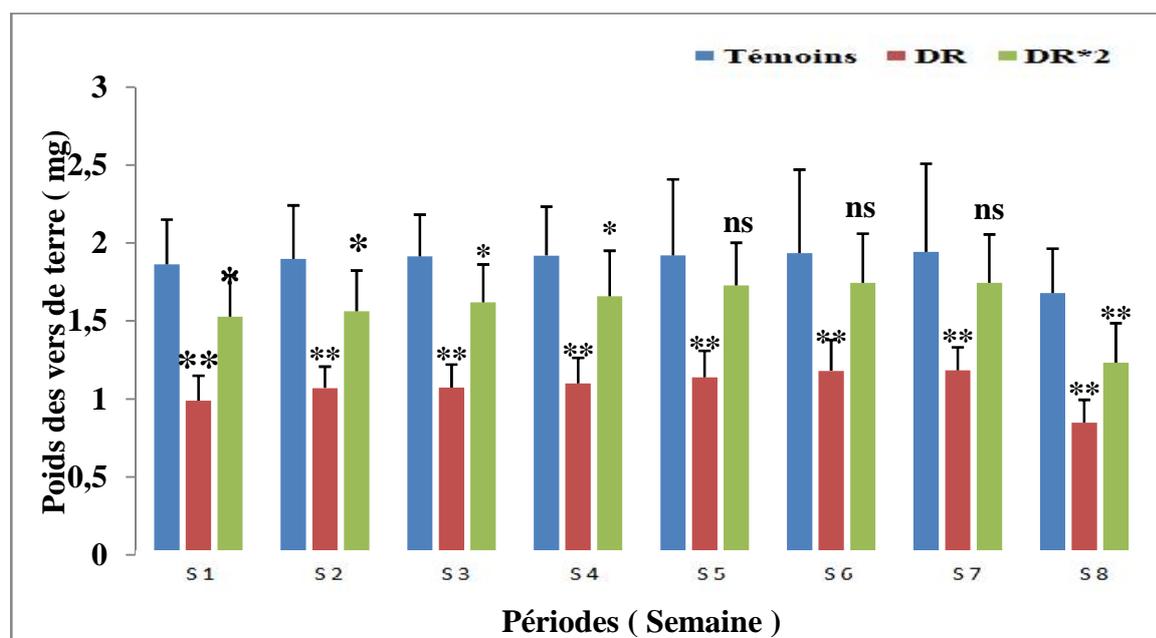


Figure 09: Effet du Décis sur le poids corporel (mg) des adultes d'*A. caliginosa* ($m \pm sem$, $n=3$ répétitions comportant chacune 5 individus).

Résultats

4.3. Effet du Décis sur la composition biochimique d'*A. caliginosa* :

Différentes concentrations de Décis DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10 (µg/mg) ont été appliquées sur les adultes d'*A. caliginosa*, l'effet de cet insecticide a été évalué sur le contenu en glucides, lipides et protéines un et deux mois de traitement.

4.3.1. Effet sur le contenu en protéines totales :

Le contenu en protéine montre une variation non significative ($p > 0,05$) pour toutes les doses appliquées par rapport au témoin et cela après le premier mois de traitement montre une diminution significative chez les séries traitées (DR/2 et DR : $p = 0.013$), et une diminution très significative pour les doses DR×2 ($p = 0,001$), DR×5 ($p = 0.000$) et DR×10 ($p = 0,004$) (Tableau 08, Figure 10).

De même on note une différence très significative entre le premier mois et deuxièmes mois de traitement et cela dans chaque série : Témoin ($p = 0.000$), DR/2 ($p = 0.001$), et non significative ($p > 0,05$) pour les autres doses appliquées DR, DR×2, DR×5 et DR×10.

Tableau08: Effet du Décis sur le contenu en protéines totales chez les adultes d'*A. caliginosa* au cours de différentes périodes ($m \pm sem$, $n = 3$ répétitions). (Comparaison des moyennes à différentes temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

dose \ période	1 mois	2 mois
Témoins	46,97±4,1 a A	50,27±3,98 a B
DR/2	47,73±6,43 a A	46,94±0,40 b B
DR	39,54±4,31 a A	46,94±0,40 b A
DR×2	37,68±2,15 a A	43,87±1,93 c A
DR×5	46,24±3,14 a A	46,63±1,00 c A
DR×10	49,07±6,59 a A	61,14±4,88 c A

Résultats

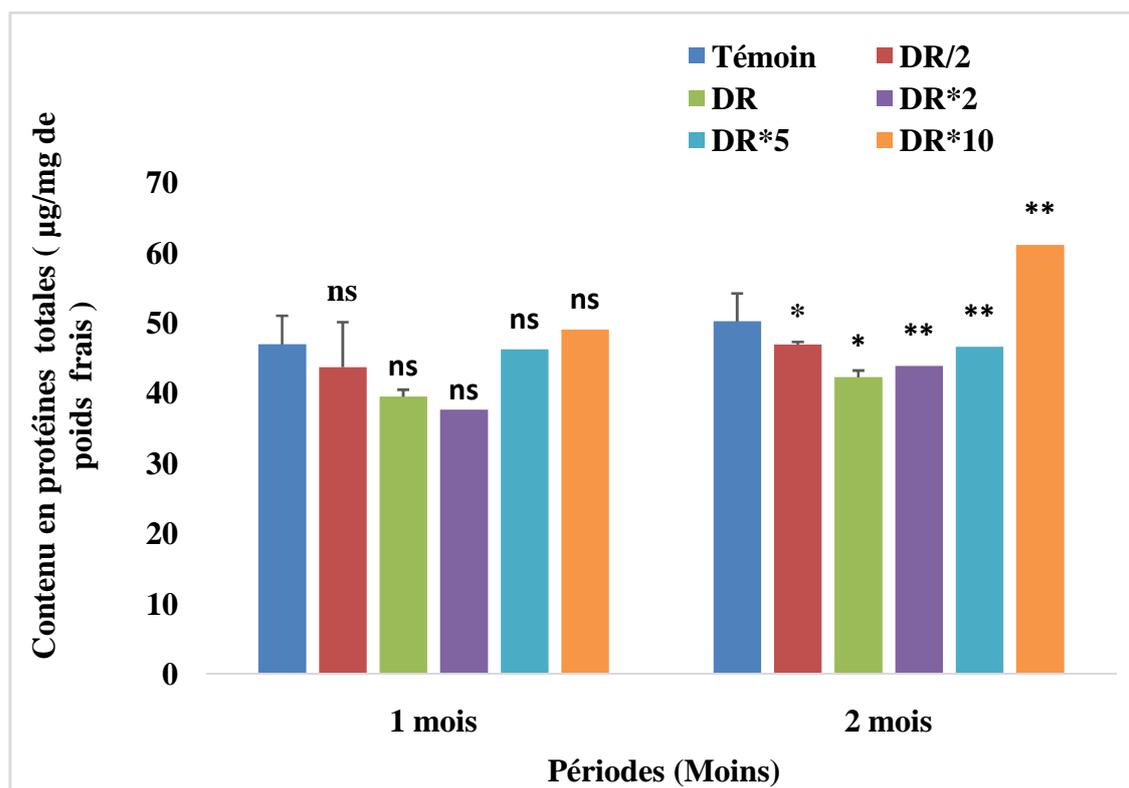


Figure 10 : Effet du Décis DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10 sur le contenu en protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez les adultes d'*A. Caliginosa* à différentes périodes.

4.3.2. Effet sur le contenu en glucides totaux :

Le contenu en glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) montre une diminution non significative ($P > 0.05$) par rapport au témoin et cela pour les doses appliquées DR/2, DR et DR×5 et une diminution significative pour les doses DR×2 ($p=0,037$) et DR×10 ($p=0,029$) et cela aussi bien après le premier mois de traitement que le deuxième mois de traitement qu'il montre une diminution non significatives ($P > 0,05$) par rapport au témoin et cela pour toutes les doses appliqués DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10. (Tableau 09, Figure11).

De même on note une différence significative entre le premier mois et deuxièmes mois de traitement et cela dans chaque série : Témoin ($p= 0.010$), DR/2 ($p= 0.001$), DR ($p= 0.014$), DR×2 ($p=0.031$), DR×5 ($p=0.021$) et DR×10 ($p= 0.000$).

Résultats

Tableau 09: Effet du Décis sur le contenu en glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez les adultes d'*A. caliginosa* ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions). (Comparaison des moyennes à différentes temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).

dose \ période	1 mois	2 mois
Témoins	93,48 \pm 3,75 a A	17,54 \pm 4,91 a B
DR/2	38,82 \pm 2,48 a A	17,45 \pm 2,07 a C
DR	33,59 \pm 5,78 a A	14,3 \pm 3,51 a B
DR \times 2	30,92 \pm 5,36 b A	14,3 \pm 3,51 a B
DR \times 5	24,2 \pm 1,83 a A	12,59 \pm 3,45 a B
DR \times 10	21,56 \pm 0,96 b A	12,13 \pm 0,25 a B

Résultats

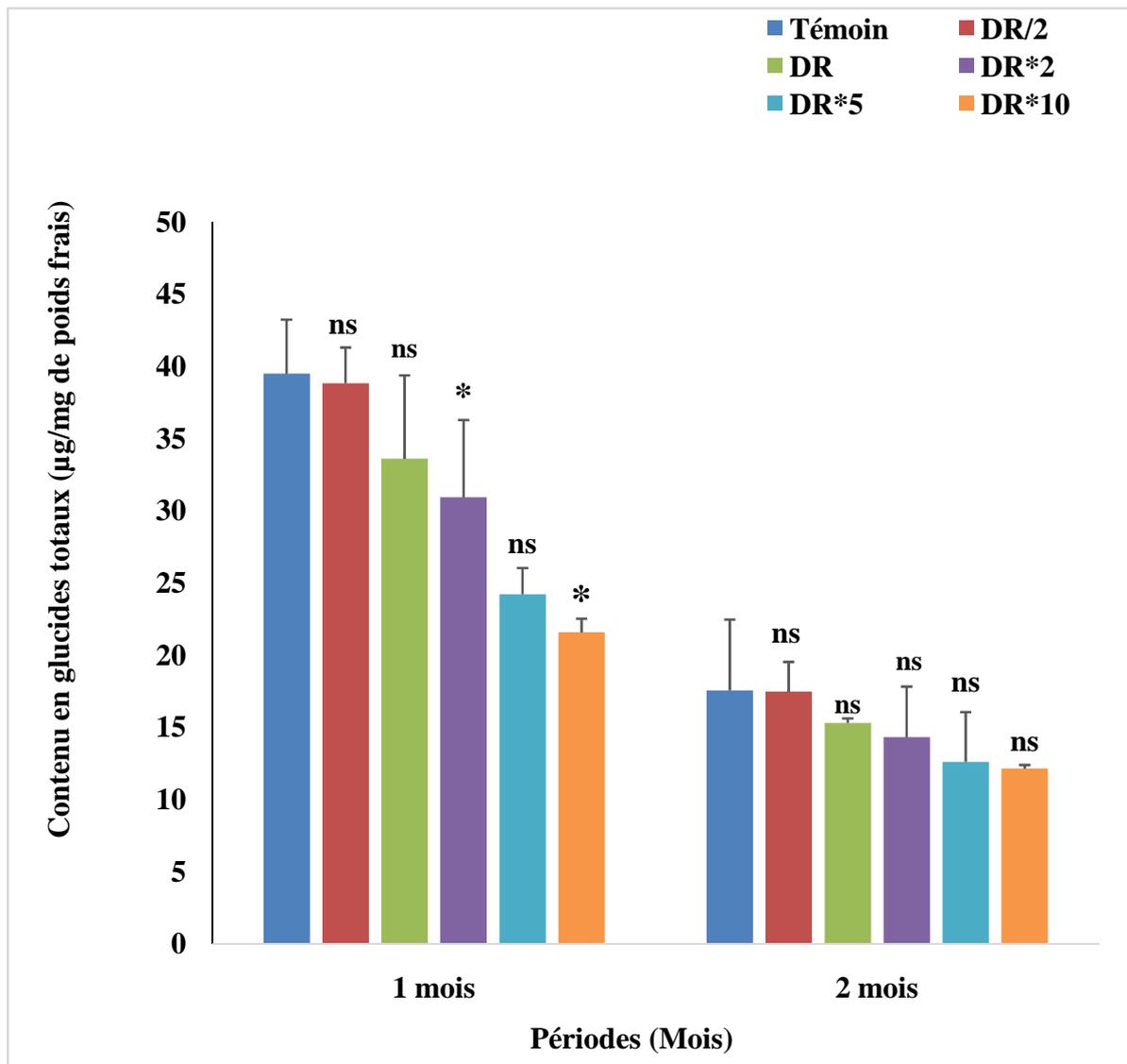


Figure 11: Effet du Décis DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10 sur le contenu en glucides totaux (µg/mg) chez les adultes d' *A. caliginosa* à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions).

4.3.3. Effet sur le contenu en lipides totaux :

D'après les résultats présentés dans le tableau 11 et la figure 12, concernant le contenu en lipide on note que ce dernier diminue de façon non significative ($p > 0,05$) par rapport aux témoins et cela aussi bien après le premier mois de traitement pour toutes les doses appliquées DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10 aussi que le deuxième mois montre une diminution non significative ($p > 0,05$) et cela aussi bien pour la DR/2, DR, DR×2 et DR×10 sauf pour la série DR×5 on note une diminution significative ($p = 0,033$).

Résultats

De même on note une diminution significative entre le premier mois et deuxièmes mois de traitement et cela dans chaque série : Témoin ($p= 0.024$), DR/2 ($p= 0.005$), et non significative ($p>0,05$) chez les séries traitées DR×2, DR×5 et D×10.

Tableau10 : Effet du Décis sur le contenu en lipides totaux chez les adultes d'*A. caliginosa* au cours de différentes périodes ($m\pm sem$, $n=3$ répétitions). (Comparaison des moyennes à différentes temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

dose \ période	1 mois	2 mois
Témoins	12,42±3,25 a A	3,2±0,39 a B
DR/2	10,34±0,13 a A	3,8±1,52 a B
DR	10,34±0,13 a A	4,99±2,11 a A
DR×2	8,79±1,94 a A	5,71±2,74 a A
DR×5	7,52±1,75 a A	4,71±0,3 b A
DR×10	7,92±2,85 a A	3,9±0,99 a A

Résultats

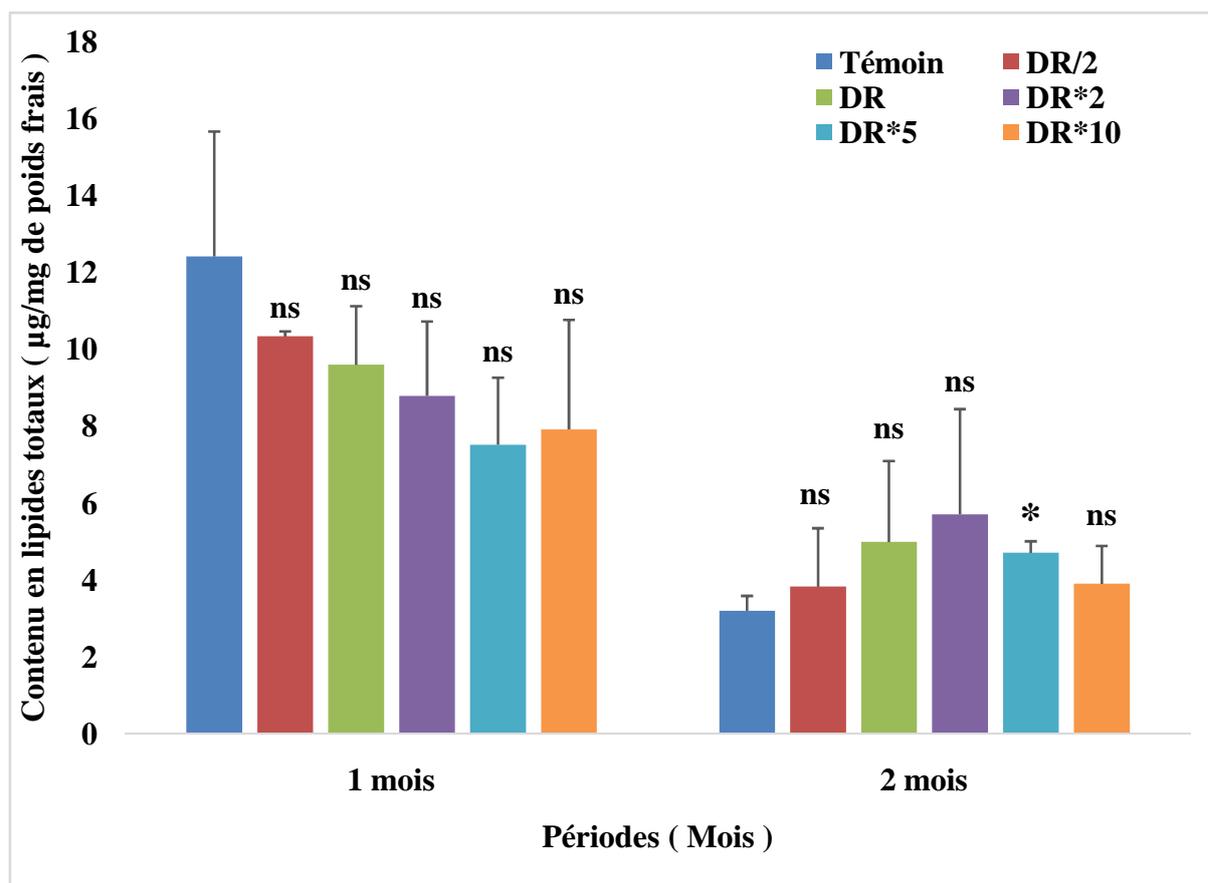


Figure 12 : Effet du Décis DR/2, DR, DR×2, DR×5 et DR×10 sur le contenu en lipides totaux (µg/mg) chez les adultes d'*A. caliginosa* à différentes périodes (m ± sem., n=3 répétitions).

4.4. Effet du Décis sur les biomarqueurs :

4.4.1. Effet du Décis sur l'activité spécifique des GSTs :

L'activité spécifique des glutathion -S- transférases a été estimée chez les séries témoins et traitées par application de formule de Habig *et al.* (1974). Les résultats sont exprimés en micromoles par minutes et par milligramme de protéines (µM/min/mg de protéines). Les résultats sont mentionnés dans le tableau 12 et la figure 13, montrent une augmentation non significative de l'activité spécifique de la GST par rapport au témoin et cela après un mois de traitement pour la dose DR/2 et une augmentation significative avec les autres doses appliquées (DR×2 : p=0,007, DR×5 : p=0,031 et DR×10 : p=0,002).

Concernant les variations de l'activité spécifique de la GST après deux mois de traitement on note une augmentation très significative (p=0,004, p=0,000) et cela aussi bien pour les DR×5, DR×10 et une augmentation significative (p=0,016) pour la dose DR×2 et une augmentation non significative (p>0,05) et cela aussi bien pour la dose DR/2 et DR.

Résultats

De même on note une augmentation non significative ($p>0,05$) entre le premier mois, le deuxième mois et cela dans chaque série témoin, DR/2, DR, DR×2, DR×5 et une augmentation significative ($p=0.006$) pour la dose la plus élevée DR×10.

Tableau 11: Effet du Décis sur l'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes d'*A. caliginosa* au cours de différentes périodes ($m\pm\text{sem}$, $n=3$ répétitions). (Comparaison des moyennes à différentes temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).

dose \ période	1 mois	2 mois
Témoins	0,803±0,64 a A	0,855±0,100 a A
DR/2	0,816±0,027 a A	0,804±0,059 a A
DR	0,890±0,007 a A	0,900±0,059a A
DR×2	1,732±0,106 c A	1,901±0,078 b A
DR×5	2,353±0,302 b A	2,410±0,028 c A
DR×10	2,592±0,087 c A	2,912±0,052 c B

Résultats

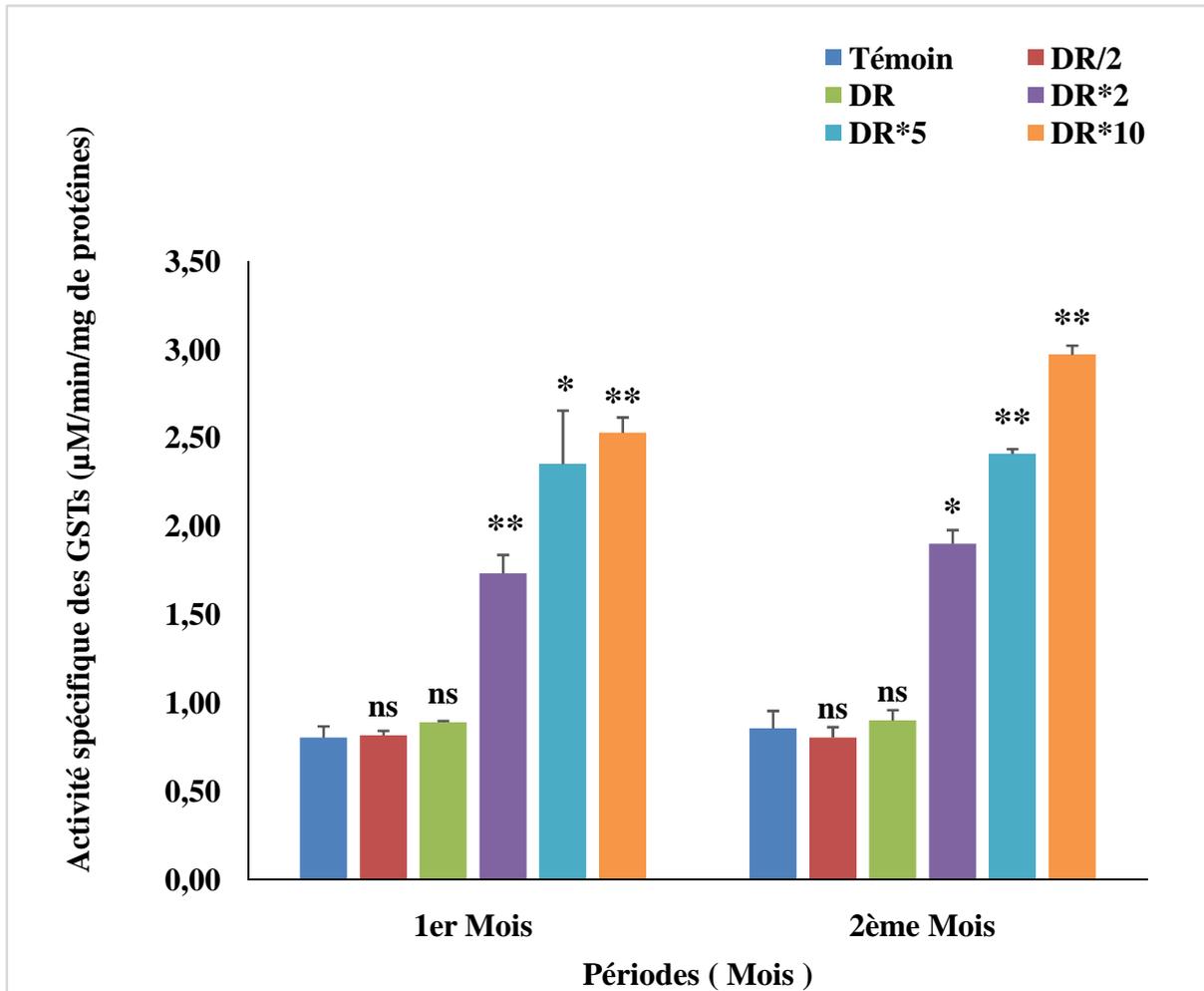


Figure 13: Effet du Décis sur l'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes d'*A. caliginosa* au cours de différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions).

4.4.2. Effet du Décis sur la catalase :

L'activité spécifique de la catalase a été estimée chez les séries témoins et traitées par application de formule de la formule de Claiborne (1985). Les résultats sont exprimés en nanomètres par minutes et par milligramme de protéines ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines). Ils sont mentionnés dans le tableau 12 et la figure 14, où on observe une augmentation significative de l'activité spécifique de la catalase (CAT) par rapport au témoin et cela après un mois de traitement pour les doses (DR \times 5, DR \times 10 : $p=0,001$), significative (DR \times 2 : $p=0,024$) et une augmentation non significative ($p>0,05$) chez les doses DR/2 et DR.

L'activité spécifique de la catalase après deux mois de traitement montre une augmentation très significative ($p=0,005$) et pour le dose DR \times 10, significative pour les doses DR \times 2 : $p=0,041$ et DR \times 5 : $p=0,013$) et une augmentation non significative ($p>0,05$) pour la dose DR/2 et DR.

Résultats

De même on note une augmentation non significative ($p > 0,05$) entre le premier mois, et le deuxième mois et cela entre les séries témoin, DR/2, DR, DR×2 et DR×5 et une augmentation significative ($p = 0,026$) pour la dose la plus élevée DR×10.

Tableau 12 : Effet du Décis sur l'activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes d'*A. caliginosa* au cours de différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions). (Comparaison des moyennes à différentes temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

dose \ période	1mois	2mois
Témoins	9,454±0,729 a A	9,6384±0,552a A
DR/2	9,574±0,665 a A	9,320±0,432a A
DR	13,564±3,702a A	13,817±2,804 a A
DR×2	15,213±0,925 b A	15,779±1,135 b A
DR×5	18,320±0,127 c A	19,085±0,885 b A
DR×10	19,864±0,295 c A	22,434±0,914 c B

Résultats

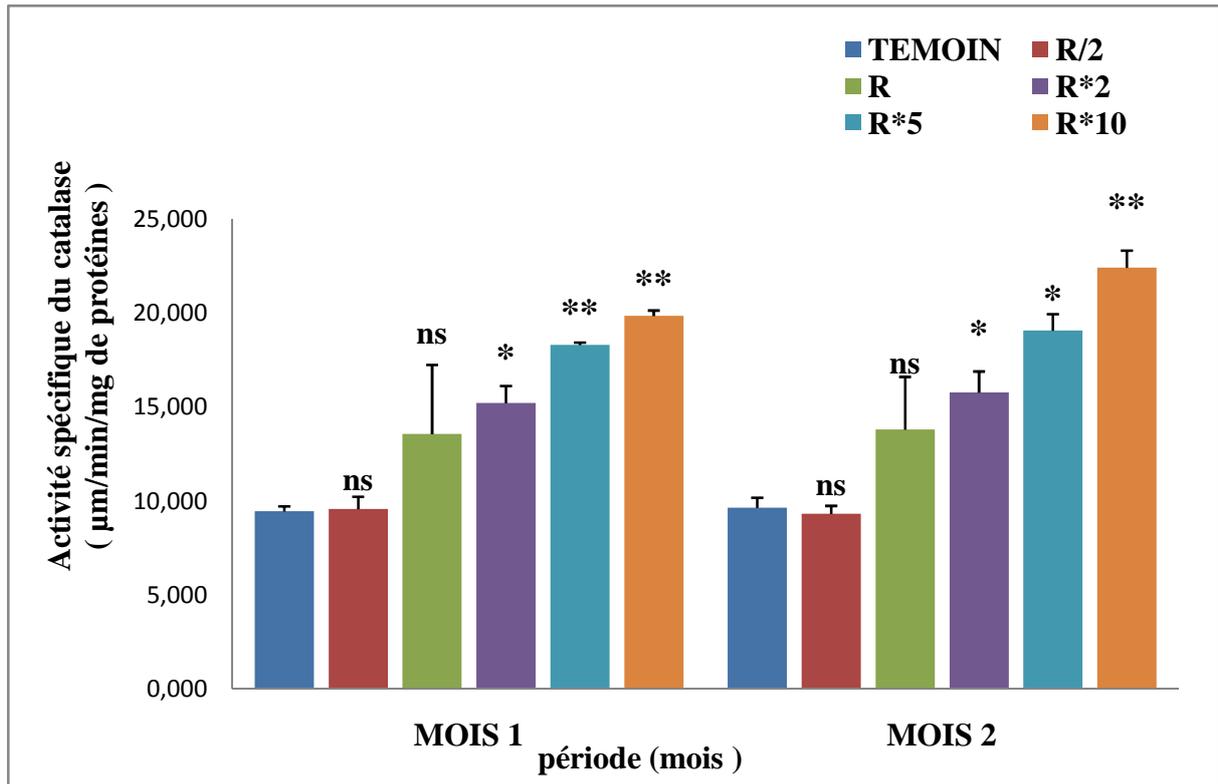


Figure 14 : Effet du Décis sur l'activité spécifique de la catalase (CAT) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes d'*A. caliginosa* au cours de différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions).

Discussion

5. DISCUSSION

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

Par ailleurs, Les paramètres biochimiques et enzymatiques chez les organismes exposés aux contaminants toxiques ont été utilisés comme biomarqueurs et peuvent constituer un importante outil de diagnostic pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (Forbes *et al.*, 1997).

5.1. Toxicité du Décis :

La toxicité aiguë des vers de terre est un outil efficace dans l'évaluation des risques écologiques des sols contaminés (Lukkari *et al.*, 2005; Hemibach, 1985) et la fin de point est la mortalité (Karnak & Hamelink, 1982; Dean-Ross, 1983; Ellis *et al.*, 2007).

Notre étude a pour but de tester la toxicité du Décis à l'égard des juvéniles et des adultes des vers de terre *A.caliginosa* après un mois de traitement. Les résultats montrent une activité insecticide avec une relation dose-réponse. Les concentrations létales, CL25, CL50 et CL90 sont respectivement de : 0.24, 0.43 et 1.36. Nos résultats sont similaires aux résultats de Mahajan *et al.* (2007) et Tindaon *et al.* (2011), car ils ont signalés les effets négatifs des engrais sur les vers de terre, le taux de mortalité des vers de terre a atteint 100% lorsque la concentration d'urée était supérieure à 1500 mg / kg. Ainsi ces résultats ressemblent à ceux signalés par Xiao *et al.* (2004) dans son expérience, bien qu'il n'y ait eu aucun rapport de mortalité du ver de terre à la dose recommandée, l'utilisation d'engrais à l'urée ne peut pas être sécuritaire. Il Doit avoir des effets sous-lesifs même aux doses agricoles recommandées (Reddy et Goud, 1987).

Des résultats semblables ont également été trouvés par un certain nombre de travailleurs de l'autre dans d'autres espèces de vers de terre. Zang *et al.* (2000) ont constatés que la valeur CL50 pour le ver de terre *Eisenia fetida* était de 2 et 4 ppm dans le sol suivant l'application de l'imidaclopride. Mostert *et al.* (2002) a constaté que la CL50 de l'imidaclopride était de 5 mg / kg pour 48h pour le ver de terre *Pheritima*. Capowiez *et al.* (2005) a également constaté que la CL50 de l'imidaclopride pour l'espèce anecique *Aporrectodea nocturna* et l'espèce d'endogie *Allobophora icterica* était entre 2 et 4 mg / kg de sol sec. Sardo & Soares (2010) ont trouvés qu'à

Discussion

une concentration plus élevée d'imidaclopride, plus la mortalité des vers de terre ont été observée.

Une tendance similaire est également signalée dans d'autres pesticides organophosphates par un certain nombre de travailleurs précédents. Bharthi & Subha Rao (1984) ont rapportés après 96h la CL50 de phosphamidon, monocrotophos et dichlorvos sous 10,35 ppm, 4,87 ppm et 0,22 ppm respectivement pour *Lampito Mauriti* du sol artificiel. Patnaik & Dash (1990) ont exposés des vers de terre à différentes concentrations des pesticides pendant deux heures, enregistrés après 48 h la CL50 de monocrotophos pour *Drawida Calebi* et *Octochactona surensis* à 14,79 ppm et 14,13 ppm et le fénitrothion à 15,67 ppm et 15,14 ppm respectivement. Reddy & Rao (2008) ont observés après 24 et 48h, la CL50 pour profenofos, un organophosphate soit 4,56 et 3,55 µg / cm² respectivement pour *Eisenia foetida*. Gupta *et al.* (2010) ont constatés que la cyperméthrine était plus toxique pour *Perionyx Fouilles* (CL50 :0.008 mg / kg) suivies de Endosulfan (CL 50 :0,03 mg / kg), carbaryle (CL50 :6,07 Mg / kg), chlorpyrifos (CL50 :7.3 mg /kg), aldicarb (CL50 :10,63 mg / kg) et monocrotophos (CL50 :13.04 Mg / kg), bien qu'aucune mortalité des vers de terre n'a été observée à la dose agricole recommandée.

5.2. Effet du Décis sur la croissance :

La mesure de la mortalité et du changement de la biomasse d'un organisme sont des tests couramment utilisés pour déterminer l'impact des substances écotoxiques sur les vers de terre. Le changement de biomasse est la différence entre la masse initiale du vers de terre et sa masse à la fin de la période d'exposition au contaminant (M.Leveque., 2014).

Les résultats obtenus au cours de notre expérimentation montrent que le Décis appliqué sur les adultes d'*A. caliginosa* affecte les paramètres biométriques étudiés (la taille et le poids). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Mostert *et al.* (2000) qui a testé l'effet de cinq pesticides (le Cyfluthrine, le Carbaryl, le Chlorpyrifos, le Fipronilet et l'Imidaclopride) sur les vers de terre. Aussi bien, les travaux de M E .I. badawy *et al.* (2013) constatent que les pesticides buprofezin, Lufenuron et triflumuron inhibent la croissance d'*A. caliginosa*. Par conséquent, un test supplémentaire sur l'effet des engrais sur les vers de terre peuvent être directement modifier l'acidité du sol ou indirectement par le changement de la forme et la quantité de la végétation qui finit par fournir des aliments pour les vers (Edward& Lofty, 1977). Il existe maintenant une preuve croissante pour montrer que l'utilisation des engrais inorganiques peuvent être bénéfiques ou des effets néfastes à la fois sur la productivité des cultures et populations des vers de terre (Edwards & Lofty, 1982; Mahajan *et al.*, 2007 & Curry *et al.* 2008).

Discussion

5.3. Effet du Décis sur la composition biochimique :

Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes connues (Mahler *et al.*, 1968). Ils sont principalement impliqués dans l'architecture de la cellule, et pendant les périodes de stress chronique, ils constituent aussi une autre source d'énergie (Padmaja & Rao, 1994).

Les résultats obtenus au cours de notre expérimentation montrent que le traitement par le Décis affecte le contenu en protéines (relation réponse- temps) et cela aussi bien en fonction des doses et du temps de traitement.

Cette diminution dose-dépendante des protéines totales a été notée chez les escargots traités par deux insecticides comparés aux escargots témoins. Dans des conditions de stress, les escargots ont besoin de plus d'énergie pour détoxifier la substance toxique. Lorsque les escargots ont une quantité limitée de glucides et de lipides, la source d'énergie alternative pour répondre à la demande accrue d'énergie est les protéines (Moussard, 1999). En outre, ces résultats sont semblables à ceux de Radwan *et al.*, (2008). Ainsi, ils ont rapporté que l'effet significatif des deux carbamates testés sur la diminution des taux de protéines au bout de 7 jours implique la possibilité que ces molécules exercent des effets cytotoxiques, qui dépendent fortement de l'interférence avec le niveau des lipoprotéines et le taux de biosynthèse. De plus, la diminution des réserves en protéines solubles de l'hépatopancréas des escargots peut être due en partie au stress résultant de l'effet de l'insecticide testé, comme l'a déjà suggéré ElWakil & Radwan (1991). En effet, ces auteurs ont attribué ce stress à un déséquilibre entre le taux de synthèse et de dégradation protéique. Padmaja & Rao (1994) ont suggéré que la diminution des lipides et des protéines tissulaire chez l'escargot *B. dissimilis* (Müller) après exposition aux pesticides peut être due à plusieurs mécanismes, parmi lesquels l'utilisation directe des protéines par les cellules pour subvenir aux besoins énergétiques.

Les glucides forment un groupe de composés très importants. Puisqu'ils représentent une source d'énergie pour les organismes vivants, soit immédiatement utilisable (tréhalose), soit sous forme de réserves (glycogène) ; d'autres ont un rôle structural (cellulose, chitine, acide hyaluronique) (Wins & Gilbert, 1967).

Concernant le contenu en glucide, nos résultats montrent que le traitement par le Décis n'a aucun effet au cours de la période testé. Par contre, le taux des glucides dans l'hépatopancréas des escargots traités au thiaméthoxam et à la téfluthrine était dose-dépendante. En effet, les carbohydrates constituent la source première et immédiate d'énergie (Moussard, 1999). Dans les

Discussion

conditions de stress, les réserves d'hydrates de carbone sont épuisées pour satisfaire les demandes énergétiques (Arasta *et al.*, 1996). Ces résultats sont conformes avec ceux de Padmaja & Rao (1994) ont d'ailleurs suggérés que la diminution du taux de glycogène dans les tissus de l'escargot d'eau douce *Bellamya dissimilis* (Müller), exposé à l'Endosulfan, le Méthyl parathion, le Quinalphos et le Nuvan peut être due à l'utilisation du glycogène pour générer l'énergie nécessaire pour faire face à l'hypoxie provoquée par ces pesticides. La déplétion en glycogène des tissus hépatiques peut être également interprétée comme une réponse non spécifique au stress chimique avec cependant des conséquences sur la mobilisation à long terme des réserves énergétiques et ainsi sur la sensibilité au stress et la susceptibilité des individus aux maladies (Schwaiger *et al.*, 1997). La diminution des réserves de glycogène est une réponse notée chez plusieurs gastéropodes pulmonés exposés à des insecticides OPs et Carbamate, notamment *Biomphalaria alexandrina*, *Bulinus trincatus* (Sharaf *et al.*, 1975) et *L. acuminata* (Singh & Agarwal, 1989). Chez *L. palustris* exposée à l'hexachlorobenzène en mésocosme, Baturu *et al.* (1995) observent une stimulation de l'activité enzymatique d'hydrolyse des polysaccharides et une réduction de la teneur en glycogène dans le manteau et la masse viscérale. Pour la même espèce exposée à des alkylphénols en mésocosme, Jumel & Lagadic (2000) rapportent une augmentation de la demande énergétique des animaux qui se traduit par une mobilisation rapide des réserves de glycogène du manteau et une diminution de la teneur en protéine et de la masse de la glande à albumen. L'énergie mobilisée n'est pas investie dans la reproduction puisqu'aucune ponte n'est produite. L'exposition en mésocosme de *L. stagnalis* au fomésafène provoque une réduction des réserves en glycogène des animaux qui peut être impliquée dans la réduction de l'activité ovipositoire (Jumel *et al.*, 2000).

Les lipides possèdent des fonctions importantes à la fois comme éléments de structure et comme régulateurs du métabolisme.(Vaysse & M.pontet ., 2006).

Nos résultats montrent que le traitement par le Décis sur les adultes d'*A. caliginosa*, cause variation non significative de ce contenu au cours de la période testé. Par contre, Padmaja & Rao (1994) montrent qu'il y a une diminution dose-dépendante des lipides totaux a été notée chez les escargots traités par deux insecticides comparés aux escargots témoins. En effet, les lipides constituent le carburant énergétique privilégié proposé aux tissus en cas de besoins après les hydrates de carbone, mais les protéines sont principalement impliqués dans l'architecture de la cellule.

D'ailleurs, les mêmes constatations ont été faites auparavant par Lagadic *et al.* (1997) sous l'effet des contaminants chez les invertébrés. La diminution dose-dépendante du taux des lipides

Discussion

après exposition de *Helix aspersa* aux mixtures M1, M2, M3 et M4 peut être due au stress chimique causé par les composés testés. En effet, Eissa *et al.* (2002) ont rapporté que l'effet nocif de composés chimiques pourrait être attribué à l'augmentation de l'utilisation de l'énergie et/ou à l'altération des organites des cellules (des escargots traités) et qu'ils peuvent interférer avec la synthèse des protéines.

5.4. Effet du Décis sur les biomarqueurs :

La préservation de la qualité des sols est une préoccupation majeure des sociétés humaines, l'utilisation des paramètres biochimiques appelés biomarqueurs, comme indicateurs de la qualité des écosystèmes ; Ces biomarqueurs mesurent l'interaction entre un système biologique et un agent environnemental et peuvent être chimiques, physiologiques ou biologiques (WHO, 1993) ; leur validité tient à trois caractéristiques principales: spécificité, sensibilité et préciosité (Amiard-Triquet *et al.*,1998). L'inhibition ou l'induction *in vivo* des biomarqueurs est un bon outil environnemental pour évaluer l'exposition et les effets potentiels des xénobiotiques sur les organismes (Sturn *et al.*, 2000). La capacité d'un organisme de s'adapter à un environnement altéré par la contamination anthropique dépend principalement des mécanismes de la détoxification de divers composés endogènes (Jakanov, 2001). Les biomarqueurs peuvent être regroupés en trois catégories: les biomarqueurs d'exposition, d'effet et de sensibilité.

5.4.1. Effet sur l'activité spécifique des GSTs :

Les GSTs sont des enzymes multifonctionnelles impliquées dans l'étape de conjugaison du (glutathion réduit) à un grand nombre de xénobiotiques (Boyer, 2006). Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme des cellules, du corps gras et des muscles alaires (Hauburge & Amichot, 1998). Elles ont un rôle important dans la détoxification de substance xénobiotique et interviennent en catalysant la conjugaison de ces substances avec le groupement thiol du glutathion endogène (Jakoby & Habig, 1980). Donc, le rôle majeur du glutathion est de convertir des composés lipophiles en molécules hydrophiles facilement excrétables (Habig *et al.*,1974). Les GSTs permettent le développement de la résistance envers les agents chimiothérapeutiques, les insecticides, les herbicides et les antibiotiques microbiens. Elles jouent un rôle important dans la physiologie du stress, le transport intracellulaire et dans les différentes voies de biosynthèse (George, 1994).

L'activité spécifique de la GST chez les adultes traitées d'*A. caliginosa* a marqué une augmentation significative au cours des périodes testées et qui se traduit par une mise en place du processus de détoxification qui est une forme de défense contre le pesticide (insecticide).

Discussion

La réponse de l'activité de la GST dépend de plusieurs facteurs comme le type de xénobiotique, la concentration, le temps d'exposition et de l'espèce (Oruc & Uner, 2000). De ce fait, de nombreuses études ont montré après exposition aux polluants une augmentation et/ou réduction de la GST dans divers organismes aquatiques (Geracitanon *et al.*, 2004 ; Ait alla *et al.*, 2006). En fait, une inhibition de cette dernière a été observée chez la moule *Mytilus galloprovincialis* contaminée par le benzoapyrène (Aqcha *et al.*, 2000). Des études menées aussi en terrain ont montré de même une inhibition de la réponse des GSTs chez des *Bivalves Scrobicula plana* collectées dans un site contaminé par comparaison à des organismes provenant des sites de références (Erquuden *et al.*, 2004). De même, une étude menée par Stephensen *et al.* (2000) a montré une absence de changement chez le poisson *Myoxocephalus scorpius* provenant des sites contaminés par rapport à leur témoin relatif.

5.4.2. Effet sur l'activité spécifique de la catalase :

Les catalases (CAT) sont des enzymes péroxysoniales dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatifs au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, les PCB, certains pesticides (Livingstone *et al.*, 1993) et les métaux (Labrot *et al.*, 1996), mais ceci de façon irrégulière *in vivo*, les résultats montrant tantôt une augmentation de l'activité (Di Giulio *et al.*, 1993), tantôt une baisse (Labrot *et al.*, 1996). Une des hypothèses retenue est que cette activité enzymatique semble très sensible aux facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle (Pellerin-Massicotte, 1994), hypothèse corroborée par les résultats obtenus par Pellerin-Massicotte *et al.* (1997), observant une induction de l'activité catalase dans un endroit non pollué qui pourrait être due à un stress physiologique comme une répétition de la ponte. Selon ces auteurs, la catalase pourrait être sensible à des variations subtiles des conditions environnementales. Chez *Helix aspersa*, l'induction de l'activité CAT est obtenue après traitement au thiaméthoxam, à la téfluthrine et à leurs mixtures. En effet, chacun des deux insecticides et leurs mixtures semblent intensifier l'activité des enzymes antioxydantes de l'hépatopancréas de *Helix aspersa*, y compris celle de la CAT en réponse à l'augmentation du stress oxydatif.

La catalase est une enzyme hémique, responsable de la détoxification des quantités significatives de peroxydes d'hydrogène (H_2O_2). La catalase est un antioxydant enzymatique largement distribué dans tous les tissus animaux, et sa plus forte activité se trouve dans les globules rouges principalement et le foie (Sathishsekar & Subramanian, 2005). L'augmentation de l'activité de la catalase peut présenter une réponse adaptative au stress

Discussion

oxydatif entraîné par les pesticides. La destruction de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la SOD et la CAT améliore la toxicité induite par le chlorpyrifos de la même façon que par des substances capables de piéger le radical hydroxyle ($\bullet OH$) (Sivajothi *et al.*, 2008).

Dans le présent travail, une stimulation significative de l'activité catalase est signalée après le temps d'exposition aux différentes doses de Décis appliqués sur l'*A. caliginosa*. D'ailleurs les travaux étudiés chez le poisson *Esomus danricus* traité avec le cuivre (Vutukuru *et al.*, 2005), chez *G. affinis* exposé au pesticide chlorpyrifos (Kavitha & Venkateswara Raou, 2008) montrent aucune variation de l'activité de cette enzyme n'a été enregistré dans le foie de *Rhamdia quelen* exposé à un herbicide Roundup 48 (Cavalheiro & Menezes *et al.*, 2011), de même que chez *Oreochromis niloticus* après exposition au pesticide organofluorine l'etoxazole (Sevgiler *et al.*, 2004). Une des hypothèses retenue est que cette activité enzymatique semble très sensible aux facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle (Pellerin-Massicotte, 1994), hypothèse corroborée par les résultats obtenus par Pellerin-Massicotte *et al.* (1997), observant une induction de l'activité catalase dans un endroit non pollué qui pourrait être due à un stress physiologique comme une répétition de la ponte. Selon ces auteurs, la catalase pourrait être sensible à des variations subtiles des conditions environnementales. Chez *Helix aspersa*, l'induction de l'activité CAT est obtenue après traitement au thiaméthoxam, à la téfluthrine et à leurs mixtures. En effet, chacun des deux insecticides et leurs mixtures semblent intensifier l'activité des enzymes antioxydantes de l'hépatopancréas de *Helix aspersa*, y compris celle de la CAT en réponse à l'augmentation du stress oxydatif.

Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress oxydant en laboratoire et surtout in situ montrent que le caractère aspécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte (Cossu *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont été observés par Salama *et al.* (2005), chez la même espèce de gastéropode après exposition au méthomyl et au chlorpyrifos. Cependant, les mêmes auteurs ont constaté que cette activité enzymatique diminue après exposition au carbofuran et au paraquat. Quant à El-Gendy *et al.* (2009), ils ont rapporté une induction de l'activité CAT hépatopancréatique chez *Theba pisana*, suite aux traitements par des pesticides à base de cuivre. L'augmentation de l'activité CAT a déjà été relevée chez d'autres organismes comme les poissons et les bivalves exposés à des polluants organiques (HAP, PCB, pesticides et engrais chimiques) (Cossu *et al.*, 1997).

Conclusion ET
PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

6. CONCLUSION ET PRESPECTIVES

L'étude expérimentale, concernant l'impact d'un pesticide (insecticide) « le Décis » sur une espèce de ver de terre *Aperroctodea caliginosa*, a été menée au niveau du laboratoire de biologie animale ; nous a permis de tirer quelques conclusions sur l'efficacité de cette molécule sur : La toxicité, la croissance, la composition biochimique (protéines, glucides et lipides) et l'activité spécifique de deux biomarqueurs enzymatiques (GST et CAT).

L'application du cet 'insecticide Décis sur les juvéniles *d'A. caliginosa*, a permis d'établir les concentrations létales CL25, CL50 et CL90. Le Décis montre des effets doses significatives et manifeste une toxicité, une perturbation de la croissance des adultes *d'A. caliginosa'* avec une relation dose- réponse.

Décis testé à différentes doses D1, D2, D3, D4 et D5 sur les adultes *d'A. caliginosa*, montre des effets sur les différentes paramètres biométriques et biochimiques étudiés au cours de la période testée (un , deux mois).

L'évaluation des biomarqueurs indique que l'insecticide Décis induit le système de détoxification par biais d'une augmentation de l'activité de la GST et de la catalase.

A partir de ces résultats on peut dire que ce travail nous a permis de comprendre mieux le mécanisme de la réponse de l'invertébré vis-à-vis de l'effet de Décis, et cela en étudiant quelques aspects.

A l'avenir, il serait judicieux de :

- Une étude histologique.
- Une étude ultra structurale.
- Effectuer une étude approfondie sur les mécanismes de défense antiradicaux par le dosage d'autre marqueur du stress oxydatifs (GPX, LDH).

*Références
bibliographiques*

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



A

Aissaoui H., 2011. Effet des produits phytosanitaires et les engrais, sur l'abondance des métaux lourds (Cu, Zn) dans le sol et les végétales dans la région de Biskra., **11.** 87 p.

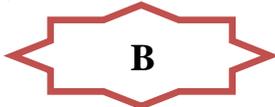
Ait Alla A., Mouneyrac C., Moukrim A & Pellerin J., 2006. Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco). *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **143**:23–29.

Akcha F., Izuel C., Venier P., Budzinski H., Burgeot T. & Narbonne J.F., (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo(a)pyrene contaminated mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.*, **49**: 269-287.

Amiard-Triquet C., Altmann S., Amiard J.C., Ballan-Dufvancais, C., Baumard, P., Budzinski H., Crouzet C., Guarrigue J.P., His, E., JEAUTET A.Y., Menasira R., Mouneyrac C., Naarboume J.F., & Pavillon J.F., 1998. Fate and effects of micropolluants in the Girond estuary, France : a multixiplinary approach. *Hdrobiologia.* **73/74** : 259-279.

Arasta T., Bais V.S., Thakur P., 1996. Effect of Nuvan on some biological parameters of Indian catfish, *Mystus vittatus*. *Journal of Environmental Biology.* **17**: 167-169.

Ayad M., Nahida., 2012. Identification et dosage des pesticides dans l'agriculture et les problèmes d'environnement liés., **11** : 87.



B

Bardgett R. D., Bowman W. D., Kanfmanu R., Schimidt S. K., 2005. A temporal approach to linking aboveground and below ground ecology. *Trends Ecol Evol.*, **20** : 634-641.

Baturo W., Lagadic L., Caquet T., 1995. Growth, fecundity and glycogen utilization in *Lymnaea palustris* (Mollusca: Gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry.* **14**: 503-511.

Bharati C., Subba Rao BVSSR., 1984. Toxicity of phosphamidon to the common South Indian earthworm *Lampito mauritii*. *Bulltein of Environmental Contamination and Toxicology.*, **32(1)** : 295-300.

Références bibliographiques

Bliefert C. & Perraud R., 1997. Chimie de l'environnement : Air, Eau, Sols, Déchets. 1^{ère}éd. Espagne. 477 p.

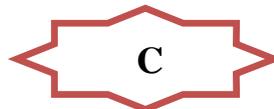
Blouin M. N. E., Hodson E. A., Delgado G., Baker L., Brussaard K. R., Butt J., Dai L., Dendooven G. Peres J. E., Tondoh D., Cluzeau & J. J., Brun., 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. Eur. J. Soil Sci., **64** : 161-182.

Bouziani M., 2007. La pollution des eaux par les pesticides, une préoccupation pour les chercheurs algériens. Journée scientifique de l'ACEDD, Oran.

Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method of the quantitation microgram quantities of protein utilising the principale dye binding .Analytic . biochem., **72**:248- 254.

Brown G. G., Barois I., Lavelle P., 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. European Journal of Soil Biology., **36** : 177-198.

Bunemann EK., Schwenke GD., Zwieten LV., 2006. Impacts of agricultural inputs on soil organisms-a review. Australian Journal of Soil Research., **44**⁽⁴⁾ :379-406.



Calvet R., 2005. Les pesticides dans le sol. Edition France Agricole.

Capowiez Y., Bastardie F., Costagliolia G., 2006. Sublethal effects of Imidacloprid on burrowing behaviour of two earthworm species L: Modification of the 3D burrow systems in artificial cores and consequences on gas diffusion in soil. Soil Biology and Biochemistry., **38**⁽²⁾ :285-293.

Capowiez Y., Rault M., Costagliolia G., Mazzia C., 2005. Lethal and sublethal effects of imidacloprid on two earthworm species (Aporrectodea nocturna and Allolobophera icterica). Biology and Fertility of Soils., **41**⁽³⁾ :135-143.

Cavalheiro de Menezes C., Braga da Fonseca M., Loro V. L., Santi A., Cattaneo R., Clasen B., Pretto A. & Morsch V.M., 2011. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of Rhamdia quelen. Arch Environ Contam Toxicol., **60**: 665–671.

Claiborne A., 1985. Catalase activity. Dans : CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Édition Greenwald R.A., 283-284.

Références bibliographiques

Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A., Vasseur P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **38**: 122-131.

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



D

Dalby PR., Barker GH., Smith SE., 1995. Glyphosate, 2,4-DB and dimethoate: effects on earthworm survival and growth. *Soil Biology and Biochemistry.*, **27(12)** : 1661-1662.

Dean-Ross D., 1983. Methods for assessment of the toxicity of environmental chemicals to earthworms. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.*, **3**⁽¹⁾ :48-59.

Di Giulio R.T., Habig C., Gallagher E.P., 1993. Effects of black rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology.*, **26**: 1-22.

Duchateau G & Florkin M., 1959. la tréhalosémie des insectes et sa signification .arch. insect. *Physiol. Biochem.*, **67** :306- 314.



E

Edward C. A., 2004. Earthworm Ecology. CRC Press, London. 441 p.

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

Edwards, CA, Lofty JR. 1982. Nitrogenous fertilizers and earthworm populations in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry.***14(5)** : 515-521.

Eissa S.H., Rizk E.T., Abou-Shafey A.E., Mona M.H., Atlum A., 2002. Toxicological effect on *Euphorbia peplus* water suspension on heamocytes of the fresh water snails, *Biomphalaria alexandrina* and *Lanistes carinatus*. *Proc LCBS.* **2**: 417-447.

Références bibliographiques

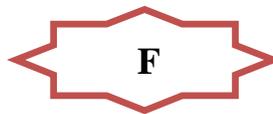
El-Gendy K. S., Radwan M. A., Gad A. F., 2009. In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. *Chemosphere.*, **77**(3): 339-344.

Ellis SR., Hodson ME., WegeP., 2007. The influence of different artificial soil types on the acute toxicity of carbendazin to the earthworm *Eisenia fetida* in laboratory toxicity tests. *European Journal of Soil Biology* : **43**⁽¹⁾ :S 239-S 245.

El-Wakil H.B., Radwan M.A., 1991. Biochemical studies on the terrestrial snail *Eobania vermiculata* (Müller) and *Thebapisana* ((Müller) treated with some pesticides. *Journal of Environmental Science Health*. **B34**: 47-60.

Erkuden P., Julian B. & Montserrat S., 2004. Biomarker responses to pollution in tow invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cadiz Bay (SW Spain). *Mar. Environ. Res.*, **58**: 275- 279.

Estevez B. A., N'Dayegamiye & Coderre D., 1996. The effect of earthworm abundance and selected soil properties after 14 years of solid cattle manure and NPKMg fertilizer application. *Canadian Journal of Soil Science.*, **76** : 351-355.



Forbes V.A., Forbes T.L., Rivière J.-L., 1997. *Écotoxicologie: théorie et applications*. Editions Quae, Paris. **424** p.

Fragoso C., Lavelle P., 1992. Earthworm tropical communities of rain forests. *Soil Biology and Biochemistry.*, **24** : 1397- 1408.



George S. g., 1994. Enzymology and molecular biology of phase 2 xenobiotic conjugation enzymes in fish. In Malins, D.C., Ostrander, G. K. *Aquatic toxicology, molecular Biochem and cell. Perspect.* Lewis, Boca Raton, FL, pp.37- 85.

Geracitano L. A., Luquet D., Monserrat J. M & Bianchini A., 2004. Histological and morphological alterations induced by copper exposure in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Mar. Environ. Res.*, **58**: 263–267.

Références bibliographiques

Goldworthy A. C., Mordue W & Guthkelch J., 1972. Studies on insect adipokinetic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **18** :306- 314.

Gupta RD., Chakravorty PP., Kaviraj A., 2010. Studies on relative toxicities of six insecticides on epigeic earthworm, *Perionyx excavates*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.*, **85 (1)** 83-86.



H

Habig W. H., Pabst M. J & Jakoby W. B., 1974. Glutathione-S - Transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. biol. chem.*, **249**: 7130- 7139.

Haubruge E. & Amichot M., 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. France. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2 (3)**: 161-174.

Hemibach F., 1985. Comparison of laboratory methods using *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* for the assessment of hazard of chemicals to earthworms. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten and Pflanzenschutz.*, **92⁽²⁾** :186-193.

Hund-Rinke K., Achazi R., Römbke J., Warnecke D., 2003. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicators for the habitat function of soils : Results of a laboratory comparison test. *Journal of Soils and Sediments.*, **3⁽¹⁾** :7-12.



J

Jakanovic M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology.*, **166** : 139-160.

Jakoby W. B & Habig W.H., 1980. Glutathiontransferase. In Jakoby, W. B Enzymatic basis of detoxification .Academic press.New York., **2**:63- 94.

Jones C. G., Lawton J. H., Shachak M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos.*, **69** : 373-386.

Jumel A., Gaboriau G., Lagadic L., 2000. Mixture toxicity of fomesafen and nonylphenol polyethoxylates on the reproduction of the pond snail *Lymnaea stagnalis*: preliminary results in laboratory and in mesocosms. Eurotox Congress. Londres, Angleterre.

Références bibliographiques

K

Kalka J., Miksch K., Grabinska-Sota E., Zbrog A., 2002. The effects of pyrethroid insecticides on earthworm *Eisenia fetida*. *Fresenius Environmental Bulletin.*, **11**⁽²⁾: 114-117.

Karnak RE., Hamelink JL., 1982. A standardized method for determining the acute toxicity of chemicals to earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **6**⁽²⁾: 216-222.

Kavitha P. & Venkateswara J., 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **87**: 182-188.

L

Labrot F., Ribera D., Saint-Denis M., Narbonne J.F., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three nonmammalian species. *Biomarkers.*, **1**: 21-28.

Langan AM., Shaw EM., 2006. Responses of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.) to iron phosphate and metaldehyde slug pellet formulations. *Applied Soil Ecology.*, **34**⁽²⁻³⁾: 184-189.

Lavelle P., & Spain A. V., 2001. *Soil Ecology*. Kluwer Sci. Pub, Amsterdam., 654 p.

Lavelle P., T. Decaëns, M. Aubert, S. Barot, M. Blouin, F. Bureau, F. Margerie, P. Mora, and J. P. Rossi. 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *Eur. J. Soil Biol.* **42**:3-15

Livingstone D.R., Lemaire P., Matthews A., Peters L.D., Bucke D., Law R.J., 1993. Prooxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses.

Louchahi M. R., 2015. Enquête sur les conditions d'utilisation des pesticides en agriculture dans la région centre de l'algérois et la perception des agriculteurs des risques associés à leur utilisation. **1**. 99 p.

Lukkari T., Aatsinki M., Vaisanen A., Haimi J., 2005. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Applied. Soil Ecology.*, **30**⁽²⁾: 133-146.

Références bibliographiques



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

Mahendru V.K., Agarwal R.A., 1981. Changes in carbohydrate metabolism in various organs of the snail *Lymnaea acuminata* following exposure to trichlorfon. *Acta of Pharmacology.* **48**: 377-381.

Mahler H & Cordes E., 1968. *Biological chemistry*, Harper and row.

Mazoyer M., 2002. *Larousse agricole*. Montréal (Québec). Larousse. 767 p.

McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M., Yu H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry.* **19**: 2085-2092.

Mostert MA., Schoeman AS., Van der Merwe M. 2000. The toxicity of five insecticides to earthworms of the *Pheretima* group, using an artificial soil test. *Pest Management Science.*, **58** :1093–1097.

Mostert MA., Schoeman AtS., Merwe Mac., vander., 2002. The relative toxicities of insecticides to earthworm of *Pheretima* (*Oligochaeta*). *Pest Management Science.*, **58**⁽⁵⁾ : 446-450.

Moussard C., 1999. *La biochimie, Biochimie structurale et métabolique, Médecine, Pharmacie, Sciences.* De Boek&Larciers.a., Bruxelles. **294** p.

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

Muthukaruppan G., Janardhanan S., Vijayalakshmi G., 2005. Sublethal toxicity of the hebicide butachlor on the earthworm *Perionyx sansibaricus* and its histological changes (5pp). *Journal of Soil and Sediments.*, **5**⁽²⁾ : 82-86.

Références bibliographiques

N

Neuhauser EF., Callahan CA., 1990. Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to sub-lethal concentrations of organic chemicals. *Soil Biology and Biochemistry.*, **22(2)** :175-179.

P

P., Rossi J. P., 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology.*, **42** : S3-S15*.

Padmaja J.R., Rao M.B., 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail, *Bellammyadissimillis* (Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* **53**: 142-148.

Panda S., Sahu SK., (2004). Recovery of acetylcholine esterase activity of *Drawida willsi* (Oligochaeta) following application of three pesticides to soil. *Chemosphere.*, **55**⁽²⁾ 283-290.

Panda S., Sahu SK., 1999. Effects of malathion on the growth and reproduction of *Drawida willsi* (Oligochaeta) under laboratory conditions. *Soil Biology Biochemistry.*, **31** : 363-366.

Patnaik HK., Dash MC., 1990. Toxicity of monocrotophos and fenitrothion to four common Indian earthworm species. *Pollution Residue.*, **9** : 95-99.

Pellerin -Massicotte J., 1997. Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal de Recherche Océanographique.*, **22**: 91-98.

Pellerin-Massicotte J., 1994. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystems Health.*, **3**: 101-111.

R

Radwan M.A., Essawy A.E., Abdelmeguid N.E., Hamed S.S., Ahmed A.E., 2008. Biochemical and histochemical on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pesticides Biochemistry and Physiology.* **90**: 154- 167.

Références bibliographiques

Rallmbke J., Jaonsch S., Junker T., Pohl B., Scheffezyk A., Schallnaay HJ., 2007. The effect of tributyltin-oxide on earthworm, springtails and plants in artificial and natural soils. *Achieves Environmental Contamination and Toxicology.*, **52**⁽⁴⁾ : 525-534.

Reddy MV., Goud AN., 1987. Impact of inorganic fertilizers on the earthworm population density of wetland rice (*Oryza sativa*) agroecosystems. *Proceeding of National Symposium on Ecotoxicology.*, 154-158.

Reddy NC., Rao JV., 2008. Biological responses of earthworm *Eisenia foetida* (savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **71**(2) :574-582.



Salama A. K., Osman K. A., Saber N. A., Soliman S. A., 2005. Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences.*, **8**: 92-96.

Sardo AM., Soares AM. VM., 2010. Assessment of the effects of the pesticide imidacloprid on the behavior of the aquatic oligochaeta *Lumbricus variegatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.*, **58**⁽³⁾ 648-656.

Sathishsekar & Subramanian., (2005).Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr.*, **14**(2):

Schwaiger J., Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Tribskorn R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery.* **6**: 75-86.

Sharaf A.A., Mohamed A.M., Abu El-Ghar M.R., Mousa A.H., 1975. Control of snail hosts of Bilharziasis in Egypt. 3. Effect of the organophosphorus insecticide dursban on carbohydrate metabolism of the snail *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. *Egyptian Journal of Bilharziase.* **2**: 49-61.

Shibko S., Koivistoinen P., Tratyneck C., New Hall & Feidman L., 1966. A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen. from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analyt.biochem.*, **19**:415- 528.

Références bibliographiques

Singh D.K., Agarwal R.A., 1989. Toxicity of piperonyl butoxide-carbaryl synergism on the snail *Lymnaea acuminata*. *International Review of Hydrobiology*. **74**: 689-699.

Sivajothi V., DeyA., Jayakar B., Raj Kapoor B., (2008). Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effect of *Phyllanthusrheedi* on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.*, **7 (1)**: 53 - 59.



T

Tindaon F., Benckiser G., Ottow JCG., 2011. Side effects of nitrification on non-target microbial processes in soils. *Journal of Tropical Soils.*, **16⁽¹⁾**:7- 16.



W

WHO: World Health Organization., 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria*, Vol 155, International Program on Chemical Safety (IPCS), Geneva.



X

Xiao H., Q. X. & J. D. Liang., 2004. Single and joint effects of acetochlor and urea on earthworm *Eisenia foetida* population in Phaozem. *Environmental Geochemistry and Health.*, **26⁽²⁾**:277-283.



Z

Zang Y., Zhong Y., Luo Y., Kong ZM., 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution.*, **108⁽²⁾** : 271-278.