

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Option : Microbiologie)Santé, eau et environnement(

Thème

L'effet des pesticides) cas de Thiaméthoxame (sur
Saccharomyces cerevisiae

Présenté par :

BERKANI Asma

BOUZEGHOUL Karima

Devant le jury composé de :

Président : M. HOUHAMDI Moussa (Pr)

Examineur : M.MERZOUG Abdelghani)M.A(

Encadreur : M. DJEKOUN Mohamed (M.A)

Jun 2011

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Option : Microbiologie)Santé, eau et environnement(

Thème

**L'effet des pesticides) cas de Thiaméthoxame (sur
*saccharomyces cerevisiae***

Présenté par :

BERKANI Asma

BOUZEGHOUL Karima

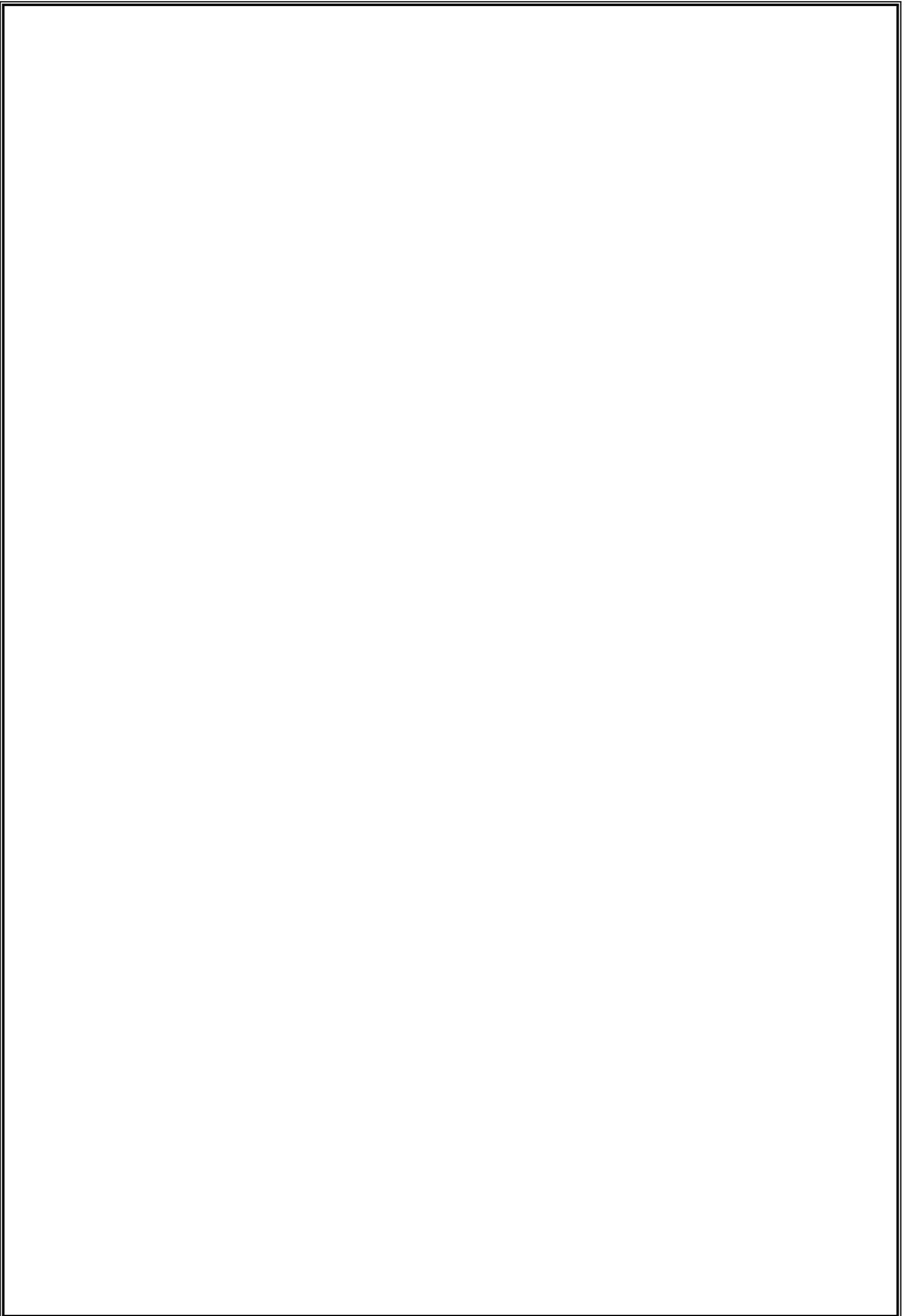
Devant le jury composé de :

Président : M. HOUHAMDI Moussa (Pr)

Examineur : M.MERZOUG Abdelghani)M.A(

Encadreur : M. DJEKOUN Mohamed (M.A)

Juin 2011



Dans les produits utilisés dans l'activité industrielle et ou agricole, il y a la présence des produits chimiques parmi les quels se trouve les pesticides qui génèrent un risque pour la santé et l'environnement. L'objectif de ce travail a été de développer une méthodologie d'évaluation des risques écotoxicologique liés au rejet dans l'environnement. une procédure a été élaborée : pour l'évaluation de l'impact généré par les pesticides, via un bioessai (*Saccharomyces cerevisiae*) par le biais d'une étude toxicologique.

Ainsi que les perturbations enregistrées au cours de l'évaluation du cycle de reproduction à travers certains paramètres (biomasse, une activité enzymatique, taux de protéine,.....).

Les tests menés sur *saccharomyces cerevisiae* au laboratoire ont montré des variations au niveau des paramètres cités ci-dessus. ces résultats nécessitent d'être vérifiés par des études complémentaires.

Le scénario présenté conduit à une évaluation semi quantitative des risques. Il devra être amélioré sur certains aspects, particulièrement ceux concernant : l'activité enzymatique.

Mots clés : *Saccharomyces cerevisiae*, bioindicateur, toxicité, Thiaméthoxame, biomasse.

In the products used in the agricultural activity, there is the presence of the products chemical among which is the pestisid that g n r tes a risk for the health of the environment. The objective of this work was to elaborate a methodological of assessment of the risks linked ecotoxicological to the dismissal in the environment. A procédure has been elaborated: for the assessment of the impact generated by th  pestisid, via a bioassay (*Saccharomyces Cerevisiae*) by th  slant of a toxicological survey. As well as the disraptions recorded during the évolution of the reproduction cycle through some parameters (biomass, enzymatic activity, rate of the protein).

The tests led on *Saccharomyces cerevisiae* to th  laboratory showed some variations to the level of the above stated parameters.

Thèse results require to be verified by complementary studies. The script presented duct to an assessment semi quantitative of the risks. It should be improved on some aspects, particularly those concerning: th  enzymatic activity.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, bioindicator, toxicity, Thiamethoxam, biomass.

من بين المنتجات المستخدمة في النشاط الصناعي أو الزراعي هناك ما يعرف بالمواد الكيميائية من بينها المبيدات والتي تؤثر سلباً على المحيط، الهدف من هذا العمل هو تحديد منهجية لتقييم الاخطار التسممية التي تتعرض لها البيئة والتي ترتبط بانتشار المواد الكيميائية في المحيط.

هناك إجراءات اتخذت لتقييم التأثيرات المتعلقة بالمبيدات و ذلك عن طريق استخدام خميرة الخباز كمادة حية للتجربة في الدراسة المتعلقة بالسموم. كذلك الخلل المسجل والمؤكد في دورة التكاثر من خلال عدة معالم (العدد، النشاط الإنزيمي، مستوى البروتينات).

التجارب التي أجريت على خميرة الخباز في المخبر أكدت عدة تغيرات طرأت على مستوى المعالم المذكورة سابقاً، هذه النتائج يجب أن تراجع بدراسات ممتمة.

السيناريو في الوقت الحاضر يعطي تقييم نصفي للأخطار، وقد يطور في بعض الجوانب وعلى وجه الخصوص كل ما يتعلق بالنشاط الإنزيمي.

. **المفتاح:** خميرة الخباز، العينات، المبيدات، السمية، العدد الكلي

Dédicaces

Je dédie ce travail

*A mes plus chers êtres au monde : **Ma mère** et **Mon père** pour leur amour, leur tendresse, et pour leur soutien moral et matériel durant toutes les étapes de ma*

vie

A mes chères sœurs

***Abir, Sawsen** et l'ange de ma maison*

Soundousse

A mes Chers frères

Sohaib** et **Hatem

A mes grands parents

A mes oncles et tantes

A mes cousins et cousines surtout

*Wadjih, **Wajdi**, Loudjayne, Yasmine, **Amina**, **widjdane**, Marwa, Lina, Amel,*

Hanen, Khouloud, Souha, Imene, Hadjar,

lisia

*A **Karima** ma binôme*

A mes amies

*Laila, Moufida, Houda, Siheme, Assiatou,
Rahma, imene*

A Mr Djekoun Mohamed mon encadreur.

A toute ma promotion

Asma

Dédicace

Je dédie ce travail :

Aux deux êtres les plus chers, **Mes parents** pour tout ce qu'ils
m'ont offert d'amour et d'affection

A mon adorable sœur

FADIA pour ses encouragements et son soutien

A mes sœurs : Malika, Miza, et Linda ainsi que leurs époux :

Mohamed aLaïd, **FOUAD** et Halim

A mes frères :

HICHAM, Yassine et **MOHCEN** pour leurs extrêmes
serviabilités et compréhension

Aux anges de ma maison mes nièces : Sara, Douaa, Malek,

Meriem et MON **ABD ELILLAH**, Abir, Maria et Lyna

A **ASMA** ma binôme

A mes amies :

Manel, Soumia, Dalila, Mina, Manel, Amel, Sabah, et Fouzia,

Assiatou

A toute ma famille et surtout mes cousines :

Hanan, Siham, Wahiba, Soumaya, Farida, Ahlam

A Mr Djekoun Mohamed mon encadreur.

A toute ma promotion

KARIMA

Remerciements

Nos sincères remerciements vont en premier lieu à dieu, Ce tout puissant de nous avoir donné la force, la volonté et le courage pour concrétiser notre travail.

Nous remercions vivement monsieur le Président monsieur Houhamdi Moussa et monsieur Merzoug Abdelghani qui nous fait l'honneur de juger notre travail.

Nous remercions vivement monsieur Djekoun Mohamed pour le grand donneur qu'elle nous a fait, en acceptant de nous encadrer citez qui ont apprécié les vastes connaissances et les qualités professionnelles qui serviront d'exemple. ses conseils ainsi que sa gentillesse pour réaliser au mieux ce modeste travail

Nous n'oublierons jamais de remercier tous nos professeurs, de la première jusqu'à 2^{eme} Année Master, qui sans leur savoir et leur compétence nous ne serions pas à ce niveau. Nous four devons respect et considération. et les responsables des laboratoires du département, surtout Melle.

Houda, Mme. Houria

*Enfin nos remerciements vont également à madame **Yasmina**
chef de laboratoire*

de L'hôpital d'Oued Zenati

*Nos remerciement vont également à : Assane Saley A. Razak,
Diallo Modibo*

Hamidou Seybou Assiatou

*Que tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à
l'élaboration de ce*

*modeste travail, trouvent ici l'expression de nos
sentiments de*

reconnaissance et de respect.

As

ma et Karima

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction générale	1
------------------------------------	---

CHAPITRE I : *Saccharomyces cerevisiae*

1. La levure modèle de cellule eucaryote	03
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	03
2.1. Définition	03
2.2. Classification scientifique.....	04
2.3. Intérêt biologique.....	04
2.4. Caractéristiques.....	05
2.5. Cycle biologique.....	06
2.5.1. Reproduction asexuée.....	07
2.5.2. Reproduction sexuée.....	08
2.5.3. Condition de croissance.....	09
2.6. Métabolisme	09
2.6.1. Métabolisme oxydatif	10
2.6.2. Métabolisme fermentaire	10
2.6.3. Effet glucose	11
2.6.4. Effet pasteur.....	11
2.6.5. Effet Crabtree.....	11

3. Biomarqueur	12
4. Bioindicateur	12

CHAPITRE II : Les pesticides

1. Définition.....	14
2. Composition.....	14
2.1. Une ou plusieurs matières actives.....	14
2.2. Un ou plusieurs additifs.....	14
3. Regroupement des pesticides.....	14
3.1. Catégorie d'usage.....	15
3.2. Origine.....	16
3.3. Type de formulation.....	16
3.4. Selon le groupe chimique.....	17
3.4.1. Les organophosphorés.....	17
3.4.2. Les organochlorés.....	17
3.4.3. Les carbamates.....	18
3.5. Classification selon la dangerosité.....	18
4. Effet Eco toxicologique des pesticides.....	18
4.1. Effet sur l'environnement.....	18

4.2.4.2.Effet sur la biodiversité : les pesticides vont évidemment éliminé les organismes contre lesquels ils sont utilisés. Mais, la plupart de ces produits vont également toucher d'autre organismes que ceux visés au départ, de manière direct (absorption, ingestion, respiration, etc) ou indirect (via un autre organisme contaminé, de l'eau pollué, etc.)les effets sur la biodiversité, et notamment la flore et la faune terrestre et aquatique, sont donc indéniable.il peuvent parfois observe langent après l'application, du fait de la persistance des produits au de la perturbation des équilibres des écosystèmesla faune et la flore :on effectue

des essais d'écotoxicité, généralement en laboratoire, sur des espèces représentatives et compatible avec le contexte expérimentale (biologie connue, espèces peu sujettes a des variations génétique, espèces d'une maintenance faciles et de faible cout).de nombreuses études permettent donc d'identifier le danger a court, moyen et longue terme pour les espèces non cibles, les effets que peut avoir un pesticide sur les organismes autre que sa cible sont deux typela toxicité aigue ou létale qui liée à une pollution majeure ou ponctuelle du milieu provoquent la mort des organismesla toxicité chronique qui la plus souvent lier à une exposition prolongée à de faible concentration du polluant qui vent induire les effets directe ou indirecte sur l'organisme et les population (modification des comportements ,des fertilités) A longue terme la toxicité chronique peut conduire à des mal formation congénital voir à la mort prématuré ou des populationles pesticides s'accumulent au fil de la chaine trophique pour ce concentrer dans les dernier maillons de cette chaine ; d' o les effets indirects que peuvent avoir les pesticides sur certain organismes Ce sont des espèces au sommet de la chaine alimentaire (mammifère oiseau etc.) qui témoignent les problèmes posé par les pesticides Mais les insectes (notamment butineurs comme les bailles et les papillons) et les animaux a sang froid (comme les reptiles et les amphibiens) sont les plus touchés. Ainsi ;des micro-organismes a la baleine bleue, toutes les espèces sont des victimes ; actuelles ou a venir , des millions de tonnes de pesticides déversée sur la planète.(mémoire) Effet sur la santé..... 20

5. Actara® 25 WG) Thiaméthoxame (.....	22
5.1. Définition.....	22
5.2. Composition.....	22
5.3. Formulation.....	23
5.4. Mode d'action.....	23
6. Informations toxicologiques.....	23
7. Informations écologiques.....	24
7.1. Informations pour l'élimination.....	24
8. Effets écotoxicologiques.....	24
9. Relation entre levure et pesticide.....	25
10. Bioaccumulation et dégradation des pesticides.....	25

CHAPITRE III : Matériel et Méthodes

1. Matériel.....	27
1.1. Matériel biologique) bioindicateur (.....	27
1.2. Substance chimique.....	27
1.2.1. Caractéristiques techniques.....	27
1.2.2. Composition.....	27
1.2.3. Formulation.....	27
1.3. Matériel expérimental	28
1.3.1. Appareillage	28
1.3.2. Verrerie	28
2. Méthodes	29
2.1. Culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.2. Les tests.....	29
2.2.1. Principe.....	29
3. Mode opératoire	29
3.1. Effet de la Thiaméthoxame sur la cinétique de croissance	29
3.2. Mesure de la catalase	32
3.3. Dosage des protéines	34
3.3.1. Principe du dosage	34
3.3.2. Protocole	34
4. Etude statistique	35

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

1. Biomasse.....	36
1.1. Dénombrement sur milieu solide.....	36
1.2. Dénombrement sur milieu liquide.....	37
1.3. Dosage des protéines	38
1.4. Activité enzymatique (catalase).....	39
2. Discussion.....	40
Conclusion.....	42

Perspectives

Annexe

Références bibliographiques

Résumé

Abstract

الملخص

Liste des figures

<i>Figures</i>	<i>Titres</i>	<i>Pages</i>
<i>Fig. 1.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>04</i>
<i>Fig. 2.</i>	<i>Paroi de S. cerevisiae</i>	<i>06</i>
<i>Fig. 3.</i>	<i>Cycle de vie chez S. cerevisiae</i>	<i>07</i>
<i>Fig. 4.</i>	<i>Le bourgeonnement</i>	<i>08</i>
<i>Fig. 5.</i>	<i>Différentes étapes du cycle cellulaire mettant en avant les changements de formes au cours du bourgeonnement</i>	<i>08</i>
<i>Fig. 6.</i>	<i>Le devenir des pesticides dans l'atmosphère</i>	<i>20</i>
<i>Fig. 7.</i>	<i>Thiaméthoxame</i>	<i>22</i>
<i>Fig. 8.</i>	<i>formule chimique de thiaméthoxame</i>	<i>23</i>
<i>Fig. 9.</i>	<i>Thiaméthoxame une action rapide</i>	<i>23</i>
<i>Fig. 10.</i>	<i>Cellule de Malassez</i>	<i>30</i>
<i>Fig. 11.</i>	<i>Numération sur cellule de Mallassez</i>	<i>31</i>
<i>Fig. 12.</i>	<i>Gélose de Sabouraud</i>	<i>31</i>
<i>Fig. 13.</i>	<i>Colonies de levures obtenues après 24h d'incubation</i>	<i>32</i>
<i>Fig. 14.</i>	<i>Homogénéiseur ultra-son VIBRA CELL 75186</i>	<i>33</i>
<i>Fig. 15.</i>	<i>Centrifugeuse réfrigérée SIGMA 2-16 K</i>	<i>33</i>
<i>Fig. 16.</i>	<i>Spectrophotomètre visible et UV/visible JENWAY 6305</i>	<i>34</i>
<i>Fig. 17.</i>	<i>Présente la concentration inhibitrice de 50%.</i>	<i>36</i>
<i>Fig. 18.</i>	<i>Variation du nombre des cellules vivantes en fonction des différentes concentrations de Thiaméthoxame.</i>	<i>37</i>
<i>Fig. 19.</i>	<i>L'évaluation du taux de protéine en fonction des différentes concentrations du Thiaméthoxame.</i>	<i>38</i>
<i>Fig. 20.</i>	<i>La variation de l'activité catalase en fonction des différentes concentrations de Thiaméthoxame</i>	<i>39</i>

Liste des tableaux

<i>Tableaux</i>	<i>Titres</i>	<i>Pages</i>
<i>Tab. 01.</i>	<i>Différents types de pesticides et leurs cibles</i>	<i>15</i>
<i>Tab. 02.</i>	<i>différentes formulations des pesticides</i>	<i>16</i>

Introduction générale

Le contrôle chimique des produits alimentaires a entraîné une augmentation spectaculaire du rendement des denrées majeures faisant partie du régime alimentaire, contribuant ainsi à l'amélioration de la santé publique; ce traitement par les pesticides est jusqu'à présent le moyen de protection prépondérant. Cependant, les pesticides peuvent aussi 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, l'atteinte aiguë et chronique du système nerveux et l'endommagement des poumons.

Le régime alimentaire est une source importante d'exposition aux pesticides et à leurs traces très dangereuses présentes dans les denrées. Afin de minimiser l'exposition humaine aux résidus de pesticides, des contrôles réglementaires concernant leurs utilisations et le niveau de leurs résidus ont été établis. Mais malgré la conscience publique du risque provenant de cette exposition et les divers incidents alarmants cités, et quoi qu'il en soit, ces produits phytosanitaires resteront, dans le cadre d'une politique productiviste et à des fins et des volontés exportatrices, une des composantes essentielles de la production alimentaire. En effet, leur utilisation est toujours en croissance et de nouvelles matières actives sont continuellement et fréquemment introduites sur le marché ; les contrôles très récents indiquent une présence permanente et préoccupante de résidus et multirésidus contaminant les denrées diverses. Par conséquent l'examen de ces résidus et de leurs effets demeure une nécessité, surtout que pour de nombreux pesticides, certains pesticides sont capables d'interagir avec les structures cellulaires directement ou après transformation par les enzymes du métabolisme, Divers systèmes expérimentaux ont servi à élucider les mécanismes d'action des pesticides, mais depuis quelque temps l'expérimentation toxicologique et les études de toxicités diverses dépendent de plus en plus des modèles cellulaires et des microorganismes. Les caractéristiques cellulaires et moléculaires exceptionnelles du modèle levurien lui fournissent des avantages uniques pour l'exécution de tout plan expérimental et l'interprétation des résultats; les levures sont désormais un matériel expérimental indispensable pour la recherche scientifique.

Le but général de ce mémoire était d'étudier les toxicités des pesticides couramment utilisés)Thiaméthoxame(pour le traitement phytosanitaire des denrées alimentaires, à l'aide d'un système expérimental

levurien, *Saccharomyces cerevisiae* eucaryote modèle, et de confirmer la validité de ce modèle expérimental dans le contexte toxicologique.)Dalal J., 2006 (

- ✓ Le premier et le second purement théoriques rassemblent d'une part sur la Biologies de *Saccharomyces cerevisiae* et des généralités sur les pesticides.
- ✓ Le troisième chapitre est consacré aux méthodes et aux techniques employées pour la réalisation de ce travail : Analyses microbiologiques (recherche et dénombrement des microorganismes)
- ✓ Le quatrième chapitre, mentionne sous formes des graphes les différents résultats obtenus au cours de notre étude pratique. Il est esquissé par une conclusion finale.

L'ensemble de cette étude permet de mettre en évidence le risque sanitaire lié aux résidus de pesticide, et l'importance du système expérimental levurien pour la définition de leurs toxicités.

Chapitre I

Saccharomyces cerevisiae

1. La levure modèle de cellule eucaryote :

Les levures peuvent être définies comme étant des champignons unicellulaires se reproduisant par bourgeonnement ou fission (Kreger-van Rij, 1984).

Les levures ont été utilisées par l'homme depuis des millénaires, sans le savoir, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et du pain. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur dans les années 1866-1876 que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. Depuis, leur facilité de culture et l'innocuité d'un grand nombre d'espèces en ont fait les microorganismes les plus utilisés pour la production de boissons alcoolisées et de produits de boulangerie, mais aussi comme source de protéines et de vitamines en alimentation humaine et animale (Leveau et Bouix, 1993).

La levure est un organisme modèle chez lequel de nombreux processus cellulaires et moléculaires communs à toutes les cellules ont été élucidés.

Egalement l'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles confèrent à ces eucaryotes des qualités qui permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des microorganismes procaryotes cependant, les plus communément utilisés (*saccharomyces cerevisiae*) Didier Pol ,1996(.

2. *saccharomyces cerevisiae* :

2.1. Définition :

Elle appartient à la classe des Ascomycètes, à la famille des *Saccharomycetoideae*, genre *Saccharomyces* (Kreger-van Rij, 1984 ; Bouix et Leveau, 1993). (fig1)

C'est un microorganisme utilisé pour sa fermentation alcoolique ainsi appelé levure de bière (*cerevisiae*), mais aussi et surtout dans le domaine des boulangeries la ou elle est appelé « levure de boulanger ». Due à son mode de reproduction, elle est également nommée « levure à bourgeon » ou « levure bourgeonnante ». Elle a été découverte, isolée et identifiée au milieu du XIXème siècle soit reconnue comme étant le petit champignon (*-myces*) se nourrissant de sucre (*saccharo-*) responsable de la fermentation. Elle fut logiquement appelée *Saccharomyces cerevisiae* (Thuriaux, 2004).



Figure01 : *Saccharomyces cerevisiae* [1].

2.2. Classification scientifique :

Règne : *Fungi*
Division : *Ascomycota*
Sous-embr : *Saccharomycotina*
Classe : *Hemiascomycete*
Ordre : *Saccharomycetales*
Famille : *Saccharomycetaceae*
Genre : *Saccharomyces*
Espèce : *Saccharomyces cerevisiae*

2.3. Intérêt biologique :

L'engagement de ces microorganismes dans divers phénomènes naturels a toujours soulevé un intérêt scientifique considérable à leur égard. Actuellement, les levures sont probablement les organismes eucaryotiques dont la biologie cellulaire est la mieux étudiée. Les bonnes connaissances de la biologie moléculaire des levures et les techniques du génie-génétique ont permis d'utiliser des levures pour la production de protéines animales et humaines, comme la présure, l'hormone de croissance humaine ou le vaccin contre l'hépatite B (Leveau et Bouix,1993). Sans oublié aussi leur grand intérêt dans l'industrie agro-alimentaire.

L'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles confèrent à ces eucaryotes des qualités qui permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des microorganismes procaryotes (Didier Pol, 1996).

2.4. Caractéristiques :

Les cellules de levure du genre *saccharomyces*, en particulier *saccharomyces cerevisiae*, sont arrondies, plus ou moins ovalaires, elles ont la formes d'un ellipsoïde de révolution dont le grand axe atteint une longueur d'environ 5 µm chez les cellules haploïdes et 7 à 8µm chez les cellules diploïdes.

La paroi fait environ 20% du poids sec de la levure. Ce réseau poreux d'environ 200 nm de large (trois fois plus large que la membrane cytoplasmique) laisse passer les petites molécules et détermine la forme et la rigidité des cellules. Elle est composée de polysaccharides) B-1,3 glucane et mannane (et de mano) phospho (protéine. Le mannane est un polymère hautement branché qui se termine par une glucosamine liée de façon covalente aux asparagines des mano) phospho (protéines.

De nombreuses mannoprotéines résidant dans l'espace péri plasmique ont une activité hydrolase (invertase, phosphatase acide, amylase, β-glucosidase), sans que l'on sache toujours bien s'il s'agit de protéines pariétales ayant un domaine péri plasmique avec une activité hydrolase (Thuriaux, 2004). On trouve également dans la paroi des lipides et de la chitine. Le noyau, généralement en position centrale a un diamètre d'environ 2 µm chez les cellules haploïdes. Le nombre haploïde de chromosomes est de 16. Le cytoplasme contient des vacuoles en nombre variable qui fusionnent le plus souvent chez les cellules âgées.

On trouve également dans le cytoplasme des inclusions de glycogène et des microvésicules, les peroxyosomes contenant notamment la catalase. Lorsque les levures sont en aérobiose, on trouve des mitochondries qui disparaissent en anaérobiose. La plupart des constituants cellulaires peuvent être distingués au microscope sur la base de leur affinité sélective pour tel ou tel colorant.

Malgré leur petite taille, le microscope optique permet d'obtenir diverses informations sur les levures en particulier si l'on utilise des techniques de coloration. L'observation

d'organites caractéristiques permet de situer les levures dans la classification. (Didier. Pol, 1996).

L'observation vitale peut aussi être utile pour comparer des cellules d'espèces différentes, souvent très semblables, et montrer ainsi les limites de cette approche pour apprécier les différences spécifiques [2].

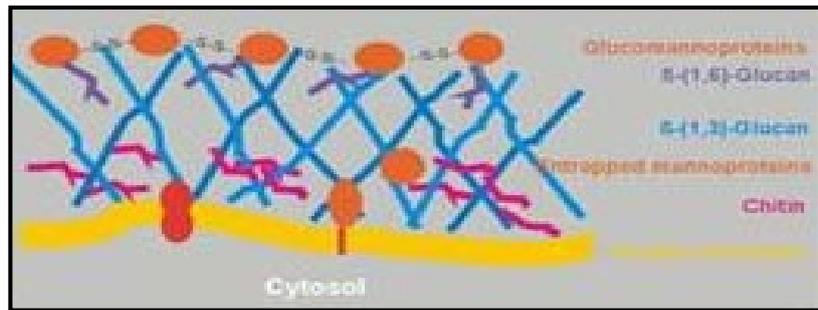


Figure02 : paroi de *S. cerevisiae*. [2]

2.5. Cycle biologique :

Les levures présentent un cycle haplodiplophasique. La plupart d'entre elles peuvent se multiplier par reproduction asexuée aussi bien sous la forme haploïde que diploïde.

A l'état diploïde, elles peuvent aussi subir la méiose et donnent alors des spores haploïdes capables de se multiplier par voie asexuée en un clone haploïde. Deux cellules haploïdes de signe sexuel opposé peuvent fusionner.

Le zygote qui en résulte est à l'origine de la phase diploïde du cycle) Didier Pol, 1996()fig3 (

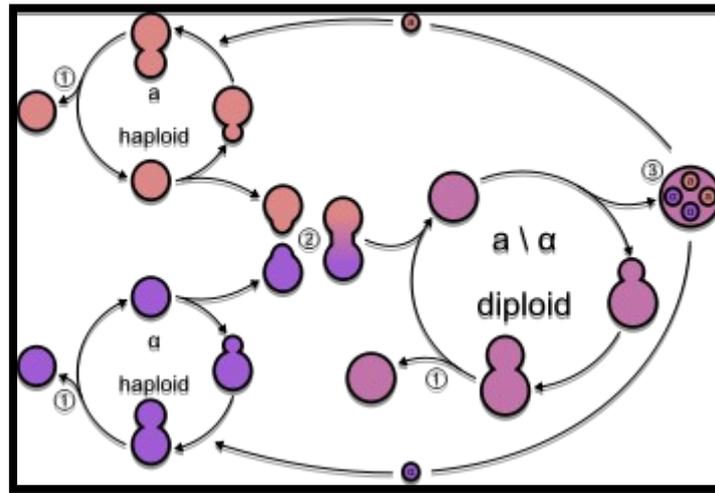


Figure 03 : le cycle biologique de *saccharomyces cerevisiae* [2]

2.5.1. Reproduction asexuée :

La multiplication asexuée s'effectue chez *Saccharomyces cerevisiae* par une forme de division cellulaire atypique : « le bourgeonnement » (Didier Pol ,1996).

- **Bourgeonnement :**

Les cellules de *S. cerevisiae* ont un mode de division cellulaire assez exceptionnel chez les eucaryotes, le bourgeonnement (fig03), qui crée une différence dans la durée individuelle des cycles. En effet, le bourgeon est plus petit que la cellule mère à l'issue de la division, d'où une période de croissance plus longue avant qu'il ne produise lui-même un nouveau bourgeon, faute de quoi les cellules deviendraient plus petites à chaque division. Pour éviter une telle « catastrophe mitotique », la cellule issue du bourgeon a donc une phase pré- réplivative (G1) plus longue (70min) que celle de la cellule mère (30min), et ne déclenche la réplivative de son ADN (qui coïncide à peu près avec la formation du nouveau bourgeon) que lorsqu'elle a atteint une taille critique appropriée. La phase S (20 min) et les phases G2 et M (50 min) complètent le cycle, de sorte que le bourgeon et sa mère ont, respectivement, un cycle de division long (140 min) et court (100 min), avec une valeur moyenne de 120 min pour l'ensemble de la population cellulaire (fig04) (Thuriaux, 2004).



Figure04 : Le bourgeonnement [2].

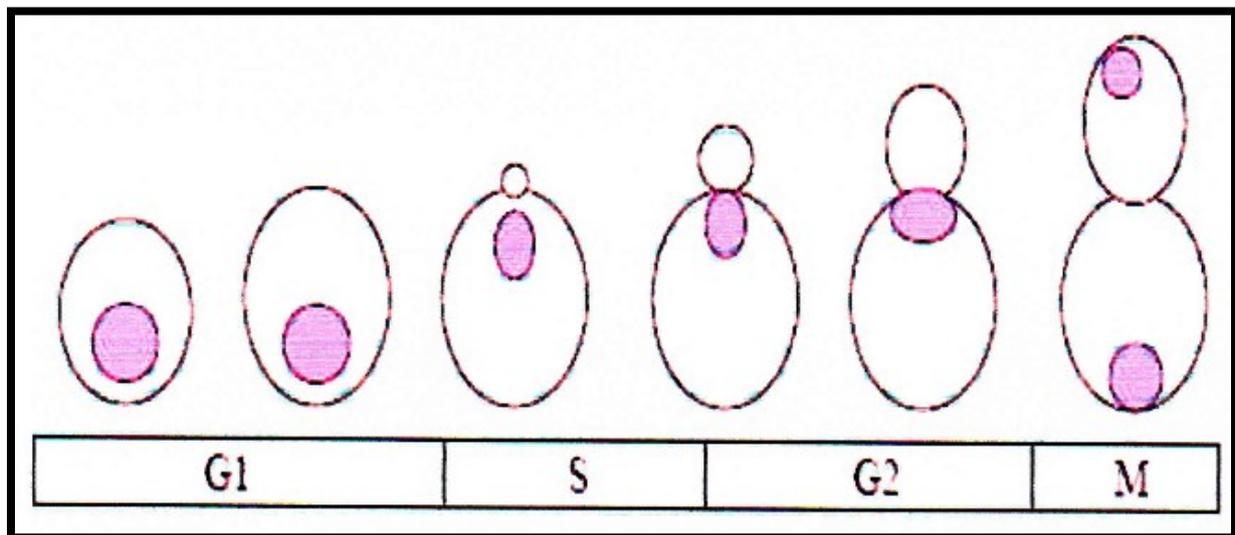


Figure05 : Les différentes étapes du cycle cellulaire mettant en avant les changements de formes au cours du bourgeonnement [2].

2.5.2. Reproduction sexuee :

- **Fecondation :**

Chez *S. cerevisiae*, les spores issues de la méiose germent pour donner des cellules haploïdes qui, en milieu riche, produisent en permanence la phéromone sexuelle correspondant aux haplotypes *MATa* et *MATa*. Ces cellules s'engagent donc spontanément dans un processus de fécondation qui produit un zygote où les deux noyaux fusionnent immédiatement, formant un diploïde *MATa/MATa* qui est certes compétent pour la méiose,

mais où celle -ci ne se produit que dans des conditions de carence sévère, et pour autant que les cellules soient compétentes pour la respiration. La présence d'acétate favorise fortement la méiose, pour des raisons inconnues (Thuriaux, 2004).

2.5.3. Condition de croissance :

Les conditions de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* se rapportent à ceux de la levure en générale, ainsi pour leur développement les levures ont besoin :

- De composés carbonés : source de carbone et d'énergie.
- De composés azotés réduits sous forme d'ammonium ; quelques levures peuvent cependant utiliser des composés oxydés (comme les nitrates) ou organiques pour la synthèse de protéines et d'acides nucléiques.
- D'éléments minéraux variés, vitamines et facteurs de croissance qui varient selon les levures.

Les levures survivent à un large spectre de type environnemental:

- Gamme de tolérance de température: de 0° à 55°C
- Température de prolifération: de 12° à 40°C
- Tolérance au pH: croissance possible à un pH = 2.8-8.
- Tolérance presque complète vis à vis de la dessiccation (levures sèches)
- Tolérance vis à vis de la pression osmotique: les levures peuvent pousser et fermenter jusqu'à des concentrations en sucre de l'ordre de 3M.
- Tolérance alcoolique: jusqu'à 20% d'alcool. (MN Simon, 2011)

2.6. Métabolisme :

• *S.cerevisiae* une levure aérobie facultative :

La fermentation produit deux molécules d'ATP par molécule de glucose oxydée, un bilan énergétique évidemment très modeste par rapport à la respiration. On comprend donc que la quasi-totalité des eucaryotes non photosynthétique privilégient la respiration en présence d'O₂. On appelle effet Pasteur cette adaptation à l'oxygène. *S.cerevisiae* échappe à cet effet, et l'on parle d'effet Crabtree pour qualifier sa forte adaptation à la fermentation même en présence de l'oxygène. *S.cerevisiae* aérobie facultative. En outre *S.cerevisiae* discrimine entre les sucres qu'elle est capable de fermenter et privilégie fortement le glucose

ou le fructose. On parle alors d'effet glucose (ou répression catabolique carbonée) (Thuriaux, 2004).

2.6.1. Métabolisme oxydatif :

Le métabolisme oxydatif du glucose est une oxydation complète de la molécule de sucre en eau et en gaz carbonique à travers les voies métaboliques de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. Deux conditions sont nécessaires à ce métabolisme. Outre la présence d'oxygène, la concentration en glucose doit rester faible, pour éviter un changement métabolique. Chez *S.cerevisiae* comme chez d'autres organismes eucaryotes, les différentes enzymes qui catalysent les réactions du cycle de Krebs sont situées dans la mitochondrie (Nielsen et villadsen ,2003).

Le bilan énergétique théorique maximal de cette voie métabolique est le suivant :



En plus de la production de coenzymes réduits sous forme de NADH et FADH₂, le cycle de Krebs sert à former de nombreux précurseurs pour la synthèse de macromolécules de la composition cellulaire La phosphorylation oxydative régénère les coenzymes réduits NADH et FADH₂ en NAD⁺ et FAD. Les électrons ainsi libérés sont transférés à l'oxygène moléculaire pour former une molécule d'eau. Les protons exportés permettent le maintien du potentiel transmembranaire entre l'espace inter membranaire et la matrice de la mitochondrie. Ainsi, l'entrée des protons à l'intérieur de la mitochondrie permet la synthèse d'ADP et Pi grâce à l'ATPase membranaire (Mouret, 2006).

2.6.2. Métabolisme fermentaire :

Le métabolisme fermentaire peut être défini comme l'ensemble des réactions qui se réalisent en l'absence d'oxygène comme accepteur final d'électron. Cette fonction est alors assurée par des molécules organiques. Ainsi ce métabolisme produit de l'éthanol, du dioxyde de carbone et des produits secondaires. La glycolyse est la voie principale de dégradation du sucre en pyruvate. La distinction entre voie oxydative et fermentaire est le devenir du pyruvate. Dans le cas d'un métabolisme fermentaire, il est transformé en éthanol et dioxyde de carbone .Le bilan énergétique de la dégradation du glucose en éthanol est alors suivant :



Le rendement théorique en éthanol est de 0,51 g d'éthanol par gramme de glucose consommé.

Cependant les réactions de maintenance, de synthèse des infrastructures cellulaires et la formation des composés secondaires (glycérol, acide acétique, substances de réserve) limitent ce rendement à 80-90 % de sa valeur théorique. Le rendement en biomasse est de l'ordre de 0,10 g. g⁻¹ de glucose.

En plus de l'éthanol, se forment d'autres sous-produits dont le plus important est le glycérol.

Le but de la production de glycérol est de rééquilibrer la balance redox en réponse à la production de biomasse associée à la réaction fermentaire (Marlene, 2006).

2.6.3. Effet glucose :

Le glucose peut devenir un répresseur des enzymes de la voie de la gluconéogenèse, de la respiration et des enzymes qui assurent le catabolisme des sucres autre que le glucose. On parle alors "d'effet glucose". Le niveau des enzymes est plus faible et lié soit à une diminution de la concentration en ARNm correspondants, soit à une diminution de leur traduction voire à une augmentation de la vitesse de dégradation de ces enzymes. Cet effet peut être déclenché par d'autres hexoses tels le fructose ou le mannose (Gancedo ,1998).

2.6.4. Effet pasteur :

L'effet Pasteur est une inhibition de la fermentation par la respiration. On assiste ainsi à une diminution de la vitesse de consommation de sucre en présence d'oxygène. L'effet Pasteur est très peu marqué chez la levure *S. cerevisiae* car elle est plus sensible au glucose (effet Crabtree et répression catabolique). (Leveau et Bouix ,1993).

2.6.5. Effet Crabtree :

Crabtree, en 1929, étudie le métabolisme des sucres chez les cellules animales. Il observe que la respiration n'exerce pas d'effet inhibiteur sur la fermentation, mais qu'à l'inverse, la respiration est inhibée par l'activité fermentaire des cellules. Suite à cette découverte, des travaux ont permis de définir l'effet Crabtree comme l'inhibition d'une voie énergétique. La respiration, par une autre voie énergétique, la fermentation. Il s'agit d'un phénomène contradictoire à l'effet Pasteur. Il est parfois nommé « contre-effet » Pasteur.

Une étude similaire sur les levures a été réalisée par De Deken en 1966. L'auteur montre que plusieurs types de levures présentent le même comportement que les cellules

animales étudiées par Crabtree. Il a observé que lorsqu'une souche de *S.cerevisiae* utilise du glucose ou du fructose comme source de carbone en présence d'air, le métabolisme est principalement fermentaire. Ce serait le résultat d'une répression de la synthèse d'enzymes du métabolisme respiratoire dû à une vitesse de fermentation élevée (Guay, 1999)

• **Définition :**

L'effet Crabtree correspond à la transition respiro-fermentaire en conditions aérobies, c'est-à-dire à une production d'éthanol en présence d'oxygène. En aérobiose, lorsque la vitesse d'apport du substrat dépasse un certain seuil, la levure passe d'un métabolisme purement oxydatif à un métabolisme oxydo-réductif.

Le niveau de sensibilité est variable selon le type de levure considéré. Certaines levures, telles que *Saccharomyces cerevisiae*, sont fortement Crabtree positives et produisent déjà de l'éthanol au-delà de 1 g/l de glucose (Mouret, 2006).

3. Biomarqueur :

Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al., 1997).

Les différents types de biomarqueur sont :

- ✓ **Biomarqueur d'exposition :** Ils permettent la mise en évidence d'une exposition actuelle ou passée à un polluant d'un organisme. Par exemple les adduits d'ADN sont utilisés comme biomarqueurs d'exposition à des cellules cancérogènes ou génotoxiques (Timbrell et al., 1994).
- ✓ **Biomarqueur d'effet :** Ils sont utilisés pour évaluer les effets des xénobiotiques sur les individus, les populations ou les écosystèmes.
- ✓ **Biomarqueur de sensibilité :** Ce sont des composés qui traduisent les variations de la sensibilité.

4. Bioindicateur :

Un bioindicateur est un indicateur constitué par une espèce végétale, fongique ou animale ou par un groupe d'espèces (groupe éco-sociologique) ou groupement végétal dont la présence (ou l'état) renseigne sur certaines caractéristiques écologiques (c'est-à-dire physico-chimiques, microclimatique, biologiques et fonctionnelle) de l'environnement, ou sur l'incidence de

certaines pratiques. On les utilise notamment pour la bioévaluation environnementale (suivi de l'état de l'environnement, ou de l'efficacité de mesures compensatoires ou restauratoires).

Son principe est d'observer des effets biologiques ou écosystémiques, au niveau de l'individu et/ou de populations ou écosystèmes (à l'échelle de la biosphère ou de grands biomes éventuellement).

Chapitre II

Les pesticides

1. Définition :

L'étymologie du mot Pesticide c'est construite à partir du suffixe «-cide » qui signifie Tuer et de la racine anglaise « Pest » (animal, insecte ou plante nuisible) provenant du Latin « Pestis »qui désignait le fléau en général.

Un pesticide est en général défini comme étant un produit conçu pour détruire des organismes considérés indésirables ou nuisibles.

Un pesticide est désigné par son nom commun, par son nom chimique ou par son nom commercial. Le nom commun fait référence à l'ingrédient actif. Le nom chimique désigne le nom de la structure chimique de l'ingrédient actif. Le nom commercial est le nom donné par le fabricant .) Mehmet et al.,2007(

Outre définition courante, les pesticides possèdent aussi une définition juridique. Deux termes désignent ces produits : « produits antiparasitaires » au niveau fédéral et « pesticides » au niveau provincial et on peut les appelés Produit phytosanitaire. [3]

2. Composition :

Un pesticide est composé de 2 types de substances :

2.1. une ou plusieurs matières actives : ce sont des matières actives qui confèrent au produit l'effet poison désiré. Exemples : le glyphosate que l'on trouve dans de très nombreux désherbants totaux, le métaldéhyde que l'on trouve dans la plupart des anti-limaces, l'isoproturon dans des désherbantes céréales...

2.2. un ou plusieurs additifs : ces additifs renforcent l'efficacité et la sécurité du produit. Exemple : répulsif, vomitif, épaississant, anti-moussant, solvant ... [4]

3. Regroupement des pesticides :

Il est courant de désigner les pesticides selon des regroupements qui tiennent compte de la cible visée par le pesticide, de l'origine du produit, de sa structure chimique, de la forme sous laquelle le pesticide est commercialisé ainsi que de sa façon d'agir sur la cible.

➤ Un pesticide peut donc être regroupé selon :

- sa catégorie d'usage;
- son origine;
- son groupe chimique;
- son type de formulation;
- selon la dangerosité

3.1. Catégorie d'usage :

La plupart des pesticides peuvent être regroupés selon la cible qu'ils visent. Il est à noter que le suffixe -cide signifie « tuer ».

Catégorie d'usage	Cibles visées	Exemples des cibles
Acaricide	Acariens	Acarien des poussières
Avicide	Oiseaux	Pigeon
Insecticide	Insectes	Blatte
Herbicide	Plantes indésirables	Chénopode
Fongicide	Champignons microscopiques causant des maladies des plantes	<i>Diplocarpon rosae</i> causant la tâche noire du rosier
Piscicide	Poissons	Meunier noir
Rodenticide	Rongeurs	Rat Souris
Molluscicide	Mollusques terrestres	Escargot Limace
Nématocide	Nématodes causant des maladies des plantes	<i>Meloidogyne hapla</i> causant la nodosité des racines chez la carotte

3.2. Origine :

Les pesticides peuvent être regroupés en pesticides organiques ou inorganiques. Les pesticides organiques contiennent du carbone, alors que les inorganiques ne contiennent du carbone que sous forme de carbonate ou de cyanure. Ces derniers sont des dérivés à base d'arsenic, de mercure, de fluor, de soufre et de cuivre, ainsi que des dérivés du cyanure.

Les pesticides organiques peuvent être divisés en 3 groupes : pesticides de synthèse (développés en laboratoire et produits en usine), pesticides naturels (d'origine animale, microbienne ou végétale) et micro-organismes. Les pesticides inorganiques sont dérivés essentiellement de minéraux.)Inra-cemagref 2005(

3.3. Type de formulation :

Les pesticides sont disponibles en différentes formulations. Ils peuvent se présenter sous forme solide, liquide ou gazeuse.

Exemples de formulations	Prêt à l'emploi ou non préparé
<i>Forme solide</i>	
Appât	Prêt à l'emploi
Poudre	Prêt à l'emploi
Poudre mouillable	Non préparé
<i>Forme liquide</i>	
Aérosol	Prêt à l'emploi
Concentré émulsifiable	Non préparé
Solution	Non préparé
<i>Forme gazeuse</i>	
Fumigant	Prêt à l'emploi

3.4. Selon le groupe chimique :

Les pesticides utilisés de nos jours sont des molécules organiques, on les classe en plusieurs grandes familles selon leur composition chimique :

3.4.1. Les organophosphorés :

Les organophosphorés sont des esters obtenus en faisant réagir divers alcools avec l'acide orthophosphorique ou l'acide thiophosphorique (dimefox, Schradan, Parathion, Malathion, Phosdrin...). Ils ont, historiquement, remplacé les organochlorés car ils présentent une faible rémanence (de l'ordre de 48 heures dans l'eau), une toxicité aigüe plus élevée, une meilleure sélectivité vis-à-vis des insectes. Ces composés sont des neurotoxines qui s'attaquent au système nerveux, inhibiteur de cholinestérase et par conséquent toxique vis-à-vis des ravageurs (insectes). Ils sont de plus en plus utilisés en raison de leur spécificité, et d'une persistance dans les eaux et les sols moins longue que celle des organochlorés, mais ils sont également beaucoup plus toxiques. De nombreux pesticides organophosphorés ont été interdits ou leur usage a été sévèrement limité dans de nombreux pays. Les pesticides organophosphorés ont un cycle de vie plus limité que les organochlorés et leurs caractéristiques physiques et chimiques peuvent se modifier avec le temps.

3.4.2. Les organochlorés :

Un composé organochloré est un produit chimique de synthèse, dérivé de molécules de chlore et utilisé comme, pesticide, insecticide, fongicide ou réfrigérant ou molécules intermédiaires de synthèse en chimie et pharmacie. Les plus connus sont les pesticides (DDT(Dichlorodiphényltrichloroéthane), à des doses non-létals, les organochlorés perturbent le système nerveux, l'appareil hépatique, la régulation hormonale et la reproduction de nombreux animaux, y compris l'homme. Ce sont d'importants contaminants des écosystèmes et le problème principal est qu'ils sont extrêmement stables. La plupart d'entre eux font partie des polluants organiques persistants. Ils ne se décomposent pas avant des décennies, et dans certains cas, des siècles.

3.4.3. Les carbamates :

Ce sont des dérivés de l'acide carbamique, dont la formule est NH_2COSH ou NH_2CSOH . Qui regroupent également des herbicides et un grand nombre de fongicides

(Aldicarbe, Carbamyl, Corprophame...). ; Certains carbamates agissent comme inhibiteurs de cholinestérase (enzymes nécessaire au fonctionnement du système nerveux de l'homme et des insectes) ; il a été utilisé comme gaz de combat pendant la première guerre mondiale. Leur demi-vie s'étend de quelques jours à plusieurs mois, voire plusieurs années dans les eaux souterraines. Solubles dans l'eau, leur toxicité est variable d'une molécule à l'autre.)Abhauer, 1990(.

3.5. Classification selon la dangerosité :

L'organisation mondiale de la santé (OMS) classe les pesticides par dangerosité en se basant sur leur dose létale médiane orale ou cutanée. Chaque pesticide est alors placé dans une des quatre classes :

- Extrêmement dangereux
- Modérément dangereux.
- Très dangereux
- Légèrement dangereux

4. Effet Eco toxicologique des pesticides :

4.1. Effet sur l'environnement :

Le risque phytosanitaire consiste à caractériser d'une part l'écotoxicité du produit, d'autre part les possibilités de contact des organismes avec le produit en fonction de leur mode d'action, de leur persistance et de leur capacité de bioaccumulation

Ces produits peuvent être responsables de pollutions diffuses et chroniques et/ou aiguës et accidentelles, lors de leur fabrication, transport, utilisation ou lors de l'élimination de produits en fin de vie.

On retrouve des résidus de pesticides partout: dans l'eau bien sûr, mais aussi dans l'air, les brouillards, l'eau de pluie et le sol. [5]

➤ Le sol :

Il précise que le sol est une source potentielle de contamination par les pesticides pour les autres compartiments environnementaux (air-eau) par la baie de phénomène comme le

ruissèlement. la plus part de ces produits vont également toucher d'autres organismes que ceux visés au départ, de manière directe (absorption, ingestion, respiration, etc.) ou indirecte (via un autre organisme contaminé, de l'eau pollué etc.). Cela peut avoir un effet nocif sur la fertilité du sol. En effet, les vers de terre sont des agents actifs de la fertilité et la circulation de l'eau. Ils sont atteints par les pesticides via l'eau polluée qui imbibe le sol. De plus ces substances dans le sol sont transformées en divers produits de dégradation dont la toxicité n'est pas toujours connue. La disparition de la substance active et des molécules dérivées est plus ou moins rapide selon le caractère biodégradable des molécules en cause, et selon les conditions de milieu.)Calvet r.,2005(

➤ **L'air**

La contamination de l'atmosphère par les pesticides s'effectue :

- Par dérive au moment des applications : fraction de la pulvérisation qui n'atteint pas le sol ou la culture et qui est mise en suspension par le vent et les courants d'air. A ce niveau, les traitements aériens contribuent de façon significative à la contamination de l'atmosphère.
- Par volatilisation de post-application à partir des sols traités : elle semble même être dans certains cas plus importante que la dérive qui a lieu au moment des applications.
- Par érosion éolienne sous forme adsorbée sur les poussières de sols traités)Inracemagref 2005(

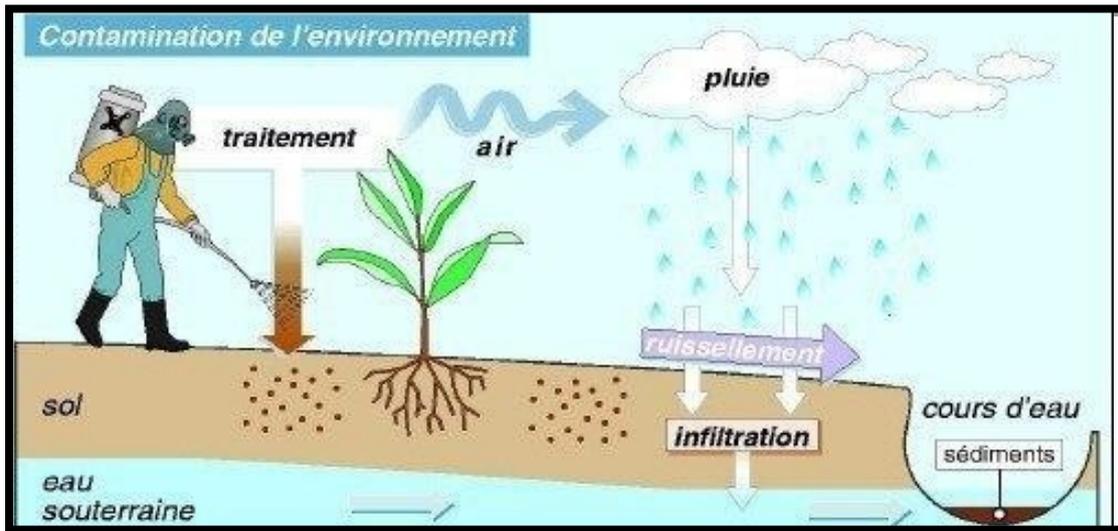


Figure 06: Le devenir des pesticides dans l'atmosphère [6]

➤ **L'eau :**

Pesticide impacts on aquatic systems are often studied using a to study movement and fate of chemicals in rivers and streams. impacts des pesticides sur les systèmes aquatiques sont souvent étudiés en utilisant un modèle de transport de l'hydrologie pour étudier le mouvement et le devenir des produits chimiques dans les rivières et les ruisseaux. As early as the 1970s quantitative analysis of pesticide runoff was conducted in order to predict amounts of pesticide that would reach surface waters.

There are four major routes through which pesticides reach the water: it may drift outside of the intended area when it is sprayed, it may percolate, or leach, through the soil, it may be carried to the water as runoff, or it may be spilled, for example accidentally or through neglect. They may also be carried to water by . Factors that affect a pesticide's ability to contaminate water include its water , the distance from an application site to a body of water, weather, soil type, presence of a growing crop, and the method used to apply the chemical. Il existe quatre grands axes à travers lesquels pesticides atteignent l'eau: elle peut se balader à l'extérieur de la zone destinée quand il est pulvérisé, il peut s'infiltrer, ou de lixiviation, à travers le sol, elle peut être mise à l'eau par ruissellement, ou il peut être déversés, par exemple, accidentellement ou par négligence. Ils peuvent également être effectués à l'eau par l'érosion du sol . Les facteurs qui affectent la capacité des pesticides à contaminer l'eau comprennent : la solubilité , la distance à partir d'un site d'application à un organisme de eau,

la météo, le type de sol, la présence d'une culture en croissance, et la méthode utilisée pour appliquer le produit chimique.)Ifen, 1998(.

4.2.4.2.Effet sur la biodiversité : les pesticides vont évidemment éliminé les organismes contre lesquels ils sont utilisés. Mais, la plupart de ces produits vont également toucher d'autre organismes que ceux visés au départ, de manière direct (absorption, ingestion, respiration, etc) ou indirect (via un autre organisme contaminé, de l'eau pollué, etc.)les effets sur la biodiversité, et notamment la flore et la faune terrestre et aquatique, sont donc indéniable.il peuvent parfois observe langent après l'application, du fait de la persistance des produits au de la perturbation des équilibres des écosystèmes**la faune et la flore :**on effectue des essais d'écotoxicité, généralement en laboratoire, sur des espèces représentatives et compatible avec le contexte expérimentale (biologie connue, espèces peu sujettes a des variations génétique, espèces d'une maintenance faciles et de faible cout).de nombreuses études permettent donc d'identifier le danger a court, moyen et long terme pour les espèces non cibles, les effets que peut avoir un pesticide sur les organismes autre que sa cible sont deux typela toxicité aigue ou létale qui liée à une pollution majeure ou ponctuelle du milieu provoquent la mort des organismesla toxicité chronique qui la plus souvent lier à une exposition prolongée à de faible concentration du polluant qui vent induire les effets directe ou indirecte sur l'organisme et les population (modification des comportements ,des fertilités) A long terme la toxicité chronique peut conduire à des mal formation congénital voir à la mort prématuré ou des populationles pesticides s'accumulent au fil de la chaine trophique pour ce concentrer dans les dernier maillons de cette chaine ; d' o les effets indirects que peuvent avoir les pesticides sur certain organismes Ce sont des espèces au sommet de la chaine alimentaire (mammifère oiseau etc.) qui témoignent les problèmes posé par les pesticides Mais les insectes (notamment butineurs comme les bailles et les papillons) et les animaux a sang froid (comme les reptiles et les amphibiens) sont les plus touchés. Ainsi ;des micro-organismes a la baleine bleue, toutes les espèces sont des victimes ; actuelles ou a venir , des millions de tonnes de pesticides déversée sur la planète.(mémoire) **Effet sur la santé :**

Les pesticides sont présents dans nos aliments également : plus de 50% par l'agriculture intensive.

Ils finissent finalement dans nos organismes, apportés là par l'eau et les aliments consommés. Nos organismes hébergent ainsi des centaines de molécules toxiques

Qui posent un véritable problème de santé publique, et pas seulement pour les utilisateurs qui sont les plus exposés, mais aussi pour la population générale. [7].

✓ **Des effets aigus :**

Les personnes les plus fréquemment victimes d'intoxication aigue par les pesticides sont les agriculteurs. L'organisation Mondiale de la santé a estimé qu'il y a chaque année dans le monde 1 million de graves empoisonnements, avec quelque 220000 décès.

Dans l'intoxication aigue le délai qui sépare l'exposition importante (exposition à des fortes doses) au pesticide et l'application des symptômes est relativement court (de quelques heures à quelques jours). L'intoxication massive peut avoir des conséquences graves par foie mortelle. les différents travaux réalisés sur les effets aigus des pesticides retiennent principalement :

- les Troubles répertoriés
- les troubles neurologiques (les maux de tête, la nausée et le vertige)
- effet dermatologique

✓ **Des effets chroniques :**

L'intoxication chronique survient à la suite d'absorption de faibles doses de pesticides durant plusieurs jours, plusieurs mois ou même plusieurs années. Ce type d'intoxication est souvent lié à la présence de pesticides résiduels dans différents milieux et ne peut être mesuré scientifiquement que plusieurs années après l'homologation des produits.

De nombreuses études scientifiques indiquent, malgré quelques réserves, que l'exposition chronique aux pesticides est susceptible d'augmenter l'incidence de dérèglements des systèmes reproducteurs, endocriniens, immunitaires, nerveux et cancérogènes)Isabelle Tron., 2001(.

5. Actara® 25 WG) Thiaméthoxame: (

5.1. Définition :

Actara® est un insecticide systémique unique qui fournit une excellente élimination, d'action rapide et durable d'un large éventail de parasites foliaires et du sol et offre une protection efficace pour les grandes cultures du monde. Ses avantages vont au-delà

de contrôle des insectes que ses propriétés chimiques uniques aide constante aux agriculteurs de maximiser le potentiel des cultures par des plantes plus saines et plus vigoureuse, une meilleure qualité des fruits récoltés et les céréales avec des rendements plus élevés.)Syngenta., 2008(.



Figure 07 : Thiaméthoxame [8]

5.2. Composition :

Actara® 25WG contient 25% de Thiaméthoxame (250 g/kg de Thiamethoxam)

Le Thiaméthoxame, substance active d'Actara est systémique. Elle appartient à la classe des thianicotinyls. Le Thiaméthoxame agit principalement par ingestion et bloque rapidement la locomotion et la nutrition de l'insecte.

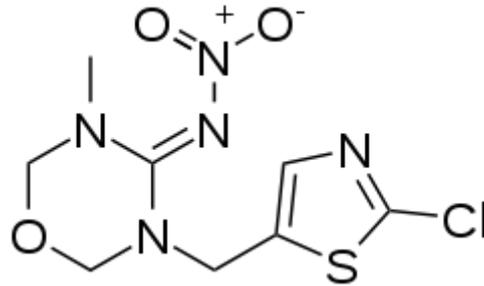


Figure 08 :formule chimique de Thiaméthoxame[8]

- Appellation chimique :

(NE)-N-[3-[(2-chloro-1,3-thiazol-5-yl) méthyl]-5-méthyl-1,3 ,5-oxadiazinan-4-ylidène] nitramide.

5.3. Formulation :

Il se présente sous une formulation moderne de micro granules dispersibles dans l'eau

5.4. Mode d'action :

Thiaméthoxame agit sur les insectes par contact et ingestion. La matière active appartient à la seconde génération des Neonicotinoides. Elle interfère avec le récepteur acétyl-choline nicotinique du système nerveux. Déjà 1 heure voire 30 minutes après l'absorption de Thiaméthoxame l'insecte arrête de s'alimenter ; immobile et inactif, il meurt 1 jour plus tard. Thiaméthoxame agit contre tous les stades larvaires et les adultes des insectes.



Figure 09: Thiaméthoxame une action rapide)Syngenta., 2008(.

6. Informations toxicologiques :

- Toxicité aiguë par voie orale: DL50 rat, > 5,000 mg/kg
- Toxicité aiguë par inhalation: CL50 rat, > 5,290 mg/m³, 4 h
- Toxicité aiguë par pénétration cutanée : DL50 rat, > 5,000 mg/kg

- Irritation de la peau : non irritant directive
- Irritation des yeux : non irritant
- Toxicité à long terme : Tumeurs de foie remarquables chez les souris qui ne sont pas appropriées aux humains.

-Ne montre pas d'effets toxiques pour la reproduction lors d'expérimentations animales.

Les tests sur les animaux n'ont montré aucun effet sur le développement du fœtus.

-N'a pas montré la neurotoxicité chez des expériences sur des animaux.

Cette information se rapporte à Thiaméthoxame, Aucun effet nuisible chez l'homme n'est prévu aux niveaux au-dessous de la limite d'exposition professionnelle.)Syngenta., 2004(.

7. Informations écologiques :

7.1. Informations pour l'élimination :

- ✓ **Bioaccumulation** : Le Thiaméthoxame montre un faible potentiel de bioaccumulation

Stabilité dans l'eau : Le Thiaméthoxame n'est pas persistant dans l'eau.

- ✓ **Stabilité dans le sol** : Le Thiaméthoxame n'est pas persistant dans le sol.

8. Effets écotoxicologiques :

- ✓ **Toxicité pour le poisson** : CL50 *Oncorhynchus mykiss* (Truite arc-en-ciel), > 100 mg/l, 96 h
- ✓ **Toxicité pour les invertébrés aquatiques**: CL50 *Daphnia magna*, > 100 mg/l, 48 h
- ✓ **Toxicité pour les algues** : (algues vertes), > 100mg/l, 72 h.)Syngenta., 2006(

9. Relation entre levure et pesticide :

La membrane plasmique des levures est le site d'action de nombreux antifongiques qui vont soit se complexer aux stérols soit inhiber la synthèse de l'ergostérol et entraîner ainsi une désorganisation de la structure membranaire, et par la suite, un déséquilibre dans les échanges de la levure avec le milieu environnant; suivi par différentes perturbations tel qu'une accumulation d'acides gras libres, une inhibition de la respiration et de la synthèse des acides nucléiques accompagnée par une augmentation du poids sec et de la synthèse des acides nucléiques accompagnée par une augmentation du poids sec et des déformations morphologiques notables)Buchenauer,1987;Bonaly,1991;Hargraves et al,1996(.Or,à part leur fonction de barrière de perméabilité entre l'intérieur et l'environnement et la maintenance de la structure cellulaire, les membranes sont le milieu naturel de plusieurs protéines fonctionnelles essentielles au fonctionnement cellulaire. Ainsi, la grande accumulation de faibles concentrations de xénobiotique lipophiles présents dans le milieu peut provoquer une altération des propriétés fonctionnelles des membranes, qui peut à son tour avoir des conséquences néfastes très sévères sur la cellule en entier, mise à part la possibilité d'une réaction du toxique avec les composants intracellulaires du cytoplasme ou du noyau.Or,cette dernière possibilité est souvent à ne pas sous estimer, la toxicité des pesticides pouvant s'exercer directement envers des composants intracellulaires levuriens de différents compartiments cellulaire; des actions cytotoxiques et génotoxiques différents compartiments cellulaires;des actions cytotoxiques et génotoxiques diverses viennent alors s'ajouter et se combiner)Ahlers et al;Goin et Mayer,1995;Wang et al,2002;Sohn et al,2004(.

Par ailleurs, l'estimation du danger environnemental et sanitaire de plus de 100000 substances chimiques fabriquées par l'homme, sans augmenter l'expérimentation avec les animaux supérieurs, implique logiquement la combinaison de plusieurs méthodes, tel que les tests utilisant des microorganismes.

10. Bioaccumulation et dégradation des pesticides :

Récemment, l'aptitude des microorganismes à accumuler et/ou métaboliser certains pesticides a été le centre d'attention à cause de la persistance environnementale et la toxicité de ces substances chimiques. Une variété de microorganismes peuvent utiliser les pesticides comme source unique de carbone ; cependant, dans certains cas ce métabolisme microbien des contaminants peut produire des métabolites toxiques, et souvent l'adsorption se présente comme le choix le plus promoteur. Ce mécanisme implique des processus indépendants du

métabolisme tel que l'adsorption physique et chimique, l'échange d'ions, l'interaction électrostatique, la complication, la chélation et la micro précipitation. Ces réactions se déroulent dans la paroi et la membrane cellulaires, contrairement aux biotransformation qui mettent en œuvre le métabolisme aérobie ou anaérobie (Aksu, 2005). La taille des cellules, leur morphologie et composition chimique, ainsi que le nombre et la distribution des sites actifs d'adsorption jouent un rôle déterminant dans la capacité d'adsorption (Aksu, 2005). La concentration du toxique dans la membrane plasmique peut être plusieurs fois supérieure à sa concentration dans le milieu extérieur et dans les compositions intracellulaires hydrophiles (Ahlers et al, 1991).

Pour conclure, on peut noter qu'en matière d'interaction avec les pesticides, le modèle levurien se montre comme un système appropriée pour répondre à nombreuses hypothèses de cytotoxicité et génotoxicité directe ou indirecte. Ainsi, perturbation des systèmes membranaires, inhibitions enzymatique, stress oxydatif, perte de chromosome, métabolites réactionnels électrophile, et autres actions cytotoxique et/ou génotoxiques sont relevés parallèlement à la baisse de la viabilité et la diminution de la croissance et de l'activité fermentaire des levures sous l'effet des pesticides. Donc, les levures peuvent être passives et subir l'action toxique, comme elles pourraient participer à cette toxicité par bioactivation des pesticides en métabolites réactifs électrophiles présentant une forte probabilité de liaison avec les macromolécules structurales et résultant en adduits, à l'exemple du métabolisme levurien de l'aflatoxine. Donc, là aussi le métabolisme peut jouer un rôle crucial qui peut être nuisible, ou protecteur lorsque les métabolites obtenus sont moins toxiques que les pesticides initiaux.

Mais, si les pesticides exercent une action toxique envers les levures, ces dernières peuvent à leur tour diminuer les résidus de pesticides par adsorption et/ou métabolisation des molécules toxiques. Cette vue d'ensemble ne peut que souligner l'efficacité du modèle levurien pour définir les basses cellulaires et moléculaires de la toxicité des pesticides.

Chapitre III

Matériel et méthodes

1. Matériel :

1.1. Matériel biologique) bio indicateur(:

Les levures, en tant qu'eucaryotes sont potentiellement un modèle pertinent pour représenter les organismes eucaryotes supérieurs dans les études de toxicités. La croissance, la physiologie, la biochimie et la génétique des levures, surtout *S. cerevisiae*, ont été considérablement étudiées, ce qui les rend un matériel convenable pour l'expérimentation. D'un point de vue pratique elles présentent de nombreux avantages puisqu'elles sont facilement cultivées et maintenues dans les conditions du laboratoire. En plus, les levures peuvent survivre dans les conditions anaérobies permettant de réaliser des tests non praticables avec les organismes supérieurs (Galzy, 1993 ; et al (. Ce qui justifie notre choix de ce bio-indicateur pour notre travail.

1.2. Substance chimique :) Insecticide - Thiaméthoxame (

Insecticide de nouvelle génération appartenant à la famille des Neonicotinoïdes, à usage agricole pour la lutte contre les mouches blanches (*Bemisia sp* et *Trialeurodes vaporariorum*) et les pucerons sur la culture de la tomate, la mineuse des Agrumes et les pucerons sur Laitue.

1.2.1. Caractéristiques techniques :

Thiaméthoxame est un produit hautement systémique, il agit par ingestion et par contact sur les insectes cibles. Il est doté d'une activité systémique et d'une pénétration rapide dans la plante, soit par les feuilles ou par les racines. Il agit par interférence avec le récepteur nicotine acétyle choline du système nerveux des insectes. Thiaméthoxame à un champ d'activité très large qui lui permet de combattre de nombreuses espèces d'insectes dans la plupart des cultures.

1.2.2. Composition:

Actara® 25 WG contient 25% de Thiaméthoxame 3-2(-chloro-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-[1,2, 3] oxadiazinan-4-ylidene-N-nitroamine

1.2.3. Formulation:

Granulés dispersibles dans l'eau.)Syngenta., 2008(

1.3. Matériel expérimental :

1.3.1. Appareillage :

- Agitateur magnétique INTERLABS et barreau aimanté
- Anse de Platine
- Autoclave SANO CLAVE WOLF 73337
- Balance EXPLORER PRO
- Bec Bunsen
- Centrifugeuse réfrigérée SIGMA 2-16 K
- Cellule de MALLASSEZ
- Etuve INCUCCELL
- Four Pasteur MEMMERT
- Homogénéiseur ultra-son VIBRA CELL 75186
- Microscope optique ZEISS
- Pompe à oxygène
- Réfrigérateur LIEBHERR
- Spectrophotomètre visible et UV/visible JENWAY 6305
- Verre de montre et spatule

1.3.2. Verrerie :

- Becher de 200ml
- Boîtes de Pétri
- Flacons en verre stériles
- Lames et lamelles
- Micropipette à embout bleu (100 à 1000 μ L)
- Pipette graduée de 25mL
- Pipettes Pasteur
- Portoir tube à essai
- Seringues de 5CC
- Tubes à hémolyse stérile
- Tubes à vis stérile
- Tubes Eppendorf de 1.5ml

2. Méthodes :

Cette étude a été réalisée au laboratoire du département de biologie de l'université de Guelma. Elle consiste à tester l'effet toxique de l'insecticide Thiaméthoxame sur *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons procédé d'abord à une culture du matériel biologique puis aux expérimentations.

2.1. Culture de *Saccharomyces cerevisiae*:

Nous avons commencé par le lavage de notre levure (puisque'elle est conditionnée en pate) pour le débarrasser de toute trace de substrat dans le milieu) Didier, 1996 (

Le lavage se fait comme suit :

- Peser et verser 1g de levure dans un bécher de 200mL de volume
- Ajouter 100mL d'eau physiologique
- Le placer sur l'agitateur magnétique en aérant avec la pompe à oxygène pendant 3h environ.

Nous avons cultivé ensuite la levure dans deux types de milieux de culture : la gélose de Sabouraud et le Sabouraud liquide

2.2. Les tests :

2.2.1. Principe :

Ces différents tests ont été réalisés afin d'évaluer l'effet d'un pesticide (l'insecticide Thiaméthoxame (sur notre bio indicateur (*Saccharomyces cerevisiae*) et aussi pour comprendre les mécanismes de défenses de la cellule vis-à-vis des xénobiotiques.

Nous avons ainsi réalisé les tests suivants :

- Effet du pesticide sur la cinétique de croissance
- Mesure de l'effet sur l'activité enzymatique : la catalase
- Dosage des protéines

3. Mode opératoire :

3.1. Effet de la Thiaméthoxame sur la cinétique de croissance :

❖ Dénombrent en milieu liquide (Sabouraud liquide) :

- Préparer une solution mère de Thiaméthoxame en raison de 1g de Thiaméthoxame pour 100mL d'eau distillée
- Préparer ensuite cinq dilutions pour les concentrations suivantes : 25mg /L ; 50mg/L ; 100mg/L ; 150mg/L et 200mg/L
- Stériliser et étiqueter six tubes à vis à proximité du bec Bunsen
- Mettre dans le tube témoin 1CC de la levure lavée et 5CC de Sabouraud liquide

- Dans les cinq autres tubes mettre 1CC de levure ; 5CC de Sabouraud liquide et 1CC de chaque concentration de Thiaméthoxame
- Incuber à 28°C pendant 24h
- Après incubation passer à la lecture au microscope sur cellule de Malassez



Figure10 : Cellule de Malassez [10]

- **Numération sur cellule de Malassez :**
 - ✓ Diluer les suspensions à 10^{-2}
 - ✓ Ajouter quelques gouttes de bleu de méthylène dans chaque dilution
 - ✓ Placer la cellule sur le microscope
 - ✓ Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer la lamelle
 - ✓ Déposer la lamelle sur les rebords
 - ✓ Placer l'extrémité de la micropipette contre la lamelle et délivrer par capillarité le liquide en évitant tout débordement vers les rigoles.
 - ✓ Compter le nombre de cellule dans 10 carreaux
 - ✓ Le nombre total de cellules est donné par la relation :

Nombre de cellules	nombre de cellules comptées	
-----	-----	x facteur de dilution
Unité de volume	volume du comptage	

sur cellule de
 • levures sur

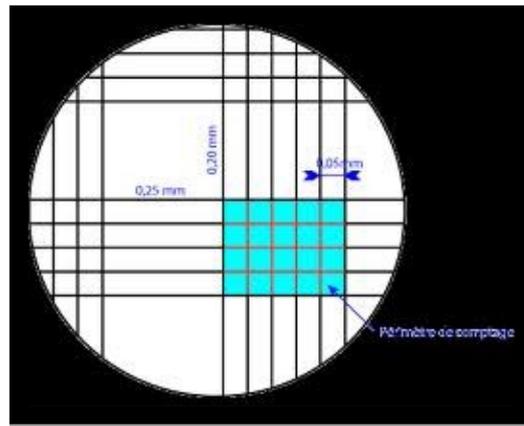


Figure 11. Numération Malassez [10]

Dénombrement des gélose de Sabouraud:



Figure 12 : Gélose de Sabouraud [11]

La gélose de Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes.

- Couler, refroidir et marquer six boîtes de Pétri à proximité du bec Bunsen
- Eliminer le surnageant de la levure lavée qu'on aura au préalable fait décanter
- Ajouter 50mL de Sabouraud liquide au culot et agiter
- Ensemencer par stries la première boîte (témoin) avec cette préparation
- Repartir ensuite le restant de la préparation (mélange Sabouraud-levure) dans cinq tubes étiquetés
- Mettre 1CC de chaque concentration de pesticide dans ces tubes
- Ensemencer les boîtes de Pétri avec 100 μ L de chaque concentration correspondante
- Incuber à l'étuve pendant 24h à 28°C

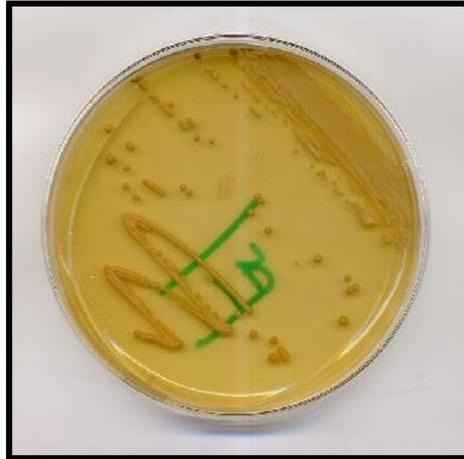


Figure 13: Colonies de levures obtenues après 24h d'incubation [11]

- Après incubation, faire le dénombrement des colonies
- Les résultats s'exprimeront en nombre d'UFC.ml⁻¹

3.2. Mesure de la catalase :

La catalase catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en dioxygène (O₂) et eau (H₂O) selon l'équation bilan :



Cette enzyme existe chez tous les organismes aérobies chez lesquels elle participe, comme la peroxydase, à la défense contre les dérivés toxiques de l'oxygène.

❖ Protocole :

On débute d'abord par l'extraction du cytosol à partir des colonies de levures, puis on prépare une solution tampon phosphate pH=7.4 et enfin on mesure l'absorbance au spectrophotomètre à 240nm.

✓ Extraction du cytosol :

- A partir des colonies obtenues, préparer des suspensions levuriennes avec 4CC de Sabouraud liquide et 1CC de chaque concentration de pesticide
- Incuber ces suspensions à 28°C pendant 24h
- Après incubation, mettre 1CC de chaque concentration de suspension dans des tubes Eppendorf bien étiquetés
- Placer ces tubes dans des morceaux de glace et éclater les cellules à l'aide de l'homogénéisateur ultra-son

- Mettre ensuite ces tubes à centrifuger à 5000 rpm pendant 15mn à -10°C



**Figure14:Homogénéiseur ultra-son
VIBRA CELL 75186**



Figure15.Centrifugeuse réfrigérée SIGMA 2-16 K

➤ **Préparation du tampon phosphate à pH=7.4 :**

- Préparer une solution (A) de Phosphate disodique en raison de 0.946g pour 100mL d'eau distillée et une autre solution (B) de Phosphate monopotassique en raison de 0.906g pour 100mL d'eau distillée
- Mélanger ensuite 80mL de solution A avec 20mL de solution B

Nous avons alors notre tampon Phosphate à pH=7.4

✓ **Lecture au spectrophotomètre :**

- Mettre dans la cuve en quartz 750mL de tampon Phosphate ; 200mL d'eau oxygénée et 50mL du cytosol de chaque concentration
- Placer la cuve dans le spectrophotomètre et lire l'absorbance à 240nm

$$\text{Activité catalase } (\mu\text{moles/mn/mg protéines}) = \frac{\Delta \text{ DO/mn}}{0.040 \times \text{mg protéines dans la cuve}}$$

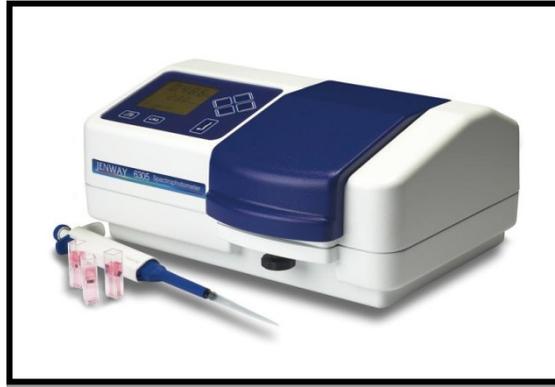


Figure 16 : Spectrophotomètre visible et UV/visible JENWAY 6305

3.3. Dosage des protéines :

Ce dosage permet de normaliser les résultats obtenus à l'issue des dosages enzymatiques en fonction d'une quantité totale de protéines présente dans les échantillons.

3.3.1. Principe du dosage :

La technique retenue dans le cadre de ce travail est celle décrite par Bradford (1976). IL s'agit d'une méthode de mesure de concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant : le bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines (la forme anionique est en effet stabilisée par des interactions hydrophobiques et ioniques, ce colorant réagissant avec des restes de l'arginine et en moindre importance avec de l'histidine, la lysine, la tyrosine, la trypsine et la phénylalanine). Par conséquent, il possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique très sensible.

3.3.2. Protocole :

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de protéine standard : la BSA (albumine de sérum bovin). Cette gamme comprend 5 points : 0, 50, 100, 200 et 400 mg/L. Elle est préparée dans un tampon phosphate à 100 mM pH 7,8 (désigné par convention dans ce document par le sigle TP(P)) dont la préparation est réalisée à partir de deux solutions : une solution A de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 26,8 g/L et une solution B de KH_2PO_4 à 13,6 g/L (l'ajustement de la solution A à pH 7,8 se faisant à l'aide de la solution B).

Suivant la concentration protéique des échantillons, des dilutions préalables peuvent s'avérer nécessaires afin que les valeurs d'absorbance des échantillons soient comprises dans

l'intervalle des valeurs d'absorbance de la gamme étalon. Ainsi, pour les fractions S9 du cytosol, trois dilutions sont réalisées par défaut sur les échantillons : 1/10, 1/20 et 1/40.

)Bradford M.M., 1976(.

Tous les tests ont été répétés trois fois.

4. Etude statistique :

Pour les études statistiques, nous les avons effectuées en grande partie avec l'Excel 2007 mais la partie de toxicité aiguë est traitée à l'aide d'un logiciel dénommé : BioStat 2008 par la méthode de Finney (distribution log normal). C'est grâce à ce logiciel que nous sommes parvenus à déterminer la létalité de 50% de la population(CL_{50}) soumise au test. En plus nous avons utilisés le logiciel Minitab 15 pour l'analyse de la variance (ANOVA).

Chapitre IV

Résultats et discussions

discussion

1. Biomasse :

1.1. Dénombrement sur milieu solide :

Analyse par la méthode de probits							
Dose (Stimulus)	Pourcentage réel (%)	Probit (Y)	Poids (Z)	X*Z	X*X*Z	Y*Z	X*Y*Z
0	0,0007	1,8109	1	0	0	1,8109	0
0,25	0,4286	4,8203	4,8203	1,2051	0,3013	23,2357	5,8089
0,5	0,5714	5,1797	4,8203	2,4102	1,2051	24,9677	12,4839
1	0,7143	5,5656	4,3689	4,3689	4,3689	24,3152	24,3152
1,5	0,8	5,8415	3,8171	5,7256	8,5884	22,2973	33,446
2	0,8571	6,0676	3,2972	6,5944	13,1889	20,0062	40,0124
2,5	0,9714	6,9026	1	2,5	6,25	6,9026	17,2566
Somme			23,1238	22,8042	33,9025	123,5357	133,3229
LD (concentration létale)50	0,6463	LD (concentration létale)16	-0,3467	Beta	1,0071		
Erreur standard LD (concentration létale)50	0,0336	LD (concentration létale)84	1,6392	Alfa	4,3491		
LD50 LCL (plus faible concentration létale)	0,5804	LD (concentration létale)100	2,1356	Erreur standard Beta	0,296		
LD50 UCL (plus forte concentration létale)	0,7121	Niveau de significativité	0,05				
LD (concentration létale)10	-0,6264						

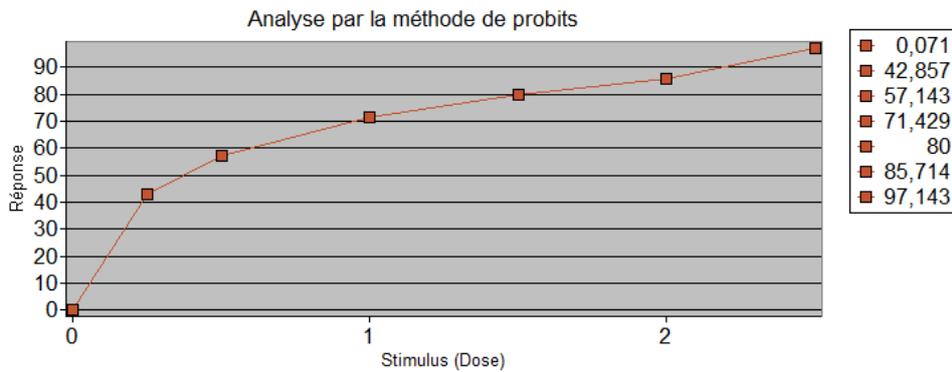


Figure 17. La concentration inhibitrice de 50%.

Cette figure 17 nous montre la sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* à la Thiaméthoxame en fonction des différentes concentrations ($C_1=0,25 \mu\text{g/ml}$, $C_2=0,5\mu\text{g/ml}$, $C_3=1,5\mu\text{g/ml}$, $C_4=2\mu\text{g/ml}$, $C_5=2,5\mu\text{g/ml}$).

En effet la sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* à la Thiaméthoxame s’est révélée dès les plus faibles concentrations ($<0,25 \mu\text{g/ml}$). On constate que plus la concentration de la Thiaméthoxame augmente, plus le taux de mortalité (*Saccharomyces cerevisiae*) augmente.

L’étude statistique exhibe que la différence entre la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) témoin et traité sont hautement significative ($p<0,001$).

La figure illustre la dose d'inhibition qu'est de l'ordre de $0,65)6,46\mu\text{g/ml}$.

1.2. Dénombrement sur milieu liquide :

Cette figure 18 met en évidence la variation du nombre en fonction des concentrations de Thiméthoxame sur milieu liquide :

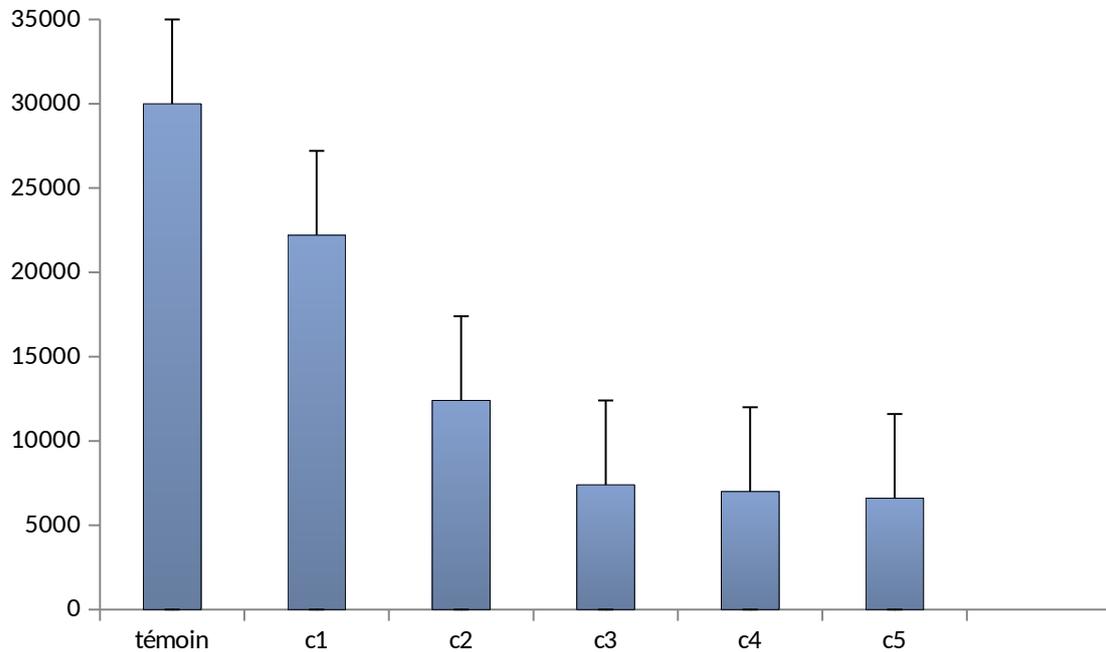


Figure 18 : Variation du nombre des cellules vivantes en fonction des différentes concentrations de Thiaméthoxame.

Tandis que la concentration de la Thiaméthoxame augmente, le nombre de cellule vivante (biomasse) diminue progressivement.

L'étude statistique montre que les différences entre les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) témoins et traitées sont hautement significatives ($p < 0,001$).

1.3. Dosage des protéines :

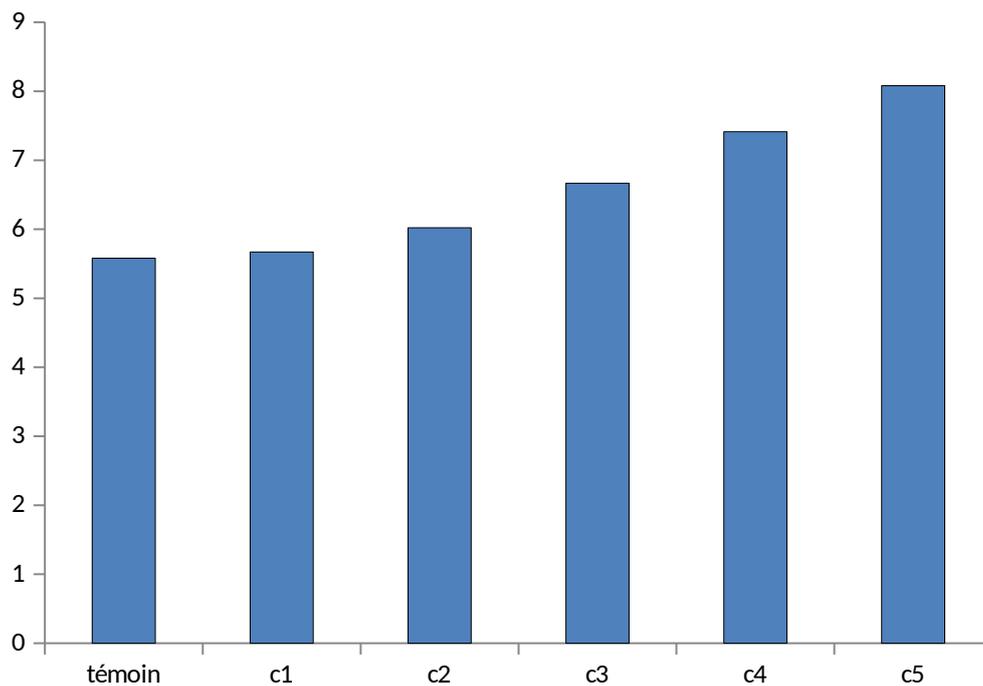


Figure19. L'évaluation du taux de protéine en fonction des différentes concentrations du Thiaméthoxame.

Les résultats auxquels nous sommes parvenus, **figure19**, montrent que l'augmentation de la concentration du Thiaméthoxame implique une augmentation au niveau du taux des protéines.

Le taux de protéine passe de 5,75 µg/mg à 8,10 µg/mg, il enregistre une augmentation chez les cellules traitées et ce par rapport aux témoins, en fait il est de l'ordre de 5,50 µg/mg.

L'étude statistique montre que les différences entre les levures témoins et traitées sont hautement significatives $p=0,000$ ainsi que la corrélation enregistrée entre l'activité catalase et les différents traitements avec le Thiaméthoxame est $r=0,99$, $p<0,001$ (.

1.4. Activité enzymatique)catalase:(

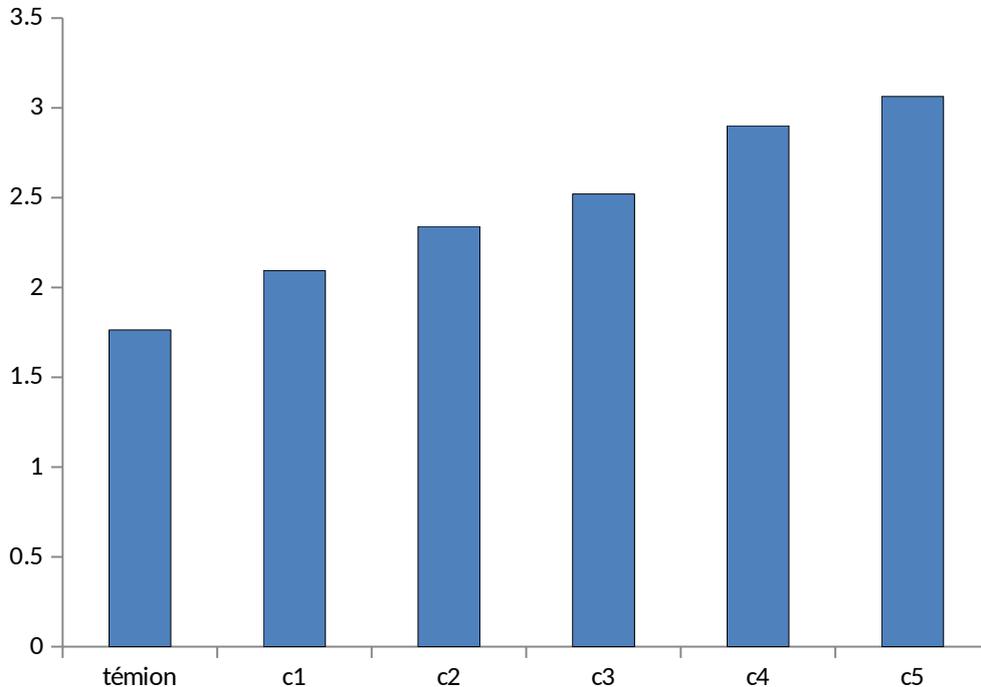


Figure20. La variation de l'activité catalase en fonction des différentes

concentrations de Thiaméthoxame.

Concernant le dosage enzymatique, les résultats sont illustres sur la **figure20**.

On constate une augmentation de l'activité catalase chez les cellules traite avec différentes concentrations du pesticides)Thiaméthoxame (:25 mg /L ; 50mg/L ; 150mg/L ; 200mg/L et 250mg/L, il passe de 2,15 µmol /mn /mg à3,1 µmol /mn /mg.l'activité catalase enregistre une augmentation chez les cellules traitées et ce par rapport aux témoins, en faite il est de l'ordre de 1,75 µmol /mn /mg.

L'étude statistique montre que les différences entre les levures témoins et traitées sont hautement significatives $p=0,000$ ainsi que la corrélation enregistrée entre l'activité catalase et les différents traitements avec le Thiaméthoxame est $r=0,95$, $p< 0,001$ (.

2. Discussion :

Dans ce chapitre, nous allons discuter les principaux résultats obtenus dans ce travail.

L'ensemble des résultats obtenues nous amène à évaluer l'impact du Thiaméthoxame sur *saccharomyces cerevisiae* a travers certain biomarqueurs) biomasse, dosage des protéines, activité enzymatique(.

L'influence des pesticides sur les levures a d'ailleurs été rapportée par plusieurs auteurs. Mais généralement son effet s'observe au niveau de la phase de latence, de la phase exponentielle et sur le rendement cellulaire en phase stationnaire. En effet, et comme l'a signalé Walker (1998), la durée de la phase de latence dépend de la présence de substances toxiques. Mais la souche s'adapte à ces nouvelles conditions et passe une phase exponentielle qui n'est pas toujours normale. D'autre part, après s'être exposée aux pesticides, les levures atteignent la phase stationnaire avec une concentration en biomasse relativement inférieure à celle du témoin. En effet, cette diminution de la concentration en biomasse peut être expliquée par le fait que la présence de résidus dans le milieu cause une diminution de l'activité des enzymes intervenant dans la production de biomasse (Sarshvili et Panasyuk, 1995). De même, une inhibition de la biosynthèse de stérol peut également être provoquée par la présence de ces résidus: les stérols étant des constituants importants de la membrane cytoplasmique qui contrôle les échanges entre les cellules et le milieu.

1. Les résultats obtenus sur la **figure 18** confirment ceux obtenus sur la **figure 17**(dénombrement sur milieu solide).

En effet la réponse de *Saccharomyces cerevisiae* dès les plus faibles concentrations de notre insecticide (Thiaméthoxame), nous montre à quel point notre substance chimique est toxique. Nous sommes parvenus à déterminer la concentration inhibitrice 50% (**figure 17**) provoquant l'inhibition de la moitié de la biomasse à l'aide d'un logiciel statistique (BioStat 2008) par la méthode de Finney. Cette valeur est comprise entre les concentrations (C_2) et (C_3) qui correspond à 0,65 $\mu\text{g/ml}$ avec les erreurs standards et un intervalle de confiance de 95 %. Cette partie confirme les travaux de Boutalbi et Bougueffa (2008) concernant la réponse des daphnies à une substance xénobiotique et ceux de Gisèle (2001) concernant l'Influence des pesticides sur les levures de fermentation vinicole et cidricole.

2. Concernant la **figure 19**, le dosage des protéines est effectué pour mettre en évidence une réponse des cellules en présence de la Thiaméthoxame. La cellule *Saccharomyces cerevisiae* étant confronté à une substance toxique, verra donc son taux de protéine augmenté en fonction de la concentration du Thiaméthoxame.

Le dosage des protéines a également prouvé qu'en état de stress, la cellule synthétise des protéines qui réagissent au peroxyde d'Hydrogène en activant la transcription de la catalase, la thiorédoxine et la peroxyredoxine. (Jérôme, 2009). Ce résultat est en parfait accord avec ceux rapportés par (Vido et al., 2001) où en effet le traitement avec le pesticide (Thiaméthoxame) provoque une augmentation des protéines totales chez *S. cerevisiae*.

3. L'augmentation de l'activité catalase (**figure 20**) chez *saccharomyces cerevisiae* nous montre quant à elle les mécanismes de défenses que la cellule met en place pour résister à son environnement toxique. En effet la catalase existe chez tous les organismes aérobies chez lesquels elle participe, comme la peroxydase, à la défense contre les dérivés toxiques de l'oxygène.

Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène (lorsqu'il est présent en quantité importante dans la cellule) en eau et oxygène.

CONCLUSION

Préparation du tampon phosphate à ph=7.4

- préparer une solution (a) de phosphate disodique en raison de 0.946g pour 100ml d'eau distillée et une autre solution (b) de phosphate monopotassique en raison de 0.906g pour 100ml d'eau distillée
- mélanger ensuite 80ml de solution a avec 20ml de solution b (Didier pol, 1996)

Préparation de la gélose de Sabouraud

- mettre en suspension dans 1 litre d'eau distillée 10g de polypeptone ,36.4g de glucose anhydre et 15g d'agar agar
- porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- répartir en tubes ou en flacons.
- stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Préparation de la solution de Bradford :

- Bleu de comassie g250
- Ethanol à 95%
- Acide phosphorique (H_3PO_4) à 85%
- H_2O
- A conserver à +4°C à l'abrit de la lumière.

Composition de la gélose Sabouraud :

- peptone..... 10 g
- glucose massé..... 20 g
- agar-agar..... 15 g
- eau distillée (qsp)..... 1 000 ml
- vitamines et facteurs de croissance
- ph = 6,0[9]

Précautions :

➤ Précautions relatives à la sécurité :

1. Dangereux pour les humains et les animaux domestiques.
2. Garder hors de la portée des enfants et des animaux domestiques. Empêcher les personnes non autorisées d'y avoir accès.
3. Provoque une irritation modérée des yeux, inhalé ou absorbé par la peau. Eviter tout contact avec les yeux. Eviter le contact avec la peau. Eviter d'inhaler les vapeurs et le brouillard de pulvérisation. Se laver les mains et la figure après avoir manipulé le produit et avant de manger ou de fumer.
4. Porter une chemise à manches longues, un pantalon long, des gants résistant aux produits chimiques, des chaussettes et des bottes pendant le mélange et le chargement du produit et lors de l'application à l'aide d'un pulvérisateur a dos; porter une chemise à manches longues, un pantalon long, des chaussettes et des bottes pendant toutes autres méthodes d'application. Retirer immédiatement les vêtements si le produit chimique pénètre à l'intérieur. Se laver à fond et mettre des vêtements propres.
5. Se laver les mains avant de manger, de boire, de prendre une gomme à mâcher, de fumer ou d'aller aux toilettes.
6. Ne pas contaminer les aliments destinés à la consommation humaine ou animale.
7. Ne pas pénétrer ni permettre à un travailleur de pénétrer dans les zones traitées pendant les douze heures qui suivent le traitement.

➤ Précautions environnementales

Ne pas appliquer ce produit directement sur les habitats d'eau douce (tels que les lacs, les cours d'eau, les marécages, les étangs, les fondrières des prairies, les marais, les réservoirs, les fossés et les terres humides) ainsi que les habitats estuariens et marins. Ne pas contaminer les sources d'approvisionnement en eau d'irrigation ou en eau potable ni les habitats aquatiques au moment du nettoyage de l'équipement ou de l'élimination des déchets. Ce produit est toxique pour les abeilles exposées directement au traitement ou aux résidus sur les cultures et les mauvaises herbes en floraison.

Ne pas appliquer ce produit sur des cultures ou des mauvaises herbes en floraison si des abeilles sont présentes dans la zone à traiter. Limiter la dérive du brouillard de pulvérisation dans les habitats situés à proximité du site traité afin de réduire les effets nocifs sur les abeilles. ce produit est toxique pour certains insectes utiles. Limiter la dérive du brouillard de

pulvérisation dans les habitats situés à proximité du site traité, tel que les haies et les terrains boisés, afin de réduire les effets nocifs sur les insectes utiles. L'utilisation de ce produit peut entraîner la contamination des eaux souterraines, en particulier lorsque les sols sont perméables (sols sableux, etc.) et/ou lorsque la nappe phréatique est peu profonde.) Syngenta, 2008(

Modèle linéaire général : catalase en fonction de dose

Facteur Type Niveaux Valeurs

dose fixe 6 D0; D50; D100; D150; D200; D25

Analyse de la variance pour catalase, avec utilisation de la somme des carrés ajustée pour les tests

SomCar

Source	DL	SomCar	seq	ajust	CM	ajust	F	P
Dose	5	3,58300	3,58300	0,71660	52,12	0,000***		
Erreur	12	0,16500	0,16500	0,01375				
Total	17	3,74800						

S = 0,117260 R carré = 95,60 % R carré (ajust) = 93,76 %

Observations aberrantes pour catalase

Valeurs

	Valeur	Valeur résiduelles		
Observation	ctalase ajustée	ErT ajust	résiduelle	normalisées
7	2,09000	2,34000	0,06770	-0,25000 -2,61 R
9	2,58000	2,34000	0,06770	0,24000 2,51 R

R indique une observation ayant des valeurs résiduelles normalisées importantes
Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95,0%

Dose	N	Moyenne	Groupement
D200	3	3,1	A
D150	3	2,9	A
D100	3	2,5	B
D50	3	2,3	B C
D25	3	2,1	C
D0	3	1,8	D

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

Fichier dosage des proteine.xlsx

Modèle linéaire général : protéine en fonction de DOSES

Facteur Type Niveaux Valeurs

DOSES fixe 6 D0; D50; D100; D150; D200; D25

Analyse de la variance pour protéine, avec utilisation de la somme des carrés ajustée pour les tests

SomCar

Source	DL	SomCar	seq	ajust	CM	ajust	F	P
DOSES	5	15,2797	15,2797	3,0559	481,67	0,000***		
Erreur	12	0,0761	0,0761	0,0063				
Total	17	15,3558						

S = 0,0796520 R carré = 99,50 % R carré (ajust) = 99,30 %

Observations aberrantes pour protéine

Valeurs

	Valeur	Valeur	Valeurs	
Observation	proteine	ajustée	ErT ajust	résiduelle normalisées
11	6,80000	6,66667	0,04599	0,13333 2,05 R
12	6,50000	6,66667	0,04599	-0,16667 -2,56 R

R indique une observation ayant des valeurs résiduelles normalisées importantes
Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95,0%

DOSES N Moyenne Groupement

D200 3 8,1 A

D150 3 7,4 B

D100 3 6,7 C

D50 3 6,0 D

D25 3 5,7 E

D0 3 5,6 E

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

Les nuisances liées à l'utilisation des pesticides sont un sujet de préoccupation récente des écologistes. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une réflexion commune sur la toxicité et l'impact lié au pesticide.

Une étude bibliographique sur les pesticides nous a permis de synthétiser les informations sur les caractéristiques physico-chimiques et écotoxicologiques des rejets provenant de diverses activités humaines.

Les informations rapportées dans la littérature sur le devenir des pesticides dans l'environnement nous a conduit à formuler l'hypothèse de risque pour la santé humaine et les différents écosystèmes.

Cette étude a permis de montrer qu'il est possible d'évaluer sommairement des risques toxicologiques liés à l'utilisation des pesticides à l'aide de bioessai sur le modèle biologique « *Saccharomyces cerevisiae* ».

Cependant beaucoup d'interrogations subsistent quant à la contamination des milieux naturels, par les pesticides dont les conséquences pourraient être plus tragiques.

Les tests réalisés sur *Saccharomyces cerevisiae* ont porté fruits, car nous sommes parvenus aux résultats escomptés, à savoir : l'évaluation de l'effet in vitro du pesticide sur sa biomasse, activité enzymatique et le taux de protéine .

Ce travail nous a permis non seulement d'évaluer l'état de nos connaissances mais aussi de comprendre l'approche biologique.

De ce constat, il nous semble indispensable d'adopter des mesures concernant l'utilisation des pesticides dans l'environnement qui contribuent à assurer une sécurité optimale. Le risque encouru en cas d'accident et les conséquences qu'il en résulterait nous amène à dire qu'il vaut mieux s'orienter vers une politique de « qualité de l'environnement » pour être sûr que chacun se sente suffisamment responsable afin d'assurer une protection fiable de notre environnement.

L'objectif de cette étude qui visait à identifier la toxicité des pesticides, plus particulièrement le Thiaméthoxame, à l'aide d'un système expérimental levurien (*Saccharomyces cerevisiae*) et de confirmer ces résultats par un test du modèle cellulaire vis-à-vis de la substance toxique a été atteint.

La protection des ouvriers entrant en contact avec une culture après un traitement phytosanitaire passe par le respect des délais de réentrée établis sur la base de données de persistance et de toxicologie des produits et de la méthode d'application. Le port de gants et de vêtements longs s'avère d'autant plus indispensable que l'opérateur manipule des plants traités pendant une longue période.

Approfondir la surveillance de la qualité de l'environnement.

La sensibilisation des producteurs et des consommateurs des pesticides est un atout majeur.

Le suivi de l'évolution des pesticides dans l'environnement ne doit pas être négligé.

La révision de l'homologation de l'utilisation de certains pesticides a grande échelle et surtout dans les endroits publics doit contribuer à la protection des gens les plus vulnérables (Femmes enceintes ou enfant).

L'approfondissement des connaissances dans le domaine de la science contribuera au développement des biopesticides et à la suppression des pesticides synthétiques.

Le but ultime est de pouvoir valider le système 'levurien' comme méthode alternative dans les tests de génotoxicité notamment.

Enfin cette étude nécessite d'être approfondie afin de faire une bonne biosurveillance de la santé de tous les écosystèmes, y compris celle de l'homme, et le maintien de la biodiversité dont l'importance n'est aujourd'hui méconnue de personne dans l'équilibre écologique.

Bibliographie

Abhauer J., 1990. Pesticide residues-Determination and evaluation in food and environment, in Pesticide chemistry, VCH, New York, 361-372.

Ahlers J., Cascorbi I., Forêt M., Gies A., Köhler M., Pauli W., Rösick E., 1991. Interaction with functional membrane proteins – A common mechanism of toxicity for lipophilic environmental chemicals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 1-2, 111-113

Aksu, 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40, 997-1026

Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248- 254.

Calvet R., 2005. les pesticides dans le sol.55p.

Dalal J., 2006. Etude de la toxicité de pesticide vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire. Thèse de doctorat. L'institut National Polytechnique de Toulouse, 12, 22, 110 p.

Didier, P., 1996 .Travaux pratique de biologie des levures, édition : Ellipses, Paris.

Galzy P., 1993. Le génie génétique, in *Biotechnologie*, 4^{ème} édition, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 451-538

Gencido, 1995. Redirection of the respire-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpressing of the transcriptional factor Hap4p. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5): 1970-1973.

Gisèle,2001.influence des pesticides sur les levures de fermentation vinicole et cidricole.mémoire de diplôme d'études approfondies.université libanaise, 59,78 p.

Goin C. J., and Mayer V. W., 1995. Induction of chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* strain D61.M by selected benzimidazole compounds. *Mutation Research*, 343, 185-199

Guay, P., 1999. Valorisation de résidus organiques par production de protéines d'origine unicellulaire. Thèse de maîtrise. L'Université Laval ,66p.

Ifen, 1998. études et travaux n 19.les pesticides dans les eaux : collecte et traitement des données.

Inra-cemagref,,2005.Expertise scientifique collective, pesticides agriculture et environnement réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux.

Isabelle tron,,2001.Effets chroniques des pesticides sur la sante : état actuel des connaissances.

Jérome, 2009. Effect of catalase specific inhibitor 3-amino-1, 2,4-triazole on yeast peroxisomal catalase in vivo. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 93-98.

Lagadic., Pearce T. G., Hewer A., 1997. A biomarker model of sublethal genotoxicity (DNA single-strand breaks and adducts) using the sentinel organism *Aporrectodea longa* in spiked soil. *Environmental Pollution*, 138, 307-315

Leveau-M.Bouix, 1993.Microbiologie industrielle, édition : Lavoisier, Paris.

Kreger-van Rij N.J.W., 1984. The yeasts, a taxonomic study, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam

Marlène, C., 2006. Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'ethanol .Thèse de doctorat. L'institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 265 p.

Mehmet a.Oturan et Jean-marie Mouchel 2007.pesticide impacts environnementaux, gestion et traitement.

Mn Simon, 2011. Determination of Oxygen Utilization Pathways in an Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae* during Enological Fermentation. Journal of fermentation and bioengineering, 86, 2, 154-163.

Mouret, J., 2006. Modulation de la transition respiro-fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae* par l'oléate : analyse cinétique et métabolique en culture continue sur substrats mixtes. Thèse de doctorat. L'institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 175 p.

Nielsen et villadsen, 2003. Relations métaboliques entre levures impliquées dans la fermentation du cidre. Belgian journal of food chemistry and biotechnology, 45, 3, 98-104.

Sarshvili et Panasyuk, 1995. «Induction of Reverse Mutation and Mitotic Gène Conversion by Some Métal Compounds in *Saccharomyces cerevisiae*», *Mutât. Res.*, 117: 149-152.

Sohn H.y., Kwon C.S., Kwon GS., Lee J.B., Kim E., 2004.induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidant against endosulfant-induced oxidative damage.toxicology letters,152,357-365.

Syngenta., 2004. Fiche de Données de Sécurité –Actara 25 WG.

Syngenta., 2006. Fiche de Données de Sécurité –Actara 25 WG.

Syngenta., 2008. Fiche de Données de Sécurité –Actara 25 WG.

Syngenta., 2009. Fiche de Données de Sécurité –Actara 25 WG.

Thuriaux, P., 2004. Les organismes modèles la levure, édition : Belin, Paris.

Timbrell, Schlenk, D., 1997. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. Mar. Pollut. Bull. 39, 48-53.

Vido; Gallego S.M. ; Benacides M. and Tomaro M., 2001. Involvement of antioxidant défense System in thé adaptive response toleary métal ions in *Helicuthus annus* L. Cells. Plant Growth Regul, (36), 267-273.

Walker, 1998. Effect of pesticide mixtures on in vitro *Saccharomyces* cells:Comparison with single pesticides. Toxicology, 108, 201-206.

Wang X., Yin C., Wang L., 2002. Structure–activity relationships and response–surface analysis of nitroaromatics toxicity to the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Chemosphere, 46, 1045-1051.

Internet: Sites web :

[1]: biologie. [En ligne]. [Consulté le 15 janvier 2011].Disponible sur :

)http://www.biologie.univ-mrs.fr/upload/p235/UElevurepart1.pdf_.PDF(.

[2]: Clermont. [En ligne]. [Consulté le 17 janvier 2011].Disponible sur :

)<http://www.univbpclermont.fr/FORMATIONS/Licence/chimie/UE/36BIOF22/II%20,%20la%20levure%20Saccharomyces%20cerevisiae.pdf>(.

[3] : biologie. [En ligne]. [Consulté le 10 février 2011].Disponible sur :

(<http://www.dissertationsgratuites.com/dissertations/Les-Pesticide/30406.html>(.

[4] : danger. [En ligne]. [Consulté le 11 mars 2011].Disponible sur :

(<http://www.danger-sante.org/effets-des-pesticides/>).

[5] : jardineranaturel. [En ligne]. [Consulté le 03 mai 2011].Disponible sur :

(<http://www.jardineranaturel.org/fr/pesticides-danger/fiche.php?id=75>).

[6]: Users. [En ligne]. [Consulté le 10 mai 2011].Disponible sur :

)http://www.Users\newtec\Desktop\les_pesticides\Pesticide.html(

[7] : wikipedia. [En ligne]. [Consulté le 20 mai 2011].Disponible sur :

)http://fr.wikipedia.org/wiki/pesticides_santé(.

[8] : Users. [En ligne]. [Consulté le 25 mai 2011]. Disponible sur :

)<http://www.Users\newtec\Desktop\actara\Thiaméthoxame - Wikipédia.html>(.

[9] : surcov. [En ligne]. [Consulté le 30 mai 2011]. Disponible sur :

www.sucov.fr.