

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mohammed Seddik Benyahia



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de l'Environnement et  
des Sciences Agronomiques

كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم علوم المحيط و العلوم الفلاحية

Mémoire

Présenté par :

Ahlem BOUZIANE

Pour l'obtention du diplôme de

Magister

Filière : Biologie

Option : Biodiversité et pathologie des écosystèmes

Thème

**EFFET TOXIQUES DES PESTICIDES SUR LA CROISSANCE ET LA  
DIVERSITE DE LA FLORE MICROALGALE : CAS DE DIATOMÉES**

Soutenu publiquement le : 30 / 01 / 2016

devant le jury composé de :

Président : M<sup>er</sup> LEGHOUCHE

Pr. Université Mohammed Seddik Benyahia - Jijel

Rapporteur : M<sup>er</sup> MAYACHE B

Pr. Université Mohammed Seddik Benyahia - Jijel

Examineurs : M<sup>er</sup> SIFOUR M

MCA. Université Mohammed Seddik Benyahia - Jijel

M<sup>er</sup> HOUHAMDI M

Pr. Université 08 Mai 1945 - Guelma.

Invité : .....

.....

Année universitaire 2014 / 2015

Numéro d'ordre : .....

## *Remerciements*

*Tout d'abord, je tiens à remercier dieu tout puissant qui m'a donné l'occasion de continuer mes études, il m'a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de m'avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Mr Bouledjadri Mohamed, maître de conférences à l'Université de Jijel, pour m'avoir proposé ce sujet, pour ses conseils scientifiques judicieux et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles.*

*Mes reconnaissants remerciements à Mr Mayaché Boualem, professeur à l'Université de Jijel, pour son aide et collaboration, sa compréhension, et l'intérêt porté pour mon sujet.*

*Je suis particulièrement reconnaissante à Mr Leghouchi Essaid, professeur à l'Université de Jijel, d'avoir accepté de juger mon travail en tant que président ainsi que, Mr Difour Mohamed, maître de conférences à l'Université de Jijel, et Mr Houhamdi Moussa, professeur à l'Université de Guelma, de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire.*

*Ma plus sincère gratitude à L'Office National d'Assainissement, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et m'avoir donné les moyens de mener à bout cette étude.*

*Mes très spéciaux remerciements reviennent à ma famille et mes amies pour leurs encouragements et leur compréhension.*

*Finalement, je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.*

*À vous tous, un grand Merci*

## التأثيرات السامة للمبيدات على نمو الطحالب حالة الدياتومات القاعية

### ملخص:

- الهدف من هذا العمل هو تحليل تأثير بعض المبيدات على نمو الدياتومات القاعية الآتية من وسطين مختلفين احدهما وسط راكد (بحيرة) والثاني وسط جاري .

- تم القيام باختبارات السمية لتقييم حساسية الدياتومات القاعية اتجاه مبيد أعشاب (الغليفوسات) و مبيد حشرات (الكلوربيريفوس ايتيل) كل واحد على حدا و هما مندمجين و بتراكيز مختلفة ، تم إجراء التجارب في المختبر و قد قادتنا هذه الدراسة بشكل عام الى النتائج التالية :

1 – إضافة الملوثات للدياتومات القاعية في المختبر يبين بصفة عامة ، و مهما يكن الملوث الغليفوسات أو الكلوربيريفوس ايتيل بالتخفيفات (100/1، 1000/1) مندمجين او كل واحد على حدا، يلاحظ زيادة في تركيز الخلوي للدياتومات.

2 – عند تعرض الدياتومات القاعية إلى تراكيز كبيرة من الغليفوسات 360 غ/ل (بدون تخفيف) وبتخفيف 10/1 ، يلاحظ انخفاض في تركيز الخلوي من اليوم الأول و يتزايد مع مدة الاختبار.

**الكلمات المفتاحية :** بيوفيلم ، الدياتومات القاعية ، المبيدات ، نضام بيئي مصغر، التجربة الحيوية ، النمو.

*Toxic effects of pesticides on the growth of benthic algae;*

*diatoms Case.*

**Abstract**

The objective of this work is to analyze the effects of some pesticides on the growth of benthic diatoms originating from two backgrounds, the first is a lotic ecosystem and the second is lentic ecosystem.

The toxicity tests were used to assess the sensitivity towards a diatomaceous herbicide (glyphosate) and an insecticide (chlorpyrifos-ethyl) tested alone and in combination at various concentrations, the experiments were performed in the laboratory in microcosms. This study has led us generally way the following results:

- addition of contaminants diatomaceous microcosms shows generally whatever the contaminant used: chlorpyrifos-ethyl or glyphosate added alone or in combination, an increase of diatoms cellular concentration. Also this increase was recorded in the presence of chlorpyrifos ethyl dilution (1 / 100, 1 / 1000), glyphosate (1/100, 1 / 1000) or chlorpyrifos-ethyl + glyphosate mixture dilution (1/100, 1/1000).

-The exposition to high concentrations of glyphosate (360g/L),  $C_1$  and  $C_{1/10}$ , causes a decrease of cellular concentration of benthic diatoms which is visible from the first day of exposition, accentuated with the duration of exposure.

**Key words:** Biofilm, Benthic diatom, Pesticides, Bioassay, Microcosm, Growth.

## *Effets toxiques des pesticides sur la croissance des algues*

### *benthiques : cas des diatomées.*

#### **Résumé**

L'objectif de ce travail vise à analyser les effets de quelques pesticides sur la croissance des diatomées benthiques provenant de deux milieux différents, l'un est un écosystème lotique et l'autre lentique.

Les tests de toxicité ont permis d'évaluer la sensibilité des diatomées benthiques vis-à-vis d'un herbicide (glyphosate) et un insecticide (chlorpyrifos-éthyl) testés seuls et en mélange à différentes concentrations, les expérimentations ont été réalisées au laboratoire en microcosmes. Cette étude nous a conduits d'une manière générale aux résultats suivants :

-L'addition de contaminants aux diatomées benthiques en microcosmes montre d'une manière générale quel que soit le contaminant utilisé : chlorpyrifos-éthyl ou le glyphosate ajoutés isolément ou en mélange, un accroissement de la concentration cellulaire des diatomées benthiques est également observé en présence de chlorpyrifos-éthyl, du glyphosate, ou du mélange chlorpyrifos-éthyl + glyphosate en dilution (1/100, 1/1000).

-Lors de l'exposition à des fortes concentrations en glyphosate (360g/L),  $C_1$  et  $C_{1/10}$ , une diminution de la concentration cellulaire des diatomées benthiques est visible dès le 1<sup>er</sup> jour, s'accroît avec la durée du test.

**Mots clés :** Biofilm, Diatomée benthique, Pesticides, Bioessai, Microcosme, Croissance.

# *Sommaire*

---

## Sommaire

---

Résumés	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction .....	01

### Partie I : Synthèse Bibliographique

#### Chapitre I : Les pesticides dans l'environnement

I. Définition .....	03
II. Classification .....	03
II.1) Classification chimique .....	03
II.1.1) Les pesticides organiques .....	03
II.1.2) Les pesticides organo-metallique .....	05
II.1.3) Les pesticides Inorganiques .....	05
II.2) Classification biologique .....	06
III. Cadre réglementaire .....	07
IV. La Pollution des eaux de surface par les pesticides .....	08
IV.1) Transfer vers les milieux aquatiques .....	08
IV.2) Ecotoxicité des pesticides sur le compartiment microalgal.....	09
V. Les pesticides testés dans ce travail.....	09

#### Chapitre II : Les diatomées

I. Description d'un biofilm périphytique .....	14
I.1.Etapes de colonisation d'un biofilm périphytique .....	15
II. Présentation générale des diatomées.....	16
II.1.Structure cellulaire .....	16
II.2.Cycle de développement .....	17
II.3.Classification .....	18
II.4.Répartition et modes de vie .....	19
III. Intérêt en tant que bioindicateurs .....	20

## Partie II : Partie expérimentale

### Chapitre III : Matériel et Méthodes

I-Sites d'étude .....	21
I-1 Oued Mencha .....	21
I-2.Le marais Redjla .....	22
I-3Choix des stations d'échantillonnage .....	22
I-4.Choix de l'espèce de diatomées .....	22
II-Protocoles expérimentaux .....	23
II-1 Le terrain .....	23
II-1-1Méthode d'échantillonnage des communautés de diatomées .....	23
II-2- Le laboratoire .....	24
II-2-1- Principe et déroulement du bioessai sur la croissance des diatomées benthique .....	24
II-2-1-1- Préparation des dilutions .....	25
II-2-1-2-La réalisation de microcosmes indoor .....	25
II-2-1-3- Estimation de la densité de diatomées .....	26
II-2-1-4-Estimation de la biomasse végétale planctonique des deux sites d'étude .....	27
II-2-1-4-1- Dosage de la chlorophylle <i>a</i> et de l'indice phéopigments par spectrométrie d'absorption moléculaire .....	27
III. Traitement statistique des résultats .....	27

### Chapitre IV : Résultats et Discussion

I/Résultats .....	28
I-1.Observation microscopique .....	28
I-2.Effet des pesticides sur la croissance de diatomées benthique du oued mancha et du marais Radjla.....	29
I-2.1.Site Oued Mencha .....	29
I-2.2.Site marai Redjla .....	36
I-3.Effet du glyphosate sur la croissance des diatomées benthiques et la teneur des nutriments (Nirate/Phosphate) .....	42
I-4 Estimation de la biomasse végétale planctonique .....	45
II. Discussion .....	47
II.1. Effet du glyphosate 360g/L .....	47
II.2.Effet du Chlorpyriphos-éthyl 480g/L .....	47



<b>II.3. Effet du mélange Chlorpyriphos-éthyl 480g/L(pyricol)+Glyphosate 360g/L(herbasate).</b>	<b>48</b>
<b>II.4. Effet du glyphosate sur la croissance des diatomées et la teneur des nutriments en milieu lenticule .....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>52</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## *Liste des Tableaux*

**Tableau 01** : Résultats du test toxicologique de l'herbicide (**Glyphosate 360g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 02** : Résultats du test toxicologique de l'insecticide (**Chlorpyriphos-éthyl 480g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 03** : Résultats du test toxicologique du mélange (**Glyphosate 360g /L+ Chlorpyriphos-éthyl 480g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 04** : Résultats du test toxicologique de l'herbicide (**Glyphosate 360g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 05** : Résultats du test toxicologique de l'insecticide (**Chlorpyriphos-éthyl 480g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 06** : Résultats du test toxicologique du mélange (**Glyphosate 360g /L+ Chlorpyriphos-éthyl 480g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 07** : Résultats du test toxicologique de l'herbicide (**Glyphosate 360g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 08** : Résultats du test toxicologique de l'insecticide (**Chlorpyriphos-éthyl 480g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 09** : Résultats du test toxicologique du mélange (**Glyphosate 360g /L+ Chlorpyriphos-éthyl 480g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 10** : Résultats du test toxicologique de l'herbicide (**Glyphosate 360g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 11:** Résultats du test toxicologique de l'insecticide (**Chlorpyrifos-éthyl 480g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 12:** Résultats du test toxicologique du mélange (**Glyphosate 360g /L+ Chlorpyrifos-éthyl 480g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

**Tableau 13:** Résultats du test toxicologique de l'herbicide **Glyphosate 360g/L** sur la croissance des diatomées benthiques et la teneur des nutriments issue du milieu lentique.

**Tableau 14:** Résultats du dosage de la chlorophylle *a* et de l'indice phéopigments par spectrométrie d'absorption moléculaire selon la méthode SCOR-UNESCO.

## *Liste des Figures*

**Figure 01 :** Structure chimique du DDT

**Figure 02 :** Structure chimique des organophosphorées

**Figure 03 :** Structure chimique des carbamates

**Figure 04 :** Le devenir de pesticides dans l'eau de surface

**Figure 05 :** Structure chimique du chlorpyrifos-éthyl

**Figure 06 :** Schéma représente la dégradation du chlorpyrifos-éthyl

**Figure 07:** Structure chimique du glyphosate et de son métabolite l'AMPA

**Figure 08 :** Modélisation de l'évolution de la biomasse (poids sec) des principaux groupes d'algues periphytiques au cours de l'année dans un écosystème lotique (l'échelle de temps démarre au 1er janvier et s'arrête au 31 décembre) (modifié d'après **McIntire et al., 1996**).

**Figure 09 :** Schéma d'un biofilm périphytique

**Figure 10 :** Structure du frustule d'une diatomée (*Navicula* sp.) (d'après **Round et al., 1990**).

**Figure 11 :** Schéma illustrant la réduction progressive de la taille des cellules au fil des multiplications végétatives des diatomées (d'après **Prygiel et Coste, 2000**)

**Figure 12 :** Clé simplifiée de détermination des genres des diatomées d'eau douce (d'après **Krammer et Lange-Bertalot 1986 - 1991**), illustrations de Michel Coste (**Coste, 1999**).

**Figure 13 :** Stations d'échantillonnage du biofilm : (A) Oued Mencha, (B) El radjla.

**Figure 14 :** Méthode d'échantillonnage du biofilm diatomique

**Figure 15 :** Photographie du dispositif expérimental utilisé pour les études en microcosmes.

**Figure 16 :** Diatomées pennées sous microscope à caméra OLYMPUS (Grossissement 40x10)

**Figure 17 :** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 18 :** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du chlorpyrifos-éthyl. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 19 :** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate(Herbasate)+ Chlopyriphos-éthyl(Pyricol). Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 20 :** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 21 :** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du chlorpyrifos-éthyl. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 22 :** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate(Herbasate)+ Chlopyriphos-éthyl(Pyricol). Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 23 :** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 24 :** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du chlorpyrifos-éthyl. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 25:** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate(Herbasate)+ Chlopyriphos-éthyl(Pyricol). Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 26:** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 27:** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du chlorpyriphos-éthyl. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 28:** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate(Herbasate) + Chlopyriphos-éthyl(Pyral). Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 29:** Evolution de la communauté de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

**Figure 30:** Cinétique de l'évolution de la teneur en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) en présence des différentes concentrations du glyphosate ajoutés dans les microcosmes (Résultats exprimés en mg/L)

**Figure 31:** Cinétique de l'évolution de la teneur en phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en présence des différentes concentrations du glyphosate ajoutés dans les microcosmes (Résultats exprimés en mg/L)

**Figure 32 :** Représentation graphique des résultats du dosage de la chlorophylle *a*

## *Liste des Abréviations*

**ANOVA** : analysis of variance

**AFNOR** : Association Française de normalisation

**DDT** : dichlorodiphényltrichloroéthane

**DDD** : dichlorodiphényldichloroéthane

**DDE** : dichlorodiphényldichloroéthylène

**DL<sub>50</sub>** : Dose létale 50%, dose en contaminant qui induit la mort chez 50% des individus exposés

**EPSPS** : enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase

**Chl *a*** : chlorophylle a

**(ID)**: L'indice de dégradation de la chlorophylle.

# *Introduction*



### **Introduction :**

La première trace de l'utilisation de pesticides date de la Grèce antique, avec notamment l'utilisation du soufre comme agent de fumigation. Les premiers pesticides de synthèse quant à eux ont fait leur apparition dans les années 1930, avec le développement d'une part de la chimie organique et d'autre part de la recherche sur les armes chimiques au cours de la Première Guerre mondiale. En parallèle les pratiques agricoles se transforment à partir du milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, avec l'émergence de la mécanisation et de la protection chimique pour améliorer la productivité des cultures. Dans un premier temps, on assiste au développement de l'utilisation de composés inorganiques comme le soufre ou le sulfate de cuivre, puis les composés organiques de synthèse émergent avec la commercialisation du DDT (insecticide) en 1943 ou du 2,4-D (herbicide) en 1946. De nos jours l'utilisation de pesticides à grande échelle est devenue la norme dans l'agriculture **(KimTiamFook, 2013)**.

Cependant cette utilisation massive de produits phytosanitaires entraîne une contamination de l'environnement et en particulier du compartiment aquatique. Les pesticides et leurs produits de dégradation peuvent alors y atteindre des concentrations susceptibles de provoquer des effets toxiques chez les organismes y étant exposés et une dégradation de la qualité de la ressource en eau.

Depuis les années 70, les altérations dues aux pesticides ont été largement étudiées sur divers Organismes, dont les diatomées ; la très grande majorité des travaux a été conduite à l'échelle des individus, voire de la cellule, dans des conditions très contrôlées et sur un nombre très limité de molécules **(Forbes et al. 1997; Peterson et al. 1997; Tang et al. 1997; Kasai 1999; Nelson et al. 1999)**.

L'intérêt des algues en écologie des systèmes aquatiques est aisément défendable, en raison de leur rôle prépondérant dans les cours d'eau. Non seulement producteurs primaires autotrophes et convertisseurs de nutriments inorganiques en formes organiques utilisables par les autres maillons de la chaîne alimentaire, ces organismes jouent un rôle structurant de stabilisation du substrat et de création d'habitat pour les poissons ou les invertébrés.

La connaissance des effets des dégradations anthropiques sur les communautés diatomiques constitue donc un enjeu majeur de l'écologie des systèmes aquatiques d'eau douce ; cependant ce compartiment biologique a été relativement moins exploité que les poissons ou les invertébrés pour la bio-surveillance de l'état de santé des cours d'eau (**Morin, 2006**).

Dans ce travail, on a choisi deux pesticides non sélectifs (glyphosate et chlorpyrifos éthyle) qui sont très utilisés dans l'agriculture. Ce présent travail porte essentiellement sur le degré de polluosensibilité des diatomées benthiques et d'importance écologique pour l'écosystème aquatique. Il présente une étude de l'évaluation de la toxicité potentielle du glyphosate et du chlorpyrifos éthyl, sur les diatomées benthiques issues de deux milieux différents (lotique et lentique) en fonction de plusieurs paramètres abiotiques. Elle devrait ainsi fournir des éléments de réponse à une question essentielle:

- Les communautés de diatomées périphytiques peuvent-elles représenter des **indicateurs biologiques** pertinents de la pollution ?

Donc, l'objectif de ce travail, consiste à évaluer l'effet du glyphosate et du chlorpyrifos-éthyl, testés seuls et en mélange sur la croissance des diatomées benthiques issues de deux milieux différents.

Les travaux présentés dans ce mémoire s'organisent en quatre chapitres principaux :

Le premier chapitre, présente les pesticides dans l'environnement.

Le deuxième chapitre, présente des généralités sur les diatomées.

Le troisième chapitre, expose les matériels et méthodes utilisés tout au long du travail, détaille la stratégie d'échantillonnage adopté, le dispositif expérimental.

Le quatrième chapitre, développe les résultats obtenus au travers des différentes expériences visant à caractériser les effets du glyphosate et du chlorpyrifos-éthyl et de son mélange sur les diatomées benthiques, appréhendés à l'aide d'une approche expérimentale en microcosmes.

*Chapitre I : Les  
pesticides dans  
l'environnement*

## I. Définitions :

Le mot « pesticide », emprunté à la terminologie anglaise, englobe toutes les substances chimiques utilisées pour lutter contre les organismes vivants (microbes, animaux ou végétaux) considérés comme nuisibles aux cultures et récoltes, à la santé humaine et vétérinaire, ainsi qu'aux bâtiments et surfaces non agricoles (**Calvet et al., 2005**).

Par le terme de pesticides, on assimile « toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications » (**Aubertot et al., 2005**).

## II. Classification :

Il existe deux façons de classer les pesticides : par les organismes vivants visés et par leurs caractéristiques chimiques.

### II.1. Classification chimique :

Les pesticides peuvent être également classés en fonction de leur nature chimique en molécules inorganiques, organométalliques et organiques.

#### II.1.1. Les pesticides organiques :

Les pesticides organiques, de loin les plus nombreux, appartiennent à plus de 80 familles chimiques. On les classe habituellement en plusieurs grandes familles selon leur composition chimique. Au sein d'une même famille on retrouve, pour les différents composés, des groupes fonctionnels identiques et des similitudes de structure (**Banton et Bangoy., 1997**). On peut citer comme exemples de familles :

##### ✓ Les pesticides organochlorés :

Les pesticides chlorés, aussi connus sous le nom « organochlorés », se répartissent en trois groupes de composés.

Le premier est le groupe des dichlorodiphénylétanes, dont le plus connu est le dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT (**figure 01**), et ses produits de dégradation anaérobie DDD (dichlorodiphényldichloroéthane) et aérobie DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène).

Le deuxième groupe est le groupe des cyclodiènes, alors que le troisième regroupe les autres composés qui ont des structures différentes (**Kouzayha, 2011**).

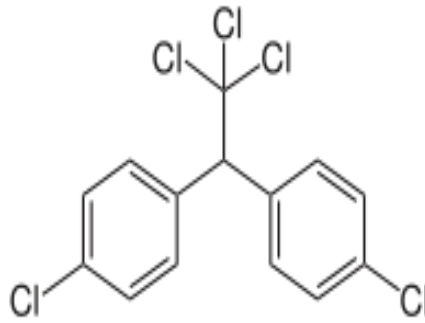


Figure 01 : Structure chimiques de DDT.

✓ **Les organophosphorés :**

Sont des composés de synthèse qui se dégradent assez rapidement dans l'environnement (Tawil, 2007). Cette famille a été développée à partir de 1944. Les organophosphorés sont des composés organiques du phosphore (figure 02) qui ont des propriétés insecticides. Ayant l'avantage d'être moins persistants et moins stables que les organochlorés et donc plus biodégradables (Kouzayha, 2011).

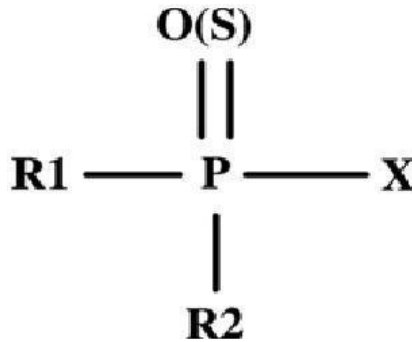
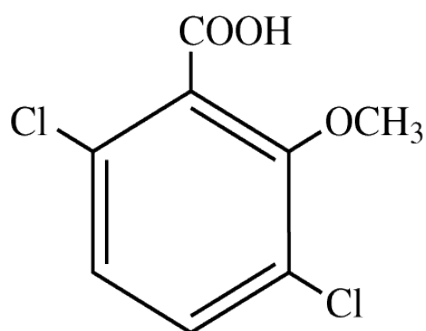


Figure 02 : Structure chimiques des organophosphorées

✓ **Les aryloxyacide :**

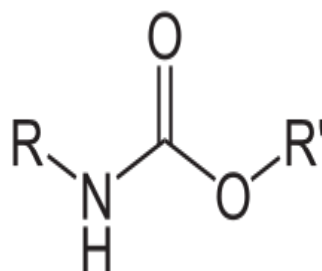
Ces molécules sont constituées d'un noyau benzénique, naphtéinique ou anthracénique dont un des atomes d'hydrogène est substitué par un atome d'oxygène lié à une chaîne hydrocarbonée comportant un groupe carboxyle (CO<sub>2</sub>H) (Telmani k, 2012).



Dicamba

### ✓ Les carbamates :

La famille de carbamates regroupe les dérivés de l'acide carbamique, habituellement ses esters (**figure03**). Les carbamates sont utilisés dans le monde entier pour combattre les insectes, les champignons, les mauvaises herbes, et en tant que régulateurs de croissance. Leur mode d'action étant des insecticides se fait par blocage de la transmission de l'influx nerveux en inhibant l'enzyme acétylcholinestérase (**Kouzayha, 2011**).



**Figure 03: Structure chimiques des Carbamates.**

### II.1.2. Les pesticides organo-métallique :

Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe d'un métal tel que le zinc et le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate (**Calvet et al., 2005**).

### II.1.3. Les pesticides inorganiques :

Ils sont peu nombreux mais certains sont utilisés en très grandes quantités comme le soufre et le cuivre.

## II.2. Classification biologique :

Selon la nature de leur cible, les pesticides peuvent être classés en trois principales catégories : les herbicides (contre les mauvaises herbes), les insecticides (contre les insectes) et les fongicides (contre les champignons)(**Rodier et al., 2009**).

### ✓ Les herbicides :

Représentent les pesticides les plus utilisés dans le monde, ils sont destinés à éliminer les végétaux rentrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance. Les herbicides possèdent différents modes d'actions sur les plantes :

- les perturbateurs de la régulation d'une hormone « l'auxine » (principale hormone agissant sur l'augmentation de la taille des cellules),
- les perturbateurs de la photosynthèse,
- les inhibiteurs de la division cellulaire,
- les inhibiteurs de la synthèse des lipides,
- les inhibiteurs de la synthèse de cellulose,
- les inhibiteurs de la synthèse d'acides aminés (**El Mrabet et al.,2008**).

### ✓ Les insecticides :

Sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction. Différents types existent comme :

- les neurotoxiques,
- les régulateurs de croissance,
- ceux agissant sur la respiration cellulaire (**El Mrabet et al.,2008**).

### ✓ Les fongicides :

Servant à combattre la prolifération des champignons phytopathogènes, ils permettent de lutter contre les maladies cryptogamiques qui causent de graves dommages aux végétaux cultivés(**Kesraoui, 2008**).

Les fongicides peuvent agir différemment sur les plantes :

- les inhibiteurs respiratoires,
  - les inhibiteurs de la division cellulaire,
  - les perturbateurs de la biosynthèse des acides aminés ou des protéines,
  - les perturbateurs du métabolisme des glucides (El Mrabet et al.,2008).
- Outre, les trois grandes familles de pesticides mentionnées ci-dessus, différentes familles peuvent être citées comme par exemple :
  - Les acaricides (contre les acariens),
  - Les nématicides (toxiques pour les vers du groupe des nématodes),
  - Les rodenticides (contre les rongeurs),
  - Les taupicides (contre les taupes),
  - Les molluscicides (contre les mollusques, limaces, escargots),
  - Les corvicides et les corvifuges (contre les corbeaux et les oiseaux ravageurs de cultures) (El Mrabet et al., 2008).
- Une autre distinction est faite selon le mode d'action des produits phytosanitaires. Certains pesticides peuvent agir sur la partie de l'organisme vivant (plante, insecte....) avec laquelle ils entrent en contact et sont alors dits de « contact » ou peuvent être absorbés par la plante et circuler dans les vaisseaux conducteurs avec la sève et sont qualifiés dans ce cas de « systémiques » 3.

### III. Cadre réglementaire :

En Algérie, la loi n°87-17 du 1<sup>er</sup> août 1987 (journal officiel 1995) relative à la protection phytosanitaire, a instauré au départ les mécanismes permettant une utilisation efficace des pesticides. Cette loi régit les aspects relatifs à l'homologation, l'importation, la fabrication, la commercialisation, l'étiquetage, l'emballage et l'utilisation des pesticides.

Décret exécutif N°99/156 du 20 juillet 1999 modifiant et complétant le décret exécutif N° 95/405 du 2 décembre 1995 relatif au contrôle des produits phytosanitaires à usage agricole.

Arrêté du 13 mars 2000, définissant le contenu des mentions et indications d'emballage des produits phytosanitaires à usage agricole. La décision ministérielle N° 817 du 11 octobre 2000 correspond au règlement intérieur de la commission des pesticides à usage agricole a pour objectif de fixer de règlement et les modalités de fonctionnement de la commission des pesticides. (IPPUA, 2011)



#### IV. La pollution des eaux de surface par les pesticides :

##### IV.1. Transfert vers les milieux aquatiques :

Le transfert des produits phytosanitaires dans l'environnement dépend du type d'épandage pratiqué, des propriétés intrinsèques des produits épandus (solubilité, volatilité, polarité...), des doses utilisées, ainsi que des conditions pédoclimatiques caractérisant le milieu où ils sont introduits. Il est régi par divers mécanismes biotiques et abiotiques qui interfèrent, se conjuguent ou s'opposent.

Dès qu'ils ont atteint le sol ou la plante, les pesticides commencent à se dissiper selon deux processus majeurs : la dégradation (biotique et/ou abiotique pouvant conduire jusqu'à la minéralisation) et la dispersion. Les substances actives non dégradées ou leurs éventuels métabolites peuvent alors être absorbés par les plantes ou les organismes du sol, se retrouver piégés par rétention, se volatiliser, ou atteindre les eaux de surface ou souterraines par ruissellement et/ou lessivage (Van der Werf, 1996). Les principales voies de transfert des pesticides vers les milieux aquatiques et l'estimation de la part attribuée à chacune d'entre elles, sont représentées sur la **Figure04**.

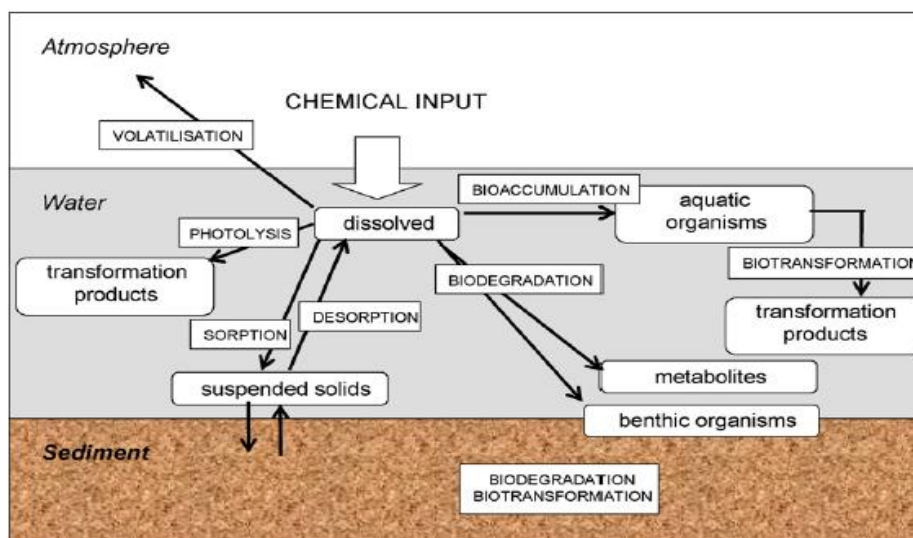


Figure04 : Le devenir de pesticides dans l'eau de surface (Telmani k,2012)

## IV.2. Ecotoxicité des pesticides sur le compartiment microalgal :

Plusieurs critères peuvent être retenus pour étudier les effets des polluants sur les microorganismes photosynthétiques tels que les teneurs en chlorophylle *a*, le taux de croissance, la densité cellulaire, la composition spécifique ou la production primaire.

De manière générale, la présence de pesticides, et plus particulièrement de molécules herbicides, induit aux effets suivants :

- ✓ une diminution de l'activité photosynthétique, conduisant à une baisse de la biomasse et de la densité cellulaire.
- ✓ Des modifications de la structure des communautés algales résultant de la raréfaction ou de la disparition des espèces les plus sensibles ont également été observées. Ce déclin peut permettre à des espèces opportunistes plus tolérantes de se développer dans le milieu.
- ✓ Le remplacement progressif des espèces sensibles par des espèces plus tolérantes, ainsi que la mise en place d'adaptations physiologiques ou génétiques chez certaines espèces, peut alors conduire à moyen terme à une augmentation de la tolérance aux pesticides chez les communautés algales.

Le compartiment microalgal peut également être indirectement stimulé par la présence de pesticides présentant une toxicité directe importante sur les organismes brouteurs. Cela a été notamment observé avec la plupart des insecticides, certains fongicides ou lors de contaminations avec plusieurs pesticides appartenant à différentes catégories (**Pesce S, 2006**).

## V. Les pesticides testés dans ce travail :

### V.1. Chlorpyrifos-éthyl (Pyrical): 480g/L

#### V.1.1. Caractéristiques physico-chimiques et mode d'action :

Le chlorpyrifos-éthyl ou O,O-diéthyl-O-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate, est un insecticide non systémique, à large spectre, commercialisé par Dow AgroSciences depuis 1965. Il appartient à la famille des organophosphorés et agit au niveau du système nerveux, en inhibant l'acétylcholine estérase qui hydrolyse l'acétylcholine, neurotransmetteur majeur (**Tomlin, 2003**).

La formulation commerciale testée dans cette étude est le **Pyrical** contenant **480 g/L** de la molécule active.

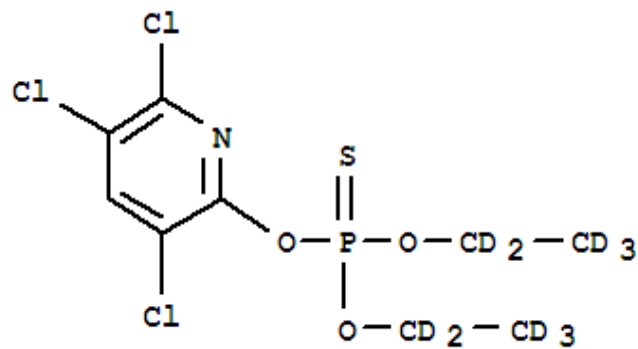


Figure 05: Structure chimique de chlorpyrifos-éthyl (Amara, 2012).

### V.1.2. Toxicité et devenir dans l'environnement :

Après son application, le chlorpyrifos se retrouve à la fois dans les compartiments atmosphérique (Zhou et al., 2010), aquatique et dans les sols. Dans le sol, le chlorpyrifos se dégrade lentement, avec un temps de demi-vie estimé à 35 jours (Gouzy et al., 2005).

Les pesticides organophosphorés subissent une dégradation naturelle dans l'environnement, accentuée par la lumière et par la présence de métaux dissous, de substances humiques et de microorganismes (Theriot et Grunden, 2011) et, le produit d'oxydation du chlorpyrifos, le chlorpyrifos-oxon s'avère également être un puissant inhibiteur de l'acétylcholine estérase (Čolović et al., 2011).

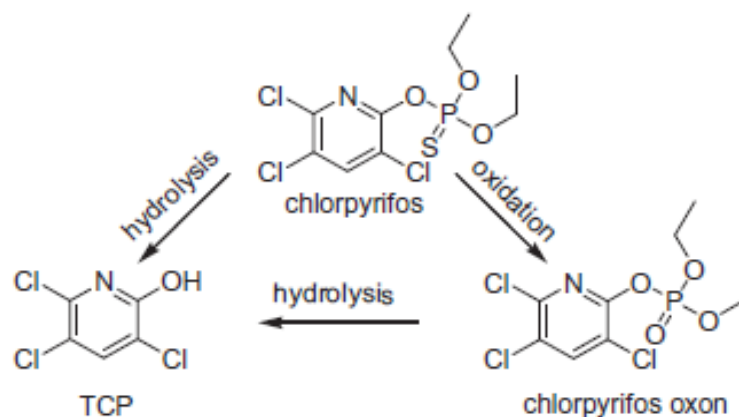


Figure 06 : Schéma représente la dégradation du chlorpyrifos (Telmani, 2012).

L'utilisation extensive des insecticides organochlorés dont le chlorpyrifos se traduit par une pollution environnementale et les organismes non-cibles en sont devenus victimes, en raison d'une pénétration dans l'organisme par inhalation, absorption cutanée *via* le contact avec l'eau et par empoisonnement secondaire (alimentation) (**Farahat et al., 2010**).

Chez les mammifères, ces insecticides inhibent non seulement l'acétylcholine estérase mais affectent également le système immunitaire, le pancréas, le foie, les systèmes hématologique et reproducteur (**Nandi et al., 2011**).

En outre, le chlorpyrifos est génotoxique (**Sandal et Yilmaz, 2011**) et il induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène, générant un stress oxydatif dans différents tissus (**Foxenberg et al., 2011**).

Les organismes aquatiques se révèlent particulièrement sensibles à l'action du chlorpyrifos. De nombreux travaux ont montré la toxicité de cet insecticide vis-à-vis du zooplancton dulçaquicole, (**Pablo et al., 2008**) ou d'eau salée (**Colville et al., 2008**), avec dans la plupart des cas une augmentation de la population phytoplanctonique : ces effets engendrent donc une modification de la structure des communautés. La toxicité du chlorpyrifos a également été rapportée pour des poissons tels que *Aphanius fasciatus* (**Boumaiza et al., 1979**), *Tilapia Guineensis* (**Chinah et al., 2004**), *Oreochomis niloticus* (**Oruç, 2010**), avec une perturbation du métabolisme de différents organes montrée chez *Heteropneustes fossilis* (**Tripathi et Shasmal, 2011**).

En outre, dans un travail (**Oruç, 2010**), met en évidence, que le chlorpyrifos, outre un stress oxydatif, agit comme un perturbateur endocrinien chez *Oreochomis niloticus* et tératogène chez *Xenopus laevis* (**Bonfanti et al., 2004**).

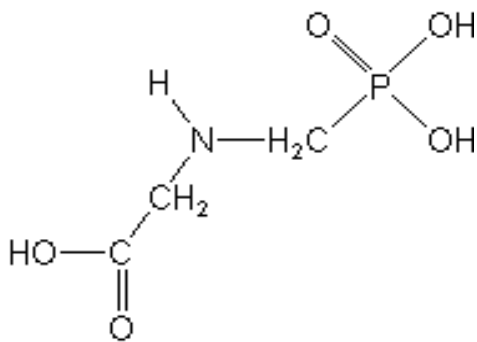
## V.2. Le glyphosate (Herbasate) : 360g/L

Le glyphosate dont le nom chimique est (N-(phosphonométhyl) glycine,  $C_3H_8NO_5P$ ) et de structure chimique (**voir Fig13**), est un herbicide à large spectre, non sélectif et systémique, commercialisé depuis une trentaine d'année (**Baylis, 2000**). La formulation commerciale testée dans cette étude est l'herbasate. Aujourd'hui cet herbicide, remplace les triazines notamment l'atrazine.

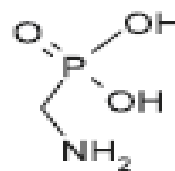
Actuellement, ce composé fait partie des pesticides les plus retrouvés dans les eaux naturelles, son métabolite principal est l'acide aminométhylphosphorique (ou AMPA), de formule brute  $\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$  (Rodier et al., 2009).

Il est absorbé par les feuilles et les tissus souples de la tige et agit en inhibant l'activité d'une enzyme jouant un rôle clé dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques :

La 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). En présence de glyphosate, la voie de biosynthèse de ces acides aminés, indispensables à la synthèse de protéines, s'interrompt (Baylis, 2000). Il tue alors pratiquement tous les types de plantes qui meurent en quelques jours ou quelques semaines. Ces formulations sont le plus souvent présentées sous forme d'un concentré soluble contenant 360 g de glyphosate acide par litre.



**Glyphosate**



**AMPA**

**Figure07** : Structure chimique du glyphosate et de son métabolite l'AMPA (Rodier et al., 2009)

### VI.2.1. Toxicité aigue du glyphosate:

Le glyphosate sous sa forme acide ou de sel possède une très faible toxicité aiguë, quels que soient la voie d'administration, l'espèce animale ou le véhicule considérés. Les résultats des nombreuses études disponibles sur différentes espèces animales montrent que la  $DL_{50}$  par voie orale de l'acide, des sels d'isopropylamine et d'ammonium chez le rat et la souris est de l'ordre de 5 000 mg/kg (Cuthbert 1989, Dreher 1994).

Enfin tous les avis exprimés ont été unanimes pour reconnaître la faible toxicité du glyphosate, tant du point de vue de la toxicité aiguë que des effets à court, moyen et long termes. En outre, l'absence de propriétés mutagènes, cancérogènes et d'effets sur les paramètres de la reproduction a été reconnue. Les seuls effets systémiques observés expérimentalement sont des effets hépato-toxiques modérés notés aux très fortes doses (**Pelfrène, 2003**).

### **V.2.2. Ecotoxicité du glyphosate sur les communautés microbiennes aquatiques :**

Malgré un temps de demi-vie relativement court en milieu aquatique (environ 100 heures dans une eau de rivière (**Mallat et Barceló, 1998**), les analyses effectuées récemment dans divers cours d'eau mettent en évidence l'exposition régulière des organismes aquatiques à cet herbicide (**Kolpinet al.,2006**).

La plupart des tests réalisés sur des microorganismes autotrophes ont mis en évidence la faible toxicité du glyphosate ; De plus, (**Sullivan et al.,1981**)et (**Schaffer et Sebetich 2004**) ont démontré certaines espèces algales pouvaient être stimulées par la présence de cet herbicide. Toutefois, la plupart des études ont été réalisées à partir de cultures cellulaires et sur des périodes très courtes. Les résultats obtenus sont donc de ce fait difficilement extrapolables sur des communautés en milieu naturel.

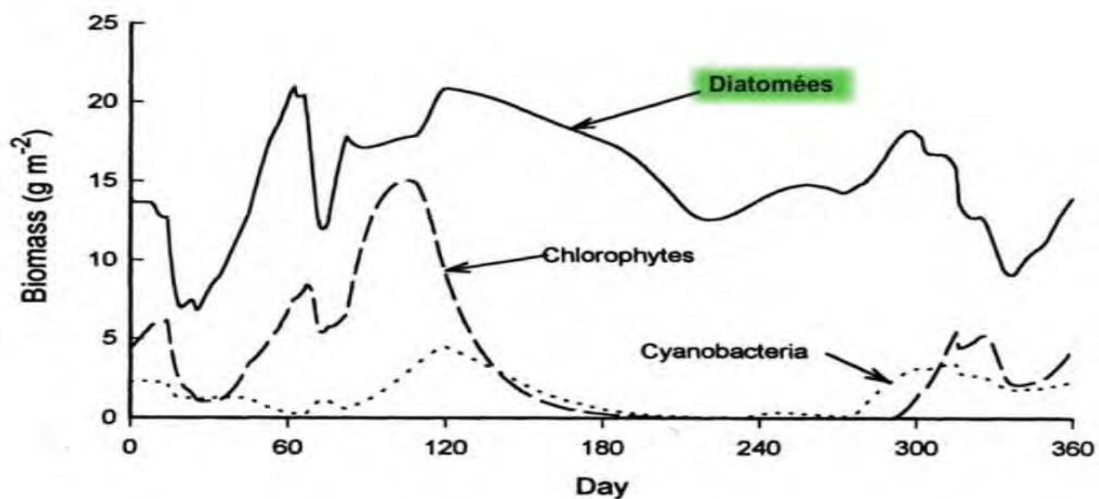
Nous avons aussi effectué un test du mélange des deux produits, pour voir l'effet antagoniste et/ou synergique des deux produits qui peuvent coexister ensemble dans la nature et dans le même milieu.

# *Chapitre II : Les diatomées*

### I. Description d'un biofilm périphytique :

Le biofilm périphytique ou « périphyton » désigne à l'origine l'ensemble de la microflore (microalgues, bactéries et champignons) se développant sur tout type de substrat immergé, vivant ou inerte (Wetzel, 1983).

Les microalgues périphytiques sont les principaux producteurs primaires au sein de nombreux écosystèmes lotiques, où le courant limite le développement des algues phytoplanctoniques et des macrophytes. Parmi ces micro-algues, les diatomées sont abondantes et peuvent constituer la quasi-totalité du peuplement végétal à certaines périodes de l'année (McIntiret al.,1996)(Figure 8).



**Figure 08 :** Modélisation de l'évolution de la biomasse (poids sec) des principaux groupes d'algues périphytiques au cours de l'année dans un écosystème lotique (l'échelle de temps démarre au 1er janvier et s'arrête au 31 décembre) (modifié d'après McIntire et al., 1996).



### I.1. Etapes de colonisation d'un biofilm périphytique :

La colonisation d'un substrat vierge par une communauté périphytique suit une succession écologique classique, telle celle décrite pour les végétaux terrestres (Hoagland, 1982; McCormick et Stevenson, 1991) (Figure 09). En premier lieu se dépose une couche de matière organique et de bactéries. Ce dépôt initial va faciliter l'ancrage et favoriser l'adhérence de petites espèces de diatomées mobiles (Stevenson et Peterson, 1989). En second lieu, les espèces érigées à court pédoncule vont se développer au-dessus des espèces pionnières. Enfin, les espèces filamenteuses vont recouvrir les espèces adhérentes et érigées.

Cette succession tridimensionnelle se met en place pour former à maturité un biofilm dont l'épaisseur est conditionnée par le pool d'espèces présentes dans le milieu, le type de substrat, mais aussi par les conditions environnementales durant les stades de la colonisation (lumière, température, nutriments, érosion due aux brouteurs et au courant) (Murdock et Dodds, 2007). Les espèces présentes au sein du biofilm sont enveloppées dans une matrice organique composée de polysaccharides sécrétée par les algues et les bactéries.

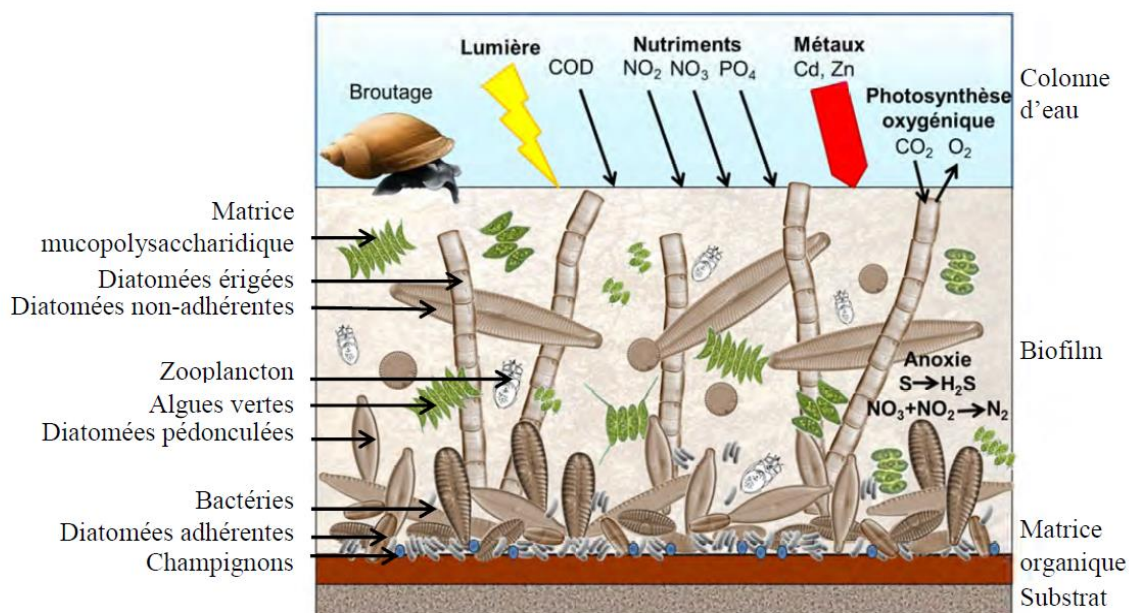


Figure 09: Schéma d'un biofilm périphytique (Arini, 2011).

## II. Présentation générale des diatomées :

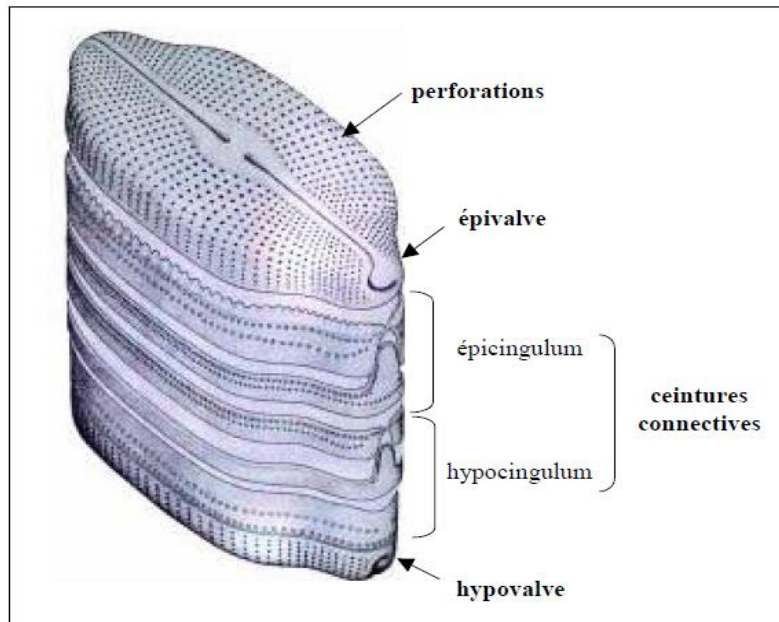
Les Diatomées, ou Bacillariophycées, sont des micro-algues unicellulaires appartenant à l'embranchement des Chromophytes (algues brunes). Leur taille varie de moins de 10  $\mu\text{m}$  à plus de 500  $\mu\text{m}$  pour les plus grandes. Elles sont principalement solitaires, mais peuvent aussi former des colonies rubanées, étoilées ou filamenteuses. Les premières diatomées fossiles datent du Crétacé (120 millions d'années) (**Van den Hoek et al., 1995**) et plus de 100 000 espèces ont été recensées jusqu'à présent (**Round et al., 1990**), se développant dans tous les types de milieux aquatiques, au niveau du phytoplancton et du périphyton.

### II.1. Structure cellulaire :

Les diatomées sont caractérisées par la présence d'une paroi très différenciée autour de la cellule, principalement constituée de silice (le **frustule**). Cette paroi externe est formée de deux valves emboîtées (l'épivalve et l'hypovalve, de plus petite dimension), reliées entre elles par des ceintures connectives (l'épicingulum et l'hypocingulum). Les diatomées produisent des **substances extracellulaires polymériques** (Extracellular Polymeric Substances, EPS), qui peuvent s'organiser en tubes, pédoncules, fibrilles ou former une enveloppe adhésive autour du frustule (**Hoagland et al., 1993**). Ces substances mucilagineuses sont excrétées par la cellule au niveau des perforations réparties sur toute la surface du frustule (**Round et al., 1990**) (**Figure 10**).

Elles sont considérées comme étant en grande partie responsables du succès biologique des diatomées, jouant un rôle dans leur mobilité, leur adhésion au substrat, dans la formation des colonies et contre la dessiccation (**Hoagland et al., 1993**).

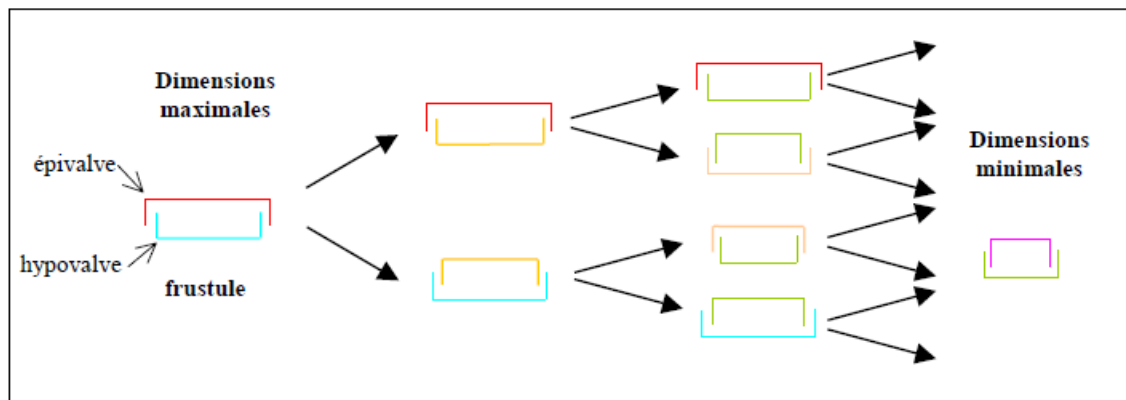
Le protoplasme sous-jacent ne présente pas de caractéristique particulière. Il contient les mêmes organites que les autres algues eucaryotes : noyau, mitochondries, dictyosomes chloroplastes, vacuoles, etc. Les chloroplastes présentent une couleur jaune pâle à brune, qui a déterminé le classement des diatomées dans le groupe des "algues brunes" et qui est due aux pigments caroténoïdes ( $\beta$ -carotène, diatoxanthine, diadinoxanthine et fucoxanthine), masquant la couleur des chlorophylles (chlorophylles a et c).



**Figure10** : Structure du frustule d'une diatomée (*Navicula* sp.)  
(d'après Round et al., 1990).

## II.2.Cycle de développement :

Les diatomées ont un cycle de développement relativement court, allant de quelques heures à quelques jours selon les espèces et les caractéristiques du milieu (**Baars,1983**). Elles possèdent deux modes de reproduction distincts : multiplication végétative et reproduction sexuée. Elles se reproduisent le plus souvent par **multiplication végétative**, au cours de laquelle chaque cellule donne naissance à deux cellules filles, par écartement des deux valves et régénération de nouvelles valves de plus petite taille. Ce processus conduit à la réduction progressive de la taille des cellules au fil des générations jusqu'à l'atteinte d'une taille minimale (**Figure 11**).



**Figure11** : Schéma illustrant la réduction progressive de la taille des cellules au fil des multiplications végétatives des diatomées (d'après Prygiel et Coste,2000)

La **reproduction sexuée**, induite par la réduction de taille de la cellule mais aussi par les facteurs environnementaux (lumière, température, nature du substrat, etc.), permet la restauration d'individus de taille normale. Les modalités de cette reproduction sexuée varient selon les espèces, mais l'auxosporulation (production d'auxospore ou cellule "oeuf") est toujours observée.

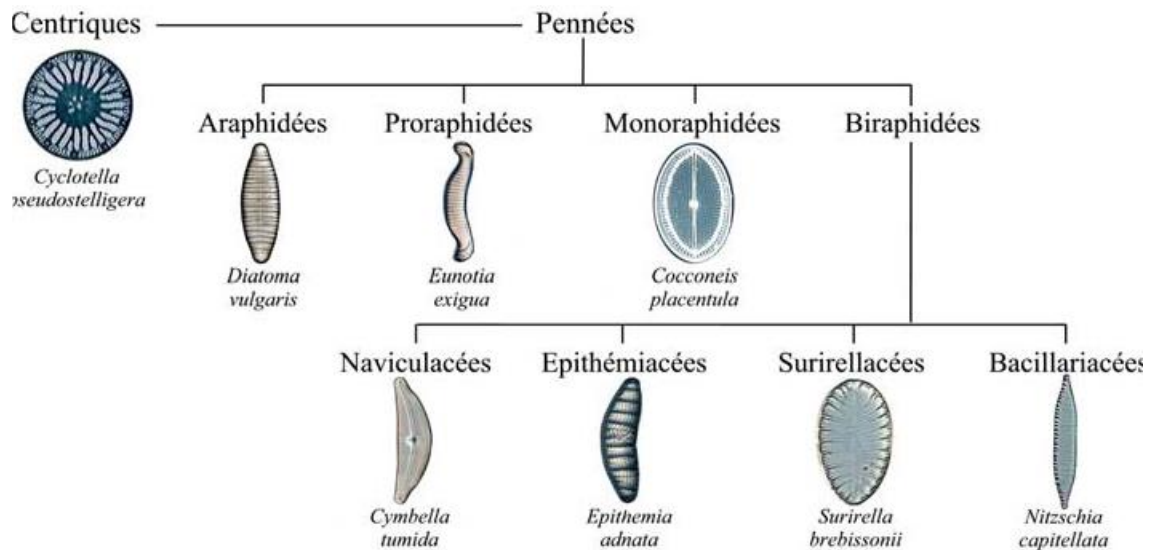
### II.3.Classification :

Environ 100 000 espèces sont répertoriées en eau douce et marine (**Round, 1990**), mais de nouveaux taxons sont décrits chaque année (**Arini, 2011**). La classification des diatomées est basée sur les caractéristiques morphologiques du frustule en vue valvaire (de face) et en vue connective (de profil), et sur l'ornementation des valves (stries, pores, ponctuations, etc. au travers desquels se font les échanges entre le protoplasme de la cellule et le milieu extérieur). Ces caractères morphologiques sont extrêmement variables selon les espèces, mais restent permanents au sein d'une même espèce, transmissibles d'une génération à l'autre.

L'élimination par traitement chimique du protoplasme des cellules et de la couche extérieure de matières organiques permet d'observer les détails des frustules au microscope photonique.

La classification utilisée dans ce mémoire, repose principalement sur la flore de Krammer et Lange-Bertalot (Krammer, 1986–1991). On distingue deux ordres de diatomées (**Figure12**): Les **Centrales**, ou Centriques, à symétrie axiale et portant des ornements radiaux ou concentriques, elles sont majoritairement pélagiques. Et les **Pennales**, ou Pennées, à symétrie

bilatérale, qui peuvent posséder une ligne interrompant les stries (pseudo-raphé) ou une fente longitudinale (raphé).



**Figure12:** Clé simplifiée de détermination des genres des diatomées d'eau douce (d'après Krammer et Lange-Bertalot 1986 - 1991), illustrations de Michel Coste (Coste, 1999).

#### II.4. Répartition et modes de vie :

Le groupe des diatomées possède une grande amplitude écologique, ces microalgues étant capables de coloniser tous les types de milieux aquatiques continentaux et marins, même les plus inhospitaliers et les plus pollués (mares temporaires, sources thermales, glace, bouées enduites de peinture antifouling, etc.).

Les diatomées présentent deux modes de vie différents, une partie des espèces étant **planctonique** alors que les autres sont **périphytiques**. Les diatomées planctoniques, appartenant aux centriques pour la plupart, vivent en suspension dans la colonne d'eau et constituent la majeure partie du phytoplancton lacustre et marin. Elles ont une importance écologique considérable, contribuant à près de 25 % de la production primaire totale de la planète (Werner, 1977).

Contrairement aux espèces planctoniques, les diatomées périphytiques ont un mode de vie benthique, et se développent à la surface des substrats immergés en zone photique. Elles sont constituées principalement d'espèces Pennées, et sont généralement responsables d'une forte

proportion de la production primaire au sein des cours d'eau, où le compartiment phytoplanctonique est peu développé, voire absent, en raison du courant (**Whitton, 1980**).

### **III. Intérêt en tant que bioindicateurs :**

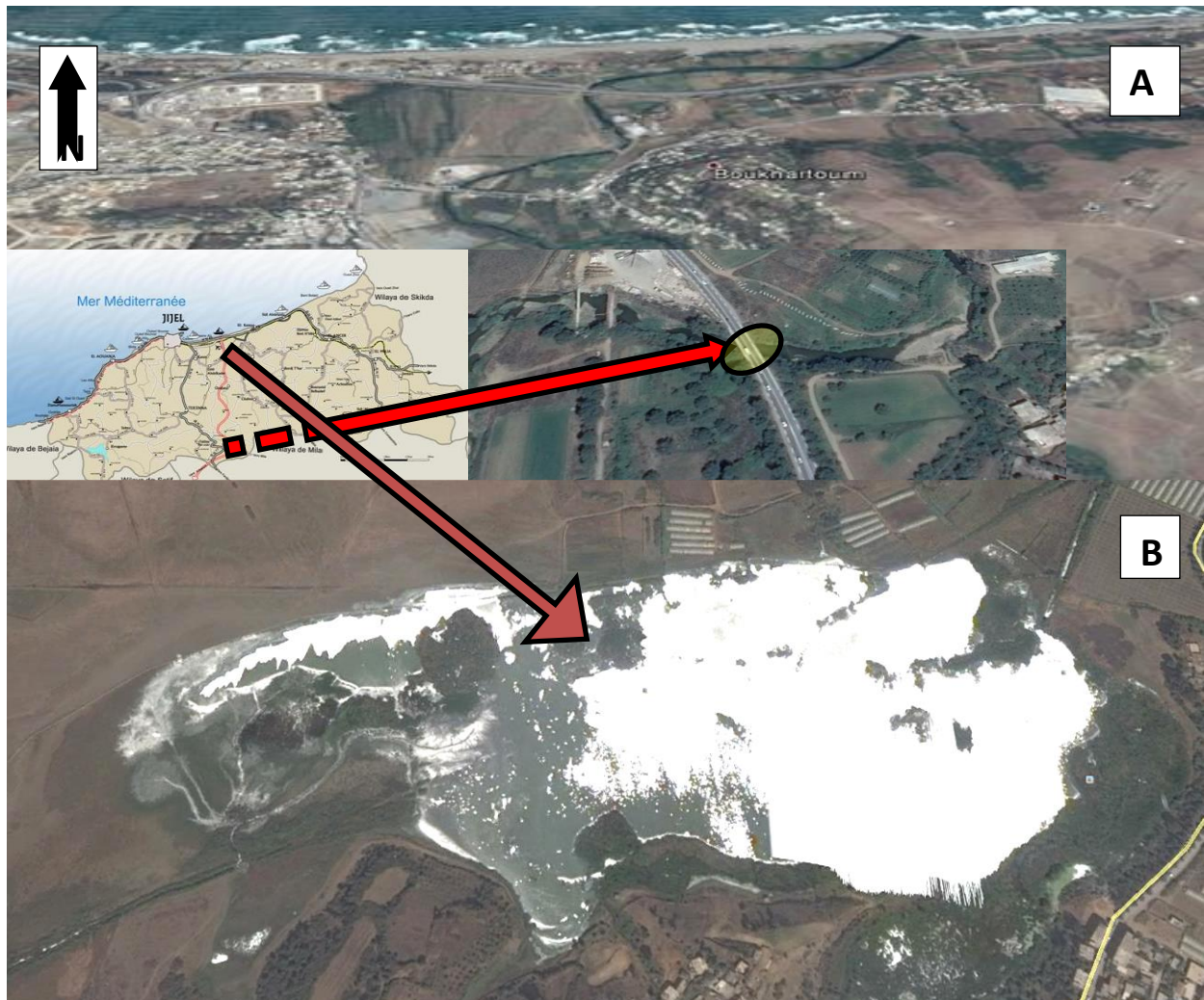
Les diatomées présentent différentes particularités écologiques appropriées à leur utilisation en tant que bioindicateurs de la qualité des cours d'eau. Leur répartition ubiquiste rend possible des applications à large échelle géographique et permet la comparaison des études réalisées dans différentes régions ou pays. De par leur immersion permanente et leur position clé à la base des chaînes trophiques, les diatomées intègrent de façon très précoce les variations physicochimiques du milieu qui peuvent influencer sur les fonctions métaboliques (respiration, alimentation, reproduction etc.). Ainsi, les préférences écologiques des espèces influencent très fortement la composition des communautés diatomiques et renseignent sur un grand nombre de paramètres physicochimiques du milieu (température, pH, conductivité, oxygène dissous, etc.) ou encore sur la présence ou non de polluants. De plus leur cycle de développement court permet de révéler des changements physicochimiques ponctuels. Enfin, l'échantillonnage sur substrats naturels ou artificiels relève d'un protocole standardisé (**NFT90 – 354**) qui outre sa simplicité, permet d'assurer la conservation et la traçabilité des échantillons.

Par conséquent, les diatomées répondent aux exigences requises pour être considérées en tant que bioindicateurs de la qualité des cours d'eau. Cependant, leur utilisation comme outil d'évaluation de la qualité du milieu présente aussi un certain nombre d'inconvénients, l'identification des espèces nécessitant des comptages fastidieux, la possession d'un microscope de bonne qualité et la maîtrise de la systématique, qui requiert un long apprentissage (**in Adeline, 2011**).

*Chapitre III :*  
*Matériels et*  
*méthodes*

### I-Sites d'étude :

Pour l'élaboration de ce travail, deux sites différents ont été choisis à savoir, Oued Mencha Jijel, qui constitue un écosystème lotique et le Marais Redjla, Taher qui constitue un écosystème lentique ces deux sites ont fait l'objet d'échantillonnage **figure : 13**.



**Figure13:**Stations d'échantillonnage du biofilm : Oued Mencha(A), Redjla(B).

#### I-1 Oued Mencha :( Ecosystème lotique)

Ce site est un cours d'eau de faible débit surtout en période d'étiage, il prend sa naissance dans les hauteurs de Texanna ; après avoir traversé des zones où il y'a des activités agricoles et des agglomérations urbaines (Kaous et Beni-Ahmed), il se jette à la mer Méditerranée.



### I-2. Le Marais Redjla : (Ecosystème lentique)

Il se situe au niveau de la commune de Taher ( $36^{\circ}47'20''\text{N}-5^{\circ}48'50''\text{E}$ ), il s'étend sur une superficie de 4.5 h, faisant partie de la circonscription des forêts de Taher , l'altitude moyenne : 50m.

Ce dernier est caractérisé par une végétation dense représenté par : *Typha angustifolia*, *Rympheae alba*, *Scirpus.sp*, *Phragmites anstralis*, *Potamogeton .sp*. Quant à l'avifaune, elle est représenté par : Foulque macroule ,Canards (souchet,siffleurs,colvert,pilet,chipeau) ,Herons (gardebœuf,cendré) ,Grèbe costagneux, Grèbe huppé, Vaneau huppé, Sarcelle d'hiver, Goéland (leucophé),Fuligule(Nyroca,milouin),Poule(sultane d'eau),échasse blanche, busards des roseaux.

### I-3. Stations d'échantillonnage:

Les stations de prélèvement d'échantillon de diatomées tel qu'elles sont représentées sur la figure : 13, sont ornée par une végétation ripisylve comme le tamarix et le peuplier blanc ; et une végétation herbacée qui indique l'état eutrophie du milieu Oued Mencha. Cet état des lieux n'est rien autre que la résultante de toutes les activités anthropiques en amont de la station (rejets domestiques, épandage des pesticides et engrais sur des terres agricoles).

Pour la deuxième station le marais Redjla, le site est entouré par une ceinture de végétation hydrophétique, représentée par le *Typha angustifolia*. Les eaux sont de très mauvaise qualité (eau polluée), du fait qui s'agit d'un écosystème lentique exposé à la pollution notamment les rejets d'eau usée de la ville de Taher et les agglomérations limitrophe.

### I-4.Choix de l'espèce de diatomées:

En pratique, il n'est pas envisageable de réaliser des expérimentations sur l'ensemble des espèces et, dans ces conditions, le choix des espèces considérées ne peut résulter que d'un compromis entre représentativité et faisabilité, pour cette raison notre choix s'est focalisé sur les diatomées pénales qui sont abondante dans les échantillons du biofilm.

En outre les diatomées sont des bioindicateurs de pollution par excellence appartiennent à la classe des Bacillariophyta, et l'embranchement des algues brunes (Chromophytes) et sont des micro- algues unicellulaires (de 2  $\mu\text{m}$  à 1 mm) et elles colonisent divers types de substrats dans des conditions et des milieux très différents, des eaux pures aux plus polluées. Les diatomées représentent une grande partie du volume du périphyton dans la plupart des écosystèmes aquatiques et présentent de nombreux avantages en faveur de leur utilisation pour la bio-indication (**John, 2000**).

Les pratiques de bio-indication se sont développées pour évaluer la qualité de l'eau et des milieux aquatiques de façon plus intégrée dans le temps (**Rott, 1991**).

## **II-Protocoles expérimentaux :**

La partie expérimentale de cette étude s'est déroulée principalement dans le laboratoire, cependant les échantillons pris à partir des deux sites sont acheminés au laboratoire.

**II-1 Le terrain :** le travail du terrain est basé sur :

La prise d'échantillons des diatomées au niveau des deux sites d'étude. (Deux périodes différentes).

Les prélèvements ont été réalisés dans le temps :

- 1. Le 11 et 19 octobre 2014.**
- 2. Le 04 et 11 avril 2015 ; 30 mai 2015.**

### **II-1-1 Méthode d'échantillonnage des communautés de diatomées:( la collecte des diatomées)**

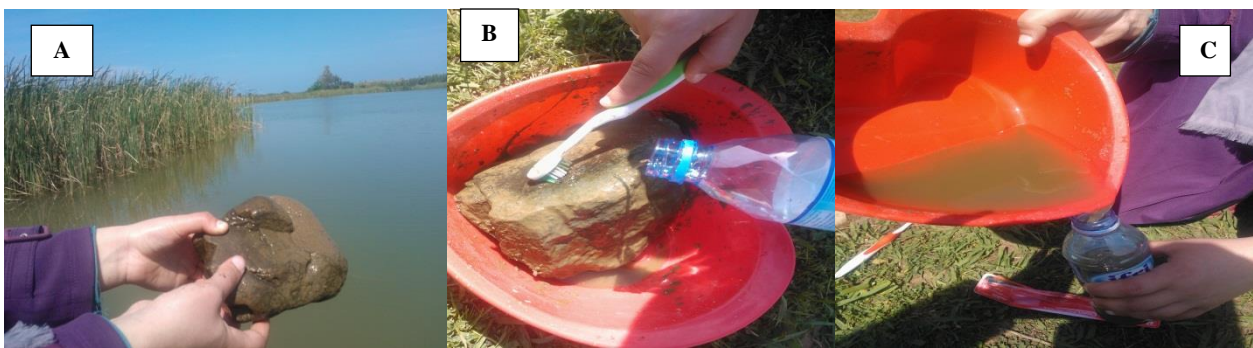
Les protocoles d'échantillonnage et de préparation des lames microscopiques pour les méthodes françaises de bioindication sont standardisés et définis dans la norme **NFT 90-354(AFNOR, 2007)**.

Lors de cette étude, une technique a été utilisée pour échantillonner les communautés de diatomées : le grattage des supports naturels. L'échantillonnage sur supports naturels a été réalisé par grattage de galets issus du site.

Les galets choisis sont relativement gros, la préférence ira vers des blocs de pierre de plus de 256 mm de diamètre. Le galet est placé dans un récipient où l'on frotte la surface par une brosse à

dent afin de récolter le biofilm brunâtre. Puis on verse de l'eau pour faciliter la collecte des diatomées. Une fois la surface du galet bien brossé, un dernier rinçage est effectué afin de s'assurer de la récolte de tout le biofilm contenant les diatomées. Ces dernières se trouvant dans l'eau brunâtre sont recueillies dans un flacon (**Figure 14**).

En effet le biofilm, prélevé sur substrats naturels, résulte de l'accumulation de communautés d'âges différents n'ayant pas la même sensibilité aux toxiques (**Debenest, 2007**). Mais il représente un agrégat d'organismes dont l'intérêt réside dans leur capacité à interagir avec les substances dissoutes et en particulier les pesticides, et dans leur faculté à s'adapter aux conditions de leur environnement. Néanmoins une contamination par ces substances peut modifier leur structure et leur fonctionnement (activité photosynthétique, respiratoire et enzymatique).



**Figure 14** : Méthode d'échantillonnage du biofilm diatomique.

## II-2- Le laboratoire :

Une approche toxicologique a été tentée sur des prélèvements naturels contaminés artificiellement, basée sur l'incubation en laboratoire : principe du microcosme indoor.

### II-2-1- Principe et déroulement du bioessai sur la croissance des diatomées benthique :

Quelques assemblages d'espèces ou de communautés des diatomées, en écosystèmes miniaturisés (microcosmes) ; vers plus de réalisme environnemental.

L'étude expérimentale a été réalisée afin d'appréhender, en conditions expérimentales, les effets des deux pesticides choisis (le glyphosate et le chlorpyrifoséthyl) sur les communautés de diatomées naturelles issues du cours d'eau (Oued Mencha) et du marais (Redjla). Pour chacune des molécules choisies, les expériences ont été menées à partir d'une exposition à des dilutions des

produits tel qu'ils sont commercialisés: ( $C_1$ : sans dilution ;  $C_{1/10}$ : dilution 1/10,  $C_{1/100}$ : dilution 1/100,  $C_{1/1000}$ : dilution 1/1000).

Afin d'appliquer les traitements dans les conditions proches de celles rencontrées dans le milieu naturel. Les facteurs environnementaux (luminosité, courant, concentration en nutriments,...) déterminent très largement les effets des pesticides sur les communautés algales (**Guasch et al.1997; Guasch et al.1998; Berard et al. 2001; Navarro et al. 2002**).

Les paramètres environnementaux suivants ont été adaptés : la lumière (intensité, durée des phases jour-nuit), une température de 25°C proche de celle mesurée *in situ* lors des prélèvements, agitation par un agitateur multiposte.

**II-2-1-1- Préparation des dilutions:** les pesticides sont dilués selon la relation suivante :

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Le calcul des volumes de pesticides pour un volume de 100 ml d'échantillon a donné les résultats suivants:

1. Pesticide (sans dilution) :  $C_2=1$  .....  $V_1= 100\text{ml}$ .
2. Pesticide avec une dilution de 1/10 :  $C_2= 1/10$  .....  $V_1= 10\text{ml}$ .
3. Pesticide avec une dilution de 1/100 :  $C_2= 1/100$ .....  $V_1= 1\text{ml}$ .
4. Pesticide avec une dilution de 1/1000 :  $C_2= 1/1000$ .....  $V_1= 0.1\text{ml}$ .

Les volumes utilisés sont adaptés pour les suivis de croissance des populations de diatomées.

**II-2-1-2-La réalisation de microcosmes indoor :**

On parle de microcosmes indoor lorsque ces systèmes sont maintenus au laboratoire. Ils permettent de contrôler un certain nombre de facteur physico-chimiques intervenant dans l'exposition à un toxique (température, éclairage...) ces microcosmes sont plus représentatifs des conditions naturelle (**Arzul, 2014**).

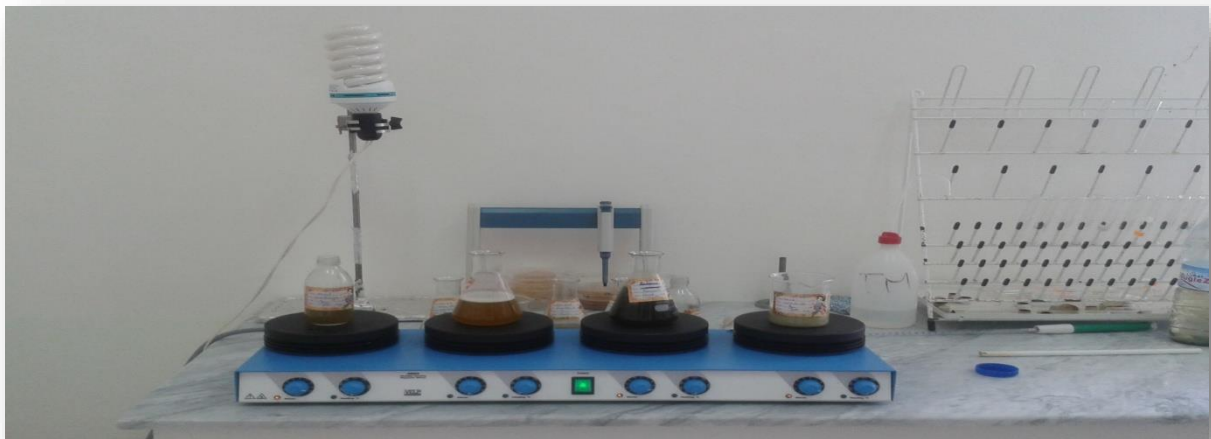
Le bioessai réalisé en laboratoire selon un protocole qui prend en compte les conditions naturelles de développement, permettent de connaitre les effets de contaminants sur les algues.

Après les prélèvements, les échantillons sont transportés jusqu'au laboratoire d'Ecotoxicologie de faculté de science naturel et vie à l'université de Jijel, pour la réalisation des bioessais :

Des erlenmeyers de 250ml ont été remplis par 100ml d'eau de prélèvement contiennent des diatomées benthique en suspension qui ont servie de microcosme. Chaque pesticide (glyphosate, chlorpyriphos-éthyl, et le mélange) est traité comme suit :

- ✓ Un erlenmeyer contient 100ml d'échantillon est exposé à 100ml de pesticide (pesticide sans dilution)
- ✓ Un erlenmeyer contient 100ml d'échantillon est exposé à 10ml de pesticide (dilution 1/10).
- ✓ Un erlenmeyer contient 100ml d'échantillon est exposé à 1ml de pesticide (dilution 1/100).
- ✓ Un erlenmeyer contient 100ml d'échantillon est exposé à 0.1ml de pesticide (dilution 1/1000).
- ✓ Un erlenmeyer contient 100ml d'échantillon est utilisé comme témoin.

Les microcosmes ont été placés sur un agitateur multiposte, à une température constante 21-25°C proche de celle mesurée in situ. L'éclairage, d'intensité constante (environ 4000 lux), a été assuré par une lampe néons serpentin "lumière du jour" qui délivre une lumière blanche couvrant l'essentiel du spectre visible ; Le pH des échantillons de deux sites est légèrement acide, il varie durant les essais dans l'intervalle (5,95 – 6,68).



**Figure15** : Photographie du dispositif expérimental utilisé pour les études en microcosmes.

Le suivi des effets toxiques de chaque produit a été effectué chaque 24 h par observation microscopique pendant 72h.

### II-2-1-3- Estimation de la densité de diatomées :

Le comptage des diatomées est réalisé à partir des échantillons préalablement fixées au Lugol, sous grossissement x 400 grâce à un microscope photonique OLYMPUS, à l'aide d'une

cellule de comptage de type Malassez. Un aliquote de 15-20 $\mu$ L est délivré par capillarité en plaçant l'extrémité de la pipette contre la lamelle. Les cellules sont dénombrées dans 10 rectangles de la zone quadrillée dont les dimensions sont : Long.= 0,25 mm / larg.= 0,20 mm / Prof. = 0,20 mm, le comptage est répété plusieurs fois.

La densité des diatomées exprimée en individus par mm<sup>3</sup>, est alors calculée selon les étapes suivantes :

Le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales (0,25 mm) et de 10 bandes horizontales (0,20 mm) formant ainsi 100 rectangles, on ne compte les cellules que dans 10 des 25 rectangles non contigus pris au hasard dans la cellule Malassez. Puis, on totalise le nombre de cellules présentes dans chaque rectangle. Ensuite, on procède au calcul du nombre moyen de cellules par rectangle (total des cellules observées dans 10 rectangles divisé par le nombre de rectangles comptés). A la fin, on multiplie le nombre obtenu par 100 pour connaître le nombre d'entités cellulaires par mm<sup>3</sup> puis par 10<sup>3</sup> pour connaître le nombre de cellules par Ml (Amara, 2012).

#### **II-2-1-4- Dosage des nutriments (nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/phosphate PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) :**

Le dosage des nutriments a été effectué au laboratoire, les concentrations en nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), et en phosphates (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), ont été déterminées selon des méthodes normalisées (voir Annexe II, III).

#### **II-2-1-5- Estimation de la biomasse végétale planctonique des deux sites d'étude :**

##### **II-2-1-5-1- Dosage de la chlorophylle *a* et de l'indice phéopigments par spectrométrie d'absorption moléculaire : selon la méthode SCOR-UNESCO. (Rodier et al., 2009)**

Le dosage de la chlorophylle *a* a été effectué au laboratoire, la concentration en chlorophylle *a*, et l'indice phéopigments, ont été déterminées selon des méthodes normalisées (voir Annexe I).

### **III. Traitement statistique des résultats**

Afin de révéler les différences statistiques entre échantillons, les données expérimentales de l'étude sont statistiquement testées par une analyse de variance (ANOVA)

Le logiciel STATISTICA 7a été utilisé et le seuil de signification de 0.05 a été retenu.

*Chapitre IV :*  
*Résultats et*  
*discussion*

**I/Résultats:**

**I-1.Observation microscopique :** l'observation microscopique a permis d'enregistrer la prédominance des diatomées pennées (**Figure : 16**) dans l'ensemble des deux sites d'échantillonnage, ces espèces ont fait l'objet de définir les effets du glyphosate, du chlorpyrofos éthyl et de son mélange, sur la croissance des algues unicellulaires cas : des diatomées benthique.



**Figure16:**Diatomées pennées sous microscope à caméra OLYMPUS (Grossissement x 400).

L'évaluation des résultats des bioessais repose sur l'examen des données brutes puis sur une description des données sous la forme de paramètres statistiques pour la quantification de la toxicité, puis sous forme graphiques ou la valeur moyenne de la concentration cellulaire est représenté pour chaque concentration du glyphosate, du chlorpyrofos éthyl et de son mélange, et le témoin en fonction du temps afin d'obtenir des courbes de croissance.



## I-2.Effet des pesticides sur la croissance de diatomées benthique du oued mancha et du marais Radjla:

**Remarque:** le chlorpyrifos et le mélange à travers les concentrations élevées (chlorpyrifos 480g/L  $C_1$  et en dilution 1/10,  $C_{1/10}$ ), nous nous ont pas permis d'aboutir au résultat escompté et ce, à cause de l'apparition de la couleur blanche que prend le chlorpyrifos avec l'eau, ce qui empêche l'observation. Ce constat nous a empêché d'obtenir un résultat probant à savoir la concentration cellulaire des diatomées au niveau des concentrations sus-citées.

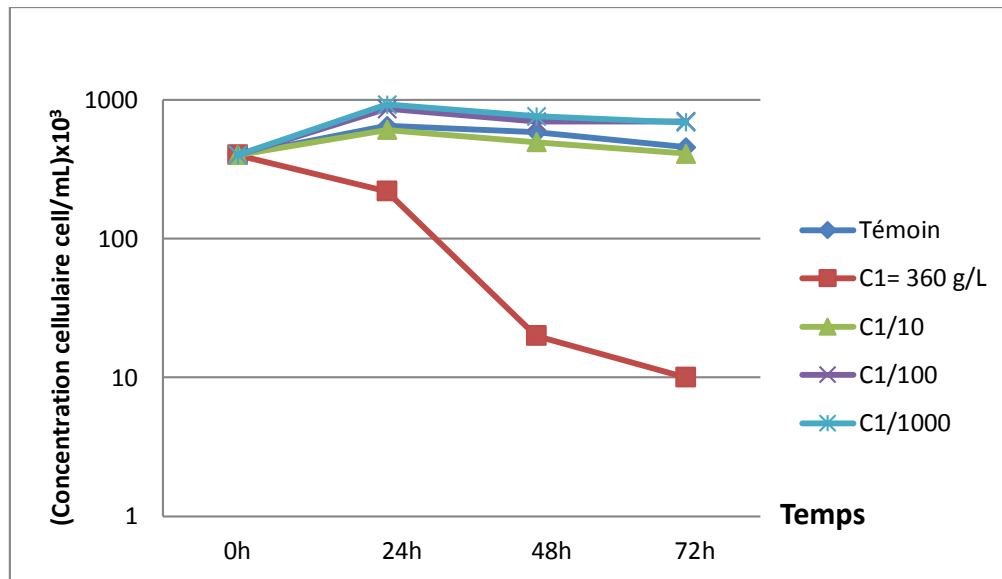
### I-2.1.Site Oued Mencha (Ecosysteme lotique):

✓ **Octobre 2014 :**

- Le prélèvement : 11/10/2014
- Le comptage des cellules de diatomées du témoin : 12/10/2014
  - La concentration cellulaire du témoin = (400 mm<sup>3</sup>X10<sup>3</sup>) cell / ml (0h).
- Le lancement du test : 13/10/2014.
- Le comptage des cellules de diatomées de tous les microcosmes : 14/10/2014 (24h), 15/10/2014 (48h), 16/10/2014 (72h).

**Tableau 01 :** Résultats du test toxicologique de l'herbicide (Glyphosate 360g/L) sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (Concentration cellulaire cell/ml).

<b>Temps</b> <b>Glyphosate</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>Témoin</b>	400X10 <sup>3</sup>	650 X10 <sup>3</sup>	583 X10 <sup>3</sup>	456 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1</sub>= 360 g/L</b>	400X10 <sup>3</sup>	220 X10 <sup>3</sup>	20 X10 <sup>3</sup>	10 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/10</sub></b>	400X10 <sup>3</sup>	606 X10 <sup>3</sup>	495 X10 <sup>3</sup>	410 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/100</sub></b>	400X10 <sup>3</sup>	860 X10 <sup>3</sup>	695 X10 <sup>3</sup>	700 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/1000</sub></b>	400X10 <sup>3</sup>	925 X10 <sup>3</sup>	760 X10 <sup>3</sup>	686 X10 <sup>3</sup>



**Figure 17** : Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml.

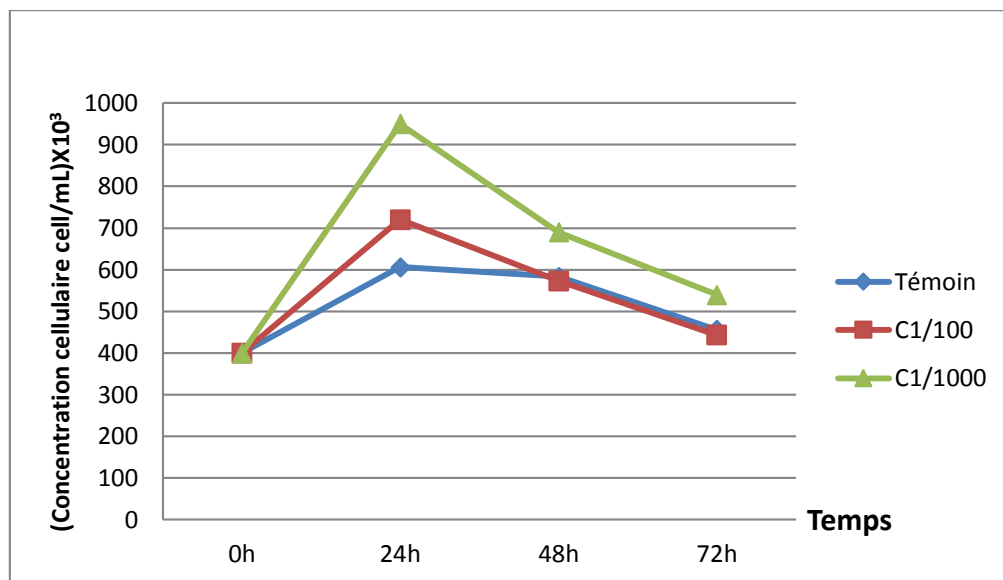
L'utilisation de l'herbicide glyphosate a permis d'enregistrer la variation de la concentration cellulaire en fonction du temps sur échelle ordinaire, représentée par le graphique de la figure :17, il s'agit dans ce cas d'un test paramétrique de données quantitatives ordinale, le test de signification utilisé est l'ANOVA à 5% , ce test a montré qu'il n'y a pas d'effets combinés temps- concentration (dilution) sur la croissance de diatomées (concentration cellulaire) ; par contre il y a un effet individuelle du temps et de la concentration (deux facteurs) sur la concentration cellulaire.

Pour le temps  $P = 0,000133$ , est inférieur à  $0,05$  ; on peut dire qu'il y a un risque de 5% de se tromper que la concentration cellulaire varie en fonction du temps, donc le facteur temps a un effet sur la variabilité de la concentration cellulaire.

Pour le facteur concentration (dilution)  $P = 0,00000$ , est inférieur à  $0,05$  (très significatif), le test montre qu'il y a un effet significatif de la dilution sur la concentration cellulaire.

**Tableau 02 :** Résultats du test toxicologique de l'insecticide chlorpyrifos 480g/L (Pyricol) sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/ml**)

Temps Chlorpyrifos	0h	24h	48h	72h
Témoin	400X10 <sup>3</sup>	606 X10 <sup>3</sup>	583 X10 <sup>3</sup>	456 X10 <sup>3</sup>
C <sub>1/100</sub>	400X10 <sup>3</sup>	720 X10 <sup>3</sup>	573 X10 <sup>3</sup>	443 X10 <sup>3</sup>
C <sub>1/1000</sub>	400X10 <sup>3</sup>	950 X10 <sup>3</sup>	690X10 <sup>3</sup>	540X10 <sup>3</sup>

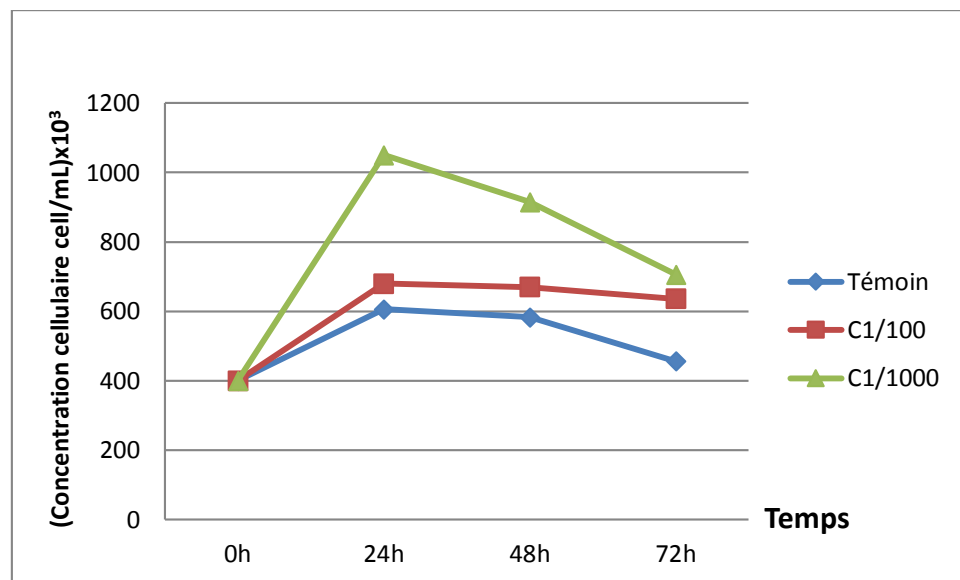


**Figure18:** Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du chlorpyriphos-éthyl. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

L'utilisation de l'insecticide Chlorpyriphos-ethyl, a permet d'enregistrer la variation de la concentration cellulaire en fonction du temps, représentée par le graphique de la figure : 18, l'analyse statistique a permet de déduire aucun effet significatif du traitement réalisé pour le temps et la dilution, étant donné que le  $P_{\text{Temps}}=0.095$ , et  $P_{\text{Dilution}}=0.05$ , est supérieur au niveau de signification seuil  $\alpha=0.05$ .

**Tableau 03 :** Résultats du test toxicologique du mélange **Glyphosate/Chlorpyriphos-ethyl** sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

Le mélange \ Temps	0h	24h	48h	72h
Témoin	400X10 <sup>3</sup>	606 X10 <sup>3</sup>	583 X10 <sup>3</sup>	456 X10 <sup>3</sup>
C <sub>1/100</sub>	400X10 <sup>3</sup>	680 X10 <sup>3</sup>	670 X10 <sup>3</sup>	636 X10 <sup>3</sup>
C <sub>1/1000</sub>	400X10 <sup>3</sup>	1050 X10 <sup>3</sup>	915 X10 <sup>3</sup>	706 X10 <sup>3</sup>



**Figure19 :** Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate(Herbasate)+ Chlopyriphos-éthyl(Pyrical). Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

Le mélange des deux produits chimiques l'insecticide/Herbicide, a permis d'enregistrer la variation de la concentration cellulaire en fonction du temps, représentée par le graphique de la figure : 19, l'analyse statistique a permis de déduire aucun effet significatif du traitement réalisé, étant donné que  $P_{\text{Temps}} = 0.098$ , et  $P_{\text{Dilution}} = 0.50$ , est supérieur au niveau de signification seuil  $\alpha = 0.05$ .

✓ **Avril 2015 :**

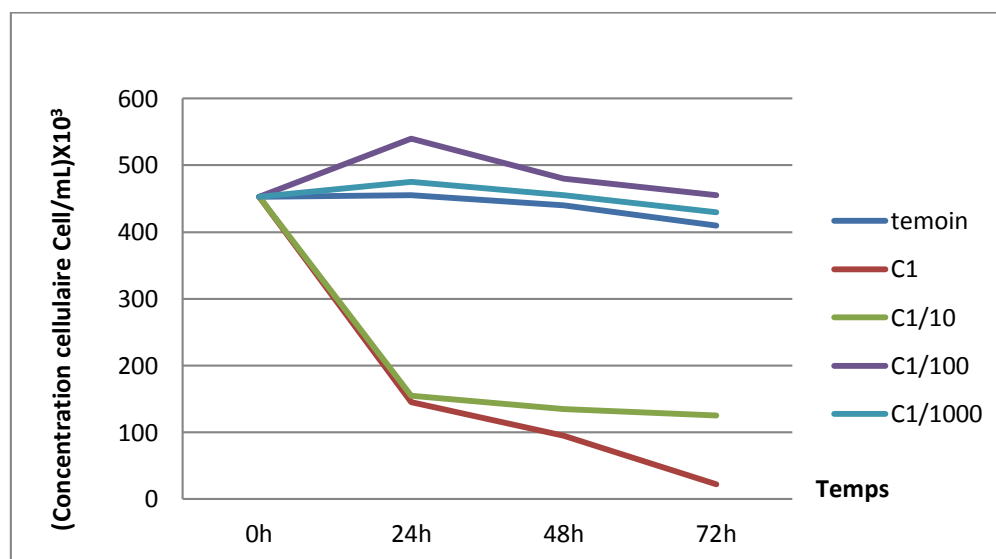
- Le prélèvement : 04/04/2015.
- Le comptage de cellules de diatomées du témoin et lancement du test : 05/04/2015.

✓ La concentration cellulaire du témoin = **(453 mm<sup>3</sup>X10<sup>3</sup>) cell / ml (0h)**.

- Le comptage des cellules de diatomées de tous les microcosmes : 06/04/2015(24h), 07/04/2015 (48h), 08/04/2015 (72h).

**Tableau 04 :** Résultats du test toxicologique de l’herbicide (**Glyphosate 360g/L**) sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/mL**).

Glyphosate \ Temps	0h	24h	48h	72h
<b>Témoin</b>	453 X10 <sup>3</sup>	455 X10 <sup>3</sup>	440 X10 <sup>3</sup>	410 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1</sub>= 360 g/L</b>	453 X10 <sup>3</sup>	145 X10 <sup>3</sup>	95X10 <sup>3</sup>	22 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/10</sub></b>	453 X10 <sup>3</sup>	155 X10 <sup>3</sup>	135X10 <sup>3</sup>	125 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/100</sub></b>	453 X10 <sup>3</sup>	540 X10 <sup>3</sup>	480X10 <sup>3</sup>	455X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/1000</sub></b>	453 X10 <sup>3</sup>	475X10 <sup>3</sup>	455X10 <sup>3</sup>	430X10 <sup>3</sup>

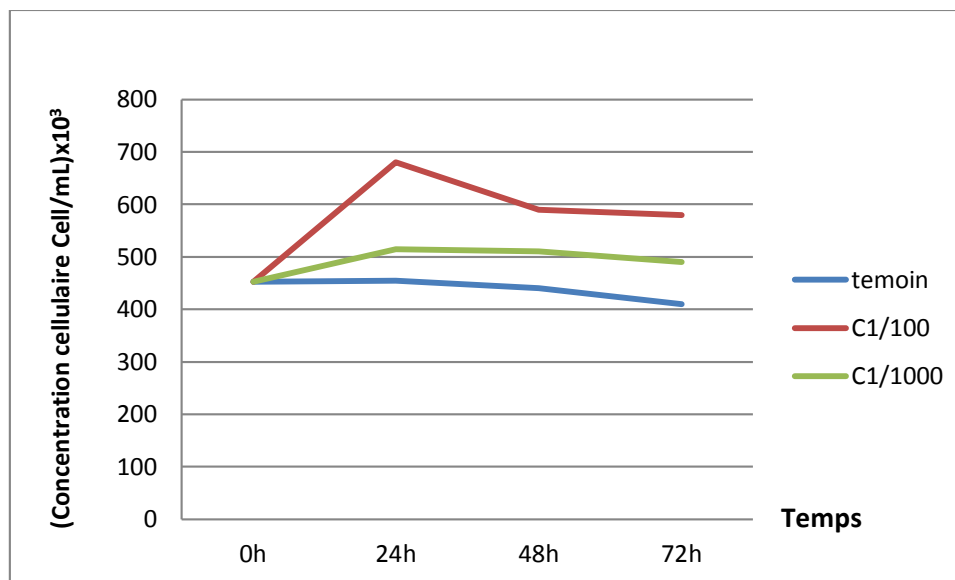


**Figure 20 :** Evolution de la population e diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

Le test de l'ANOVA est significatif pour les deux facteurs (temps et dilution) car P est inférieur à 0.05,  $P_{\text{Temps}} = 0.028$ , et  $P_{\text{Dilution}} = 0.00$ .

**Tableau 05 :** Résultats du test toxicologique de l'insecticide **chlorpyrifos 480g/L** sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/ml**)

Temps \ Chlorpyrifos	0h	24h	48h	72h
Témoin	453 X10 <sup>3</sup>	455X10 <sup>3</sup>	440X10 <sup>3</sup>	410X10 <sup>3</sup>
C <sub>1/100</sub>	453 X10 <sup>3</sup>	680X10 <sup>3</sup>	590X10 <sup>3</sup>	580X10 <sup>3</sup>
C <sub>1/1000</sub>	453 X10 <sup>3</sup>	515X10 <sup>3</sup>	510X10 <sup>3</sup>	490X10 <sup>3</sup>



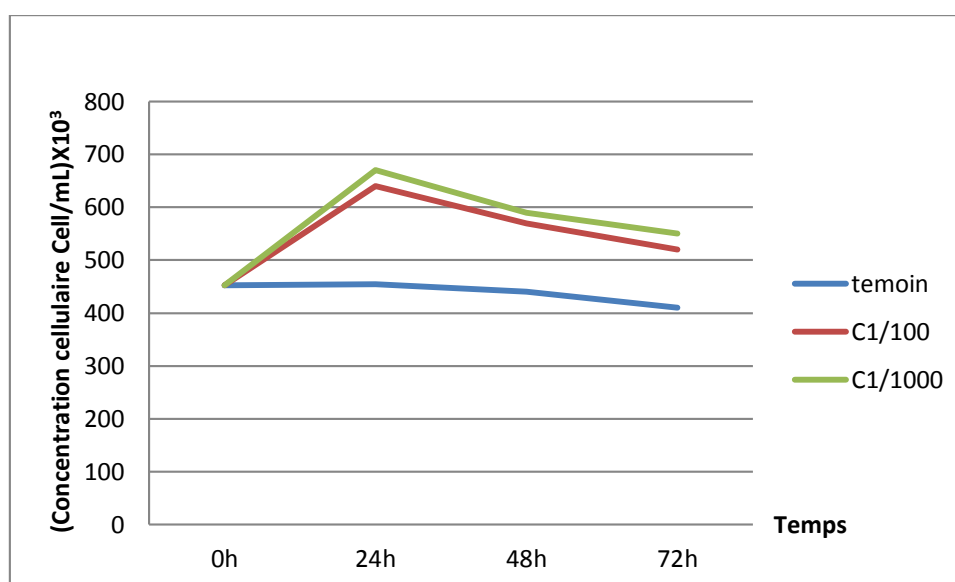
**Figure21:** Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du chlorpyrifos-éthyl. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

Le test de l'ANOVA est significatif seulement pour le facteur (dilution) car P est inférieur à 0.05,  $P_{\text{Dilution}} = 0.00225$  et non significatif pour le facteur temps car P est supérieur à 0.05,  $P_{\text{Temps}} = 0.113$ .

**Tableau 06 :**

Résultats du test toxicologique du mélange **Glyphosate/Chlorpyriphos-ethyl** sur la croissance des diatomées issue du milieu lotique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

Le mélange \ Temps	0h	24h	48h	72h
<b>Témoin</b>	453 X10 <sup>3</sup>	455X10 <sup>3</sup>	440X10 <sup>3</sup>	410X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1</sub>/100</b>	453 X10 <sup>3</sup>	640X10 <sup>3</sup>	570X10 <sup>3</sup>	520X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1</sub>/1000</b>	453 X10 <sup>3</sup>	670X10 <sup>3</sup>	590X10 <sup>3</sup>	550X10 <sup>3</sup>



**Figure 22 :** Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate(Herbasate)+ Chlopyriphos-éthyl(Pyricol). Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

Le test de l'ANOVA est significatif pour les deux facteurs (temps et dilution) car P est inférieur à 0.05,  $P_{\text{Temps}} = 0.01826$ , et  $P_{\text{Dilution}}=0.0017$ .

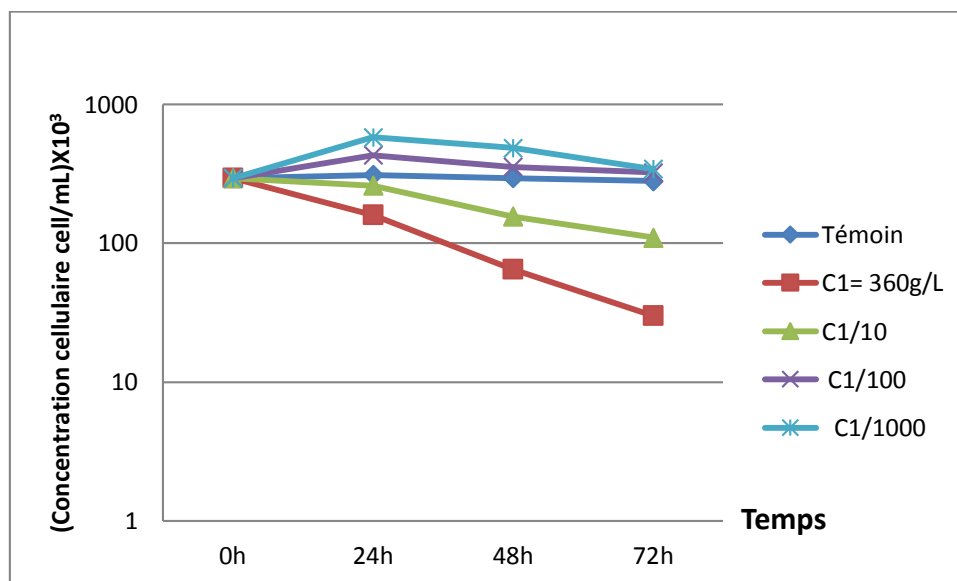
**I-2.2.Site marais Redjla (Ecosysteme lentique) :**

✓ **Octobre 2014 :**

- Le prélèvement : 19/10/2014
- Le comptage des cellules de diatomées du témoin et lancement du test : 20/10/2014
- ✓ La concentration cellulaire du témoin = **(295mm<sup>3</sup>X10<sup>3</sup>)cell / ml**
- Comptage des cellules de diatomées de tous les microcosmes : 21/10/2014 (24H), 22/10/2014 (48H), 23/10/2014 (72H).

**Tableau 07 :** Résultats du test toxicogique de l’herbicide **Glyphosate 360g/L** sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

<b>Temps</b> <b>Glyphosate</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>Témoin</b>	295 X10 <sup>3</sup>	310 X10 <sup>3</sup>	295 X10 <sup>3</sup>	280 X 10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1</sub>= 360g/L</b>	295 X10 <sup>3</sup>	160 X10 <sup>3</sup>	65 X10 <sup>3</sup>	30 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/10</sub></b>	295 X10 <sup>3</sup>	260 X10 <sup>3</sup>	156 X10 <sup>3</sup>	110 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/100</sub></b>	295 X10 <sup>3</sup>	430 X10 <sup>3</sup>	355 X10 <sup>3</sup>	323 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/1000</sub></b>	295 X10 <sup>3</sup>	580 X10 <sup>3</sup>	485 X10 <sup>3</sup>	343 X10 <sup>3</sup>



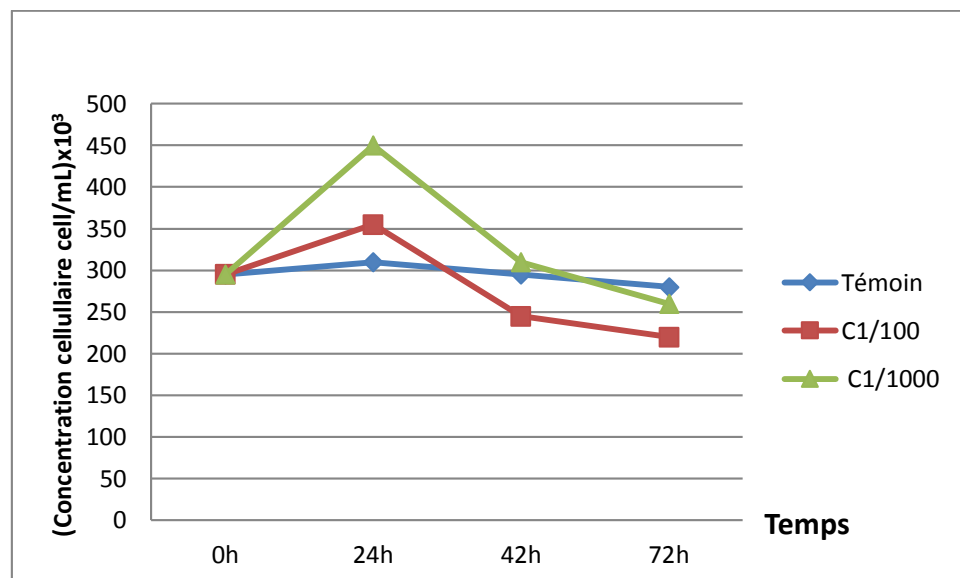
**Figure 23:** Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml



L'utilisation de l'herbicide glyphosate a permis d'enregistrer la variation de la concentration cellulaire en fonction du temps, représentée par le graphique de la figure : 19, l'analyse statistique a permis de déduire un effet significatif du traitement réalisé, les résultats de l'application de ce test étant donnés que la  $P_{\text{Temps}} = 0.0014$ , et  $P_{\text{Dilution}} = 0.000032$  est inférieur au niveau de signification seuil  $\alpha = 0,05$ .

**Tableau 08 :** Résultats du test toxicologique de l'insecticide **Chlorpyrifos 480g/L** sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

Temps Chlorpyrifos	0h	24h	48h	72h
Témoin	295 X10 <sup>3</sup>	310 X10 <sup>3</sup>	295 X10 <sup>3</sup>	280 X 10 <sup>3</sup>
C <sub>1/100</sub>	295 X10 <sup>3</sup>	355 X10 <sup>3</sup>	245 X10 <sup>3</sup>	220 X10 <sup>3</sup>
C <sub>1/1000</sub>	295 X10 <sup>3</sup>	450 X10 <sup>3</sup>	310 X10 <sup>3</sup>	260 X10 <sup>3</sup>

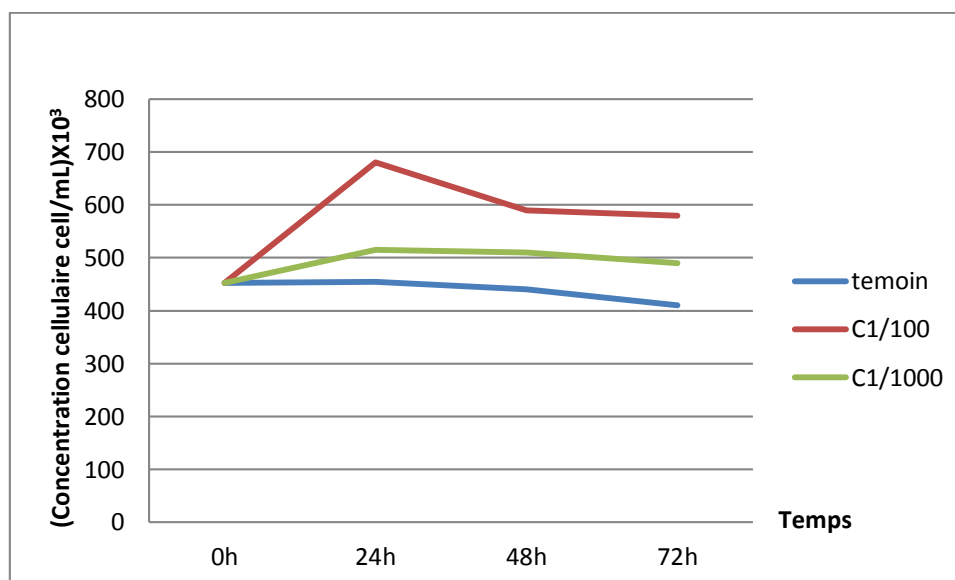


**Figure 24 :** Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du chlorpyrifos-éthyl. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

L'utilisation de l'insecticide Chlorpyrifos-ethyl, a permet d'enregistrer la variation de la concentration cellulaire en fonction du temps représentée par le graphique de la figure : 21, l'analyse statistique a permet de déduire aucun effet significatif du traitement réalisé, étant donné que  $P_{\text{Temps}}=0.061$ , et  $P_{\text{Dilution}}=0.268$ , est supérieur au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ .

**Tableau 09 :** Résultats du test toxicologique du mélange **Glyphosate/Chlorpyrifos** sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique. (**Concentration cellulaire cell/ml**).

TempsLe mélange	0h	24h	48h	72h
<b>Témoin</b>	295 X10 <sup>3</sup>	310 X10 <sup>3</sup>	295 X10 <sup>3</sup>	280 X 10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/100</sub></b>	295 X10 <sup>3</sup>	515 X10 <sup>3</sup>	435 X 10 <sup>3</sup>	405 X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/1000</sub></b>	295 X10 <sup>3</sup>	610 X10 <sup>3</sup>	466 X10 <sup>3</sup>	420 X10 <sup>3</sup>



**Figure25 :** Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate(Herbasate)+ Chlopyrifos-éthyl(Pyricol). Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

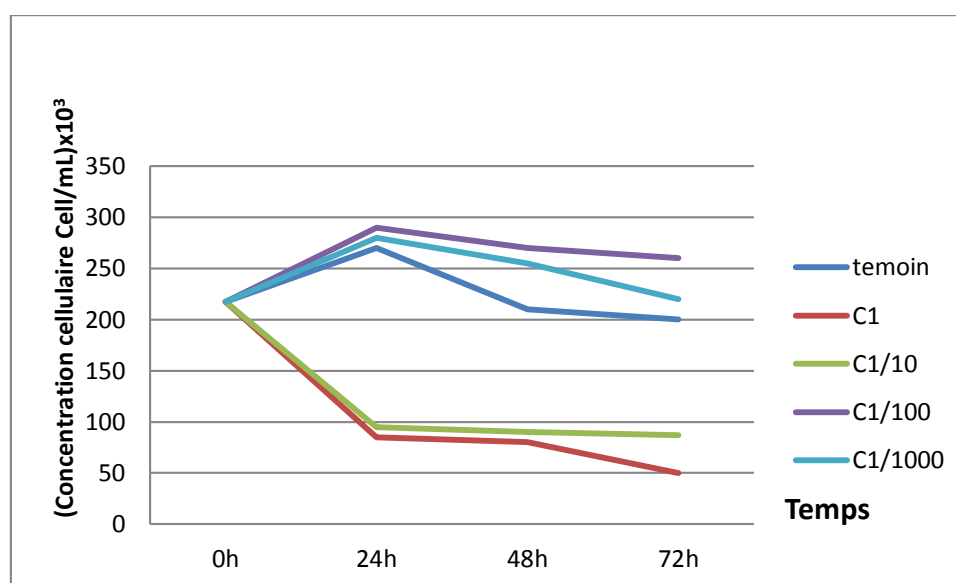
Le mélange des deux produits chimiques l'insecticide/Herbicide, a permis d'enregistrer la variation de la concentration cellulaire en fonction du temps, représentée par le graphique de la figure :21, l'analyse statistique a permis de déduire qu'il y a un effet de dilution qui est significatif, étant donné que  $P_{\text{Dilution}}=0.0091$  est inférieur au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , par contre avec le facteur temps le  $P_{\text{Temps}}=0.073$  est supérieur au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , donc il n'y a pas d'effets significatifs sur la concentration cellulaire.

✓ **Avril 2015 :**

- Le prélèvement : 11/04/2015.
- Le comptage de la concentration cellulaire du témoin et lancement du test : 12/04/2015.
- ✓ La concentration cellulaire du témoin = **(217,5mm<sup>3</sup>X10<sup>3</sup>) cell / ml (0h)**.
- Le comptage des cellules de diatomées de tous les microcosmes : 13/04/2015 (24h), 14/04/2015 (48h), 15/04/2015 (72h).

**Tableau 10 :** Résultats du test toxicologique de l'herbicide **Glyphosate 360g/L** sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

<b>Temps</b> <b>Glyphosate</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>Témoin</b>	217,5 X10 <sup>3</sup>	270X10 <sup>3</sup>	210X10 <sup>3</sup>	200X 10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1</sub>= 360g/L</b>	217,5 X10 <sup>3</sup>	85X10 <sup>3</sup>	80X10 <sup>3</sup>	50X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/10</sub></b>	217,5 X10 <sup>3</sup>	95X10 <sup>3</sup>	90X10 <sup>3</sup>	87X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/100</sub></b>	217,5 X10 <sup>3</sup>	290X10 <sup>3</sup>	270X10 <sup>3</sup>	260X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/1000</sub></b>	217,5 X10 <sup>3</sup>	280X10 <sup>3</sup>	255X10 <sup>3</sup>	220X10 <sup>3</sup>

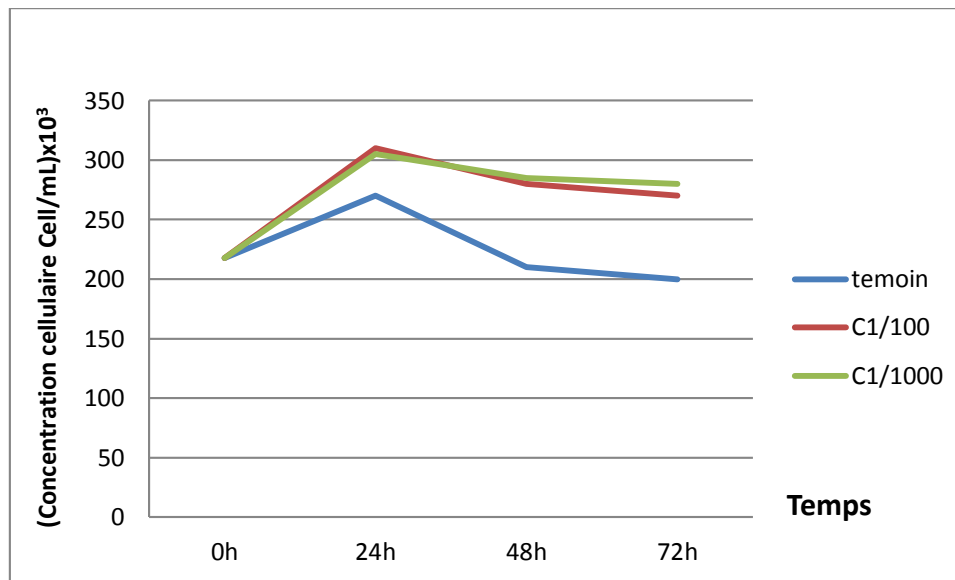


**Figure 26:** Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

Il y'a un effet sur la concentration cellulaire, le test de l'ANOVA est significatif pour les deux facteurs (temps/dilution) car P est inférieur à 0.05 ( $P_{\text{Temps}} = 0.007817$ , et  $P_{\text{Dilution}} = 0.0000$ ).

**Tableau 11 :** Résultats du test toxicologique de l'insecticide **Chlorpyrifos 480g/L** sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique (**Concentration cellulaire cell/ml**).

Temps Chlorpyrifos	0h	24h	48h	72h
<b>Témoin</b>	217,5 X10 <sup>3</sup>	270X10 <sup>3</sup>	210X10 <sup>3</sup>	200X 10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/100</sub></b>	217,5 X10 <sup>3</sup>	310X10 <sup>3</sup>	280X10 <sup>3</sup>	270X10 <sup>3</sup>
<b>C<sub>1/1000</sub></b>	217,5 X10 <sup>3</sup>	305X10 <sup>3</sup>	285X10 <sup>3</sup>	280X10 <sup>3</sup>

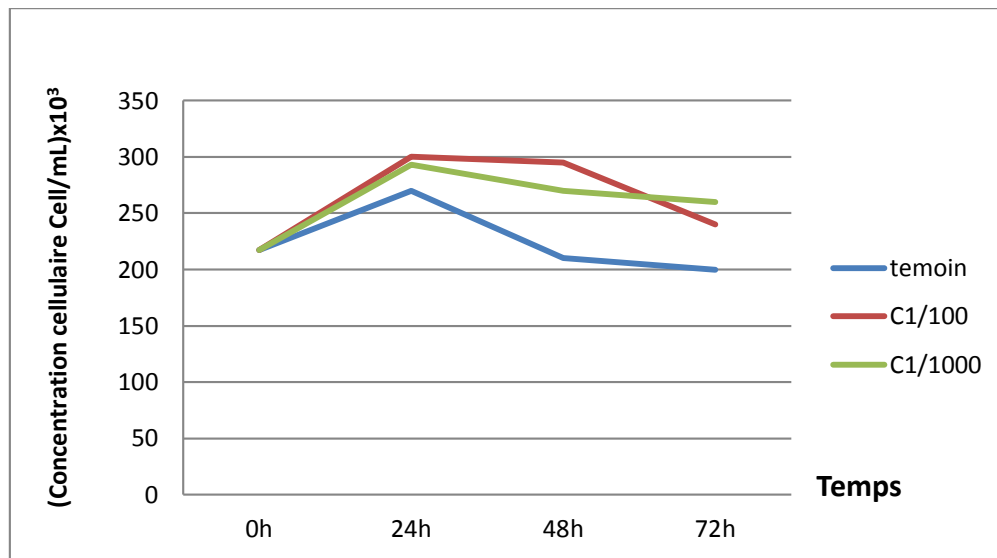


**Figure27 :** Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du chlorpyriphos-éthyl. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

Le test de l'ANOVA est significatif pour les deux facteurs (temps/dilution) car P est inférieur à 0.05.  $P_{\text{Temps}} = 0.0249$ , et  $P_{\text{Dilution}} = 0.0060$ .

**Tableau 12 :** Résultats du test toxicologique du mélange Glyphosate/Chlorpyrifos sur la croissance des diatomées issue du milieu lentique. (Concentration cellulaire cell/ml).

Temps Le mélange	0h	24h	48h	72h
Témoin	217,5 X10 <sup>3</sup>	270X10 <sup>3</sup>	210X10 <sup>3</sup>	200X 10 <sup>3</sup>
C <sub>1/100</sub>	217,5 X10 <sup>3</sup>	300X10 <sup>3</sup>	295X 10 <sup>3</sup>	240X10 <sup>3</sup>
C <sub>1/1000</sub>	217,5 X10 <sup>3</sup>	293X10 <sup>3</sup>	270X10 <sup>3</sup>	260X10 <sup>3</sup>



**Figure28** : Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate(Herbasate)+ Chlopyriphos-éthyl(Pyrical). Résultats exprimés en nombre de cellule/ml

Le test de l'ANOVA est significatif pour les deux facteurs (Temps/dilution) car P est inférieur à 0.05,  $P_{\text{Temps}}=0.046$ , et  $P_{\text{Dilution}}=0.038$ .

### I.3. Effet du glyphosate sur la croissance des diatomées benthiques et la teneur des nutriments (Nitrate / Phosphate) du marais Radjla:

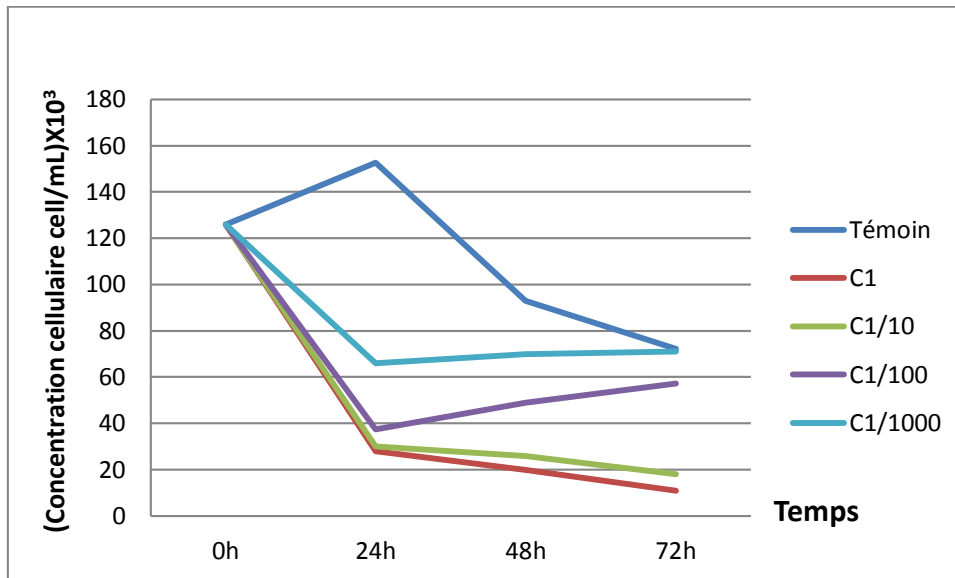
- Le prélèvement : 30/05/2015.
- Le comptage de la concentration cellulaire du témoin et lancement du test : 31/05/2015.
- ✓ La concentration cellulaire du témoin = (126mm<sup>3</sup>X10<sup>3</sup>) cell / ml (0h)/ pH= 7.07
- Le comptage des cellules de diatomées de tous les microcosmes : 01/05/2015 (24h), 02/05/2015 (48h), 03/04/2015 (72h).

**Tableau 13 :** Résultats du test toxicologique de l'herbicide **Glyphosate 360g/L** sur la croissance des diatomées benthique et la teneur des nutriments (Nitrate / Phosphate) issue du milieu lentique :

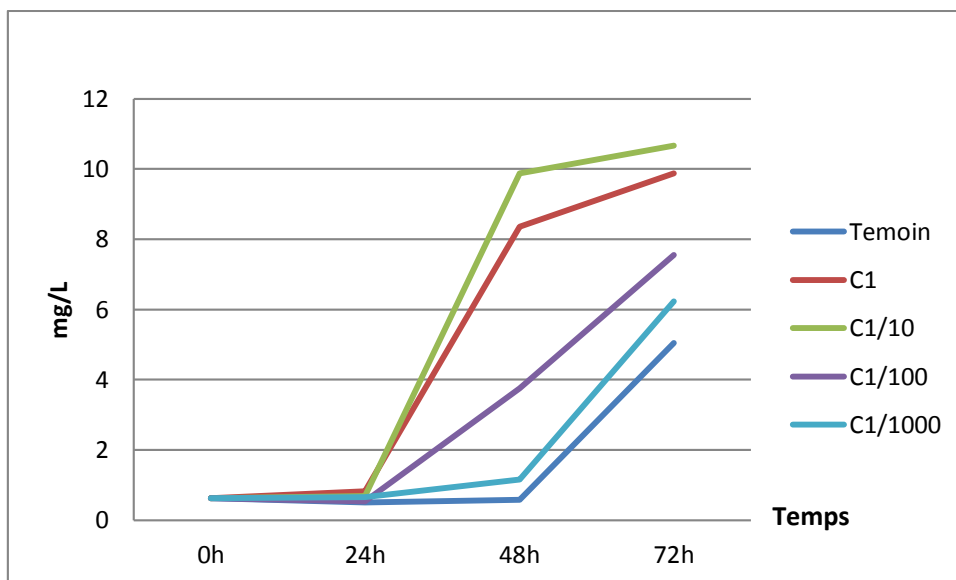
Temps		0h	24h	48h	72h
Glyphosate					
Témoin	Concentration cellulaire	126 X10 <sup>3</sup>	152,66X10 <sup>3</sup>	93X10 <sup>3</sup>	72,33X 10 <sup>3</sup>
	pH	7.07	7.73	7.48	7.32
	NO <sup>3-</sup>	0.62	0.513	0.589	5.05
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.034	0.094	0.780	0.113
C <sub>1</sub> =360g/L	Concentration cellulaire	126 X10 <sup>3</sup>	28X10 <sup>3</sup>	20X10 <sup>3</sup>	11X10 <sup>3</sup>
	pH	7.07	4.67	7.52	7.48
	NO <sup>3-</sup>	0.62	0.83	8.35	9.88
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.034	0.078	0.788	0.065
C <sub>1/10</sub>	Concentration cellulaire	126 X10 <sup>3</sup>	30X10 <sup>3</sup>	26X10 <sup>3</sup>	18X10 <sup>3</sup>
	pH	7.07	4.77	7.07	7.09
	NO <sup>3-</sup>	0.62	0.686	9.87	10.66
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.034	0.083	0.782	0.086
C <sub>1/100</sub>	Concentration cellulaire	126 X10 <sup>3</sup>	37.33X10 <sup>3</sup>	49X10 <sup>3</sup>	57.33X10 <sup>3</sup>
	pH	7.07	5.58	7.29	7.17
	NO <sup>3-</sup>	0.62	0.536	3.76	7.56
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.034	0.217	0.891	0.208
C <sub>1/1000</sub>	Concentration cellulaire	126 X10 <sup>3</sup>	66X10 <sup>3</sup>	70X10 <sup>3</sup>	71.66X10 <sup>3</sup>
	pH	7.07	6.08	7.1	7.4
	NO <sup>3-</sup>	0.62	0.655	1.156	6.23
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.034	0.223	0.848	0.259

✓ Concentration cellulaire : cell/mL

✓ la teneur des nutriments : Résultat exprimés en mg/L de NO<sup>3-</sup> et PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

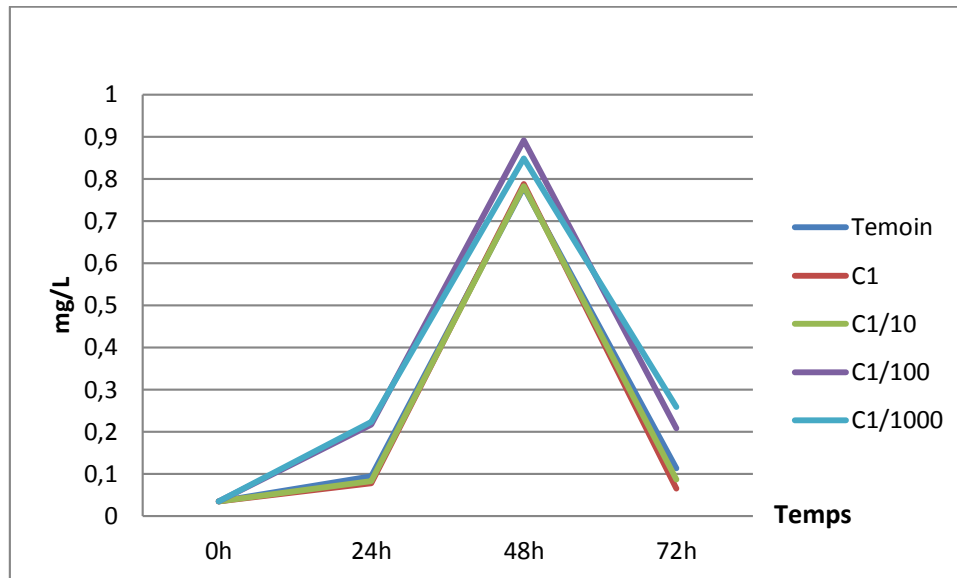


**Figure 29:** Evolution de la population de diatomées dans les microcosmes en présence du glyphosate. Résultats exprimés en nombre de cellule/ml



**Figure 30:** Cinétique de l'évolution de la teneur en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) en présence des différentes concentrations du glyphosate ajoutés dans les microcosmes (Résultats exprimés en mg/L de  $\text{NO}_3^-$ )





**Figure 31:** Cinétique de l'évolution de la teneur en phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en présence des différentes concentrations du glyphosate ajoutés dans les microcosmes (Résultats exprimés en mg/L de  $\text{PO}_4^{3-}$ )

#### I-4 Estimation de la biomasse végétale planctonique :

**Tableau 14 :** Résultats du dosage de la chlorophylle *a* et de l'indice phéopigments par spectrométrie d'absorption moléculaire selon la méthode SCOR-UNESCO. (Rodier et al., 2009)

Sites Résultats	Oued mencha	El Radjla
(C) $\mu\text{g/L}$	5.5	12.78
(ID)	0.93	1.016
(P)%	49.01	61.18
(C <sub>a</sub> ) $\mu\text{g/L}$	2.69	7.81
(P <sub>a</sub> ) $\mu\text{g/L}$	2.81	4.97

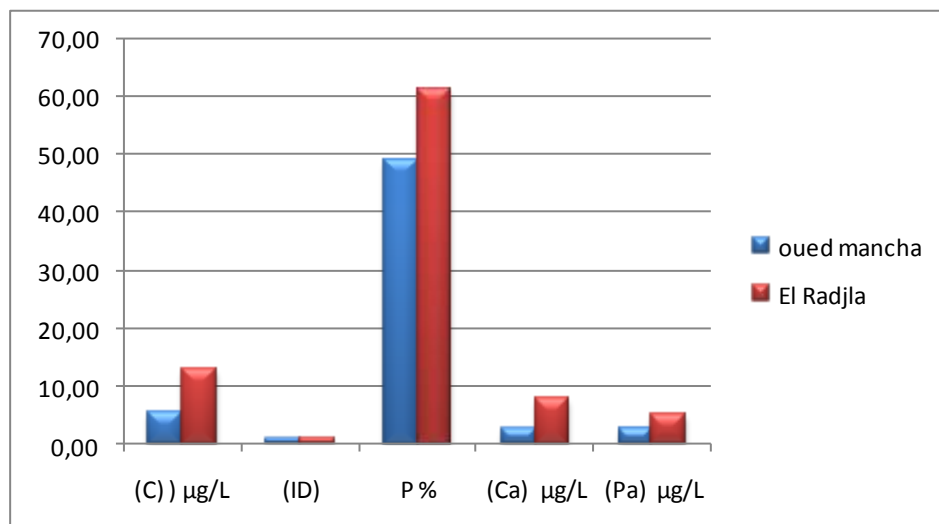
(C)  $\mu\text{g/L}$ : La concentration brute en chlorophylle *a*

(ID): L'indice de dégradation de la chlorophylle.

(P)%: Le pourcentage de chlorophylle *a* dans l'échantillon.

(C<sub>a</sub>)  $\mu\text{g/L}$ : La concentration en chlorophylle *a*.

(P<sub>a</sub>)  $\mu\text{g/L}$ : La concentration en indice phéopigments.



**Figure 32:** représentation graphique des résultats du dosage de la chlorophylle *a*.

## II. Discussion :

### II.1. Effet du glyphosate 360g/L :

Les courbes de croissance des diatomées benthiques, soumises à divers taux de contamination au glyphosate sont présentées à la figure : 17 et 20 pour le site « Oued mencha » et à la figure : 23 et 26 pour le site « El radjla ».

Les cultures exposées à des faibles concentrations du glyphosate ( $C_{1/100}$ ,  $C_{1/1000}$ ), affichent un taux de croissance moyen légèrement supérieur à celui du témoin, ces deux cultures poursuivent leur activité de croissance après le début de l'expérimentation (0 à 24h).

L'impact du polluant est noté à la concentration  $C_1$  et  $C_{1/10}$ , aux doses les plus élevées ou les cultures ont exposée au glyphosate sans dilution et avec dilution de 1/10, la concentration cellulaire est réduite, avec une augmentation importante du nombre d'algues vidées de leur contenu cellulaire (cellules fantômes) et une inhibition de la locomotion cellulaire a été observée.

Ce résultat, reste cependant sous-estimé, puisqu'une diatomée morte ou moribonde (observée au microscope) ne correspond pas toujours à une cellule totalement vide, sans contenu cellulaire.

De plus, l'observation de certaines cellules met en évidence une nette détérioration du chloroplaste.

Donc, les cultures exposées à des faibles concentrations du glyphosate ( $C_{1/100}$ ,  $C_{1/1000}$ ) ne présentent aucune inhibition de croissance significative, c'est seulement en présence du glyphosate en concentration élevés ( $C_1$ ,  $C_{1/10}$ ) que la croissance est fortement inhibée.

La présence du glyphosate en concentration faible ( $C_{1/100}$ ,  $C_{1/1000}$ ) dans les microcosmes produit une stimulation de la croissance visible dès le 1<sup>er</sup> jour de culture (après 24h), et qui diminue ensuite. A l'opposé l'augmentation de la concentration du glyphosate ( $C_1$ ,  $C_{1/10}$ ), se traduit par une inhibition de la croissance des diatomées, surtout importante à 72h.

### II.2.Effet du Chlorpyriphos-éthyl 480g/L :

Les courbes de croissance des diatomées benthiques, soumises à divers taux de contamination au chlorpyriphos-éthyl sont présentées à la figure 18 et 21, pour le site « oued mancha » et à la figure 24 et 27 pour le site « al radjla ».

L'ajout du chlorpyriphos-éthyl en dilution (1/100, 1/1000) produit une stimulation de la croissance des diatomées dans le 1<sup>er</sup> jour de culture (après 24h) et qui se diminue ensuite.

### **II.3. Effet du mélange Chlorpyriphos-éthyl 480g/L (pyrical) + Glyphosate 360g/L (herbasate) :**

Les courbes de croissance des diatomées benthiques, soumises à divers taux de contamination au chlorpyriphos-éthyl+ glyphosate, sont présentées à la figure : 19 et 22, pour le site « oued mancha » et à la figure : 25 et 28 pour le site « al radjla ».

La présence dans les microcosmes du chlorpyriphos-éthyl et du glyphosate en mélange et en dilution de (1/100, 1/1000), augmente considérablement la concentration cellulaire des diatomées. Cette stimulation visible dès le 1<sup>er</sup> jour (après 24h) et qui se diminue ensuite.

L'addition de contaminants aux diatomées en microcosmes montre d'une manière générale quel que soit le contaminant utilisé : chlorpyriphos-éthyl ou le glyphosate ajoutés isolément ou en mélange, un accroissement de la concentration cellulaire des diatomées est également observé en présence de chlorpyriphos-éthyl en dilution (1/100,1/1000), du glyphosate en dilution (1/100,1/1000), ou du mélange chlorpyriphos-éthyl +glyphosate en dilution (1/100, 1/1000).

Lors de l'exposition à une forte concentration en glyphosate ( $C_1, C_{1/10}$ ) la diminution de la concentration cellulaire est visible dès le 1<sup>er</sup> jour, s'accroît avec la durée du test.

Ces résultats montrent que les différents contaminants utilisés modifient la concentration cellulaire des diatomées dans les différents microcosmes.

L'examen de l'évolution de la concentration cellulaire des diatomées montre que, à faibles concentrations, le chlorpyriphos-éthyl, le glyphosate, stimulent la croissance des diatomées. Le mélange glyphosate + chlorpyriphos-éthyl induit également une très nette stimulation de la croissance des diatomées.

Ces résultats montrent que les réponses d'une communauté ne sont pas dépendantes de la sensibilité d'un seul des organismes. Elles résultent de la combinaison des différentes sensibilités à un composé biologiquement actif. De nombreux exemples ont été rapportés tant pour des microcosmes que pour des mésocosmes. Ainsi, en eau douce, la toxicité du chlorpyriphos vis-à-vis

du zooplancton s'accompagne d'une augmentation du phytoplancton (Hurlbert *et al.*, 1972 ; Papstet Boyer, 1980 ; Brocket *et al.*, 1992 ; Fleeger *et al.*, 2003 ; Van Wijngaarden *et al.*, 2005).

Cet effet est retrouvé lorsque deux insecticides (chlorpyrifos + lindane) ou un herbicide (atrazine) + un insecticide (lindane) ou un seul insecticide (cyperméthrine) sont ajoutés au microcosme (Van denBrink *et al.*, 2002 ; Friberg-Jensen *et al.*, 2003 ; Van den Brink *et al.*, 2009).

Pour rendre compte de la stimulation de croissance des diatomées observée en présence de faibles concentrations de contaminants, on peut invoquer **un phénomène d'hormèse** qui permet une accélération du taux de croissance lorsque le stress imposé est relativement faible (Stebbing, 1998b). Cependant, en présence du mélange des deux pesticides, bien qu'utilisés tous deux à faible concentration, une forte stimulation de la croissance des diatomées exposées.

Une légère diminution de la concentration cellulaire des diatomées après les 48h d'exposition à des faibles doses du contaminant (glyphosate, chlorpyrifos, mélange) a été observé, ces résultats peuvent s'expliquer par : l'existence de certaines espèces sensibles et âgées (cellules moribondes). Plusieurs explications sont possibles, au cours des premières heures de la culture, la biodisponibilité du contaminant par unité cellulaire est élevée et l'activité métabolique est intense. Cela permet une absorption importante du contaminant, rendant les cellules plus vulnérables. En revanche, en fin de culture, au cours de la phase plateau, les cellules présentent une activité métabolique réduite et assimilent peu le contaminant (Veldhuis *et al.*, 2011).

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que la repense des diatomées benthique du milieu lotique soumise à divers taux de contamination en pesticides est identique à celle du milieu lentique.

#### **II.4. Effet du glyphosate sur la croissance des diatomées et la teneur des nutriments du marais Radjla:**

##### **II.4.1. Action sur la croissance des diatomées :**

Les courbes de croissance des diatomées benthiques du marais Radjla, soumises à divers taux de contamination au glyphosate sont présentées à la figure : 29.

Les cultures exposées à des faibles concentrations du glyphosate ( $C_{1/100}$ ,  $C_{1/1000}$ ), poursuivent leur activité de croissance après les 24h.

L'effet du polluant est noté à la concentration  $C_1$  et  $C_{1/10}$ , aux doses les plus élevées ou les cultures sont exposées au glyphosate sans dilution et avec dilution de 1/10, la concentration cellulaire est réduite, avec une augmentation importante du nombre d'algues vidées de leur contenu cellulaire (cellules fantômes) et une inhibition de la locomotion cellulaire a été observée.

Par ailleurs, il est important de noter que la repense des diatomées aux pesticides n'est pas toujours la même. En effet, de nombreux paramètres peuvent interférer dans le degré de réaction de ces micro-organismes, voir même masquer leurs repenses vis-à-vis des pesticides. En d'autre terme, il nous semble qu'il y' a des interférences au sein des communautés algales, et le comportement des diatomées qui peuvent affecter la repense de ces micro-algues aux pesticides. La compétition et les relations d'interdépendance entre les différentes espèces influent donc largement sur la repense aux différentes doses.

## **II.4.2. Action sur la teneur des nutriments (Nitrate /Phosphate) :**

### **II.4.2.1. Action sur la teneur du nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) :**

Les courbes qui montrent la cinétique de l'évolution de la teneur en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) en présence des différentes concentrations du glyphosate ajoutés dans les microcosmes sont présentées à la figure : 30. Nous avons constaté qu'il y'a une évolution au cours des 72h, de la teneur en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ).

### **II.4.2.2. Action sur la teneur du phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) :**

Les courbes qui montrent la cinétique de l'évolution de la teneur en phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en présence des différentes concentrations du glyphosate ajoutés dans les microcosmes sont présentées à la figure : 31.

Nous avons constaté qu'il y'a une évolution au cours des 48h, qui se diminue ensuite.

En effet, les résultats de notre expérience indiquent que le glyphosate a une influence positive potentiellement importante en faible concentration ( $C_1, C_{1/10}$ ) sur la structure de la communauté phytoplanctonique algale et particulièrement les diatomées dans des milieux échantillonnés de même le glyphosate est une source potentielle de nutriments importants N et P pour le système lentique et lotique échantillonnés. (Saxton et al ., 2011).

D'autre part, **Lin et al., 2005** rapportent que les effets des pesticides sur les communautés de diatomées varient en fonction de la concentration en nutriments dans le milieu. Il a ainsi été montré que des carences en azote et en phosphore pouvaient augmenter la sensibilité des algues.

Dans notre cas le milieu est riche en éléments nutritifs comme le montre les teneurs en ( $\text{NO}_3^-$ ) et les teneurs en ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) enregistrées dans le tableau (13) néanmoins la consommation des nutriments dans le temps a rendu les diatomées beaucoup plus sensibles aux concentrations de pesticides dans le milieu.

# *Conclusion*



## **Conclusion**

L'objectif de ce travail était, d'étudier l'impact des pesticides sur la croissance des diatomées benthiques. Des communautés naturelles de diatomées provenant de deux milieux ; l'un est un écosystème lotique et l'autre lentique, ces communautés ont été exposés en microcosmes à deux pesticides testés seul et en mélange (glyphosate 360g/L, chlorpyriphos-éthyl 480g/L) à plusieurs concentrations pendant une durée de 72h.

En effet, l'analyse des données obtenues en microcosmes portant sur l'effet des contaminants chimiques sur la croissance des diatomées benthiques, nous a permis de déterminer que :

La croissance des diatomées est affectée par une contamination au glyphosate 360g/L à des fortes concentrations ( $C_1$  sans dilution) et  $C_{1/10}$ , la tolérance des diatomées diminue rapidement et se manifeste par une réduction du taux de croissance et une mortalité cellulaire.

Les cultures exposées à des faibles concentrations du glyphosate ( $C_{1/100}$ ,  $C_{1/1000}$ ), affichent un taux de croissance moyen légèrement supérieur à celui du témoin, ces deux cultures poursuivent leur activité de croissance après le début de l'expérimentation (0h à 24h). Donc, les cultures exposées à des faibles concentrations du glyphosate ( $C_{1/100}$ ,  $C_{1/1000}$ ), ne présentent aucune inhibition de croissance significative, c'est seulement en présence des dilutions  $C_1$  et  $C_{1/10}$  de l'herbicide que la croissance est fortement inhibée.

La présence dans les microcosmes du chlorpyriphos-éthyl avec dilution de (1/100, 1/1000), augmente considérablement la concentration cellulaire des diatomées. Cette stimulation visible dès le 1er jour (après 24h) et qui diminue par la suite peut être expliquée par le manque d'effet inhibiteur pendant ce temps. Des résultats similaires sont enregistrés pour le mélange des deux pesticides (chlorpyriphos-éthyl et glyphosate) avec dilution de (1/100, 1/1000).

L'addition de contaminants aux diatomées en microcosmes montre d'une manière générale et que ce soit le contaminant utilisé : chlorpyriphos-éthyl ou le glyphosate ajoutés isolément ou en mélange, un accroissement de la concentration cellulaire des diatomées est également observé en présence de chlorpyriphos-éthyl, du glyphosate ou de son mélange (chlorpyriphos-éthyl + glyphosate) en dilution (1/100, 1/1000). En revanche, lors de l'exposition à des fortes concentrations en glyphosate (360g/L)  $C_1$ ,  $C_{1/10}$  la diminution de la concentration cellulaire est visible dès le 1<sup>er</sup> jour, qui s'accroît avec la durée du test.

Pour rendre compte de la stimulation de croissance des diatomées observée en présence de faibles concentrations de contaminants, on peut invoquer **le phénomène d'hormèse** qui permet une accélération du taux de croissance lorsque le stress imposé est relativement faible (**Stebbing, 1998b**). D'après les résultats, les organismes issus des deux types d'hydrosystèmes ne montrent pas de différences significatives en termes d'effets de ces pesticides sur la croissance des diatomées benthiques. Autrement dit, les phénomènes environnementaux sont très complexes ; les interactions entre les espèces dans les communautés ou des espèces avec certains paramètres abiotiques (luminosité, concentration en nutriments, etc...) peuvent influencer sur la réponse des organismes lors d'une exposition à un ou des toxiques.

### **Perspectives**

Les résultats que nous avons obtenus, nous permettent de penser que la mise en évidence des pollutions dues aux pesticides à l'aide d'un seul outil biologique ne paraissent pas suffisantes pour conclure quant à une exposition des organismes, ceci nécessite la mise en place d'une démarche plus intégrée faisant appel à la fois aux indices biologiques, et aux biomarqueurs. Car de nombreux paramètres environnementaux pouvant interférer dans leurs réponses. Les perspectives dans ce domaine sont donc de concevoir un outil qui intègre des données de terrain avec des données obtenues en laboratoire sur des communautés d'organismes cibles comme les diatomées.

*Référence  
bibliographique*

**-A-**

- 1/ **Arsul G., Quiniou F., 2014.** Plancton marin et pesticides quels liens ?, éditions Quae, 123p.
- 2/ **Amara A., 2012.** Evaluation de la toxicité de pesticides sur quatre niveaux trophiques marins : micro-algues, échinoderme, bivalves et poisson. Thèse de doctorat, spécialité Ecotoxicologie, Brest et Tunis, 211p.
- 3/ **Afnor, 2007.** Qualité de l'eau. Détermination de l'indice biologique diatomée. NF T90-354.
- 4/ **Arias-Estévez M., Lopez-Periago E., Martinez-Carballo E., Jesu S., Simal-Gandra J., Garcia-Rio L., 2008.** The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Ecosystems and Environnement* 123,pp : 247-260.
- 5/ **Arini A., 2011.** Décontamination métallique et capacités de récupération de deux composantes biologiques d'un hydrosystème naturel – biofilms diatomiques et bivalves filtreurs- Après remédiation d'un site industriel. Thèse de doctorat. Spécialité : Sciences et Environnements, 378p.
- 6/ **Aubertot J., Barbier A., Carpentier J-J., Gril L., Guichard P., Lucas S., Savary M., 2005.** Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Paris, INRA CEMAGREF: 64.

**-B-**

- 7/ **Banton O., Bangoy L M., 1997.** Hydrogéologie. Multiscience environnement des eaux souterraines. Presses de l'université du Québec/Ed. Edicef, Québec. 460p.
- 8/ **Boumaiza M., Ktari M.H., Vitiello P., 1979.** Toxicity of several pesticides used in Tunisia, for *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Pisces, Cyprinodontidae). *Arch. Inst. Pasteur, Tunis* 56 (3) : 307-342.
- 9/ **Bonfanti P., Colombo A., Orsi F., Nizzetto I., Andrioletti M., Bachetta R., Mantecca P., Fascio U., Vailati G., Vismara C., 2004.** Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology*, 70 : 189-200.

**10/ Boukhmila M., 2015.** Evaluation de l'effet d'un herbicide (glyphosate) sur la croissance d'organismes aquatiques : cas des diatomées benthique. Mémoire de master, spécialité Toxicologie de l'environnement, 49p.

**11/ Benkara Z., Ouataf H., 2014.** Effet toxicologique de quelques pesticides sur la croissance des algues benthiques : cas des diatomées. Mémoire de master, spécialité Toxicologie de l'environnement, 32p.

**12/ Baars, J.W., 1983.** Autoecological investigations on freshwater diatoms. 1. Generation times of some species. . Archiv für Hydrobiologie Supplement 67, 11-18.

**-C-**

**13/ Calvet R., Barriuso E., Benoit P., Charnay M.P., Coquet Y., 2005.** Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales. Ed. France Agricole.637p.

**14/ Colville A., Jones P., Pablo F., Hose G., Lim R., 2008.** Effects of chlorpyrifos on macroinvertebrate communities in coastal stream mesocosms. Ecotoxicology, 17 : 173-180.

**15/ Čolović M.B., Krstić D.Z. , Ušćumlić G.S., Vasić V.M., 2011.** Single and simultaneous exposure of acetylcholinesterase to diazinon, chlorpyrifos and their photodegradation products. Pesticide Biochemistry and Physiology, 100 : 16-22.

**16/ Caquet, T., Thybaud, E., Le Bras, S., Jonot, O., Ramade, F., 1992.** Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms. Aquat. Toxicol, 23, 261–278.

**17/ Chindah A.C., Sikoki F.D., Vincent-Akpu I., 2004.** Toxicity of an organophosphate pesticide (chlorpyrifos) on a common Niger Delta wetland fish *Tilapia Guineensis* (Blecker 1862). Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 8 :11-17.

**18/ Coste, M., 1999.** Atlas des diatomées pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées (IBD). Agences de l'Eau - Cemagref QEBX Bordeaux.

**-D-**

**19/ Debenst T., 2007.** Caractérisation de l'impact des pollutions agricoles sur les diatomées benthiques. Thèse de doctorat, spécialité Ecotoxicologie. 251p.

**-E-**

**20/ El Mrabet K., Charlet P., Lalère B., 2008.** Les pesticides, Laboratoire national de métrologie et d'essais, Centre de Métrologie Scientifique et Industrielle, France.

**-F-**

**21/ Farahat F.M., Fenske R.A., Olson J.R., Galvin K., Bonner M.R., Rohlman D.S., Farahat T.M., Lein P.J., Anger W.K., 2010.** Chlorpyrifos exposures in egyptian cotton field workers. *NeuroToxicology*, 31 : 297-304.

**22/ Foxenberg R.J., Ellison C.A., Knaak J.B., Ma C., Olson J.R., 2011.** Cytochrome P450-specific human PBPK/PD models for the organophosphorus pesticides : chlorpyrifos and parathion. *Toxicology*, 285: 57-66.

**23/ Forbes V. E., Forbes T.L., 1997.** Ecotoxicologie Théorie et Application. Paris, INRA EDITIONS.

**-G-**

**24/ Gold C., 2002.** Etude des effets de la pollution métallique (Cd / Zn) sur la structure des communautés des diatomées périphtiques des cours d'eau. Approches expérimentales in situ et en laboratoire. Thèse de doctorat. Spécialité : Ecotoxicologie, 392p.

**-H-**

**25/ Holvoet K.A.A., Seuntjens P., Vanrollegem P.A., 2007.** Monitoring and modeling pesticide fate in surface waters at the catchment scale. *Ecological modelling*, 209 pp : 53-64.

**26/ Hoagland, K.D., Rosowski, J.R., Gretz, M.R., Roemer, S.C. 1993.** Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *J. Phycol*, 29, 537-566.

**Hoagland, K.D.R., S.C. Rosowski, J.R. , 1982.** Colonization community structure of two

periphyton assemblages with emphasis on the diatoms (Bacillariophyceae). Am. J. Bot. 69, 188-213.

**-I-**

**27/ Index des produits phytosanitaire à usage agricole, 2011.** Ministère de l'agriculture et du développement rural, Algérie.

**28/Index des produits phytosanitaires, 1996.** Ministère de l'agriculture et de l'environnement, Algérie, 32<sup>e</sup> édition.

**-J-**

**29/John J., 2000.** Diatom prediction and classification system for urban streams. - LWRRDC, 156.

**-K-**

**30/Kim Tim S., 2013.** Effets de mélanges de pesticides sur les biofilms periphytiques d'eau douce. Thèse de doctorat, Spécialité Géochimie et Ecotoxicologie, 273p.

**31/Kouzayha A., 2011.** Développement des méthodes analytiques pour la détection et la quantification des traces des HAP et les pesticides dans l'eau. Application à l'évaluation de la qualité des eaux libanaises, thèse doctorat, Chimie Analytique et Environnement, université Bordeaux I, France.

**32/ Kasai F., 1999.** "Shifts in herbicide tolerance in paddy field periphyton following herbicide application." Chemosphere 38(4): 919-931.

**33/ Krammer K., Lange-Bertalot H., 1986.** Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: *Bacillariophyceae. Teil 1. Naviculaceae*, Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

**34/ Krammer K., Lange-Bertalot H., 1991 b.** Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: *Bacillariophyceae. Teil 4. Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema*, Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

**35/ Krammer K, Lange-Bertalot, H. (1986–1991).** Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae. 876 p.; 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 596 p.; 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 576 p.; 4. Teil: Achnantheaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema. G. Fischer Verlag, Stuttgart, 437 pp.

**36/ Kesraoui-Abdessalem A., 2008.** Dégradation des pesticides chlortoluron, carbofurane et bentazone en milieux aqueux par les procédés d'oxydation avancée, thèse doctorat, Géomatériaux, université de paris-est, France.

**-L-**

**37/ Lin J.H., Kao W.C., Tsai K.P., Chen C.Y., 2005.** A novel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. *Water Research* 39(9): 1869-1877.

**-M-**

**38/ Morin S., 2006.** Bioindication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques. Approche in situ et expérimentales. Thèse de doctorat, Spécialité Sciences du vivant, géoscience et science de l'environnement. 302p.

**39/ Mouhri K., Marsot P., Pelletier E., Loudiki M., Saint-Louis R., 1995.** Effets du chlorure de tributylétain sur la croissance et le métabolisme de la diatomée marine *Phaeodactylum tricornerutum* (Bohlin). *Oceanologica Acta*, Vol 18-n°3, 363-370.

**40/ McIntire, C.D., Gregory, S.V., Steinman, A.D., Lamberti, G.A., 1996.** Modelling algal communities: an example from stream ecology, in: Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L. (Ed.), *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, Boston, pp. 669-704.

**41/ McCormick, P.V., Stevenson, R.J., 1991.** Mechanisms of benthic algal succession in lotic environments. *Ecology* 72, 1835-1848.

**42 / Murdock, J.N., Dodds, W.K., 2007.** Linking benthic algal biomass to stream substratum topography. *Journal of Phycology* 43, 449-460.

**43/ Stevenson, R.J., Peterson, C.G., 1989.** Variation in benthic diatom (Bacillariophyceae) immigration with habitat characteristics and cell morphology. *Journal of Phycology* 25, 120-129.



**-N-**

**44 / Nandi S., Gupta P.S.P., Roy S.C., Selvaraju S., Ravindra J.P., 2011.** Chlorpyrifos and endosulfan affect Buffalo oocyte maturation, fertilization, and embryodevelopment *in vitro* directly and through cumulus cells. *Environmental Toxicology*, 26: 57-67.

**45/ Nelson K. J., Hoagland K. D., Siegfried B. D., 1999.** "chronic effects of atrazine on tolerance of a benthic diatom." *environmental Toxicology and Chemistry* 18(5):1038-1045.

**-O-**

**46/ Oruç E.O., 2010.** Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochomis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96 : 160-166.

**-P-**

**47/ Pablo F., Krassoi F.R., Jones P.R.F., Colville A.E., Hose G.C., Lim R.P., 2008.** Comparison of the fate and toxicity of chlorpyrifos. Laboratory versus a coastal mesocosm system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71 : 219-229.

**48/ Pesce S., 2006.** Effets de pesticides sur l'activité de la diversité des communautés microbiennes d'un milieu lotique récepteur. Etudes in situ et expérimental. Thèse de doctorat, spécialité :Ecologie Microbienne, 271p.

**49/ Peterson H. G., Boutin C., Freemark K. E., Martin P. A., 1997.** "Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed." *Aquatic Toxicology* 39(2): 111-134.

**50/ Prygiel, J., Coste, M., 2000.** Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées NF T 90-354. Cemagref et Agence de l'eau Artois Picardie.

**-R-**

**51/ Rodier J., Legube B., Merlet N., 2009.** L'analyse de l'eau, éditions Dunod, 1526p.

**52/ Round E.E., Crawford R.M., Mann D.G., 1990.** The diatoms. Biology and morphology of the Genera. Cambridge University Press, Cambridge.

**53/ Rott E., 1991.** Methodological aspects and perspectives in the use of periphyton for monitoring and protecting rivers. - In: Whitton, B.A., Rott, E. et Friedrich, G. (eds.), Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck., 9-16.

**-S-**

**54/ Sandal S., Yilmaz B., 2011.** Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan and 2,4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and non-smokers. Environmental Toxicology, 26 : 433-442.

**55/ SCOR-UNESCO Working Group 17, 1966.** Determination of Photosynthetic Pigments in Sea-Water. Monogr. Oceanogr. Method, vol. 1. UNESCO, Paris, pp. 9-15.

**56/ Stebbing A.R.D., 1998b.** Hormesis. the stimulation of growth by low levels of inhibitors. Science of the Total Environment, 22 : 213-234.

**57/ Saxtone A. M. , Morrow A .E., Boubonnier A.R ., Wilhelm . S., 2011.** Glyphosate influence on phytoplankton community structure in Lake Erie. Journal of great lakes research .ELSEVIER , N° 37, P . 683-690 .

**-T-**

**58/ Telmani K., 2012.** Evaluation du risque de contamination de la zone humide d'El-Kennar par les pesticides : Analyse des pesticides dans le sol et l'eau par GC/MS. Thèse de magistère, Spécialité Chimie Physique.

**59/ Tawil G., 2007.** Etude Bibliographique sur l'effet des pesticides sur la santé chez l'homme, rapport de recherche master 2, INRA, école nationale de vétérinaire Toulouse, France.

**60/ Tomlin C.D.S., 2000.** The pesticide manual., 12th edn, British crop protection council. Farnham, Surrey, UK.

**61/ Tripathi G., Shasmal J., 2011.** Concentration related responses of chlorpyrifos in antioxidant, anaerobic and protein synthesizing machinery of the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99 : 215-220.

**62/ Tomlin C.D.S., 2003.** The pesticide manual (13<sup>th</sup> edition), British Crop Protection Council. Farnham, Surrey, U.K, 1344p.

**63/Tang J. X., Hoagland K. D., Siegfried B. D., 1997.** "Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(4): 631-637.

-V-

**64/ Van den Brink P.J., Hartgers E.M., Gylstra R., Bransen F., Brock T.C.M., 2002.** Effects of two insecticides in freshwater microcosms : II. Responses of plankton and ecological risk assessment. *Ecotoxicology*, 11 : 181-197.

**65/ Van Wijngaarden R.P.A., Brock T.C.M., Douglas M.T., 2005.** Effects of chlorpyrifos in freshwater model ecosystems : the influence of experimental conditions on ecotoxicological thresholds. *Pest Management Science*, 61 : 923-935.

**66/ Veldhuis M., Kraav G., Timmermans K., 2001.** Cell Death in phytoplankton : Correlation between Changes in Membrane Permeability, Photosynthetic Activity, Pigmentation and Growth. *European Journal of Phycology*, 36(2), 167-177.

**67/ Verneuil L., 2015.** Toxicité environnementale et écotoxicité de nanotubes de carbone chez des diatomées benthique : De la cellule au biofilm. Thèse de doctorat, Spécialité Ecologie fonctionnelle, 197p.

**68/ Van der werf H.M.G., 1996.** Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agr. Ecosyst. Environ.* **60** : 81-96.

-W-

**69/ Wetzel, R.G., 1983.** Opening remarks, in: R.G., W. (Ed.), Proceeding of the first international workshop on periphyton of freshwater ecosystems. Dr W. Junk Publishers, pp. 2 - 4.

**70/ Werner, D., 1977.** The Biology of Diatoms. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

-Z-

**71/ Zhang Y., Hou Y., Chen F., Xiao Z., Zhang J., Hu X., 2011.** The degradation of chlorpyrifos and diazinon in aqueous solution by ultrasonic irradiation : Effect of parameters and degradation pathway. Chemosphere, 82 pp : 1109-1115.

**72/ Zhou Q., Sun X., Gao R., Zhang Q., Wang W., 2010.** Mechanism study on OH-initiated atmospheric degradation of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos. Journal of Molecular Structure : THEOCHEM. 952 : 8-15.

# *Annexes*

**Annexe I : Dosage de la chlorophylle *a* et de l'indice phéopigments par spectrométrie d'absorption moléculaire : selon la méthode SCOR-UNESCO. (Rodier et al., 2009)****✓ Principe :**

Après filtration sur membrane pour isoler et concentrer le plancton végétal, la chlorophylle et les phéopigment sont extraits sur le filtre par de l'acétone dans un bain à ultrasons.

L'absorbance mesurée à différentes longueurs d'onde permet le calcul des concentrations en chlorophylle et en phéopigments.

La méthode de lecture d'absorbance et de calcul des concentrations utilisée est la méthode SCOR-UNESCO qui s'est basée sur la mesure de l'absorbance de l'extrait à 750nm, 663nm, 645nm, 630nm, 430nm et 410nm.

**- Matériel :**

Filtres en fibre de verre : diamètre de pores d'environ 1  $\mu\text{m}$ , système de filtration sous vide ou sous pression, bac à ultrasons, spectromètre, équipé de cuves de trajet optique de 10 mm.

**-Réactifs :** solvant d'extraction : acétone à 90 %.

**✓ Échantillonnage et conservation des échantillons :**

Prélevés dans des flacons remplis à ras bord et sans bulle d'air, les échantillons ont été transportés à l'obscurité et au froid (4 à 5 °C), la récupération du plancton végétal par filtration a été effectuée dans les 6 heures qui suivent le prélèvement. En présence de particules macroscopiques l'échantillon est tamisé sur un tamis d'environ 200  $\mu\text{m}$ .

**✓ Protocole d'extraction des pigments planctoniques :****- Récupération du plancton végétal par filtration :**

L'échantillon a été filtré sur un filtre en fibre de verre d'un diamètre de pores de 1 à 2  $\mu\text{m}$  moins de 6 heures après le prélèvement, le volume filtré a été de l'ordre de 100 mL.

**-Extraction de la chlorophylle et des phéopigments par l'acétone :**

Le filtre en fibres de verre est placé dans un bécher recouvert de papier d'aluminium et contenant 10 mL d'acétone à 90 %.

Le bécher est maintenu à l'obscurité. Le bécher a été placé dans un bac à ultrasons à l'obscurité et soniqué pendant 20 minutes à température ambiante avant de laisser reposer 10 minutes.

L'extrait est filtré sur un filtre en fibre de verre, le bécher et le filtre est rincé avec de l'acétone en ajoutant le solvant de lavage à l'extrait, le filtrat est transvasé dans une fiole jaugée en complétant au volume 10 mL avec de l'acétone pure. La fiole est maintenue à l'obscurité et en effectuant les mesures d'absorbance dans un délai très court (quelques minutes).

#### **-Préparation d'une solution de référence (pour le zéro du spectromètre)**

Un filtre en fibre de verre a été placé dans un bécher identique à celui utilisé précédemment, en ajoutant 10 mL d'acétone. Mettre sous ultrasons pendant 20 minutes. Placer l'extrait dans la cuve du spectrophotomètre pour régler le zéro d'absorbance aux différentes longueurs d'onde utilisées.

#### ✓ **Protocoles de détermination de l'absorbance des extraits**

##### **-Méthode scor-unesco :**

Les longueurs d'onde retenues sont : 750 nm, 663 nm, 645 nm, 630 nm, 430 nm et 410 nm. La mesure est faite par rapport au blanc préparé précédemment, Soient  $A_{0\lambda}$  les absorbances mesurées aux différentes longueurs d'onde.

#### ✓ **Présentations des résultats**

Les résultats permettent de calculer :

- La concentration brute en chlorophylle a (C) en  $\mu\text{g/L}$ .
- L'indice de dégradation (ID) de la chlorophylle.
- Le pourcentage P de chlorophylle a dans l'échantillon.
- La concentration en chlorophylle a ( $C_a$ ) en  $\mu\text{g/L}$ , corrigée grâce à une équation trichromatique.
- La concentration en indice phéopigments ( $P_a$ ) en  $\mu\text{g/L}$ .

- $$C = \frac{V}{IV} [11,64 (A_{0663} - A_{0750}) - 2,16 (A_{0645} - A_{0750}) + 0,10 (A_{0630} - A_{0750})]$$
- $$ID = \frac{A_{0430} - A_{0750}}{A_{0410} - A_{0750}}$$
- $$P = 59,0 + 137,6 \ln ID$$
- $$C_a = C \cdot \frac{P}{100}$$
- $$P_a = C - C_a$$

Avec :

$A_{0750}$ ,  $A_{0663}$ ,  $A_{0645}$ ,  $A_{0630}$ ,  $A_{0430}$ ,  $A_{0410}$ , les absorbances respectives de l'extrait aux longueurs d'onde 750nm, 663 nm, 645 nm, 630 nm, 430nm et 410 nm.

$v$  le volume (en mL) d'acétone utilisé.  $v = 10\text{ml}$

$V$  le volume (en L) d'échantillon filtré.  $V = 100\text{ml}$

$I$  le trajet optique de la cuve de mesure (en cm).  $I = 10\text{mm}$

## Annexe II : Dosage des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ )

### Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire (Rodier et al., 2009)

#### ■ Principe

En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitrosalicylate de sodium, coloré en jaune et susceptible d'un dosage spectrométrique.

#### ➤ Réactifs

- Solution de salicylate de sodium à 0.5% (à renouveler toutes les 24 heures).

0.5g de salicylate de sodium dans 1000 ml d'eau distillée.

- Acide sulfurique  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré ( $d = 1,84$ ).

- Solution d'hydroxyde de sodium :

30g hydroxyde de sodium dans 1000 ml

- Solution de Tartrate double de sodium et de potassium

Hydroxyde de sodium  $\text{NaOH}$ .....400g.

Tartrate de sodium et de potassium... 60g.

Eau distillée.....qsp 1000 ml.

#### ➤ Matériel spécial

- Capsule de 60 ml environ.

- Bain-marie.

-Spectrophotomètre U.V. visible.

#### ➤ Mode opératoire :

- Prendre 10ml de l'échantillon à analyser.

- Ajouter 2 à 3 gouttes de  $\text{NaOH}$  à 30%.



- Ajouter 1ml de salicylate de sodium.
- Evaporer à sec au bain marie ou à l'étuve entre 75 et 88°C. (ne pas surchauffer ni chauffer très longtemps) laisser refroidir.
- Reprendre le résidu avec 2 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. laisser reposer 10mn.
- Ajouter 15ml d'eau distillée.
  - Ajouter 15ml de tartrate double de sodium et de potassium puis passer au spectrophotomètre à 420 nm.

➤ **Expression des résultats :**

Le résultat est donné directement en mg/l d'azote nitrique, pour obtenir la teneur en nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup> multiplier le résultat par 4.43.

### Annexe III : Dosage des phosphates (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)

#### Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire (Rodier et al., 2009)

➤ **Principe :**

En milieu acide et en présence de molybdate d'ammonium, les orthophosphates donnent un complexe phosphomolybdique qui, réduit par l'acide ascorbique, développe une coloration bleue susceptible d'un dosage spectrométrique.

Certaines formes organiques pouvant être hydrolysées au cours de l'établissement de la coloration et donner des orthophosphates, le développement de la coloration est accélérée par l'utilisation d'un catalyseur, le tartrate double d'antimoine et de potassium.

➤ **Appareils :** Spectrophotomètre UV, Visible.

➤ **Réactif mixte :**

**A**

- Heptamolybdate d'ammonium.....13g.
- Eau distillée.....100 ml.

**B**

- Tartrate d'antimoine.....0.35g
- Eau distillée.....100 ml.

**C**

- Acide sulfurique pur .....150 ml.
- Eau distillée.....150 ml.

Effectuer le mélange dans l'ordre (A+B) +C et compléter à 500ml d'eau distillée.

Acide ascorbique à 10% :

- Acide ascorbique.....10g.
- Eau distillée.....100ml.

➤ **Mode opératoire :**

- 40 ml d'eau à analyser.
- 1 ml acide ascorbique.
- 2 ml du réactif mixte.

Attendre 10 mn pour le développement de la couleur, puis effectuer la lecture à  $\lambda = 700$  ou  $800$  nm.