



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



# Mémoire

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD

En : TOXICOLOGIE CELLULAIRE

Option : TOXICOLOGIE

Par : M<sup>me</sup> YOUSFI Amani

Intitulée :

**Etude des effets toxiques de la Bifenthrine et de l'Hymexazol sur  
*Helix aspersa* et évaluation de l'effet protecteur des huiles  
essentielles de l'orange**

Devant le jury :

M. ROUABHI Rachid	Pr.	Université de Tébessa	Président
M. DJABRI Belgacem	Pr.	Université de Tébessa	Rapporteur
M. GOUDJIL Tahar	MCA	Université de Tébessa	Examineur
M. DEROUICHE Samir	Pr.	Université d'El-Oued	Examineur
M. Gasmi Salim	MCA	Université de Tébessa	Examineur

Date de Soutenance

**03 /03/ 2024**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

« قَدْ أَفْلَحَ الْوَالِدُ الَّذِي هَدَىٰ نَاصِرًا وَلَدًا وَوَعَدْنَا اللَّهُ لَوْلَا أَن هَدَانَا اللَّهُ »

صدق الله العظيم

سورة الأعراف: الآية 43

## ملخص

البحث يهدف إلى تقييم سمية اثنين من مبيدات الآفات ( البيفينثرين (BF) وهيميكلزول (HY)) على نشاط نظام مضادات الأكسدة الخلوية والميتوكوندريا على مستوى الكبد والبنكرياس عند حلزون الحقائق هيليكس اسبيرسا ( *Helix aspersa*)، وكذلك التأثير الواقي للزيوت الأساسية البرتقال المستخرجة من قشرة البرتقال تومسون نافال (HEO) ضد هذه السمية.

هذا بحث تجريبي تم إجراؤه في المختبر على 80 حلزونا من نوع هيليكس اسبيرسا موزعة على ثمانية مجموعات (10 حلزونات في كل مجموعة): (i) المجموعة الشاهدة، (ii) مجموعة معاملة بالبيفينثرين (0.83 ملغ/غ)، (iii) مجموعة معاملة بالهيميكلزول (90 ميكروغرام/غ)، (iv) مجموعة معاملة بالزيت الأساسي لقشرة البرتقال تومسون نافال (0.151 ميكروغرام/غ)، (v) مجموعة معاملة بمزيج البيفينثرين + الزيت الأساسي لقشرة البرتقال تومسون نافال بنفس الجرعات، (vi) مجموعة معاملة بمزيج الهيميكلزول + الزيت الأساسي لقشرة البرتقال تومسون نافال، (vii) مجموعة معاملة بمزيج البيفينثرين + الهيميكلزول، وأخيراً (viii) مجموعة معاملة بمزيج البيفينثرين والهيميكلزول والزيت الأساسي لقشرة البرتقال تومسون نافال بنفس الجرعات. تم تحديد تركيبة الزيت الأساسي لقشرة البرتقال تومسون نافال باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا الغازية المرتبطة بطيفية الكتلة (CPG/SM). تم قياس علامات الإجهاد التأكسدي على مستوى الخلية والميتوكوندريا (MDA، GSH، GST، CAT، GPX، نشاط الأستيل كولين استيراز (AChE)) بالإضافة إلى المعايير البيوكيميائية (معدل البروتين والكاربوهيدرات والدهون) والسلوكية (النشاط الحركي ومعدل تناول الطعام وتغير لون القشرة واضطراب اتجاه الحركة) والفسولوجية (الوفاة و وزن القواقع و وزن البنكرياس الكبدي، طول الصدفة و قطرها).

التحليل الكروماتوغرافي للزيوت العطرية للبرتقال تومسون نافال قد تعرف على 24 مكونًا، منها الليمونين كمكون رئيسي يليه الميرسان واللينالول. أظهرت الدراسة أن المعالجة بواسطة البيفينثرين والهيميكلزول ومزيجيهما أثرت سلبًا على الخواص الغذائية والحركية للحلزونات البالغة، مما أدى إلى انخفاض الوزن الجسماني والوزن المتوسط للصدفة وزيادة الوزن النسبي للبنكرياس الكبدي، بالإضافة إلى تقلص قطر وطول الصدفة. علاوة على ذلك، أظهرت قياسات معلمات الأكسدة في البنكرياس الكبدي أن البيفينثرين والهيميكلزول ومزيجيهما يؤديان إلى زيادة في مستويات MDA و GPX ونشاط الكاتالاز وانخفاض في مستويات GSH و GST على مستوى الهيولا الخلوية والميتوكوندريا للبنكرياس الكبدي. لوحظ أيضًا انخفاض في أسيتيل كولين استيراز (AChE). على مستوى الميتوكوندريا، كانت المبيدات الحشرية سببًا في انخفاض التنفس الميتوكوندري (استهلاك الأوكسجين) وزيادة النفاذية مع إنتفاخ الميتوكوندريا.

بالإضافة إلى ذلك، تُظهر نتائجنا أن إضافة زيت قشرة البرتقال الأساسي من تومسون نافال لعلاجات البيفينثرين والهيميكلزول تُعيد معظم علامات التوتر التأكسدي إلى مستويات مماثلة لتلك الموضحة عند المجموعة الشاهدة. استنادًا إلى هذه النتائج، يمكننا أن نقترح إدراج زيت قشرة البرتقال الأساسي في أي نظام علاجي في حالة التسمم بالبيفينثرين والهيميكلزول.

**الكلمات المفتاحية:** بيفنثرين، هيميكلزول، تومسون نافال، الزيت الأساسي، هيليكس اسبيرسا، التأثير الوقائي، الإجهاد التأكسدي.

## Abstract

The research aims to evaluate the toxicity of two pesticides (Bifenthrin (BF) and Hymexazole (HY)) on the activity of the cytosolic and mitochondrial antioxidant systems at the hepatopancreatic level in *Helix aspersa*, as well as the protective effect of essential oils of Thomson Naval orange peel (OEO) against this toxicity.

This is an experimental research carried out in the laboratory on 80 *Helix aspersa* snails divided into eight groups (10 snails each): (i) a control group, (ii) a group treated by BF (0.83 mg/g); and (iii) a group treated with HY (90 ug/g) (iv) a group treated with OEO (0.151 ul/g), (v) a group treated with the BF + OEO combination at the same doses, (vi) a group treated with the HY + OEO combination, (vii) a group treated with the BF + HY mixture, and finally (viii) a group treated with the BF, HY, and OEO mixture at the same doses. The composition of OEO was determined by the gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) technique. At the cytosolic and mitochondrial level, oxidative stress markers (MDA, GSH, GST, CAT, GPX, and acetylcholinesterase (AChE) activity) as well as biochemical parameters (protein, carbohydrate, and lipid rate), behavioral (locomotor activity, food intake rate, shell color change, orientation disturbance), and physiological (mortality, the weight of snails, and hepatopancreas weight, Shell length and diameter) were measured.

The chromatographic analysis of Thomson Naval Orange essential oils identified 24 components, with limonene as the majority constituent, followed by myrcene and linalol. The study found that the treatment with BF and HY, as well as their mixture, had a negative impact on the nutritional and locomotive properties of adult shrimp, resulting in a decrease in body weight, average shell weight and an increase in the relative hepatopancreatic weight, and a reduction in shell diameter and length. In addition, dosing of hepatopancreatic oxidative parameters showed that BF and HY as well as their mixture resulted in an increase in MDA, GPX, catalase activity and decrease in GSH and GST levels in the cytoplasm and mitochondria of hepatic pancreases. A decrease in acetylcholinesterase was also observed. At the mitochondrial level, pesticides have been the cause of a decrease in mitochondrial respiration (O<sub>2</sub> consumption), an increase in permeability with mitochondrial swelling. Additionally, our results show that adding Thomson Naval orange peel essential oil to bifenthrin and hymexazole treatments restored most signs of oxidative stress to levels similar to controls. Based on these results, we can suggest the inclusion of orange peel essential oil in any therapeutic regimen in cases of BF and HY poisoning.

**Keywords:** Bifenthrine, Hymexazole, Naval Thomson, essential oil, *Helix aspersa*, protective effect, oxidative stress

## Résumé

La recherche vise à évaluer la toxicité de deux pesticides (la Bifenthrin (BF) et l'Hymexazole (HY)) sur l'activité du système antioxydant cytosolique et mitochondrial au niveau hépatopancréatique chez *Helix aspersa*, ainsi que l'effet protecteur des huiles essentielles de l'écorce d'orange Thomson Naval (HEO) contre cette toxicité.

C'est une recherche expérimentale réalisée au laboratoire sur 80 escargots *Helix aspersa* répartis en huit groupes (10 escargots chacun) : (i) un lot témoin, (ii) un lot trité par la BF (0,83 mg/g), (iii) un lot traité par l'HY (90 ug/g) (iv) un lot traité par l'HEO (0,151 ul/g), (v) un lot traité par la combinaison BF + HEO aux mêmes doses, (vi) un lot traité par la combinaison l'HY + HEO, (vii) un lot traité par la mixture BF + HY et enfin (viii) un lot traités par la mixture BF, HY et HEO aux mêmes doses. La composition de l'HEO a été déterminée par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). Au niveau cytosolique et mitochondrial, les marqueurs du stress oxydatifs (MDA, GSH, GST, CAT, GP<sub>x</sub>, l'activité acétylcholinestérase (AChE)) ainsi que des paramètres biochimiques (Taux de protéine, glucide et lipide), comportementaux (Activité locomotrice, taux de prise de nourriture, changement de la couleur de coquille, perturbation de l'orientation) et physiologiques (Mortalité, poids d'escargot et poids d'hépatopancréas, diamètre et longueur de la coquille) ont été mesurés.

L'analyse chromatographique des huiles essentielles d'orange Thomson naval a identifié 24 composants avec le limonène comme constituant majoritaire suivi par le Myrcène et le Linalol. L'étude a révélé que le traitement par la BF et l'HY, ainsi que leur mixture, a eu un impact négatif sur les propriétés nutritionnelles et locomotives des escargots adultes, ce qui a entraîné une diminution du poids corporel, le poids moyen de la coquille et une augmentation des poids relatifs de l'hépatopancréas, ainsi qu'une réduction du diamètre et de la longueur des coquilles. En outre, le dosage des paramètres oxydatifs hépatopancréatique a montré que la BF et l'HY ainsi que leur mixture entraînaient une augmentation des taux de MDA, GPX, l'activité catalase et une baisse des taux de GSH et de GST dans le cytoplasme et les mitochondries d'hépatopancréas. Une diminution de l'acétylcholinestérase a également été remarquée. Au niveau mitochondrial, les pesticides ont été à l'origine d'une diminution de la respiration mitochondriale (consommation d'O<sub>2</sub>), une augmentant la perméabilité avec un gonflement mitochondrial. De plus, nos résultats montrent que l'ajout de l'huile essentielle d'écorce d'orange de Thomson Naval aux traitements par la bifenthrine et l'hymexazole rétablit la plupart des signes de stress oxydatif à des niveaux similaires à ceux des témoins. Sur la base de ces résultats, nous pouvons suggérer l'inclusion de l'huile essentielle de l'écorce d'orange dans quelconque schéma thérapeutique en cas d'intoxication par la BF et l'HY.

**Mots clés :** Bifenthrine, Hymexazole, Thomson naval, huile essentielle, *Helix aspersa*, effet protecteur, stress oxydant

## *Remerciements*

Avant tout, louange à **Dieu** le tout puissant, qui m'a guidée tout au long de ma vie et m'a donné la force extraordinaire, le courage et la patience pour passer par tous les moments difficiles, et a permis à ce travail de voir le jour malgré tous les défis que j'ai auparavant cru insurmontables...**Alhamdulillah.**

Je suis particulièrement reconnaissant à Monsieur le Professeur **DJABRI Belgacem**, mon directeur de thèse à l'Université Echahid Chikh Larbi Tebessi, qui a dirigé et suivi ce travail avec une rigueur scientifique exceptionnelle. Cela m'a donné la confiance nécessaire pour terminer ce projet de recherche. Je le remercie exceptionnellement pour toute son aide au cours des années de cette thèse, y compris sa compassion, son encouragement et sa confiance illimitée en moi et surtout sa bonne humeur permanente dans le laboratoire. Merci beaucoup pour tout.

Je remercie de tout mon cœur, Monsieur **ROUABHI Rachid** Professeur à l'Université de Tebessa, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de soutenance. Je le remercie pour son soutien tout au long des années universitaires particulièrement de m'encourager en me faisant partager ses connaissances et son expérience scientifique, sa croyance en le succès de cette spécialité, malgré tous les problèmes, comme je n'oublie pas de le remercier pour le sourire qui apparaît sur son visage à chaque fois qu'il me voit. Merci

Il m'est agréable d'adresser mes vifs remerciements à Monsieur **DEROUICHE Samir**, Professeur à Université d'Eloued pour sa gentillesse, sa bienveillance et ses conseils. Je le remercie infiniment pour m'avoir accordé un peu de son temps et beaucoup de ses informations malgré son éloignement, son temps limité. Merci pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur **GOUDJIL Tahar** maître de conférences à l'université de Tébéssa, pour avoir accepté d'examiner mon travail et de faire partie de mon jury de thèse. Qu'elle reçoive mon plus sincère respect et ma reconnaissance.

Mes sincères et respectueux remerciements sont adressés au Monsieur **GASMI Salim**, maître de conférences à l'université de Tébéssa, pour avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail en tant qu'examinateur.

Je n'ai jamais les mots justes pour remercier chacun des membres de ma chère famille pour son soutien continu. Je voudrais exprimer ma gratitude à mon père, mon cher mari, mes frères Adel, Hamza, Ahmed, ma sœur Samah et son mari Jihad, et je n'oublie pas ma chères filles Mayssan et Mawadda. À la famille de mon cher mari, Yousfi Abd Rahman, Yousfi Aisha et sa chère sœur Anissa et ses frères Jalal, Atef, Walid, Marwan et sa femme et ses enfants. Qu'Allah les récompense !

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur **Degaichia Amor** pour son aide, son soutien moral et ses conseils précieux ainsi que pour le sens de l'humour et du plaisir qu'il a toujours. Je lui souhaite beaucoup de succès.

Enfin, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous les enseignants du département de biologie appliquée de l'université de Tebessa.

Il m'est agréable de remercier tous mes amis qui m'ont aidé de près ou de loin à terminer cette thèse correctement.

## Dédicas

C'est le fruit de mes efforts que je récolte aujourd'hui, c'est un don que je dédie à :  
Les propriétaires de ce succès, mes chers père et mère, puissé-je toujours être une source de  
fierté pour vous.

**Ma mère** m'a toujours encouragé et poussé dans mes études, et pour cela je suis  
reconnaisant. Je t'aime, maman, que Dieu prolonge ta vie et que tu sois toujours un atout  
pour nous.

Ce travail est dédié à toi, **mon Père**, qui je t'aime d'un amour incomparable. Pour toutes les  
souffrances et les sacrifices que vous avez faits pour mon éducation, pour tout cet amour que  
vous m'avez donné depuis ma naissance jusqu'à aujourd'hui. Tu m'as donné ta protection  
paternelle, ta tendresse et ta compréhension durant toute mon enfance dorée. Je te dois ce que  
je suis aujourd'hui et ce que je serai demain, et je ferai toujours de mon mieux pour maintenir  
ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant vous protège, vous donne la santé,  
le bonheur et vous protège de tout mal.

A mon **cher mari**, mon soutien et toute ma vie, je dédie ce travail. Je ne trouve pas les mots  
justes pour te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi . La lumière de ma vie , merci  
pour votre patience, vos sacrifices et votre aide tout au long de ces années universitaire. Vous  
avez tous mes remerciements et mon respect. Que Dieu vous protège pour moi. Je t'aime.

À la bénédiction la plus précieuse que Dieu a accordée à mes deux chères filles, **Misso** et  
**Dodda**, que Dieu les protège et les protège de tout mal.

À la personne qui m'a grandement soutenue et qui m'a soutenu pendant les moments difficiles.  
Elle qui a continué à me motiver malgré nos difficultés. Pour ma sœur "**Samah**". Que Dieu te  
garde et te protège pour nous, la garde heureuse, et je remercie aussi son mari, **Jihad**.

A mon grand frère **Adel**, que Dieu le ramène sain et sauf de son exil mon petit frère **Ahmed**  
A mon frère **hamza** et sa femme et ses enfants. À toute la famille de mon mari, en particulier  
mon oncle **Abd Rahman, Aisha, Anisa Jalal, Atef, Marwan** et sa famille.

Tous mes amis qui m'ont toujours soutenu et à qui je souhaite plus de succès.

Surtout Ma chère **BOUTERAA Zina**





## Liste de tableaux

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre</b>	<b>page</b>
<b>1</b>	Classification des pesticides selon leur organisme cible	<b>8</b>
<b>2</b>	Caractéristiques physiques, chimiques et toxicologiques de la BF	<b>11-12</b>
<b>3</b>	Liste des insecticides contrôlés par le ministère de la santé-février 2023	<b>16</b>
<b>4</b>	Caractéristiques physique et chimiques principales de la substance active	<b>19-20</b>
<b>5</b>	Explication de certains termes	<b>27-28</b>
<b>6</b>	Caractéristiques des espèces réactives de l'oxygène	<b>41</b>
<b>7</b>	Caractéristiques des espèces réactives de l'azote	<b>43</b>
<b>8</b>	Principales variétés d'orange	<b>52</b>
<b>9</b>	Composition chimique pour 100g de l'écorce d'orange Thomson Naval	<b>55</b>
<b>10</b>	Composition en caroténoïdes des écorces d'orange ( $\mu\text{g/g}$ bs)	<b>56</b>
<b>11</b>	Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d'orange	<b>60</b>
<b>12</b>	Composés aromatiques des huiles essentielles des écorces d'orange	<b>61</b>
<b>13</b>	Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction.	<b>71</b>
<b>14</b>	Composition chimique des huiles essentielles d'écorce d'orange Thomson naval	<b>80</b>
<b>15</b>	Mortalité des escargots enregistrée à la fin de la période de traitement	<b>83</b>
<b>16</b>	Composition d'huile essentielle de citrus sinensis rapportée dans la littérature.	<b>91</b>

## Liste de figures

Figure N°	Titre	page
1	Histoire des produits phytosanitaires	7
2	Formule développée de la Bifenthrine	10
3	Voies de dégradation de la bifenthrine dans l'environnement	13
4	Modes d'action des fongicide	17
5	Structure chimique de l'hymexazole	19
6	Escargot <i>Helix aspersa</i>	29
7	Critères de description et de mensuration de la coquille de <i>helix aspersa</i>	30
8	Morphologie externe de l'escargot	30
9	Anatomie d'un escargot	31
10	Schéma de l'appareil génital de l'escargot	33
11	Différentes voies des contaminations d' <i>Hélix aspersa</i>	36
12	Etapes de la réduction de l'oxygène et la formation des intermédiaires partiellement réduits sont détaillées	40
13	Réaction de formation du NO à partir de l'arginine	42
14	Différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) et leurs mécanismes de productions	43
15	Origine de la production des ERO au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.	44
16	Réaction en chaîne induisant la peroxydation des acides gras et leur devenir	45
17	Les différents dégâts pouvant altérer la molécule d'ADN	46
18	Stratégie de lutte des antioxydants contre le stress oxydant	47
19	Familles d'antioxydants naturels	48
20	Orange Thomson navel	54
21	Description morphologique d'orange Thomson naval	54
22	Coupe transversale d'une orange variété Thomson Naval	55
23	L'écorce d'orange Thomson est coupée en petits morceaux	69
24	photographies des écorces d'orange Thomson naval (A) : Fraiches (B) : Sèches	69
25	Escargots <i>Helix aspersa</i>	70
26	Elevage des escargots dans le laboratoire	70

27	Procédé d'hydro-distillation	71
28	Injection des escargots <i>Helix aspersa</i>	74
29	Etapes de la dissection des escargots et Prélèvement d'hépatopancréas	75
30	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	77
31	Huile essentielle d'écorce d'orange Thomson naval	79
32	Chromatogramme CPG/SM de l'HEO Thomson naval	79
33	Effet des différents traitements sur la diminution d'activité locomotrice des escargots	81
34	Effet des différents traitements sur la couleur de coquille des escargots	82
35	Evolution poids corporelle chez les escargots témoins et traités	84
36	Evolution de gain du poids corporelle chez les escargots témoins et traités	84
37	Évolution du poids moyen de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités	85
38	Effets de BF, d'HY, HEO et de leurs mixtures sur le poids frais moyen coquillère des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	86
39	Evolution de diamètre de la coquille chez les escargots témoins et traités	87
40	Evolution de longueur de la coquille chez les escargots témoins et traités	88
41	Principales étapes d'extraction des métabolites: (glucides, lipides, et protéines) de l'hépatopancréas chez les adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	99
42	Principe du dosage du malondialdéhyde.	100
43	Principe de dosage du glutathion.	102
44	Taux des protéines totales au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.	109
45	Taux des lipides totaux au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.	110
46	Taux des glucides totaux au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.	111
47	Variation de taux de MDA au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.	112
48	Taux des GSH au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.	112
49	Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.	113

<b>50</b>	Activité de la GST au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.	<b>114</b>
<b>51</b>	Variation de l'activité de la catalase (CAT) au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.	<b>115</b>
<b>52</b>	Variation de l'activité de l'acétylcholinestérase ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.	<b>116</b>
<b>53</b>	Variation de la respiration mitochondriale au niveau hépatopancréatique chez les escargots témoins et traités	<b>132</b>
<b>54</b>	Variation du gonflement mitochondrial des cellules hépatiques chez les escargots traités et témoins	<b>133</b>
<b>55</b>	Variation de la perméabilité mitochondriale au niveau hépatopancréatique chez les escargots témoins et traités	<b>134</b>
<b>56</b>	Variation de la perméabilité mitochondriale (DO 540nm) au niveau hépatopancréatique chez les escargots témoins et traité par l'HEO.	<b>134</b>
<b>57</b>	Effets du BF, HY, HEO et de mixture sur le taux de MDA au niveau mitochondrial chez les escargots témoins et traités	<b>135</b>
<b>58</b>	Variation de la teneur de glutathion ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protéine) au niveau mitochondrial chez les escargots témoins et traités	<b>136</b>
<b>59</b>	Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase au niveau mitochondrial chez les escargots témoins et traités	<b>137</b>
<b>60</b>	Effets de BF, d'HY, HEO et leurs mixture sur l'activité enzymatique catalase au niveau mitochondrial chez les escargots témoins et traités	<b>137</b>
<b>61</b>	Variation de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) au niveau mitochondrial chez les escargots témoins et traités	<b>138</b>

## Liste d'abréviation

<b>Abréviation</b>	<b>Désignation</b>
<b>AChE</b>	Acétylthiocholine esterase
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AGE</b>	Advanced Glycation Endproducts
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>BBC</b>	Bleu Brillant de Coomassie
<b>BF</b>	Bifenthrine
<b>BSA</b>	Bovine Sérum Albumine
<b>CAP</b>	Certificat d'aptitude professionnelle
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcium
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CCTV</b>	Comité de Coordination de la Toxicovigilance
<b>COX</b>	Cyclo-oxygénases
<b>CPG</b>	Chromatographie en phase gazeuse
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>DAC</b>	Development Assistance Committee
<b>DAR</b>	Draft Assessment Repor
<b>DDT</b>	Dichlorodiphényltrichloroéthane
<b>DGAI</b>	Direction générale de l'alimentation
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose létale pour 50 % des individus
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DTNB</b>	Acide 5,5- dithio-bis-2-dinitrobenzoïque
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétra acétique
<b>EFSA</b>	Autorité européenne de sécurité des aliments
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency
<b>ERN</b>	Espèces réactives à l'azote
<b>ERO ou ROS</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavine adénine dinucléotide
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>Fe</b>	Fer
<b>FMC</b>	Association Française de Formation Médicale
<b>GPx</b>	La glutathion peroxydase
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSSG</b>	Glutathion disulfure
<b>GST</b>	Glutathion-S-transférase
<b>HAPs</b>	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>HEO</b>	Huiles essentielles d'écorce d'orange
<b>HE</b>	Huiles essentielles
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HY</b>	Hymexazole
<b>H</b>	Hauteur
<b>IBS</b>	Inhibiteurs de la synthèse des stérols
<b>INA</b>	Institut National d'Agronomie
<b>IPM</b>	Indice de Pauvreté Multidimensionnelle

<b>ISO</b>	International Organization for Standardization
<b>LPO</b>	Peroxydation lipidique
<b>L</b>	Longueur
<b>MDA</b>	Malondialdehyde
<b>Mg</b>	Milligramme
<b>ml</b>	Millilitre
<b>Min</b>	Minute
<b>M</b>	Mole
<b>M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup></b>	Mole <sup>-1</sup> centimètre <sup>-1</sup>
<b>mg/ml</b>	Milligramme/millilitre
<b>Mn</b>	Manganèse
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>Ni</b>	Nickel
<b>NO•</b>	Oxyde nitrique
<b>NO</b>	Oxyde d'azote
<b>NO<sub>2</sub></b>	Dioxyde d'azote
<b>NOAEL</b>	No observed adverse effect level
<b>NOEC</b>	No Observed Effect Concentration
<b>NOS</b>	Oxyde nitrique synthase
<b>O<sub>2</sub>•</b>	Anion super oxyde
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxygène singulet
<b>OH•</b>	Radical hydroxyl
<b>OGM</b>	Organisme génétiquement modifié
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la Santé
<b>ONOO-</b>	Peroxyde nitrite
<b>POP</b>	Persistent organic pollutant
<b>PR</b>	Poids relatifs
<b>Prxs</b>	Peroxyredoxines
<b>PTPM</b>	Pores transitoires de perméabilité mitochondriale
<b>PYRs</b>	Pyréthroïdes
<b>RAC</b>	Reconnaissance des Acquis et des Compétences
<b>RL</b>	Radical libre
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>Se</b>	Sélénium
<b>SM</b>	Spectrométrie de masse
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>TCA</b>	Acide tri chloro-acétique
<b>TNB</b>	Acide thionitrobenzoïque
<b>Trx</b>	Thioredoxin
<b>UV</b>	Ultraviolet.
<b>Zn</b>	Zinc

## Table de matière

Remerciement

Dédicas

ملخص

Abstract

Résume

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste d'abréviation

Introduction generale

### Partie bibliographique

<b>I. Généralités sur les pesticides</b> .....	4
I.1. Historique.....	4
I.2. Quelques définitions.....	7
I.3. Classification des pesticides.....	8
I.3.1. Herbicides.....	8
I.3.2. Insecticides.....	9
I.3.2.1. La Bifenthrine.....	9
I.3.2.1.1. Informations règlementaires.....	9
I.3.2.1.2. Définition.....	10
I.3.2.1.3. Propriétés de la Bifenthrine.....	11
I.3.2.1.4. Caractéristiques générales et mode d'action.....	12
I.3.2.1.5. Comportement dans l'environnement.....	13
I.3.2.1.6. Toxicocinétique de la Bifenthrine.....	14
I.3.2.1.7. Voies d'exposition.....	15
I.3.2.1.8. Toxicité du Bifenthrine chez l'animal et l'homme.....	15
I.3.2.1.9. La bifenthrine insecticides controlées.....	16
I.3.3. Fongicides.....	17
I.3.3.1. L'hymexazole.....	18
I.3.3.1.1. Informations règlementaires.....	18
I.3.3.1.2. Définition.....	19
I.3.3.1.3. Propriétés de l'hymexazol.....	19
I.3.3.1.4. Caractéristiques générales et mode d'action.....	20
I.3.3.1.5. Comportement dans l'environnement et devenir.....	21
I.3.3.1.6. Toxicocinétique de l'hymexazole.....	22
I.3.3.1.7. Effets toxicologiques d'hymexazol chez l'animal et l'homme.....	23
I.3.3.1.8. Effets écotoxique.....	24
<b>II. L'escargot <i>Helix asperca</i></b> .....	<b>25</b>
II.1. Introduction.....	25
II.2. Histoire et origine.....	25
II.3. Etymologie et terminologie.....	26
II.3. 1.Noms communs et vernaculaires de l'escargot <i>helix asperca</i> en algérie.....	26
II.3.2. Noms communs de l'Escargot <i>Helix asperca</i> dans d'autres pays et régions.....	27
II.3. 3. Noms de l'Escargot Petit.Gris avec d'autres langues.....	27
II.3.4. Terminologies propres à l'escargot.....	27
II.4. Présentation et classification de l'espèce <i>Helix aspersa</i> .....	29
II.5.Morphologie de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	29



II.5.1. La coquille.....	29
II.5.2. Le pied .....	30
II.5.3. Anatomie de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	31
II.5.3.1. Système digestif .....	31
II.5.3.1.1. Intestin .....	31
II.5.3.1.2. Hépatopancréas .....	32
II.5.3.2. Système nerveux .....	32
II.5.3.3. Système circulatoire et respiratoire .....	32
II.5.3.4. Appareil reproducteur .....	33
II.5.3.4. 1. Reproduction.....	34
II.5.3.5. Appareil excréteur .....	34
II.6. Différents types de glandes d' <i>Helix aspersa</i> sécrétant le mucus.....	34
II.7. Activités physiologique des escargots .....	34
II.7.1. Activité journalière .....	34
II.7.2. Activité saisonnière.....	34
II.7.3. Estivation .....	35
II.7.4. Hibernation .....	35
II.7.5. Alimentation .....	35
II.7.6. Croissance des escargots.....	35
II.8. Toxicologie et Eco-toxicologie des escargots .....	36
II.8.1. Transfert des polluants chez l'escargot .....	36
II.8. 2. Intérêts de l'utilisation de l'escargot en écotoxicologie.....	36
<b>III. Stress oxydatif.....</b>	<b>38</b>
III.1. Introduction .....	38
III.2. Définition.....	38
III.3. Radicaux libres .....	38
III.3.1. Type des radicaux libres .....	38
III.3.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS Reactive Oxygen Species) .....	38
III.3.1.1.1. Anion super oxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ).....	39
III.3.1.1.2. Radical hydroxyle (OH) .....	39
III.3.1.1.3. Oxygène singulet ( $^1O_2$ ).....	39
III.3.1.1.4. Radical peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).....	39
III.3.1.1.5. Les radicaux peroxyyl $ROO^{\bullet}$ .....	40
III.3.1.1.6. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes .....	41
III.3.1.2. Les espèces réactives à l'azote (ERN). .....	41
III.3.1.2.1. Oxyde nitrique ( $NO^{\bullet}$ ; monoxyde d'azote).....	41
III.3.1.2.2. Dioxyde d'azote ( $NO_2^{\bullet}$ ) .....	42
III.3.1.2.3. Peroxyde nitrite ( $ONOO^{\bullet}$ ).....	42
III.3.1.3. Origine des radicaux libres.....	43
III.3.1.3.1. Origine endogène.....	44
III.3.1.3.2. Origine exogène.....	44
III.4. Conséquences du stress oxydant .....	44
III.4.1. La peroxydation des lipides .....	45
III.4.1.1. Conséquences de la peroxydation lipidique .....	45
III.4.2. Oxydation des protéines .....	46
III.4. 2.1. Conséquences des dommages oxydatifs des protéines .....	46
III.4.3. Dommage de l'ADN .....	46
III.4.3.1. Conséquences des dommages de l'ADN .....	47
III.4.4. Oxydation des glucides .....	47
III.5. Système de défense antioxydants .....	47

III.5. 1. Systèmes antioxydants enzymatiques .....	48
III.5. 1.1. Glutathion peroxydase (GPx).....	48
III.5. 1.2. Catalase .....	48
III.5. 1.3. Superoxydes dismutases.....	49
III.5. 2. Systèmes antioxydants non enzymatiques .....	49
III.5. 2.1. Antioxydants non enzymatiques liposolubles .....	49
III.5. 2.1.1. Vitamine E ( $\alpha$ . tocophérol).....	49
III.5. 2.1.2. Caroténoïdes (Vitamine A).....	49
III.5. 2.1.3. Ubiquinol (Coenzyme Q10) .....	49
III.5. 2.2. Antioxydants non enzymatiques hydrosolubles .....	49
III.5. 2.2.1. Acide ascorbique (vitamine C).....	50
III.5. 2.2.2. Glutathion .....	50
III.5. 2.2.3. Acide urique .....	50
III.5. 2.2.4. Oligoéléments.....	50
III.5. 2.2.5. Bilirubine.....	50
III.5. 2.2.6. Polyphénols .....	50
III.6. Les agents toxiques et la production endogène des ERO.....	51
<b>IV. Huile essentielle d'écorce d'orange.....</b>	<b>52</b>
IV.1. Introduction.....	52
IV.2. Les variétés d'orange.....	52
IV.3. Orange ( <i>Citrus sinensis</i> variété <i>Thomson navel</i> ) .....	52
IV.3.1. Historique.....	52
IV.3.2. Nomenclature.....	53
IV.3.3. Systématique.....	53
IV.3.4. Description botanique et morphologique .....	54
IV.3.5. Composition chimique des écorces d'orange .....	55
IV.3.6. Utilisation de l'écorce d'orange .....	56
IV.3.6.1. Utilisation alimentaire.....	56
IV.3.6.2. Utilisation en produits pharma et para pharmaceutiques .....	57
IV.4. Les huiles essentielles de <i>Citrus sinensis</i> .....	57
IV.4.1. Historique .....	57
IV.4.2. Définitions .....	58
IV.4.3. Localisation.....	59
IV.4.4. Propriétés physico.chimiques des huiles essentielles .....	60
IV.4.5. Compositions chimiques des huiles essentielles .....	60
IV.4.6. Extraction des huiles essentielles .....	62
IV.4.7. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles.....	62
IV.4.8. Activités biologiques des huiles essentielles.....	62
IV.4.8. 1. Activité antioxydante .....	63
IV.4.8.2. Activité anti.inflammatoire .....	63
IV.4.8.3. Activité antiallergique.....	63
IV.4.8.4. Activité antimicrobienne et antivirale.....	63
IV.4.8. 5. Activité anti.cancer .....	64
IV.5. Toxicité des huiles essentielles.....	64
<b>Partie pratique</b>	
<b>I. Choix stratégiques et démarche expérimentale.....</b>	<b>65</b>
I.1. Objectifs détaillés et justification de la démarche expérimentale.....	65
I.2. Choix des modèle biologique.....	65
I.3. Choix des pesticides et des dose .....	65
I.4. Choix des huiles essentielles de l'écorce d'orange .....	66

I.5. Choix de mode de traitement par injection .....	66
I.6.Choix de l'organe.....	67
<b>II. Etude physiologique et comportementale.....</b>	<b>68</b>
II.1. Introduction et objectif d'étude .....	68
II.2.Matériels et méthodes .....	68
II.2.1.Matériels.....	68
II.2.1. 1.Matériel végétal.....	68
II.2.1. 2.Matériel biologique .....	69
II.2.1. 3.Matériel chimique.....	70
II.2.1.4.Matériel d'extraction .....	71
II.2.2 Méthodes .....	71
II.2.2.1.Extraction et analyse de l'huiles essentielles d'orange Thomson naval .....	71
II.2.2.1.1. Extraction.....	71
II.2.2.1.2. Protocole de l'extraction .....	72
II.2.2.1.3. Détermination des rendements des huiles essentielles .....	73
II.2.2.1.4. Analyses de la composition chimique des huiles essentielles d'orange <i>Citrus sinensis</i> .....	73
II.2.3.Méthode de traitement.....	73
II.2.4. Dissection de l'escargot pour le prélèvement des organes.....	75
II.2.5.Observation des effets comportementaux .....	75
II.2.6.Mesures des paramètres physiologiques .....	76
II.2.7.Protocole expérimental.....	77
II.3.Analyse statistique .....	78
II.4. Résultats.....	79
II.4.1. Rendement et composition chimique des huiles essentielles d'écorce d'orange Thomson naval .....	79
II.4.2. Effet sur le comportement.....	81
II.4.3. Effet sur les paramètres physiologiques.....	82
II.4.3.1. La mortalité .....	83
II.4.3.2. Le poids frais moyen des escargots.....	84
II.4.3.3. Le poids frais moyen de l'hépatopancréas .....	85
II.4.3.4. Le poids frais moyen de la coquille.....	86
II.4.3.5. Le diamètre de coquille .....	87
II.4.3.6.La longueur de coquille.....	88
II.5. Discussion.....	89
II.5.1. Rendement et composition chimique des huiles essentielles d'écorce d'orange Thomson naval .....	89
II.5.2. Mortalité.....	92
II.5.3. Réponses comportementales .....	92
II.5.4. Réponses physiologiques .....	93
II.6. Conclusion.....	96
<b>III. Etude de stress oxydatif.....</b>	<b>97</b>
III.1. Introduction et objectif du travail.....	97
III.2. Matériel et méthodes .....	97
III.2.1. Préparation des échantillons .....	97
III.2.2. Paramètres étudiés : .....	97
III.2.3. Extraction et dosage des métabolites .....	98
III.2.4. Dosages des indicateurs du stress oxydant.....	98
III.2.4.1. Dosage de la peroxydation lipidique (MDA).....	98
III.2.4.1.1.Principe : .....	100

III.2.4.1.2.Mode opératoire :	100
III.2.4.1.3. Calcul de la concentration de MDA	101
III.2.4.2. Mesure du Glutathion (GSH et GSSG)	101
III.2.4.2.1.Principe	101
III.2.4.2.1.Mode opératoire	102
III.2.4.2.1.Calcul de la concentration de GSH	102
III.2.4.3. Dosage du Glutathion peroxydase (GPx)	103
III.2.4.3.1.Principe	103
III.2.4.3.2.Mode opératoire	103
III.2.4.3.3.calcul de l'activité de GPx	104
III.2.4.4. Dosage de l'activité de la glutathion S.transférase (GST)	104
III.2.4.4.1.Principe	105
III.2.4.4.2.Mode opératoire	105
III.2.4.4.3.Calcul de l'activité de GST	105
III.2.4.5.Dosage de l'activité de la catalase (CAT)	105
III.2.4.5.1.Principe	105
III.2.4.5.2.Mode opératoire	106
III.2.4.5.3.Calcul de l'activité de la CAT	106
III.2.4.6.Dosage de l'activité acétylcholinestérase (AChE)	106
III.2.4.6.1.Principe	106
III.2.4.6.2.Mode opératoire	106
III.2.4.6.3. Calcul de l'activité de l'AChE	107
III.3. Présentation des résultats et analyses statistiques	107
III.4.Résultats	109
III.4.1. Effet du traitement par la Bifenthrine (BF), l'Hymexazole(HY) et huile essentielle d'orange (HEO) et leur mixture sur la composition biochimique de l'hépatopancréas.	109
III.4.1.1.Effet sur le taux des Protéines	109
III.4.1.2. Effet sur le taux des lipides d'hépatopancréas	110
III.4.1.3. Effet sur le taux des glucides d'hépatopancréas	110
III.4.2. Effet du traitement par la Bifenthrine (BF), l'Hymexazole(HY) et huile essentielle d'orange (HEO) et leur mixture sur les indicateurs du stress oxydant au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Helix aspersa</i>	111
III.4.2.1. Effet sur le taux de Malondialdehyde (MDA)	111
III.4.2.2. Effet sur le taux du glutathion réduit (GSH)	112
III.4.2.3. Effet sur l'activité de GPx	113
III.4.2.4. Effets sur l'activité de la glutathion S.transférase (GST)	114
III.4.2.5. Effets sur l'activité catalas (CAT)	115
III.4.2.6.Impact du BF, HY, HEO et leur mixture sur l'activité de l'acétylcholinestéras	116
III.5.Discussion	117
III.5.1.Effets des pesticides, l'huile essentielle d'orange et de la mixture sur les métabolites tissulaires	118
III.5.2. Effets des pesticides seuls et mixtes sur le statut redox	121
III.5.3. effets préventives des huiles essentielles d'orange sur le statut redox	125
III.5.4.Effets des pesticides et l'huile essentielle sur l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)	126
III.6. conclusion	128
<b>IV. Etude subcellulaire</b>	129
IV.1.Objectif du travail	129
IV.2. Isolement des mitochondries	129

IV.2. 1. Principe.....	129
IV.2. 2. Réactifs.....	129
IV.2.3. Protocole.....	129
IV.3. Mesure de la respiration mitochondriale.....	130
IV.3. 1. Principe :.....	130
IV.3. 2. Réactifs.....	130
IV.3. 3. Protocole.....	130
IV.4. Mesure du gonflement des mitochondries.....	130
IV.5. Estimation de la perméabilité mitochondriale.....	130
IV.6. Mesure des activités enzymatiques mitochondriales.....	130
IV.7. Analyse statistique.....	131
IV.8. Résultats.....	132
IV.8. 1. Effet des pesticides et l'huile essentielle sur la respiration mitochondriale.....	132
IV.8. 2. Effet des pesticides et l'huile essentielle sur le gonflement mitochondrial.....	132
IV.8. 3. Effet des pesticides et l'huile essentielle d'écorce d'orange sur la perméabilité mitochondriale.....	133
IV.8. 4. Suivi des activités enzymatiques et non enzymatiques mitochondriales.....	135
IV.8. 4. 1. Effet sur les taux du malondialdéhyde mitochondrial.....	135
IV.8. 4.2. Taux du glutathion réduit (GSH).....	135
IV.8. 4.3. Activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	136
IV.8. 4.4. Activité de la catalase (CAT).....	137
IV.8. 4.5. Activité de la glutathion S.transférase (GST).....	138
IV.9. Discussion.....	<b>139</b>
IV.9. 1. Effets des deux pesticides et des huiles essentielles d'écorce d'orange sur la respiration, la perméabilité et le gonflement mitochondrial.....	139
IV.9. 2. Effets des deux pesticides et des HEO sur le système antioxydant mitochondriale.....	140
IV.9. 3. Effets des HEO sur la respiration, la perméabilité, le gonflement et le statut redox mitochondrial.....	141
IV.10. Conclusion.....	142
Conclusion générale et perspectives.....	143
Référence bibliographique	
Annexes	



# Introduction generale

INTRODUCTION GENERALE

## **Introduction generale**

Toute substance chimique ou non rejetée dans l'environnement est considérée comme polluant. Si elle pénètre dans un organisme vivant, elle est alors connue sous le nom de xénobiotique. Un contaminant est donc un élément exogène présent dans l'environnement sous forme organique ou minérale, dissous, en suspension ou, plus rarement, sous forme d'émulsion. C'est un élément présent en concentration supérieure à la nature dans un système non contaminé, qu'il s'agisse d'un élément étranger au système ou, à l'inverse, d'un élément familier, au système (**Marteil, 1974**).

Un pesticide est une substance utilisée pour prévenir, détruire, repousser ou contrôler tout ravageur ou maladie animale provoqué par des micro-organismes ou des mauvaises herbes indésirables. Depuis ces découvertes, les traitements aux insecticides, fongicides et herbicides ont émergé dans les domaines agricoles et autres (**Jeroen et al., 2004**). Les pesticides, qui sont facilement disponibles et largement étudiés pour leur efficacité dans les revues et journaux agricoles, sont devenus la principale solution pour lutter contre les infestations. La diminution du nombre et de la variété des organismes utiles (prédateurs et parasites), ainsi que l'augmentation de la résistance des organismes ciblés par les pesticides, ont conduit à une utilisation accrue de ces produits de synthèse. Il en découle une pression accrue sur l'environnement qui entrave le producteur dans une situation difficile à éviter (**Marle-Claude, 2007**).

Avec l'agrandissement de l'agriculture en Algérie, l'application de pesticides sur les cultures est en augmentation (**Yesguer, 2014**). Le document publié par l'Agence européenne de l'environnement, examine la situation en Algérie, où plus de 190 tonnes de pesticides interdits sont actuellement stockées, principalement le DDT, alors que le Maroc a huit tonnes de DDT en stock, la Tunisie moins de huit tonnes et la Turquie 10 tonnes (**Tahar, 2016**).

Les produits phytosanitaires sont classés en plusieurs catégories, avec les trois principales étant les fongicides, les herbicides et les insecticides. Ces trois articles classés représentent presque 97 % du marché mondial. (**Louat, 2013**). La BF est un pyréthrianoïde, une substance active qui a des effets insecticides et acaricides. Le programme communautaire (Directive CE 91/414) a réévalué cette substance en tant que phytopharmaceutique et en tant que biocide (Directive CE 98/8) (**EFSA, 2011**). La BF est un insecticide largement utilisé dans le monde, principalement dans les cultures de maïs, d'orge et de blé. En Algérie, il est également utilisé pour la culture de la pomme de terre et de quelques arbres fruitiers tels que le poirier et le pommier. (**ACTA, 1989**).

L'HY qui est le composant de tachigazol, un fongicide vendu en Algérie. Il fait partie de la famille des triazines (**Tahar et al., 2017**). Malgré ces bénéfices importants dans de nombreux domaines, son utilisation croissante provoque des effets nocifs sur les systèmes biologiques (**IPCS, 1990**).

Les pesticides sont des substances chimiques qui sont largement présentes dans l'environnement et peuvent nuire aux insectes et toxiques pour la vie aquatique et les mammifères (**Steeve, 2013**). L'importance des Invertébrés dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes terrestres et aquatiques justifie l'intérêt d'étendre les recherches et les procédures écotoxicologiques à ces groupes d'animaux (**Ramade, 1992**).

Pour réaliser des études toxicologiques, les organismes doivent fournir des indicateurs de perturbation de l'environnement ou un groupe de créatures utilisées comme gardes en examinant les changements physiologiques, biologiques et écologiques qui ont un impact sur eux. L'escargot (*Helix aspersa*) constitue un modèle biologique largement utilisé dans les études toxicologiques (**Coline druart, 2011**). Les mollusques gastéropodes sont connus pour leur grande capacité d'accumulation des pesticides dans ce contexte.

La toxicité induite par les pesticides, provoque un stress oxydatif important et des changements intenses aux niveaux des marqueurs du stress oxydatif. Pour diminuer les effets nocifs des pesticides, plusieurs substances chimiques ayant des propriétés anti-oxydantes ont été proposées. Les plantes médicinales ainsi que leurs extraits, y compris les huiles essentielles sont largement utilisées pour les propriétés favorables de leurs principes actifs qui ont un rôle thérapeutique comme agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobiens, et antioxydants protecteurs contre les effets oxydatifs (**Ouelbani et al., 2016**). Les huiles essentielles d'orange (*Citrus sinensis*) sont très utilisées par les industries pharmaceutiques et en phytothérapie et sont connues pour leurs propriétés antioxydantes qui peuvent être divisés en fractions volatiles et non volatiles (**Mondello et al., 2005**).

Le premier objectif de cette recherche est d'évaluer les effets toxiques de deux pesticides : la BF et HY, ainsi leurs combinaisons en utilisant l'escargot *Helix aspersa* comme modèle bioindicateur au niveau cytosolique et mitochondriale. Le deuxième objectif est d'évaluer l'effet protecteur des huiles essentielles d'orange (HEO) contre la toxicité produite par ces deux xénobiotiques. Pour atteindre ces objectifs, ce document est divisé en deux parties principales :

- ✓ La première section correspond à une étude bibliographique rassemblant des informations sur les pesticides et leurs effets d'une manière générale en spécifiant



la BF et l'HY. Des rappels sur le stress oxydatif et ses conséquences seront également avancés. Nous allons enfin présenter quelques notions bibliographiques sur les huiles essentielles d'orange et sur le modèle biologique qui est en l'occurrence le petit gris ou *Helix aspersa*.

- ✓ Dans la deuxième section, nous allons exposer la partie pratique divisée en 3 parties :
  - Une partie dédiée à l'étude des aspects comportementaux et de forme morphométrique (poids frais moyen des escargots, coquille hépatopancréas, aussi la longueur et diamètre de la coquille) des escargots exposés aux différents traitements (pesticides et HEO).
  - Une partie consacrée de la détermination de la teneur de l'hépatopancréas, en protéines, glucides et lipides, ainsi que des dosages des biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques suite aux différents traitements.
  - Une partie réalisée au niveau subcellulaire étudiant le gonflement et perméabilité mitochondriale, la respiration cellulaire et le dosage de quelques enzymes de stress oxydant.

Enfin, une Conclusion générale soulignera les avantages de cette étude pour la recherche en toxicologie et en écotoxicologie.



# Généralité sur les pesticides

pesticides

## **I.Généralités sur les pesticides**

### **I.1. Historique**

Les pesticides ont été utilisés pour la première fois dans l'agriculture depuis longtemps (**Connell, 1997**). Il semble que l'utilisation du soufre remonte à la Grèce antique (1000 ans avant J.-C.) et que Pline, un naturaliste romain, a suggéré l'arsenic comme un insecticide. Au XVIe siècle, la Chine et l'Europe utilisaient des produits arsenicaux ou à base de plomb. Dès 1690, le tabac était reconnu pour ses propriétés insecticides. Les racines de Derris et Lonchocarpus, qui contiennent de la roténone, étaient utilisées par les jardiniers en Inde comme insecticides (**Gatignol et étienne, 2010**).

Les progrès de la chimie minérale ont conduit à l'utilisation plus largements des pesticides. Au XIXe siècle, les traitements fongicides à base de sulfate de cuivre sont devenus courants, notamment les bouillies bordelaises ou les fongicides à base de mercure utilisés pour lutter contre les invasions fongiques dont le mildiou sur la vigne et la pomme de terre. Des pesticides tels que l'arsénite de cuivre, l'arsénite de cuivre et l'arséniate de plomb sont également apparus. Cependant, l'utilisation massive de ce produit est controversée car elle provoque une contamination des sols, l'excès de cuivre entraînant la destruction du microbiote du sol. Les pesticides à base d'arsenic ont été largement utilisés vers 1920 lorsqu'on s'est rendu compte que les fruits et légumes transformés contenaient des poisons à des doses mortelles pour les consommateurs (**Duval, 2009**).

L'ère des pesticides de synthèse commence véritablement dans les années 1930 avec le pouvoir insecticide des thiocyanates d'alkyle et d'autres produits comme le salicylanilide en 1931 et les dithiocarbamates en 1934. En 1874, Zeidler synthétise le DDT, dont les propriétés insecticides ont été établies par Muller en 1939 (**Duval, 2009**). Le DDT est devenu disponible en 1943, ouvrant la voie à la famille des organochlorés. Le DDT a dominé le marché des pesticides jusqu'au début des années 1970. En 1944, l'herbicide 2,4D, copié de l'hormone de croissance végétale, est synthétisé. Cet herbicide était utilisé comme composant de l'Agent Orange, un mélange d'herbicides utilisé pendant la guerre du Vietnam qui provoquait diverses maladies (cancer, malformations congénitales, etc.) (**Jeroen et al., 2004**).

Depuis 1945, la famille des organophosphorés a connu des progrès considérables pendant la Seconde Guerre mondiale grâce aux recherches sur la production de gaz de combat. Toutefois, ces produits sont très toxiques et nombre d'entre eux ont été retirés du marché (**Calvet et al., 2005**). Pendant la décennie 1950-1955, aux États-Unis, des herbicides

appartenant à la famille des urées substituées tels que le linuron et le diuron ont été créés. Le plus grand marché des fongicides est actuellement constitué par les fongicides IBS (inhibiteurs de la synthèse des stérols) qui sont des fongicides imidazoliques et triazoliques, qui datent de 1966. Dans les années 1970-1980, les pyréthrinoïdes, une nouvelle catégorie d'insecticides, ont pris le dessus sur le marché des insecticides **(Guy Roy, 2015)**.

La compétition entre les industries phytosanitaires est devenue de plus en plus difficile depuis les années 1990 en raison du grand nombre de produits commercialisés et des exigences réglementaires telles que l'homologation et la normalisation. Plutôt que de se lancer dans la fabrication simultanée d'autres produits, les industriels préfèrent concentrer leurs efforts sur la vente d'un seul produit optimisé pour un usage bien ciblé et la surveillance de la qualité de l'eau et des aliments, la protection et la réhabilitation de l'environnement **(Dorothée, 2011)**.

Des phénomènes de résistance sont apparus à la suite de l'essor de ces produits chimiques chez les insectes, les plantes adventives et certains champignons en raison de mécanismes de mutation du gène cible, de détoxification, de séquestration ou d'hérédité de gènes de résistance. En 2010, les OGM résistants aux herbicides représentaient 93 % du soja, 78 % du coton et 70 % du maïs. De plus, l'utilisation de systèmes de lutte intégrée contre les ravageurs (IPM), qui réduisent l'utilisation de produits agrochimiques et le développement des populations de ravageurs, est devenue plus répandue. Pour limiter ces phénomènes de résistance, l'industrie doit continuer à rechercher et développer de nouvelles molécules **(Deguine, 2008)**.

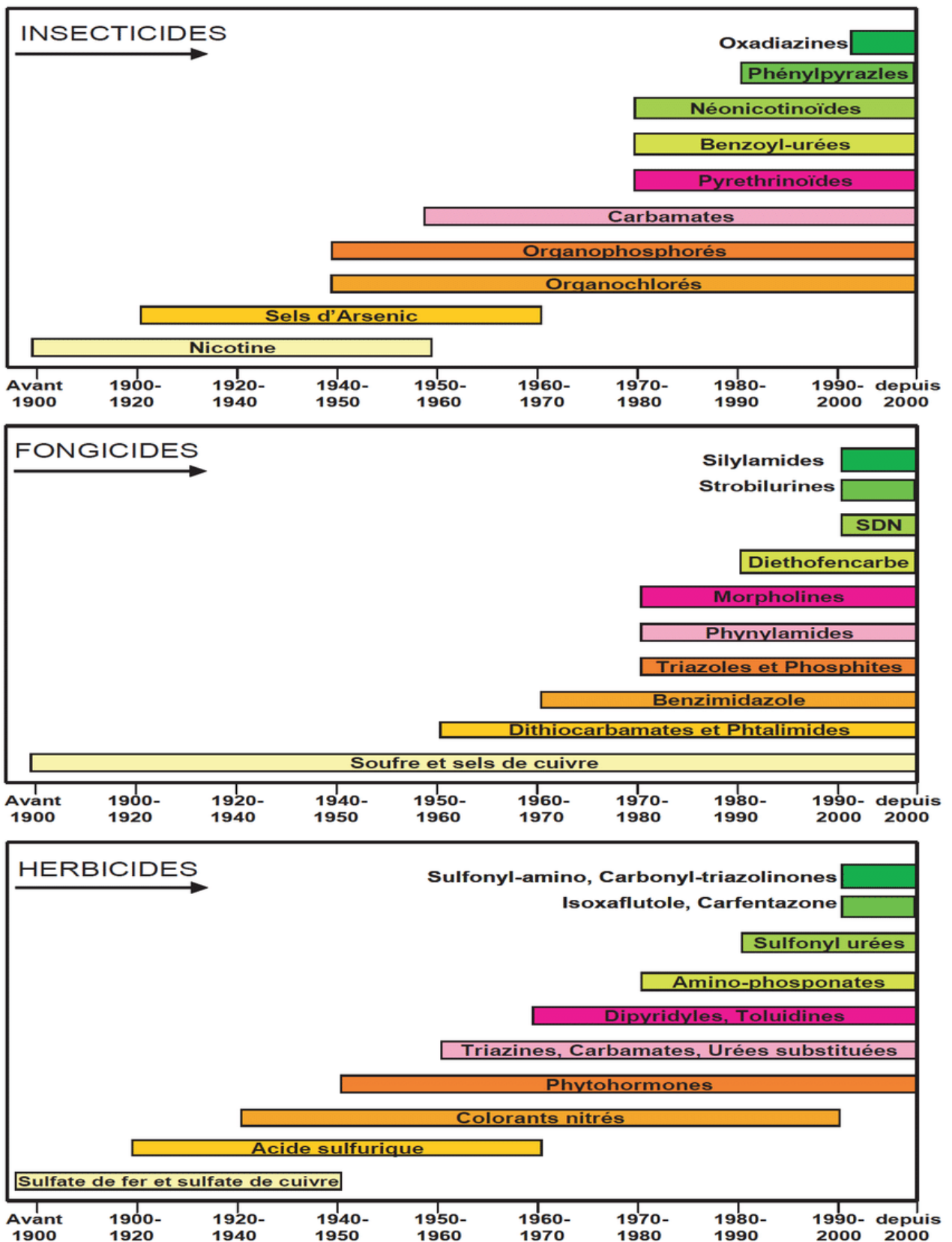


Figure 01 : Histoire des produits phytosanitaires (Abd-Ella, 2011).

## I.2. Quelques définitions

Le terme « **pesticide** » provient du mot anglais « **pest** », qui est dérivé du mot latin « **pestis** », qui signifie un animal, un insecte, une plante ou un nuisible qui peuvent être dangereux pour l'homme et son environnement. Le suffixe «-cide » (du verbe latin caedo, caedere) signifie tuer (**Cotonat, 1996 ; Couteux et Salaün, 2009**).

Selon la FAO, les pesticides sont « toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, les espèces indésirables de plantes ou d'animaux qui causent des dommages ou se montrent autrement nuisibles pendant la production, la transformation, le stockage, le traitement ou l'élevage.

Les pesticides sont des produits chimiques de synthèse, minéraux ou substances organiques, également qualifiés par les fabricants et les utilisateurs de « phytosanitaires » ou, plus récemment, de « phytopharmaceutiques » (**Levet et al., 2008**), conçus pour assurer l'éradication (ou empêcher son fonctionnement) nocifs, animaux, plantes, micro-organismes ou virus. Ils sont largement utilisés dans les cultures agricoles (**Bonvallot et Dor, 2004**).

L'article 2 de la loi n° 87-17 du Journal officiel de l'Algérie relative à la protection phytosanitaire du 1er août 1987 précise les pesticides : " Toute substance ou mélange de substances destiné à repousser, détruire ou combattre des organismes nuisibles, en vue de protéger ou d'améliorer la production végétale ".

Dans les textes liés à la réglementation européenne on distingue :

La directive 91/414/CE du 15 août 1991 désigne " les produits phytopharmaceutiques comme les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentes sous la forme dont elles sont livrées à l'utilisateur" et destinées à :

- ✓ protéger les végétaux ou les produits végétaux contre les organismes nuisibles ou à les empêcher d'agir.
- ✓ protéger les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'ils assurent la conservation des produits végétaux,
- ✓ à condition que les substances ou produits ne soient pas soumis à des dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs.
- ✓ détruire les végétaux indésirables, y compris des parties de végétaux, ralentir ou empêcher la croissance des végétaux.

Les **biocides** sont les produits anciennement appelés " **pesticides à usage non agricole** ".

### I.3. Classification des pesticides

Il est difficile de classer les pesticides qui sont actuellement sur le marché puisqu'ils ont un si large éventail de structures chimiques, de groupes fonctionnels et d'activités (**Merhi, 2008**). Certains classent les pesticides comme herbicides, insecticides ou fongicides. D'autres les classent comme pesticide en fonction de leur cible, de la composition minérale, de leur teneur organique, du lieu d'application ou de leur toxicité (**Djeffal, 2014**).

Chaque catégorie a été démontrée avoir des effets nocifs non intentionnels sur les espèces non ciblées tout en étant explicitement conçue pour cibler les ravageurs (**Ghosal et al., 2018 ; Sánchez-Bayo et Wyckhuys, 2019 ; Fiera et al., 2020**).

Le tableau 1 donne un résumé des principales catégories de pesticides

**Tableau 01** : Classification des pesticides selon leur organisme cible (**PAN, 2019**)

Types de Pesticides	Usage et action	Exemples
<b>Insecticides</b>	Un produit chimique utilisé pour empêcher la destruction, l'élimination ou l'attaque d'insectes qui nuisent, tuent ou attaquent des plantes ou des animaux.	Imidaclopride, Cyperméthrine, Diméthate, Phosate, Parathion de méthyle et Chlorpyrifos
<b>Herbicides</b>	Les substances qui sont utilisées dans la lutte contre les mauvaises herbes et autres plantes qui coexistent avec l'espèce cultivée et le développement des plantes stunt.	2,4-D, 2,4,5-T, glyphosate, Terbis, Butachlore et Acétochlore.
<b>Fongicides</b>	Les substances utilisées pour éradiquer ou prévenir le développement de maladies affectant les plantes et les animaux, ainsi que les champignons.	Ampropylphos, Carbendazim et Carboxine
<b>Rodenticides</b>	Les substances qui tuent les rongeurs	L'oxyde d'arsenic et la Warfarine
<b>Nematicides</b>	Les produits chimiques utilisés pour défendre ou prévenir les nematodes qui nuisent à différentes cultures.	Aldicarb, Carbofuran
<b>Molluscicides</b>	Les substances utilisées pour arrêter le développement des cafards et des boues et les tuer.	Sulfate de cuivre, Gardene, et Fentin.
<b>Régulateurs de croissance</b>	Une substance qui ralentit ou accélère le processus de développement ou de maturation.	Probenazole et Acibenzolar.

#### I.3.1 Herbicides

Les herbicides, communément appelés herbivores, sont des composés actifs utilisés dans l'horticulture pour éradiquer les mauvaises herbes et détruire les plantes (**Andersen et al.,**

**2002**). Il existe trois types d'herbes: les herbes totales, celles qui tuent complètement les plantes et celles qui affectent leurs parties aériennes (**Bouvier et al., 2011**).

Les herbicides agissent sur les plantes à plusieurs endroits, selon **Dorothé (2011)** :

- ✓ perméabilisant la membrane cellulaire et perturbant la photosynthèse.
- ✓ Les perturbateurs de la croissance comprennent l'arrêt de la division cellulaire, l'arrêt de l'élongation et l'arrêt de la synthèse de la cellulose.
- ✓ inhibiteurs de la formation de lipides et d'acide aminés.
- ✓ agents de blocage de la synthèse pour les pigments.

### **I.3.2. Les insecticides**

C'est un grand groupe pesticide utilisé pour éliminer les insectes porteurs de maladies et lutter contre les parasites cultivées (**Hodgeson et al., 2004**). Les insecticides organiques de synthèse sont des molécules carbonées, synthétisées, et se distinguent des insecticides inorganiques ou minéraux. Parmi les insecticides organiques, trois grandes familles se distinguent : les organophosphorés, groupe existant depuis 1944, dont de nombreuses molécules ont été retirées du marché à cause de leur toxicité ; les carbamates, groupe important comprenant également beaucoup de fongicides et d'herbicides ; enfin les pyréthriinoïdes de synthèse, qui présentent une toxicité moindre que les organophosphorés et les carbamates, et s'emploient à faible dose.

Les insecticides jouent un rôle important dans la limitation de populations d'insectes ravageurs et dans l'amélioration de la production agricole, mais aussi ils présentent des effets non intentionnels sur les différentes composantes de l'écosystème, notamment les problèmes écotoxicologiques et toxicologiques sur la faune auxiliaire (**Slamene et al., 2016**). Devant cette situation notre étude s'intéresse à étudier et à déterminer la toxicité chronique d'insecticide **bifenthrine** sur l'escargot ; *helix aspersa*.

#### **I.3. 2.1. La bifenthrine**

##### **I.3. 2.1.1. Informations réglementaires**

La bifenthrine a été découvert et fabriqué pour la première fois aux États-Unis par la FMC Corporation. L'Agence américaine de protection de l'environnement (EPA) a initialement autorisé l'utilisation du document en 1985 (**Riar, 2014**). En tant que produit biocide et en tant que composé phytopharmaceutique dans le cadre du programme communautaire (**directive 91/414**) ce médicament a fait l'objet d'une nouvelle évaluation. La



bifenthrine est classée par l’OMS comme modérément dangereuse (WHO, 1998a). Le rapport d’évaluation (Draft Assessment Report) proposé par l’Etat membre rapporteur (France) est publiquement disponible auprès de l’EFSA, 2006 (Ineris, 2011). Par ailleurs la bifenthrine remplit certains critères de la convention de Stockholm pouvant la classer comme un POP. Il s’agit donc d’une substance préoccupante dont les usages pourraient être extrêmement restreints, dans l’hypothèse où elle serait à nouveau autorisée au niveau communautaire (Jorf, 2010).

La Direction générale de l’alimentation a saisi le Comité de Coordination de la Toxicovigilance pour une description générale des intoxications dues à la BF par un courrier du 16 septembre 2005. La présente étude a pour objet d’analyser les cas d’exposition à la BF collectés par les CAP français entre 2000 et 2005 (Harry *et al.*, 2011).

### I.3.2.1. 2. Définition

La bifenthrine (CAS 82657-04-3) est un dérivé synthétique des pyréthrines que l’on trouve dans les extraits de fleurs de chrysanthème et est utilisée comme insecticide (Grube *et al.*, 2011). Le BF est un cyclopropane carboxylate d’alcool (Nieradko *et al.*, 2015), dont la nomenclature est : 2-chloro-3, 3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylate est présent dans la Figure 02 (Starr *et al.*, 2014). Cette nomenclature est donnée par la formule chimique de  $C_{23}H_{22}ClF_3O_2$  (Abdolah, 2011). Elle appartient à la famille chimique de la troisième génération des pyréthrinoïdes de synthèse (Naumann,1990 ; Davies,1990 ; Ruigt,1985), Il se distingue à la fois par sa structure et sa biologie (structurellement due au fragment d’alcool diphenylique et biologiquement en raison de la forte activité acaricide) (Engel *et al.*,1983). Ce pesticide possède de fortes propriétés insecticides grâce à sa capacité de modifier le fonctionnement des nerfs en modifiant la cinétique des canaux sodique voltage dépendant chez les insectes (Nieradko *et al.*, 2015).

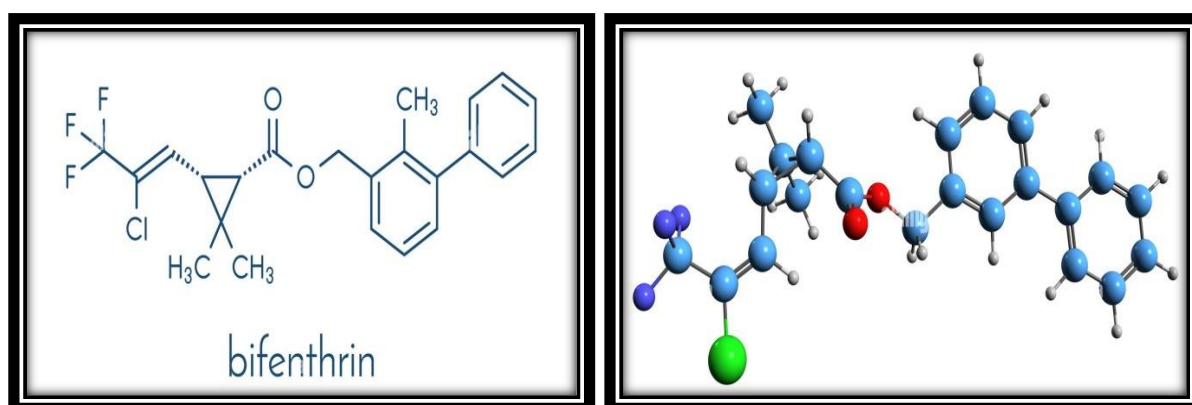


Figure 02 : Formule développée de la Bifenthrine (Alamy, 2017).

### I.3.2.1.3. Propriétés importantes de la Bifenthrine

Les propriétés physique, chimique et toxicologiques de la BF sont résumées dans le tableau 2 :

**Tableau 02 :** les caractéristiques physiques, chimiques et toxicologiques de la BF (Andrew, 1999 ; Boyd, 2002 ; Beausoleil *et al.*, 2009 ; Kaneko, 2010 ; Mokhtari et Mouhouche, 2016 ; Yang *et al.*, 2018 ; Meena, 2022).

Propriétés	Valeur
<b>Formule chimique</b>	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
<b>N°CAS</b>	82657-04-3
<b>Etat Physique</b>	Liquide, visqueux ou un solide, cristallin où cireux
<b>Masse molaire</b>	422,88 g/mol
<b>Point de fusion</b>	66-69 °C
<b>Point bouillant</b>	Décomposition à 285 °C avant ébullition
<b>La densité</b>	1,212 - 1,316
<b>La pression de la vapeur</b>	2,4.10 <sup>-5</sup> Pa à 25 °C
<b>Le point d'éclair</b>	151 °C (coupelle fermée), 165 °C (coupelle ouverte)
<b>Solubilité dans l'eau</b>	<1 µg·L <sup>-1</sup> (pH 4,05) <1 µg·L <sup>-1</sup> (pH 7,04) 3,76 µg·L <sup>-1</sup> (pH 9,22)
<b>Solubilité dans les solvants organiques</b>	Le chlorure de méthylène, l'acétone, le chloroforme et l'éther sont tous solubles dans la bifenthrine. Il peut être légèrement dissous dans le méthanol et l'heptane.
<b>Durée de demi-vie par hydrolyse (eau naturelle, à pH 5, 7 et 9 à 25 °C)</b>	Stable
<b>Constante d'Henry (pH 7, 25°C)</b>	7,20 x 10 <sup>-3</sup> atm.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup>
<b>Coefficient de partage octanol-eau (Kow) :</b>	1,0 x 10 <sup>6</sup>
<b>Demi-vie anaérobie</b>	97-156 jours
<b>Demi-vie aérobie</b>	65- 125 jours
<b>Demi-vie de dissipation dans le champ</b>	122 à 345 jours
<b>Coefficient de partage carbone organique-eau (Koc) :</b>	1,31 – 3,02x10 <sup>5</sup>

**Tableau 02** : les caractéristiques physiques, chimiques et toxicologiques de la BF (**Suite**)

Propriétés	Valeur
Gravité spécifique	(à 25 °C) 1,212 g.mL <sup>-1</sup>
Coefficient d'adsorption dans le sol (Koc)	1,31 - 3,02.105
La photolyse	276-416 jours

#### **I.3. 2 .1. 4. Caractéristiques générales et mode d'action**

Bifenthrin, insecticide, est utilisé dans le monde entier contre une gamme de peste agricoles. Sa faible toxicité chez les mammifères a entraîné une utilisation généralisée à la fois dans les applications agricoles et urbaines. À l'échelle mondiale, les pesticides pyréthrinoïdes, y compris la BF, sont utilisés dans la lutte antiparasitaire contre les cultures agricoles, y compris le coton, en Australie, en Inde et en Chine (**Riar, 2014**).

Les PYRs utilisent un nombre différent de voies pour causer des dommages au système nerveux des invertébrés (**Miller et Salgado, 1985**). En tant qu'agent neurotoxique, la BF induit une ouverture persistante du canal sodique voltage-dépendant via la liaison aux canaux sodiques en prolongeant la dépolarisation neuronale (**Ji et al., 2021**). En maintenant l'ouverture de ces canaux, les pyréthrinoïdes créent une séquence d'impacts électriques dans les neurones qui conduisent à leur dépolarisation (Louise, 2015), ce qui entraîne une variété de symptômes, y compris l'hyperexcitabilité des cellules neuronales (tremors, uncontrollable movements, and salivation) (**Gargouri et al., 2018**). Elle provoque aussi le dysfonctionnement des neurones chez les termites, les mouches et les cafards (**Yang et al., 2018**).

Des études ont été menées sur la façon dont le BF agit sur les récepteurs cannabinoïdes somatiques dans les neurones corticaux des cerveaux de rats nouvellement nés, où des effets toxiques sont souvent générés. Un changement d'hyperpolarisation causé par le BF a également été lié à des concentrations dans les états normaux de l'activation et de l'inactivation du canal, ainsi qu'à la lenteur de la récupération de son inactivation. Ces résultats indiquent que le BF ment et modifie les canaux de sodium à la fois dans les états fermés et ouverts (**Yang et al., 2009**).

Dans le biote, la manière d'action et les caractéristiques chimiques de la BF la rendent très efficace contre les insectes pourtant elle est relativement sans gravité pour les mammifères et les oiseaux une fois appliquée correctement (**Mokrey, 1989**).

### I.3.2.1.5. Comportement dans l'environnement

#### I.3.2.1.5.1. Sol

La BF se lie fortement aux particules du sol en raison de sa valeur élevée de Koc (FMC, 1983) et a tendance à ne pas se déplacer dans le sol. En fonction du type de sol et de la quantité d'air dans le sol, la période de demi-vie du sol varie de 7 jours à 8 mois pour atteindre la moitié de sa concentration initiale (Walker *et al.*, 1992). L'activité microbienne détermine sa dégradation (Alanwood, 2008) (figure 03).

Le schéma suivant représente Les voies de dégradation de la BF dans l'environnement

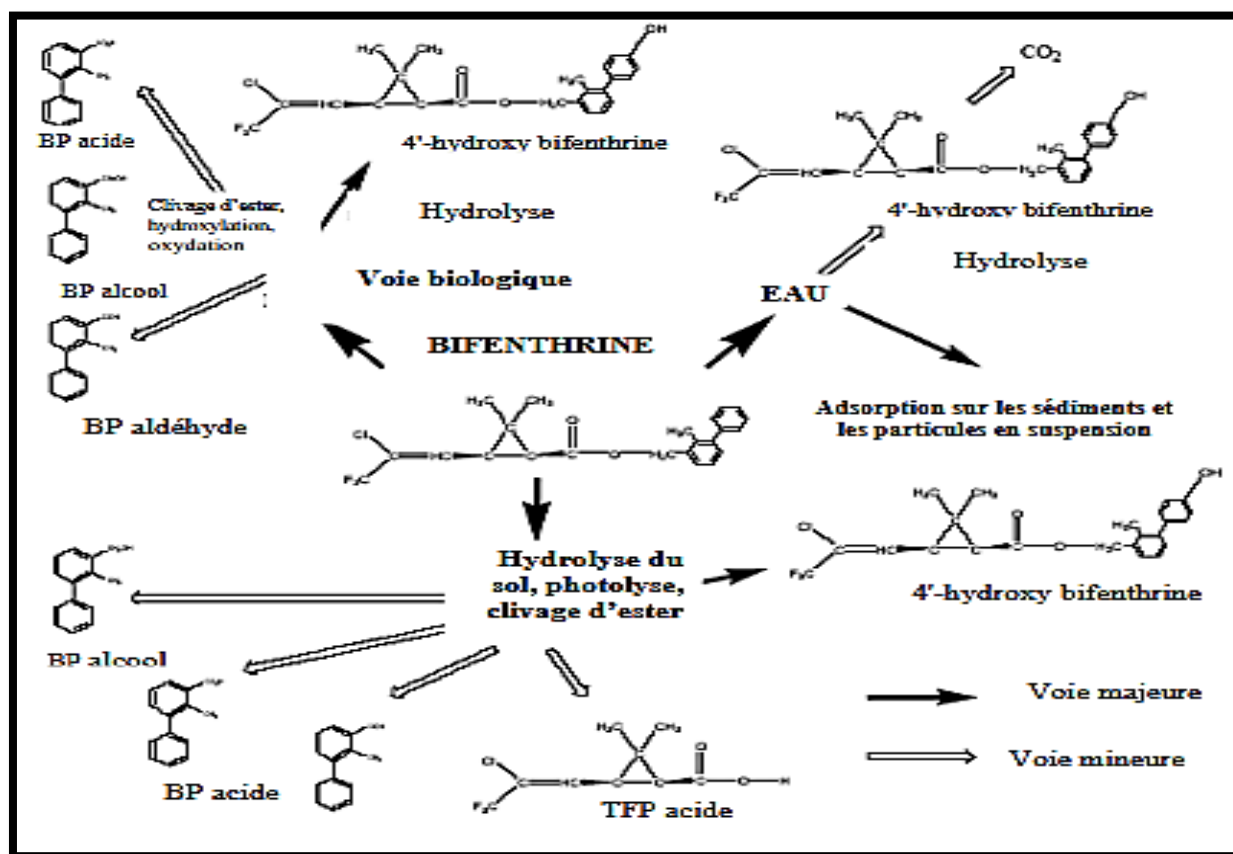


Figure 03 : Voies de dégradation de la bifenthrine dans l'environnement (Bouras, 2009).

#### I.3.2.1. 5.2. Eau

La BF est une molécule non polaire ce qui explique sa faible solubilité dans l'eau (Mokrey, 1989). Elle peut créer une réactivité vers des photolyses aqueuses dont la demi-vie du photolytique varie entre 276 jours à 416 jours. Cela signifie que le pesticide peut demeurer dans l'eau, le sol et la matière organique trouvée dans les eaux, mais il est peu probable qu'il s'évapore dans des eaux de surface (Langley *et al.*, 2003).

### **I.3.2.1.5.3. Air**

Lorsqu'il est appliqué sur un sol sec, le BF a un faible coefficient de volatilisation dans l'air, et un plus grand pour un sol humide, selon la valeur de la pression de vapeur et la constante d'Henry (**Andrew, 1999**). Il peut être détecté dans les dérivés de pulvérisation ou dans l'air lié à des particules de sol (**Boyd, 2002**).

### **I.3.2.1.6. Toxicocinétique de la Bifenthrine**

#### **I.3.2.1.6.1. Absorption**

Environ 50% de la biphenthrine est efficacement absorbée par le système digestif. Sur la base de recherches in vitro sur la peau des rongeurs (ris) et de la peau humaine ainsi que de données in vivo sur les rats, l'absorption cutanée a été estimée à 12 %. Non connu: absorption par les voies respiratoires (**INRS, 2009**). La BF est de nature hydrophobe et le fait que sa préparation commerciale avec les solvants lipophiles peut assurer son passage de la peau facilement et développer une toxicité systémique (**Michael et al., 2015**).

#### **I.3.2.1.6.2. Distribution**

Le transport dans le sang n'est pas documenté sur les escargots terrestres *helix aspersa*. On peut en retrouver dans tous les tissus, mais ils se concentrent surtout dans les tissus contenant beaucoup de lipides comme les graisses ou les tissus nerveux (**Anadon et al., 1991**) parce qu'ils sont liposolubles (**Anadon et al., 1996**). La thyroïde présente des fibres nerveuses qui entourent les adipocytes remplis de tissu adipeux ce qui fait de la glande thyroïdienne un organe cible de la BF (**Madan, 2020**).

#### **I.3.2.1.6.3. Métabolisme**

Bifenthrin passe généralement par trois phases du métabolisme :

- C'est la première étape est un clivage hydrolytique de la liaison ester central (**Beausoleil et al., 2009**).
- La deuxième étape est une oxydation conduisant à des dérivés acide carboxylique ou acide phénoxybenzoïque (**Leng et al., 1997**).
- les métabolites obtenus sont conjugués ensuite généralement avec des composés comme la Glycine, des Sulfates, Acides glucuroniques pour former des complexes très hydrosolubles (**Casida et al., 1983**).

#### **I.3.2.1.6.4. Élimination**

Bien qu'une petite quantité de bifenthrine soit libérée intacte dans les matières fécales, elle est principalement excrétée dans l'urine sous forme de métabolites. Avec 20 à 30% de la

dose expulsée, l'excrétion biliaire semble être la deuxième voie excrétrice la plus courante (Inrs, 2016).

#### **I.3.2.1.7. Voies d'exposition**

Les humains et les animaux étant une partie du même écosystème sont constamment exposés professionnellement à (BF) par la contamination de l'environnement. Il y a trois principales voies par lesquelles les BF peuvent pénétrer dans l'organisme, c'est-à-dire : à l'aide de l'ingestion, par le contact avec la peau, et par inhalation (Fortin, 2009). Aussi par les concentrations élevées dans différents produits alimentaires ou applications thérapeutiques accidentelles par voie orale et dermique. Les expositions par le contact avec la peau, et par inhalation sont généralement associées à de seuls des effets indésirables légers. Des décès sont survenus rarement après une exposition aux PYR<sub>S</sub>, généralement suivant l'ingestion (He *et al.*, 1989).

#### **I.3.2.1.8. Toxicité du Bifenthrine chez l'animal et l'homme**

Les pesticides causent généralement des effets inattendus sur l'environnement. Tout comme la plupart des Insecticides, La bifenthrine à cause de sa grande capacité d'accumulation : "elle est hautement toxique sur les poissons et les invertébrés et les organismes aquatiques "(Ullah *et al.*, 2021).

Depuis 2010, le laboratoire Chrono-Environnement mène des recherches approfondies sur l'embryotoxicité des produits chimiques sur un type de gastropodes terrestres. L'objectif de ces études était de créer un bioassay qui utiliserait les œufs du petit escargot gris *Helix aspersa* (Druart, 2011). Des autres ont évalué la toxicité induite par la BF, y compris l'induction du stress oxydatif, les malformations du développement, la neurotoxicité, la toxicité neurocomportementale, l'immunotoxicité, chez les souris gestantes et les cellules mammaires humaines. Elle présente également des effets endocriniens perturbants, selon Baldi *et al.* (2021).

##### **I.3.2.1.8.1. Toxicités aiguë sur l'animale**

Après une brève exposition, le BF est toxique pour les animaux (OMS, 2005). Lorsqu'il est consommé par les animaux, le BF n'est que légèrement nocif. Lorsque le BF est administré à la peau des rats et des lapins par les voies cutanées, il est quelque peu nocif (Tomlin, 2000).

##### **I.3.2.1.8.2. Toxicités chronique sur l'animal**

Les animaux atteints de pyréthrinoïdes ont des problèmes de comportement, de développement et d'hormones (Koureas *et al.*, 2012). La neurotoxicité de l'exposition

prolongée à la BF comprend des difficultés à marcher et à secouer (**Louise, 2015**). Le poids corporel, le foie et la taille des reins diminuent tous en raison de changements de comportement (**Fortin, 2009**). Les rats n'avaient aucun signe de cancer, tandis que les souris ayant reçu des doses plus élevées avaient plus de tumeurs dans le réservoir souple de l'urine (**Tech, 2008**).

### **I.3.2.1.8.3. Toxicités aiguë et chronique sur la santé humaine**

L'exposition aiguë à la bifenthrine entraîne des symptômes tels que la diarrhée, les nausées et les vomissements (**Grant, 1993**). Étant donné que la plupart des informations sur la toxicité proviennent de la recherche sur les animaux, l'exposition à long terme est peu connue (**Kolaczinski et Curtis, 2004**). Les maladies induites par les pyréthriinoïdes après une exposition chronique n'ont été étudiées que dans un petit nombre de recherches cliniques, expérimentales et épidémiologiques. D'autres facteurs peuvent être la source de symptômes vagues (**Wagner-Schuman et al., 2015**).

Chez l'homme, les niveaux d'hormones liés à l'exposition aux PYRs n'ont pas été concluants à ce jour, partiellement à cause de faibles expositions, ou à des expositions mixtes aux pesticides. Selon l'étude de **Gargouri et al. (2018)**, ils ont fourni des preuves que la BF induit des réponses inflammatoires médiées par le stress, qui favorisent les altérations de l'anxiété et le dysfonctionnement cholinergique.

### **I.3.2.1.9. La bifenthrine insecticides contrôlées**

Le BF est l'un des insecticides que le Ministère de la Santé surveille pour s'assurer qu'il fonctionne comme prévu et pour éviter les effets négatifs sur l'environnement ou la santé humaine qui pourraient résulter de son utilisation (**DHM, 2023**).

**Tableau 03** : Liste des insecticides contrôlés par le ministère de la santé-février 2023 (**DHM, 2023**)

<b>NOM COMMERCIAL</b>	<b>MATIERE ACTIVE</b>	<b>CONCENTRATION</b>
STRONG RAMPANTS	Cyperméthrine	0,1
<b>Fumicide BF</b>	<b>Bifenthrine</b>	<b>10.6g/Kg</b>
Pyrel diffuseur	Huile de citronnelle	6
STRONG VOLANT	Tétraméthrine	0,100
	Perméthrine	0,070
VAPE KO	Tétraméthrine	5
	Bioressthine	5
GOLIATH GEL	Fipronyl	0,005

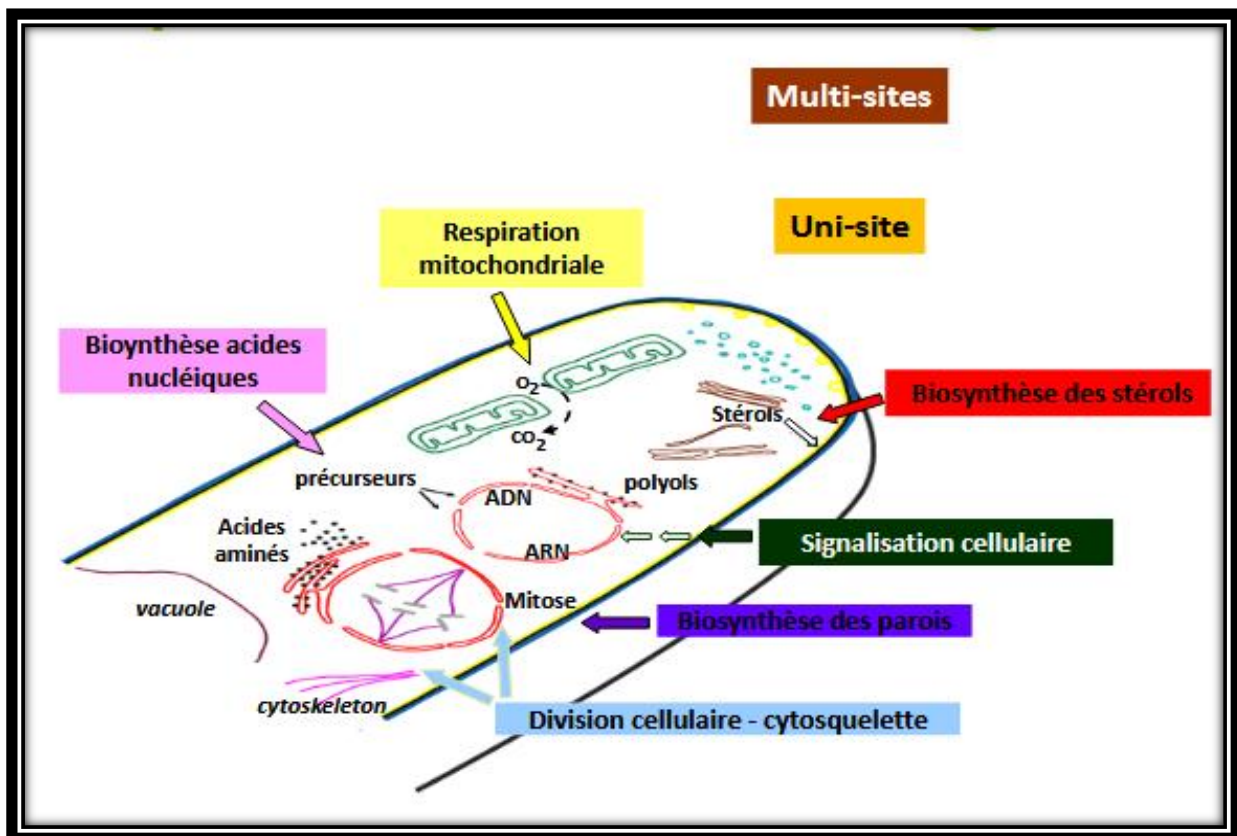
**N.B.** : La liste peut être mise à jour à la lumière des données scientifiques internationales et nationales disponibles.

### I.3.3. Fongicides

Pour protéger les plantes cultivées contre les champignons parasites, les fongicides sont des agents phytopharmaceutiques utilisés pour lutter contre les infections cryptogamiques (CEC, 2003). Les produits chimiques organiques les plus courants sont les carbamates, les triazols et les dérivés du benzène, qui sont dérivés des sels de cuivre et du soufre (Margoum, 2003). On distingue aujourd'hui deux types de fongicides (Hamadache, 2014) :

- ✓ **Curative** : Supprime une maladie existante.
- ✓ **Préventive** : Protège la plante en arrêtant la progression de la maladie.

Il existe une multitude de modes d'action des fongicides représentés dans le schéma suivante (figure 04) :



**Figure 04** : Modes d'action des fongicides

**N. B :** les fongicides multisites (qui agissent sur plusieurs paramètres à la fois).

Nous nous focalisons particulièrement sur l'exemple de l'hymexazole (HY) car il représente le sujet de cette étude.



### **I.3.3.1. Hymexazole**

#### **I.3.3. 1.1. Informations règlementaires**

La notation de danger de HY a été autorisée en 1995, mais révisée en 1998 à la suite d'informations environnementales récentes fournies au Groupe d'experts sur l'impact environnemental.

Une étude d'évaluation des produits phytopharmaceutiques a déterminé que l'hymexazole était un ingrédient actif. Le requérant a retiré l'appui à l'inclusion de HY dans la directive 91/414/CEE du Conseil, de sorte que l'Autorité européenne de sécurité des aliments a procédé à un examen par les pairs, mais la procédure a été terminée (**Anses, 2011**).

Le rapport supplémentaire a été reçu par l'EFSA en 2009. L'EFSA a distribué le document additionnel les pays membres pour observations le 22 septembre 2009. L'EFSA a rassemblé et transmis tous les commentaires reçus au Conseil le 5 novembre 2009. Après avoir examiné le rapport supplémentaire, les commentaires reçus et, le cas échéant, le DAC, la Commission a demandé à l'EFSA de mener un examen ciblé par les pairs dans domaines de toxicologie des mammifères, résidus et de l'écotoxicologie et de présenter ses conclusions sur l'hymexazol. Les résultats ont été tirés à partir de la base de l'évaluation des utilisations représentatives de l'HY comme fongicide sur la betterave à sucre et la tomate, telle que proposée par le demandeur (**EFSA, 2009**).

Le Comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale s'est réuni pour examiner le projet de rapport d'évaluation, le rapport complémentaire et les conclusions de l'Autorité. Sur la base de leurs considérations, la Commission et les États membres ont élaboré leur rapport d'examen sur HY le 23 novembre 2010.

Deux autres études de toxicité pour le développement futur ont été déposées par le demandeur en août 2015, une étude de toxicité de la recherche de l'intervalle de dose chez le lapin blanc de Nouvelle-Zélande gravide par administration de gavage par voie orale (IIA 5.6.2/06) et une étude sur les effets sur la croissance de l'embryon et fœtus chez le lapin blanc de Nouvelle-Zélande par administration de gavage oral (IIA 5.6.2/07). Ces recherches n'ont pas été examinées dans le cadre du programme d'examen des pesticides, mais sont incluses dans la proposition actuelle de CLH (**CLH, 2017**).

### I.3.3. 1.2. Définition

L'ingrédient principal du fongicide systémique des semences de Golden Union Agrochemical, le Tachigazol, qui est vendu en Algérie, est l'hymexazole. Il est un membre de la famille des triazines, avec la formule développée 5-méthyl-3 (2H)-isoxazolone et la forme chimique brute C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>. La structure chimique de ce composé est montrée dans l'image qui l'accompagne. (Figure 05) (Tahar *et al.*, 2017).

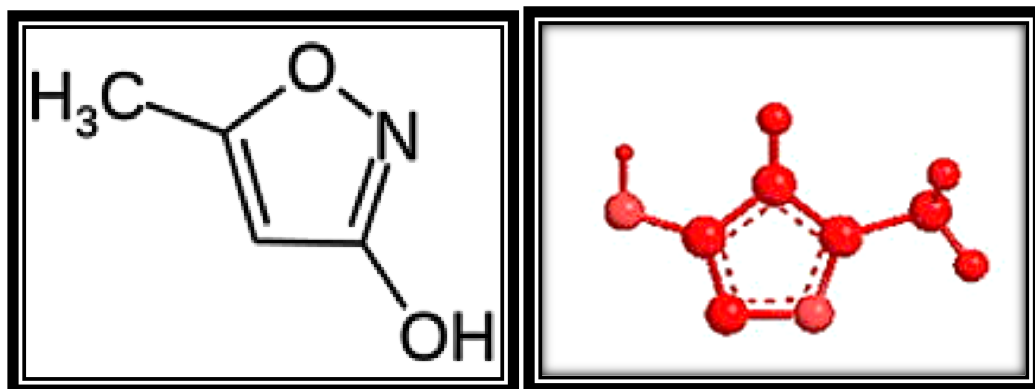


Figure 05 : Structure chimique de l'hymexazole (Tahar *et al.*, 2017 ; Chunli *et al.*, 2023)

### I.3.3.1.3. Propriétés de l'hymexazol

Le tableau 04 présente les caractéristiques physico-chimiques principales de la substance active.

Tableau 04 : Caractéristiques physiques et chimiques principales de la substance active (Whetzel 1993a ; Ristorcelli 2002 ; Bates 2004 ; EFSA, 2010a)

Propriété	Valeur
Classification	Fongicide
No CAS	10004-44-1
Nom chimique	Le " 3-hydroxy-5-méthylisoxazole; 5-méthylisoxazol-3-ol "
Formule moléculaire	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>
Poids moléculaire	99,15
Forme	Cristaux
Couleur	Incolore
Odeur	légère odeur spéciale
Point d'éclair	Sans objet, le point de fusion > 40 °C.
Point de fusion/congélation	83,9 – 84,9 °C
Densité relative de	0,551 g/ml à 22 °C
Solubilité dans l'eau	58.2 g / L (pH 3, 20)
Pureté minimale de la substance active telle que fabriquée	985 g/kg

**Tableau 04 : Caractéristiques physiques et chimiques principales de la substance active  
(Suite)**

Propriété	Valeur
<b>Pression de vapeur (température de l'état, pureté de l'état)</b>	0,182 Pa à 25 °C (99,75 %) (extrapolée à partir de mesures à 303 – 323 °K)
<b>Constante de la loi de Henry</b>	1,4 x 10 <sup>-4</sup> Pa · m <sup>3</sup> · mol <sup>-1</sup> solubilité dans l'eau (99,1 %) : 65,1 g/l à 20°C pression de vapeur (99,75 %) : 0,0925 Pa à 20 °C
<b>Inflammabilité : (pureté de l'état)</b>	Pas très inflammable. (99.96 %)
<b>Propriétés explosives :(pureté de l'état)</b>	Non explosif. (99.96 %)
<b>Propriétés comburantes : (pureté de l'état)</b>	Non oxydant. (99.96 %)
<b>État de la substance à 20 °C et 101,3 kPa</b>	Solide cristallin blanc jaunâtre
<b>Valeur du Ph</b>	6-9
<b>Point d'éclair</b>	non inflammable
<b>Pression de vapeur</b>	0,182 Pa à 25 °C, extrapolée à partir de mesures à 303 - 323 °K (n = 4)
<b>Point d'ébullition</b>	La substance se décompose avant l'ébullition.
<b>Tension de surface</b>	72,1 mN/m à 20 °C (solution de 1 g/l).
<b>Solubilité dans l'eau</b>	65,1 g/l à 20 °C, eau non tamponnée 58,2 g/l à 20 °C, PH 3 67,8 g/l à 20 °C, PH 9
<b>Coefficient de partage noctanol/eau (Kow)</b>	Log Pow = 0,48 à 25 °C, non tamponné. " PH 4 : log Kow = 1,01 à 25 °C " " PH 7 : log Kow < 0,3 à 25 °C " " PH 9 : log Kow < 0,3 à 25°"
<b>Stabilité des solvants organiques et connaissance des produits de dégradation associés</b>	Solvant, solubilité : "acétone 730 g/l à 20 °C (99,1 %) " "dichlorométhane 602 g/l à 20 °C (99,1 %) " " acétate d'éthyle 437 g/l à 20 °C (99,1 %) " " hexane 12,2 g/l à 20 °C (99,1 %) " " méthanol 968 g/l à 20 °C (99,1 %) " " toluène 176 g/l à 20 °C (99,1 %) "
<b>Constante de dissociation.</b>	pK <sub>a</sub> = 5,92 à 20 °C
<b>Viscosité</b>	Sans objet, l'hymexazol est à l'état solide

#### **I.3.3.1.4. Caractéristiques générales et mode d'action**

Le fongicide systémique HY a été lancé dans les années 1960 comme agent pour réduire les maladies des semis, améliorer la vigueur et augmenter la résistance au froid dans le riz. L'hymexazol, un fongicide à large spectre, s'est avéré efficace pour combattre les maladies des plantes provoquées par *Pythium*, *Aphanomyces cochlioides* (Payne et William, 1990), fusarium (Myresiotis *et al.*, 2012) et autres champignons tels que *Mortierella sp.* (Tsao et Guy, 1977) et *Rhizoctonia solani* (Zhongyi *et al.*, 2011). Il a donc été largement utilisé dans la betterave sucrière (Harveson *et al.*, 2007), les légumes (Katsube et Nekoduka, 2002), riz (Liu *et al.*, 2004) et etc. pour contrôler les semis et la pourriture des racines (Yongmei, 2017).

L'hymexazol appartient au groupe chimique hétéroaromatique et affecte les organismes cibles en inhibant la synthèse de l'ARN. Il présente un faible potentiel de toxicité pour les mammifères et les poissons, bien qu'il soit soluble dans l'eau. De plus, il a la capacité unique d'inhiber les espèces d'*Aphanomyces* et de *Pythium* sans affecter les autres oomycètes, y compris de nombreuses espèces de *Phytophthora* (Kato, 1990). En raison de ces propriétés, il est largement utilisé dans les milieux sélectifs de *Phytophthora* pour inhiber *Pythium* dans les dilutions du sol ou les isolements racinaires. L'HY est également le seul fongicide homologué qui contrôle à la fois *Aphanomyces* et *Pythium* (Harveson, 2007).

Des enquêtes sur son mode d'action ont été menées sur *Fusarium oxysporum* et *Pythium spp.* Sur *Fusarium*, il a été suggéré que l'HY interfère avec les synthèses d'ARN et d'ADN. Sur *Pythium*, il a été suggéré que l'HY interfère uniquement avec la synthèse de l'ARN. L'HY affecte la croissance mycélienne et la sporulation de *Pythium* mais pas les zoospores et la germination. À l'entrée dans la cellule, l'HY transforme rapidement en glucosides. L'O-glucoside a une activité fongicide, alors que le N-glucoside n'est pas fongitoxique. Le N-glucoside a été associé à certains effets favorisant la croissance des plantes, tels que la stimulation du développement des poils racinaires latéraux chez les plantules (Ypema, 2003).

Bien que les deux agents pathogènes énumérés sur l'étiquette causent la pourriture des racines, ce qui implique que l'HY devrait être présent dans la plante après la germination pour la protection contre la maladie, une étude sur le métabolisme de la betterave à sucre (MRID 42826314) sur la détermination de l'utilisation alimentaire / non alimentaire, trouve des preuves substantielles que l'HY se métabolise rapidement (se dégrade) en CO<sub>2</sub> dans la plante et est ensuite incorporé dans les sucres (Tanja, 2015).

L'hymexazol est homologué comme fongicide, mais il peut aussi servir de régulateur du taux de croissance (Payne et William, 1990).

#### **I.3.3.1.5. Comportement dans l'environnement et devenir**

##### **I.3.3.1.5.1.Sol**

- ✓ Dans les incubations de laboratoire dans le sol dans des conditions aérobies dans l'obscurité (quatre sols étudiés), l'HY présente une persistance faible à modérée ne formant aucun métabolite majeur ou mineur non transitoire du sol.
- ✓ À mesure que le pH du sol augmente, la mobilité de l'HY augmente.

- ✓ La dégradation de l'HY après 7 jours dans le sol à 15, 20, 25 et 30 °C est en moyenne de 3,3, 7,8, 15 et 24 %, respectivement et se poursuit dans le temps.

#### **I.3.3.1.5.2. Eau**

- ✓ Lors d'incubations en laboratoire dans des systèmes aérobies de sédiments naturels (au total, trois systèmes ont été étudiés), l'HY a montré une faible persistance, formant le métabolite principal 5-méthyl-2 (3H) oxazolone, et son métabolite étaient principalement présents dans la phase aqueuse.
- ✓ Très forte solubilité dans l'eau.
- ✓ Il existe une forte probabilité que les eaux de surface soient contaminé (flaque, rosée, ruisseau etc.) et des milieux aquatiques, humides et ressources hydriques.
- ✓ Très longue durée de vie dans l'eau (**Toxibees, 2023**).

#### **I.3.3.1.5.1. Air**

- ✓ Avec une constante de la loi de Henry de  $1,4 \times 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\text{mol}^{-1}$  et une pression de vapeur de 0,182 Pa à 25 °C, on s'attend à ce qu'une proportion de l'HY appliqué se volatilise, bien que les méthodes d'application pour les produits d'un traitement des semences et d'un trempage entraînent une volatilisation plus faible que celle résultant de l'application par pulvérisation à la surface du sol.
- ✓ La proportion d'HY appliqué qui atteindra la haute atmosphère ne devrait pas être soumise à un transport atmosphérique à longue distance, car sa demi-vie atmosphérique calculée à la suite d'une dégradation oxydative photochimique est nettement inférieure à 2 jours (0,64 heure) (**EFSA, 2010b**).

### **I.3.3. 1.6. Toxicocinétique de l'hymexazole**

#### **I.3.3.1.6.1. Absorption**

Selon une étude menée sur des rats mâles, l'HY administré par voie orale unique était rapidement absorbé, de l'ordre de plus de 95% de la dose (**Utip *et al.*, 2013**).

#### **I.3.3. 1.6.2. Distribution**

L'hymexazole est largement présent dans les tissus corporels des rats, avec des concentrations plus élevées dans le foie et les reins que dans le cerveau, les muscles et la graisse corporelle qui a des concentrations plus faibles, principalement dans les 12 heures suivant l'administration de l'hymexazole par voie orale (**IPCS, 1990**).

### **I.3.3.1.6. 3. Métabolisme**

Largement métabolisé, principalement par conjugaison avec des acides glucuroniques et sulfuriques pour former l'hymexazol-O-sulfate et l'hymexazol-O-glucuronide (EFSA, 2010). Le métabolisme de l'HY, 3-hydroxy-5-méthylisoxazole, marqué avec le C<sup>14</sup> en position trois ont été examinés après une administration orale unique à des rats mâles. L'HY était rapidement absorbé et distribué dans les tissus. Pendant 24 heures, > 95 % de la radioactivité totale était une partie dans les fèces et une partie dans l'urine. Taux d'excrétion légèrement inférieur à forte dose et chez les femelles (Ando *et al.*, 1974).

### **I.3.3.1.6. 4. Elimination**

Chez le rat, l'hymexazole est éliminé de manière presque équivalente par les fèces et l'urine. L'élimination urinaire représente 97%, l'élimination fécale 0,89% et 0,86% dans l'air expiré. L'HY peut être éliminée soit sous forme de " 3-(beta-D-glucopyranuronosyloxy) -5-méthylisoxazole et 5-méthyl-3-isoxazolyl sulfate ", soit sous forme inchangée (Decourtye, 2004).

### **I.3.3.1.7. Effets toxicologiques d'hymexazol chez l'animal et l'homme**

La recherche sur la toxicité environnementale de l'hymexazol a été limitée. L'HY est très dangereux pour les êtres aquatiques. Un risque élevé a été identifié pour les invertébrés aquatiques et les organismes vivant dans les sédiments (Finland, 2010).

#### **I.3.3. 1.7.1. Toxicité aiguë sur l'animal**

L'examen de l'étude de l'EPA et l'évaluation des risques de l'EFSA (2010) faisant état d'une toxicité orale aiguë et de contact chez les abeilles mellifères comme DL50 > 100 µg/abeille et CL50 >100 µg /abeille, respectivement, pour la technique HY, suggèrent que le risque pour les abeilles mellifères sur une base orale aiguë et par contact devrait être faible.

La toxicité de l'HY pour *Tetrahymena pyriformis* est la plus faible parmi les pesticides testés, y compris la métribuzine, le clopyralide, le glyphosate et le bentazon (Saratovskikh, 2013).

Le DL50 oral des rats est de 1600 mg/kg, alors que celui des lapins est de 2000 mg/ kg. Les cobayes en tirent une peau sensible car il est un peu irritant pour la peau et les yeux. Les rats ont un taux élevé de HY CL50 dans l'air de > 0,65 mg/L, ce qui peut être un signe de toxicité (ARA, 2007).

### **I.3.3.1.7. 2. Toxicité chronique sur l'animal**

La toxicité chronique d'HY résumée dans les pointes suivantes :

- ✓ Les dommages causés par HY peuvent affecter les reins et le foie chez les rats. Après deux ans d'exposition, les doses commençant à 63 mg/kg de poids corporel par jour chez les hommes entraînent ces lésions (**Ando et al., 1974**).
- ✓ L'hymexazole n'est pas mutagène dans ses effets. Les cellules de hamster chinois de 61,67 à 2,220 g/ml ont démontré des effets négatifs des altérations génétiques dans les cellules germinales et les cellules de mammifères (**CEC, 2003**).
- ✓ Chez les rats administrés jusqu'à 61 mg/kg/jour, une étude n'a révélé aucun effet négatif sur les indices de procréation et seuls des symptômes de sensibilité chez les jeunes ont été observés après une exposition prénatale et postnatale (**Sánchez et Goka, 2006**).

### **I.3.3. 1.7.3. Toxicité sur la santé humaine**

En ce qui concerne la toxicité aiguë de HY chez l'homme, aucune information particulière n'est disponible. Aucune toxicité humaine n'a été détectée, selon le Dar, alors que la santé des travailleurs de l'usine était surveillée. L'HY de qualité technique est fabriqué au Japon depuis plus de 30 ans depuis son lancement en 1970. De même, une préparation « Tachigaren » 70 WP (70 % p/p d'hymexazol comme seule substance active) et « Tachigaren » 30 L (30 % p/p d'HY comme seule substance active) est formulée au Japon depuis plus de 30 ans. Il n'y a eu aucun symptôme lié à l'HY, à 'Tachigaren' 70 WP ou à 'Tachigaren' 30 L.

Aucun cas clinique ou incident d'empoisonnement de la population générale n'a été signalé et il n'y a aucun rapport de la littérature ouverte concernant les cas cliniques et les incidents d'empoisonnement (**CLH, 2017**).

### **I.3.3.1.8. Effets écotoxiques**

Il y a une pénurie d'informations sur l'éco-toxicité des poissons, des oiseaux et d'autres créatures. Les poissons avaient un CL50 de 460 et 165 mg/L après 48 heures, comparativement à un LD50 oral d'un oiseau de 1085. D'autres espèces avaient des concentrations mortelles de 28, 29 et 15,7 ppm, respectivement, dans leur corps (**Hill, 1989**).



L'escargot *helix*  
*aspersa*

*aspersa*



## II. L'escargot *helix aspersa*

### II.1. Introduction

Les invertébrés terrestres sont des éléments essentiels des écosystèmes et sont essentiels à la structure, aux fonctions et aux services fournis par le sol (**González et al., 2020**). L'herbivore et l'escargot *Helix aspersa*, l'un de ces invertébrés est important pour de nombreux écosystèmes. Il peut par conséquent être la cause des transferts de contamination dans la chaîne alimentaire tropicale puisqu'il est la cible de plusieurs prédateurs, y compris les oiseaux, les mammifères et les invertébrés. C'est pourquoi l'influence de la pollution sur de nombreux processus physiologiques et comportementaux est de plus en plus évaluée à l'aide de ce gastropode terrestre (**Aït-Hamlet, 2019**).

### II.2. Histoire et origine

Les escargots font partie de l'alimentation humaine depuis le début des temps. Les coquilles découvertes par les archéologues dans les cavernes où vivaient nos ancêtres sont la preuve que les escargots étaient auparavant récoltés pour la consommation à cette période (**Jean-Claude, 2019**).

Dédale a utilisé un fil de soie pour connecter une coquille spirale pour lui permettre de passer à travers une fourmi dans l'œuvre grecque du quatrième siècle Christinger. La "**Guerre contre la Jugurtha**" de Salluste raconte l'histoire d'un soldat encerclant un fort avec des écharpes et apportant de l'eau à un camp à travers une brèche, grâce aux adeptes des escargots.

Au premier siècle après Jésus-Christ, les escargots étaient consommés comme nourriture à Rome et en Grèce, affirme André. Ce sujet est abordé par Varron dans son livre "Rural Agronomy Treaty".

Il reste inconnu ce qui a déclenché l'apparition d'*Helix Aspersa* et comment elle s'est propagée. Pallary (1901) évoque l'espèce dans "presque tous les dépôts quaternaire de l'Afrique du Nord", tandis que Taylor (1910) liste les endroits où l'espèce a été découverte sous forme fossile ou sous-fossile, en fonction des sources publiées : les dépôts quaternaires à Villefranche-sur-Mer datés par Caziot au Pleistocène moyen, les falaises de Toga à Bastia en Corse Caziot (1911) et Maury (1912) ont trouvé l'hélice *aspersa* dans les dépôts argilosables de Montalban et le Petit Piol, avec des restes de coquilles marines du Pliocène supérieur.

**Taylor (1910)** remet en question l'existence de l'espèce dans les îles britanniques avant l'Holocène, mais affirme qu'elle a été découverte en Angleterre dans des débris de cuisine du Néolithique. Selon **Evans (1972)** seuls les Romains ont introduit l'espèce en Angleterre.

**Morel (1974)** a récemment découvert un *Helix aspersa* dans des sables limoneux interstratifiés prémindeéliens dans les formations quaternaires des quartiers ouest de Nice.

Les marins espagnols et portugais qui se ravitaillent à La Rochelle et accumulent une réserve de "viande fraîche " à bord connaissent bien l'escargot *Helix aspersa* " Petits-gris ". Les habitants actuels des Antilles, les escargots, ont probablement leurs origines à cette époque et à ce lieu.

Une espèce de snail de mer est *Helix aspersa*. Les informations géologiques concernant le bassin méditerranéen oriental sont manquantes, il n'est donc pas clair si l'espèce s'est répandue dans toute la Méditerranée au cours du Pleistocène inférieur ou moyen ou s'il a été principalement trouvé dans les nations du bassin médiéval occidental (**Henry, 1977**).

### II.3. Etymologie et terminologie

Le nom français "escargot", probablement dérivé du mot espagnol "caracol", a été utilisé pour la première fois en France par des marins d'Espagne et du Portugal à La Rochelle. Les termes "**hélice**" (en relation avec l'architecture de sa coquille), "**limon**" et "**colimaçon**" doivent être ajoutés à cette description.

Les espèces des escargots connues sous le nom d'*Helix aspersa*, parfois appelées "Petit-Gris", "Z'gargou", ou "Boujaghlel" en Algérie, sont très répandues sur le front méditerranéen d'Alger. L'Afrique du Nord et l'Europe sont incluses dans sa gamme écobiogéographique. En 1774, le scientifique danois Otto Friedrich Müller a écrit une description de l'espèce.

#### II.3.1. Noms communs et vernaculaires de l'Escargot Petit-Gris en algérie

- ✓ "Z'gargou" زَقْرَفُو , "S'gargou" سَقْرَفُو , "Babbouch" بَبُوش , "Boujaghlel" بُوَجَّغْلَل , "Boujaghlelou" بُوَجَّغْلَلُو et "Boukrar" بُوَكْرَار (en arabe dialectal algérien et langage populaire).
- ✓ "Avellarousse" أفيلاروس , "Aarousse", "Averjehlellou" ou "Ajaghlel" أجاغلال, nom de la coquille, et par extension celui de l'escargot (en kabyle).
- ✓ "Ajoughlel" ou "Bouchkham" (en chaoui).
- ✓ "Al-halazoune" الحلازون , "Al-bazzague" البَزَاق (en arabe littéraire).

### II.3.2. Noms communs de l'Escargot *helix asperca* dans d'autres pays et régions

Le petit gris est connu sous le nom de (Jean-Claude, 2019) :

- ✓ "héllice chagrine ", " luma " ou " limât ", " tapada " (en Provence).
- ✓ " cagouille " (en Bordeaux - Charentes).
- ✓ "carago " (en Marseille).
- ✓ "luma "(en Poitou), il est possible que le mot "luma" provienne de l'Italie (de Lumace).
- ✓ " cacalan "(en Provence).
- ✓ "cantareu "(en Nice).
- ✓ "casaraulau " (en Languedoc).
- ✓ " casaulada " (en Roussillon).

### II.3.3. Noms de l'Escargot *helix asperca* avec d'autres langues

- ✓ "Escargot Petit-Gris, Escargot des jardins, Cagouille ou Luma (en français littéraire et langage populaire)".
- ✓ "Brown Garden Snail (en anglais)".
- ✓ "Caracol común de jardín (en espagnol)".
- ✓ "Braun garten schnecke (en allemand)".
- ✓ "Grigiolina dei giardini (en italien)".

### II.3.4. Terminologies propres à l'escargot

Le tableau suivant montre une explication détaillée de certaines terminologies propres à l'escargot :

**Tableau 05** : Explication de certains termes (Zaafour, 2013).

Terminologies	Explication
" Une escargotière"	Le terme " escargotière " peut s'appliquer à une variété de choses, y compris un endroit où les escargots sont conservées et nourries, un plat particulier avec de minuscules alvéoles dans lequel les escargots sont insérés avant de les cuire ou une collection d'un amas de coquilles des escargots trouvées dans un dépôt ancien.

**Tableau 05 : Explication de certains termes (Suite)**

<b>Terminologies</b>	<b>Explication</b>
<b>"Un mollusque (embranchement des Mollusca)"</b>	- Molluscum est un mot latin scientifique et Mollusca est un mot latin classique.
<b>"Un gastéropode ou gastropode, (classe des Gastropoda)"</b>	- Un gastêr est un mollusque qui habite dans l'eau salée, les eaux douces, ou d'autres environnements humides et a un large pied moyen musclé et souvent une coquille dorsale spirale.
<b>"Un pulmoné (sous-classe des Pulmonata)"</b>	est une espèce de mollusque gastropode terrestre qui respire par un poumon, y compris le Scarlet, la Limace et le Limne.
<b>"L'héliciculture"</b>	Un escargot comestible, qui tire son nom du mot grec pour spirale
<b>"La coquille"</b>	La plupart des mollusques et des brachiopodes ont un squelette extérieur fait de calcaire dur appelé conchylium, qui est produit par une partie du manteau.
<b>"Le manteau (Chez les mollusques)"</b>	Un pli du tégument appelé le mantellum, qui est dérivé du mot latin pour "mantum", couvre la masse viscérale et sécrète souvent une coquille qui ne reste pas connectée.
<b>"Helix"</b>	<i>Helix pomatia</i> et Petit-gris ( <i>Helix aspersa aspersa</i> ), deux espèces bien connues des escargots gourmands du genre <i>Helix</i> , avec des coquilles enveloppées.
<b>"L'escargotage"</b>	est le meurtre des escargots dans les vignes ou les arbres.
<b>"Naissain"</b>	(du mot né) : un mollusque juvénile nouvellement élevé (shrimp, oysters, or molds).

## II.4. Présentation et classification de l'espèce *Helix aspersa*

Le gastropode pulmonaire mollusc *Helix aspersa* (**Figure 06**) est un membre de la famille des helicidae, sous-famille des helicinae, et de l'ordre des stylommatophores (**Beaumont et Cassier ; 1998**).

Comme il est décrit par **Bonnet et al. (1990)**, l'*Helix aspersa* escargot est classé comme suit :

- **Règne** : Animalia
- **Embranchement** : Mollusca
- **Classe** : Gastropoda
- **Sous-classe** : pulmonés
- **Ordre** : Stylommatophora
- **Sous-ordre** : Helicina
- **Super-** : Helicoidea
- **Famille** : Helicidae
- **Genre** : Hélix
- **Espèce** : *Hélix aspersa*
- **Sous-espèce** : *aspersa* (**Barker, 2001**)



**Figure 06:** Escargot *Helix aspersa* (**Ali et Dehri, 2021**).

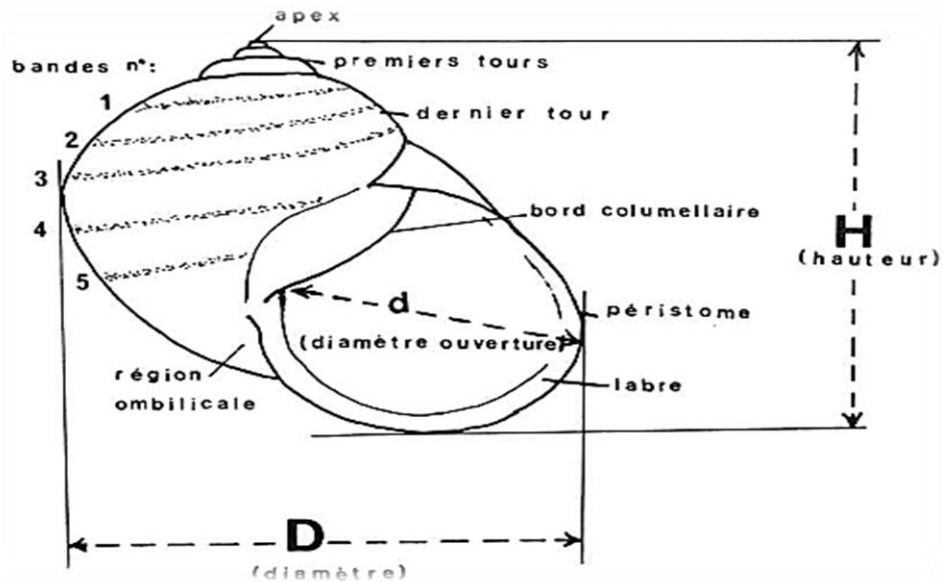
## II.5. Morphologie de l'escargot *Helix aspersa*

### II.5.1. La coquille

C'est un tube en calcaire en forme de spirale avec un fond concave. Le sommet ou le sommet du cône, est composé des plus anciennes tours. Selon **Daguzan (1983)**, les tours se rejoignent pour créer une tige de suture. Selon les critères de mesure et de description indiqués dans (**figure 07**), l'ouverture de la coquille est limitée par le péristome après le dernier tour (**Stiévenart et Hardouin, 1991**).

La coquille globulaire et spirale (**Larba, 2014**) *helix aspersa* présente une vaste diversité de couleurs et de formes, avec deux groupes principaux : en général, les coquilles sombres et les colorations lumineuses (**Taylor, 1910**).

Un tiers du poids frais d'un escargot est composé de la coquille, qui est composée de 98% de carbonate de calcium, de calcite et d'aragonite en termes de minéraux (**Chevalier, 1992**).



**Figure 07 :** Critères de description et de mensuration de la coquille de *helix aspersa* (Henry, 1977).

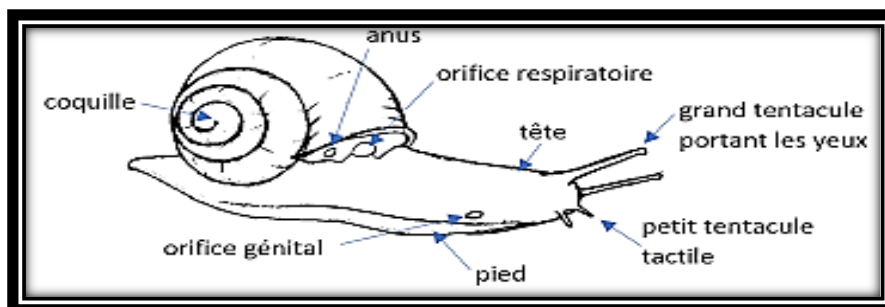
### II.5.2. Le pied

Un tiers du poids des escargots est composé des composants organiques et minéraux de sa coquille. Un cadre de protéines constitue la portion organique, tandis que le carbonate de calcium constitue une portion minérale. Le pied de *Helix aspersa* fournit un appui au corps et permet de progresser par reptation. Le cœur, le système génital, les reins, les hépatopancréas, les soles pédiculaires et musculaires, et le système digestif sont parmi les viscères.

Une tête et deux ensembles de tentacules forment le pied (Figure 08) :

Les tentacules de contact avant sont de petite taille, tandis que les tendons arrière de l'œil sont énormes en taille.

Au sommet du pied, vers le bord de la coquille, il y a deux ouvertures qui peuvent être identifiées comme l'entrée respiratoire et l'anus (Mebirouk, 2017).



**Figure 08 :** Morphologie externe de l'escargot (Kerney *et al.*, 2006).

### II.5.3. Anatomie de l'escargot *Helix aspersa*

La figure 09 montre toute l'anatomie de l'escargot *Helix aspersa*, y compris tous les organes et systèmes.

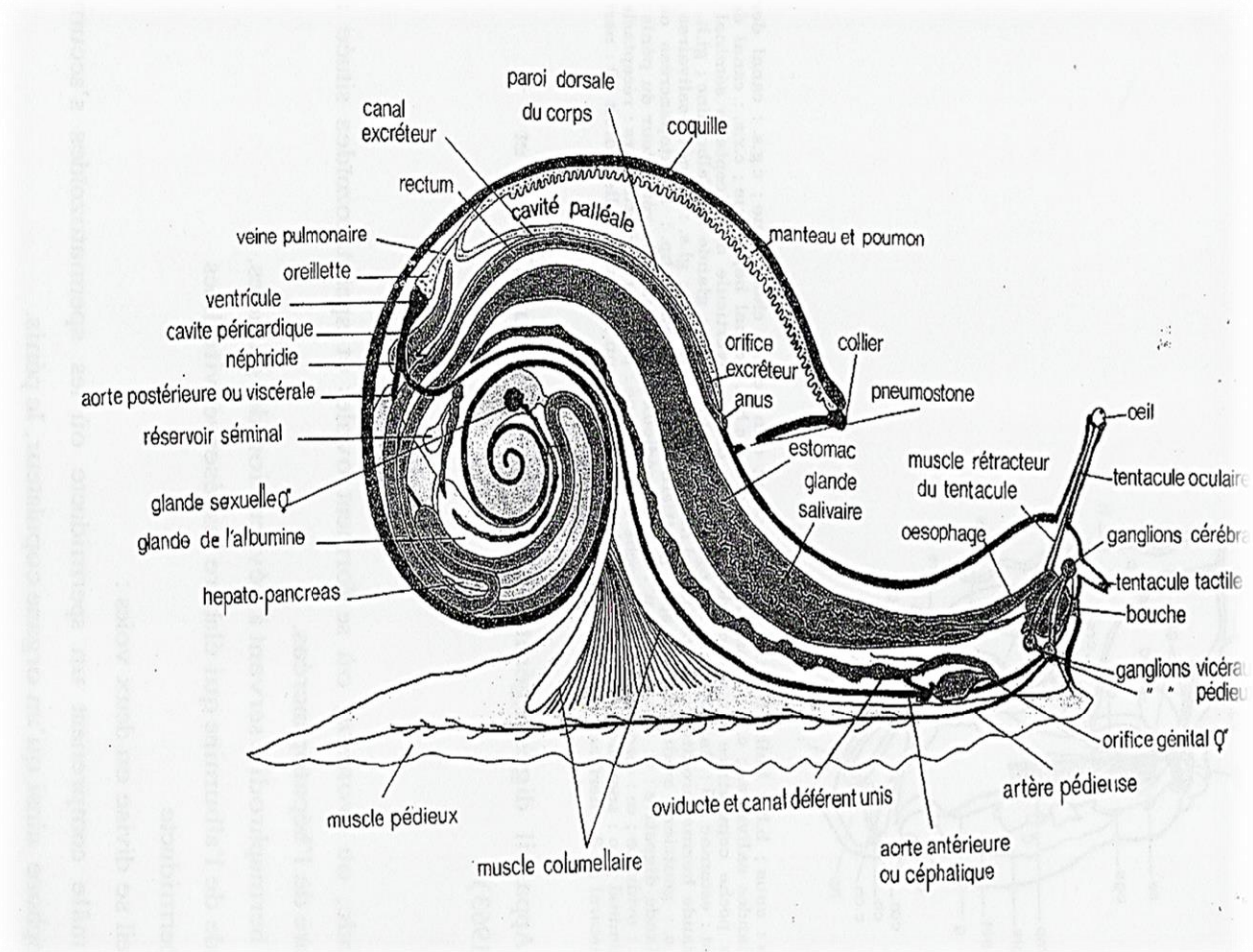


Figure 09 : Anatomie d'un escargot (Cazin, 2014).

#### II.5.3.1. Système digestif

L'anus est ramené vers l'avant par une boucle formée par le tube digestif. L'œsophage, l'estomac, les intestins, les glandes salivaires, le bulbe buccal, la radule et l'hépatopancréase créent une double circonvolution qui se termine dans l'anus (Thompson, 2005).

##### II.5.3.1.1. Intestin

L'intestin se développe de la lumière à la périphérie et a une forme tubulaire avec un diamètre constant et des pliures élevées, elle est formée :

- ✓ Composant une couche alternante de cellules revêtues, cellules ciliées et cellules glandulaires dans un simple épithélium prismatique.

- ✓ une tunique peu épaisse faite de tissu conjonctif.
- ✓ Comprend une couche de fibres musculaires lisses qui est sous-développée (Sandrine et Henri, 2011).

#### II.5.3.1.2. Hépatopancréas

L'hépatopancréase, un organe considérable dans la masse viscérale, se compose de deux lobes reliés par un canal hépatopancréatique et est entouré de tissu conjonctif et de fibres musculaires lisses. De nombreux tubules sont disposés l'un à côté de l'autre pour créer son enveloppe, avec des lacunes pour la circulation hémolymphe.

Un épithélium droit et élevé constitue la paroi des tubules hépatopancréatiques. Il est composé de trois types de cellules, chacune ayant une morphologie distincte :

- ✓ **Les cellules sécrétoires** sont responsables de la digestion extracellulaire des nutriments et sont chargées de créer les enzymes digestives qui sont pompées dans la lumière des tubules.
- ✓ **les cellules absorbant** qui effectuent la digestion intracellulaire en phagocytosant les particules alimentaires à partir de la lumière des tubules.
- ✓ **les cellules basales** qui permettent la régénération d'autres types de cellules (Sandrine et Henri, 2011).

#### II.5.3.2. Système nerveux

*Helix aspersa* a un système nerveux sympathique composé de nodules oraux et cérébroïdiens reliés par des cordes nerveuses et un système neuronal central logé dans la région cérébrale composé d'un collier double périphérique esophagien compliqué (Pirame, 2003).

#### II.5.3.3. Système circulatoire et respiratoire

Les composantes de son système circulatoire et respiratoire sont les suivantes :

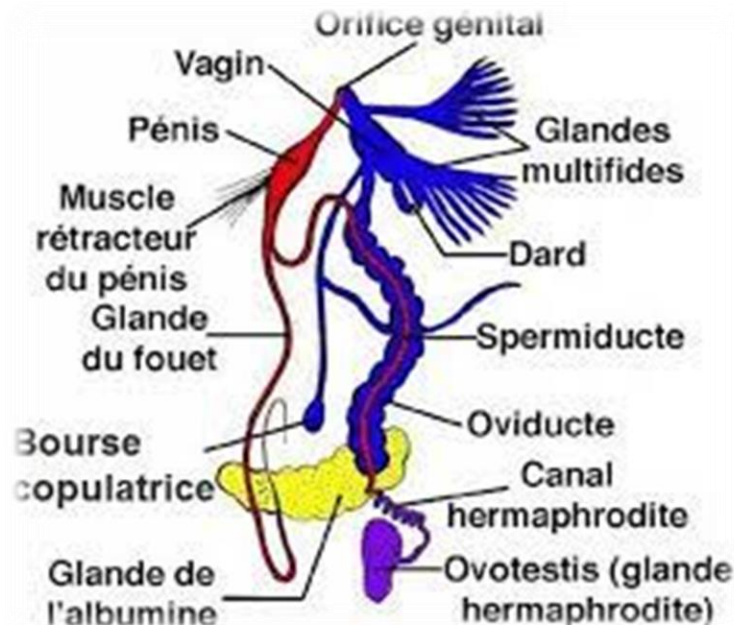
- ✓ **Le cœur** qui a un seul oreillette et un ventricule.
- ✓ *Helix aspersa* ainsi que d'autres mollusques terrestres et marins, produisent du sang ou de l'hémolymphe comme liquide physiologique. Un système veineux et une artère sont utilisés pour circuler l'hémolymphe. Il y a deux aortes qui la conduisent dans le réseau artériel. Les hémocytes, une sorte de cellule, et l'hémocyanine sont tous les deux présents (Sanchez *et al.*, 1998 ; Adamowicz et Bolaczek 2003).



- ✓ **Le poumon** est un compartiment fait d'épithélium pallial qui est irrigé par les artères pulmonaires et dans lequel l'air est circulé par des mouvements de contraction du pneumostome (**Sandrine et al., 2003**).
- ✓ **L'hémocyanine** est un membre de la famille des protéines métalliques qui ressemble à une protéine et fonctionne comme un transporteur d'oxygène (**Markl, 2013**).

#### II.5.3.4. Appareil reproducteur

L'appareil complexe de l'escargot (**figure 10**) comprend à la fois les organes mâles et femelles, tels qu'une glande génitale, un canal hermaphrodite pour l'évacuation des gamètes, une glande albumine pour les réserves de vitelline, et un ovispermidukt pour le mouvement des spermatozoïdes et des œufs d'une main. Tous ces organes sont exclusifs à l'escargot.



**Figure 10** : Schéma de l'appareil génital de l'escargot (**Djatita, 2019**)

Le système génital est séparé en deux voies :

La voie mâle, qui contient le spermatophore et le conducteur de sperme, et la voie féminine, qui comprend le vagin et la poche qui sécrète le dard de calcaire pendant l'accouplement. Pour une reproduction saine, les deux voies sont nécessaires (**Sandrine et al., 2003**).

#### **II.5.3.4.1. Reproduction**

L'escargot *Helix aspersa*, un animal hermaphrodite, nécessite un accouplement pour la reproduction et l'auto-fertilisation. Ils sont dans la phase masculine pendant l'accouplement, et leur maturité sexuelle est influencée par le climat et la température. L'accouplement prend plusieurs heures et la mise prend 12 à 48 heures, ce qui donne 80 à 140 œufs.

#### **II.5.3.5. Appareil excréteur**

Le rein unique, également connu sous le nom d'organe de Bojanus, est un organe triangulaire de couleur gris-jaune situé entre le cœur et le rectum. Il est composé de deux parties : une bonne partie excrétrice et une vessie d'accumulation à partir de laquelle un canal urinaire mince mène à un orifice d'excrétion située entre l'anus et le pneumostome (**Popple et Tribune, 2002**).

### **II.6. Différents types de glandes d'*Helix aspersa* sécrétant le mucus**

Huit glandes unicellulaires qui sécrètent du mucus à travers des lacunes entre les cellules épidermiques ont été découvertes par Marie en 1961 au pied de la plante *Helix aspersa* et au bord du manteau. Il existe au moins huit types distincts de mucus, mais les trois variétés les plus courantes sont le mucus de protéines, le calcium carbonate granule mucus et les sécrétions pigmentées contenant des flavones.

### **II.7. Activités physiologiques des escargots**

#### **II.7.1. Activité journalière**

La température négative et les circonstances hygrométriques peuvent interférer avec les activités quotidiennes de l'escargot, qui sont fortement liées à la photopériode. 9 °C et 80% d'humidité relative sont les conditions idéales (**Chevalier, 1992**). Après le coucher du soleil, les escargots entrent dans leur phase d'activité de 6 heures, qui dure jusqu'au matin et est suivie d'une période d'inactivité plus courte, moins de 18 heures (**Agro-service., 2004**).

#### **II.7. 2. Activité saisonnière**

L'incapacité de contrôler la température corporelle, selon **Daguzan (1981)**, caractérise l'escargot comme un poikilotherme. Il s'adapte aux fluctuations de chaleur saisonnières via les trois étapes physiologiques de l'estivation, l'hibernation et l'activité. Alors que l'hibernation réduit le métabolisme pendant les mois plus froids, les étivations ralentissent la vie dans les

saisons chaudes et sèches. Les augmentations de la reproduction adulte, du développement juvénile et de l'activité motrice se produisent au printemps et à l'automne.

### **II.7. 3. Estivation**

L'animal se déplace lentement ou semi-lentement dans des climats d'été chauds et secs, se retirant entièrement à l'intérieur de sa coquille fermée en utilisant du mucus et des minéraux de calcaire. Bien que la respiration et le rythme cardiaque restent normaux pendant l'estivation, les réserves d'eau et d'énergie s'épuisent rapidement (**Sandrine *et al.*, 2003**).

### **II.7. 4. Hibernation**

Il faut un certain temps à un escargot pour ouvrir sa coquille en hiver parce que l'animal devient lent et sécrète du mucus. Ils dépendent de leurs stocks de glycogène puisque leur métabolisme ralentit lorsqu'ils hivernent. Jusqu'à 30% de leur poids peut être perdu par les escargots, mais au printemps, ils le retrouvent rapidement (**Gomot, 1989**).

### **II.7. 5. Alimentation**

Les plantes de jardin peuvent être endommagées par l'*Helix aspersa*, une espèce phytophage, coprophage, detritivore et parfois cannibale. Dans ses intestins, il a des microbes qui aident la plante à être digérée. Les bactéries mangent le mucus dans les intestins lorsqu'elles hivernent (**Charrier *et al.*, 2006**). Sur de grandes feuilles ortie, le petit gris mange la nuit (**Iglesias et Castillejo, 1998**).

### **II.7. 6. Croissance des escargots**

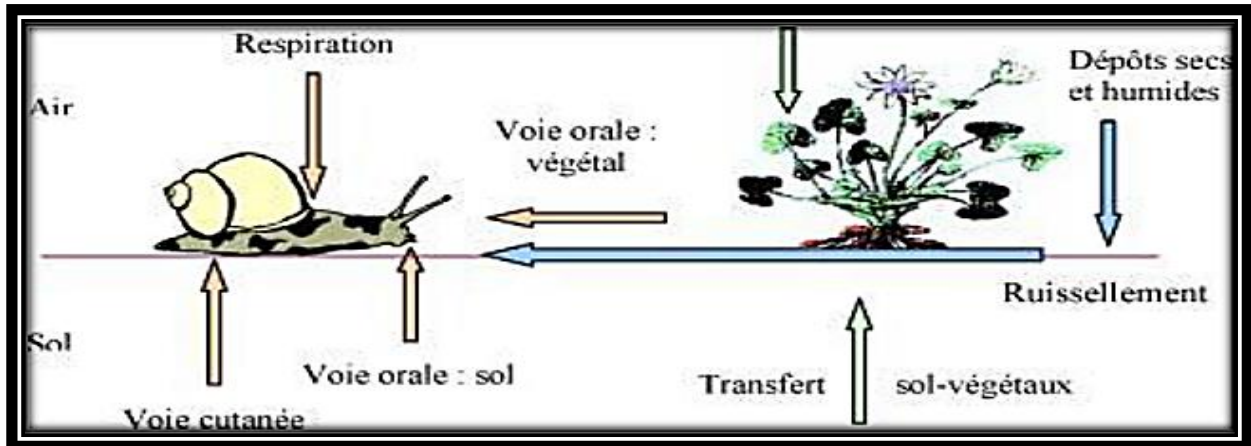
Les phases infantiles, juvéniles, sexuelles et adultes de croissance nulle sont les quatre étapes du développement des escargotes. Les voies génitales non différenciées sont présentes dans la phase infantile, tandis que les voies sexuelles structurées et la gamétogénèse active sont présentes dans la période juvénile. Alors que la phase adulte, qui a une croissance négligeable et pèse entre 6 et 14 g, permet la reproduction et le développement des glandes voisines féminines, la période de maturité sexuelle.

Après avoir traversé un processus de croissance normal qui comprend le pallier, l'été et l'hibernation, les escargots atteignent généralement la maturité sexuelle dans le deuxième ou le troisième été après la naissance. La température, l'humidité, la lumière et la composition du sol et de la nourriture sont quelques-unes des variables qui affectent le développement. Dans la nature, les escargots peuvent vivre de 6 à 7 ans en moyenne (**Lalmi et Lazreg, 2016**).

## II.8. Toxicologie et Eco-toxicologie des escargots

### II.8.1. Transfert des polluants chez l'escargot

Les escargots intègrent plusieurs sources de contamination qui sont accessibles par diverses voies d'exposition à l'interface sol-plante-atmosphère (**figure 11**) :



**Figure 11** : Différentes voies des contaminations *d'Helix aspersa* (**Brooks & White, 1995**)

- ✓ digestion par la consommation alimentaire.
- ✓ La peau des contaminants du sol diffusant à travers l'épithélium du pied.
- ✓ Inhalation de produits chimiques dangereux et/ou de particules d'air pendant la respiration (**Belhouari, 2012**).

### II.8.2. Intérêts de l'utilisation de l'escargot en écotoxicologie

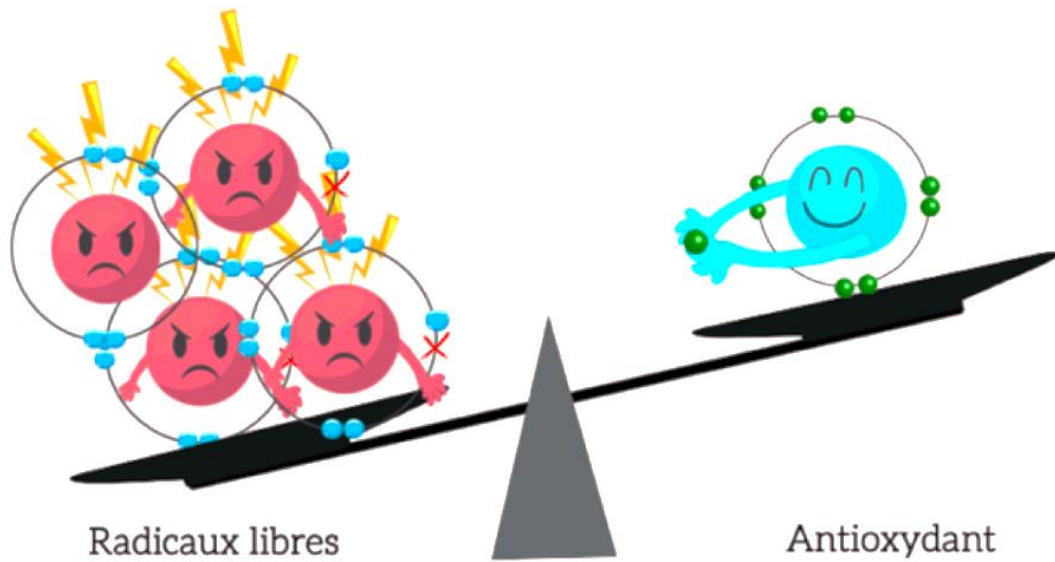
La recherche souligne l'importance que revêtent les indicateurs de bioaccumulation pour résister à de grandes concentrations de polluants et que les espèces de bioindicateurs d'impact sont sensibles aux modestes changements environnementaux (**Fränzle, 2006**).

De nombreuses espèces des escargots terrestres, telles que *Helix aspersus* (**Snyman et al., 2003**), *Lymnaea stagnalis* (**Mahmoud et Desouky, 2006**), *Potamopyrgus antipodarum* et *Lymnaea luteola L* (**Sangita et Khangarot, 2010 ; Panget et al., 2012**).

En plus d'être soumis à des essais pour la toxicité des pesticides, le genre *Helix*, lorsqu'il est cultivé dans des conditions favorables, peut servir de biomarqueur de la contamination terrestre. L'utilisation de ce type d'escargots dans la recherche toxicologique a augmenté récemment, par exemple l'étude d'**Aït-Hamlet et al (2019)** sur l'effet du thiaméthoxame et de la téfluthrine sur le même genre *Helix*. Selon **Zouaghi et al (2020)**, la toxicité du mélange insecticide sur les escargots *Helix aspersa* entraîne des perturbations physiologiques du poids

et du diamètre de la coquille et de nombreux changements métaboliques. **Bakkouche et Said (2021)** ont également étudié la toxicité de la deltaméthrine sur *helix aspersa* ; L'exposition a détecté des troubles physiologiques, biochimiques et histologiques. Attendu que la toxicité de l'acétamipride et de la téfluthrine a été étudiée sur la même espèce par **Benbouch et Bendiaf (2022)**. Cependant, en ce qui concerne l'insecticide bifenthrine, sa toxicité a été étudiée sur *E. Fetida* (**Chang et al., 2016**).

La plupart des études actuelles ne tiennent pas compte de la bioaccumulation des fongicides organiques chez les invertébrés terrestres, probablement en raison de leur analyse complexe. La majorité des études disponibles concentrent sur les vers de terre, montrant, par exemple, la bioaccumulation du tébuconazole, du furalaxyl, du pentachloronitrobenzène et du tolclofos-méthyl chez *E. fetida* (**Svobodová et al, 2018**). Le carbendazime et le prochloraz peuvent induire des changements morphologiques dans la paroi corporelle et le tractus gastro-intestinal de même espèce (**Liu et al, 2012**).



Stress oxydatif

Stress oxydatif

### III. Stress oxydatif

#### III.1. Introduction

**Hans Selye** a initialement proposé l'idée du stress oxydatif cellulaire dans les années 1930 (**Selye, 1936**). Il décrit comment un organisme réagit à un stimulant ou à un stressor, perturbant son état d'adaptation (**Selye et Fortier, 1949**). Depuis lors, cette idée a été largement utilisée, avec des définitions plus modernes mettant l'accent sur la surcharge de l'environnement sur les mécanismes réglementaires d'un organisme (**Grandjean, 2005**).

#### III.2. Définition

Le stress oxydatif, souvent appelé stress oxydant, se développe lorsque le rapport entre les pro-oxydants et les antioxydants est déséquilibré. Ce déséquilibre provoque des dommages oxydatifs aux constituants cellulaires tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques et augmente la probabilité de mutation cancéreuse (**Almasiova et al, 2012**).

#### III.3. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques avec des électrons uniques dans une orbite extérieure qui augmentent leur réactivité par oxydation (**Halliwell, 1989**). Elles ont généralement une courte durée de vie de quelques millisecondes ou nanosécondes et sont identifiées par un point qui désigne l'emplacement de l'électron libre (**Goto et al, 2008**).

Il existe trois méthodes qui peuvent produire des radicaux libres (**Chavan et Melinkeri, 2013**) :

- ✓ L'ajout d'électrons libres à un non-radical :  $NR + e^- \rightarrow R^\cdot$
- ✓ Chaque fois qu'un non-radical perd un électron :  $NR - e^- \rightarrow R^\cdot$
- ✓ séparation homolytique de liaison covalente

##### III.3.1. Type des radicaux libres

Les espèces réactives tombent principalement dans deux grandes catégories, selon **Sies (1991)** :

- ✓ espèces qui réagissent à l'oxygène (ERO).
- ✓ ERN est l'acronyme de Nitrogen Reactive Species.

##### III.3.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS Reactive Oxygen Species)

Les "espèces réactives d'oxygène" (**Figure 12**) sont des dérivés d'oxygène qui sont très réactifs en raison d'une partie de leurs électrons étant dans un état énergétique excité. Certains

de ces dérivés ont un électron non couplé, qui est un radical libre (**Tsumbu et al., 2012**). Les radicaux libres d'oxygène peuvent être trouvés dans le monoxyde ( $1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), et l'anion de superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ), ainsi que dans les produits chimiques réactifs non-radicaux oxydants.

#### **III.3.1.1.1. Anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )**

Selon **Birben et al. (2012)**, l'oxygène moléculaire est donné un électron pour créer l'anion de superoxyde. Au fur et à mesure que les électrons traversent la chaîne respiratoire, ce radical est le premier à se développer (**Siein, 2014**). La NADPH oxydase, l'oxydase de xanthine, les cyclooxygénases (COX), les lipo-oxygénases, les synthases d'oxyde nitrique NOS, le réticul endoplasmique lisse (cytochrome P450), et les enzymes de la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries sont parmi les nombreuses enzymes qui facilitent ce processus (**Cai et Harrison 2000**).

#### **III.3.1.1.2. Radical hydroxyle (OH)**

Les radicaux libres d'oxygène les plus réactifs, les hydroxyliques, peuvent interagir avec les protéines, l'ADN, les glucides et les nucléotides pour former des lésions nécrotiques. (**Favier, 2003**). Les réactions suivantes peuvent résulter de la réduction de le  $H_2O_2$  et produire un radical hydroxylique (OH) :

- ✓  $H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow OH^{\cdot} + HO^{\cdot} + Fe^{+3}$  (Réaction de Fenton)
- ✓  $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow HO^{\cdot} + O_2 + OH^{\cdot}$  (Réaction de Haber-Weiss)

Pour la cellule et ses parties constituantes, c'est l'ERO le plus nocif. Il possède une réactivité très élevée associée à un potentiel oxydatif très élevé tout en ayant une durée de vie très courte et étant incapable de passer les membranes (**Robineau et al., 2012**).

#### **III.3.1.1.3. Oxygène singulet ( $^1O_2$ )**

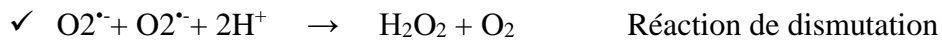
Il a la même structure électrique que l'oxygène, mais il est "arrangé" différemment puisque les électrons précédemment incompatibles de la couche extérieure ont maintenant formé un couplage. Cela correspond à une version excitée d' $O_2$ . Elle n'est donc pas radicale. Son état « excité » lui donne un potentiel oxydant plus fort que l'oxygène (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

#### **III.3.1.1.4. Radical peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )**

Le radical d'oxydation rapide  $H_2O_2$  est plutôt stable. Il est capable de traverser les membranes lipidiques. Il peut encore réagir avec des métaux de transition (fer et cuivre) pour

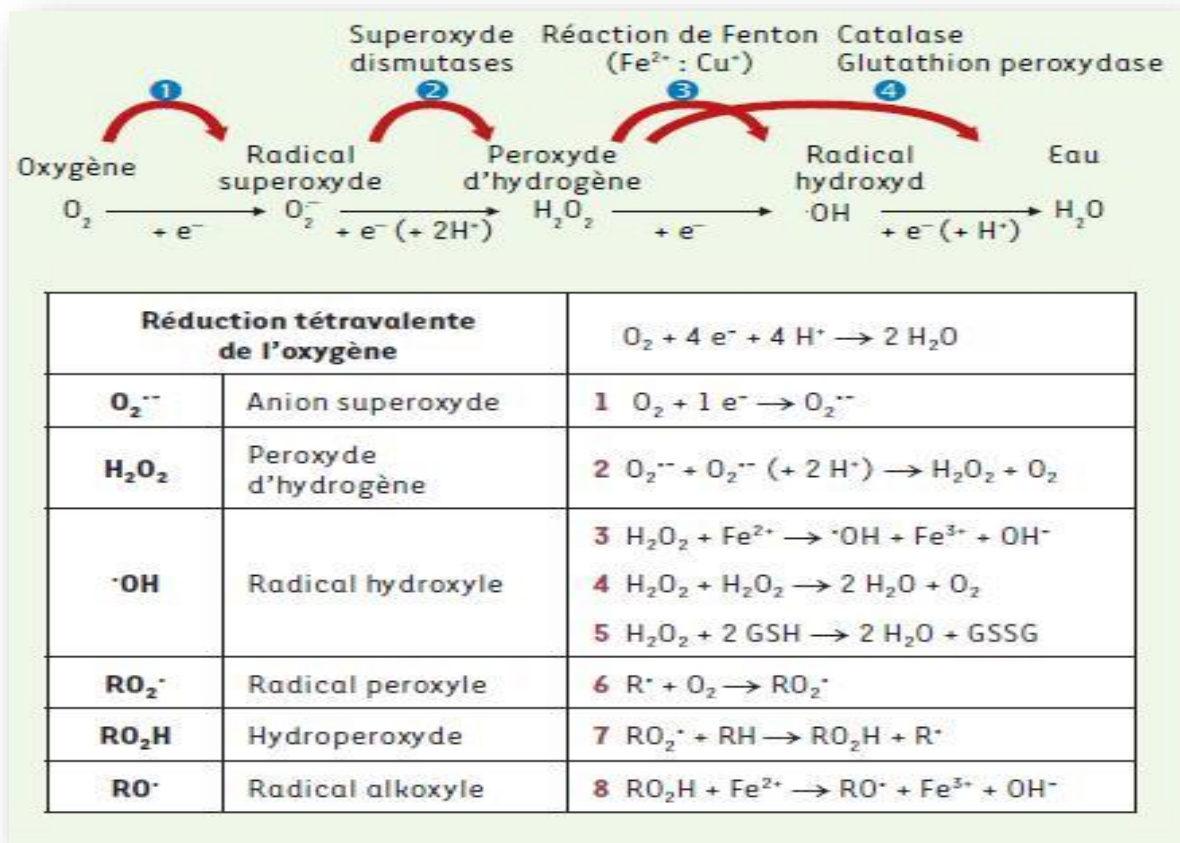
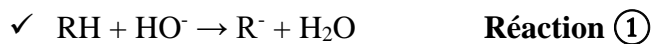


oxyder certaines macromolécules biologiques. Bien qu'il ne soit pas un radical libre, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut produire des radicaux extrêmement réactifs (Saoudi *et al.*, 2011). Il est produit par un processus de démutation dans le peroxyzome, les microsomes et les mitochondries (Ramirez *et al.*, 2008).



### III.3.1.1.5. Les radicaux peroxy ROO<sup>·</sup>

La "deuxième vague" de l'ERO implique la production d'acides gras polyinsaturés, qui sont produits par deux étapes primaires: la réaction 1 et la réaction 2, qui impliquent la liaison d'une molécule d'oxygène et la perte d'un atome d'hydrogène, peut-être par un radical hydroxylique.



**Figure 12 :** Etapes de la réduction de l'oxygène et la formation des intermédiaires partiellement réduits sont détaillées (Migdal et Serres, 2011).

Le tableau 06 donne un résumé des caractéristiques des espèces d'oxygène réactif.

**Tableau 06.** Caractéristiques des espèces réactives de l’oxygène (**Tessier et Marconnet, 1995**).

Noms	Symboles	Caractéristiques
Oxygène moléculaire	O <sub>2</sub>	Bi-radical, stable, faible pouvoir oxydant
Radical anion superoxide	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical peu réactif, stable, non toxique, oxyde les catécholamines, peut former HO <sup>•</sup>
Oxygène singulet	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Non radical, très réactif, très instable face à des molécules riches en électrons
Peroxyde d’hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Non radical, stable, faiblement toxique, antiseptique, peut former HO <sup>•</sup>
Radical hydroxyle	HO <sup>•</sup>	Très réactif, peu diffusible, initiateur principal de la Lipoperoxydation altère protéines, ADN

### III.3.1.1.6. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes

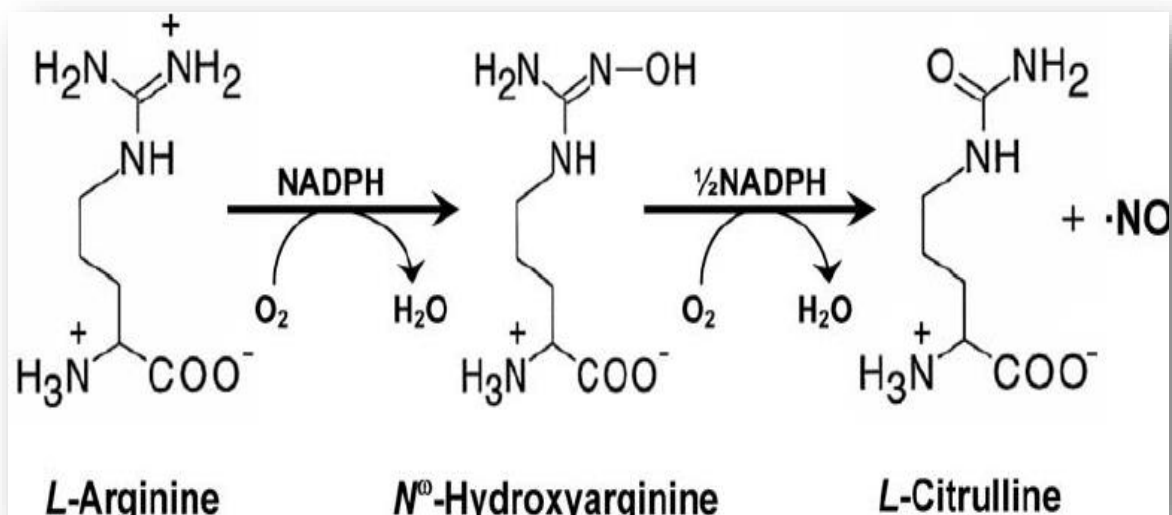
Les radicaux libres (FRs) jouent un rôle crucial dans la santé des cellules et des tissus en sauvegardant et en régulant les cellules, en préservant l'équilibre du redox, et en aidant à la production d'ADN, d'hormones stéroïdiennes, des acides biliaires, d'acides gras insaturés, de processus dépendants de la vitamine B12 et de la biosynthèse mitochondriale. Ils jouent un rôle important dans la maturation des réponses immunitaires et médient une variété de processus de signalisation et de transcription (**Migdale et Serres, 2011**).

### III.3.1.2. Les espèces réactives à l’azote (ERN).

La famille ERO est complétée par des espèces d'azote réactif (ERN), qui sont des produits du métabolisme de l'oxygène et participent aux phénomènes de stress oxydatif. L'enzyme NO-synthase, qui libère du monoxyde d'azote (NO), produit des ERN lorsqu'elle est active. Ces derniers produiront des dérivés des radicaux libres d'azote (ERN) sous diverses formes (**Haleng et al., 2007**).

#### III.3.1.2.1. Oxyde nitrique (NO<sup>•</sup> ; monoxyde d'azote)

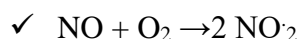
Le monoxyde nitrique est un radical libre omniprésent qui est produit à partir de l'arginine par des enzymes de synthèse d'oxydes nitriques (NOS) (**Figure 13**) (**Arora, 2002**). Parce qu'il s'agit d'un gaz, l'oxyde nitrique se diffuse facilement à travers les membranes. Afin de créer des espèces oxydantes, il est probable qu'elles interagissent avec d'autres radicaux libres : NO<sub>3</sub><sup>-</sup> peroxynitrite (**Kalender et al., 2010**).



**Figure 13 :** Réaction de formation du NO à partir de l'arginine (Bédard, 1998).

### III.3.1.2.2. Dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>·)

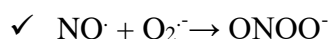
Il s'agit d'un polluant atmosphérique résultant de l'interaction entre le radical peroxy et le NO



Les acides gras insaturés sont attaqués par le NO<sub>2</sub>·, qui les transforme en nitrates ou en cis. L'acide arachidonique est transformé par les lipoxygénases en radicaux libres, qui sont ensuite utilisés comme messagers intracellulaires et extra-cellulaires. Les espaces entre les membranes aprotiques peuvent retenir le NO<sub>2</sub>· (Sisein, 2014).

### III.3.1.2.3. Peroxyde nitrite (ONOO<sup>-</sup>)

Un produit d'oxygène connu sous le nom de peroxyde nitrite est très toxique et, en plus de l'oxydation du LDL, endommage également gravement les tissus. Selon Ghafourifar et Cadenas (2005), les ONOO non radicaux ont une courte durée de vie. Il est capable d'oxyder les protéines et les bases d'azote dans les fils d'ADN avec un degré élevé de ressemblance à l'oxydation des radicaux hydroxyles (Monocada, 1993). La peroxyde nitrite est produite lorsque l'anion de superoxyde et le NO réagissent

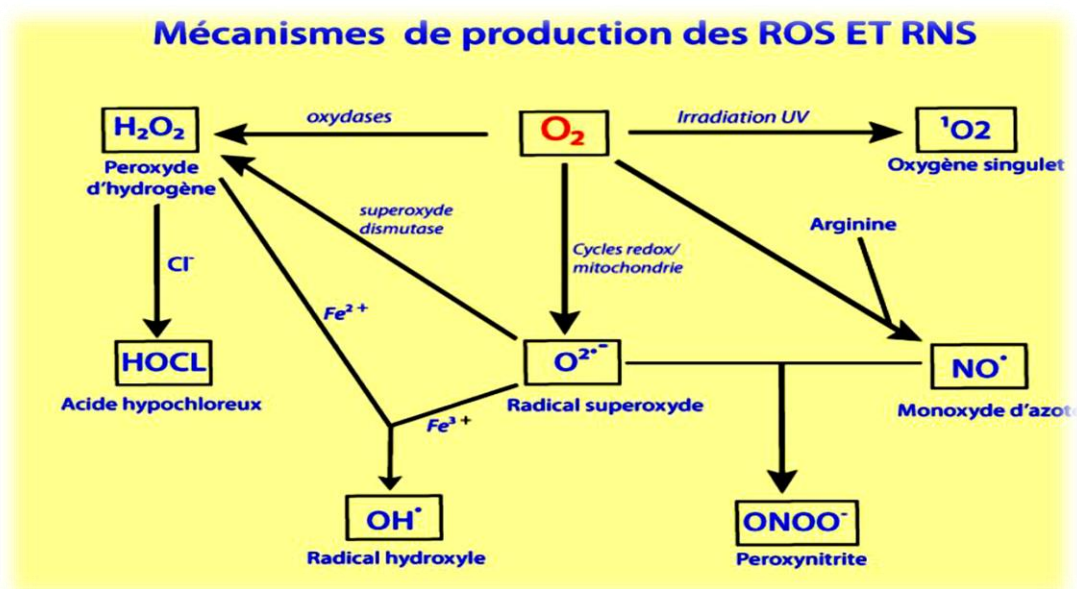


Le tableau 07 présente les nombreuses caractéristiques des espèces d'azote réactif.

**Tableau 07** : Caractéristiques des espèces réactives de l'azote (Tessier et Marconnet, 1995).

Noms	Symboles	Caractéristiques
Monoxyde d'azote	NO•	très diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques
Dioxyde d'azote	NO <sub>2</sub>	déclencheur de la peroxydation lipidique
Peroxyde nitrite	ONOO <sup>-</sup>	très toxique, non radicalaire est instable, très graves en plus de l'oxydation des LDL

Les radicaux libres se présentent sous une variété de formes avec différents modes d'action. Le processus de leur formation est décrit dans la figure suivante (figure 14) :



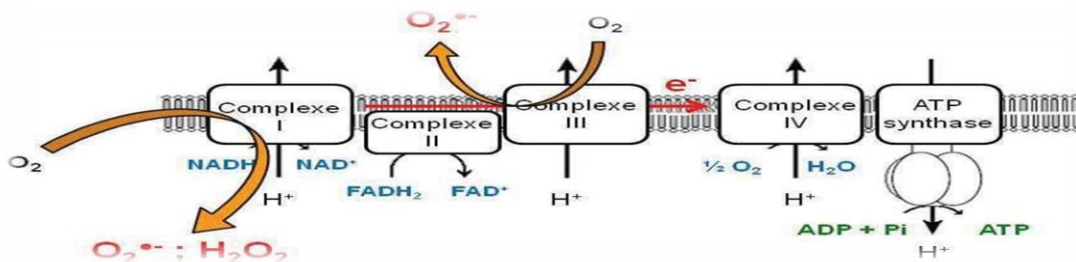
**Figure 14** : Différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) et leurs mécanismes de productions (Boubali, 2017).

### III.3.1.3. Origine des radicaux libres

Les radicaux libres oxygénés sont produits en raison du métabolisme aérobie, où le corps a besoin d'O<sub>2</sub> pour l'énergie pendant les réactions respiratoires oxydatives. Une petite partie de l'oxygène s'échappe dans l'eau dans les mitochondries, potentiellement en provenance de sources endogènes ou exogéniques (Beaudeau *et al.*, 2006).

### III.3.1.3.1. Origine endogène

En raison du métabolisme aérobie, où l'oxygène est nécessaire pour l'énergie, des radicaux libres oxygénés (EROs) sont créés. Les ERO sont produits lorsqu'une petite quantité d'oxygène échappe à la réduction en eau dans les mitochondries. La source principale est l'oxydation des molécules réduites du cycle de Krebs dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Carrière *et al.*, 2006). Il semble que la fuite d'électrons est causée par les complexes de chaîne mitochondriale I et III (Figure 15). En conséquence, avant les activités de l'oxydase de la membrane NADPH, la fuite d'électrons des mitochondries semble être la source prédominante d'EROs dans la cellule étant donné la forte activité de la chaîne respiratoire chez les espèces aérobies (Tessier et Marconnet, 2015).



**Figure 15 :** Origine de la production des ERO au niveau de la chaîne respiratoire Mitochondriale (Cyril, 2011).

L'oxydase de xanthine est essentielle pour la synthèse de l'ERO, alors que les oxydases de NADP (H) dans la paroi vasculaire produisent l'O<sub>2</sub>. Pendant une réponse inflammatoire, les neutrophiles et les macrophages peuvent oxyder l'acide arachidonique, et la synthase NO aide également à produire de l'ERO (Valko *et al.*, 2006).

### III.3.1.3.2. Origine exogène

Les radicaux libres exogènes sont produits lorsqu'ils sont exposés à des environnements toxiques, tels que les rayons UV, l'oxyde d'azote et le NO<sub>2</sub>, et l'ingestion d'alcool. Ces radicaux peuvent oxyder le métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, et stimuler la production d'anions de superoxyde (Robineau et Mercier, 2012), y compris dans certains médicaments anticancéreux et antibiotiques (Basdevant *et al.*, 2006).

## III.4. Conséquences du stress oxydant

Des faibles quantités d'EROs peuvent contribuer à la signalisation cellulaire, tandis que des niveaux élevés peuvent nuire aux protéines, aux lipides et aux acides nucléiques (Dröge 2002).



- ✓ modifications de la composition structurale des lipoprotéines.
- ✓ Une augmentation des dommages cellulaires, principalement due aux métabolites secondaires

### III.4.2. Oxydation des protéines :

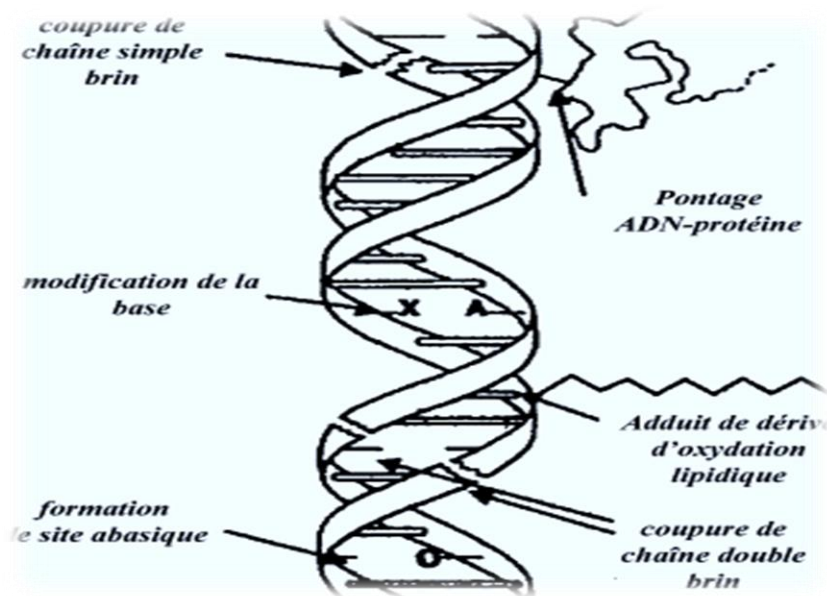
Les ERO modifient la structure et la fonctionnalité des protéines qu'ils ciblent, y compris les enzymes, les récepteurs et les protéines de transport cellulaire, ce qui a un impact sur tous les mécanismes cellulaires (Favier, 2011).

#### III.4.2.1. Conséquences des dommages oxydatifs des protéines

Les protéines qui ont subi des dommages oxydatifs changent de structure, ce qui affecte les processus cellulaires et entraîne des inhibitions enzymatiques, des changements dans la spécificité du ligand-récepteur, la dénaturation des épitopes antigéniques, des troubles métaboliques, la formation de produits de glycation avancés, des états pro-inflammatoires et l'accumulation de tissus.

### III.4.3. Dommage de l'ADN

En particulier dans les cellules nucléaires et mitochondriales, l'ADN, en particulier la guanine (Grandjean, 2005), est vulnérable à l'oxydation, ce qui entraîne une attaque radicale qui peut produire des fractures, des aberrations chromosomiques et peut-être favoriser la carcinogenèse et le vieillissement des tissus (figure 17) (Favier, 2011).



**Figure 17 :** Les différents dégâts pouvant altérer la molécule d'ADN (Wallace *et al.*, 2008).

### III.4.3.1. Conséquences des dommages de l'ADN

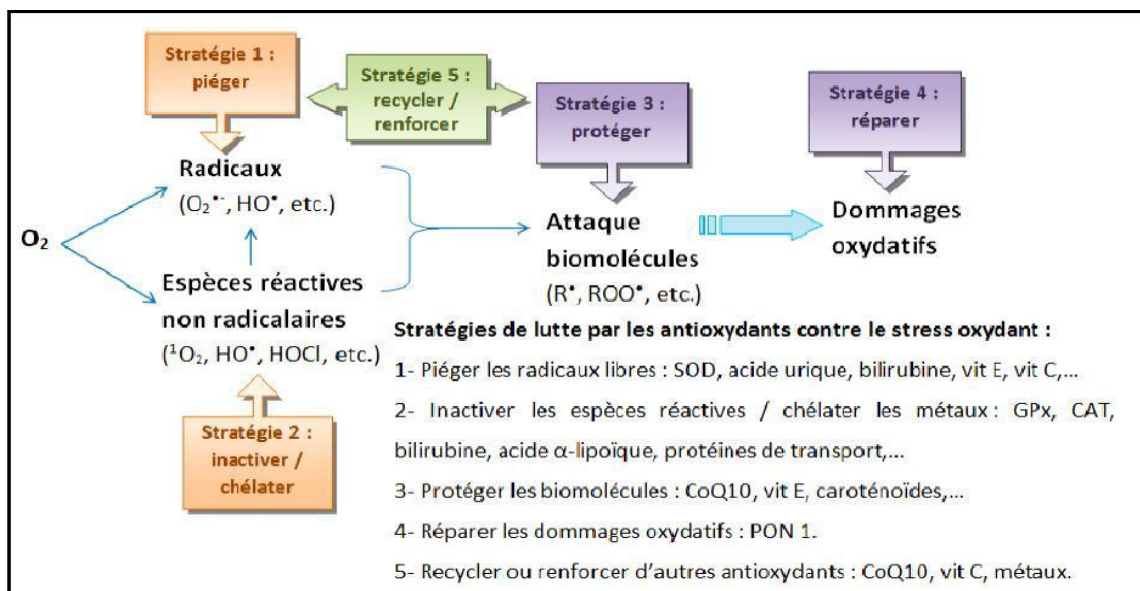
Altération de la fonction mitochondriale, création d'espèces mutagènes et mise en œuvre des systèmes de réparation.

### III.4.4. Oxydation des glucides

Les protéines peuvent se décomposer ou devenir glyquées à la suite de la libération de cétoaldéhyde,  $H_2O_2$ , et  $OH^\bullet$  de l'oxydation du glucose dans des conditions physiologiques et en présence de traces de métaux (Barnoud *et al.*, 2007).

### III.5. Système de défense antioxydant

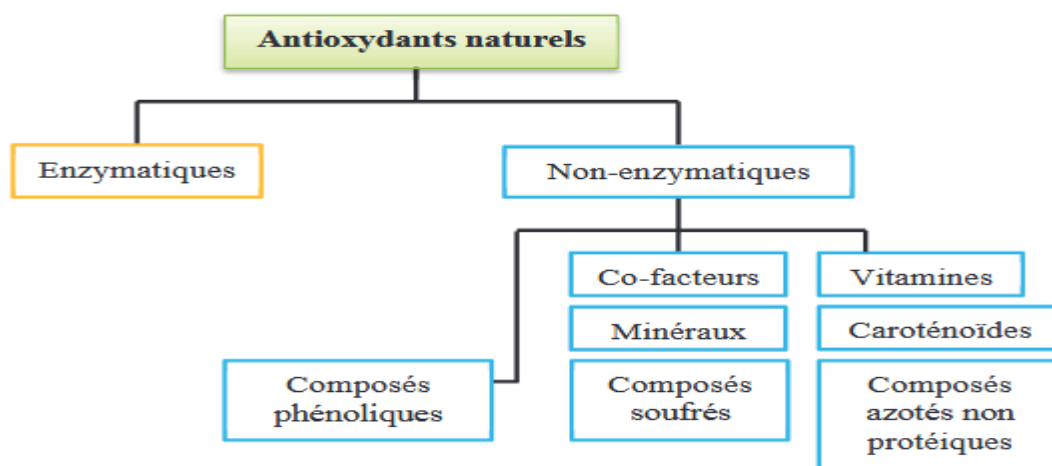
L'organisation utilise des mécanismes de défense efficaces contre la surproduction des ERO (Halliwell, 1990), tels que les systèmes antioxydants qui retardent ou bloquent l'oxydation à faibles concentrations et sont classés selon leur mode d'action, leur emplacement cellulaire et leur source (Delattre *et al.*, 2005). Il existe une variété de méthodes pour protéger contre le stress oxydant (Figure 18).



**Figure 18 :** Stratégie de la lutte des antioxydants contre le stress oxydant (Grandjean, 2005).

Les enzymes et les molécules simples font partie des mécanismes de défense utilisés par les êtres vivants pour réguler la génération d'espèces réactives. Alors que les antioxydants non enzymatiques sont obtenus par l'alimentation ou la médecine, les antioxydants à base d'enzymes sont créés par le corps (figure 19) (Dabelstein *et al.*, 2007).





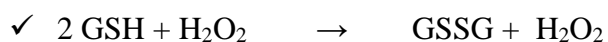
**Figure 19:** Familles d'antioxydants naturels (Kelly, 2017).

### III.5.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les enzymes produites par les bactéries et agissant comme antioxydants sont incluses dans cette catégorie. Nous pouvons inclure la catalase, le superoxyde dismutase (SOD), et le glutathion peroxydase (GPx) (Kelly, 2017). La thiorédoxine (Trx), les paraxonases et les peroxyrédoxines (Prxs) sont d'autres enzymes.

#### III.5.1.1. Glutathion peroxydase (GPx)

Avec une affinité plus faible pour le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et une carence en sélénium, l'enzyme tetramérique glutathion peroxydase (GPx) dégrade l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui est présent dans le cytosol, la matrice mitochondriale, et le citosol (Mullenbach *et al.*, 1988). L'isoforme GPx-4, qui est exclusive aux membranes cellulaires, participe à la décomposition des peroxydes lipidiques en oxydant le GSH et en réduisant le SGSS par la glutathion-réductase (Pincemail *et al.*, 2007).



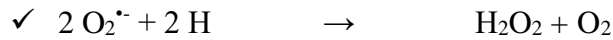
#### III.5.1.2. Catalase

La catalase (CAT) est une protéine concentrée dans le foie et les érythrocytes, principalement située dans les peroxyzomes. Il est efficace dans le stress oxydatif élevé, protégeant les cellules de la production de le  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Tsan *et al.*, 1990), due à l'activité des SOD ou des oxydases (Reichel, 2010).



### III.5.1.3. Superoxydes dismutases

Plusieurs protéines métalliques, telles que Cu/Zn-SOD, Mn- SOD2, et Cu / Zn-sOD3, protègent contre le stress oxydatif en démettant O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Pincemail *et al.*, 2007).



### III.5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

#### III.5.2.1. Antioxydants non enzymatiques liposolubles

Ils se trouvent en circulation dans les lipoprotéines plasmatiques et les membranes cellulaires parce qu'ils sont liposolubles. Les caroténoïdes, la vitamine E et l'ubichinol peuvent tous être trouvés dans ce groupe.

##### III.5.2.1.1. Vitamine E ( $\alpha$ - tocophérol)

La forme la plus active de vitamine E, qui a huit dérivés, se trouve chez l'homme et protège les membranes cellulaires contre la peroxydation des lipides des espèces réactives (Yang et McClements, 2013).

##### III.5.2.1.2. Caroténoïdes (Vitamine A)

Une classe de caroténoïdes connue sous le nom de vitamine A, parfois appelée rétinoïdes et provitamines A, est utile pour repérer les peroxydes RO et les radicaux hydroxyles, ainsi que pour réduire les chaînes de peroxydation des lipides et protéger contre les dommages causés par les rayonnements UV (Gardès-Albert *et al.*, 2013).

##### III.5.2.1.3. Ubiquinol (Coenzyme Q10)

Les radicaux libres sont neutralisés après leur production et empêchés d'oxyder les lipides par la coenzyme Q10 (co-factor). Les anions hydroxy et le peroxyde d'hydrogène sont capturés par le glutathion endogène de tripeptide de soufre (Yehye *et al.*, 2015).

#### III.5.2.2. Antioxydants non enzymatiques hydrosolubles

Dans le cytosol, le plasma et les médias extracellulaires, ces antioxydants sont dispersés. L'acide alpha-lipoïque, l'acide urique, le glutathion, la bilirubine, la vitamine C et le glutathion sont tous présents.

#### **III.5.2.2.1. Acide ascorbique (vitamine C)**

L-acide ascorbique, souvent connu sous le nom de vitamine C, est un antioxydant soluble dans l'eau (**Koolman et Röhm, 2004**), qui piège les ERO, inhibe l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, et renouvelle la vitamine E (**Duarte et al, 2007**).

#### **III.5.2.2.2. Glutathion**

Grâce à son rôle de cofacteur de l'enzyme GPX, le glutathion de tripéptide protège les lipides, les protéines et les acides nucléiques contre l'oxydation, surtout en période de stress oxydatif. En outre, il soutient les processus de régénération de la vitamine E et de vitamine C (**Douris et al., 2009**).

#### **III.5.2.2.3. Acide urique**

Le sous-produit du métabolisme des purines est l'acide urique. Le radical d'urate est créé lorsque l'acide urique réagit avec des oxydants, et il peut ensuite être réduit par l'ascorbate (**Stocker et Keaney, 2004**).

#### **III.5.2.2.4. Oligoéléments**

Alors que le sélénium et le fer agissent comme catalyseurs de GPx et de catalase, respectivement, les oligo-éléments tels que le cuivre, le zinc, le manganèse, le nickel et le fer sont des co-facteurs essentiels pour les enzymes antioxydantes et les caractéristiques antioxydantes (**De moffarts et al., 2005**).

#### **III.5.2.2.5. Bilirubine**

En raison de sa capacité à neutraliser le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les radicaux peroxydes ROO, qui sont ensuite transformés en biliverdine oxydée, la bilirubine, un produit de décomposition hémisphérique, possède des caractéristiques antioxydantes (**Neuzil et Stocker, 1993**).

#### **III.5.2.2.6. Polyphénols**

Les diterpènes, les flavonoïdes, les stilbenes, les tocoferols, les phénols simples et les acides phénoliques sont quelques-uns des produits chimiques phényliques (**Brset, 2006**), qui ont une action antioxydante (**Zhu et al., 2012**). En plus d'agir comme agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et éliminateurs d'oxygène, les polyphénols sont bien connus pour être en mesure d'inhiber l'oxydation des lipides insaturés (**Inra et Anses, 2013**). Certains d'entre eux ont même le potentiel de chélation des métaux (**Proestos et al., 2013**).

### **III.6. Les agents toxiques et la production endogène des ERO**

La création d'espèces réactives d'oxygène peut être influencée par un certain nombre de substances dangereuses, notamment :

- ✓ Les produits chimiques comprennent les métaux, les solvants et les drogues.
- ✓ L'ionisation et le rayonnement UV sont des exemples d'agents physiques.

Lorsqu'il s'agit de certaines maladies, le stress oxydatif peut être la cause principale (dans le cas du cancer), le déclencheur (en cas de la maladie d'Alzheimer), ou la cause secondaire (in the case of diabetes).



# Huile essentielle d'écorce d'orange

q, εcorce q, orange

## IV. Huile essentielle d'écorce d'orange

### IV.1. Introduction

Dans la famille des Rutaceae, le genre *Citrus* comprend les oranges, les mandarines, les citrons verts, le citron, les grenades et les cèdres (Chao *et al.*, 2017). Les oranges sucrées sont classées en quatre groupes, le plus populaire étant l'orange ombilical (Handaji *et al.*, 2013). Ils sont largement cultivés dans le monde entier, avec Guangzhou étant la plus grande zone de production d'orange naval en Chine (Zhang *et al.*, 2018). L'industrie de la consommation et de la transformation d'agrumes génère des sous-produits tels que les pâtes, les fraises et les crustacés, qui sont utilisés pour la production d'aliments pour animaux, de fibres et de carburant (Lagha-Benamrouche *et al.*, 2017). Ces coquilles sont riches en composés biologiquement actifs, y compris la vitamine C, les composés phénoliques, les flavonoïdes et les huiles essentielles, qui ont été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes, antifongiques, anti-inflammatoires et antioxydantes (Hosni *et al.*, 2010 ; Rafiq *et al.*, 2018). Il convient de noter que les composés de la peau d'orange ont suscité de grands intérêts de recherche dans le monde entier, en raison de sa composition chimique et de leur biodiversité (Shirisha *et al.*, 2019 ; Smeriglio *et al.*, 2019 ; Limei *et al.*, 2022).

### IV.2. Les variétés d'orange

L'orange, *Citrus sinensis* est l'espèce la plus importante du genre en raison de ses nombreux hybrides et variantes (Tableau 08) (Nicolosi *et al.*, 2000).

Tableau 8 : principales variétés d'orange (Ferhat *et al.*, 2010).

Les groupes	Les oranges blondes	Les oranges blondes Navals	Les oranges Sanguines	Les oranges sans acidité
Les principales variétés	-Salustiana, - Hamlin - Shamouti - Valencia Late	- Washington - Thomson	- Double fine améliorée - Moro et Tarocco	- Impérial - Réal - Lima

### IV.3. Orange (*Citrus sinensis* variété Thomson navel)

#### IV.3.1. Historique

Le mot "orange" est apparu pour la première fois au 13<sup>ème</sup> siècle. En Asie du Sud-Est, en Méditerranée et en Europe, elle s'est rapidement répandue (Hellal, 2011). Au XV<sup>e</sup> siècle, les Portugais l'ont amené en Europe du Sud, où il est rapidement devenu la norme. En raison de

sa popularité, le narangi a été rebaptisé portugais dans les nations arabes. Les Européens ont également contribué à l'expansion mondiale de l'orange (Akrouf, 2022).

Il est difficile d'établir la date exacte de l'entrée de la pomme d'orange en Algérie, mais son développement et sa plantation généralisée sont fondamentalement emblématiques de la période coloniale (Mutin, 1969). Selon Trabut (1905), l'étude de plusieurs plants d'orange et de mandarin cultivés en Algérie lui a permis d'identifier un certain nombre de races.

Hardy introduit pour la première fois l'espèce de mandarin en 1850 (Trabut et Marès, 1906) ; les variétés souhaitables pourraient être améliorées par la transplantation. Le clementine, qui tire son nom de son frère Clément, est une nouvelle espèce qui a été découverte au tournant du siècle et qui va continuer à devenir un succès. C'est une crois entre un Mandarin et un Bigaradier "Granito" fruit. Près d'Oran à Messerghin, cette espèce a été identifiée et évoluée en 1902 (Badaoui *et al.*, 2022).

#### IV.3.2. Nomenclature

- ✓ L'orange doux est son **nom commun**.
- ✓ *Citrus sinensis* est son **nom scientifique**, la variété *Thomson naval*.

#### IV.3.3. Systématique

Selon Praloran (1971), *Citrus sinensis* (l'orange) variété *Thomson* est un membre de la famille des Rutaceae (**figure 20**). Classé comme suit :

- ✓ " **Règne** : Plantae "
- ✓ " **Classe** : Magnoliopsida "
- ✓ " **Ordre** : Sapindales "
- ✓ " **Famille** : Rutacées "
- ✓ " **Genre** : *Citrus* "
- ✓ " **Espèce** : *Citrus sinensis Thomson* "



**Figure 20 : Orange Thomson navel (originale, 2019).**

#### **IV.3. 4. Description botanique et morphologique**

Les arbustes d'agrumes sont des arbres verts et durables de différentes longueurs et feuilles (Ferhat *et al.*, 2010). Ils ont des feuilles ovales-lancéolées, longues, coriaces, cireuses et sont souvent divisées en trois folioles. Les fleurs blanches peuvent être trouvées seules ou en groupes, tandis que le fruit peut être sphérique ou allongé et pèse jusqu'à un kilogramme (Figure 21) (Teuscher *et al.*, 2005).

La couche extérieure du fruit, le "flavedo", se compose d'un mesocarpe extérieur et de l'épiderme, qui sont jaunes quand immatures et orange ou rouge quand mûres. Il contient des poches sécrétoires remplies d'huiles essentielles qui se rompent sous pression (Bruneton, 2001), Le mesocarpe intérieur est poreux et varie d'épaisseur. Dupont et Guignard (2007) ont constaté que l'endocarpe, l'épiderme intérieur, produit des poils chauds et gonflés qui donnent à la pulpe d'orange un goût agréable. La pulpe, jaune, orange ou rouge, est composée de sacs de jus de membrane, divisés en segments, certaines variétés étant sans noix (figure 22). Chaque segment contient 2 à 4 graines (Jhaet *al.*, 2019).

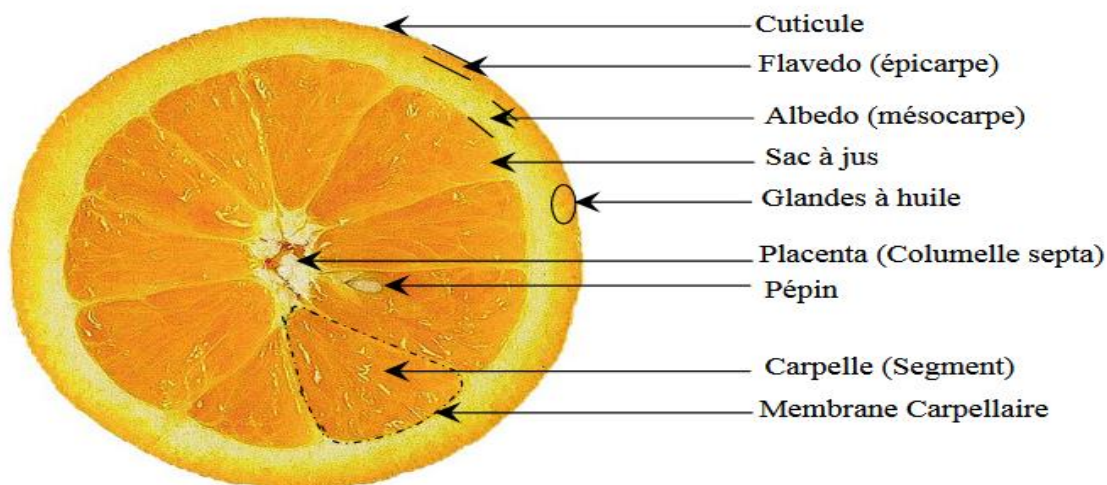


**Figure 21 : Description morphologique d'orange Thomson naval (Metoui *et al.*, 2014).**

A : Arbre, B : Feuilles, C : Fleurs, D : Pépins, E : Fruits, F : Fruit (coupe transversale), E : Fruit (coupe longitudinale)



Cette recherche est axée sur la variété d'orange Thomson Naval (Synonymes Bahia), qui a une diversité de formes et de couleurs de fruits. L'orange Thomson naval, selon Jacquemond et al. (2009), est descendu d'une mutation précoce du Washington Naval qui a été amené en Californie en 1891. Les fruits n'ont pas de paille et varient en taille de 100 à plus de 200 g. Ils ont une teinte orange et sont simples à éplucher.



**Figure 22** : Coupe transversale d'une orange variété Thomson Naval (Bousbia, 2011).

#### IV.3.5. Composition chimique des écorces d'orange

La composition chimique de l'écorce d'orange est influencée par divers facteurs, y compris la variété, et est affectée par les conditions météorologiques et environnementales. La composition globale de l'écorce d'orange de Thomson Naval est présentée en grammes par 100 grammes de base sèche dans le **Tableau 9** (Ghanem *et al.*, 2012).

**Tableau 09**: La composition chimique pour 100 g de l'écorce d'orange Thomson Naval (Ghanem *et al.*, 2012).

Constituantes	Quantités g
Fibres	41,64
Glucides	15,01
Protéines	1,79
Lipides	1,66
Caroténoïdes	0,04
Phénols	1,89
Vitamines	0,15
Huiles essentielles	0,6
Eau	3,14
Minéraux	3,45
Vitamine C	0,145

L'écorce d'orange est riche en eau, en protéines, en glucides, en minéraux, en acides gras essentiels, en fibres, en caroténoïdes et en vitamine C (**Ramful et al., 2010**). L'écorce d'orange navale contient des composants phénoliques, tels que les flavonoïdes et les acides phényliques, qui possèdent des propriétés antioxydantes (**Rafiq et al., 2016**). La dégradation de la chlorophylle et la synthèse accrue des caroténoïdes, qui sont provoquées par la disparition du chloroplast et le développement du chromoplast, font que la couleur des jeunes oranges passe du vert au jaune orange au fur et à mesure de leur croissance (**Meléndez-Martínez, 2007**). Les caroténoïdes et les antocyaniens sont responsables de la couleur de divers types d'orange sanguin, y compris l'orangée maltaise, qui est principalement attribuée aux pigments carotéiques (**Tableau 10**).

**Tableau 10** : Composition en caroténoïdes des écorces d'orange ( $\mu\text{g/g}$  bs) (**M'hiri et al., 2015**).

Compositions	Lutéine	Zeaxanthine	$\beta$ -cryptoxanthine	$\beta$ -carotène
Quantités	29,30	27,70	0,76	50,30

Un régime riche en caroténoïdes peut réduire le risque de maladies cardiovasculaires, de détérioration musculaire, de cancer et de dommages à la peau causés par les coups de soleil (**Aust et al., 2001**).

#### **IV.3.6. Utilisation de l'écorce d'orange**

La recherche a, en fait, démontré que l'écorce d'orange représente une ressource potentiellement précieuse qui pourrait être transformée en une variété de produits à valeur ajoutée. Traditionnellement, le moyen le plus pratique d'utiliser la peau d'orange est de traiter l'ensemble de la matière première sans différencier les constituants individuels (**Can, 2020**).

##### **IV.3.6.1. Utilisation alimentaire**

Les écorces d'orange ont été utilisées dans les aliments. Cependant, la demande globale d'écorces d'orange est insignifiante, car les applications n'ont pas été largement explorées et reconnues (**Godishala et al., 2019**).

La cuisson et les compositions alimentaires utilisent de l'écorce d'orange (**Bousbia et al., 2009**), une fibre naturelle contenant des composants bénéfiques (**Fernandez-Lopez et al., 2004**). Alors que la pectine est employée dans de nombreuses entreprises agroalimentaires pour ses qualités d'épaississement, de texture, de gelage et de stabilisation, les fibres de peau d'agrumes offrent une variété de fonctions utiles (**Hawthorne et al., 2000**).

Il convient de noter que les écorces d'orange séchées pourraient également être utilisées dans des applications de formulation alimentaire, industries laitières, de boissons, de pâtisseries et de confiserie, par exemple (**Farahmandfar et al., 2019**)

#### **IV.3.6.2. Utilisation en produits pharma et parapharmaceutiques**

Avec une connaissance croissante de la peau d'orange, en particulier de sa composition chimique, il est maintenant possible d'améliorer davantage la valeur de ces déchets agro-industriels importants en explorant leur application potentielle dans l'alimentation, industries pharmaceutiques et cosmétiques (**Lagha et al., 2013**). Pectine et ses extraits d'écorce d'orange sont utilisés dans le pharmaceutique pour fabriquer des médicaments (**Piriyaprasarth et Sriamornsak, 2011**), savons, parfums et autres cosmétiques (**Lohrasbi et al., 2010**), et pour créer solutions pharmaceutiques, réduire cholestérol (**Wang et al., 2014**), et combattre le cancer (**Maxwell et al., 2012**).

#### **IV.4. Huiles essentielles de *Citrus sinensis***

À l'heure actuelle, de nombreuses études portaient principalement sur l'extraction d'ingrédients actifs de l'écorce d'orange navel (**Guo et al., 2012 ; Yang et al., 2009 ; Lux et al., 2019**). Parmi les plus importants de ces principes actifs sont les huiles essentielles.

##### **IV.4.1. Historique**

L'histoire des huiles essentielles remonte à 2000-3000 av. J.-C., les Égyptiens produisant l'essence de cèdre par distillation sèche et utilisant des essences aromatiques aux propriétés antibactériennes. La technologie de distillation s'est améliorée au IXe siècle sous l'influence arabe, et **Avicenna** est créditée du développement de la distillerie entre **980 et 1037**, lorsque les Égyptiens ont utilisé l'essence de terebentine et les huiles distillées. Après cela, pendant les croisades du XIIIe siècle, la connaissance des huiles essentielles s'est répandue en Europe. Ensuite, les pharmaciens ont joué un rôle majeur dans le développement des techniques de fabrication et la compréhension de ces extraits (**Fillâtre et al., 2011**).

Le mot "huile essentielle" ne provient pas de sa fonction, malgré son potentiel d'aider considérablement à la survie d'un organisme. Une idée fausse commune est que les huiles essentielles sont appelées huiles « essentielles » pour mettre en évidence leur importance dans la survie biologique de l'organisme. Cependant, le terme « huile essentielle » a en fait son origine du mot « quintessence », le rendu anglais de Quinta Essentia. Ce terme signifie le cinquième élément de la constellation alchimique antérieure, utilisée pour les huiles essentielles au début du XVIe siècle par le pionnier médical suisse, **Bombastus Paracelsus**

**von Hohenheim.** À l'époque, **Von Hohenheim** pensait que l'huile essentielle était la forme la plus concentrée et la plus pure du principe médicinal de toute plante, produite par hydrodistillation du tissu végétal. L'utilisation du terme « quintessence » par **von Hohenheim** est le reflet du paradigme aristotéen, qui décrit la matière comme étant composée des cinq éléments : terre, feu, eau, air et esprit. La quintessence (littéralement la cinquième essence) était considérée comme la dernière ; L'esprit ou la force vitale de la plante, qui pourrait être retiré et contenu par le processus de distillation. L'utilisation du terme moderne « spiritueux » pour décrire diverses liqueurs, en particulier celles produites par la distillation, est à nouveau le reflet de cette anciens concepts (**Nicholas et Graham, 2015**).

Le commerce des parfums a commencé en 1754 avec la découverte de l'eau de Cologne par un marchand italien. Les produits synthétiques ont été introduits au XIXe siècle à mesure que l'industrie grandissait. L'aromathérapie a connu une montée en popularité au XXe siècle lorsque les chimistes français René-Maurice Gatte Fossé et Sevelinge ont confirmé qu'elle possédait des propriétés antibactériennes dans les domaines de la chimie et de la médecine vétérinaire, respectivement (**Fouche et al., 2000**). Le Dr Jean Valnet a utilisé des huiles essentielles pour soigner les blessures pendant la guerre de 1939-1945.

Depuis la publication en 1964 du premier livre sur l'aromathérapie, "Aromatherapy, Treatment of Diseases by Plant Essences", les huiles essentielles ont été utilisées pour des raisons thérapeutiques. En 1975, l'aromatologue français Franchomme a mis l'accent sur l'importance du chimiotype de l'espèce. Il y a maintenant 3 000 huiles essentielles disponibles, dont 300 sont vendues aux industries des arômes et des cosmétiques. Les huiles essentielles sont utilisées depuis cinquante ans dans diverses industries (**Zhiri, 2006**), y compris l'aromathérapie, l'agroalimentaire, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et l'agriculture comme insecticides naturels (**Fillâtre et al., 2011**).

#### **IV.4.2. Définitions**

Une variété d'autres noms est donnée à l'huile essentielle. Il s'agit notamment de l'essence, de l'huile parfumée, de l'huile volatile, de l'huile éthérique, de l'huile aréthole ou de l'huile aromatique. Ce dernier terme « aromatique » est un autre terme qui génère beaucoup de confusion. Bien que le terme « aromatique » dans l'utilisation moderne décrit la qualité de dégager un arôme qui est agréable ou odieux au nez, un composé aromatique ou une fraction, dans le langage de la chimie, a un arrangement chimique qui entraîne la délocalisation des électrons, produisant une plus grande stabilité moléculaire. Ainsi, les huiles essentielles

peuvent être un mélange d'aromatique et d'aliphatiques composés (non aromatiques), qui contribuent tous à l'arôme perçu (**José-Luis, 2016**).

Habituellement les huiles essentielles trouvées dans les petites gouttes entre les cellules, les huiles essentielles sont des composés inflammables et parfumés ou des combinaisons qui sont créées dans le cytoplasme. Il s'agit d'un mélange d'arômes ou de composés sans odeur et sans arôme, avec des substances parfumées qui ont des avantages sociaux potentiels (**Sonwa, 2000**).

Les huiles essentielles sont définies par **l'Organisation internationale de normalisation (ISO)** comme des produits végétaux produits par des méthodes de distillation mécanique, sèche ou à vapeur, avec des modifications physiques qui ne modifient pas sensiblement leur composition (**Turek et Stintzing, 2013**).

Cette définition peut être étendue à l'exposition à froid du zest ou de l'écorce d'agrumes résultant de la participation d'eau à des processus mécaniques qui libèrent le produit des alvéoles oléifères.

Les huiles essentielles sont des liquides volatils solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles végétales et minérales, principalement insolubles dans de l'eau. Ils sont classés en six classes en fonction du maquillage chimique (**Funk et Wagnalls, 2004**).

#### **IV.4.3. Localisation**

Les EHS sont créés et conservés dans des structures végétales telles que les poils sécréteurs, les poches, les canaux et les cellules d'huile essentielle. Ils peuvent également être transportés par des poches de carburant dans l'espace intracellulaire. L'évaporation de ces gouttes et l'oxydation de l'air sont entravées par des membranes contenant des esters et des groupes de peroxyde (**Bruneton, 2009**).

Les fleurs, les feuilles, les crustacés, le bois, les racines, les rhizomes, le savon, les boutons, les fruits ou les graines ne sont que quelques exemples des différents organes où les essences végétales peuvent être trouvées. Les espèces d'agrumes construisent des dépôts de cellules sécrétrices en se divisant radialement et tangencialement pour former des poches schizolysigènes qui stockent les huiles essentielles dans le mesocarpe du fruit (**Bruneton, 1999**).

#### IV.4.4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

De grandes marges dans les constantes et les composants découlent des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles, qui varient selon des aspects tels que l'origine, le climat, les techniques de récolte et les procédures d'extraction (Valnet, 1984).

- ✓ À des températures normales, ils sont souvent liquides.
- ✓ contrairement aux huiles fixes, elles sont volatiles.
- ✓ souvent ils n'ont pas de couleur.
- ✓ À l'exception de trois huiles, le cannabis, le géranium et le saffran, leur densité est en moyenne inférieure à 1.
- ✓ Ils ont souvent des indices de réfraction élevés et des pouvoirs de rotation.
- ✓ Selon Paris et Hurabielle (1981), ils sont solubles dans les huiles fixes, les alcools et la plupart des solvants organiques, mais insolubles dans l'eau.

Selon la recherche de Hamdani et Allem (2017), les caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles d'orange sont énumérées dans le **tableau 11**.

**Tableau 11** : Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d'orange (Hamdani et Allem, 2017).

Huiles essentielles	Indices physiques		Indices chimiques		
	Pouvoir rotatoire	Densité (20°C)	Indice de réfraction (20°C)	Indice d'Acide	Indice d'Ester
<i>Citrus sinensis</i>	+ 94°	0,855	1,475	2,24	12,25

#### IV.4.5 Compositions chimiques des huiles essentielles

Sur le plan chimique, les HEs sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 85% de l'huile, tandis que d'autres composants sont présents seulement comme trace (Burt *et al.*, 2004).

Selon Burt *et al.* (2004) les HEs, composés de plus de 300 produits chimiques et d'une composition structurale complexe, peuvent représenter jusqu'à 85 % de l'huile. Les HEs se composent de deux familles principales de produits chimiques : les terpènes du métabolisme de l'acide mevalonique et les dérivés du phénylpropane de la voie acide et comprennent

potentiellement des produits chimiques contenant du soufre ou du nitrogène (**Bakkali et al., 2008**). Avec un squelette d'hydrocarbures, les HEs peuvent effectuer une variété de tâches de chimie organique. Les terpènes et les terpenoïdes les plus courants sont les alcools, les composés carbonylés, les esters, les phénols et les dérivés de l'azote et du soufre (**Bouhali, 2015**). Le **tableau 12** montre la composition de l'huile essentielle de l'écorce d'orange.

**Tableau 12** : Composés aromatiques des huiles essentielles des écorces d'orange (**Farhat et al., 2011**)

Substance aromatique		Orange
<b>Monoterpènes</b>	$\alpha$ -pinène	<b>0,21-0,45</b>
	$\beta$ -pinène	<b>0,04-1,82</b>
	Sabinène	<b>0,10-0,60</b>
	Myrcène	<b>0,03-2</b>
<b>Limonène</b>	Terpinène	<b>94,88-97,3</b>
	Terpinolène	<b>0,02-0,22 &lt;0,1</b>
<b>Sesquiterpènes</b>	Valencène	<b>0,09-0,20</b>
	$\alpha$ -copaène	<b>0,01-0,05</b>
	$\beta$ -elemène	<b>0,01-0,06</b>
<b>Composés carbonylés</b>	$\beta$ -sinensal	<b>&lt;0,1</b>
	Nootkatone	<b>&lt;0,1</b>
	Décanal	<b>0,18-0,60</b>
	Nonanal	<b>0,10-0,20</b>
<b>Alcools</b>	Linalol	<b>0,04-1</b>
	$\alpha$ -terpinéol	<b>0,02-0,50</b>
	Terpinène-1-ol-4	<b>0,01-0,20</b>
<b>Esters</b>	Acétat de néryles	<b>&lt;0,1</b>
	Acétate de géranyle	<b>&lt;0,1</b>

Les substances les plus importantes trouvées dans les peaux d'agrumes sont les hydrocarbures monoterpéniques, le limonène étant le plus répandu. Pinène, myrcène, terpinène,  $\beta$ -pinène et sabinène sont d'autres substances importantes. Valence,  $\alpha$ -copaène et  $\beta$ -elemène sont des hydrocarbures de sesquiterpène. Les aldéhydes, les alcools, les esters et les substances carbonylées sont également présents dans les huiles essentielles (**M'hiri, 2015**).

Les techniques énumérées ci-dessous peuvent être utilisées pour identifier les différents composants d'une huile essentielle, qualitativement et quantitativement:

- ✓ Couplage CPG/SM
- ✓ spectrométrie de masse
- ✓ chromatographie de phase gazeuse

#### **IV.4.6. Extraction des huiles essentielles**

Les huiles essentielles (HE) sont stockées dans le flavedo, la couche extérieure de l'écorce d'orange, qui abrite de nombreuses petites glandes (**Torre et al., 2019**). L'écorce est traitée pour libérer ces huiles essentielles en utilisant :

- ✓ soit une pression froide directe ou une extraction de jus qui se produit simultanément (**Dugo et al., 1997; Oreopoulou et Tzia, 2007 ; Yeoh et al., 2008 ; Sahraoui et al., 2011**).
- ✓ soit la distillation à l'eau ou à la vapeur (**Gamarra et al., 2006 ; Gamiz-Garcia et Castro, 2000**).

Afin d'extraire le HES des plantes, la distillation par vapeur d'eau et l'hydrodistillation sont aujourd'hui les approches les plus importantes (**Kulisic et al., 2004**). D'autres méthodes, cependant, ont été créées :

- ✓ L'utilisation de fluides supercritiques pour l'extraction (**Fellah et al., 2006**).
- ✓ Extraction de solvants organiques (**Lin et al., 2010**).
- ✓ Extraction assistée par micro-ondes (**Chemat et al., 2006 ; Sahraoui et al., 2008**).

#### **IV.4.7. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles**

En raison de variables inhérentes et externes, les huiles essentielles ont une composition et un rendement très variés. Les facteurs qui sont intrinsèques comprennent l'espèce, le type de clone, l'organe, la maturité et la période de récolte (**Besombas, 2008**). La composition des essences est influencée par des éléments extérieurs, y compris la géographie, les circonstances édaphiques et le climat (**Olle et Bender, 2010**). La quantité et la teneur en huiles essentielles sont également influencées par des facteurs liés à la culture, y compris les dates de plantation et de récolte, les pratiques phytosanitaires, l'utilisation d'engrais et les méthodes de collecte (**Aprotosoie et al., 2010**).

#### **IV.4.8. Activités biologiques des huiles essentielles**

Au cours des dernières années, les activités biologiques (p. ex. activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-âge, antibactériennes, antifongiques et anti-aflatoxigènes) des HE d'écorce d'orange ont été précisées (**Barreca et al., 2017 ; Celano et al., 2019**) qui sont fortement liés à divers constituants de ces huiles volatiles, notamment les hydrocarbures, les alcools, les esters et les aldéhydes (**Geraci et al., 2017**). Par conséquent, le problème des



écorces d'orange gaspillées pourraient être transformé en un actif, si des procédures potentiellement commercialisables telles que l'extraction d'HE se produisent (**Farahmandfar et al., 2019**).

#### **IV.4.8. 1. Activité antioxydante**

Plusieurs processus sous-tendent l'activité antioxydante des polyphénols, qui est une composante cruciale de la défense de l'organisme contre les LPR :

- ✓ Absorption UV : Rutin et naringenin ont une fonction de protection solaire qui empêche la surproduction de RLs (**Tripoli et al., 2007**).
- ✓ Les cytoflavonoïdes régulent l'expression des gènes de la catalase, le glutathion peroxydase et le sous-peroxyde dysmutase, renforçant l'activité antioxydante de la superoxydesmutase et de la catalase.
- ✓ Les polyphénols d'agrumes ont été démontrés dans les essais pour être capables de chélater les métaux, principalement le fer, et de neutraliser les LR (**Del-Rio et al., 2004**).
- ✓ Des études expérimentales ont lié les flavonoïdes d'agrumes à des taux sanguins plus faibles de lipoprotéines LDL de faible densité, qui ont subi moins d'oxydation (**Gonzalez-Molina et al., 2010**).

#### **IV.4.8.2. Activité anti-inflammatoire**

Ils sont capables d'inhiber les kinases et phosphodiesterases essentiels pour l'activation et la transduction du signal cellulaire. Ils ont également une incidence sur l'activation de certain nombre de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, y compris les lymphocytes T et B (**Manthey et al., 2001**).

#### **IV.4.8.3. Activité antiallergique**

Les agrumes contiennent de la quercétine, de l'hespéridine et de la diosmine, qui agissent comme des inhibiteurs de l'histamine, prévenant les réactions allergiques et l'inflammation (**Gonzalez-Molina et al., 2010**).

#### **IV.4.8.4. Activité antimicrobienne et antivirale**

Les flavonoïdes d'agrumes ont une action antibactérienne significative, comme l'ont montré plusieurs études expérimentales :

- ✓ La quercétine et l'héspéridine inhibent l'infectiosité et la réplication de l'herpès simplex, le poliovirus, le virus parainfluenza et le virus syncytial (**Tripoli et al., 2007**).
- ✓ L'héspéridine, aglycone de l'héspéridine expose une activité antimicrobienne modérée contre le *salmonella typhi* et *salmonella typhimurium*.


#### **IV.4.8.5. Activité anti-cancer**

Parce qu'ils sont considérés comme des agents antiproliférants et cytotoxiques, les flavonoïdes, qui sont présents dans plusieurs plantes, sont riches en métabolites secondaires qui sont efficaces dans la prévention et le traitement du cancer.

#### **IV. 5. Toxicité des huiles essentielles**

Malgré leurs effets positifs, les huiles essentielles ne devraient être utilisées qu'à modération en raison de leur composition chimique compliquée, ce qui les rend potentiellement dangereux à des concentrations excessives (**Hammer et Carson, 2011**). La simplicité d'utilisation des produits peut attirer les clients (**Bernadet, 1983**).

Les huiles essentielles d'agrumes, qui contiennent des furocoumarines (**Smith et al., 2000**) et provoquent une rougeur de la peau lorsqu'elles sont exposées aux rayons UV, sont phototoxiques en raison de leurs qualités photosensibilisantes, mais l'ingestion de ces huiles n'entraîne aucun risque de toxicité (**Robert et Lobstein, 2005**).



# Choix stratégiques et et démarche expérimentale

expérimentale  
et démarche

## **I. Choix stratégiques et démarche expérimentale**

Cette section présentera les choix clés qui ont influencé le programme de recherche décrit dans cette thèse.

### **I.1. Objectifs détaillés et justification de la démarche expérimentale**

Cette recherche utilise l'escargot *Helix aspersa* comme modèle bioindicateur pour évaluer la toxicité unique et combinée d'un fongicide (Hymexazole) et un insecticide (Bifenthrine), et l'impact protecteur des huiles essentielles d'orange.

L'étude a examiné l'impact de divers facteurs sur le comportement et les caractéristiques morphophysiologiques de *Helix aspersa*, y compris BF, HY, HEO et leurs combinaisons, et a identifié des biomarqueurs sensibles aux niveaux cytosolique et mitochondrial.

L'utilisation nouvelle d'huiles essentielles d'écorce d'orange pour protéger les escargots *Helix aspersa* contre la toxicité à long terme des pesticides (Bifenthrin, Hymexazole, seul ou en combinaison) est ce qui distingue cette recherche des autres.

### **I.2. Choix du modèle biologique**

Nous avons opté, dans cette étude, pour le choix d'un gastropode terrestre *Helix aspersa* qui est un bioindicateur pleinement satisfait pour les raisons suivantes :

- ✓ Facile à recueillir et à cultiver et.
- ✓ Organisme sédentaire, largement répandu et largement dispersé géographiquement.
- ✓ Très tolérant aux changements environnants.
- ✓ Bénéficie d'une durée de vie raisonnable.
- ✓ Possède une taille d'organe (hépatopancréas) suffisante qui permet une analyse totale satisfaisante.

### **I.3. Choix des pesticides et des doses**

Dans notre stratégie d'étude, une étape importante consistait à spécifier les pesticides et les mixtures qui seront évalués. Après avoir étudié des critères relatifs à la composition chimique, le mécanisme d'action, les objectifs physiologiques et/ou cellulaires, la possibilité d'exposition du consommateur et la toxicité aiguë et chronique des pesticides, nous avons opté pour :

- ✓ **L'utilisation de la Bifenthrine**, un insecticide qui présente un risque très élevé de dommages à long terme. Le facteur de persistance dans les tissus est assez élevé, et elle est très toxique pour les invertébrés.
- ✓ **L'utilisaion de l'Hymexazole** un fongicide qui présente un risque grave d'intoxication chronique pour les invertébrés aquatiques, les algues et les organismes vivants dans les sédiments.

Afin d'évaluer l'exposition des invertébrés aux pesticides sélectionnés, nous devons choisir les doses appropriées. Nous nous sommes donc inspirés des doses utilisées dans des études antérieures. En absence de toute étude utilisant les deux pesticides choisis sur l'escargot, nous nous somme permi d'extrapoler les doses effectuées sur les rats aux escargots. Nous nous sommes dons consentis d'utiliser les doses suivantes pour une exposition sub-chronique de 90 jours

- ✓ **la Bifenthrine** : selon les études toxicologiques et écotoxicologiques traitant la bifenthrine, nous avons choisi la dose de 0,83 mg/g/2j (**Beausoleil et al., 2009**).
- ✓ **l'Hymexazole** : la dose (90 ug/g/2jour) a été choisie. Cette dose a été déduite à partir des données trouvées dans **EFSA (2010)**.

#### **I.4. Choix des huiles essentielles de l'écorce d'orange**

L'écorce d'orange Thomson naval est :

- ✓ Riche en métabolites secondaires, en particulier des flavonoïdes et des huiles essentielles, qui sont riches en composés phénoliques.
- ✓ Abondant en vitamine C et une source de produits chimiques physiologiquement actifs.
- ✓ Abondante et facile à récolter.
- ✓ Riche en fibres de pectine et de mélase destinées à l'alimentation animale.


Les HEO sont d'un grand intérêt pour plusieurs domaines, nous avons choisi une seule dose qui est de 0,151µl/g/2j, Cette dose a été utilisée par **Omoniwa et al. (2014)**.

#### **I.5. Choix de mode de traitement par injection**

Nous avons opté pour que l'adminisration des différents traitements soit faite par injection. Pour cela, nous avons utilisé une microseringue pour injecter les escargots au niveau côté du pied (**Burton et al., 1987**).

## **I.6. Choix de l'organe**

L'organe utilisé dans ce travail de thèse est l'**hépatopancréas**. En effet, le foie est un organe crucial pour le métabolisme, l'accumulation, la biotransformation et l'excrétion de divers xénobiotiques et joue un rôle dans la décomposition et l'absorption de différents composés chimiques. D'autre part, l'exposition aux pesticides peut entraîner des changements cytologiques extrêmement graves dans l'hépatopancréase, qui est un organe vital pour la désintoxication des polluants.



# Etude physiologique et comportementale

comportementale

étude physiologique et comportementale

## **II. Étude physiologique et comportementale**

### **II.1. Introduction et objectif d'étude**

L'un des problèmes environnementaux les plus importants aujourd'hui est la question des produits phytosanitaires (pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques, etc.) en raison de leur rétention dans l'environnement naturel et de leurs effets. Lorsque les polluants ont un impact négatif sur les processus physiologiques d'un invertébré, il peut modifier un certain nombre de processus critiques au niveau individuel (**Forbes et Forbes, 1994**). Ces impacts sont le résultat de changements dans leur mode de vie (exercice, nutrition, comportement, etc.), ainsi que des changements de leurs processus cellulaires, tissulaires ou métaboliques ou encore par des modifications physiologiques (poids de la masse corporelle, poids et qualité de la coquille etc...) (**Notten et al., 2006**).

Les objectifs de cette section étaient d'établir l'élevage afin de préparer les individus aux essais dans des circonstances soigneusement réglementées, suivis d'une étude sur les effets des différents traitements sélectionnés sur le comportement des escargots et sur certaines caractéristiques morphométriques.

### **II.2 Matériels et méthodes**

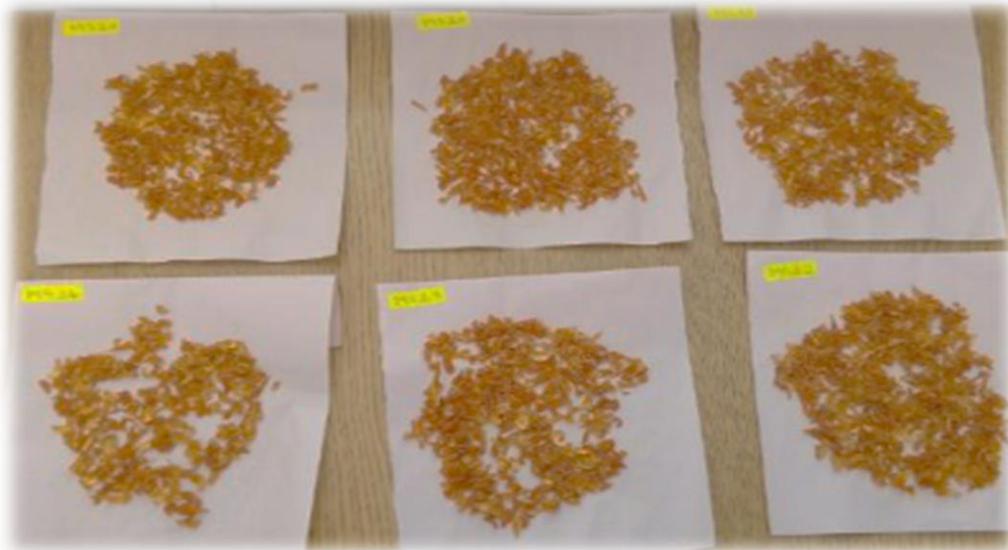
Les expérimentations effectuées dans cette étude ont été accomplies dans le Laboratoire des molécules et applications bioactives (LMBAA), du département de Biologie appliquée au niveau de l'Université de Tébessa.

#### **II.2.1. Matériels**

##### **II.2.1.1. Matériel végétal**

Les oranges (originaires de l'est de l'Algérie) ont été achetées au marché de la commune de Tébessa au cours du mois de Novembre 2019. Des fruits mûrs et sains ont été sélectionnés. L'identification de l'espèce *Citrus sinensis* (variété *Thomson Navel*) a été faite par Mme Hioun (botaniste travaillant à l'Université de Tébessa) sur la base de critères descriptifs (présence de graines, nombril, peau, couleur). La peau d'orange a été coupée en petits morceaux et séchée à l'ombre pendant 15 jours à température ambiante (**Figure 23 et 24**).





**Figure 23 :** L'écorce d'orange Thomson est coupée en petits morceaux (photo originale, 2019).



A



B

**Figure 24 :** Photographies des écorces d'orange Thomson naval  
(A) : Fraîches (B) : Sèches (photo originale, 2019).

#### II.2.1.2. Matériel biologique

Le mollusque gastropode Petit-gris, appelé *Helix aspersa*, membre de la famille des Helicidae, a été utilisée dans l'étude. L'escargot *Helix aspersa* sont adultes avec un poids moyen de 14 g ( $\pm 0,35$  g) (Figure 25), ont été recueillis d'un emplacement non traité dans la région d'annaba. Ensuite, pendant trois mois, ils ont été acclimatés dans un environnement de

laboratoire avec un éclairage idéal (18 heures de lumière toutes les 24 heures, 20 °C et 80–95 % d'humidité). Au total, 80 escargots ont été utilisés dans notre expérimentation.



**Figure 25 :** Escargots *Helix aspersa* (photo originale, 2019).

Ils sont répartis dans des boîtes de plastiques transparents, avec couvercle perforé (pour l'oxygénation), et nourris de nouvelles feuilles de laitue fraîche, et chaque boîte à une éponge humide pour garder l'humidité (**Figure 26**). Les boîtes sont nettoyées régulièrement trois fois chaque semaine et l'alimentation a été renouvelée quotidiennement.



**Figure 26 :** Elevage des escargots dans le laboratoire (photo originale, 2019).

### II.2.1.3. Matériel chimique

La substance chimique utilisée est:

- ✓ **La bifenthrine (BF)** : (C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>ClF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) ; est proposé comme une substance cireuse beige sous le nom de commerce TRISTAR continental 10 % EC. Une variété de parasites agricoles peut être contrôlée à l'aide d'insecticides pyréthrinoïdes.

- ✓ **L'hymexazol (HY)** : (C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>) ; SNAKE contient 30% SL, apparaît comme une substance cireuse jaune-blanc. Ingrédient actif d'un fongicide vendu sous le nom de Tachigazol en Algérie. Les triazines sont sa famille chimique.

#### II.2.1.4. Matériel d'extraction

Le **Tableau 13** ci-dessous représente les différents matériels et les instruments utilisés pour la procédure d'extraction.

**Tableau 13** : Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction.

Appareil	Verreries et Autres	Solvant et Soluté
Balance (Scout Pro)	Éprouvette de 500 ml	Eau distillé
Hydro-distillateur de type Clevenger :	Bêcher de 50 ml	Acétone
Chauffe-ballon	Flacon en verre des 5 ml	
Ballon en verre pyrex 2000 ml	Pissette	
Une colonne	Entonnoir	
Un réfrigérant	Papier aluminium	
Un collecteur		

## II. 2.2. Méthodes

### II.2.2.1. Extraction et analyse de l'huile essentielle d'orange Thomson naval

#### II.2.2.1.1. Extraction

L'hydrodistillation a été utilisée pour éliminer les huiles essentielles de l'écorce d'orange. L'approche la plus simple et la plus populaire est celle-ci. L'équipement de type Clevenger est utilisé pour l'hydrodistillation (**Figure 27**).



**Figure27** : Procédé d'hydro-distillation (photo originale, 2019).

Le ballon en verre pyrex est utilisé pour insérer 100 g d'écorce d'orange séchée avec 1200 ml d'eau distillée. Chacun de ces composants à un but distinct. Suite à l'installation et à la fermeture du montage, le chauffe-ballon est allumé avec le meilleur réglage de chauffage pour permettre une extraction stable à un rythme prévisible et bien contrôlé. La condensation se produit dans la colonne remplie de réfrigérant. Le condensateur reçoit la vapeur qui est infusée avec de l'huile essentielle. La durée prévue du processus d'extraction est de trois heures (jusqu'à ce que nous puissions obtenir plus d'HE). En raison de la densité et de la couleur différente de l'huile essentielle par rapport à l'hydrolat (eau aromatique), elles peuvent être séparées les unes des autres. Il est récupéré par décantation, puis séparé de lui, et stocké dans des flacons bruns qui sont hermétiquement scellés et maintenus dans un endroit sombre, froid (4 °C) loin de la lumière.

#### II.2.2.1.2. Protocole de l'extraction

1- Pesage



2- Hydrodistillation



3- Apparition de l'huile



4- Séparation



5- Conservation



### II.2.2.1.3. Détermination des rendements des huiles essentielles

Le poids du HEO extrait par rapport au poids de la biomasse végétale qui doit être traitée, selon la recherche **Bouhali, (2015)**, est le rendement de HEO. En suivant la formule ci-dessous, le rendement est déterminé et représenté en pourcentage (%) :

$$R (\%) = P_{\text{HEO}} / P_{\text{MV}} \times 100$$

**R** : Le rendement des huiles essentielles (%).

**P<sub>HEO</sub>** : Poids de l'HEO extraite (g)

**P<sub>MV</sub>** : Poids du matériel végétal traité (g)

### II.2.2.1.4. Analyses de la composition chimique des huiles essentielles d'orange *Citrus sinensis*

Au niveau de l'Institut national d'agronomie d'Alger (El-Harrach) a utilisé la chromatographie à phase gazeuse combinée à la spectrométrie de masse ont été analysée les huiles essentielles d'orange de *Citrus sinensis* (variété Thomson navel). L'analyse a été effectuée sur un chromatographe à phase gazeuse Chrompack CP 9002 avec contrôle électronique de la pression, une phase stationnaire et un détecteur d'ionisation de flamme réglable à 280 °C. La phase mobile était composée d'hélium qui coulait à une vitesse de 1,3 ml/min, et l'injecteur était programmé pour fonctionner à une température de 250 °C. La source était à 230 °C, et l'interface à 280 °C.

## II. 2. 3. Méthode de traitement

Après une période de 20 jours, nous avons commencé un traitement quotidien pendant 90 jours. Pour chaque traitement nous avons choisi 10 escargots, les solutions préparées sont délicatement injectées une fois, jour par jour sur le côté du pied de l'escargot en utilisant une microseringue (**figure 28**). Les animaux témoins reçoivent l'eau distillée.



**Figure 28 :** Injection des escargots *Helix aspersa* (photo originale, 2019).

Les 80 escargots utilisés dans notre expérimentation sont divisés en 8 lots :

- ✓ **Lot n°1 :** témoin a été injecté par l'eau distillée ( $20 \mu\text{l/g/2j}$ ).
- ✓ **Lot n°2 :** Bifenthrine ( $0,83 \text{ mg/g/2j}$ ) de poids corporel.
- ✓ **Lot n°3 :** traités par l'hymexazole ( $90 \mu\text{g/g/2j}$ ) de poids corporel.
- ✓ **Lot n°4 :** traités par huiles essentielles de l'écorce d'orange avec une dose de ( $0,151 \mu\text{l/g/2j}$ ) de poids corporel.
- ✓ **Lot n°5 :** traités par la mixture bifenthrine ( $0,83 \text{ mg/g/2j}$ ) + huiles essentielles de l'écorce d'orange ( $0,151 \mu\text{l/g/2j}$ ).
- ✓ **Lot n°6 :** traités par la mixture hymexazole ( $90 \mu\text{g/g/2j}$ ) + huiles essentielles de l'écorce d'orange ( $0,151 \mu\text{l/g/2j}$ ).
- ✓ **Lot n°7 :** traités par l'hymexazole ( $90 \mu\text{g/g/2j}$ ) + bifenthrine ( $0,83 \text{ mg/g/2j}$ ) de poids corporel.
- ✓ **Lot n°8 :** traités par la mixture (bifenthrine + hymexazole + huiles essentielles de l'écorce d'orange) avec les mêmes doses.

**Remarque :** l'huile essentielle de l'écorce d'orange a été administrée 30 minutes avant les pesticides.

## II. 2. 4. Dissection de l'escargot pour le prélèvement des organes

Les escargots ont subi un jeûne de 48 heures après avoir reçu une thérapie de 90 jours afin de nettoyer leurs systèmes digestifs. Pour empêcher la ré-ingestion des matières fécales, les boîtes de jeûne ont été nettoyées avec de l'eau artificielle. Après avoir été tués par congélation à -20 °C, les animaux sont disséqués pour extraire l'hépatopancréas et ensuite nettoyés dans de l'eau saline (**Figure 29**).



**Figure 29** : Etapes de la dissection des escargots et Prélèvement d'hépatopancréas  
(photo originale, 2019).

## II. 2. 5. Observation des effets comportementaux

L'objectif de la recherche était d'examiner les effets nocifs des pesticides testés ainsi que leurs effets protecteurs sur le comportement de *Helix aspersa*. Selon l'activité et l'emplacement géographique des animaux, les observations ont indiqué divers

comportements, tels que manger ou fuir de la nourriture. En outre, des changements de mouvement et de couleur ont été observés. Ces indicateurs sont visibles à l'œil humain, comme lorsqu'une boîte est ouverte et que son couvercle est placé sur la paille. Les résultats sont présentés sous forme d'observations quotidiennes pour chaque comportement par rapport aux concentrations de pesticides et d'huiles essentielles d'orange par rapport au contrôleur.

## II.2.6. Mesures des paramètres physiologiques

De nombreux facteurs biométriques sont pris en compte, notamment :

- ✓ **La mortalité** : après un traitement toxique et préventif, les escargots *Helix aspersa* subissent une surveillance quotidienne de la vitalité et les personnes décédées sont retirées du site d'essai. La mort d'un escargot est souvent simple à repérer : le pied-plat, jaune se dégage fréquemment du corps et le socle pédicé n'est attaché à aucune surface. L'odeur désagréable des escargots est également un indicateur. En cas de doute, le pied est stimulé avec une aiguille, le manque de réaction entraîne la mort de l'individu.
- ✓ **Le poids frais de l'escargot (tissus mous + coquille)** : avant et pendant le traitement (12 semaines), le poids frais des escargots (tissu mou et coquille) est évalué quotidiennement à l'aide d'une échelle de précision.
- ✓ **Le poids frais de la coquille, le poids frais de l'hépatopancréas**: en utilisant la même échelle que précédemment, les poids de la coquille fraîche et des glandes digestives sont calculés. Après que les animaux aient été tués et que 90 jours de traitement pesticide et HEO ont passé, ils sont pesés.
- ✓ **Le diamètre et la longueur de coquille** : les coquilles des escargots sont mesurées chaque deux jours pendant 12 semaines, pour s'assurer qu'elles n'endommagent pas leurs marges.



## II. 2. 7. protocole expérimental

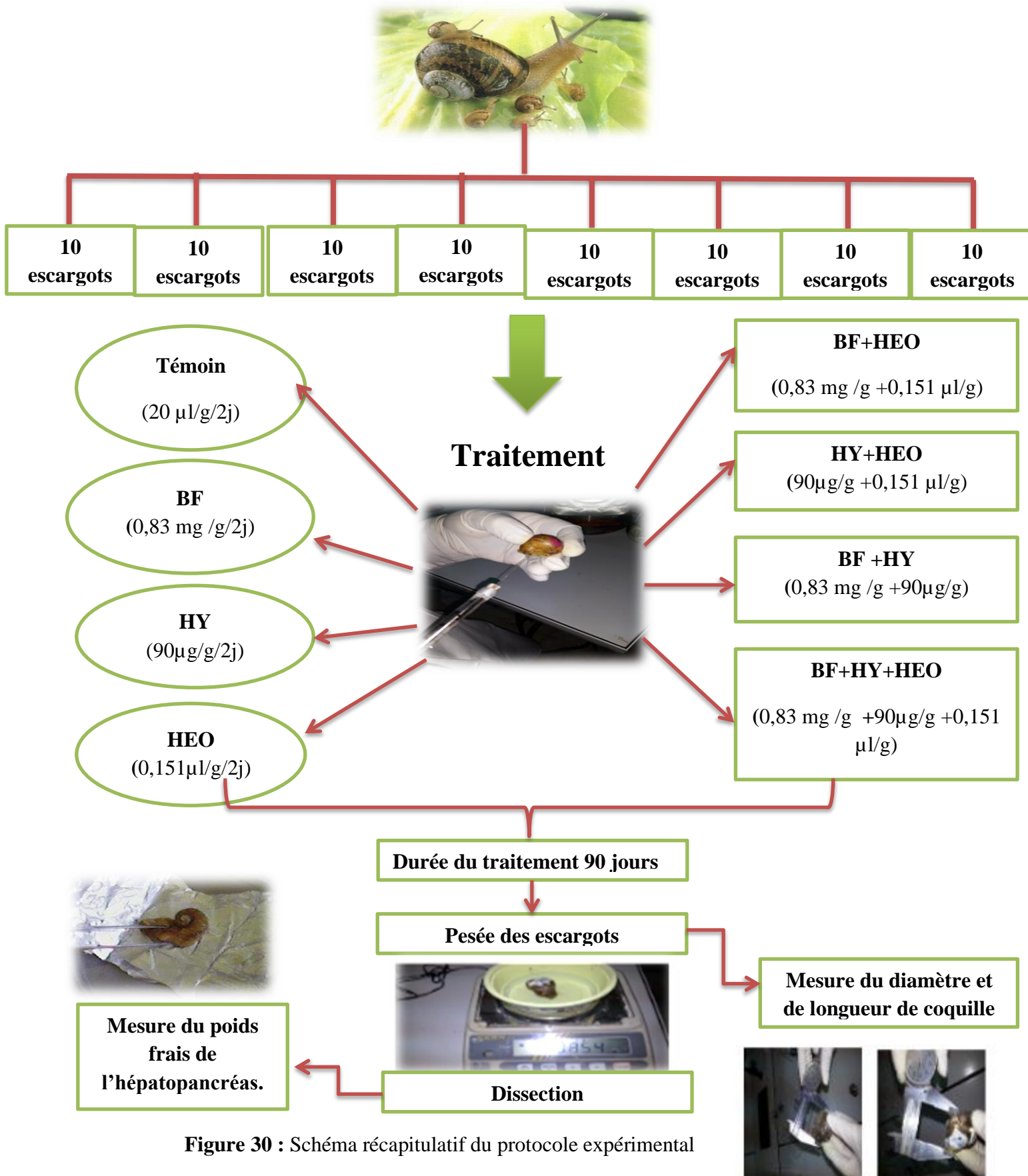


Figure 30 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

### II. 3. Analyse statistique

Les résultats ont été indiqués comme la moyenne de dix répétitions (déviations standard moyenne), et pour une visualisation plus facile, ces données ont été représentées sous forme de graphiques et d'histogrammes dans Office Excel 2010. En évaluant la variance à un facteur (ANOVA), les moyennes et la déviation standard sont déterminées pour chaque groupe expérimental à un seuil significatif de  $p \leq 0.05$ . Les résultats des tests sur les doses biochimiques et les activités enzymatiques et non enzymatiques ont été comparés entre les groupes étudiés en utilisant le test 't' de Student, ce qui a révélé les différences entre les deux groupes. Le programme de traitement et d'analyse des données MINITAB version 18 a été utilisé pour tous les calculs.

Nous avons fait deux comparaisons :

- Les groupes traités (BF, BF+HEO, HY, HY+HEO, BF+HY et BF+HY+HEO) contre le groupe témoins :
    - ✓ " \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".
    - ✓ " \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ )".
    - ✓ " \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".
  - Les groupes traités (BF+HEO, HY+HEO, BF+HY+HEO) par rapport au groupe traité (BF, HY, BF+HY) :
    - ✓ " **A** : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".
    - ✓ " **B** : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ )".
    - ✓ " **C** : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".
- Avec  $p > 0,05$  = la différence n'est pas significative.

## II.4. Résultats

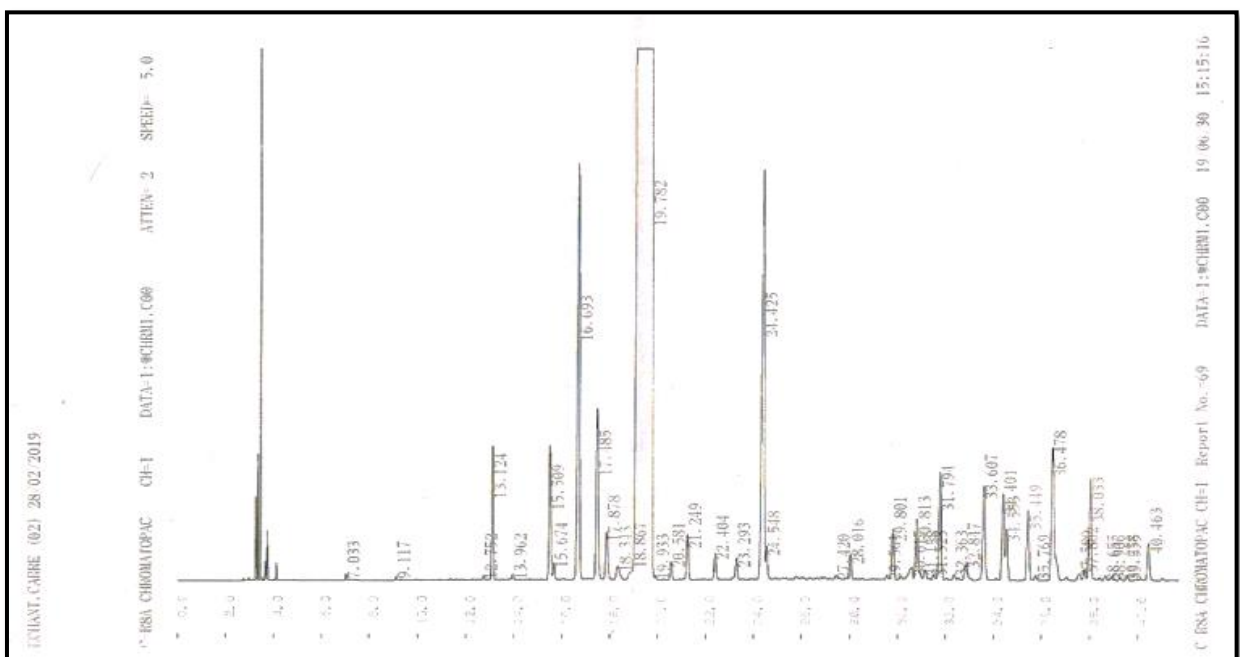
### II.4.1. Rendement et composition chimique des huiles essentielles d'écorce d'orange Thomson naval

L'huile essentielle d'écorce d'orange Thomson naval était un liquide jaune clair avec un rendement de 1,05 % (**figure 31**), réalisée au niveau du laboratoire à l'aide de l'extraction par hydrodistillation.



**Figure 31 :** Huile essentielle d'écorce d'orange Thomson naval (photo originale, 2019).

La **figure 32** décrit un total de **24** composants, qui représentent **96,42 %** de l'huile. La majeure partie de la composition chimique des HEO de la Thomson Naval est composée de composés d'hydrocarbures, dont le limonène, le linalol et le myrcène sont les plus répandus. Limonène a la concentration la plus élevée, à **89,19 %**, tandis que les deux autres ont la plus faible, à **1,32 %** et **1,57 %**, respectivement. Terpen (**0,03 %**) et Nonanal **0,04 %** de 4-ol était la proportion la plus faible. (**Tableau 14**).



**Figure 32 :** Chromatogramme CPG/SM de l'HEO Thomson naval

**Tableau 14** : Composition chimique des huiles essentielles d'écorce d'orange Thomson naval

Nom de composé	Pourcentage (%)
	Tr
$\alpha$ -thujene	0,42%
$\alpha$ -pinène	0,41%
Sabinene	1,57%
Myrcene	0,42%
Phellandrene	0,26%
$\alpha$ - carène	0,07%
$\alpha$ -terpinene	89,19%
Limonène	0,13%
$\gamma$ -terpinene	0,08%
Octanol	0,08%
Terpinolene	1,32%
Linalol	0,03%
Nonanal	0,04%
Terpen.4-ol	0,33%
Citronellal	0,08%
Alpha-Tepèneol	0,43%
Citral	0,26%
Nerol	0,24%
Neral	0,57%
Géraniol	0,10%
Citronellylacetate	0,15%
geranylacetate	0,16%
$\beta$ -caryophyllene	0,08%
$\alpha$ -humulene	0,08%

#### II.4.2. Effet sur le comportement

Les escargots exposés au Bifenthrine (BF) et l'Hymexazole (HY) et leur mixture ont montré une série de symptômes :

✓ **Diminution d'activité locomotrice :**

Nos résultats montrent que les escargots traités par l'HEO (0,151 ul/g), BF+HEO et HY+HEO et BF+HY+HEO, a la première semaine de l'injection, ils ne se déplacent pas beaucoup par rapport aux escargots temoins et passent la majorité de leur temps au sommet des boîtes. Tandis qu'on, enregistre l'absence d'une activité motrice après les premières heures de l'injection pendant la période expérimentale chez les lots traités par la BF (0,83 mg /g) et l'HY (90 ug /g) et leur mixture (BF+ HY), puis elle revient progressivement à son état normal comparant au groupe traité uniquement par l'un des deux pesticides et la mixture avec l'HEO.



**Figure 33 :** Effet des différents traitements sur la diminution d'activité locomotrice des escargots (**photo originale, 2019**).

✓ **Diminution le taux de prise de nourriture :**

Les escargots traités par HEO, (BF+HEO), (HY+HEO), (BF+HY+HEO) ne sont plus attirés par la nourriture. Après une période d'exposition de deux semaines, la quasi-totalité des escargots consomme moins des feuilles de laitue que les escargots de contrôle. Même encore, la majorité des traitements BF, HY et BF/HY tout au long de l'essai ont eu une activité comparable aux escargots témoins.

✓ **Changement de la couleur de coquille :**

Après que le temps de traitement ait terminé, nous avons qu'il y a une diminution de la dispersion des pigments noirs chez les escargots traités par la BF et l'HY et leur mixture (BF+HY), par rapport aux escargots témoins. Aucun changement de la couleur chez les lots traités par HEO, (BF+HEO), (HY+HEO), (BF+HY+HEO) par rapport au témoin. Bien qu'il y ait un léger changement dans la couleur des coquilles dans le groupe qui est injecté avec le mélange HEO, BF et HY.



**Figure 34 :** Effet des différents traitements sur la couleur de coquille des escargots  
(Photo originale, 2019).

✓ **perturbation de l'orientation :**

La toxicité par leur mixture (BF + HY), (BF+HEO), (HY+HEO), (BF+HY+HEO) peut perturber l'orientation et la capacité de déplacement chez les escargots, tandis qu'aucun changement enregistré chez les restes groupes

#### **II.4.3. Effet sur les paramètres physiologiques**

En utilisant les procédures décrites ci-dessus, des données morphométriques (estimation de la mortalité, poids frais de l'escargot, hépatopancréas et coquilles) ont été recueillies auprès de tous les escargots de traitement analysés et témoins.

### II.4. 3.1. La mortalité

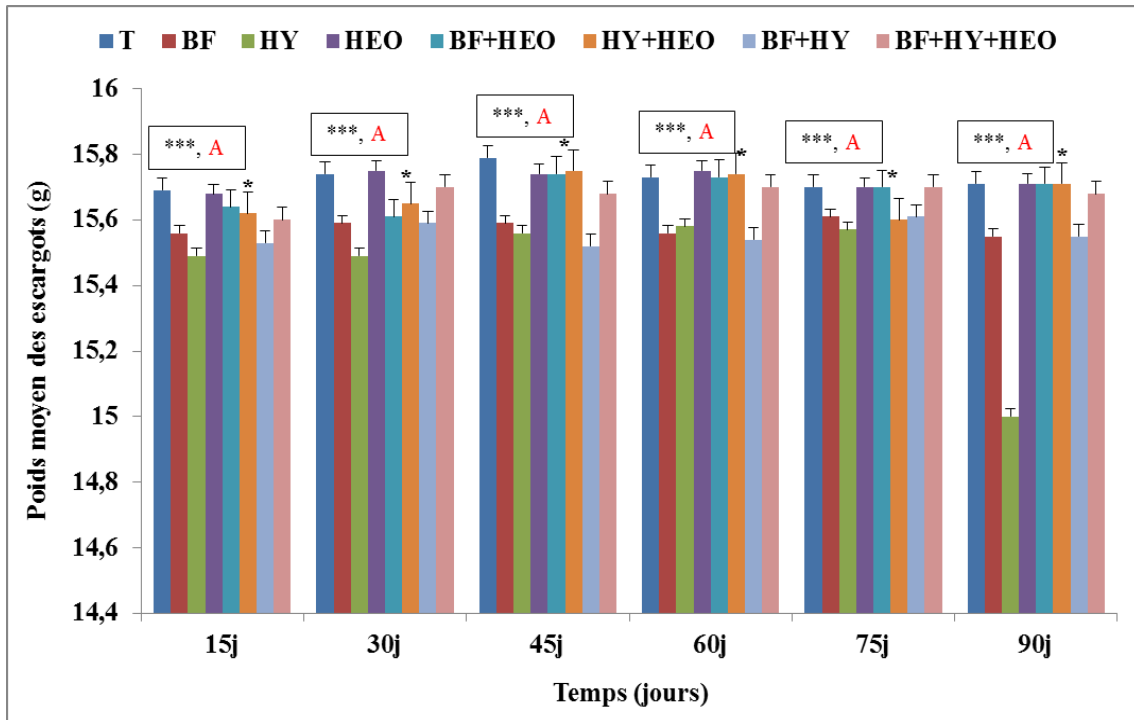
Seulement 5 escargots sur les 80 qui ont été testées sont morts tout au long de l'essai, soit 6,25 % d'entre elles. Selon le **tableau 15**, il y avait 3 décès : 1 au cours des 15 premiers jours de traitement dans le groupe BF+HEO, 2 dans les 30 jours suivants de traitement au groupe HEO, et finalement 2 après 40 jours de thérapie dans le groupe BF+HY+HEO.

**Tableau 15** : Mortalité des escargots enregistrée à la fin de la période de traitement

Période d'exposition	Début de l'expérience	15 Jours	30 Jours	45 Jours	60 Jours	75 Jours	90 Jours	Mortalité totale
Groupe T	0	0	0	0	0	0	0	0
Groupe BF	0	0	0	0	0	0	0	0
Groupe HY	0	0	0	0	0	0	0	0
Groupe HEO	0	0	2	0	0	0	0	2
Groupe BF+HEO	0	1	0	0	0	0	0	1
Groupe HY+HEO	0	0	0	0	0	0	0	0
Groupe BF+HY	0	0	0	0	0	0	0	0
Groupe BF+HY+HEO	0	0	0	2	0	0	0	2
Mortalité Totale	0	1	2	2	0	0	0	5

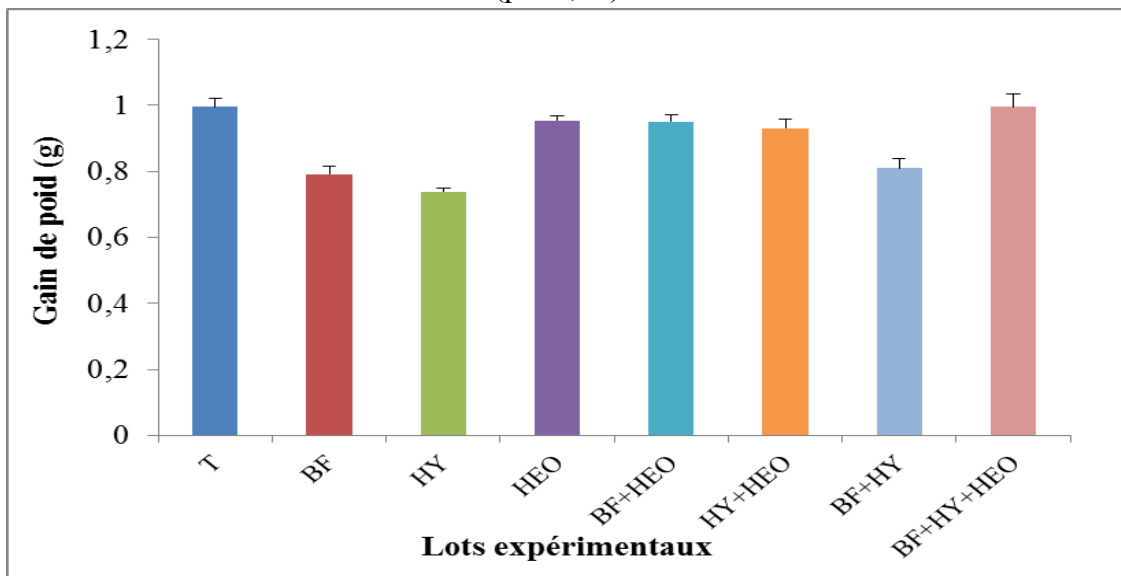
### II.4. 3. 2. Le poids frais moyen des escargots

Les graphiques 35 et 36 illustrent l'impact des insecticides, de l'huile essentielle d'écorce d'orange et de leurs mélanges sur le développement du poids moyen et le poids frais moyen des escargots au fil du temps.



**Figure 35 :** Evolution poids corporelle chez les escargots témoins et traités.

" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; A : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".



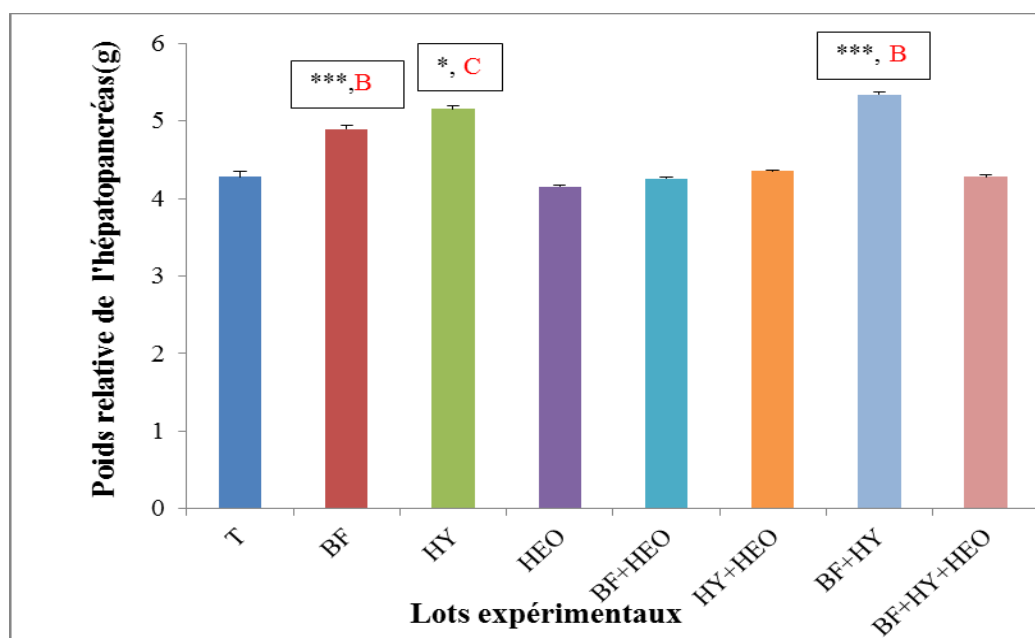
**Figure 36 :** Evolution de gain du poids corporels chez les escargots témoins et traités.



En conséquence du traitement, nos résultats indiquent que les lots qui ont reçu par la bifenthrine et l'hymexazole et leur mixture révèlent une réduction du poids corporel et diminution du gain de poids comparativement au lot témoin. On note une différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) après l'exposition à BF, HY et BF+HY par rapport au témoin et aux lots pesticides + HEO. Par ailleurs, une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) a été observée chez les lots traités par BF+HEO et HY+HEO par rapport au témoin. Aucun changement significatif n'a été constaté chez les lots traités par HEO et BF+HY+HEO par rapport au témoin. À partir de la première semaine d'exposition, il y a eu une augmentation notable du poids corporel lorsque l'huile essentielle d'orange Thomson Naval a été donnée aux groupes exposés aux deux pesticides et à la combinaison, par opposition au groupe traité avec un seul des deux.

### II.4.3. 3. Le poids frais moyen de l'hépatopancréas

La figure 37 montre comment le poids relatif (PR) des hépatopancréas a changé au fil du temps dans les groupes des escargots témoins, et traités par des pesticides ou de pesticide plus HEO.



**Figure 37 :** Évolution du poids moyen de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités.

" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; B : différence hautement significative ( $p \leq 0,05$ ) ; C : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) " .

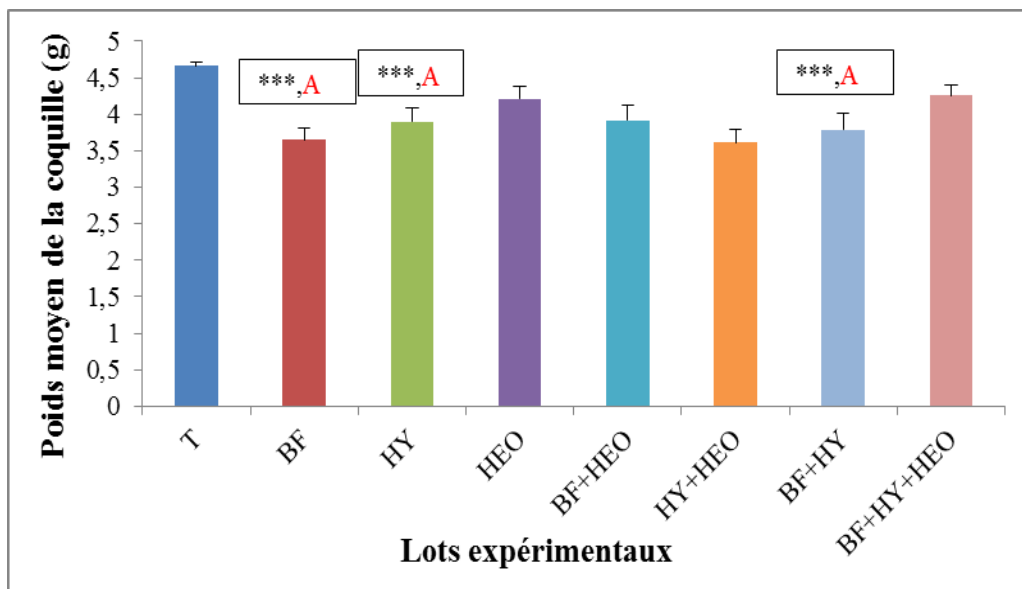
Lors de la comparaison du poids relatif de l'hépatopancréas entre le groupe traité par l'HY et le groupe de contrôle, ainsi que le lot HY+HEO-traité, il y a eu un changement statistiquement significatif ( $p \leq 0,05$ ).

Concernant les lots traités par BF, BF+HY, Le poids proportionnel des hépatopancréas dans les deux lots est très significativement différent ( $p \leq 0,001$ ), comparant au témoin. Aussi bien, on trouve une différence assez remarquable ( $p \leq 0,01$ ) comparant par les lots recevant pesticides plus HEO.

Par contre, les résultats ont montré que l'addition de l'HEO à des escargots exposés aux pesticides a un effet correcteur, qui a été exprimé par une réduction des poids relatifs d'hépatopancréas chez les escargots exposée par rapport aux escargots non traités. En comparaison avec les témoins, il n'y a pas de changements perceptibles.

#### II.4.3.4. Le poids frais moyen de la coquille

La figure 38, qui compare les escargots témoins et testées, et montre l'évolution du poids frais moyen de la coquille au fil du temps.



**Figure 38 :** Effets de BF, d'HY, HEO et de leurs mixtures sur le poids frais moyen coquillère des adultes de l'escargot *Helix aspersa*.

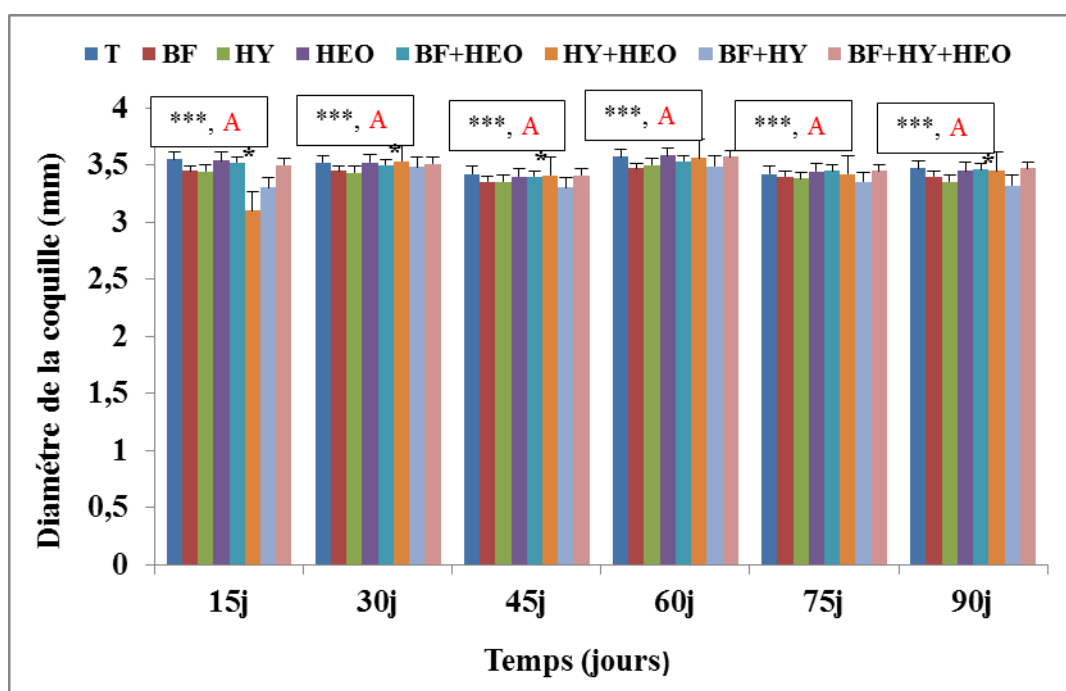
" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; A : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".

L'évolution de ce poids par exposition des escargots au BF et au HY, et leurs mixtures montre par rapport aux escargots de contrôle, un déclin très substantiel ( $p \leq 0,001$ ) s'est produit. En plus remarquée une différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) comparant avec les lots injectés par pesticides plus HEO.

Les lots HEO et BF+HY+HEO traités n'ont montré aucune différence perceptible par rapport au non traités.

#### II.4.3. 5. Le diamètre de coquille

La figure 39 montre comment la présence de BF, HY, HEO et de combinaisons a affecté le développement du diamètre D de la coquille de l'escargot *Helix aspersa*.



**Figure 39** : Evolution de diamètre de la coquille chez les escargots témoins et traités.

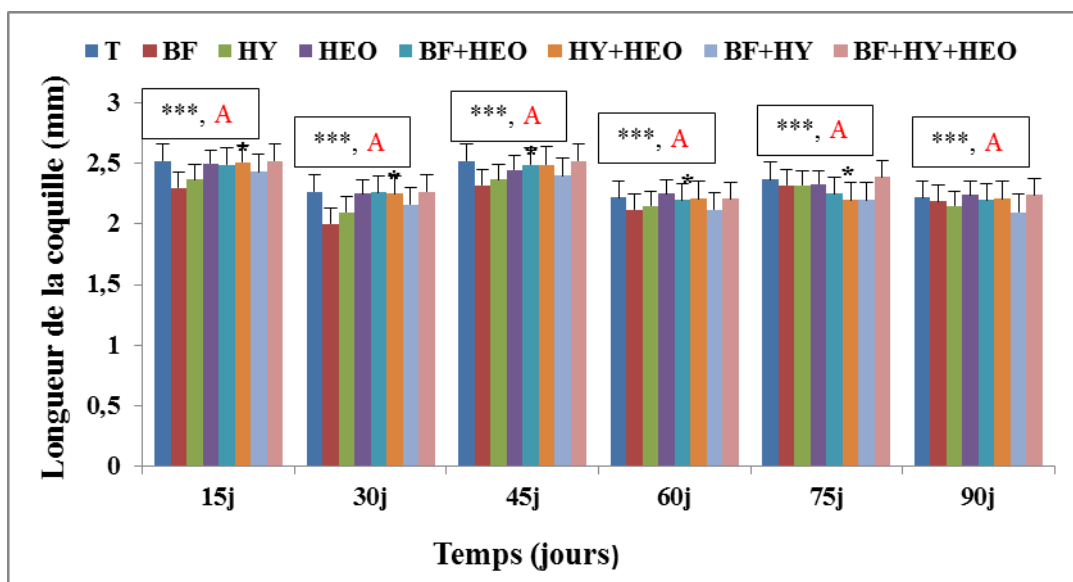
" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; A : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".

Nos résultats montrent une baisse assez considérable ( $p \leq 0,001$ ) après l'exposition à BF, HY et BF+HY par rapport au témoin et aux lots pesticides + HEO. En outre, dans les lots traités avec BF+HEO et HY+ HEO par rapport à l'essai, une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) dans les diamètres D a été observée. En comparaison avec les lots non traités, il n'y a pas de différence perceptible entre les lots traités avec HEO et BF+HY+HEO.

#### II.4.3.6. La longueur de coquille

L'effet des deux pesticides et huile essentielle d'écorce d'orange et de leurs mixtures sur La longueur de coquille des escargots est présenté dans la **figure 40**.

L'évolution des longueurs L de la coquille des escargots traités par le BF, HY et la mixture (BF+HY) montre une réduction très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) par rapport à celui des escargots témoins pendant 90 jours de traitement et aux lots BF + HEO, HY+HEO. Toutefois, lorsque les escargots sont exposés à HEO et à leurs combinaisons (BF+ HY+ HEO), le développement de ces longueurs est considérablement réduit ( $p \leq 0,05$ ) par rapport aux lots de contrôle.



**Figure 40** : Evolution de longueur de la coquille chez les escargots témoins et traités.

" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; A : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".

## II.5. Discussion

En tant que marqueurs écologiques essentiels de la pollution métallique et organique, des invertébrés, tels que les gastéropodes pulmonaires, ont été utilisés pour évaluer la qualité des écosystèmes dans le milieu aquatiques et terrestres (**Hamdi-Ourfella et al., 2014**).

Notre recherche examine les conséquences de la pollution sur le développement et la physiologie de l'*Helix aspersa*, un composant vital qui joue un rôle important dans de nombreux écosystèmes (**Gomot et Kerhoas, 2000**).

La littérature manque de recherches toxicologiques sur la combinaison (BF + HY) de pesticides, et les études montrent que l'impact d'un mélange ne correspond pas toujours aux effets des substances individuelles (**Padhi et al., 2008**). Cela rend difficile de prédire l'impact global de l'exposition des gastropodes aux pesticides en raison des nombreuses relations entre les éléments (**Lodovici et al., 1994**). La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature va se faire, si possible, avec les travaux réalisés sur les pesticides de la même famille et sur d'autres modèles biologiques proches des escargots.

### II.5.1. Rendement et composition chimique des huiles essentielles d'écorce d'orange Thomson naval

Le rendement en huiles essentielles des écorces d'oranges Thomson naval, obtenues par l'hydrodistillation à l'aide de matériaux végétaux était de 1,05%, ce qui est proche de celui obtenue par **Farahmandfar et al. (2019)** ; À partir de l'écorce d'orange de même espèce de Thomson Naval, **Hosni et al. (2010)** ont rapporté un rendement d'huile essentielle de **1,20 %** et **1,49 %**, respectivement.

En revanche, un teneur est diminué comparée à celle rapportée par **Jeannot et al. (2005)** et **Fuselli et al. (2008)**. Ces derniers ont produit des rendements d'huile essentielle pour l'écorce d'orange amère et l'écorce d'orange sucrée qui ont varié de **0,25 à 0,57 %** et de **0,06 à 0,8 %**, respectivement. Aussi, un rendement de **0,79 %** a été enregistré pour les huiles d'écorce d'orange de Colombie (**Blanco Tirado et al., 1995**). Le rendement des citrus HES varie de 1 à 3 % selon l'espèce (**Rega et al., 2003**). Les rendements de HES peuvent être directement influencés par des variables telles que la saison de récolte, le climat, l'emplacement géographique, la génétique des plantes, la fraîcheur, le temps de séchage et la technique d'extraction (**Vekiari et al., 2002**).

La spectroscopie des huiles essentielles de Thomson Naval a révélé la présence de 24 composants (tableau 14), dont 93 % des principaux composants de l'écorce d'agrumes sont

des hydrocarbures (**Njoroge et al., 2009**). D'autres produits chimiques sont présents à l'état de traces, qui soutiennent les principaux composants de l'huile essentielle Thompson Naval Orange, qui sont principalement des hydrocarbures. D'après l'échantillon que nous avons analysé au cours de cette étude, l'extraite des huiles essentielles de l'écorce de Thomson Naval est constituée de : limonène (89,19 %), le Myrcène (1,57 %), le Linalol (1,32 %), géraniol (0,57 %), Citral (0,43 %),  $\alpha$ -pinène (0,42 %),  $\alpha$ -phellandrene (0,42 %), sabinene (0,41 %), citronellal (0,33%), carène (0,26 %), nerol (0,26 %), Neral (0,24 %),  $\beta$ -caryophyllene (0,16 %), geranylacetate (0,15 %),  $\gamma$ -terpinene (0,13 %), citronellylacetate (0,10 %) terpinolene (0,08 %), octanol (0,08 %), Alpha-Terpèneol (0,08 %),  $\alpha$ -humulen (0,08 %),  $\alpha$ -terpinene (0,07 %) , Terpen.4-ol (0,04 %), Nonanal (0,03 %)

Les diverses études effectuées dans l'Algérie ou dans différents pays sur la caractérisation des huiles essentielles d'écorce d'orange *Citrus sinensis* ont avancé l'idée que cette huile essentielle a une diversité chimique (**Tableau 16**).

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles d'orange *Citrus sinensis* à partir de la plante récoltée en turque a été effectuée par **Kirbaslar et al. (2009)**, qui ont identifiés les composés majoritaires suivants " Limonene (91.6 %), myrcene (1.3 %), sabinene (1,0 %) and  $\alpha$ -pinene (0,9 %),  $\beta$ -caryophyllene (0,1 %),  $\alpha$ -copaene (0,1 %), octanal (1,4 %), decanal (0,2 %), geranial (0,2 %), linalool (0,4 %),  $\alpha$ -terpineol (0,1 %), geraniol (0,1 %), geranyl acetate (0,1 %) and neryl acetate (0,1 %). L'huile essentielle de l'espèce récoltée en Tunisie, est riche en Limonene (96,0–97,3 %),  $\beta$ -pinene (1,45–1,82 %), verbenone (0,17–0,36 %), linalool (0,04–0,22 %),  $\beta$ -sinensal (0,04–0,09 %),  $\alpha$ -copaene (0,04–0,05 %),  $\beta$ -elemene (0,02–0,06 %), et  $\alpha$ -sinensal (0,02–0,04 %) " (**Hosni et al., 2010**).

L'huile essentielle récupérée dans l'étude du **Espina et al, (2011)** contient " Limonene (85,5 %), cis- limonene oxide (1,03 %), myrcene (0,92 %), 8-dien-1-ol (0,75 %), carvone (0,65 %), linalool (0,47 %) and sabinene (0,43 %), (E)-patchenol (0,41 %) and valencene (0,34 %) " sont les principaux constituants. On remarque également Limonene à (95,35 %),  $\beta$ -myrcene à (2,48 %),  $\alpha$ -terpineol à (0,42 %) et  $\alpha$ -pinene (0,49 %) dans l'étude de **Murthy et al. (2012)** en États-Unis.

Nos conclusions sont principalement appuyées par celles faites sur la variété *Citrus sinensis* par **Sovoboda et Greenaway** en 2003. La composition chimique de HEO est principalement composé de " limonène (93,6 %) et de  $\beta$ - myrcène (2,0 %), et de composés minoritaires tels que le décanal (0,82 %), sabinène (0,7 %),  $\alpha$ -pinène (0,4 %) et  $\beta$ -phellandrène (0,3 %) ".

**Tableau 16:** Composition d'huile essentielle de *Citrus sinensis* rapportée dans la littérature.

L'origine de la plante	Les composants majeurs	Pourcentage	Références
<b>Turkey</b>	Limonene myrcene sabinene $\alpha$ -pinene $\beta$ -caryophyllene $\alpha$ -copaene octanal decanal geranial linalool $\alpha$ -terpineol geraniol geranylacetate neryl acetate	91,6 % 1,3 % 1,0 % 0,9 % 0,1 % 0,1 % 1,4 % 0,2 % 0,2 % 0,4 % 0,1 % 0,1 % 0,1 % 0,1 %	<b>Kirbaslar <i>et al</i>, (2009)</b>
<b>Tunisia</b>	Limonene $\beta$ -pinene linalool verbenone $\alpha$ -copaene $\beta$ -elemene $\beta$ -sinensal	96,0–97,3 % 1,45–1,82 % 0,04–0,22 % 0,17–0,36 % 0,04–0,05 % 0,02–0,06 % 0,04–0,09 %	<b>Hosni <i>et al</i>, (2010)</b>
<b>Spain</b>	Limonene cis-limonene oxide myrcene 8-dien-1-ol carvone linalool sabinene (E)-patchenol Valencene	85,5 % 1,03 % 0,92 % 0,75 % 0,65 % 0,47 % 0,43 % 0,41 % 0,34 %	<b>Espina <i>et al</i>, (2011)</b>
<b>États-Unis</b>	Limonene $\beta$ -myrcene $\alpha$ -terpineol $\alpha$ -pinene	95,35 % 2,48 % 0,42 % 0,49 %	<b>Murthy <i>et al</i>, 2012</b>

La présence des chimiotypes D-limonen, geraniol, linalol, citral, citronellal, terpineol et decanal, ainsi que l'environnement de la plante, son héritage génétique, son âge et d'autres

facteurs, peuvent tous contribuer à des variations dans la composition chimique des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, tant quantitativement que qualitativement. En outre, la maturité du fruit a une influence significative sur la composition chimique de l'huile essentielle (Hellal, 2011).

### II.5.2. Mortalité

Selon la recherche, la mortalité des escargots après l'exposition au bifenthrine, à l'hymexazole, HEO et à des combinaisons était de (6,25 %), ce qui était inférieur à (9,61%) de l'expérience Bourbia (2012) mais plus élevé que Schuytema *et al.* (1994) (13 %).

La mortalité réellement enregistrée (6,25%) était supérieure à celle observée dans l'expérience menée par de nombreux auteurs (5%) Gomot (1997), (4,3%) Scheifler *et al.* (2002). L'espèce testée et sa susceptibilité aux composés testés affectent en fait la mortalité des escargots.

### II.5.3. Réponses comportementales

En premier lieu, nous avons noté des modifications de comportement chez les escargots traitées par la BF, l'HY, et leurs mixtures BF + HY. En plus remarquée l'effet préventive d'HEO et leurs associées avec les pesticides (BF+HEO), (HY+HEO), (BF+HY+HEO).

Il est possible que les pesticides BF et HY et leurs mélanges aient un effet nocif et toxique sur ce type de gastéropodes observé par le comportement locomoteur et nutritionnel des escargots adultes, *Helix aspersa*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Salmi (2017) qui a travaillé sur la toxicité des CdSe, Novaluron et mixture CdSe/Novaluron sur *Helix aspersa*. Rodrigues *et al.* (2010) ont étudié un impact inhibiteur du thiaméthoxam sur le comportement locomoteur des rats. Les effets du carbamate sur le comportement des insectes ont été étudiés par Bingham *et al.*, en 2008 selon la même hypothèse. Le développement des escargots est également fortement influencé par la qualité de l'alimentation (Viard *et al.*, 2004). Par exemple, dans cette étude, les escargots témoins nourris avec les feuilles de laitue donnés un facteur de croissance plus élevé que ceux traités avec BF, HY ou BF+HY (Ait-hamlet *et al.*, 2019).

Cette étude a aussi montré que le BF, l'HY et leurs mixtures (BF+HY) sont capable de Changement de la couleur de coquille. Ces résultats sont également conformes à ceux de Reddy et Fingerman (1995), qui ont étudié les effets physiologiques du Cd sur le crab *Ucapugilator* après 48 heures d'exposition directe à 10 mg/L de Cd. (forte dose). Ces auteurs



ont montré que cette pollution a entraîné une réduction considérable de la dispersion du pigment noir dans les mélanophores (cellules contenant les pigments noirs).

L'utilisation du comportement des animaux comme indicateur de l'exposition sublétales à des polluants toxiques devrait être reconnue. (**Felten *et al.*, 2008 ; Al kadissi, 2012**).

Dans cette recherche, nous n'avons trouvé aucun changement sur le comportement d'*Helix aspersa* traité par HEO, BF +HEO, HY+HEO, BF+HY+HEO.

#### **II.5.4. Réponses physiologiques**

Les escargots traités par ingestion au bifenthrine, hymexazole, et leurs mixtures (BF+HY), apparaissent une diminution du gain de poids corporel durant les trois mois de traitement et une réduction du poids frais moyens.

Cette perte de poids est le premier signe de toxicité probable. Ces résultats sont cohérents avec ceux de **Grara *et al.* (2015)** qui ont étudié l'impact des nanoparticules ZnO sur *Helix aspersa* et l'étude de **Bouaricha, (2013)** sur la toxicité du biopesticide Emamectine benzoate sur les escargots *Helix aspersa*, qui a également souligné une diminution du poids frais des escargots. En conséquence, à partir de la troisième semaine de traitement, les insecticides (tiaméthoxam, tefluthrine), ainsi que leurs mélanges, empêchent les escargots de prendre du poids. Selon **Coeurdassier *et al.* (2001)**, il a également été démontré que le diméthoate réduisait le développement et la survie des escargots d'une manière dose-dépendante. **Simkiss et Watkins (1991)**, par exemple, ont fait une hypothèse selon laquelle *Helix aspersa* est capable de détecter des quantités élevées de zinc dans son alimentation, ce qui entraîne une réduction du taux d'ingestion d'aliments fortement contaminés. Des conclusions similaires ont été tirées par **Viard *et al.* (2004)** en présence de contamination au plomb : la quantité excessive de plomb dans le sol, que les escargots peuvent ressentir, limite leur taux d'apport et donc ralentit partiellement leur développement. Les phénomènes de toxicité, cependant, pourraient également être à blâmer pour cette inhibition de la croissance.

Des raisonnements similaires peuvent être utilisés pour l'étude de **Gomot-Devaufleury et Bispo (2000)**, qui a mis l'accent sur les effets du pentachlorophénol, du trichlorophénol et du naphthalène sur le développement de *Helix aspersa* et *Helix maxima* et a souligné une inhibition de la croissance chez *Helix aspersa* à la dose la plus faible. Dans la même veine, Aussi **Belhaouchet (2012)** a étudié la toxicité de Spinosad sur les escargots *Helix aspersa* et a découvert une réduction du poids frais des escargots. Selon **Schuyttema *et al.* (1994)**, qui ont testé la toxicité des aminocarbures, du méthylparathion et du paraquat, la diminution

significative du poids total des escargots traitées qu'ils ont observée est liée au type et à la dose du pesticide utilisé, qui est la même direction que notre travail.

Nous avons constaté que les animaux traités consommaient moins de nourriture que les contrôles, ce qui aide à expliquer la perte de poids. Par conséquent, il est évident que le contaminant en question croit que l'incapacité à manger découle d'un phénomène soit de toxicité dangereuse ou répulsion (**Swaileh et Ezzughayyar, 2001**).

Les escargots exposés à ces pesticides ont pris du poids dans notre expérience lorsque l'huile essentielle d'écorce d'orange Thomson Naval a été ajoutée. Cela pourrait être provoqué par la suppression par les antioxydants de l'accumulation de radicaux libres, ce qui a été soutenu par une augmentation de la consommation diététique quotidienne. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Messarah et al. (2012)** et **Mossa et al. (2014)**, qui ont utilisé différents antioxydants.

Après 90 jours de thérapie avec BF, HY, et leurs combinaisons, la recherche a découvert que le poids de l'hépatopancréas a augmenté. Ceci est provoqué par l'accumulation de tissus et l'hypertrophie dans l'organe cible détoxifiant. Selon **Zama et al. (2005)** et **Bitri et al. (2007)**, l'hypertrophie hépatique résulte de l'empoisonnement par l'hexachlorobenzène dans le *Meriones unguiculatus*. La recherche a révélé que le poids de l'hépatopancréas a augmenté suite à l'affirmation de **Simons et al. (1995)** selon laquelle une augmentation du poids relatif des organes chez les souris est un signe de cytotoxicité des pesticides.

La présence d'hormones de croissance et de leurs mélanges (BF, HY) dans les coquilles des escargots diminue en raison de l'inhibition de la synthèse. Ceci est similaire à une diminution de 30 % de la masse de coquille des escargots exposés au sol artificiel contaminé par le cadmium (**Gimbert et al., 2008**). La majeure partie de la coquille est composée de chonchioline et de carbonate de calcium, qui sont cruciaux pour la croissance de coquille. (**Heller et al., 1983**). Cette diminution du poids de la coquille est cohérente avec les études antérieures montrant une diminution dose-dépendante dans le poids des coquilles dans les escargots traitées avec des métaux lourds (**Grara, 2011**). La recherche a révélé que BF, HY et leurs mélanges réduisaient considérablement le poids des coquilles des mollusques. Les résultats suggèrent que la modalité (**Salama et al., 2005**, **Radwan et al., 2008**) et la durée de l'exposition (**Coeurdassier et al., 2001**, **Rorke et al., 1974**) aux pesticides sont les causes de la réduction de la croissance. Chez *Lymnea stagnalis*, toutefois, une intoxication persistante par le carbaryl et le lindane entraîne également une diminution du développement de la

coquille (**Bluzat et Seuge 1979**). Différentes solubilités, objectifs biologiques, ou d'autres éléments peuvent être la cause des variations de croissance (**Bourabia et al., 2019**).

Nos résultats, d'un autre côté, montrent que donner de l'huile essentielle d'écorce d'orange au groupe qui avait reçu BF, HY, ou la combinaison de ces traitements a amélioré le poids, la longueur de la coquille, et du poids relatif des hépatopancréas. Cette amélioration peut être attribuée à l'action préventive de l'huile essentielle d'écorce d'orange Thomson Naval contre la toxicité de ces pesticides et de leur combinaison.

## II.6. Conclusion

Les HEO sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, L'analyse chromatographique des huiles essentielles d'orange *Thomson naval* par CPG/SM a identifié 24 composants avec le limonène comme constituant majoritaire suivi par le Myrcène et le Linalol.

L'impact des pesticides sur l'environnement augmente de jour en jour et pour analyser les effets toxiques des pesticides sur les invertébrés terrestres, en particulier les escargots *Helix aspersa*, il est nécessaire de créer des procédures appropriées.

Ces changements comportementaux, variations du poids frais moyen des escargots, ainsi que ceux de l'hépatopancréas et de la coquille, peuvent être causés par la toxicité des insecticides BF, HY et de leurs combinaisons. Ces pesticides affectent également la composition biochimique des tissus, la composition minérale de la coquille, et les réserves d'énergie accumulées dans cette espèce de snail. En effet, l'huile essentielle d'écorce d'orange *Thomson naval* protège le poids frais moyen et l'hépatopancréas d'escargots *Helix aspersa* contre les effets néfastes induits par ces pesticides.



# Etude de stress oxydatif

Etude de stress oxydatif

### **III. Etude de stress oxydatif**

#### **III.1. Introduction et objectif du travail**

Les problèmes de santé liés aux pesticides et leur potentiel de nuire gravement aux personnes ont suscité un intérêt accru pour la toxicologie environnementale (**Bigot, 2009**). Les programmes de surveillance de l'environnement devraient inclure l'analyse des réactions biologiques aux contaminants chimiques comme outil de diagnostic. Ces signes peuvent servir de systèmes d'alerte précoce pour les contaminants (**Bourbia, 2013**).

L'objectif principal de cette partie était de déterminer la teneur de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* en protéines, glucides et lipides et de doser certains biomarqueurs enzymatiques et non-enzymatiques relatifs au stress oxydant après une exposition à l'hymexazole, la bifenthrine et de leurs mélanges. Le deuxième objectif était d'évaluer l'effet protecteur de l'huile essentielle d'orange *Thomson naval* à l'égard de l'exposition à ces deux pesticides (BF et HY).

#### **III.2. Matériel et méthodes**

##### **III.2.1. Préparation des échantillons**

Huit échantillons soigneusement choisis à partir de chaque groupe d'escargots (voir les sections II.2.3. et II.2.7) sont utilisés pour le dosage des métabolites à la fin du troisième mois de traitement.

##### **III.2.2. Paramètres étudiés :**

Les gastropodes réagissent biochimiquement et physiologiquement aux polluants. Neuf biomarqueurs biochimiques ont été dosés après sacrifice et dissection des escargots, en extrayant l'hépatopancréas, et en le subdivisant en petits morceaux :

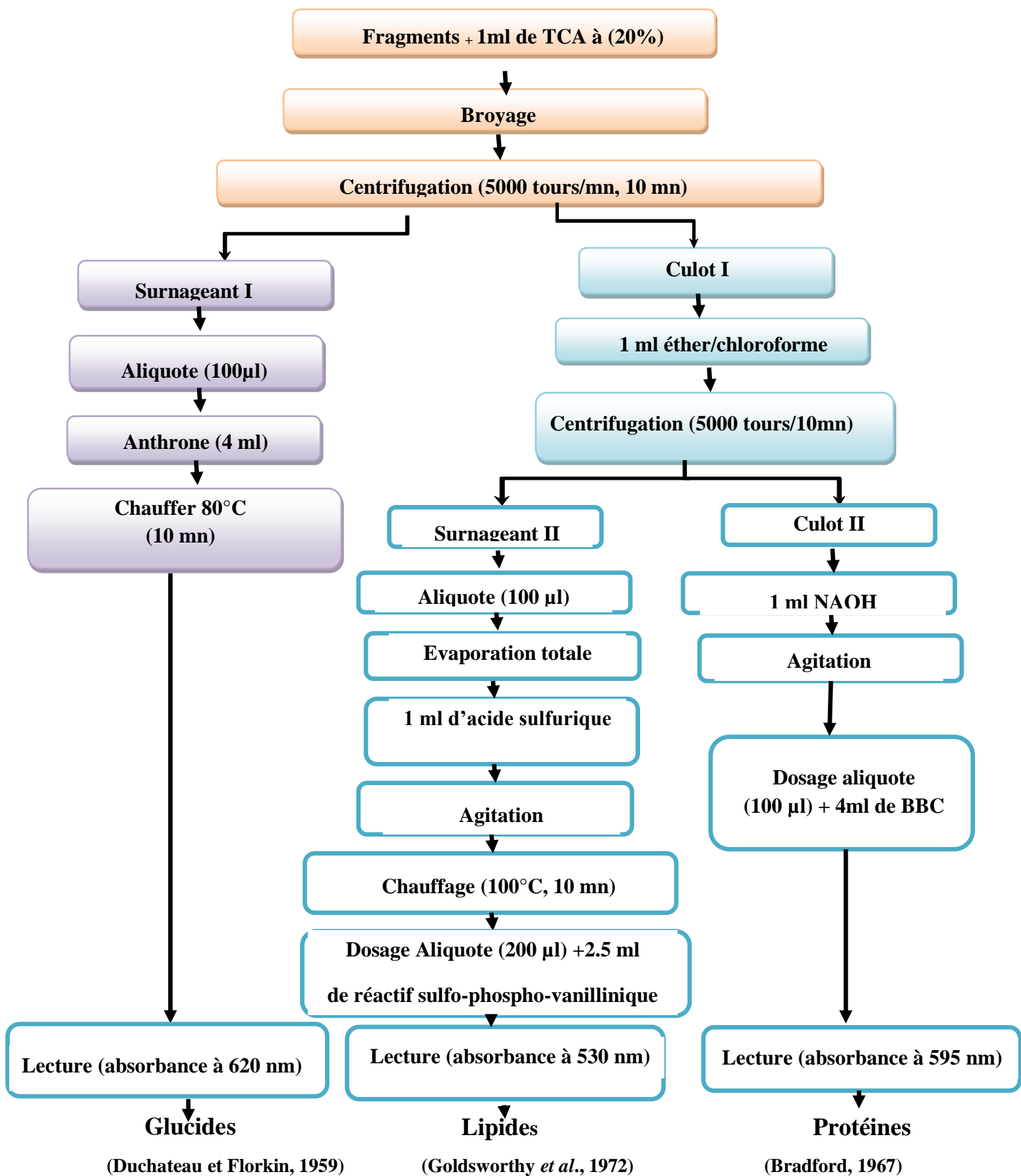
- ✓ " Métabolites (protéines, lipides, glucides)"
- ✓ " Malondialdéhyde (MDA)"
- ✓ " Glutathion (GSH)"
- ✓ " glutathion peroxydase (GPx)"
- ✓ "Glutathion-S-transférase (GST)".
- ✓ " Catalase (CAT)"
- ✓ " Acétylcholinestérase (AChE)"

### III.2.3. Extraction et dosage des métabolites

La méthode de **Shibko *et al.* (1966)** a été utilisée pour extraire les différents métabolites hépatiques (protéines, glucides et lipides) (figure 42). Les échantillons sont broyés à ultrasons dans 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 %, puis centrifugés pendant 10 min à 5000 tours/min. Le surnageant I sera utilisé pour mesurer les glucides, tandis que le culot I sera ajouté à 1 ml d'un mélange éther/chloroforme (1/1, v/v). Le surnageant II, qui sera utilisé pour mesurer les lipides, est récupéré par une deuxième centrifugation (5000 tours/min, 10 min). Ensuite, on retrouve le culot II dans 1 ml de NaOH (0,1N). La technique de **Bradford (1976)** a été utilisée pour mesurer la teneur en protéines totales des hépatopancreas en utilisant un mélange de 4ml de bleu brillant de coomassie (BBC) avec de 0,1 ml de l'homogénat. La solution BBC a été préparée comme suit : 50 mg de BBC additionnée à 25 ml d'éthanol à 95 %. Suite à une agitation de 2 heures, 50 ml d'acide orthophosphorique (85 %) a été ajoutée. Ensuite, une quantité d'eau distillée a été ajoutée afin de compléter le volume jusqu'à 500 ml. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 595 nm. La plage d'étalonnage a été réalisée à l'aide d'une solution de référence de Sérum d'Albumine Bovine (BSA).

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de **Duchateau et Florkin (1959)**. Le processus consiste à mélanger 100 ml de supernageant avec 4 ml de réactif anthrone. Un chauffage à 80°C pendant 10 minutes a été réalisé. Une coloration verte commence à se développer. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à teneur des glucides dans l'échantillon. L'absorbance a été mesurée à 620 nm contre une gamme de blanc. Le réactif anthron est réalisé en mélangeant 75 ml d'acide sulfurique concentré, 25 ml de l'eau distillée et 150 mg d'anthron.

La teneur en lipide totaux a été estimée en adoptant la technique développée par **Goldsworthy *et al.* (1972)**. Cette méthode utilise le réactif sulfo-phospho-vanillinique où un aliquotes de 100µl des extraits lipidiques ou de la gamme étalons a été utilisé. Un (01) ml d'acide sulfurique concentré a été additionné après que le solvant soit totalement évaporé. Après agitation, les tubes sont placés dans un bain à sec à 100°C pendant 10minutes. Une fois refroidis, 200µl de ce mélange ont été ajoutés à 2,5ml de réactif sulfo-phospho-vanillinique. Trente (30) minutes après (à l'obscurité), la densité optique a été estimée à une longueur d'onde de 530nm grâce à un spectrophotomètre. Un complexe de couleur roses est formé suite à la réaction des lipides avec l'acide sulfurique à chaud et en présence de vanilline et l'acide orthophosphorique. Le réactif a été préparé en dissolvant 0,38g de vanilline dans 55ml d'eau distillée additionnée à 195ml d'acide orthophosphorique (85%).



**Figure 41** : Principales étapes d'extraction des métabolites: (glucides, lipides, et protéines) de l'hépatopancréas chez les adultes de l'escargot *Helix aspersa* selon Shibko *et al.* (1966)



### III.2.4. Dosages des indicateurs du stress oxydant

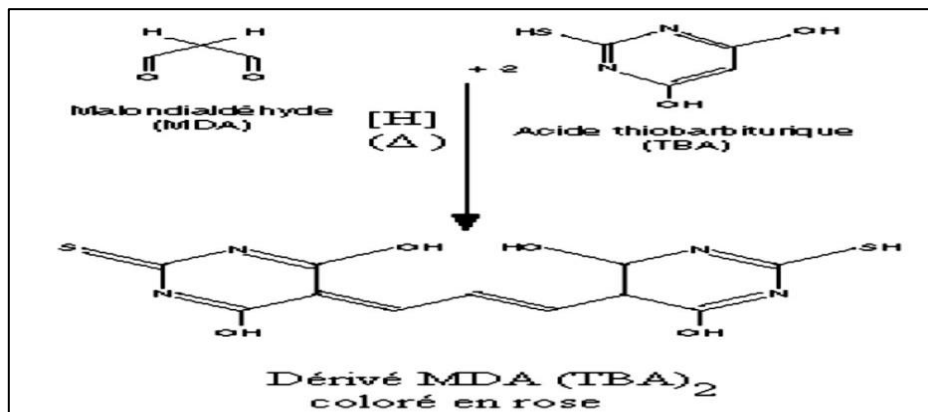
La technique de **Bradford (1976)** a été adoptée pour estimer la teneur totale en protéines des échantillons biologiques après trois mois d'exposition aux divers traitements.

#### III.2.4.1. Dosage de la peroxydation lipidique (MDA)

La peroxydation des lipides (LPO) a été déterminée en détectant des produits chimiques réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS), y compris l'aldéhyde (MDA) et les lipides hydroperoxydes (**Benaicha, 2021**). Le marqueur le plus fréquemment utilisé en peroxydation lipidique est le Malondialdéhyde, également connu sous le nom de MDA. La concentration de MDA est liée à la dégradation des membranes cellulaires et peut être utilisée comme biomarqueur du stress oxydatif (**Funes et al., 2006 ; Ladhar-Chaabouni et al., 2007**).

##### III.2.4.1.1. Principe

Afin de doser le MDA, nous avons suivi la technique **d'Esterbauer et al. (1992)**. Le dosage est basé sur la condensation de MDA avec de l'acide thiobarbiturique dans un milieu acide et chauffé. La conséquence de la réaction est la production d'un complexe de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbiturique, qui peuvent être détectées par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm (**Figure 42**).



**Figure 42** : Principe du dosage du malondialdéhyde.

##### III.2.4.1.2. Mode opératoire

Le protocole expérimental est le suivant :

- ✓ " Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant)".
- ✓ "Ajouter 150 µl de la solution TBS (tris 50mM, NaCl150 mM pH 7.4)".
- ✓ "Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20 %, BHT 1 %)".

- ✓ "Vortex et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min".
- ✓ "Prélever 400 µl du surnageant".
- ✓ "Ajouter 80 µl du HCL 0.6 M".
- ✓ "Ajouter 320 µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM)".
- ✓ "Mélanger et incuber au bain-marie à une température de 80 °C pendant 10 minutes."

### III.2.4.1.3. Calcul de la concentration de MDA

La loi de Beer-Lambert (DO = E.C.L) a été utilisée pour déterminer la concentration de MDA.

$$C(\text{nmol /mg de protéine}) = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot \chi \cdot Fd}$$

Significations des acronymes et coefficients :

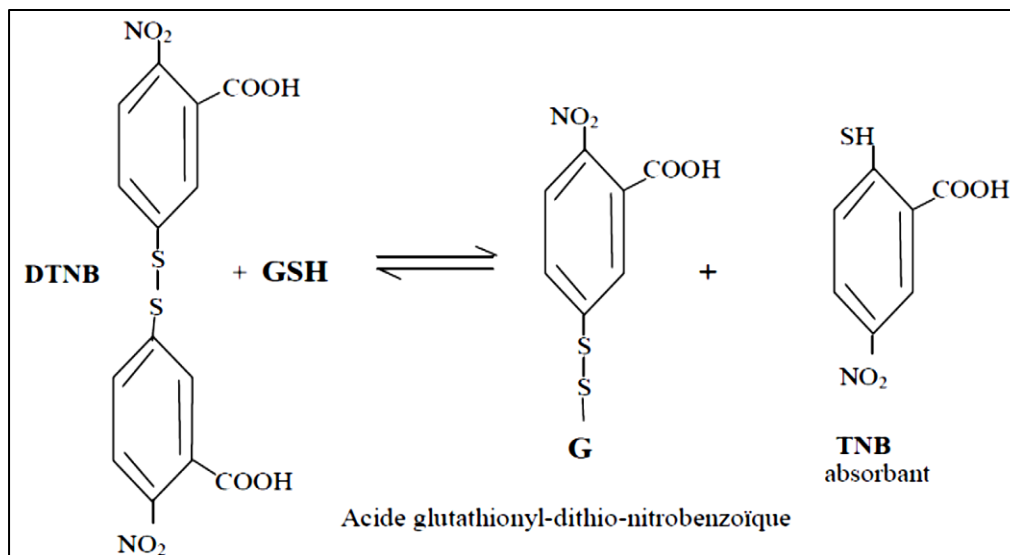
- "C : concentration en nmoles/mg de protéines "
- " DO : densité optique lue à530nm"
- "E : coefficient d'extinction molaire du MDA ;  $\epsilon_{MDA} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ "
- "L : longueur du trajet optique = 0.779 cm"
- "X : concentration de l'extrait en protéines (mg/ml)"
- "Fd : facteur de dilution : Fd = 0.2083".

### III.2.4.2. Mesure du Glutathion (GSH et GSSG)

Le thiol libre non-protéinaire le plus répandu dans les cellules, le glutathion, existe en équilibre entre deux formes : le glutathion réduit (GSH) et le glutathion oxydé. (GSSG). Dans la lutte contre le stress oxydatif, le glutathion est un agent de défense antioxydant vital (Zaafour, 2014).

#### III.2.4.2.1. Principe

L'approche la plus utilisée pour l'estimation de glutathion est la méthode colorimétrique utilisant le réactif Ellman (DTNB) (Weckberker *et al.*, 1988). Le GSH est utilisé pour couper la molécule d'acide dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) de 5,5' par la réaction, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB), qui a une absorbance de 412nm. (Figure 43).



**Figure 43:** Principe de dosage du glutathion (Weckberker et Cory, 1988).

#### III.2.4.2.2. Mode opératoire

- ✓ " Les échantillons (200mg de tissu) sont mis individuellement en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0.02 M. Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine".
- ✓ " Une fois préparé, l'homogénat est déprotéinisé ; 0,8 ml de ce dernier auquel on ajoute 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0,25%."
- ✓ " Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- ✓ " Centrifugé pendant 5min à 1000 t/min."
- ✓ " Prélever 0.5 ml du surnageant".
- ✓ "Ajouter 1 ml de tampon tris-HCL + EDTA (0.02M), PH=9,6."
- ✓ " Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0,01M dissous dans le méthanol absolu."
- ✓ " Laisser pendant 5min à température ambiante".
- ✓ " Mesurer l'absorbance (A) à 412 nm."

#### III.2.4.2.3. Calcul de la concentration de GSH

Il est possible de calculer la concentration de GSH en nanomol par milligramme de protéine (nmol/mg prot) en utilisant la formule ci-dessous :

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5} / \text{mg de protéines}$$

Significations des acronymes et coefficients :

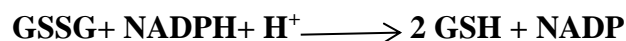
- " **DO** : densité optique".
- " **1** : volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation. (0.8 ml homogénat +0.2ml SSA)."
- " **1.525** : volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris-EDTA+0.025 ml DTNB)."
- " **13100** : coefficient d'absorbance (contenant le groupement-SH à 412 nm)".
- " **0,8** : volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans 1 ml".
- " **0,5** : volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml".

### III.2.4.3. Dosage du Glutathion peroxydase (GPx)

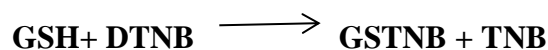
#### III.2.4.3.1. Principe

L'activité de GSH-Px a été mesurée en suivant la technique de **Flock et Gunzler (1984)**. La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de l'acide 5,5-dithio-bis-2-dinitrobenzoïque (DTNB), le groupe sulfhydryl (-SH) du glutathion réagit spontanément avec le DTNB et forme un composé jaune, l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB)

La glutathion réductase catalyse la réaction suivante :



L'ajout de 5,5-dithio-bis-2-dinitrobenzoïque (DTNB) permet une détection indirecte de la formation de GSH :



L'activité de la glutathion-réductase peut être mesurée en lisant l'absorbance à 412 nm du TNB. Cela se traduit par la création d'une molécule de TNB pour chaque molécule de GSH produite.

#### III.2.4.3.2. Mode opératoire

- ✓ " L'extraction de l'enzyme : l'homogénéisation par le tampon phosphate (pH = 7,8)."
- ✓ " Centrifugation 10 min à 3000t/min.
- ✓ " Récupération de surnageant (extrait enzymatique).

- ✓ 0,2 ml de surnageant +0.4 ml de GSH (glutathion forme réduite) a 0,1 mM (réaction enzymatique) + 0.2 ml TP (tampon d'extraction pH=7,8).
- ✓ " Incubation au bain-marie à 25°C pendant 05 min".
- ✓ " 0,2 ml d'H2O2 (1.3mM) pour initier la réaction."
- ✓ " Laisser agir 10 min."
- ✓ " Arrêter la réaction par addition de 1 ml de TCA 1%(acide tri chloro-acétique)."
- ✓ " Mettre le mélange dans la glace pendant 30 min."
- ✓ " Centrifuger durant 10 min a 3000t/min."
- ✓ " 0,48 ml de surnageant et place dans une cuve+2,2 ml de TBS + 0,32 ml de DNTB (1mM)."
- ✓ Mesurer la densité optique à 412 nm pendant 05 min."

#### III.2.4.3.3. Calcule de l'activité de GPx

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se réalise par la formule suivante :

$$\text{L'activite de la GPx} = \text{La quantité de GSH réduit disparue} \times \frac{5}{\text{La concentration de protéine}}$$

La quantité GSH réduite qui sera oxydée (disparue) est déterminée comme suit :

$$X = \frac{(DOe - DOb) \times 0.04}{DOb} = \text{quantité de GSH réduite disparue (oxydée) dans 0.2 extrait dans 1ml.}$$

Significations des acronymes et coefficients :

- " X = activité de GSH consommée/min /mg de protéine"
- " DOb = densité optique de l'échantillon"
- " DOe = densité optique de l'étalon"
- "0.04 : concentration de substrat (GSH)"

#### III.2.4.4. Dosage de l'activité de le glutathion S-transférase (GST)

Les glutathion S-transférases sont une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques qui participent au transport et à la biosynthèse intracellulaire. En présence du glutathion, un cofacteur, et des molécules réactives comportant des sites électrophiles, elles catalysent des réactions de conjugaison (**Chenikhar, 2019**).

#### III.2.4.4.1. Principe :

La technique de **Habig *et al.* (1974)** est utilisée pour quantifier l'activité de la glutathion S-transférase (GST). Il est basé sur le processus de conjugaison entre le GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2, 4 di nitrobenzène), dans un cofacteur le Glutathion (GST). Le conjugué conduit à la synthèse d'une nouvelle molécule; 1-S-Glutathionyl 2-4Di nitrobenzène, permettant d'évaluer l'activité GST.

#### III.2.4.4.2. Mode opératoire

L'intensité de l'activité GST est directement proportionnelle à la valeur de la densité optique mesurée. Dans 1 ml de tampon phosphate pH6, les échantillons sont homogénéisés. L'homogénat est centrifugé pendant 30 minutes à 14000 t/min, et le surnageant récupéré sera utilisé comme source d'enzymes. Le dosage consiste à mélanger 1.2 ml du mélange CDNB (1mM) avec 200 µl du surnageant. À une longueur d'onde de 340 nm, la lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes contre un blanc contenant 200 l d'eau distillée, remplaçant la quantité de surnage.

#### III.2.4.4.3. Calcule de l'activité de GST

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (umol GST /min/mg de protéine)} = \frac{(\text{DOéchant/min} - \text{DOblanc/min})}{9,6 \times \text{mg de protéine}}$$

- " **Do** : densité optique de l'échantillon /min."
- " **Do/min blanc** : densité optique du blanc /min"
- " **9.6** : coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM.Cm"

#### III.2.4.5. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

##### III.2.4.5.1. Principe

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (**Aebi, 1984**).

L'activité de la CAT est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### III.2.4.5.2. Mode opératoire

En faisant réagir 200 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500mM) sur 20 µl de l'homogénat dans un tampon phosphate de 780 µl (100 mM) au pH 7,4. Les résultats ont été exprimés en µmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minute et par mg de protéines. Après 15 s de délai, la lecture de l'absorbance se fait à 240 nm et la mesure dure 60 s.

#### III.2.4.5.3. Calcul de l'activité de la CAT

L'activité de la CAT exprimée en micromoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minute par milligramme de protéines (µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{Activité CAT} = \frac{\Delta \text{DO} \times d}{\epsilon \times X \times L \times 0.02}$$

- "  $\Delta \text{DO}$  : variation de la densité optique par minutes, c'est-à-dire pour" :
  - ✓ " **AI** (Absorbance initiale) : 15 s."
  - ✓ " **AF** (Absorbance finale) : 1min ; On fait :  $(\text{AI} - \text{AF}) \times 4/3$  par min."
- " **d** : dilution de l'échantillon au début"
- "  $\epsilon$  : coefficient d'extinction  $0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ."
- " **L** : largeur de la cuve (longueur du Trajet optique) en cm"
- " **X** : quantité des protéines en mg/ml."

#### III.2.4.6. Dosage de l'activité acétylcholinestérase (AChE)

##### III.2.4.6.1. Principe

La méthode d'**Ellman *et al.* (1961)**, qui utilise l'acétylthiocholine comme substrat artificiel et l'hydrolyse en acide acétique et en thiocholine pour produire le TNB, a été utilisée pour tester l'activité de l'AChE.

##### III.2.4.6.2. Mode opératoire

Grâce à l'utilisation d'un broyeur ultra-turraxe, pour homogénéiser les têtes des escargots témoins et traités dans 1 millilitre de solution détergente pendant une à deux minutes et cinq répétitions sont effectuées. L'homogénat est centrifugé pendant 5 minutes à 5 000 g. Le surnageant est récupéré pour servir de source d'enzymes. Une fraction aliquote de 100 µl est

utilisée pour mesurer l'activité AChE. 100 µl de DTNB et 1 ml de tampon Tris (0.1 M, pH 7) sont ajoutés. Après 3 à 5 minutes, 100 µl de substrat acétylthiocholine sont ajoutés pour épuiser la réaction spontanée. Les absorbances sont mesurées à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc toutes les 4 mn pendant 20 mn.

### III.2.4.6.3. Calcul de l'activité de l'AChE

L'activité AChE est calculée selon la formule suivante:

$$X = \frac{\Delta DO / \text{min}}{1.36 \times 10^4} \times \frac{Vt}{Vh} / \text{mg de protéines}$$

- " **x** : micromoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines "
- " **Δ DO** : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat"
- " **1.36 × 10<sup>4</sup>** : coefficient d'extinction molaire du DTNB (M-1 cm-1)"
- " **Vh** : volume de l'homogénat (100 µL)"
- " **Vt** : volume total de la cuve (1 300 µL)"
- " **mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg."

### III.3. Présentation des résultats et analyses statistiques

Les résultats ont été indiqués comme la moyenne de dix répétitions (déviations standard moyenne), et pour une visualisation plus facile, ces données ont été représentées sous forme de graphiques et d'histogrammes dans Office Excel 2010. En évaluant la variance à un facteur (ANOVA), les moyennes et la déviation standard sont déterminées pour chaque groupe expérimental à un seuil significatif de p 0.05. Les résultats des tests sur les doses biochimiques et les activités enzymatiques et non-enzymatiques ont été comparés entre les groupes étudiés en utilisant le test 't' de Student, ce qui a révélé les différences entre les deux groupes. Le programme de traitement et d'analyse des données MINITAB version 18 a été utilisé pour tous les calculs.

Nous avons fait deux comparaisons :

Les groupes traités (BF, BF+HEO, HY, HY+HEO, BF+HY et BF+HY+HEO) contre le groupe témoins :

- ✓ " \* : différence significative (p ≤ 0,05)".
- ✓ " \*\* : différence hautement significative (p ≤ 0,01)".
- ✓ " \*\*\* : différence très hautement significative (p ≤ 0,001)".



Les groupes traités (BF+HEO, HY+HEO, BF+HY+HEO) par rapport au groupe traité (BF, HY, BF+HY) :

- ✓ " **A** : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".
- ✓ " **B** : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ )".
- ✓ " **C** : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".

- Avec  $p > 0,05$  = la différence n'est pas significative.

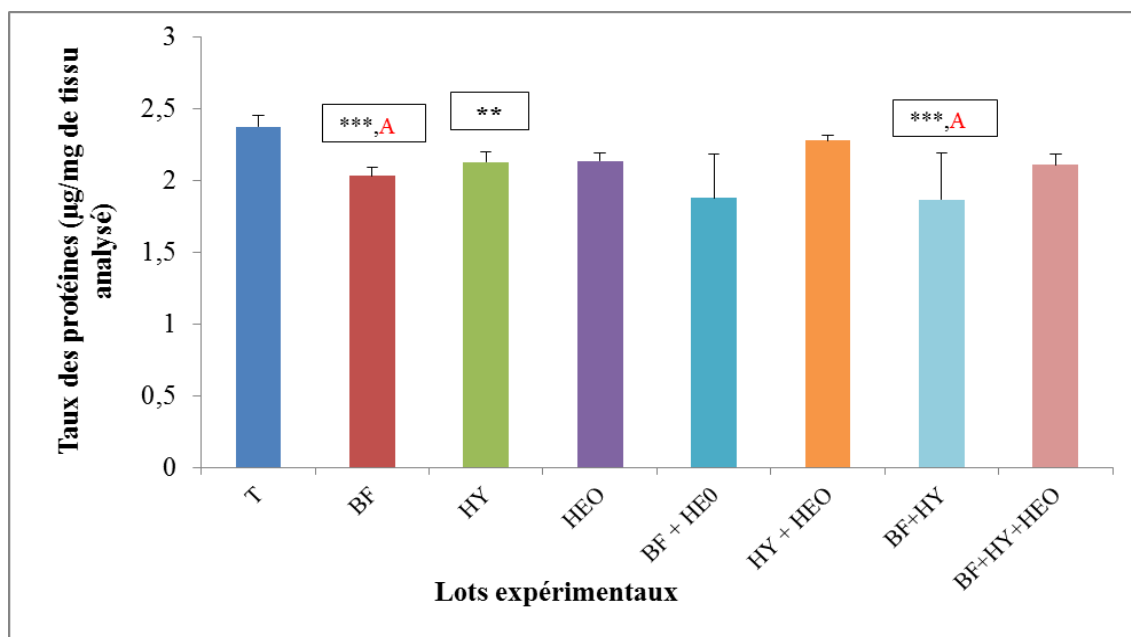
### III.4. Résultats

Les effets des deux pesticides commerciaux Bifenthrine et Hymexazole et leurs mixtures, ainsi l'évaluation des effets protecteurs d'huile essentielle d'orange sur les indicateurs biochimiques du stress oxydant d'*Helix aspersa* ont été estimés après 12 semaines de traitement.

#### III.4.1. Effet du traitement par la Bifenthrine, l'hymexazole et huile essentielle d'orange et leur mixture sur la composition biochimique de l'hépatopancréas.

##### III.4.1.1. Effet sur le taux des Protéines

La figure 44 représente les variations du taux des protéines totales au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots témoins et traités.



**Figure 44 :** Taux des protéines totales au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.

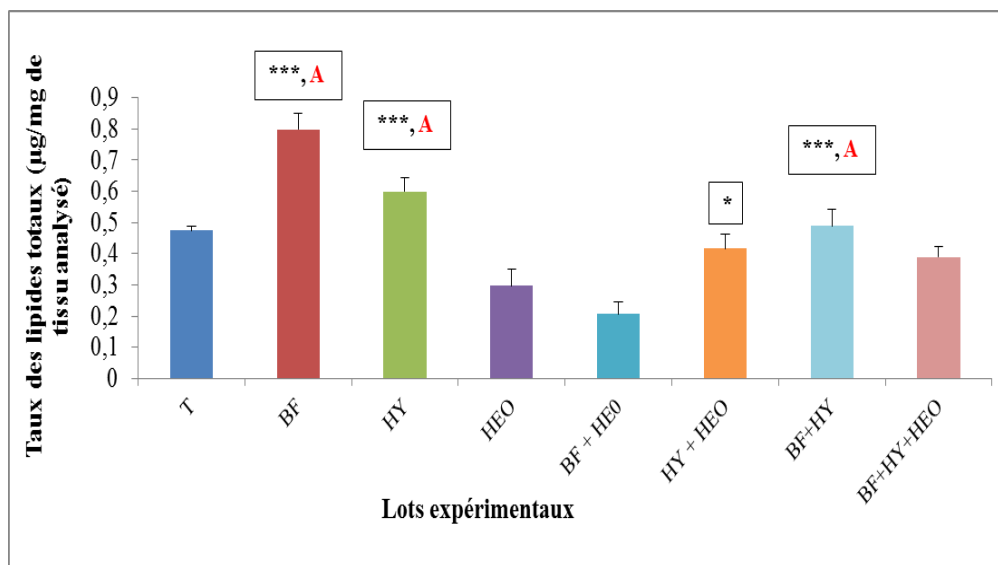
" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; A : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) du taux des protéines de l'hépatopancréas chez les escargots traités par la BF, BF+HY et hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les escargots traités par HY par rapport au témoin. On constate que la co-exposition des pesticides et d'HEO diminue le taux de protéine d'une façon non significative chez les groupes BF, HY, et très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) chez le

groupe BF+HY comparant aux lots traités uniquement par le pesticide, alors qu'aucune différence n'a été observée quand on les compare avec le groupe témoin.

### III.4.1.2. Effet sur le taux des lipides d'hépatopancréas

La **Figure 45** représente l'effet des deux pesticides commerciaux (BF), (HY) et l'effet protecteur d'HEO sur les variations du taux de lipides au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.



**Figure 45 :** Taux des lipides totaux au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.

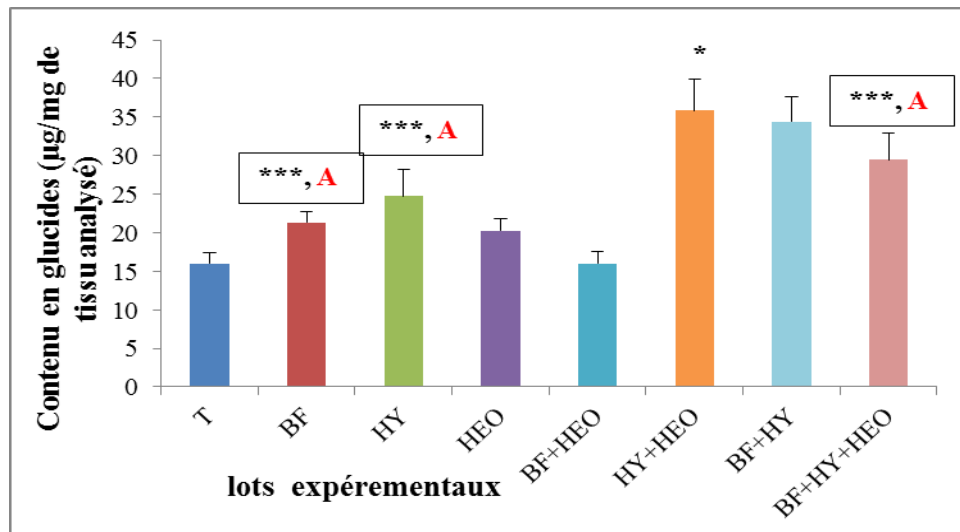
" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; A : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".

Nos résultats mettent en évidence une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) du taux de lipides chez les escargots traités par la BF, HY, BF+HY par rapport aux témoins et au lots pesticides + HEO. Concernant l'addition de l'HEO, on note une diminution du taux du lipide par une variation significative ( $p \leq 0,05$ ) chez les lots traités par HY+HEO par rapport au témoin. Les autres groupes n'ont présenté aucune différence significative du taux des lipides, comparés au témoin.

### III.4.1.3. Effet sur le taux des glucides d'hépatopancréas

Les variations du taux des glucides au niveau des hépatopancréas des escargots témoins et traités sont représentées dans la **Figure 46** qui montre que la teneur en glucides augmente de façon très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) chez les lots de BF, HY, BF+HY dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins et au lot pesticides + HEO.

Par ailleurs, une réduction du taux de glucide est néanmoins observée en cas de co-exposition au pesticide et l'HEO, significativement ( $p \leq 0,05$ ) chez le lot traité par HY par rapport au groupe témoin. Aucun changement significatif sur le taux de glucide n'a été constaté chez les autres groupes.



**Figure 46 :** Taux des glucides totaux au niveau hépatopancreatique des différents lots d'escargots.

" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; A : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".

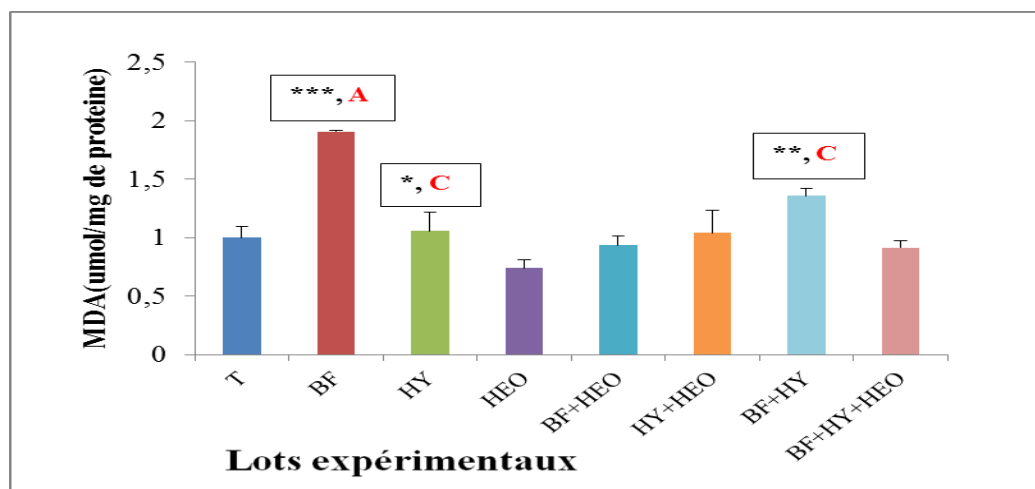
### III.4.2. Effet du traitement par la Bifenthrine, l'hymexazole et huile essentielle d'orange et leur mixture sur les indicateurs du stress oxydant au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa*

#### III.4.2.1. Effet sur le taux de Malondialdéhyde (MDA)

L'analyse statistique de l'activité de Malondialdéhyde dans l'hépatopancréas chez *Helix aspersa* après l'ingestion de BF, HY et leurs mixtures, extrait d'huile essentielle d'orange seul et leur association (BF+HEO, HY+HEO, BF+HY+HEO) pendant 90 jours est représentée dans la **figure 47** ci-dessous.

On constate une augmentation significative du taux de malondialdéhyde (MDA) au niveau hépatique chez les escargots injectée par l'HY ( $p \leq 0,05$ ), BF+HY ( $p \leq 0,01$ ), BF ( $p \leq 0,001$ ) par rapport aux rats témoins. On a trouvé une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les lots traités par le pesticide HY et ceux traités par le pesticide + HEO, et très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) en comparant les escargots traités par BF+HY et le groupe des escargots traités par BF+HY+HEO. Par contre, l'administration du l'HEO a permis de

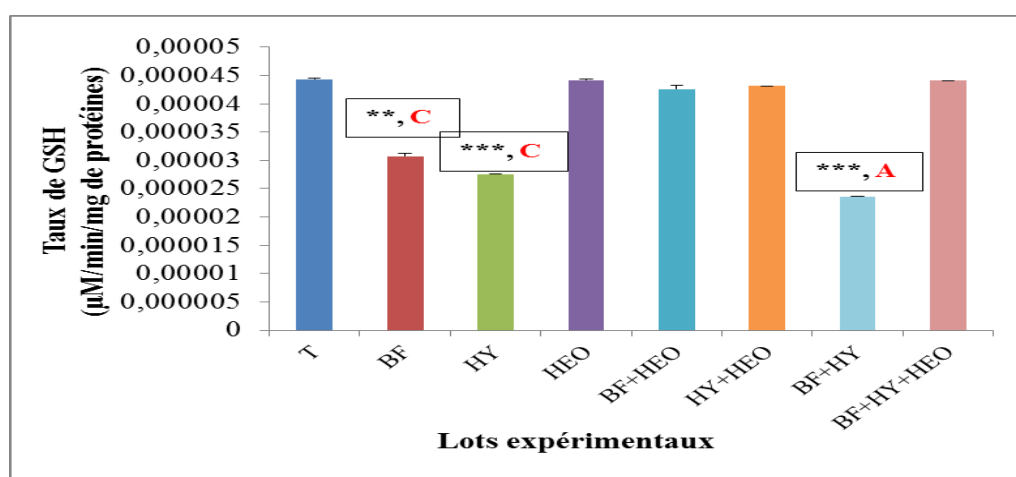
réduire cette perturbation chez les escargots intoxiqués, ceci est illustré par une diminution significative du taux du MDA chez les lots traités par la combinaison du BF, HY, BF+HY plus HEO par rapport au lot traité par le pesticide seul ou bien en mixture, et on enregistre aucune variation significative par rapport au témoin.



**Figure 47 :** Variation de taux de MDA au niveau hépatopancreatique des différents lots d'escargots.

" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; **A** : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; **C** : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".

#### III.4.2.2. Effet sur le taux du glutathion réduit (GSH)



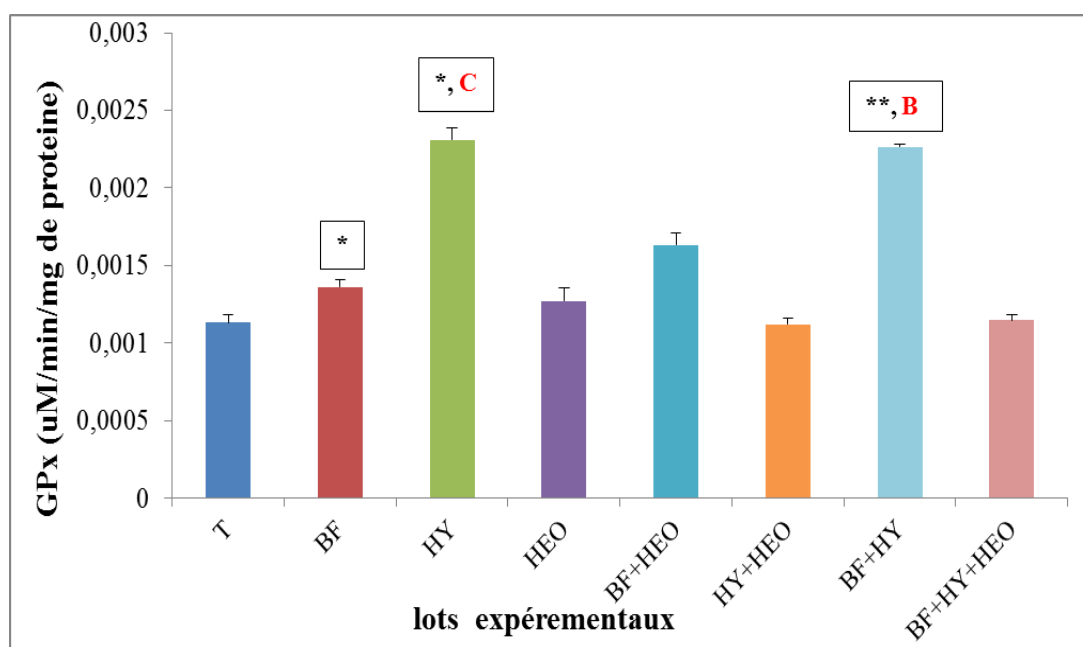
**Figure 48 :** Taux des GSH au niveau hépatopancreatique des différents lots d'escargots.

" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; **A** : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; **C** : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".

Le taux du glutathion réduit (GSH) hépatique est diminué chez les lots traités par les pesticides, avec une différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les escargots recevant la BF et très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) chez les escargots recevant l'HY, et les escargots recevant la mixture BF+HY par rapport au témoin. Ainsi nous constatons une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les lots traités uniquement par le pesticide et ceux traités par le pesticide + HEO, et très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) en comparant les escargots traités par BF+HY et le groupe des escargots traités par BF+HY+HEO. Aucune variation significative chez les lots traitée par l'HEO par rapport au témoin (**Figure 48**).

### III.4.2.3. Effet sur l'activité de GPx

L'activité de **GPx** au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots témoins et traités par BF, HY, HEO et les mixtures (BF+HEO, HY+HEO et BF+HY, BF+HY+HEO) est illustrée dans la figure (**49**).



**Figure 49** : Variation de l'activité enzymatique hépatique de la glutathion peroxydase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protéine) au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.

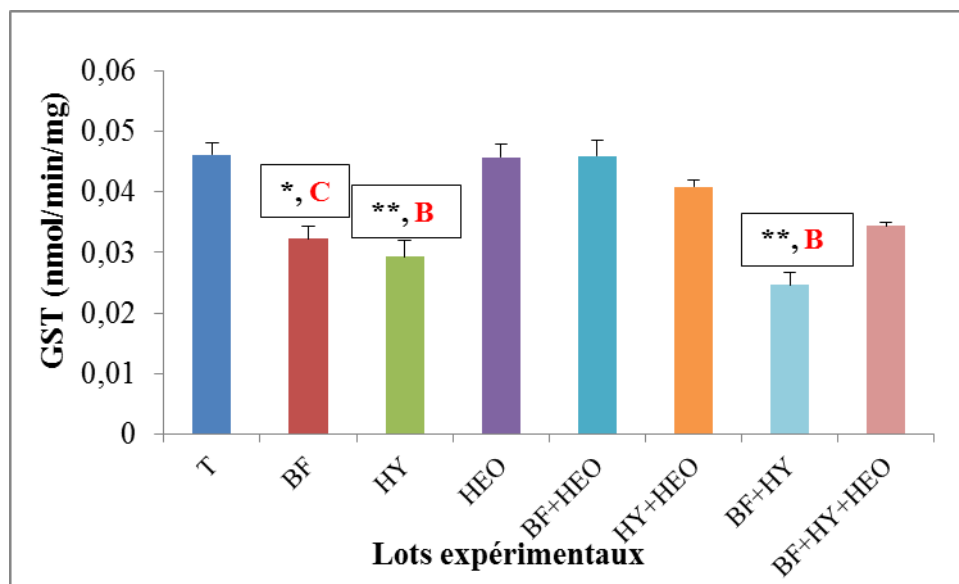
" \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; **B** : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; **C** : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".

Sur une durée de 90 jours de traitement, on constate une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) au niveau hépatique

entre les escargots des lots témoin et ceux des lots traités par BF, HY, hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les lot traité par la mixture des deux pesticide (BF+HY) et on enregistre variation significative par rapport au HY+HEO hautement significative chez les lots injectée par la BF+HY par rapport au témoin et la mixture BF+HY+HEO, et on enregistre aucune variation significative par rapport au témoin.

#### III.4.2.4. Effets sur l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

Les variations de l'activité de GST au niveau hépatopancréas chez les escargots témoins et traités sont représentées dans la **Figure 50**.



**Figure 50** : L'activité de GST au niveau hépatopancréatique des différents lots d'escargots.

" \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; **B** : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; **C** : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".

L'administration des pesticides étudiés pendant 90 jours chez les escargots, induit une diminution de l'activité enzymatique de le glutathion S-transférase (GST) au niveau d'hépatopancréas par rapport aux escargots témoins. On note une différence hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de l'activité de la GST chez le lot traité par HY, et chez les escargots administrés BF+HY comparant au lot témoin. Ainsi, on observe une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) chez le lot traité par BF, et hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les lots traités par HY, BF+HY comparant aux lots traités par les pesticides associés au l'huile essentielle d'orange.

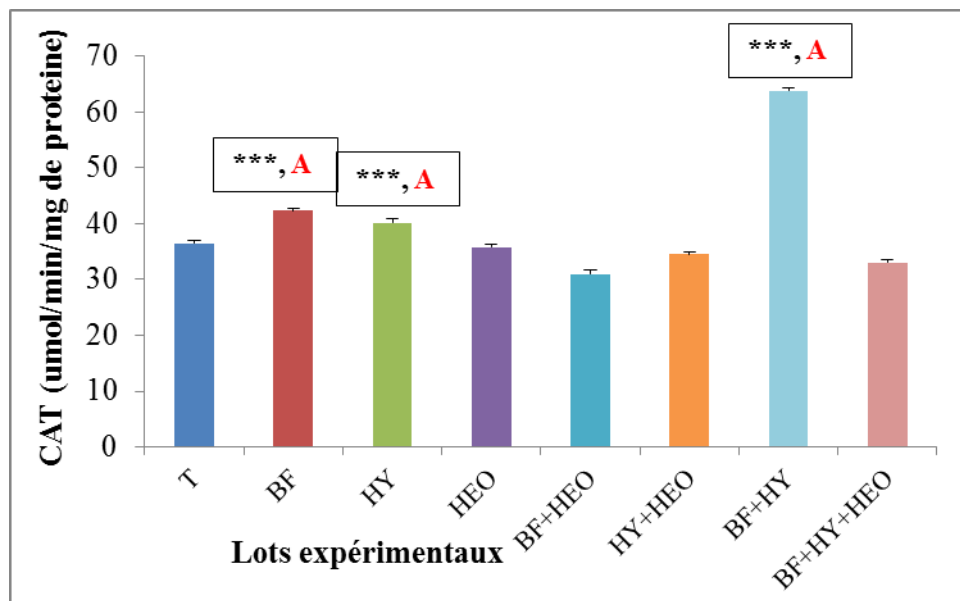
Ainsi, on observe une différence hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) chez le lot traité par HEO, et chez les lots traités par BF+HEO, HY+HEO par rapport à celle des escargots témoins. Par ailleurs, nous avons enregistré aucune variation significative ( $p > 0,05$ ) chez les escargots recevant les combinaisons pesticides plus HEO par rapport au témoin.

#### III.4.2.5. Effets sur l'activité catalase (CAT)

L'évolution des taux moyen de la CAT hépatique chez les escargots traités et ceux des témoins sont exposés dans la **Figure 51**.

Les activités de la catalase présentent une augmentation chez les lots traités par BF, HY, BF+HY. L'analyse de la variance met en évidence une variation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) entre les escargots des lots témoin et ceux des lots traités par BF, HY, BF+HY ( $p \leq 0,001$ ). En revanche, le traitement protecteur des escargots avec l'HEO augmenté d'une manière très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) par rapport au témoin.

La combinaison de l'HEO avec les pesticides BF et HY, BF+HY provoque une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) comparant par les groupes traités uniquement par BF, HY, BF+HY. En revanche, le traitement protecteur des escargots avec HEO normalise clairement l'activité de cet enzyme, et on ne constate aucune variation significative de leur activité par rapport au témoin.



**Figure 51:** Variation de l'activité de la catalase (CAT) au niveau hépatopancreatique des différents lots d'escargots.

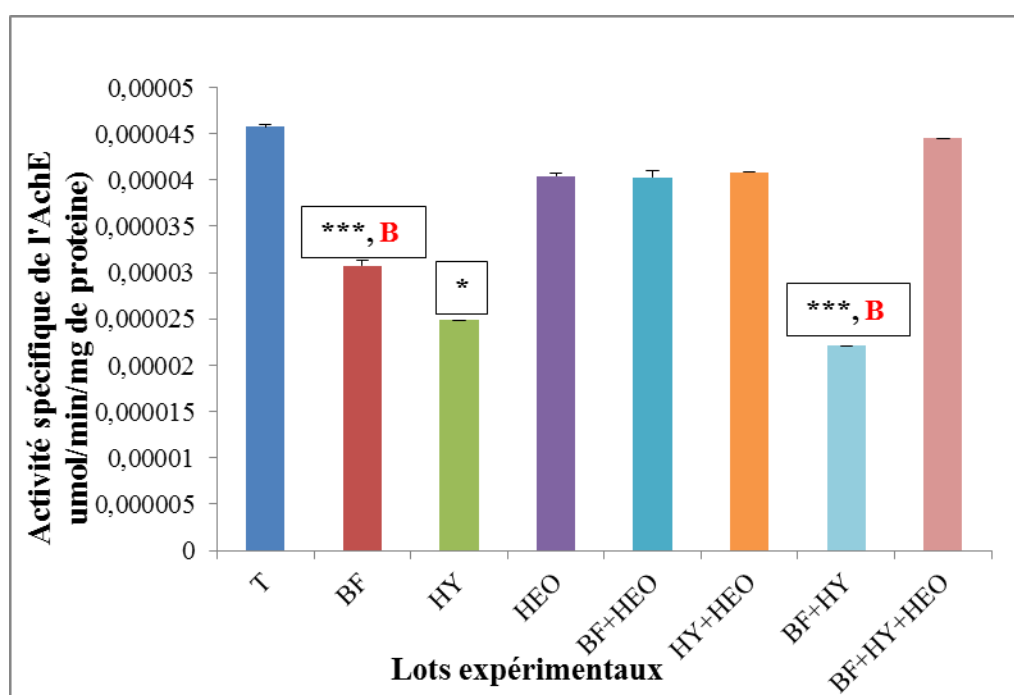
" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; A : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ".



### III.4.2.6. Impact du BF, HY, HEO et leur mixture sur l'activité de l'acétylcholinestérase

L'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les témoins et traités est représentée dans la **figure 52**.

L'exposition des escargots adultes *Helix aspersa* par injection aux pesticides (BF, HY, BF+HY) a provoqué une diminution de l'activité enzymatique de l'AChE comparant au groupe témoin. Nos résultats révèlent que l'administration du BF et leur combinaison par HY provoque une variation très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) par rapport aux non traités, et hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) comparant aux BF+HEO et BF+HY+HEO. Chez les lots des escargots ayant reçu l'HEO, on a observé une nette amélioration par l'augmentation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE), et n'est pas significativement différente de ceux du lot témoin.



**Figure 52:** Variation de l'activité de l'acétylcholinestérase ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protéine) au niveau hépatopancreatique des différents lots d'escargots.

" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; B : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ )".

### III.5. Discussion

Avant d'atteindre l'hépatopancréas, l'organe qui détoxifie les xénobiotiques, les pesticides pénètrent dans le corps de l'escargot de diverses manières (par la bouche ou par injection) et passent par un certain nombre d'obstacles. L'un des organes les plus étudiés est l'hépatopancréas, qui joue un rôle crucial dans le métabolisme, l'accumulation, la biotransformation et l'excrétion de plusieurs xénobiotiques (**Odendaal et al., 2003**).

Cette recherche, c'est appuyé en partie sur l'hépatotoxicité de la **BF**, **HY** et la mixture **BF + HY** et d'autre part sur les propriétés hépatoprotectrices des huiles essentielles d'orange (**HEO**) après une exposition chronique par rapport à la recherche de (**Zouaghi et al., 2020 ; Bourbia et al., 2012**). Où ils ont étudié la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*.

Il manque dans la littérature d'études toxicologiques sur la bifenthrine, l'hymexazole et la combinaison (BF + HY), et certaines études ont montré que les effets d'un mélange ne reflètent pas toujours les résultats des substances prises individuellement, de sorte que les données actuellement disponibles sont insuffisantes pour tirer des conclusions sur les résultats de l'exposition des gastropodes aux pesticides (**Padhi et al., 2008**). En raison de la complexité des interactions potentielles entre les composants du mélange, il est particulièrement difficile d'anticiper comment le mélange se comporterait globalement (**Lodovici et al., 1994**). Si possible, des recherches sur les pesticides de la même famille et sur d'autres modèles biologiques liés aux escargots seront utilisées pour comparer nos résultats à ceux rapportés dans la littérature.

Les organismes vivants tels que les escargots peuvent mettre en place des systèmes de défense qui leur permettent de tolérer le stress chimique engendré par les polluants bioaccumulés (**Amiard-Triquet et al., 2008**). La réponse de ces organismes à la pollution des sols peut être mesurée à l'aide de biomarqueurs tels que l'inhibition, l'induction d'enzymes comme par exemple : l'induction de dommages moléculaires, cellulaires (**Coeurdassier et al., 2001 ; Ismert et al., 2002 ; Regoli et al., 2006**).

Les paramètres biochimiques et enzymatiques des organismes exposés à des contaminants toxiques ont été utilisés comme biomarqueurs, et ils peuvent être un outil de diagnostic important pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (**Forbes et al., 1997 ; McLoughlin et al., 2000**).

### III.5.1. Effets des pesticides, l'huile essentielle d'orange et de la mixture sur les métabolites tissulaires

Les protéines sont des constituants organiques importants des cellules animales. Ils jouent un rôle essentiel dans le processus d'interactions entre les milieux intra et extra-cellulaires faisant partie de la membrane cellulaire (**Amutha et al., 2002**), et ils sont requis par un organisme dans la construction de tissus, la réparation des organites cellulaires et aussi le métabolisme cellulaire (**Yeragi et al., 2000**). Sa synthèse est considérée comme un paramètre biochimique de premier ordre puisqu'il est l'indicateur de stress le plus sensible et le plus précoce. Ils peuvent être reflétés par un grand nombre de substances exogènes, principalement par la réduction du réticulum endoplasmique dans les cellules (**Deivanayagam et al., 2014**).

Nos résultats montrent que l'exposition aux deux pesticides, seuls ou en mixture, a provoqué une diminution de la teneur en protéines totales chez les escargots traités comparés aux escargots témoins. En réalité, les protéines jouent un rôle clé dans la détermination de la façon dont les cellules sont organisées. Ils fournissent comme une source supplémentaire d'énergie pendant les moments de stress en cours (**Padmaja et al., 1994**). Les escargots ont besoin de plus d'énergie pendant les situations stressantes pour se débarrasser de leur corps du poison. Les protéines sont la source alternative d'énergie pour les escargots pour répondre à une demande énergétique accrue lorsqu'elles ont un apport limité de lipides et de glucides (**Moussard, 1999**). Étant donné que les pesticides (Bifenthrine et Hymexazole) et le mélange testé ont eu un impact très significatif sur la baisse des niveaux de protéines après 90 jours, il est possible que ces molécules aient des effets cytotoxiques, qui dépendent en grande partie de l'interférence avec les taux de lipoprotéines et du taux de biosynthèse. Plusieurs processus, dont l'utilisation directe de protéines par les cellules pour satisfaire les besoins énergétiques, ont été proposés par **Padmaja et Rao (1994)** comme des explications potentielles de la diminution des prothèses tissulaires chez l'escargot *B. dissimilis* (**Müller, 1991**) suite à l'exposition aux pesticides. En outre, **El-Wakil et Radwan** ont déjà proposé que le stress causé par le pesticide testé pourrait être un facteur dans la réduction des réserves de protéines solubles dans l'hépatopancréas des escargots.

Au contraire, certaines autres études ont montré une augmentation du taux de protéines au niveau hépatique. Cette augmentation est obtenue par **Bouaricha (2013)**, suite à l'exposition d'escargot *Helix aspersa* et les paramécies, aux Emamectine Benzoate (biopesticide). Ainsi **Radwan et al. (2010)** ont trouvées une forte augmentation de teneur en

protéines totales au niveau de l'hépatopancréas à la suite du traitement de l'escargot *Vermicula taeobania* par un carbamate.

Dans la présente étude, l'utilisation des HEO a été associée à une diminution très hautement significative du taux des protéines comparé aux témoins. Ce résultat peut être expliqué par une sensibilité particulière d'*Helix aspersa* contre les HEO. En effet, certains travaux présentés dans la littérature ont rapporté que cette espèce paraît sensible aux HEO (**Hamzi et Hamla, 2017**).

Les résultats concernant l'évolution du taux de lipides dans l'hépatopancréas mettent en évidence une diminution du taux des lipides chez les escargots traités par HEO et la mixture (BF + HEO, HY+HEO, BF+HY+HEO) comparativement aux témoins. Le même effet a été montré par les travaux de (**Bourbia, 2013**) après l'application d'insecticides commerciaux à base de thiaméthoxam (0-25 50-100 et 200 mg/L) sur *Helix aspersa* après six semaines de traitement. Cette diminution est en concorde avec les résultats de (**Padmaja et Rao, 1994**). La diminution dose-dépendante du taux des lipides après exposition de *Helix aspersa* peut être due au stress chimique causé par les composés testés. Selon (**Aurousseau, 2002**) les radicaux oxygénés libres sont toxique via la dégradation des lipides. Ces résultats vont dans le même sens que ceux rapporté dans (**Hélène, 2007**) qui ont montré une diminution du taux des lipides chez les ravageurs traités par les HEs de thym de sauge.

Nos résultats aussi montrent que le taux du lipide dans l'hépatopancréas chez les escargots traités par BF, HY est plus élevé que celui des escargots témoins. Certains pesticides causent des changements dans le métabolisme des lipides par l'inhibition des serines hydrolases y compris les lipases. Ces lipases sensibles aux pesticides OPs, jouent un rôle essentiel dans la régulation cellulaire, la nutrition et les maladies. Leur inhibition pourrait perturber l'homéostasie lipidique (**Quistad et al., 2006**).

Parallèlement nous avons mis en évidence une diminution du taux des glucides, chez les escargots traités par la BF, HEO et leur mixture (BF+HEO) au niveau hépatique comparativement aux témoins. Ce résultat est en accord avec ceux de **Boucenna, (2015)** et **Nzengue, (2008)** également sur des Gastéropodes. Selon **Padmaja et Rao (1994)**, la diminution des niveaux de glycogène dans les tissus des escargots d'eau douce *Bellamya dissimilis* (Müller) exposées à Endosulfan, Methyl parathion, Quinalphos et Nuvan peut être due à la nécessité d'utiliser du glycogène pour produire l'énergie nécessaire pour faire face à l'hypoxie causée par ces pesticides.

En raison de l'exposition aux insecticides OP et carbamate, de nombreux gastropodes pulmonaires, y compris *Biomphalaria alexandrina*, *Bulinus trincatus* (Sharaf *et al.*, 1975), et *L. acuminata* (Mahendru et Agarwal, 1981; Singh et agarwal, 1989), ont montré une diminution des stocks de glycogène. Baturu *et al.*, (1995) ont noté une augmentation de l'activité enzymatique d'hydrolyse des polysaccharides de *L. palustris* exposés à l'hexachlorobenzène dans le mécosme et une diminution de la teneur en glycogène dans la masse viscérale et du manteau.

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent une augmentation du taux des glucides chez les escargots traités par l'hymexazole et les mixtures (HY+HEO, BF+HY, BF+HY+HEO) en comparaison avec les témoins. Ceci peut être expliquée par plusieurs hypothèses notamment l'augmentation des réserves énergétiques, ou par des changements structuraux ou de perméabilités des membranes cellulaires (Carpy *et al.*, 2000). Cette augmentation s'accorde avec les travaux de (Jumel et Lagadic, 2000) qui enregistrent une augmentation du glucose d'une manière significative pendant la période expérimentale chez les escargots traités avec le pesticide Fluazifop-p-butyl.

Nos résultats montrent que l'utilisation des huiles essentielles de l'écorce d'orange Thomson naval avec le pesticide HY n'a pas corrigé cette perturbation du taux des glucides. Comme étant molécule antioxydante, il s'avère que ces composés chimiques augmenter d'une manière très hautement significative le taux du glucide.

La perturbation des taux de protéines, lipides, et glucides peut être expliquée par d'une part l'induction de la synthèse des protéines en rapport avec le phénomène de bioactivation / biotransformation et d'autre part par la peroxydation lipidique générée par les ROS (Benbouzid, 2012) qui peuvent entraîner les dommages des macromolécules tels que les acides nucléiques, lipides et protéines (Agrawal et Sharma, 2010). Nos résultats sont en parfait accord avec cités ci-dessus puisque nous avons mis en évidence une perturbation du taux de tous les métabolites confirmant ainsi la toxicité des deux pesticides testés et leur mixture.

Ce phénomène pourrait être considéré comme un biomarqueur précoce de l'exposition aux polluants chimiques. Partant du principe que tout type de stress chimique peut provoquer une libération de radicaux libres dans l'organisme (Aurousseau, 2002), une altération des composants cellulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement. Tous les composants cellulaires peuvent être touchés : lipides, protéines, et donc les membranes dans leur ensemble (Haliwell et Chirico, 1993), glucides et ADN (Jaeschke, 1995 ; Meneghini, 1997).

D'autre part, la co-exposition des pesticides et l'huile essentielle d'orange *Thomson naval* a tendance de diminuer les taux des protéines, lipides, et glucides dans les groupes préventifs, car cette plante possède une activité antioxydante basée sur le piégeage des radicaux libres, ou la modulation du statut antioxydant, la régénération tissulaire ou le maintien du métabolisme.

### III.5.2. Effets des pesticides seuls et mixtes sur le statut redox

L'exposition aux pesticides peut induire un état de stress oxydant (SO) par : (1) production accrue des radicaux libres qui s'accumulent dans la cellule, (2) altération des mécanismes de défense antioxydante ; y compris la détoxification et les enzymes de balayage, ou (3) augmentation de la peroxydation lipidique suite à l'interaction entre les ERO et les membranes cellulaires ou sous-cellulaires (**Abdollahi et al., 2004**).

Les biomarqueurs constituent des indicateurs qui répondent de façon précoce et sensible à un dysfonctionnement et leur utilisation rend compte de la biodisponibilité des polluants et des effets qu'ils engendrent sur les organismes et les populations (**McCarthy et Shugart, 1990**). Les biomarqueurs du stress environnemental mesurés dans cette étude sont Le taux de malondialdéhyde (MDA), le taux de glutathion (GSH) et catalase (CAT) et la glutathion S-transférase (GST), la glutathion peroxydase (GP<sub>x</sub>).

Le MDA est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générées dans certaines conditions de stress, en particulier avec des contaminants organiques (HAP, PCB, pesticides) et inorganiques (métaux de transition). Le taux de malondialdéhyde (MDA) est souvent utilisé comme un indicateur de la peroxydation lipidique des membranes. En effet, selon **Bebianno et al. (2005)** et **Al-Mutairi et al. (2007)** l'augmentation du taux de Malondialdéhyde indique une peroxydation lipidique, cette dernière est suivie de changements et d'une dégradation des structures membranaires, Il s'ensuit une perte des récepteurs et des enzymes de la membrane (**Pampanin et al., 2005**).

Nos résultats ont mis en évidence, des teneurs très hautement significatives de MDA au niveau d'hépatopancréas chez *Hélix aspersa* traités par la BF, BF+HY. Ces résultats sont en accord avec **Dar et al. (2013)** ; qui ont remarqué une augmentation de MDA après la toxicité au BF chez les rats, aussi **Khan et al. (2013)** a rapporté une augmentation significative du niveau de MDA due à une lipo-oxydation lors d'un traitement par la BIF chez les rats. Au contraire le taux de MDA était élevé d'une façon non significative dans l'hépatopancréas des

escargots traités en comparaison avec les témoins (**Geyu et al., 2014**). Dans notre travail aussi nous avons confirmé (chez les escargots traités par HY, HY+HEO, BF+HEO) ce phénomène à travers la mise en évidence d'une augmentation significative du taux de Malondialdéhyde (MDA). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Siwela et al. (2010)** ont mis en évidence une augmentation significative du taux du MDA chez l'escargot marin *Lymnaea natalensis* exposé à des polluants environnementaux il en est de même pour les travaux de **Dutta et al. (2012)** ont montré une élévation des niveaux de malondialdéhyde, sous-produit de la peroxydation des lipides, corrélée à une production d'EROs par les nanoparticules d'oxyde de zinc placées sous illumination. Récemment, **Zeriri et al. (2012)** ont mis en évidence une induction du taux de MDA chez les verres de terre exposés à un pesticide (le Métomyl). Ainsi et au vu des résultats obtenus, les deux pesticides que nous avons testés est toxique et cette toxicité a été mise en évidence à travers l'induction de certains biomarqueurs de stress que nous avons pu quantifier.

Dans la présente étude, le taux de MDA a été augmenté, tandis que l'activité de GSH a été réduite dans le groupe traité par BF, HY et la mixture de ces derniers. La concentration accrue de MDA dans les groupes traités peut être attribuée à une production excessive de ROS par les deux pesticides, ce qui peut avoir provoqué la diminution des activités des enzymes antioxydantes (**Akande et al., 2014**). Les travaux menés par **Banerjee (1999)** ont clairement démontré que les pesticides avaient une influence sur les enzymes antioxydants.

Le GSH joue un rôle central dans le processus de défense intracellulaire (Arrigo, 1999), il neutralise le peroxyde organique, élimine les hydrocarbures par conjugaison au groupement thiol (**Adam et al., 2005**). Le glutathion existe sous deux formes, oxydée GSSG et réduite GSH (**Kizek et al., 2004**). Le rapport (GSH/GSSG) est un excellent indicateur dynamique du stress oxydant. Dans les cellules non stressées, 99% du glutathion est présent sous sa forme réduite GSH (**Griffith et Mulcahy, 1999**). Le glutathion réduit (GSH) c'est un piègeur direct des radicaux libres, un cosubstrat nécessaire pour l'activité GPx et la GST. Une déficience en GSH expose les cellules à un risque de dommage oxydatif (**Droge, 2002**).

Une réduction très hautement significative des teneurs en GSH est enregistrée dans notre étude chez les individus de *Helix aspersa* après exposition au bifenthrine, au hymexazole, à l'huile essentielle d'orange et à leurs mixtures. La diminution du taux de GSH enregistrée dans notre étude peut refléter le stress oxydatif causés par les deux pesticides testés et leurs mixtures. En effet, le GSH est un antioxydant dont la diminution devrait contribuer à la protection de l'animal de l'effet de chacun des composés testés. La forte diminution du taux

de la GSH pourrait s'expliquer par une réaction/liaison directe du pesticide avec le glutathion (**Galaris et al., 2002**). Parmi les travaux confirment les résultats obtenus et aide à mieux expliquer la relation entre la diminution du taux de GSH et le niveau de contamination. Selon **Dar et al. (2011)** le taux de GSH dans le sang a diminué de manière significative dans groupe traité à la BIF. Une réduction significative et non significative observée chez les gastéropodes *Helix aspersa* après exposition au carbofuran et au paraquat respectivement (**Salama et al., 2005**). Une autre étude sur la réponse antioxydante a indiqué une diminution du taux de GSH comme réponse générale des mollusques bivalves exposés aux contaminants (**Regoli et Principato, 1995; Suteau et al., 1988**). D'un autre côté la réduction du taux de GSH peut être expliquée également par l'augmentation de l'utilisation de ce dernier par la GST dans la réaction de conjugaison, ceci est confirmé par nos résultats qui indiquent une induction de la GST suite aux traitements testés. Ces résultats sont en accord avec le travail de (**Radwan et al., 1992**), qui ont mis en évidence une induction de l'activité GST après l'exposition du gastéropode terrestre (*Theba pisana*) aux carbamates, aussi remarquée une diminution du taux de GSH dans l'hépatopancréas de la moule *Mytilus galloprovincialis* exposée aux contaminants (**Canesi et al., 1998**). Au contraire, **Grara, (2011)** expliquée L'augmentation du taux de GSH chez l'escargot *Helix aspersa* par l'enclenchement du processus de défense de l'organisme.

La Catalase est un enzyme de la phase II qui joue un rôle très important dans les mécanismes de détoxification. Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation très hautement significative de l'activité Catalase chez les lots traités par BF, BF+HY cette augmentation serait due à l'intensification de l'activité antioxydante (**Grara et al., 2009**), contrairement les lots traités par HY qui montre une diminution très hautement significative. En fait, il n'existe pas vraiment de règle générale qui permet d'expliquer ou de prédire la toxicité associée à ce produit chimique. En effet, la Catalase est sensible à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif comme les HAP, les PCB, certains pesticides (**Livingston, 1991**). Une des hypothèses retenues est que cette activité enzymatique semble très sensible aux facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle (**Pellerin-Massicotte, 1994**), hypothèse corroborée par les résultats obtenus par **Pellerin-Massicotte et al. (1997)**, observant une induction de l'activité catalase dans un endroit non pollué qui pourrait être due à un stress physiologique comme une répétition de la ponte. Selon ces auteurs, la catalase pourrait être sensible à des variations subtiles des conditions



environnementales, l'augmentation et le changement de l'activité Catalase contribue à la prévention contre l'accumulation des ROS résultant de la présence du biopesticide, et par des lésions cellulaires causées par l'exposition à des contaminants. (Shijin *et al.*, 2011). Nos résultats sont en parfait accord avec ceux de Bouaricha, (2013) qui a mis en évidence une augmentation de l'activité CAT suite au traitement du gastéropode *Helix aspersa* par un biopesticide, ou encore ceux d'El-Gendy *et al.* (2009) qui ont démontré qu'en présence d'un pesticide à base de Cuivre, l'activité Catalase augmente chez l'escargot *Theba pisana*. Des résultats similaires ont été observés par Salama *et al.* (2005), chez la même espèce de gastéropode après exposition au méthomyl et au chlorpyrifos. L'augmentation de l'activité CAT a été observée chez d'autres organismes comme les bivalves et les poissons traitée à des polluants organiques (HAP, PCB, pesticides et engrais chimiques) (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993 ; Torreilles *et al.*, 1996 ; Cossu *et al.*, 1997).

Le glutathion réduit (GSH) joue un rôle multifactoriel important dans le mécanisme de défense antioxydante (Sathishsekar et Subramanian, 2005). En outre Le GSH est susceptible d'être impliqué dans les systèmes de détoxification des pesticides administrés à dose élevée et aussi jouer un rôle de scavanger anti ROS, ce qui cause sa réduction accrue dans le cytosol, (Mani *et al.*, 2014). C'est un piègeur direct des radicaux libres, un cosubstrat nécessaire pour l'activité GPx et la GST (Ravi *et al.*, 2004). Par conséquent, les changements dans l'état redox du GSH peuvent être considérés comme un indicateur particulièrement très sensible du stress oxydant (Taleb-Senouci *et al.*, 2009). Dans notre travail, nous avons mis en évidence une implication de système de détoxification à travers une augmentation de l'activité GST et une diminution du taux de GSH chez les escargots traitées par le BF, l'HY et la mixture. L'augmentation de l'activité GST et la diminution du taux de GSH sont dus au fait que le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales, Atailia (2009) étudiée l'implication du système GSH/GST chez les escargots *Helix aspersa* traités avec des xénobiotiques terrestres (poussière métallique). L'induction de l'activité de cette enzyme est en accord avec les résultats signalés par Gagné *et al.* (2006) qui démontre que les polluants augmentent l'activité GST de l'hépatopancréas chez les bivalves *Mya arenaria*. L'augmentation de l'activité GST observée peut être due à l'activation du système naturel antioxydant par les pesticides. Notons également que Torres et Mason (2002) ont observé une inhibition de l'activité GST (in vitro) chez des escargots *Helix espersa* exposés à 10 µm de TBT. Aussi remarquée dans l'étude de Radwan et Mohamed, (2013) une induction de

l'activité GST après l'exposition du gastéropode terrestre (*Thebapisana*) à un pesticide (Carbamate) et chez l'espèce *Helix aspersa* exposé aux insecticides.

Le glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit de manière continue et à des niveaux physiologiques dans la cellule, elle agit plus lentement que la catalase, mais elle possède une meilleure affinité pour le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que cette dernière (**Zhao et al., 2006**). Elle catalyse la réduction de peroxydes organiques avec oxydation concomitante du glutathion réduit (GSH) (**Paglia et Valentine, 1967**). Une augmentation progressive dans le taux de GPx a été observée chez les escargots traités en comparaison avec les témoins. Les résultats d'**Attia et al. (2022)** confirmée ce résultat et révèlent une augmentation significative de l'activité de la GPx chez *E. vermiculata* exposé au Weatfert, au Decis et au Zoom. Cette augmentation peut être attribuée à la production de radicaux libres (**Hermes et al., 2004**) comme le montrent **Orbea et al. (2000)** et **Radwan et al. (2010)** sur d'autres espèces d'escargots exposées à certains polluants. En revanche, une légère inhibition de l'activité GPx a été observée chez *Biomphalaria alexandrina* après traitement avec un engrais à haute teneur en phosphore (**El-Deeb, 2017**).

A l'heure actuelle, Les connaissances sur l'effet toxique mixte des pesticides étudiés sur ces escargots *Helix asperca* sont encore limitées en outre, les données disponibles sur la toxicité de mixture BF+HY pour les invertébrés et ses effets potentiels sur les paramètres de stress oxydatif restent incomplètes. Aucun rapport sur les biomarqueurs écotoxicologiques de BF+HY dans les mollusques terrestres n'a été trouvé dans la littérature. D'autre part, certaines études ont montré que l'effet d'un mélange ne reflète pas nécessairement les effets des substances prises individuellement (**Padhi et al., 2008**). Les interactions possibles entre les composants d'un mélange sont donc assez complexes et rendent la prédiction de l'effet global très difficile.

### III.5.3. Effets préventifs des huiles essentielles d'orange sur le statut redox

L'huile essentielle de *Citrus sinensis* contient des mélanges de nombreux composés riches en polyphénols, terpènes et hydrocarbures (**Akah et al., 2007**). Le principal constituant de l'huile essentielle d'écorce d'orange naval est le limonène et ses activités antioxydantes ont été signalées (**Roberto et al., 2009**). Les écorces d'orange naval possèdent des potentiels antioxydants qui pourraient être protecteurs contre le stress oxydatif, donc utiles dans son traitement et sa gestion (**Erukainure et al., 2012**). Les résultats globaux révèlent l'effet d'amélioration prononcé de la peroxydation lipidique, après l'addition de l'huile essentielle d'orange chez les escargots intoxiqués par BF, HY et leur mixture. Ces résultats concordent

avec de nombreux travaux réalisés avec la même huile essentielle d'orange contre la toxicité des autres pesticides et composants (Kosasih *et al.*, 2019 ; Muhammad *et al.*, 2013). Nous avons aussi concordé ces résultats avec de nombreux travaux réalisés avec d'autres antioxydants chez les rats (Al-Awthan *et al.*, 2012 ; Ozkan *et al.*, 2012). Cette amélioration peut être due à leur diffusion plus élevée dans les membranes, en permettant le piégeage des radicaux libres (Uzun et Kalender, 2013). Nos résultats indiquent que l'administration de l'huile essentielle d'écorce d'orange Thomson naval associée ou non aux pesticides étudiés et leur mixture, a réduit les niveaux de MDA, GST, CAT et GSH et a augmenté les taux de GPx après 90 jours de traitements. Ces résultats sont en concurrence avec ceux obtenus chez les rats par Mostafa *et al.* (2016). L'écorce d'orange naval a induit des effets hépato-préventifs potentiels qui ont été mis en évidence par une amélioration de la fonction hépatique et des activités antioxydantes d'hépatopancréas en plus de l'atténuation des marqueurs apoptotiques (Ahmed *et al.*, 2019). Nos résultats sont en parfait accord avec cités ci-dessus prouvant l'effet préventif de l'HEO contre la toxicité induite par les deux pesticides testés et leur mixture.

#### III.5.4. Effets des pesticides et l'huile essentielle sur l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'AChE est une enzyme responsable de l'inactivation du neurotransmetteur acétylcholine. L'inactivation de l'AChE entraîne l'accumulation du neurotransmetteur acétylcholine dans l'espace des synapses cholinergiques, conduisant à un blocage synaptique et à une perturbation de la transmission du signal. Ainsi, l'inhibition de l'AChE est considérée comme un biomarqueur spécifique de l'exposition aux pesticides (Banaee *et al.*, 2011). Chez les invertébrés, le rôle important des cholinestérases est moins clairement défini, bien que l'existence de motoneurones cholinergiques ainsi que celle de récepteurs spécifiques à l'acétylcholine ait été mise en évidence chez les mollusques et les gastéropodes (Weiss *et al.*, 1993). L'activité AChE est utilisée comme marqueur d'exposition aux pesticides inhibiteurs chez les mollusques. Néanmoins, dans une étude de surveillance biologique menée dans l'estuaire de la Gironde, aucune pollution de ce type n'a été mise en évidence et une inhibition significative de l'AChE a pourtant été remarquée chez *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas* (Amiard-Triquet *et al.*, 1998).

Nos résultats révélés que la bifenthrine, hymexazole et leurs mixtures utilisées aux doses choisies, inhibent très significativement l'activité spécifique de l'AChE, il y a une diminution de l'activité de l'AChE chez *Helix aspersa*. La bifenthrine semble avoir un effet plus marqué sur cette inhibition que l'hymexazole. Cependant, les mixtures choisies semblent être moins

neurotoxiques à l'égard de ce gastéropode. Cette diminution peut être expliquée par la production et l'accumulation de ROS suite à l'administration de ces pesticides, ce qui entraîne des dommages à l'ADN et aux phospholipides membranaires ainsi qu'une inhibition de l'AChE (Yu *et al.*, 2008). Des travaux appuient nos résultats, notamment ceux de Ullah *et al.* (2022), qui ont mis en évidence une inhibition de l'acétylcholine estérase chez *Ctenopharyngodon idella* traités avec la bifenthrine, de Miao *et al.* (2016) et Farag *et al.* (2021) qui ont observé le même résultat, mais sur d'autres bioindicateurs.

Les molécules organiques extraites des végétaux apparaissent comme un outil alternatif dans le domaine de la détoxification en raison de leur biodégradabilité, disponibilité et de leur non-toxicité. Par conséquent, plusieurs chercheurs ont mis l'accent sur l'utilisation potentielle de ces inhibiteurs verts depuis environ dix ans (M'hiri, 2015). Les HE sont potentiellement utiles dans les mécanismes de détoxification en raison de leur capacité à neutraliser différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites au début de maladies neurodégénératives (Smeriglio *et al.*, 2018). Nos résultats montrent que le traitement par les huiles essentielles d'écorce d'orange naval corrige la diminution de l'activité de l'AChE engendrée par les pesticides. Ce résultat est en accord avec Menichini *et al.* (2011) qui a indiqué que Limonène,  $\alpha$ -terpinène,  $\alpha$ -Pinène,  $\gamma$ -terpinène et terpinen-4-ol étaient les principales composantes d'HE identifiées responsables des effets neuroprotecteurs. Ce résultat peut démontrer que l'huile essentielle d'écorce d'orange Thomson naval peut protéger les escargots contre la neurotoxicité induite par ces pesticides, et les effets protecteurs peuvent être régulés l'état oxydant et antioxydant des escargots.

### III.6. Conclusion

En conclusion, nous pouvons suggérer que les perturbations observées dans la composition biochimique de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* (contenue dans les glucides totaux, les lipides totaux et les protéines totaux) après traitement avec la bifenthrine, l'hymexazole et leurs mélanges sont susceptibles d'être liées soit :

- ✓ L'utilisation de l'énergie peut augmenter ou diminuer en raison des interactions entre ces composés chimiques et des enzymes métaboliques importantes.
- ✓ aux modifications de la perméabilité des membranes cellulaires causées par les organites ou d'autres modifications.
- ✓ interférence structurelle ou fonctionnelle avec la production de protéines.

La seule réaction des composants métaboliques est insuffisante pour évaluer les effets de la bifenthrine, un fongicide, et de leurs mélanges sur le crâne de *Helix aspersa*. Il est crucial de rechercher d'autres biomarqueurs qui sont plus sensibles et ciblés sur les contaminants. *Helix aspersa*, par exemple, est utilisé pour évaluer les études de réponse de quelques indicateurs de stress environnemental.

Nos résultats montrent un lien entre la toxicité des produits chimiques examinés et la stimulation du système de désintoxication. En effet, le BF et le HY augmentent considérablement les niveaux de GST, de GPx et de CAT, réduisent sensiblement les taux de GSH et semblent être neurotoxiques (inhibition de l'AChE). En fait, les conséquences négatives potentielles d'une combinaison de polluants peuvent être le résultat d'interactions complexes impliquant leur métabolisme, leurs divers mécanismes d'action, ou leurs diverses cibles. Par conséquent, pour comprendre pleinement cette variation de toxicité, une étude du métabolisme de ces composés et de leurs combinaisons est essentielle et gratuite.

Enfin, avec la présente étude confirmée que la composition chimique d'huile essentiels d'écorce d'orange Thomson naval surtout « Limonène » le composant majoritaire, qui joué un rôle hépatoprotective et neuroprotecteurs très importante contre les toxicités des deux pesticides bifenthrine et hymexazole.



Etude subcellulaire

Etude subcellulaire

## **IV. Etude subcellulaire**

### **IV.1. Objectif du travail**

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés particulièrement à l'effet de bifenthrine, de hymexazole et de leur mixture sur les mitochondries isolées des hépatopancréas. Pour cela, les effets des deux pesticides et la combinaison ont été évalués d'une part sur la vitesse d'oxydation et le gonflement mitochondriale et d'autre part sur l'activité enzymatique mitochondriale. En plus, l'objectif était de chercher le rôle protecteur d'HEO contre les effets succellulaires comme étant avoir des propriétés antioxydantes.

### **IV.2. Isolement des mitochondries**

#### **IV.2. 1. Principe**

La procédure d'isolement des mitochondries a été effectuée selon la méthode de **Kristal et al. (1996)**. Cette méthode est basée sur préparation d'un homogénat suivie d'une centrifugation différentielle.

#### **IV.2. 2. Réactifs**

Tampon d'isolement

- ✓ 210 mM mannitol
- ✓ 70 mM sucrose
- ✓ 1 mM Tris-Hcl pH 7.5
- ✓ 1 mM EDTA pH 7.5

#### **IV.2. 3. Protocole**

- ✓ Préparer l'homogénat à partir 500 mg de tissu dans 4 ml de tampon d'isolement.
- ✓ Transférer l'homogénat dans un tube à centrifuger de plusieurs centrifugations différentielles à 4°C.
- ✓ Jeter le surnageant et récupérer le culot qui contient essentiellement les mitochondries pures.
- ✓ Laver les mitochondries deux fois par le tampon de respiration.
- ✓ Remettre le culot dans 1 ml de tampon d'isolation.
- ✓ Ensuite la lecture spectrophotométrique à la longueur d'onde 520 nm.

### **IV.3. Mesure de la respiration mitochondriale**

#### **IV.3.1. Principe**

La respiration a été estimée en utilisant un Oxygraph (Hansatech) à l'aide d'une électrode à oxygène selon la méthode décrite par **Rouabhi *et al.* (2006 ; 2009)**.

#### **IV.3.2. Réactifs**

Tampon de respiration

- ✓ 0,5 M de mannitol
- ✓ 0,05% d'albumine de sérum bovin
- ✓ 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- ✓ 10 mM tampon phosphate à pH 7,3

#### **IV.3.3. Protocole**

Les mesures de consommation d'oxygène des mitochondries isolées ont été réalisées par simple addition d'organelles (0,2 mg / ml mitochondries).

### **IV.4. Mesure du gonflement des mitochondries**

Les mesures du gonflement des mitochondries sont effectuées à 25 ° C avec un spectrophotomètre (Jenway, modèle UV6300) à la longueur d'ondes  $\lambda = 520$  nm. La réaction est déclenchée par l'addition de mitochondries (0,2 à 0,5 mg de protéines pour un volume final de 3 ml).

### **IV.5. Estimation de la perméabilité mitochondriale**

Selon la méthode de **Kristal *et al.* (1996)**, nous avons estimé la perméabilité mitochondriale en se basant sur la mesure du taux des ions de Ca<sup>++</sup> qui traverse leur membrane. Cette perméabilité a été mesurée en évaluant l'augmentation de la taille des mitochondries et a été suivie pendant 2 minutes toutes les 15secondes. La lecture a été faite à une longueur d'onde de 540 nm.

### **IV.6. Mesure des activités enzymatiques mitochondriales**

Les échantillons sont broyés dans un tampon de broyage dans un Potter en verre à 4 ° C. Après avoir été centrifugé à 3000 tours pendant cinq minutes, le surnage obtenu a été récupéré pour surveiller les diverses activités enzymatiques. L'activité de la catalase a été déterminée dans l'hépatopancreas colorimétriquement selon **Cakmak et Horst (1991)**. La vitesse de disparition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est suivie en observant le taux de diminution de l'absorbance à 240 nm.



La mesure de l'activité de glutathion S Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig *et al.* (1974)** suite à la formation de 1-glutathion-2,4-dinitrobenzène résultant de la conjugaison entre le substrat (1-chloro-2,4 dinitrobenzène (CDNB) avec du glutathion réduit. La réduction du glutathion a été déterminée par spectrophotométrie, selon la méthode de **Weckbecker et Cory (1988)**. Le MDA peut être détectée par une réaction colorimétrique avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le MDA est analysé selon la méthode **d'Esterbauer *et al.* (1992)**. L'activité de la glutathion peroxydase a été évaluée par la méthode de **Flohe et Günzler (1984)** en utilisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat.

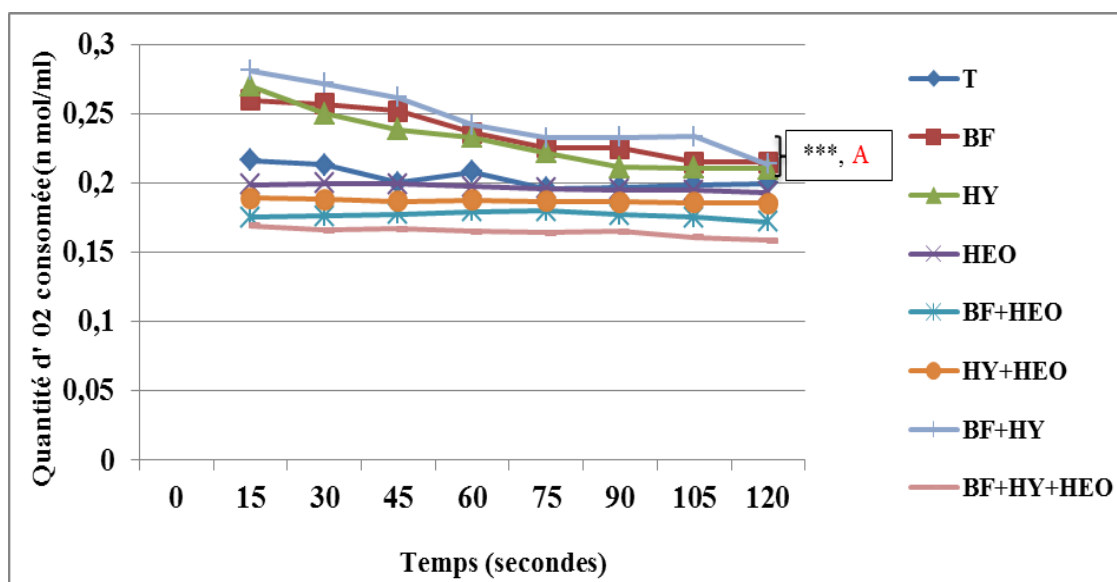
#### **IV.7. Analyse statistique**

Pour analyser les résultats de ce chapitre, nous nous sommes appuyés sur la même méthode que celle que nous avons adoptée dans les chapitres précédents.

## IV.8. Résultats

### IV.8. 1. Effet des pesticides et l'huile essentielle sur la respiration mitochondriale

La figure 53 met en évidence l'évolution de la consommation d'oxygène chez les escargots *Helix aspersa* en présence de BF, de HY, HEO et de la mixture après 90 jours de traitement.



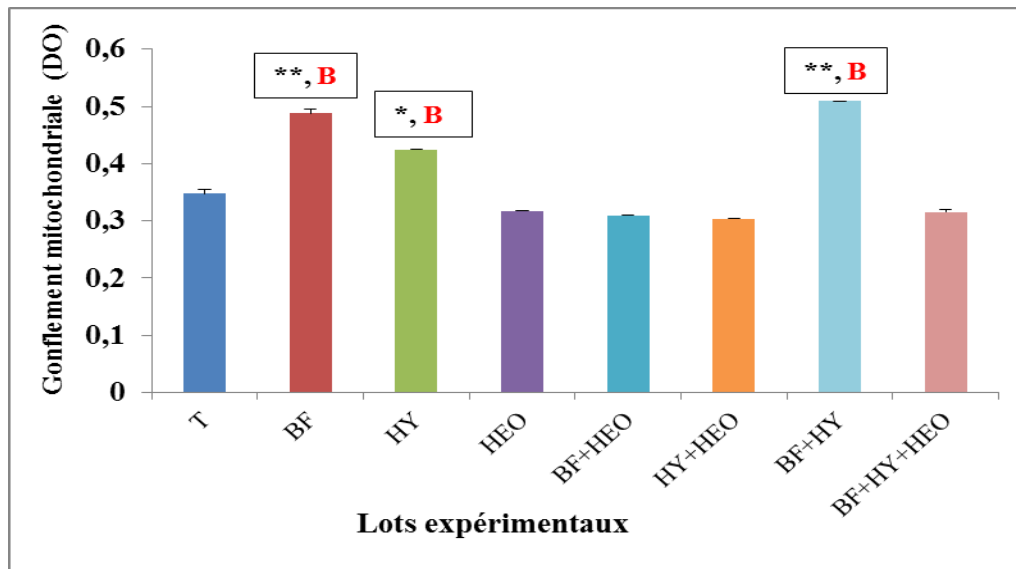
**Figure 53 :** Variation de la respiration mitochondriale au niveau hépatopancreatique chez les escargots témoins et traités.

" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; A : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".

La figure montre une diminution très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) de la concentration d'oxygène consommé dans l'hépatopancreas chez le lot traité par BF, HY, BF+HY comparés au témoin, et au lot traité par BF+HEO, HY+HEO, BF+HY+HEO. L'analyse de la variance ne met en évidence aucune modification statistiquement significative chez les escargots traités par l'huile essentielle d'écorce d'orange (HEO) seuls ou en association avec le pesticide par rapport aux témoins.

### IV.8.2. Effet des pesticides et de l'huile essentielle sur le gonflement mitochondrial

Les résultats de l'effet du BF, HY, BF+HY et leur combinaison avec l'huile essentielle d'écorce d'orange sur le gonflement mitochondrial sont rapportés dans la figure 54.



**Figure 54 :** Variation du gonflement mitochondrial des cellules hépatopancréatiques chez les escargots témoins et traités.

" \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ;  
**B**: différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ )".

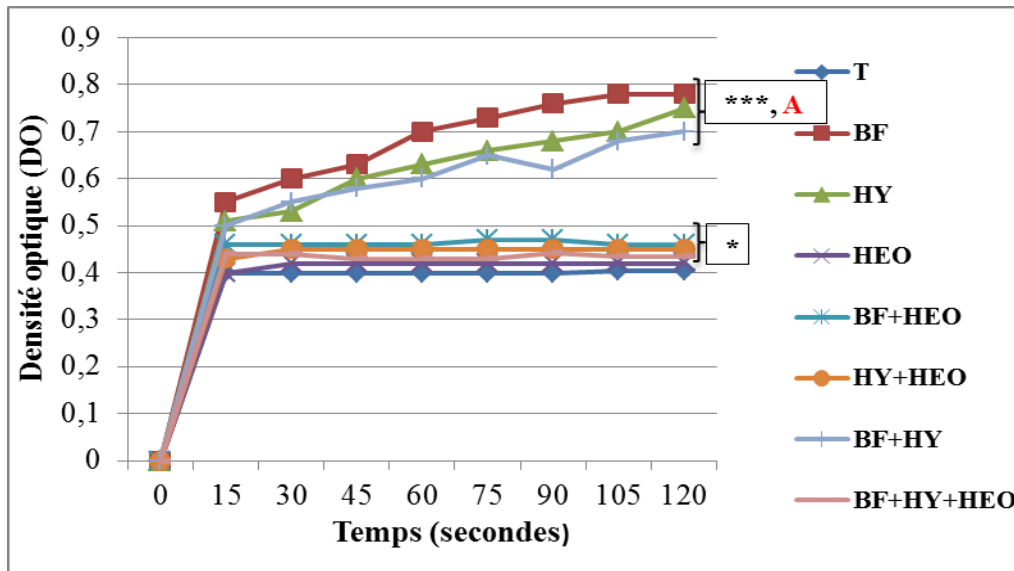
Les résultats obtenus montrent une augmentation significative ( $p \leq 0,05$ ) chez le lot HY, et hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les lots BF, BF+HY par rapport au témoin. En revanche, cette augmentation est diminuée pour les lots traités par l'addition d'HEO de façon hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) comparé aux lots traités uniquement par les pesticides et la mixture. Ainsi nous ne constatons aucune différence significative entre ces lots traités et le lot témoin. Seulement pour le lot HY+HEO, une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) a été constatée.

#### IV.8.3. Effet des pesticides et l'huile essentielle d'écorce d'orange sur la perméabilité mitochondriale

Les résultats concernant l'effet du BF, HY, BF+HY et leur combinaison avec l'huile essentielle d'écorce d'orange sur la perméabilité mitochondriale durant 90 jours sont représentés dans les **figures (55 et 56)**.

Les résultats montrent une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) de la perméabilité mitochondriale dans l'hépatopancréas chez les lots traités par le pesticide seul et en mixture, et significative ( $p \leq 0,05$ ) chez les lots traités par pesticide + HEO comparés au témoin. L'analyse de la variance met en évidence une variation très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) chez les escargots traités par l'HEO en association avec BF et HY ou en mélange, par rapport aux escargots traités uniquement par le pesticide (**Figure 55**).

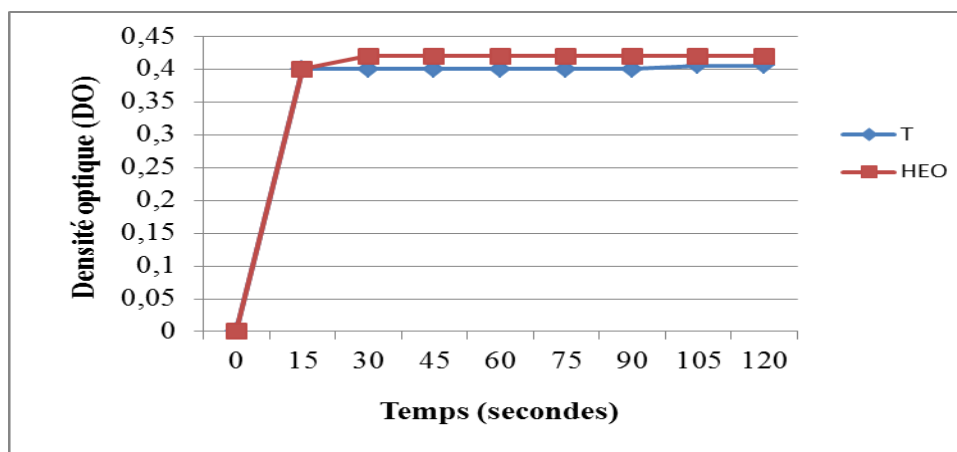
Après 30 secondes, on note une stabilité du volume de mitochondries chez les escargots témoins et traités uniquement par l'HEO ou en association avec BF, HY et en mélange.



**Figure 55 :** Variation de la perméabilité mitochondriale au niveau hépatopancréatique chez les escargots témoins et traités.

" \*\*\* : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; A : différence significative ( $p \leq 0,05$ )".

La figure 56 illustre les résultats concernant l'effet de l'huile essentielle d'écorce d'orange sur la perméabilité mitochondriale. L'analyse de la variance ne met en évidence aucune modification statistiquement significative chez les escargots traités par L'HEO par rapport aux témoins.

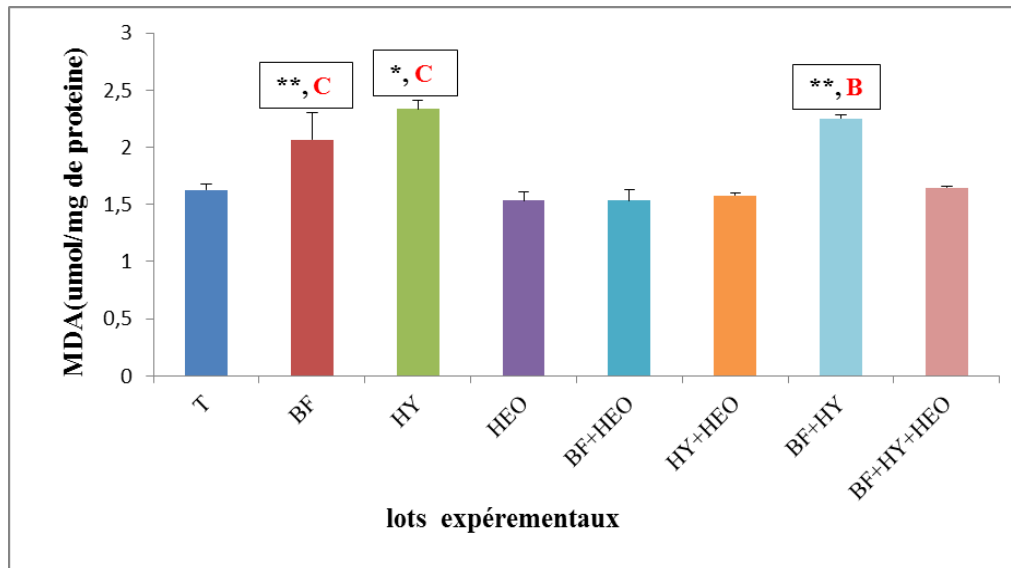


**Figure 56 :** Variation de la perméabilité mitochondriale (DO 540nm) au niveau hépatopancréatique chez les escargots témoins et traité par l'HEO.

#### IV.8.4. Suivi des activités enzymatiques et non enzymatiques mitochondriales

##### IV.8. 4.1. Effet sur les taux du malondialdéhyde mitochondrial

La figure 57 met en évidence l'évolution des taux du malondialdéhyde chez les mitochondries témoins et traitées avec de BF, d'HY, d'HEO et leurs mixture.



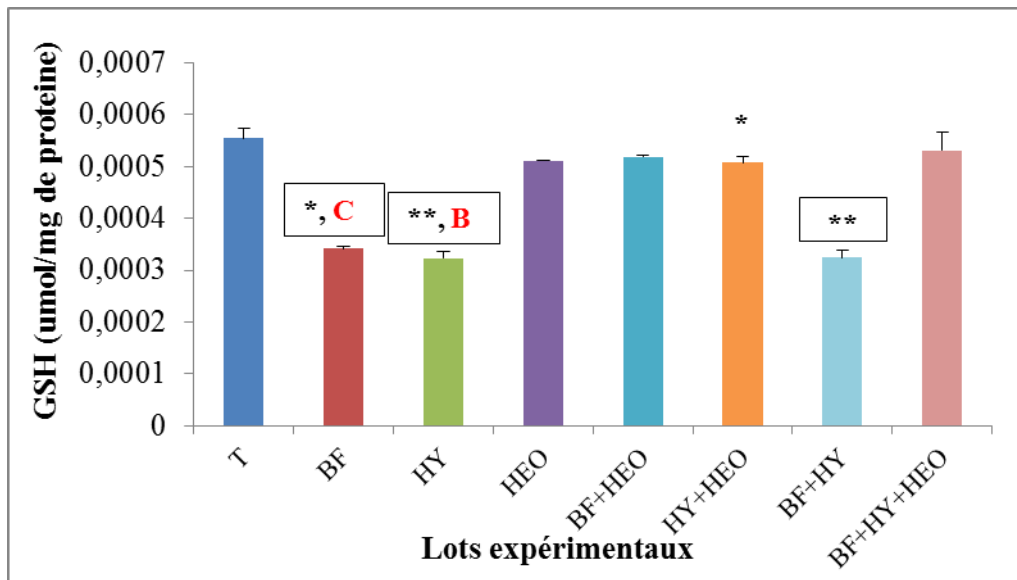
**Figure 57 :** Effets du BF, HY, HEO et de mixture sur le taux de MDA au niveau mitochondrial chez les escargots témoins et traités.

" \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; **B** : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; **C** : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".

Nous avons constaté une élévation du MDA significative ( $p \leq 0,05$ ) chez les escargots injectée par l'HY, et hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) du MDA chez les escargots injectée par la BF et la mixture par rapport au groupe témoin. Cependant, l'administration du l'HEO a diminué le taux du MDA de façon significative ( $p \leq 0,05$ ) chez les lots traités par BF, HY, et hautement significative chez les escargots ayant subi la mixture par rapport au groupe traité par le pesticide seul. Par ailleurs, aucune variation significative du MDA n'est constatée chez les escargots injectée par la BF, HY, BF+HY et prétraités par l'huile essentielle d'écorce d'orange par rapport au groupe témoin.

##### IV.8.4.2. Taux du glutathion réduit (GSH)

Nos résultats indiquent une diminution hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) du taux de GSH chez les groupes traités par HY, HY+BF, et significative ( $p \leq 0,05$ ) chez le groupe traité par BF comparé au groupe témoin (**Figure 58**).



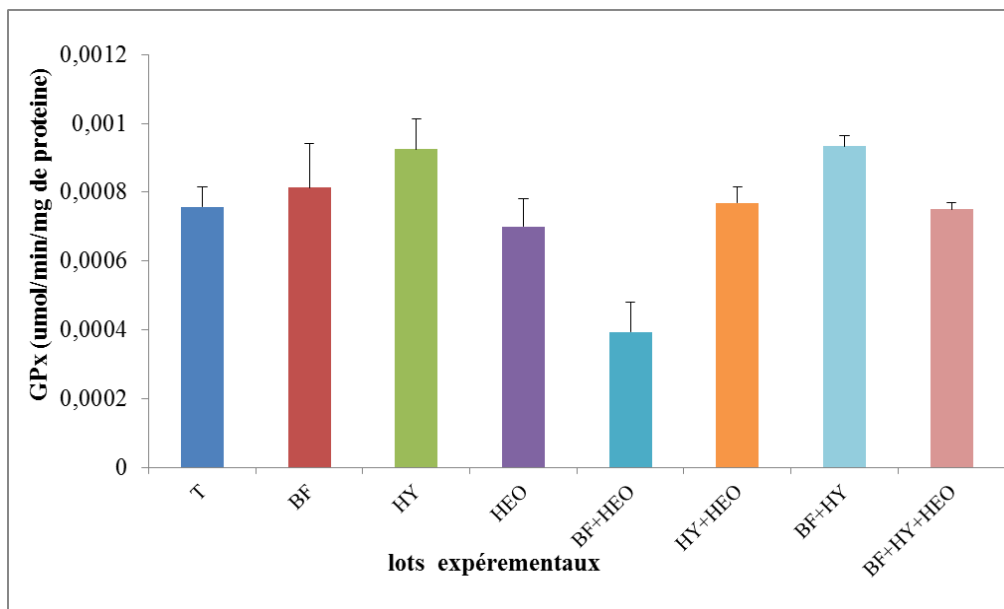
**Figure 58 :** Variation de la teneur de glutathion ( $\mu\text{mol/mg}$  protéine) au niveau mitochondrial chez les escargots témoins et traités.

" \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; **B** : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; **C** : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".

En revanche, on remarque une augmentation de la teneur en GSH chez les lots injectée par la combinaison du pesticide et l'HEO de façon hautement significative ( $p \leq 0,01$ ), et significative ( $p \leq 0,05$ ) chez le groupe traité par HY+HEO comparés aux groupes traités uniquement par le pesticide. Ainsi aucune différence n'est constatée lorsqu'on les compare avec le témoin, sauf pour le lot traité par l'HY+HEO ( $p \leq 0,05$ ).

#### IV.8.4.3. Activité de la glutathion peroxydase (GPx)

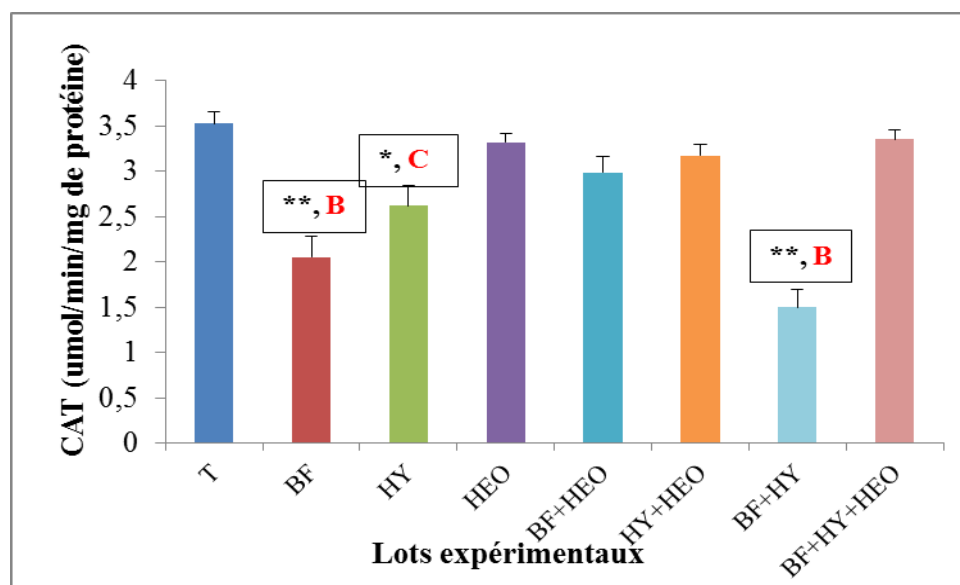
L'exposition sub-chronique au BF, HY, et leur combinaison a induit une augmentation de l'activité enzymatique mitochondrial de la glutathion peroxydase, mais on ne constate aucune différence significative de l'activité de cette enzyme entre les escargots des lots témoin et ceux des tous les lots traités (**Figure 59**).



**Figure 59 :** Variation de l'activité enzymatique mitochondriale de la glutathion peroxydase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protéine) au niveau mitochondrial chez les escargots témoins et traités.

#### IV.8.4.4. Activité de la catalase (CAT)

Les activités de la catalase présentent une diminution chez les lots traités par BF, HY, BF+HY (**Figure 60**).



**Figure 60 :** Effets de BF, d'HY, HEO et leurs mixtures sur l'activité enzymatique Catalase au niveau mitochondrial chez les escargots témoins et traités.

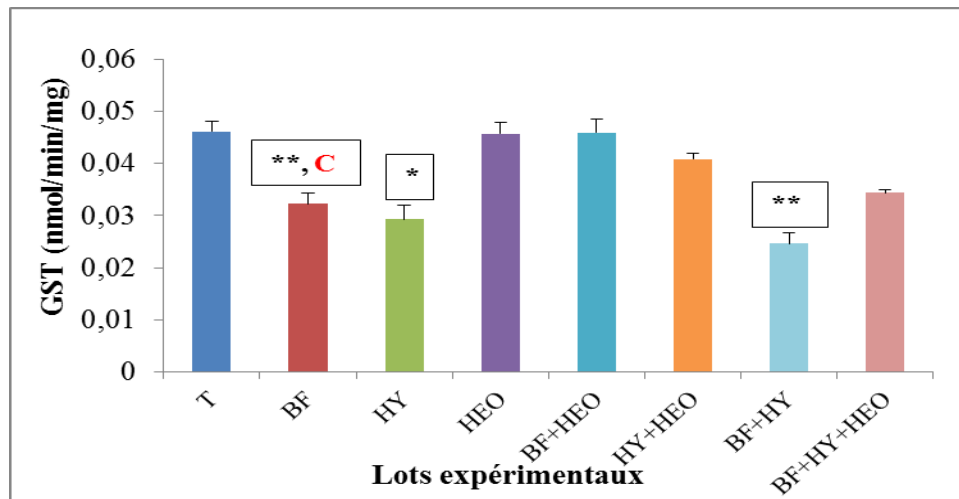
" \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ; **B** : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; **C** : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".

L'analyse de la variance met en évidence une variation significative entre les escargots des lots témoin et ceux des lots traités par l'HY ( $p \leq 0,05$ ), BF ( $p \leq 0,01$ ), BF+HY ( $p \leq 0,01$ ). La combinaison des HEO avec les pesticides provoque une augmentation significative ( $p \leq 0,05$ ) chez le groupe traité par l'HY, et une augmentation hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les groupes traités par BF, BF+HY en comparant par les groupes traités uniquement par BF, HY, BF+HY. En revanche, le traitement protecteur des escargots avec HEO normalise clairement l'activité de cette enzyme, et on ne constate aucune variation significative de leur activité par rapport au témoin.

#### IV.8.4.5. Activité de la glutathion S-transférase (GST)

L'administration des pesticides étudiés pendant 90 jours chez les escargots, induit une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) au niveau des mitochondries d'hépatopancreas par rapport aux escargots témoins. On note une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) de l'activité de la GST chez le lot traité par HY, et hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les escargots injectée par la BF et BF+HY comparant au lot témoin. Ainsi, on observe une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) chez le lot traité par BF, comparant au lot traité par le pesticide associé au l'huile essentielle d'écorce d'orange.

Par ailleurs, on enregistre un rétablissement par une augmentation significative de l'activité de la GST chez les escargots recevant les combinaisons pesticides plus HEO, avec aucune variation dans les valeurs de l'activité de cette enzyme chez ces groupes par rapport au groupe témoin (**Figure 61**).



**Figure 61** : Variation de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) au niveau mitochondrial chez les escargots témoins et traités.

" \*\* : différence hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) ; \* : différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ;  
**C** : différence très hautement significative ( $p \leq 0,001$ )".



## IV.9. Discussion

La respiration cellulaire, la phosphorylation oxydative et la production d'ATP (principale source d'énergie pour la cellule) se produisent principalement dans la mitochondrie (Mcbride *et al.*, 2006). Les agents des stress environnementaux peuvent créer un stress oxydatif en agissant sur une réaction très différente à travers des voies métaboliques variables, telles que celles induites par des enzymes détoxifiantes. Cela peut endommager les mitochondries et leur intégrité dans la cellule mitochondriale (Franco *et al.*, 2009).

### IV.9.1. Effets des deux pesticides et des huiles essentielles d'écorce d'orange sur la respiration, la perméabilité et le gonflement mitochondrial

La chaîne respiratoire mitochondriale est susceptible d'interférer avec certains xénobiotiques au cours de leur métabolisme. Les résultats de cette étude ont montré que la BF, l'HY, et leur mixture provoquaient une inhibition de la chaîne respiratoire. Cette diminution est probablement due à l'inhibition du complexe IV et du complexe V qui a été démontré par Delgado *et al.* (2006). Les ROS pouvaient interagir avec les composants de la chaîne respiratoire spécifiquement sur le site responsable de l'oxydation du substrat du cycle de Krebs, une dépolarisation (diminution du potentiel membranaire) et une perméabilité membranaire conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial (Sbartai *et al.*, 2012). L'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale peut suivre une diminution de la synthèse de l'ATP (Pinot *et al.*, 2000). Ces pores sont des canaux (complexes protéiques) situés au niveau de la membrane mitochondriale qui, lorsqu'ils sont ouverts, libèrent dans le cytosol plusieurs facteurs pro-apoptotiques qui provoquent la mort cellulaire. (Berson, 2005). Selon Fromenty (2010), une hyperproduction d'espèces oxygénées réactives est provoquée par l'atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale.

En effet, la mesure de l'oxygène dissous dans le milieu de la respiration cellulaire est un excellent indicateur du fonctionnement du système respiratoire mitochondrial et un bon outil d'évaluation de la cytotoxicité. Devant l'absence de données concernant l'effet de BF, HY et leurs mixtures sur le métabolisme respiratoire, les travaux concernant cet aspect, ont mis en évidence une inhibition de la respiration cellulaire en présence de différents xénobiotiques par la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale. Parmi ces études, Sbartai *et al.* (2009) ont montré une inhibition de la respiration des paramécies en présence de Bifenazate et Phosphoramidate. D'un autre côté, Chagra *et al.* (2009) a mis en évidence la perturbation de la photophosphorylation oxydative chez des mitochondries isolées de *Solanum tuberosum* traités par le cadmium. Tous ces travaux sont en accord avec nos résultats en effet nous avons

mis en évidence une inhibition du métabolisme respiratoire des escargots. Ces résultats suggèrent la libération de radicaux libres au niveau mitochondrial.

L'autre paramètre aussi intéressant que nous avons jugé utile de mesurer est le gonflement des mitochondries. Le gonflement est la stimulation de la perméabilité membranaire des mitochondries traitées car certains xénobiotiques sont capables d'entraîner une ouverture des pores transitoires de perméabilité mitochondriale (PTPM), tels que les médicaments (**Pessayre et al., 2010**). Les protéines impliquées dans le PTPM peuvent être altérées par la production des ROS par la chaîne respiratoire, ou d'autres sources subcellulaires, et/ou par la production d'un ou de plusieurs métabolites réactifs par l'intermédiaire de cytochromes P450 (**Boulassel, 2014**). Selon **Binukumar et al. (2010)** qui ont remarqué une augmentation significative de l'absorption mitochondriale de  $Ca^{++}$  et les niveaux de ROS après traitement des rats au pesticide. Aussi, comme exemple l'insecticide parathion est un inhibiteur du complexe II, de l'ATP-synthase et du transporteur de phosphate, et il provoque une diminution du contrôle respiratoire et le potentiel de la membrane mitochondriale (**Gomez et al., 2007**). Nos résultats sont en parfait accord avec ces travaux puisque nous avons également mis en évidence un gonflement mitochondrial chez les mitochondries traitées avec le BF, HY et la combinaison BF/HY.

#### **IV.9. 2. Effets des deux pesticides et des HEO sur le système antioxydant mitochondriale**

Les agents toxiques environnementaux peuvent attaquer directement les mitochondries en induisant la génération de ROS, ce qui peut induire davantage l'épuisement des défenses antioxydantes et médier les réactions d'oxydo-réduction en favorisant les dommages mitochondriaux, la génération de ROS et l'épuisement des molécules antioxydantes dans la cellule d'hépatopancréas (**Franco et al., 2009**). Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'effet de deux pesticides (BF, HY) et leur mixture à l'échelle subcellulaire, à travers le suivi de l'évolution de certains biomarqueurs de la toxicité tels que le glutathion (GSH), l'activité GST, l'activité catalase,  $GP_x$  et le taux de malondialdéhyde (MDA) au niveau mitochondriale. À partir d'une fuite d'électrons en amont du complexe IV, la chaîne respiratoire mitochondriale produit en permanence des espèces oxygénées réactives. Ces électrons se combinent avec l'oxygène pour créer des superoxydes et, plus tard, du peroxyde d'hydrogène (**Schmidt et al., 2007**). La préparation mitochondriale hépatiques des escargots traités avec ces pesticide (BF, HY) a démontré une diminution significative du GSH mitochondrial, des niveaux de GST et de l'activité CAT, mais il y a une augmentation de l'activité  $GP_x$ . Ceci est en accord avec ceux obtenus dans des travaux antérieurs sur les

mitochondries cérébrales sur différents pesticides (**Lakroun et al., 2015, Beghoul et al., 2017**). Une diminution des niveaux de GSH mitochondriale peut donc entraîner l'accumulation de ROS dans les mitochondries, conduisant à l'apoptose et à la mort cellulaire éventuelle (**Orrenius et al., 2007**). Ainsi, nous pouvons expliquer la diminution de GSH chez les escargots traités par la BF, l'HY, et leur combinaison par l'inhibition du transport de GSH dans les mitochondries du cytosol, qui est dépendant de l'énergie. Aussi, les niveaux de GSH diminuent fortement, donc l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'accumule, ce qui entraîne des dommages mitochondriaux importants (**Martín et al., 2000**). **Chandran et al. (2005)** ont observé une augmentation significative du taux du (MDA) chez le gastéropode *Achatina fulica* après exposition au Cd et Zn. L'augmentation de la peroxydation lipidique, représentée par des niveaux plus élevés de MDA, pourrait de loin être due à la diminution de l'activité de GST observée dans notre étude (**Zaidi et Banu, 2004**). De plus, cette baisse reflète l'insuffisance des niveaux de GSH (**Garg et al., 2009**).

L'augmentation de GPX dans notre étude a pu être produite pour surmonter la production de peroxyde d'hydrogène due à la peroxydation lipidique et réduire leur neutralisation par CAT défectueuse (**Samanta et Chainy, 1997**). La diminution de l'activité de la catalase peut refléter l'incapacité des mitochondries à éliminer l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite par l'activation du pesticide. De même, cela peut être dû à l'inactivation de l'enzyme causée par une production supplémentaire de ROS dans les mitochondries (**Latchoumycandane et Mathur 2002**). Plusieurs stress cellulaires activent la voie intrinsèque qui perturbe la structure et la fonction des mitochondries (**Assefa et al., 2005**). De plus, une inhibition des taux d'ATP après deux heures d'exposition à un pesticide indique une perturbation rapide des activités mitochondriales (**Vasseur et al., 1980**).

#### **IV.9.3. Effets des HEO sur la respiration, la perméabilité, le gonflement et le statut redox mitochondrial**

L'administration par injection de l'huile essentielle d'écorce d'orange *Thomson naval* associée ou non à BF ou HY chez les escargots *Helix aspersa* mixtures pendant 90 jours, a pu maintenir l'intégrité et le fonctionnement mitochondrial grâce à l'effet antioxydant de l'HEO contre les ROS, qui peuvent interagir avec les sites responsables de l'oxydation provoquant l'apoptose et à l'effet hépatoprotecteur de l'HEO. Et en raison du manque d'études sur cette HEO et de son effet sur les mitochondries, nous avons comparé cette étude avec d'autres approches, telles que les études de **Kebieche et al. (2009)**, **Ashar et Muthu (2012)** et **Lakroun et al. (2015)**. Ces études montrent que la quarcétine est une excellente chélatrice des

ROS, qui favorise la restauration de l'activité de l'enzyme perdue lorsque les animaux ont été exposés aux PYR.

#### **IV.10. Conclusion**

À la fin de ce chapitre, nous pouvons conclure que l'exposition sub-chronique à la BF et l'HY, seules ou en mélange, produit un effet toxique au niveau mitochondrial hépatique chez les escargots *Helix aspersa*. Les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques mitochondriaux ont été altérés par des anomalies dans les lots traités par rapport aux escargots témoins ; une telle augmentation importante dans le stress oxydatif et dans le gonflement mitochondrial, signifie la perte du fonctionnement et de l'intégrité structurale des cellules et des mitochondries hépatiques. Cette altération, peut être facilement conduite vers une mort cellulaire. De plus, l'administration d' HEO associée aux pesticides a montré un potentiel puissant contre les ROS et la peroxydation lipidique qui a permis aux mitochondries hépatiques de maintenir l'homéostasie redox et l'intégrité de leurs membranes.



# Conclusion générale et perspectives

perspectives

## Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette étude consistait à étudier la toxicité induite par deux pesticides bifenthrine, hymexazole et leur mixture au niveau cytosolique hépatique et mitochondrial sur un modèle biologique d'écosystème terrestre considéré également comme bioindicateur des pesticides; à savoir l'escargot *Helix aspersa*, et à évaluer l'effet protecteur de l'huile essentielle d'écorce d'orange *Thomson naval* (*Citrus sinensis*) contre cette toxicité.

La bifenthrine et l'hymexazole influencent tous les paramètres étudiés reflétant son habilité à créer un stress oxydatif. En effet, ils causent des altérations comportementales accompagnées d'une réduction des paramètres physiologiques tels que le poids frais moyen des escargots, de l'hépatopancréas, de la coquille, le diamètre et la longueur de la coquille. Ils influencent également le système de détoxification par le biais d'une augmentation du taux des protéines, des lipides et des glucides, une modification de l'équilibre pro et anti-oxydant se manifestant notamment par une augmentation de la peroxydation lipidique (MDA), GPx et de l'activité du CAT avec une diminution de la quantité de GSH, GST. En outre, une diminution de l'activité de l'enzyme acétylcholinestérase a été observée.

Le traitement des mitochondries isolées à partir d'hépatopancréas chez les escargots *Helix aspersa* par ces pesticides a démontré une diminution de la respiration mitochondriale (consommation d'O<sub>2</sub>), une augmentation de la perméabilité avec un gonflement mitochondrial. De plus à ce niveau d'organisation cellulaire, nous avons également mis en évidence une perturbation de l'activité CAT, GST et GPX des enzymes connues pour leur rôle dans le piégeage des ROS.

Parallèlement, le traitement des escargots *Helix asperca* par les huiles essentielles d'écorce d'orange *Thomson naval* en présence des deux pesticides a ramené tous les marqueurs biochimiques et oxydatifs à des niveaux proches de ceux obtenus chez les escargots témoins. Ceci souligne l'effet protecteur des huiles essentielles des écorces d'orange *Thomson naval* contre l'intoxication par ces pesticides en raison de leurs propriétés antioxydantes prouvée dans la littérature.

Les résultats de la présente étude permettent de conclure que les huiles essentielles d'écorce d'orange *Thomson naval* pourraient s'avérer très bénéfique lors d'une intoxication par la bifenthrine, l'hymexazole. Ils peuvent être proposés alors dans le schéma thérapeutique des personnes intoxiqués par les pesticides sans risque d'effet secondaires, et peut être utilisée comme un antidote contre cette toxicité.

Afin d'approfondir les résultats obtenus dans la présente étude, il nous semble approprié de conduire des recherches futures axées notamment sur :

- ✓ Définir le ou les composants actifs de l'huile essentielle du *Thomson naval* originaires des effets observés.
- ✓ Approfondir l'étude par une étude histologique visant à localiser les dégâts tissulaires engendrés par les pesticides.
- ✓ Approfondir les essais au niveau de l'hémolymphe et des autres organes des escargots *Helix aspersa*.



# Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE



## Référence bibliographique

### A

- **Abd-Ella A.** 2011. Etude du mode d'action neurotoxique d'un repulsif, le deet utilisé seul et en association avec un insecticide sur l'acetylcholinesterase des dum neurones d'un insecte la Spécialité. Thèse de doctorat. université d'Angers, France. 179p.
- **Abdolah M.** 2011. Protective role of L-ascorbic acid in oxidative stress induced by repeated oral administration of bifenthrin in wistar rats. *Journal of Animal Research.* 6(1). 39.
- **Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaiee A.** 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* 10: RA141-RA147.
- **ACTA.** 1989. Association de coordination. Technique agricole. Index phytosanitaire. Paris. *Chimica Sinica*, 47 (10), pp 935-940.
- **Adam V., Petrlovà J., Potesil D., Lubal P., Zehnàlek J., Sures B., Kizek R.** 2005. New electrochemical biosensor to determine platinum cytostatic to DNA structure. *Chemistry Listy.* 99: 353-393.
- **Adamowicz A., Bolaczek M.** 2003. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae). *Zoological poloniae* 48. 93-101.
- **Aebi H.** 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology.* 105: 121–126.
- **Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire.** 2007. Rapport d'évaluation du l'hymexazol - ERC2007-01. Santé Canada. 105pp.
- **Agrawal A., Sharma B.** 2010. Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems: Review Article. *Int. J. Biol. Med. Res.* 1(3): 90 - 104.
- **Agro-service.** 2004. L'élevage d'escargot. Etude monographique. Rapport final. Tunis. p166.
- **Ahmed O. M., Fahim H. I., Ahmed H. Y., Al-Muzafar H. M., Ahmed R. R., Amin K. A., & Abdelazeem W. H.** 2019. The preventive effects and the mechanisms of action of navel orange peel hydroethanolic extract, naringin, and naringenin in N-acetyl-p-aminophenol-induced liver injury in Wistar rats. *Oxidative medicine and cellular longevity.* p 145.
- **Aït-Hamlet S., Djekoun M., Bensoltane S., Berrebbah H.** 2019. effets du thiamethoxame et de la tefluthrine sur les biomarqueurs physiologiques. de l'escargot terrestre *helix aspersa*. *Revue Agrobiologia* (2019) 9(2): 1491-1498. p 1492.
- **Ait-Hamlet S., Djekoun M., Smati M., Semassel A., Djekoun B. S., Berrebbah H.** 2014. Histopathological effects of neonicotinoid insecticide in the hepatopancreas of terrestrial gastropod *Helix aspersa*. *Fresenius Environ. Bul.*, 23 (11). 3041-3047.
- **Akah PA., Okpi O., Okoli CO.** 2007. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial activities of *Azelaia africana*. *Niger J. Nat. Prod. Med.*; 11:48-52.
- **Akande M.G., Aliu Y.O., Ambali S.F., Ayo J.O.** 2014. Co-treatment of chlorpyrifos and lead induce serum lipid disorders in rats: Alleviation by taurine. *Toxicol. Ind. Health.*pp: 231.
- **Akrout L.**2022. Inventaire qualitatif et quantitatif des invertébrés inféodés à la culture d'oranger *Citrus sinensis* dans la région de Tamda. universite mouloud mammeri de tizi-ouzou. pp : 45.p3

- **Al-Kadissi S.** 2012. Comparaison De La Réponse (En Termes D'accumulation, D'impacts Cellulaires Et Génétiques) De L'écrevisse *Procambarus Clarkii* Après Exposition A Un Polluant Métallique (Cadmium) Et Un Polluant Radiologique. Thèse De Doctorat. Université Brdeaux.p 238, p 233.
- **ALAMY.** 2017. Molécule insecticide bifenthrine (pyréthrinéoïde). Formule topologique.banque de photos. images 360° panoramiques.
- **Al-Awthani Y.S., Al-Douis M.A., El-Sokkary G.H. and Aqlan E.M.** 2012. Dimethoate-induced Oxidative Stress and Morphological Changes in the Liver of Guinea Pig and the Protective Effect of Vitamin C and E. *Asian Journal of Biological Sciences.* 5(1):9-19.
- **Ali h., DEHRI A.**2021. Étude des effets physio-toxicologiques des pesticides à l'égard d'une espèce non visée *Helix aspersa*.Memoire master. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy B.B.A.pp41.
- **Almasiova V., Holovska K., Tarabova L., Cigankova V., Lukacinova A., Nistiari F.** 2012. Structural and ultrastructural study of the rabbit testes exposed to carbamate insecticide. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering.* 47 :1319-1328.
- **Al-Mutairi D. A., Craik J.D., Batinic-Haberle I., Benov L T.** 2007. Induction of oxidative cell damage by photo - treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. *Free radical research.* 41, 89-96.
- **Amiard-Triquet C., Altmann S., Amiard J. C., Ballan-Dufrançais C., Baumard P., Budzinski H., Pavillon J. F.** 1998. Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. In *Oceans, Rivers and Lakes: Energy and Substance Transfers at Interfaces: Proceedings of the Third International Joint Conference on Limnology and Oceanography held in Nantes, France. October 1996* (pp. 259-279).
- **Amiard-Triquet C., Cossu-Leguille C., Mouneyrac C.** 2008. Les biomarqueurs de défense, la tolérance et ses conséquences écologiques. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques.* 55-94.
- **Amutha P., Sangeetha G., Mabalasingam S.** 2002. Dairy effluent induced alterations in the protein, carbohydrate and lipid metabolism of freshwater teleost fish. *Oreochromismossambicus.* *Poll. Res.* 21: 35-51.
- **Anadon A., martinez I.M. Diaz M.,** effet de la deltaméthrine sur la pharmacocinétique de l'antipyrine et le métabolisme chez le rat. *archives de toxicologie.*65.156-159pp.
- **Anadon A., Martinez L.M., Fernandez G. M.**1996.Toxicocinétique de la deltaméthrine et de son métabolite 4'-ho chez le rat. *Toxicologie et pharmacologie appliquée.*141.8-16pp.
- **Andersen H R., Vinggaard A M., Rasmussen T. H.** 2002. Effects of currently used pesticide in assays for estrogenity androgenicity, *and aromatase activity in vitro.**Toxicol.Appl. Pharmacol.* 179:1-12 pp.
- **Ando M., Nakamura T., Nakagawa M.**1974.Metabolism of Hymexazol. 3-Hydroxy-5-methylisoxazole. in the Rats.*Agr. Bioi. Chem.* 38:12. 2451 – 2456pp.

- **Andrew F.** 1999. Environmental fate of bifenthrin. Environmental Monitoring and Pest Management Branch. 830 K St. Sacramento, CA 95814.
- **ANSES.**2011. de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation. de l'environnement et du travail relatif à la demande de changement de classification de la préparation phytopharmaceutique TACHIGAREN dossier n° 2010-1531 – TACHIGAREN AMM n° 8100345. Maisons-Alfort, le 16 février 2011.pp3.p1
- **Aprotosoie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U.** 2010.The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*.58:46-54pp.
- **Arora A., Sairam R., Srivastava G.** 2002. Oxidative stress and anioxidative system in plantes –Cur. Sci. 82 (10): 122-144.
- **Arrigo A.P.** 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biology & Medicine*. 27: 936-944.
- **Ashar W. M. P., Muthu M. H. S. (2012).** Fenvalerate induced hepatotoxicity and its amelioration by quercetin. International Journal of PharmTech Research, 4(4), 1391-1400.
- **Assefa Z., Van Laethem. A., Garmyn M., Agostinis P. 2005.** Ultraviolet radiationinduced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochim Biophys Acta*. 1755:90–106.
- **ATAILIA A.**2009. Effet des poussières métalliques d'origine industrielles sur un organisme animal bio indicateur/bio accumulateur de pollution.. Thèse de doctorat. Annaba. Pp:39-45
- **Attia L., Tine S., Tine-Djebbar F., Soltani N.** 2021. Potential hazards of an inorganic fertilizer (Weatfert) for the brown garden snail (*Eobania vermiculata* Müller, 1774): Growth, Histological and Biochemical changes and biomarkers. *Applied Ecology and Environmental Research*. 19(3):1719-1734.
- **Attia L.** 2022. Impact des pratiques agricoles sur les organismes non visés, cas d'un gastéropode bioindicateur de pollution, *Helix vermiculata* (Müller, 1774). Thèse de Doctorat en Physiologie Animale. Université de Tébessa, 100 p.
- **Aurousseau B.** 2002. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux : Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits.*INRA Prod.Anim*. 15(1), p. 67-82. Badji Mokhtar, Annaba. 74 p.
- **Aust O., Sies H., Stahl W., Polidori M.C.** 2001. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *Journal of Chromatography A*, 936 (1-2), 83-93.

## B

- **Badaoui Ch., Cherouat H., Deif A.**2022. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux variétés d'agrumes. *Toxicologie*. Université des Frères Mentouri Constantine 1.pp : 48.p 3
- **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar. M.** 2008. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*.46: 446-475.
- **Bakkouche Z., Said A.** 2021. Aspects biochimique et histologique de la toxicité des pyréthronoïdes de type 2. Université laarbi tebessi tebessa. P 44.

- **Banaee M., Sureda A., Mirvaghefi A. R., Ahmadi K.** 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide biochemistry and physiology*. 99(1), 1-6.
- **Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S.T., Chakraborty A.K.** 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid-peroxidation and free-radical Scavengers. *Toxicol. Lett.* 107: 33–47.
- **Barker G.M.** 2001. *The Biology of Terrestrial Molluscs*. CAB International. Oxon. Wallingford. UK. 567 pages
- **Barnoud D., Cano N., Schneider S.M., Vasson M.P., Hasselmann M., Leverve X.** 2007. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer, troisième édition. Paris : 241-242.
- **Barreca D., Gattuso G., Bellocco E., Calderaro A., Trombetta D., Smeriglio A., Nabavi S. M.** 2017. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *BioFactors*, 43(4), 495–506.
- **Basdevant J.L., Rich J., Spiro M.** 2006. *Énergie nucléaire*. Editions de l'école polytechnique, Palaiseau. 175176.
- **Bates M.L.**, 2004. Hymexazol: evaluation of the boiling temperatures (EC directive 92/69/EEC method A2, OECD guideline 103) Covance Laboratories Limited. Report No. 730/104-D2149
- **Baturo W., Lagadic L., Caquet T.**, 1995. Growth, fecundity and glycogen utilization in *Lymnaea palustris* (Mollusca: Gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14: 503-511.
- **Beaudeau J.L., Peynet. J., Bonnefont-Rousselot D., Therond P., Delattre J., Legrand. A.** 2006. Stress oxydant Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote Implication dans la transcription et la régulation des gènes. *Ann. Pharm. Fr.* 64 : 373-381pp.
- **Beaumont A., Cassier P.** 1998. *Travaux pratiques de biologie animale. Zoologie Embryologie Histologie*. Dunod. Paris. 502p.
- **Beausoleil C., Bonnard N., Falcy M., Jargot D.** 2009. Bifenthrine. Fiche toxicologique 274 – Paris– INRS édition. aturereview. Équiterre. Montréal, Canada. 68pp.
- **Bebianno M.J., Company R., Serafim A., Cosson R.P., Fiala-Medoni A.** 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathy-modiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol*, 75, p.354–373.
- **Bédard J.** 1998. *Familles en détresse sociale, Repères d'action*, Tome I et Tome II, Québec. Éditions Anne Sigier. vol. 10, p. 207
- **Beghoul A., Kebieche M., Gasmi S., Chouit Z., Amieur C., Lahouel A Soulimani R.** 2017. Impairment of mitochondrial integrity and redox status in brain regions during a low-dose long-term exposition of rats to pyrethrinoids: the preventive effect of quercetin. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 19714-19722.
- **Belhaouari B.** 2012. *Etude écotoxicologique chez un gastéropode marin Osilinus tubinatus (Born, 1780) dans le littoral algérien occidental*. Thèse de Doctorat de l'université d'Oran. p120.

- **Belhaouchet N., Djebbar M.R., Meksem L., Grara N., Zeriri I., Berrebbah H.** 2012. Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide : The Spinosad on an alternat model : *Helix aspersa*. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(8): 4199-4206.
- **Benaicha B.** 2021 Impact cellulaire de Lambda-cyhalothrine chez les rats Wistar et le rôle cytoprotecteur d'une plante médicinale.these doctorat. Université tébessa.p83.
- **Benbouch F et Bendiaf N.**2022. Evaluation de la toxicité d'une mixture de pesticide a l'égard d'un espèce non visé helix asperca.pp :54.
- **Benbouzid H.** 2012. Evaluation et etude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliées. These de doctorat de l'université d'Annaba. 87p.
- **Bernadet M.** 1983.*Phyto-aromathérapie pratique, usage thérapeutique des plantes médicinales ethuiles essentielles*, Eds. Dangles, France.30 : 203-384 pp.
- **Berset C.** 2006. Antioxydants phénoliques structure, propriétés, sources végétales. Cheynier (Eds). Les polyphénols en agro-alimentaire. Paris, France : Lavoisier. pp, 265-294.
- **Berson A., 2005.** Hépatotoxicité médicamenteuse par atteinte mitochondriale. Minirevue, Hépto-Gastro 12, 191-198.
- **Besombas C.**2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle.10 : 208- 289 pp.
- **Bigot. A.,** 2009. Identification et étude de l'expression de gènes de détoxification chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea* : Approches en laboratoire et en milieu naturel. Thèse de Doctorat de l'université Paul Verlaine (METZ).138 pages.
- **Bingham. G., Gunning R.V., Delogu. G., Borzatta. V., Field L.M., Moores G.D.** 2008. Temporal synergism can enhance carbamate and neonicotinoid insecticidal activity against resistant crop pests. *Pest Management Science*. 64: 81-85.
- **Binukumar. B.K., Bal A., Kandimalla. R., Sunkaria. A., Gill K.D.** 2010. Mitochondrial energy metabolism impairment and liver dysfunction following chronic exposure to dichlorvos. *Toxicology*. 270(2-3):77-84.
- **Birben. E., Sahiner U.M., Sackesen. C., Erzurum. S., Kalayci. O.** 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J*. 5(1): 9–19.
- **Bitri L., Dhaouadi N., Ouertani L., Maurel D., Ben Saad M., 2007.** Toxicité de l'hexachlorobenzène chez *Meriones unguiculatus* : effets sur la thyroïde et le foie. *C. R. Biologies*. 330 : 410–418.
- **Blanco Tirado. C., Stashenko. E. E., Combariza. M. Y., & Martinez. J. R.** 1995. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 697, 501–513
- **Bluzat R., Seuge. J.** 1979. Etude de la toxicité chronique de deux insecticides (Carbaryl et Lindane) à la génération F1 de *Lymnea stagnalis* L. (Mollusque Gastéropode pulmoné). 1. Croissance des coquilles. *Hydrobiol*. 65 (3) : 245-255.

- **Bonnefont-Rousselot D., Théron P., Delattre J.** 2003. Radicaux libres et antioxydants. En : Delattre J., Durand G., Jardillier J-C. Biochimie pathologique. Flammarion, Paris. 317p.
- **Bonnet J.G., Aupinel P., Vrillon J. L.** 1990. L'escargot *Helix aspersa*, biologie-élevage ; Institut National de l'Agronomie, Paris.20. pp:102-124.
- **Bonvallot N., Dor F.** 2004. Insecticides organochlorés aux Antilles : identification des dangers et valeurs toxicologiques de référence (VTR). Institut de Veille Sanitaire. 50p.
- **Bouaricha H.** 2013. Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium* sp.). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 55p.
- **Boubali Z.** 2017. Biomarqueurs du stress oxydatif. Thèse de Doctorat. Université Mohamed V- Rabat. 134p.
- **Boucenna M., Berrebbah H., Atailia A., Grara N., Djebar M.R., Global V.** 2015. Effects of metal dust on functional markers and histology of gland digestive and kidney of the land snails (*Helix aspersa*) in the North east of Algeria. *Global Veterinaria*, 14(2), 189-198.
- **Bouchard M., Carrier G., Brunet R.C., Bonvalot Y., Gosselin N.H.** 2005. Determination of biological reference values for chlorpyrifos metabolites in human urine using a toxicokinetic approach. *J Occup Environ Hyg* 2, 155–168.
- **Bouhali H.** 2015. Caractérisation des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et étude de leur activité antioxydante : étude comparative entre l'huile essentielle des écorces sèches et fraîches. diplôme de Magister. Université A.MIRA-BEJAI. pp51.p15. p86.p 31
- **Boulassel A.** 2014. Evaluation de la toxicité de deux médicaments : le Paracétamol et l'Ibuprofène, sur un modèle cellulaire : *Paramecium tetraurelia*. Essai à l'échelle subcellulaire. Thèse de Doctorat, Université d'Annaba. 134p.
- **Bouras N.** 2009. Etude de la biodégradabilité d'un insecticide " la bifenthrine " par des souche bactérienne. These magister en Génie de l'environnement. Ministère de l'enseignement supérieur de la recherche scientifique pp 59. P23
- **Bourbia S.** 2013. Évaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateurs de la pollution des sols *Helix aspersa*. Mémoire de doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba. 58 pages p71.
- **Bourbia-Ait-Hamlet S.** 2012. Évaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. P : 177.
- **Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F.** 2009. A New process for extraction of essential oil from citrus peel: Microwave Hydrodiffusion and Gravity. *Journal of Food Engineering*, 90: 409- 413.
- **Bouvier J.C., Ricci B., Agerberg. J., Lavigne C.** 2011. Apple orchard pest control strategies affect bird communities in southeastern France. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30 (1): 212
- **Boyd A.M., B. Noller P.** 2002. White. Environmental effects of currently used termiticides

- **Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
  - **Brooks A. W., White K. N.** 1995. The localization of aluminum in the digestive gland of the terrestrial snail *Helix aspersa*.P226.
  - **Bruneton J.** 1999. Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation. 3éme Edition Lavoisier. Paris. 1120
  - **Bruneton J.** 2001. Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux. Ed. TEC & DOC Lavoisier. Pp : 461.
  - **Bruneton J.**2009.Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales. 3eme éd. Paris : Edition médicales internationales. Edition Tec & Doc Lavoisier. p : 1120.
  - **Burt S.A.** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potentiel applications in foods. *International Journal of Food Microbiolog.* 94 (3). 22-25.
  - **Burton R.F., Shirley.M., Morrwn And Douglas.A.M.** 1987. Some effects of injected magnesium chloride in the snail, helix asperm: narcosis. magnesium distribution and responses to infused potassium. *Comp.Biochem. Physiol.* Vol. 86A, No. I, Pp. 113.
- Buttemer W. A., Abele. D. & Costantini. D.** 2010 Cadmium in the environment: Sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. From bivalves to birds: oxidative stress and ongevity. *Functional Ecology*.P36.

## C

- **Cai H., Harrison DG.** 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87(10): 840-844.
- **Cakmak I., Horst W.J.** 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum*83, 463-468.
- **Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charnay M.P., Coquet Y.** 2005. Les pesticides dans le sol, Conséquence agronomique et environnementales. ed. France Agricole. France, 637 pP :22,23
- **Can G., Youxia S., Zhiqiang Y., Linyan Z., Wei L., Yan L., Zhigang O., Balian Z., Jun Z.** 2020. Chemical composition, antioxidant, antibacterial, and tyrosinase inhibition activity of extracts from Newhall navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) peel. *Society of Chemical Industry. J Sci Food Agric* 2020; 100: 2664–2674.
- **Carpy S.A., Kobel W., Doe J.** 2000. Health risk of pesticide: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*.3:1:1-25pp.
- **Carrière A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M.C., Pénicaud L., Casteilla L.** 2006. Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. 22 (1): 47-53.
- **Casida J., Gammon D., Glickman A.**1983. mécanismes d'action sélective d'insecticides pyréthroïdes. *Revue annuelle de pharmacologie ainsi que de toxicologie et de toxicologie.* 23.413-438pp.
- **Cazin X.** 2014. Schéma de l'anatomie de l'escargot. Dans *Biologie et zootechnie du Petit-gris Helix aspersa Müller*.p44 .

- **Caziot E.** 1911. Étude révisionnelle des Mollusques quaternaires des brèches de Toga à Bastia (Corse). Bull. Soc. géol. Fr. 4e sér. 11 : 239-248.
- **CEC 2003.** A european environment and health strategy. *Commission of the European community*. Brussels, 11.6.338 final.pp34.
- **Celano R., Campone L., Pagano I., Carabetta S., Di Sanzo R., Rastrelli L., Russo M.** 2019. Characterisation of nutraceutical compounds from different parts of particular species of *Citrus sinensis* ‘Ovale Calabrese’ by UHPLC-UV-ESI-HRMS. *Natural Product Research*, 33(2). 244–251.
- **Chagra A., Djebbar M. R., Rouabhi R., Berrebbah H.** 2009. Cadmium Induced Changes in Metabolic Function of Mitochondrial Isolated from Potato Tissue (*Solanum tuberosum* L.). *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 5 (1), 35-39.
- **Chandran K., Sullivan N. J., Felbor U., Whelan S. P., & Cunningham J. M.** 2005. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science*, 308(5728), 1643-1645.
- **Chang J., Wang Y., Wang H et al.** 2016. Bioaccumulation and enantioselectivity of type I and type II pyrethroid pesticides in earthworm. *Chemosphere* 144:1351–1357.
- **Chao Y., Hui Ch., Hongli Ch., Balian Z., Xuzhong L., Jiong Ch.** 2017. Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oil from Gannan Navel Orange Peel ID National Navel Orange Engineering Research Center. College of Life and Environmental Sciences. Gannan Normal University. Ganzhou 34100. China, 22, 1391; 10 Chapter 7, pp : 183-262.
- **Charrier M., Fonty G., Gaillard-Martinie B., Ainouche K., Andant G.** 2006. Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biological Research*. 39 :4. pp: 669-681.
- **Chaudhary A K., Reddy G R., Blair I A., Marnett L J.** 1996. Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: *Carcinogenesis*. 17:1167-1170pp.
- **Chavan V.U., Melinkeri R.R.** 2013. Study of protein carbonyl group, nitric oxide and MDA (index of lipid peroxidation) as biomarkers of oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Natl J Community Med.* 4(2):294-9.
- **Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G., Visinoni F.** 2006. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta.* 555: 157–160.
- **Chevalier H.** 1992. L'élevage des escargots. 2ème édition. Editions du point vétérinaire. Maison-Alfort.
- **Chunli X., Lidong C., Chong C., Huiping C., Hanghang Z., Yuanbo L., Qiliang H.** 2032. Fungicide it self as a trigger to facilely construct Hymexazol-Encapsulated polysaccharide supramolecular hydrogels with controllable rheological properties and reduced environmental risks. Elsevier
- **CLH** 2017. CLH REPORT FOR HYMEXAZOL. Proposal for Harmonised Classification and Labelling. Based on Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation). Annex VI.Part 2.pp 156.p



- **Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M.** 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environment, Toxicol. & Chem.* 20, 1951-1957.
- **Connell D. W.** 1997. Basic concepts of environmental chemistry. Boca Raton. Lewis Publishers. New York. P: 138.
- **Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A., Vasseur P.** 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 38: 122-131
- **Cotonat J.** 1996. La toxicologie. Presses universitaires de France, Paris. 127p.
- **Couteux A., Salaün C.** 2009. Index phytosanitaire ACTA 2009. 45ème édition. Association de Coordination Technique Agricole. MAME
- **Cruickshank P. A., Harnish W. N., Nethery A. A., Crosby G. A.** 1983. Synthesis and biological activity of a new group of broad-spectrum pyrethroid insecticides. In *Pesticide Chemistry: Human Welfare and Environment* .pp:101-106.
- **Cyril D.** 2011. Penguin acclimatization to polar environmental constraints: a transcriptomic and integrative study in King (*Aptenodytes patagonicus*) and Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*). Diplôme de doctorat. pp 241.  
d'une espèce non visée *Helix aspersa*. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A. Toxicologie. pp :30.

## D

- **Dabelstein W., Reglitzky A., Schutze A., Reders k.** 2007. "Automotive Fuels" Ullmann's Encyclopedia of industrial Chemistry. Doi 10.1002/14356007.a 16-71900pub 2. ISBN978-3-527-30673-2
- **Daguzan J.** 1983. Principales caractéristiques biologiques et écophysiologiques de l'escargot. In: Daguzan J. (Ed). L'escargot et l'Héliciculture. Informations techniques des services vétérinaires. Paris. p : 207.
- **Daguzan J., Bonnet J.C., Perrin Y., Perrin E., Rouet H.** Contribution à l'élevage de l'escargot Petit-Gris en bâtiment et en conditions thermohygro-métriques contrôlées. *Annales de zootechnie. INRA/EDP Sciences.* 1981. 30 (2). pp : 249-272.
- **Danièle D.** 2019. UMR BIOGER INRA Grignon; Anne-Sophie Walker, UMR BIOGER INRA Grignon ; Marie-France Corio-Costet, UMR SAVE Bordeaux ; Benoit Barrès. ANSES CASPER Lyon. Fongicides agricoles: Modes d'action, mécanismes de résistance et exemples par filière. colloque résistance aux pesticides 14 et 15 février 2019 à montréal.
- **Dar-Muneer A., Rajinder R., Arshad-Hussain M., Pawan K.V., Nrip K. P., Mudasir S.** 2016. Protective Role of L-ascorbic Acid in Oxidative Stress Induced by Repeated Oral Administration of Bifenthrin in Wistar Rats. *Journal of Animal Research.* v.6 n.1. p : 39-42.
- **Dar M. A., Khan A. M., Raina R., Verma P. K., Sultana M.** 2013. Effect of repeated oral administration of bifenthrin on lipid peroxidation and anti-oxidant parameters in Wistar rats. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 91, 125-128.

- **Dar M. A., raina R., pankaj N. K., sultana M., kumar P.** 2012. Sub acute dermal toxicity of bifenthrin with special reference to haemato-biochemical changes in rat. *Journal of veterinary pharmacology and toxicology/december*. 11(1-2), 62-64.
- **Davies J. H.** 1990. In *The Pyrethroid Insecticides*; Leahey. J. P., Ed.; Taylor &
- **Davies K. J. A.** 2000 Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life* 50, 279-289.
- **De Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J., Lekeux P.** 2005. Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. 149: 1-9.
- **Decourtye A., Devillers J., Cluzeau S.**2004.Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions.*Ecotoxicology. and Environmental.Safety*.57:3: 410-419pp.
- **Deguine J. P., Russell D., Ferron P.** 2008. **Protection** des cultures: de l'agrochimie à l'agroécologie. *Protection des cultures*, 1-192.
- **Deivanayagam C., Asokan S., Rajasekar S.** 2014. The Study of Lipid Peroxidation, Liver Enzymes and Antioxidantstatus Inlufenuron Treated Mice. *Mus Musculus species. ChemTech Res.* 6: 5321-5328.
- **Del Rio J.A., Fuster M. D., Gomez P., Porrás I., Garcia-Lidon A.,Ortuno A.** 2004. *Citrus limon*: a source of flavonoid of pharmaceutical interest. *Food chem.*84:457-461pp.
- **Delattre J., Beaudeau J.L., Bonnefont-Rousselot D.** 2005. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales. Paris. 405p.
- **Delgado E.H.B., Dal-Pizzol F., Streck E.L., Quevedo J.L.** 2006. Mitochondrial Respiratory Dysfunction and Oxidative Stress after Chronic Malathion Exposure. *Neurochem Res.* 31:1021–1025.
- **DHM.** 2023. liste des pesticides controlées par le ministere de la sante-février 2023. Direction de l'Hygiène du Milieu et de la Protection de l'Environnement/Ministère de la Santé. PP 37. P16.
- **Djatita O.**2019. Évaluation des effets de l'herbicide Cossack(od) sur les paramètres physiologiques de l'escargot « *Helix aspersa* ». *Toxicologie. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A.* pp 53.p9
- **Djeffal A.**2014. Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate « méthomyl » chez le rat Wistar : Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C. Thèse de doctorat.Université de Annaba.
- **Dorothee B.** 2011. L'impact des pesticides sur la santé humaine. Sciences pharmaceutiques. UNIVERSITÉ Henri Poincaré NANCY. pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. hal-01739150. pp 164 P 5
- **Douris P.C., Elokda A.S., Handrakis J.P., Principal S., Rondo.E., Bovell. J., Coughlin W.P., Mastroianni C.N., Wong M.J., Zimmerman T.** 2009. Martial art training enhances the glutathione antioxidant system in middleaged adults. *J. Strength Cond. Res.* 23(5): 1518-23.
- **Dröge W.** 2002 Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95

- **Druart C.** 2011. Effets des pesticides de la vigne sur le cycle biologique de l'escargot dans divers contextes d'exposition. P: 326.
- **Duarte T.L., Jones G.D.D.** 2007. Vitamin C modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 43: 1165-1175.
- **Duchateau G., Florkin.** 1959. For trehalosemie of insects and *its* signification. *Arch. Insect. Physiol. Biochem.* 67, 306-314.
- **Dugo P., Mondello L., Lamonica G., Dugo. G** 1997. Characterization of cold-pressed key and Persian lime oils by Gas chromatography, Gas Chromatography/Mass spectroscopy, high performance liquid chromatography, and physicochemical indices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(9), 3608-3616.
- **Dupont F., Guignard J.L.** 2007. Botanique, Systématique moléculaire. Ed. Masson. p :189.
- **Dutta S., Ganguly B. N.** 2012. Characterization of ZnO nanoparticles grown in presence of Folic acid template. *Journal of nanobiotechnology*. 10(1). 1-10.
- **Duval M.** 2009. L'histoire des phytosanitaires de l'origine à 2030. Santé sécurité au travail. P64.

## E

- **EFSA.** 2010. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance hymexazol. EFSA Scientific Report. EFSA Journal 2010 8(8): 1653
- **EFSA.** 2010.a Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance hymexazol.p32.
- **EFSA.** 2009. Guidance of EFSA; Risk Assessment for Birds and Mammals on request from EFSA. EFSA Journal 2009; 7(12): 1438
- **EFSA.** 2011. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bifenthrin. EFSA Journal. 9(5):2159. pp: 101
- **El-Deeb F. A., Marie M. A. S., Hasheesh W. S., Hussein R. M., Sayed S. S.** 2017. Biomarkers of oxidative stress in Biomphalaria alexandrina snails for assessing the effects of certain inorganic fertilisers. *Molluscan Research*. 37(4): 289-294.
- **El-Gendy K.S., Radwan M.A., Gad A.F.** 2009. In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, Theba pisana exposed to copper-based pesticides. *Chemosphere*. 77(3): 339-344.
- **Ellman G.L., Courtney K.D., Andres. V., Featherstone R.M.** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholine esterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7(88).
- **El-Wakil H.B., Radwan M.A.** 1991. Biochemical studies on the terrestrial snail *Eobania vermiculata* (Müller) and *Thebapisana* ((Müller) treated with some pesticides. *Journal of Environmental Science Health*. B34: 47-60.
- **Erukainure O. L., Ajiboye J. A., Davis F. F., Obabire K., & Muhammad A.** 2012. Effect of orange (*Citrus sinensis*) peel oil on lipid peroxidation, catalase activity and hepatic biomarker levels in blood plasma of normo rats. *J. Biomed. Pharm. Res*, 67, e113.

- **Espina L., Somolinos M., Loran S., Conchello P., García D., Pagan R.** 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control.* 22(6), 896–902.
- **Esterbaer H., Gebicki J., Puhl H., Jungens G.** 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol.Med.* 13(4):341-90.
- **European Food Safety Authority.** 2010. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance hymexazol. *EFSA.Journal.*8:8:1653 - 1663 pp.
- **EVANS J. G.** 1972. Land Snails in Archaeology with special reference of the British Isles. Seminar Press. London & New York. 436 p.

## F

- **FAO ., OMS.** 1958. Méthodes d'essai toxicologique des additifs alimentaires (Deuxième rapport du Comité mixte FAO/OMS d'experts des Additifs alimentaires).. OMS Série de Rapports Techniques, No. 144. 24p
- **FAO., OMS.** 1995. Evaluation des risques dus à la présence de produits chimiques dans les aliments. Archives de documents de la FAO. Issu de Application de l'analyse des risques dans le domaine des normes alimentaires, par le Comité mixte FAO/OMS d'experts des Normes alimentaires. 39p.
- **Farag M. R., Mahmoud H. K., El-Sayed S. A., Ahmed S. Y., Alagawany M., Abou-Zeid S.M.**2021. Neurobehavioral, physiological and inflammatory impairments in response to bifenthrin intoxication in *Oreochromis niloticus* fish: Role of dietary supplementation with *Petroselinum crispum* essential oil. *Aquatic Toxicology.* 231. 105715.
- **Farahmandfar R., Tirgarian B., Dehghan B., Nemati A.**2019. Changes in chemical composition and biological activity of essential oil from Thomson navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) peel under freezing, convective, vacuum, and microwave drying methods. *Food Sci Nutr.* 2020;8:124–138.
- **Favier A.** 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. *L'actualité Chimique.* 108-115.
- **Favier A.** 2011. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique.* 65 (4) 108-115.
- **Fellah S.,Romdhane M., Abderraba M.** 2006. Extraction et étude des huiles essentielles de la *salvia officinalis*.l cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Societe Algerienne de Chimie.* 16: 193-202.
- **FeltenV., Charmantier G., Mons R., Geffard A., Rousselle. P., Coquery. M., Garric J., Geffard O.** 2008. Physiological And Behavioural Responses Of *Gammarus Pulex* (*Crustacea: Amphipoda*) Exposed To Cadmium. *Aquatic Toxicology* 86, 413-425.

- **Ferhat M. A., Meklati B. Y., Chemat F.** 2010. Citrus d'Algérie, les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction. Office des Publications Universitaires. P : 38, 42, 52-57.
- **Fernandez-Lopez J., Fernandez-Gines J.M., Aleson-Carbonell L., Sendra E., Sayas-Barber E., Perez-Alvarez J. A.** 2004. Application of functional citrus by-products to meat products. Trends in Food Science and Technology. 15, 176-185.
- **Fiera C., Ulrich W., Popescu D., Bunea C. I., Manu M., Nae I., Stan M., Markó B., Urák I., Giurginca A., Penke N., Winter S., Kratschmer S., Buchholz J., Querner. P., & Zaller. J. G.** 2020. Effects of vineyard inter-row management on the diversity and abundance of plants and surface-dwelling invertebrates in Central Romania. Journal of Insect Conservation, 24(1), 175–185.
- **Fillâtre Y., Rondeau D., Bonnet B., Daguin A., Jadas-Hécart A.** 1 January 2011. Communal P.-Y. Multiresidue Analysis of Multiclass Pesticides in Lavandin Essential Oil by LC/MS/MS Using the Scheduled Selected Reaction Monitoring Mode. Analytical Chemistry. Volume 83. Pages 109-117.
- **Finland.** 2010. Final Addendum to the Additional Report on hymexazol. compiled by EFSA. April 2010.
- **Flohe L., Gunzler W.A.** 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, 114-121.
- **FMC Corporation.** 1983. Application for Experimental Use Permit, Product Chemistry. Department of Pesticide Regulation. Sacramento. CA. DPR Report No. 50429-025.
- **Forbes V.A., Forbes T.L., Rivière J.-L.** 1997. Écotoxicologie: théorie et applications. Editions Quae, Paris. 424 p.
- **Forbes V.E., Forbes T.L.** 1994. Ecotoxicology in Theory and Practice. Chapman & Hall. London. 242 p.
- **Fortin M.C.** 2009. Développement application et validation d'une nouvelle stratégie de mesure des indicateurs biologiques de l'exposition aux pyréthriinoïdes et aux pyrétrines chez l'humain. Thèse de doctorat. Université de Montréal. 200 PP
- **Fouche J.G., Marquet A., Hambuckers A.** 2000. Les plantes Médicinale, de la plante au médicament. Observatoire du monde des plantes Sart-Tilman. Francis: Philadelphia, pp : 1-41.
- **Franco R., Sanchez-Olea R., Reyes-Reyes E.M., Panayiotidis M.I.** 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis : Ménage à Trois. Mutat Res 674: 3–22.
- **Fromenty B.** 2010. Drug-induced mitochondrial and metabolic toxicity: Mechanisms and deleterious consequences for the liver. Réanimation. 19(6): 552-567.
- **Funes. V., Alhama. J., Navas J.I., Lopez-Barea. J., Peinado. J.** 2006. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollux species from the Spanish South Atlantic littoaral. Environ Pollut 139: 214-223.
- **Funk ., Wagnalls.** 2004: Encyclopédie britannique Funk & Wagnalls
- **Fuselli R., Susana B., Garcia D.L.R., Martin J., Rosalia F.** 2008. Chemical omposition and antimicrobial activity of citrus essences on honeybee bacterial

pathogen *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24, 2067-2072

## G

- **Gagné F., Blaise C., Pellerin J., Pelletier E., Strand J.** 2006. Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64(3), 348-361.
- **Galaris D., Evangelou A.** 2002. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Critical reviews in oncology/hematology*. 42(1). 93-103.
- **Gamarra F. M. C., Sakanaka L. S., Tambourgi E. B., Cabral F. A.** 2006. Influence on the quality of essential lemon (*Citrus aurantifolia*) oil by distillation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 23, 147-151.
- **Gamiz-Gracia L., Luque M. D.** 2000. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*. 51(6), 1179-1185.
- **Gan H. , Wickings K.** 2017. Soil ecological responses to pest management in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 246, 66–77.
- **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D.** 2013. Espèces réactives de l'oxygène: comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *Actualité chimique*: 91-96
- **Garg D.P., Bansal A.K., Malhotra A., Kiran R., Dhawan D.K.** 2009. Methomyl induced hematological and biochemical alterations protection by vitamin E. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 93(3): 127-132.
- **Gargouri B., Bhatia H. S., Bouchard M., Fiebich B. L., Fetoui H.** 2018. Inflammatory and oxidative mechanisms potentiate bifenthrin-induced neurological alterations and anxiety-like behavior in adult rats. *Toxicology Letters*. 294. 73-86.
- **Gatingol MC., Etienne MJC.** 2010. Pesticides et santé. Assemblée nationale sénat. constitution du 4 octobre 1958. Rapport n°2463.
- **Geraci A., Di-Stefano V., Di Martino E., Schillaci D., Schicchi R.** 2017. Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. *Natural Product Research*, 31(6), 653–659
- **Geyu L., Yuepu P., Lihong Y., Ran L., Bing Y., Yaoyao S., Yanfen L.** 2014. Influence of Different pesticides on Hepatic and Renal Functions in Rats with Correlation to Oxidative Stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A: Current Issues*. pp.72:11-12pp.
- **Ghafourifar P., Cadenas E.** 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*. 26 : 190-5.
- **Ghanem N., Mihoubi D., Kechaoua N., Boudhrioua M. N.** 2012. Microwave dehydration of three citrus peel cultivars: Effect on water and oil retention capacities, color, shrinkage and total phenols content. *Industrial Crops and Products*. 40, 167-177.

- **Ghosal A., Hati A., Mal S., Mukherjee A., Mukherjee A.** 2018. Impact of Some New Generation Insecticides on Beneficial Rhizospheric Microorganisms in Rice Maize Cropping System. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(05), 666–676.
- **Gimbert F., De-Vaufleury A., Douay F., Coeurdassier M., Scheifler R., Badot P.M.** 2008. Longterm Responses Of Snails Exposed To Cadmium-Contaminated Soils In A Partial Life-Cycle Experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 138–146
- **Godishala S., Kiranmai M., Uma R.B., Kesava R. T., Vijaya-Laxmi T.** 2019 Antitumor and Antioxidant Effects of Flavonoid Fraction of *Citrus sinensis* peel Extrac /*Pharmacogn J*; 11(1): 57-63.
- **Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J.** 1972. Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 18 (3): 545.
- **Gomez C., Bandez M.J., Navarro A.** 2007. Pesticides and impairment of mitochondrial function in relation with the parkinsonian syndrome. *Front Biosci.* 12:1079-93.
- **Gomot A.**1997b. Double labelling of neural grafts for identification of sites mediating growth in snails. *Biol. Cell.* 89. 133-140.
- **Gomot A.** 1997. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33 : 209-216.
- **Gomot- deVaufleury A.** 2001. Regulation of growth and reproduction. *The biology of terrestrial molluscs.* Barker GM. Oxon, CABI: 331-355.
- **Gomot-deVaufleury A., Kerhoas I.** 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* ,64,434-442.
- **Gomot-de Vaufleury A., Bispo. A.** 2000. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. 1. Sublethal effects on growth. *Environmental science & Technology.* 34(9): 1865-1870.
- **González-Alcaraz M. N., Malheiro C., Cardoso D.N., Prodana M., Morgado R. G., van.G., Cornelis A.M., Loureiro.S.** 2020. Bioaccumulation and Toxicity of Organic Chemicals in Terrestrial Invertebrates. In J. J. Ortega-Calvo, & J. R. Parsons (Eds.), *Bioavailability of Organic Chemicals in Soil and Sediment.* pp149-189. p 150.
- **Gonzalez-molina E., Dominguez-perles R., Moreno D.A., Garcia-viguera** 2010. Natural bioactive compounds of *citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 51: 327-345pp.
- **Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazaw K.** 2008. A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-. *Free Radical Biology and Medicine.* 45: 1318-1325.
- **Grandjean D.** 2005. Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien. *Le Nouv. Prat. Vét.* 22: 11-15.
- **Grant S.M.B.** 1993. An unusual case of burning mouth sensation. *Br. Dent J* 175.378-80PP.
- **Grara N.** 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gasteropode *Helix aspersa*): Cas des métaux. Thèse de doctorat de l'université de Annaba. 120.91 pages.

- **Grara N., Berrebbeh H., Rouabhi R., Atailia A et Djebbar M.R.** 2009. Impact of pollution by industrial metallic Dust on Bio-Accumulator Organism *Helix aspersa*. *Global Veterinaria*. 3(4) ,276-280.
- **Grara N., Bouloudenine M., Khaldi F., Zenir Z., Abdemadjid S., J. Mater.** 2015. *Environ. Sci.* 6 (9) 2596-2603.
- **Griffith O.W., & Mulcahy R.T.** 1999. The enzyme of glutathione synthesis: Gamma-glutamyl cycteine synthetase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 73: 209-67.
- **Grube A., Donaldson D., Kiely T., Wu L. USEPA 2011.** Pesticides industry sales and usage 2006 and 2007 market estimates. Biological and Economic Analysis Division. Office of Pesticide Programs.
- **Guo X., Han D., Xi H., Rao L., Liao X., Hu X ., Wu. J.** 2012. Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: a comparison. *Carbohydrate Polymers*, 88(2).441-448.
- **Guy. R.** 20 novembre 2015. La performance de vos pesticides. agronome Consultant Scientifique en Agriculture Expert horticole synAgri.

## H

- **Habig. H., Pabst M.J., Jokoby W.B.** 1974. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P.** 2007. Le stress oxidant. *Revue médicale de Liège*, 62(10).
- **Halliwell B.** 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* 13: 1-32.
- **Halliwell B.** 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J ExpPathol.* 70: 737 – 757
- **Halliwell ., Chirico S.** 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition.* 57, p.715-724.
- **Hamadache M.** 2014. Modélisation en vue de la prédiction ou de la corrélation de l'activité toxicologique à partir de la structure moléculaire. THESE DE DOCTORAT. l'Université de Médéa. PP 131;P 52.
- **Hamdani F.Z., Allem.R.** 2017. Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de *Citrus* vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium* sp in vitro. *Phytothérapie.*15:263-266.
- **Hamdi-Ourfella A. N., Soltani N., J. Mater.** 2014. *Environ. Sci.* 5 (S2) 2527-2533.
- **Hammer K. A., Carson C. F.** 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom. Pp : 255 – 295
- **Hamzi S., Hamla.S.** 2017. Etude Toxicologique des huiles essentielles du fenouil. Université de Larbi Tébessi-Tébessa. PP 84
- **Handaji. N., Benyahia H., Arsalane N., Ben Azouz A., Gaboun F.** 2013. Evaluation pomologique et organoleptique de 34 variants d'orangers (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) issus de semis apomictique en essai dans la région du Gharb. Laboratoire d'amélioration génétique des agrumes, INRA Kenitra Maroc. 2. BP. 415, UR de Biotechnologie, CRRRA Rabat, pp 70 . p 50.



- **Harry P., Viriot J. D.** 2011. Expositions aux spécialités phytopharmaceutiques contenant de la BIFENTHRINE. Synthèse des cas signalés à la MSA et aux centres antipoison français de 2000 à 2010. Centre antipoison et de toxicovigilance du CHRU de Lille Marie Odile RAMBOURG. DPR. Anses. pp48 p6.
- **Harveson R., Windels C., Smith J., Brantner J., Cattanach A., Giles J., Cattanach. N.** 2007. Fungicide registration and a small niche market: a case history of hymexazol seed treatment and the US sugar beet industry. *Plant Dis.* Vol. 91 No. 7 91. 780-790.
- **Hawthorne S.B., Grabanski C.B., Martin E., Miller D.J.** 2000. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A.* 892, 421-433
- **He F., Wang S., Liu L., Chen S., Zhang Z., Sun J.** 1989. Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Arch Toxicol.* 63. 54-8pp
- **Hélène M.** 2007. Etude des mécanismes sous-jacents aux phénomènes collectifs chez un primate non humain (*Cebus capucinus*) : De l'expérimentation à la modélisation.
- **Hellal Z.** 2011. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). diplôme de Magister en biologie. université mouloud mammeri de tizi-ouzou. pp 78.p 26 ; 60.
- **Heller J., Magaritz. M.** 1983. From where do land snails obtain the chemicals to build their shells. *Journal of Molluscan Studies.* 49: 116-121.
- **Henry CH.** 1977. La variabilité de l'Escargot Petit-Gris *Helix aspersa* Müller. BULLETIN DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE. 3e série. n 448. mars-avril 1977. Zoologie 311
- **Hermes L. M.** 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and Adaptation.* 319-368.
- **Hill I.R.** 1989. Aquatic organisms and pyrethroids. *Pesticides Sciences.* 27: 429-465pp.
- **Hosni K., Zahed N., Chrif R., Abid I., Medfei W., Kallel M., Sebei H.** 2010. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. *Food chemistry.* 123(4), 1098-1104.
- **Hulbert A., Pamplona R., Buffenstein R., Buttemer W.** 2007 Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews* 87, 1175.

## I

- **Iglesias J., Castillejo J.** 1998. Field observations on feeding of the land snail *Helix aspersa* Müller. Department of Animal Biology. Faculty of Biology. University of Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. Spain *Oxford Journals, Life Sciences. Journal of Molluscan Studies.* 65. pp: 411-423..
- **INERIS.** 2011. BIFENTHRINE – N° CAS 82657-04-3 Version 1 :16/12/2011. DRC-11-118981-13678A
- **INRA.** 2013. Etude d'impacts des chartes d'engagements volontaires de progrès nutritionnel sur les volumes de nutriment mis sur le marché : étude actualisée. Rapport Oqali.

- **INRS** 2009. Bifenthrin. Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles 30. rue Olivier-Noyer 75680 Paris cedex 14. Fiche toxicologique ft 274.
- **INRS** 2016. Bifenthrin. Institut national de recherche et de sécurité. 2<sup>ème</sup> édition. Septembre 2016. Fiche toxicologique n°274.9P
- **Ismert M., Oster T., Bagrel D.** 2002. Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere* **46**, 273-280.

## J

- **Jacquemond C., Agostini D., Cur K.** 2009. Des agrumes pour l'Algérie. Bureau d'ingénierie en horticulture et agro-industrie. P :49.
- **Jaeschke H.** 1995. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 209(2), 104-111.
- **Jean-Claude B., Pierrick A et Jean-Louis V.**2019. L'escargot *Helix aspersa* biologie – élevage. INRA. Domaine pluridisciplinaire du Magneraud 17700 Surgères. Paris. pp : 119. p11-12.
- **Jeannot V., Chahboun J., Russell D.,Baret P.** 2005. Quantification and determination of chemical composition of essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium L. ssp. aurantium*). *International Journal of Aromatherapy*, 15 (2), 94-97.
- **Jeroen B., Irene K., Joep v. L., Jan O.**2004. Les pesticides : composition, utilisation et risques ' Fondation Agromisa. Agrodok 29.Wageningen. ISBN : 90-77073-01-9 p 124 p11
- **Jha A. K., Assumi S. R., Verma V. K., Deshmukh N. A., RymbaiH., Devi M. B., Talang H. D.** 2019. FOOD PROCESSING INDUSTRY IN NORTHEAST INDIA-A PROSPECTIVE WAY FORWARD. *Commercial Crops Processing and Value Addition*, 5(10), 194.
- **Ji C., Tanabe P., Shi Q., Qian L., Mcgruer V., Magnuson J. T., Schlenk D.** 2021. Stage dependent enantio selective metabolism of bifenthrin in embryos of zebra fish. *Environmental Science & Technology*. 55(13). 9087-9096
- **JORF.** 2010. Avis aux fabricants, distributeurs et utilisateurs de produits phytopharmaceutiques concernant le retrait des préparations contenant les substances actives considérées comme préoccupantes et les délais d'écoulement octroyés pour leur distribution et leur utilisation. Journal officiel de la république française. jorf n°0302 du 30 décembre 2010. texte n° 122 (nor: agr1033278v). p : 23301.
- **José-Luis R.** 2016. Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. Universitat de València. Department de Farmacologia. Facultat de Farmàcia.Valencia, Spain.
- **Jumel A., Lagadic. L.** 2000. Metabolism of polysaccharides in *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) exposed to nonylphenoldodecylethoxylate.*Third SETAC World Congress. Global Environmental Issues in the 21th Century: Problems, Causes and Solutions.* Brighton, Angleterre.14:33-90pp.

## K

- **Kalender S., Uzun F.G., Durak D., Demir F., Kalender Y.** 2010. Malathion-induced hepatotoxicity in rats: The effects of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 633-638.
- **Kaneko H.** 2010. Pyrethroid chemistry and metabolism. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (Pp. 1635-1663).
- **Kato S., Coe R., New L., Dick M. W.** 1990. Sensitivities of various Oomycetes to hymexazol and metalaxyl. *J. Gen. Microbiol.* 136:2127-2134.
- **Katsube K., Nekoduka S.** 2002. Control of damping off and root rot diseases of spinach with hymexazol dust formulation. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan (Japan)*.
- **Kebieche M., Lakroun Z., Lahouel M., Bouayed J., Meraihi Z., Soulimani R.** 2009. Evaluation of epirubicin-induced acute oxidative stress toxicity in rat liver cells and mitochondria, and the prevention of toxicity through quercetin administration. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(2), 161-167.
- **Kelly M.** 2017. Synthèse de composés phénoliques de types diarylhepatonoïde: évolution de leurs propriétés antioxydante et anti-inflammatoires. Thèse de doctorat. Chimie organique. Université Paul Sabatier-Toulouse. P22-23.
- Kerney M, Cameron R et Bertrand A (2006). *A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe*. French ed. Paris. Delachaux et Niestlé SA.
- **Khan A. M., Sultana M., Raina R., Dubey N., Dar S. A.** 2013. Effect of sub-acute toxicity of bifenthrin on antioxidant status and hematology after its oral exposure in goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 83, 545-549.
- **Kirbaslar F. G., Tavman A., Dülger B., Türker. G.** 2009. Antimicrobial activity of Turkish citrus peel oils. *Pakistan Journal of Botany*. 41(6), 3207–3212.
- **Kizek R., Vacek J., Trnková L., Jelen F.** 2004. Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris (2-carboxyethyl) phosphine. *Bioelectrochemistry*. 63: 19-24.
- **Kolaczinski J.H., Curtis C.F.** 2004. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. *Food Chem. Toxicol.* 42, 697–706.
- **Koolman J., Röhm K.H.** 2004. *Atlas de Poche de Biochimie*. 3e édition. Flammarion, Paris. P ;478.
- **Kosasih E., Chiuman L., Lister I. N. E., Fachrial E.** 2019. Hepatoprotective effect of *Citrus sinensis* peel extract against isoniazid and rifampicin-induced liver injury in wistar rats. *Majalah Obat Tradisional*, 24(3), 197-203.
- **Koureas M., Tsakalof A., Tsatsakis A., Hadjichristodoulou C.** 2012. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicology Letters*. 210: 155-68.
- **Kristal B.S., Park B.K., Yu B.P.** 1996. 4-hydroxynonéal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J. Biol. Chem.* 271, 6033 -6038.
- **Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M.** 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85: 633–640.

## L

- **Ladhar-Chaabouni R., Gargouri R., Hamza-Chaffai A.** 2007. effects of Cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus*: metallothionein quantification by using two techniques. *Inter J Environ Pollu* 30: 593-601.
- **Lagha-Benamrouche S., Madani K.** 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: peels and leaves. *Ind Crop Prod* 50: 723–730.
- **Lagha-Benamrouche S., Lydia A., Boudershem H., Tani S., et Madani K.** 2017. Caractérisation chimiques des écorces d'oranges. identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Nature & Technology Journal*. Vol. B : Agronomic & Biological Sciences. 18 (2017) 01-08:pp8.p2.
- **Lakroun Z., Kebieche M., Lahouel A., Zama D., Desor F., Soulimani R.** 2015. Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat. *Environ Sci Pollut Res*. 22 :7776-81.
- **Lalmi S., et Lazreg A.** 2016. Effet de deux molécules nanométriques sur les paramètres physiologiques des escargots « *Helix aspersa* ». *Toxicologie: Xénobiotiques et Risques Toxicologiques*. Université Larbi Tébessi-Tébessa. Pp 45.p18.
- **Langley A., Gilbey M., Kennedy B.** 2003. Health-Based Investigation Level for Bifenthrin in Soil; Proceedings of the Fifth National Workshop on the Assessment of Site Contamination.
- **Larba R.** 2014. Biosurveillance de l'environnement dans la région Est : mesure de biomarqueurs chez *Helix aspersa* et corrélation avec les caractéristiques physicochimiques des sols. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar-Annaba.
- **Latchoumycandane C., Mathur P.P.** 2002. Effect of methoxychlor on the antioxidant system in mitochondrial and microsome-rich fractions of rat testis. *Toxicology*. 176: 67–75.
- **Leng G., Kuhn K., idel H.** 1997. Surveillance biologique des pyréthroïdes dans le sang et métabolites des pyréthroïdes dans l'urine: applications et limites. *sciences de l'environnement total*.199. 173-18PP.
- **Levet D., Hen L., Jacques S., Mouchelin J., Berly A.** 2008. Guide pratique des Substances Toxiques dans les Eaux Douces et Littorales du Bassin Seine-Normandie. Éditions AESN. 271p.
- **Limei Y., Yingxian WU., Dongjie L, Zhili S., Junmei L, Haiguang CH., Weihua F.** 2022. The kinetic behavior of antioxidant activity and the stability of aqueous and organic polyphenol extracts from navel orange peel Limei. *Food Sci. Technol, Campinas*. v42. e90621. 2022.pp11.p1
- **Lin C.M., Sheu S.R., Hsu S.C., Tsai Y.H.** 2010. Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. *Food Control*. 2, 1710-1715.
- **Liu K., Pan X., Han Y.** 2012. Estimating the toxicity of the weak base carbendazim to the earthworm (*Eisenia fetida*) using in situ pore water concentrations in different soils. *Sci Total Environ* 438:26–32.

- **Liu F., Mu W., Zhang W., Zhang J.** 2004. Control of rice blight on dry nursery seedling by fungicide and physiological regulation on rice seedling. *Chin. J. Pest. Sci.* 6. 37-42. (in Chinese)
- **Livingston D. R.** 1991. Towards a specific index of impact by organic pollution for marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C : 151-155
- **Lodovici M., Aioli S., Monserrat C., Dolara P., Medica A., Di-Simplicio P.** 1994. Effect of a mixture of 15 commonly used pesticides on DNA levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*. 13(3): 163-168.
- **Lohrrasbi M., Pourbafrani M., Niklasson C., Taherzadeh M.J.** 2010. Process design and economic analysis of a citrus ; *Bioresource Technology* 101 (2010) 7382–7388.
- **Louat F.** 2013. Etude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle *Drosophilamelanogaster* , *Sciences agricoles. Université d'Orléans. Français.* PP 224 ;p1.
- **Louise H.E.** 2015. Health and environmental impacts of pyrethroid insecticides: What we know, what we don't know and what we should do about it. Executive summary and litter
- **Lux P. E., Carle R., Zacarías L., Rodrigo M. J., Schweiggert R. M., Steingass C. B.** 2019. Genuine carotenoid profiles in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Navel] peel and pulp at different maturity stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67(47), 13164-13175

## M

- **Margoum C.** Contribution à l'étude du devenir des produits phytosanitaires lors d'écoulements dans les fossés : caractérisation physico-chimique et hydrodynamique. Thèse de doctorat. Université Joseph Fournier. Grenoble I. 2003  
C., Eds. Pergamon. New York. P: 101.
- **M'hiri N.** 2015. Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone. diplôme de Doctorat. Université de Carthage. Pp 147. P13.
- **M'hiri N., Ioannou I., Ghoul M., Mihoubi N.** 2015. Proximate chemical composition of orange peel and variation of phenols and antioxidant activity during convective air drying. *Journal of New Sciences-Agri and biotech in volume JS-INAT* (9); September 01.2015.
- **Mahendru V.K., Agarwal R.A.** 1981. Changes in carbohydrate metabolism in various organs of the snail *Lymnaea acuminata* following exposure to trichlorfon. *Acta of Pharmacology*. 48: 377-381.
- **Mahmoud M.A. D.** 2006. Tissue distribution and subcellular localization of trace metals in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with special reference to the role of lysosomal granules in metal sequestration. *Aquatic Toxicology* 77 (143–152).
- **Mani V. M., Sadiq A. M. M.** 2014. Naringin modulates the impairment of memory, anxiety, locomotor, and emotionality behaviors in rats exposed to deltamethrin; a

possible mechanism association with oxidative stress, acetylcholinesterase and ATPase. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 4(4). 527-533.

- **Manthey J.A., Guthrie N., Grohmann K.** 2001. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*. 8: 135-153pp.
- **Markl J.** 2013. Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1834(9). 1840-1852.
- **Marle-claude L.** 2007. Etudes biologiques et toxicologiques de pesticides utilises en pomiculture quebecoise sur le prédateur acarien anystis baccarum (L.) Et analyse critique des dispositifs d'évaluation canadien et amerlcain de la toxicité des pesticides. université du québec à montréal. p 199 p2
- **Marteil L.** 1974. La conchyliculture francaise Premiere partie : Le milieu naturel et ses variations. *Revue de Travail de l'Institut des Pêches Maritimes* 38: 217-337.
- **Martin M., Macias M., Escames G., León J., Acuña-Castroviejo D.** 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintain glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *The FASEB Journal*. 14:16779.
- **Mary C.** 1961. The Structure and Function of the Cutaneous Glands in *Helix aspersa*. From the Department of Zoology. the University of Reading. Present address: Department of Biology, University College of North Staffordshire, Keele, Staffordshire). *Quarterly Journal of Microscopical Science*. Vol. 102, part 2, pp. 195-216.
- **Maxwell E.G., Belshaw N. J., Waldron K. W., Morris V. J.** 2012. Pectin an emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science and Technology*. 24 (2), 64-73.
- **McBride H.M., Neuspiel M. Wasiak S.** 2006. Mitochondria: More Than Just a
- **McCarthy J.F., Shugart L.R.,** 1990. Biological markers of environmental contamination, *in* Journal of McCarthy F., and Shugart L.R., eds., Biomarkers of environmental contamination: Boca Raton, FL, USA, Lewis Publishers. 3-16.
- **McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M., Yu H.** 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 2085-2092.
- **MEBIROUK R.** 2017. Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique) : Activités anti-inflammatoire, anti tumorale et anti-angiogénique. Thèse Doctorat. universite des freres mentouri constantine.pp :172.p5
- **Meena P.** 2022. Method validation for the analysis of bifenthrin residue in different soils.
- **Meléndez-Martínez A.J., Vicario I.M., Heredia F.J.** 2007. Critical Review Review: Analysis of carotenoids in orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20, 638-649.
- **Meneghini R.** 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(5), 783-792.
- **Menichini F., Tundis R., Bonesi M., De-Cindio B., Loizzo M. R., Conforti F.** 2011. Chemical composition and bioactivity of *Citrus medica* L. cv. Diamante essential oil

obtained by hydrodistillation, cold-pressing and supercritical carbon dioxide extraction. *Natural Product Research*. 25(8). 789–799.

- **Merhi M.** 2008. Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faible doses ; caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.
- **Messarrah M., Klibet F., Boumendjel A., Abdennour C., Bouzerna N., Boulakoud M.S, El Feki A.** 2012. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic induced liver injury in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 64: 167-174.
- **Metoui N., Hamrouni L., Dhaoudi F., Bettaieb T.** 2014. Notes ethnobotanique et phytopharmacologique sur la Maltaise de Tunisie. © Springer-Verlag France 12:105-108
- **Miao J., Reisig D. D., Li G., Wu Y.** 2016. Sublethal effects of insecticide exposure on *Megacopta cribraria* (Fabricius) nymphs: key biological traits and acetylcholinesterase activity. *Journal of Insect Science*. 16(1). 99.
- **Michael F. H., David G. Ross., Brenda C. Edwards., Michael J. Devito J., Starr M.** 2015. Tissue time course and bioavailability of the pyrethroid insecticide bifenthrin in the long-evans rat.
- **Migdal C., Serres M.** 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/sciences*. 27 :405-412pp.
- **Miller T.A., Salgado V.L.** 1985. The mode of action of pyrethroids on insects. in *The Pyrethroid Insecticides*. Leahy. J.P. Ed. Taylor & Francis. London. 43-97.
- **Mokhtari M., Mouhouche F.** 2016. Determination of bifenthrin levels in tomato and strawberry products in the region of Algiers (Algeria). *Advances In Environmental Biology*. 10(10). 62-70.
- **Mokrey L.E., Hoagland K.D.** 1989. Acute toxicities of five synthetic pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 9:1045-1051.
- **Mondello L., Casilli A., Tranchida P Q., Dugo P., Dugo G.** 2005. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 20(2). Pp: 136-140.
- **Monocada S.** 1993. The L- arginine- nitric oxide Pathway. *Nengl. J. Med*. 329 : 2002-2012.
- **MOREL J.** 1974. Sur la malacofaune des formations continentales des quartiers ouest de Nice (A. M.). *Bull. Mus. Anthropol. préhist. Monaco*. 19 (1973-74) : 21-36.
- **Mossa A-T.H., Heikal T.M., Omara E.A.Z.** 2014. Liver damage associated with exposure to aspirin and diazinon in male rats and the ameliorative effect of selenium. *Biomed. Aging. Pathol*.
- **Mostafa A. A., Salem M., Elaby N. Nail S.** 2016. "Protective activity of commercial citrus peel extracts against paracetamol induced hepato-nephro toxicity in rats." *Journal of Chemical. Biological and Physical Sciences*. vol. 6. no. 1, pp. 70–83.
- **Moussard C.,** 1999. La biochimie, Biochimie structurale et métabolique, Médecine, Pharmacie, Sciences. De Boek&Larciers.a., Bruxelles. 294 p.

- **Muhammad N O, Soji-Omoniwa O., Usman LA., Omoniwa BP.** Antihyperglycemic Activity of Leaf Essential Oil of *Citrus sinensis* on Alloxan-induced Diabetic rats. Annual Review & Research in Biology. 2013;3(4):825-834.
- **Mullenbach G.T., Tabrizi A., Irvine B. D., Bell GI., Tainer JA., Halliwell RA.** 1988. Selenocysteine's mechanism of incorporation and evolution revealed in cDNAs of three glutathion peroxidases. Protein Eng. 2: 239–246.
- **Müller O.F.** 1774. Vermium terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succincta historia. Volumen alterum. Havniæ & Lipsiæ. Heineck et Faber. P : 59.
- **Murthy K. N. C., Jayaprakasha. G. K., & Patil. B. S.** 2012. D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. Life Sciences. 91(11–12), 429–439.
- **Mutin G.** 1969. L'Algérie et ses agrumes In : Revue de géographie de Lyon. VoL 44 n°1. 1969. Pp : 5-36.
- **Myresiotis C., Karaoglanidis G., Vryzas Z., Papadopoulou- Mourkidou E.** 2012. Evaluation of plant- growth- promoting rhizobacteria, acibenzolar- S- methyl and hymexazol for integrated control of Fusarium crown and root rot on tomato. Pest Manag. Sci. 404-411.

## N

- **Naumann K. Synthetic.** 1990. Pyrethroid Insecticides: Structures and Properties. Springer-Verlag: New York.
- **Neuzil J., Stocker R.** 1993. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. 20: 281-284.
- **Nicholas S. Graham J. A.** 2015. Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. Agriculture, 5, 48-102. P53.
- **Njoroge S. M., Phi N. T. L., Sawamura M.** Chemical Composition of Peel Essential Oils of Sweet Oranges (*Citrus sinensis*) from Uganda and Rwanda., J. Essent. Oil. Bear, Pl., 12 (2009) 26-33.
- **Nicolosi E., Deng Z N., Gentile A., La- Malfa S., Continella G., Tribulato E.** 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theoretical and Applied Genetics 100:1155-1166.
- **Nieradko-Iwanicka B., Borzecki A., Jodlowska-Jedrych B.** 2015. Effect of subacute poisoning with bifenthrin on locomotor activity, memory retention, haematological, biochemical and histopathological parameters in mice. Journal of Physiology and Pharmacology, 66(1).
- **Notten M. J. M., Oosthoek A. J. P., Rozema J., Aerts R.** 2006. Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the landsnail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. Ecotoxicology, 15, 295-3
- **Nzengue Y.** 2008. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du Cadmium. du cuivre et du zinc : place des métallo thionines et de P53. Thèse de doctorat. Université JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1. France. p : 299.

## O



- **Odendaal J.P., Reinecke A.J.**2003.Quantifying histopathological alterations in the hepatopancreas of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a biomarker of cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56(2): 319-325.
- **Olle M., Bender. I.** 2010.The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*.8: 687-696pp.
- **OMS.**2005.Safety of Pyrethroids for Public Health Use; WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.10; Communicable Disease Control (CDC) - Prevention and Eradication World Health Organisation Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) - Protection of the Human Environment Programme on Chemical Safety (PCS). Organisation Mondiale de la Santé, Genève.
- **Orbea A., Dariush Fahimi H., Cajaraville M. P.** 2000. Immuno localization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochemistry and Cell Biology*. 114(5): 393-404.
- **Oreopoulou V., Tzia C.** 2007. In Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food, chapitre 11: Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants and colorants. Springer, USA: 209-232.
- organisme animal bio indicateur / bioaccumulateur de pollution : *Helix aspersa*. Thèse Doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba. 45 p.
- **Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B.** 2007. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 47:143–83.
- **Ouelbani R., Bensari S., Mouas T.N., Douadi K.** 2016. Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*. pp: 194196-218.
- **Ozkan F., Gunduz S.G., Hunt A.O., Berkoz M., Yahn. S.** 2012. The protective role of ascorbic acid (vitamin C) against chlorpyrifos-induced oxidative stress in *Oreochromis niloticus* Fish. *Physiol Biochem*. 38:635–643.

## P

- **Padhi B.K., Pelletier. G., Williams A., Berndt-Weis L., Yauk C., Bowers W.J., and Chu. I.** 2008. Gene expression profiling in rat cerebellum following in utero and lactational exposure to mixtures of methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Toxicological Letters*. 176(2): 93-103.
- **Padmaja J.R., Rao M.B.** 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail. *Bellammyadissimillis* (Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53: 142-148.
- **Paglia D. E., Valentine W. N.** 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory And Clinical Medicine*. 70(1) :158-169.
- **Pallary P.** 1901. Mémoire sur les Mollusques fossiles terrestres, fluviátiles et saumâtres de l'Algérie. *Mém. Soc. géol. Paléont.* 22 (reprint 1970 : Swets & Zeitlinger, Amsterdam, 213 p., 4 pl.).
- **Pampanin D.M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C.** 2005. Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venic Lagoon (Italy).*Mar.Pollut. Bull*, 50, 1548-15557.

- PAN Pesticide action network. 2019. Pesticide database. (last accessed on 26 February 2018). Available online: <http://www.pesticideinfo.org> 5.
- **Panget C., Selck H., Misra S-K., Berhanu D., Dybowska A., Valsami-Jones E., Valery E., Forbes V-E.** 2012. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail. *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano and micro-CuO particles. *Aquatic Toxicology* 106– 107 (2012) 114– 122.
- **Paris M., Hurabielle M.** 1981. *Abrégé de matière végétale pharmacognosie. Tome 1. Généralités monographiques.* Ed. Masson.
- **Payne P., Williams G.** Hymexazol treatment of sugar-beet seed to control seedling disease caused by *Pythium* spp. and *Aphanomyces cochlioides*. *Crop Prot.* 9 (1990) 371-377.
- **Pessayre D., Mansouri A., Berson A., Fromenty B., 2010.** Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol.* 196 :311-65.
- Petit-Gris (*Helix aspersa aspersa*, Gastropoda: Stylommatophora; Helicidae) dans la région Nord-est d'annaba– algérie. *edoctoratensciences. université badji mokhtar-annab.* pp : 109.p 5
- Pharmacology: Kerkut G. A.; Gilbert, L. I., Eds.; Pergamon: New York, Vol. 12,
- Pincemail J., Haleng J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. 2007. Le stress oxydant. *62 (10): 628-38*
- **Pinot F., Kreps S.E., Bachelet M., Hainaut P., Bakonyi M., Polla B.S., 2000.**
- **Pirame S.S.L.** 2003. Contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit gris (*Helix aspersa*) : Reproduction expérimentale. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. P : 99.
- **Piriya-prasarth S., Sriamornsak P.** 2011. Flocculating and suspending properties of commercial citrus pectin and pectin extracted from pomelo (*Citrus maxima*) peel. *Carbohydrates Polymers.* 83 (2), 561-568.
- **Popple I., Tribune M.G.** 2002. Are snails 'Love Darts' Source of Cupid Lore. *National Geographic News.* 63: 211-243
- Powerhouse. *Curr. Biol.*16(14), R551-R560.
- **Powers S., Jackson M.** 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88: 1243-1276.
- **Praloran J.C.** 1971. *Les agrumes, techniques agricoles et productions tropicale.* Ed. Maisonneuve et Larose. Paris. 561 p.
- **Proestos C., Lytoudi. K., Mavromelanidou. O K., Zoumpoulakis. P., and Sinanoglou V J.** 2013. Antioxydant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxydants* 2: 11-22.

## Q

- **Quista G. B., Liang S. N., Fisher K. J., Nomura. D. K., Casida J. E.** 2006. Each lipase has a unique sensitivity profile for organophosphorus inhibitors. *Toxicological Sciences,* 91(1), 166-172.

## R

- **Radwan M.A., & Mohamed M.S.** 2013. Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 95: 91-97.
- **Radwan M.A., El-Gendy K.S., Gad A.F.** 2010. Biomarkers of oxidative stress in the landsnail. *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere.* 79 (1): 40-46.
- **Radwan M.A., Essawy A.E., Abdelmeguid N.E., Hamed S.S., Ahmed, A.E.** 2008. Biochemical and histochemical on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 90 : 154-167.
- **Radwan M. A., H. B. EL-wakil., Osman K. A.** 1992. Toxicity and biochemical impact of certain oxime carbamate pesticides against terrestrial snail, *Theba pisana* (Muller). *J. Environ. Sci. Health, B27(6):* 759-773.
- Rafiq. S., Kaul. R., Sofi. S. A., Bashir. N., Nazir. F., & Nayik. G. A. 2018. Citrus peel as a source of functional ingredient: a review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.* 17(4), 351-358.
- **Rafiq S., Kaul R., Sofi S. A., Bashir N., Nazir F., Nayik G. A.** 2016. Citrus peel as a source of functional ingredient: a review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.* 17(4), 351-358.
- **Ramade F.** 1992. *Précis d'Ecotoxicologie*, Ed Masson.
- **Ramful D., Bahorun T., Bourdon E., Tarnus E., Aruoma O.I.** 2010. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology.* 278: 75-87.
- **Ramirez D.C., Gomez-Mejiba S.E., Corbett J.T., Deterding L.J., Tomer K.B., Mason R.P.** 2008. Cu/ZnSuperoxide Dismutase-driven Free Radical Modifications: Copper-and Carbonate Radical Anion-initiated Protein Radical Chemistry. *Biochemical Society.* 10: 1-25.
- **Ravi K., Ramachandran B., Subramanian S.** 2004. Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 27(8), 1212-1217.
- **Reddy P.S., Fingerman M.,** 1995. Effect Of Cadmium Chloride On Physiological Color Changes Of The Fiddler Crab. *Uca Pugilator.* *Ecotoxicology And Environmental Safety* 31, 69-75.
- **REGA B., FOURNIER N., GUICHARD E. RUSSELL R.** 2003. Citrus flavour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51, 117-133.
- **Regoli F., Gorbi S., Fattorini D., Tedesco S., Notti A., Machella NR., Benedetti.M et Piva F.** 2006. "Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicological effects of urban pollution: an integrated approach." *Environmental Health Perspectives* 114(1): 63-69.
- **Regoli F., Principato G.** 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to, metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology.* 31: 143-164.

- **Reichel F-X.** 2010. Guide pratique de toxicologie. 2e édition. De Boeck. Bruxelles. 202, 203. 148.
- **Riar N. K.** 2014. *Bifenthrin. Encyclopedia of Toxicology. University of California.Riverside. CA. USA 449–451.*
- **Ristorcelli D.**2002. Hymexazol: Determination of the physico-chemical properties (spectroscopic properties. EC tests A5, A8, A10, A12, A14, A16, A17 and estimated photochemical oxidative degradation). Covance Laboratories Limited, Report No. 730/61-D2149.
- **Robert A., Lobstein A.** 2005. *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles.* Ed : Tec et Doc, Lavoisier, Paris.30 : 212-522pp.
- **Roberto D., Micucci P., Sebastian T., Graciela F.** 2009. Anesini C.antioxidant activity of limonene on normal murinelymphocytes: relation to H2O2 modulation and cell proliferation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 106, 38–44.
- **Robineau P., Mercier T.** 2012. Quelle évaluation pour les produits phytopharmaceutiques Which assessment for plant protection products *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement.* 6 : 927–933.
- **Rodrigues K.J.A., Santana M.B., Do Nascimento J.L.M., Picanço-Diniz D.L.W., Maués L.A.L., Santos S.N., Ferreira V.M.M., Alfonso M., Durán R., Faro L.R.F.** 2010. Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicology Environmental Safety.* 73: 101-107.
- **Rodriguez-Ariza A., Martínez-Lara E., Pascual P., Pedrajas J.R., Abril N., Dorato. G., Toribio F., Bárcena J.A., Peinado J., Pueyo C., López-Barea J.** 1993. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Science of the Total Environment.* (Suppl.): 109-116.
- **Rorke M.A., Gardner D.R., Greenhalgh R.** 1974. Lethality and behavioral symptoms produced by some organophosphorus compounds in the snail (*Helix aspersa*). *Bull. Environ.Contam. Toxicol.* 11 : 417-424.
- **Rouabhi R., Djebbar H., Djebbar M.R.** 2009. Toxic Effects of Combined Molecule from Novaluron and Diflubenzuron on Paramecium caudatum. *Am-Euras. J. Toxicol. Sci.*1(2), 74-80.
- **Rouabhi R., Djebbar-Berrebah H. Djebbar M.R.** 2006. Toxic Effect of a Pesticide, Diflubenzuron on Freshwater Macroinvertebrate (*Tetrahymena pyriformis*). *ChineseJ. Appl. Environ. Biol.*12(4), 514-517.
- **Ruigt G. S. F.** 1985. In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry. Rev. Med.Liege.*62: 10: 628-638pp.

## S

- **Sahraoui N., Abert Vian M., El Maataoui M., Boutekedjiret., Chemat F.** 2011. Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD). *Innovative Food Science Emerging Technologies.* 12, 163-170.
- **Sahraoui.N., Abert Vian. M., Bornard. I., Boutekedjiret. C. and Chemat. F.** 2008. Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils, comparison with conventional steam distillation. *Journal of Chromatography A.* 1210: 229–233.

- **Salama A.K., Osman K.A., Saber N.A., Soliman S.A.** 2005. Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 8: 92-96.
- **Samanta L., Chainy G.B.** 1997. Comparison of hexachlorocyclohexane-induced oxidative stress in the testis of immature and adult rats. *Comp. Biochem. Physiol. C : Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118 : 319-327.
- **Sanchez D., Ganfomina M.D., Gutierrez G., Bastani M.J.** 1998. Molecular characterization and phylogenetic relationship of a protein with potential oxygen-binding capabilities in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects. *Mol Biol Evol* 15. 415-426.
- **Sánchez-Bayo F., Goka K.** 2006. Ecological effects of the insecticide imidacloprid and a pollutant from antidandruff shampoo in experimental rice fields. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(6), 1677-1687.
- **Sánchez-Bayo F., Wyckhuys K. A. G.** 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*. 232, 8–27.
- **Sánchez-Bayo F., Goulson D., Pennacchio F., Nazzi F., Goka K., Desneux. N.** 2016. Are bee diseases linked to pesticides?—A brief review. *Environment International*, 89, 7–11.
- **Sandrine H.** 2003. contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit gris (*Helix aspersa*) reproduction Expérimentale. thèse de doctorat. université Paul-Sabatier de Toulouse.10. pp:104-166.
- **Sandrine H., Henri-Gabriel D.** 2011. Synthèse de la structure tissulaire à la réalisation des fonction chez les gastropods pulmonés. École normale supérieure de Lyon. *Folia conchyliologica*, n°10, Avril 2011. pp : 23.p13 ,14
- **Sangita D. B.S., Khangarot.** 2010. Bioaccumulation and toxic effects of cadmium on feeding and growth of an Indian pond snail *Lymnaea luteola* L. under laboratory conditions. *Journal of Hazardous Materials*. 182 (2010) 763–770.
- **Saoudi M., Messarah M., Boumendjel A., Jamoussi K., El Feki A.** 2011. Protective effects of vitamin C against haematological and biochemical toxicity induced by deltamethrin in male Wistar rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 1765-1769.
- **Saratovskikh E.** Complexation with ATP as a cause of pollutants toxicity to aquatic Life, *J. Environ. Prot.* 4 (2013) 585-594.
- **Sathishsekar D., Subramanian. S.** 2005. Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 14(2).
- **Sbartai I.** 2009. Behavior of *Paramecium* sp. *BTAIJ*. 6:304-311.
- **Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi R., Sbartai H., Djebar M.R.** 2012. Induction of oxidative stress in a freshwater ciliated microorganism *Paramecium* sp., after treatment with Indoxacarb. *BTAIJ*. 6:304-311.
- **Scheifler R., Gomot-De Vaufleury A., Badot P.M.** 2002. Transfert of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa* : Bioaccumulation and Effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2002, 53 : 148-153.

- **Schmidt H. D., Duman R. S. 2007.** The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behavioural pharmacology*, 18(5-6), 391-418.
- **Schuytema G. S., Nebeker A. V., Griffis W. L. 1994.** Effects of dietary exposure to forest pesticides on the brown garden snail *Helix aspersa* Müller. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 26(1): 23-28.
- **Selye H. 1936.** A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*; 138: 32.
- **Selye H., Fortier C. 1949.** Adaptive reactions to stress. *Proc A Research Nerv & Ment Dis*; 29: 3.
- **Sharaf A.A., Mohamed A.M., Abu El-Ghar M.R., Mousa A.H. 1975.** Control of snail hosts of Bilharziasis in Egypt. 3. Effect of the organophosphorus insecticide dursban on carbohydrate metabolism of the snail *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. *Egyptian Journal of Bilharziosis*. 2: 49-61.
- **Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyek C. A., Newhall A.R., Freidman L., 1966.** A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, Lipid and Glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytic Biochemistry*. 19: 415-429.
- **Shijin W., Ermiao W., Lequan Q., Weihong Z., Jianmeng C. 2011.** Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. *Chemosphere*, 83: 429-434
- **Shirisha G., Mandava K., Batchu U. R., Thammana K. R., Turpu V. L. 2019.** Antitumor and antioxidant effects of flavonoid fraction of *Citrus sinensis* peel extract. *Pharmacognosy Journal*. 11(1), 57-63.
- **Sies H. 1991.** Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69: 8-10pp.
- **Simkiss K., Watkins B. 1991.** Differences in zinc uptake between snails (*Helix aspersa* Müller) from metal- and bacteria-polluted sites. *Functional Ecology*. 5: 787-794.
- **Simons J.E., Yang R.S.E., Bernan E. 1995.** Evaluation of the nephrotoxicity of complex mixtures containing organic metals: advantages and disadvantages of the use of red-world complex mixtures. *Environ. Health. Perspect.* 103: 67-71.
- **Singh D.K., Agarwal R.A. 1989.** Toxicity of piperonyl butoxide-carbaryl synergism on the snail *Lymnaea acuminata*. *International Review of Hydrobiology*. 74: 689-699.
- **Sisein E.A. 2014.** Biochemistry of Free Radicals and Antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB)*. Sch. Acad. J. Biosci. 2(2): 110-118.
- **Siwela A. H., Nyathi C. B., Naik Y. S. 2010.** A comparison of metal levels and antioxidant enzymes in freshwater snails, *Lymnaea natalensis*, exposed to sediment and water collected from Wright Dam and Lower Mguza Dam, Bulawayo, Zimbabwe. *Ecotoxicol Environ Saf.* 73(7): 1728-32.
- **Slamene N., frah. N. 2016.** Effets de quelques insecticides sur la coccinelle à sept points *coccinella septumpunctata* L. Au laboratoire. *Univ hadj lakhdar. Batna. Algérie.* p : 1219.
- **Smeriglio A., Alloisio S., Raimondo F. M., Denaro M., Xiao J., Cornara L., Trombetta D. 2018.** Essential oil of *Citrus lumia* Risso: Phytochemical profile,

antioxidant properties and activity on the central nervous system. *Food and Chemical Toxicology*. 119, 407–416.

- **Smeriglio A., Cornara L., Denaro M., Barreca D., Burlando B., Xiao J., Trombetta D.** 2019. Antioxidant and cytoprotective activities of an ancient Mediterranean citrus (*Citrus lumia* Risso) albedo extract: microscopic observations and polyphenol characterization. *Food Chemistry*, 279, 347-355.
- **Smith C.K., Moore C.A., Alahi E.N., Smart Â.T., Hotchkiss S.A.** 2000. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168,189-99
- **Snyman R.G., Reinecke A.J., Reinecke S.A.** 2003. Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60 (2005). 47–52.
- **Sonwa M.M.**, 2000. Isolation and Structure Elucidation of Essential Oil Constituents. Comparative Study of the Oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus*, and *Cyperus rotundus*. Ph.D. degree. University of Hamburg. Germany.
- **Sovoboda K., Greenaway R.I.** 2003. Lemon scented plants. *International Journal of Aromatherapy*. 13(1), 23-32.
- special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *American*
- **Starr J. M., Graham S. E., Ross D. G., Tornero-Velez R., Scollon E. J., DeVito M. J., & Hughes M. F.** 2014. Environmentally relevant mixing ratios in cumulative assessments: a study of the kinetics of pyrethroids and their ester cleavage metabolites in blood and brain; and the effect of a pyrethroid mixture on the motor activity of rats. *Toxicology*.320.15-24.
- **Steeve H., Thany., Pascal R et Guy L.** mars.2013. Neurotoxicité des pesticides Quel impact sur les maladies neurodégénératives. *m/s n°3*, vol. 29.
- **Stiévenart C., Hardouin J.** 1991. centre technique de Coopération Agricole et Rurale ACP/CEE,pp :34
- **Stocker R., Keaney J.F.** 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 84: 1381-1478.
- **Suteau P., Daubeze. M., Migaud M.L., Narbonne J.F.** 1988. PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring. *Marine Ecological progress search.* 46: 45-49.
- **Svobodová M., Šmídová K., Hvězdová M., Hofman J.**2018. Uptake kinetics of pesticides chlorpyrifos and tebuconazole in the earthworm *Eisenia andrei* in two different soils. *Environ Pollut* 236:257–264
- **Swaileh K.M., Ezzughayyar A.** 2001. Dose-dependent effects of dietary Pb and Zn on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 50: 9-14.

## T

- **Tahar W., Bordjiba O., Aimeur N.** 2017. Effet de l'hymexazole et de la prométhryne sur la qualité physico-chimique et biologique des sols agricoles. *Rev. Sci. Technol., Synthèse* 35: 37-44 p 38.
- **Tahar W.** 2016. Impact de la pollution par les pesticides sur la qualité des terres agricoles. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Protection

Conservation et Valorisation des Ressources Naturelles. Université de Annaba. p 161 ;p 5.

- **Taleb-Senouci D., Ghomari H., Krouf D., Bouderbala S., Prost J., Lacaille-Dubois M. A., Bouchenak M.** 2009. Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic. R. *Phytomedicine*, 16(6-7), 623-631.
- **Tanja C.**2015. Hymexazol: Ecological Risk Assessment for Registration Review. united states environmental protection agency washington office of chemical safety and pollution prevention.D.C. 20460.
- **Taylor J. W.** 1910.Life histories of British Helices *Helix (Pomatia) aspersa* Müll. J. Condi. London, 4 : 89-105.
- **Taylor J. W.** 1911. Monograph of the land and freshwater Mollusca of the British Isles. 6 fasc, 522 p. 35 p.
- **Tessier F., Marconnet P.** 2015. Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports*. 10(16): 1-13.
- **Tessier F., Marconnet P.**1995.Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice.*Science et Sports*.10.1-13pp.
- **Teuscher E., Anton R., Lobstein A.** 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition TEC & DOC Lavoisier. P : 6, 77.
- **the Fifth International Congress of Pesticide Chemistry.** Miyamoto.J. Keamey, P.
- **Thompson D'Arcy. W.** 2005. Forme et croissance, Seuil et Meinhardt H. *The Algorithmic Beauty of Sea Shells*, Springer, in Roux, J.B. *La coquille des mollusques*. 87: 234-239
- **Tomlin C.D.S.**2000.The pesticide manual, a world compendium.12thed.BritishCropProtectionCouncil.London. UK
- **Toreilles J., Guérin M.C., Roch P.** 1996. Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense endocrine. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III. Sciences de la vie*. 319(3): 209-218.
- **Torre I., Martin-Dominguez V., Acedos M.G.** 2019. Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 5975–5991.
- **Torres R., Mason A. Z.** 2002. The effect of tributyltin (TBT) on glutathione-S-transferase (GST) of the common garden snail, *Helix aspersa*. *Molecular Toxicology Laboratory. Department of Biological Sciences. California State University. Long Beach. CA, USA*.
- **Toxibeas.** 2023. Hymexazol. Un outil pour informer et guider les agriculteurs à réduire les risques des traitements sur les abeilles. Dernière mise à jour le 25/04/2023.
- **Trabut L., Marès R.** 1906. L'Algérie Agricole en 1906. Ed. Direction de l'agriculture, 534p
- **Tripoli E., Guardia M., Gimmanco S., DiMajo D., Giammanco M.** 2007. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties*Food.Chemistry*. 104: 466-479pp.
- **Tsan M.F., White J.E., Treanor C., Shaffer J.B.** 1990. Molecular basis for tumor necrosis factor induced increase in pulmonary superoxide dismutase activities. *Am J Physiol*. 259: 506- 512.



- **Tsao P., Guy S.** 1977. Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a Phytophthora-isolation medium containing hymexazol. *Phytopathology*. 67. 796-801.
- **Tsumbu C.N., Deby-Dupont G., Tits M., Angenot L., Frederich M., Kohnen S., Mouithys-Mickalad. A., Serteyn. D., Franck. T.** 2012. Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extract on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase. *Int.J. Mol.* 13 :628-650.
- **Turek C., Stintzing F.C.** 2013. Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 40–53.

## U

- **Ullah S., Ahmad S., Altaf Y., Dawar F. U., Anjum S. I., Baig M. M. F. A., Wanghe K.** 2022. Bifenthrin induced toxicity in *Ctenopharyngodon idella* at an acute concentration: a multi-biomarkers based study. *Journal of King Saud University-Science*.34(2). 101752.
- **Ullah S., Ahmad S., Altaf Y., Dawar F. U., Anjum S. I., Baig M. M. F. A., Wanghe K.** 2021. Bifenthrin induced toxicity in *ctenopharyngodon idella* at an acute concentration: a multi-biomarkers based study. *Journal Of King Saud University-Science*.34(2), 101752.
- **Utip B., Youn. B., Ibiang E., Victor I., Bassey E., Francis A.** 2013. Effect of Deltamethrin and Ridomil on Sperm Parameters and Reproductive Hormones of Male Rats. *Toxicol. Environ. Health* 9-14pp.
- **Uzun F.G., Kalender Y.** 2013. Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The role of quercetin and catechin. *Food and Chemical Toxicology*. 55: 549–556.

## V

- **Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.** 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160: 1-40.
- **Valnet.** 1984. *Aromathérapie*. Ed. Maloine. Paris
- **Van Iersel S., Swart E. M., Nakadera Y., Van Straalen N. M., Koene J. M.** 2014. Effect Of Male Accessory Gland Products On Egg Laying In Gastropod Molluscs. *J. Vis. Exp.* (88). E51698, Doi:10.3791/51698.
- **Vasseur M., Pousse A., Ferard G.** 1980. The relationship between surface tension and release of rat jejunal brush border membrane hydrolases induced by sodium deoxycholate. *Reproduction Nutrition Développement*, 20(5A), 1461-1466.
- **Vekiari S.A., Protopapadakis E.F., Papadopoulou P., Papanicolaou D., Panou C. Vamvakias M.** 2002. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 5 (1), 147-153.
- **Viard B., Maul A., Pihan J.C.** 2004. Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination. *J. Environ. Monit.*, 6 : 103-107.

## W

- **Wagner-Schuman M., Richardson J.R., Auinger P., Braun J.M., Lanphear B.P., Epstein J.N., Yolton K., Froehlich T.E.** 2015. Association of pyrethroid pesticide

exposure with attention-deficit/hyperactivity disorder in a nationally representative sample of U.S. children. *Environmental Health* 14, 44.

- **Walker M. M., Keith L.H.** 1992. EPA's Pesticide Fact Sheet Database. Lewis Publisher. Boca Raton. FL.
- **Wallace C.** 2008. Mitochondria as Chi. *Genetics*.179: 727-735pp.
- **Wang C., Chen F., Zhang Q., Fang Z.** 2009. Chronic toxicity and cytotoxicity of synthetic pyrethroid insecticide cis-bifenthrin. *Journal of Environmental Sciences* 21 ;1710–1715.
- **Wang L., Wang J., Fang L., Zheng Z., Dexian Z., Wang S., Li S., Ho C.T., Zhao H.** 2014. Anticancer activities of citrus peel polymethoxyflavones related to angiogenesis and others. *Biomed.*
- **Weckbecker G., Cory J.G., 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 1210 cells in vitro. *Cancer Letters*. 40: 257-264.
- **Weiss K.R., Brezina V., Cropper E.C., Heierhorst J., Hooper S.L., Probst W.C., Rosen S.C., Vilim F.S., Kupfermann I.** 1993. Physiology and biochemistry of peptidergic cotransmission in: *Aplysia*. *Journal of Physiology*. 87: 141-151.
- **Whetzel. J. E.** 1993a. Determination of three product chemistry parameters for hymexazol pure grade. Twin City Testing Corporation. Report No. 95/91-SAN.6.
- **WHO.** 1998a. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 1998. WHO/PCS/98.21/Rev.1. World Health Organization. Geneva. Switzerland.

## Y

- **Yang D., Wang X., Chen Y. T., Deng R., Yan B.** 2009. Pyrethroid insecticides: isoform-dependent hydrolysis, induction of cytochrome P450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnane X receptor. *Toxicology and applied pharmacology*. 237(1). 49-58
- **Yang J., Zhang G., Wang J., Feng L.** 2009. Response surface methodology as an approach to optimizing ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from navel orange peel. *Shipin Kexue*, 30(16), 94-97.
- **Yang Y., Clement D J.** 2013. Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified  $\alpha$ -tocopherol acetate. *Food Chemistry*, 141:473-481.
- **Yang Y., Wu N., Wang C.** 2018. Toxicity of the pyrethroid bifenthrin insecticide. *Environmental Chemistry Letters*. 16(4), 1377-1391.
- **Yehye W. A., Rahman N. A., Ariffin A., Abd Hamid S. B., Alhadi A. A., Kadir F. A., Yaeghoobi M.** *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 101, 295-312 ; dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.026.
- **Yeoh S., Shi J., Langrish T.A.G.** 2008. Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*. 218, 229-237.
- **Yeragi S.G., Koli A., Yeragi S.** 2000. Effect of pesticide malathion on protein metabolism of the marine crab, *Uca marionis*. *J. Ecotoxicol. Environ Monot.*, 10: 59-62.
- **Yesguer S.** 2014. Evaluation de l'écotoxicité de certains pesticides sur les sols par l'utilisation d'un biotest : cas des lombricidés. Mémoire de fin de cycle en vue Pour l'obtention du diplôme de Magister en Ecologie et Environnement. Université de Bejaia. P 116 P 2

- **Yongmei F., Weiguo M., Kehua L., Weikang H., Rui X. S., Qing X. Li.** 2017. Developmental toxicity and inhibition of the fungicide hymexazol to melanin biosynthesis in zebrafish embryos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. YPEST 4131.
- **Ypema H.** 2003. Fongicides, hymexazol. *Encyclopedia of agrochemicals* John Wiley & Sons, Inc. Publication. V.S.A. 572-537 pp.
- **Yu F., Wang Z., Ju B., Wang Y., Wang J., Bai D.** 2008. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 59: 415–423.

## Z

- **ZAAFOUR M.,** 2014. Étude écophysiological de la reproduction de l'escargot terrestre Petit-Gris (*Helix aspersa aspersa*, Gastropoda: Stylommatophora; Helicidae) dans la région Nord-Est d'Annaba– Algérie. doctorat sciences. université badji mokhtar-annaba. pp109.p35 ; 55.
- **Zaidi S.M.K.R., Banu N.** 2004. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta*. 340: 229-233.
- **Zama D., Meraihi Z., Boubekri N., Amrani A., Tebibel S., Baali N.** 2005. Assessment of the changes in some diagnostic enzymes and other parameters in wistar albino rats treated with pesticides during gestation. *Sciences & Technologie*. 23 : 51-56
- **Zeriri I., Tadjine A., Belhaouchet N., Grara N., Djebar M. R., Brebbah H.** 2012. Potential toxicity of an insecticide of the family of carbamate on a bioindicator model of the pollution the earthworm *Octadrilus complanatus* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Annals of biological research*, 3(11):5367-5373.
- **Zhang J., Yang Z., Lian. Y., Zhang L., Ling W., Guo. C., Liang G., Luo G., Ye Q., Zhong B.** 2018. Effects of postharvest time, heat treatment, pH and filtration on the limonin content in Newhall navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) juice. *Molecules*, 23(10). 2691.
- **Zhao X., Flynn B B., Roth A. V.** 2006. Decision sciences research in China: a critical review and research agenda-foundations and overview. *Decision Sciences*. 37(4) : 451-496.
- **Zhiri A.** 2006. Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News Sciences, Nutrition, Prévention et santé*. Edité par la Fondation pour le libre choix. (12): 8.
- **Zhongyi G., Jinglan Z., Yongpan R., Guo Z., Guobo S.** 2011. Studies on the effects of prochloraz and hymexazol to *Fusarium moniliforme* and *Rhizoctonia solani*. *J. Agri*. 32-36 (in Chinese)
- **Zhu Q., Qian Y., Zheng Z P L C., Chen F, Wang M.** 2012. Natural polyphenols alleviated lipid peroxidation- induced modification on BSA. *Journal of functional foods*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ff.2012.11.006>.
- **Zouaghi M F., berrebbah H., boudoucha I., rekaik I.** 2020. Evaluation of the toxicity of a mixture insecticides used on a biological model: the snail *Helix aspersa*. *Vasile Goldis University Press*. Vol 30. issue 2. 2020. Pp: 69 – 75.



# ANNEXES

ANNEXES

### Annexe 1 : Tableaux de la réalisation de la gamme d'étalonnage

**Annexe 1a :** Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines hépatopancréatiques.

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>BSA (µl)</b>	<b>00</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b>Eau distillée (µl)</b>	<b>100</b>	<b>80</b>	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>00</b>
<b>Réactif BBC (ml)</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

**Annexe 1b :** Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des glucides hépatopancréatiques.

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Solution mère de glucose (µl)</b>	00	20	40	60	80	100
<b>Eau distillée (µl)</b>	100	80	60	40	20	00
<b>Réactif d'Anthrone (ml)</b>	4	4	4	4	4	4

**Annexe 1c :** Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des lipides hépatopancréatiques.

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Solution mère de lipide (µl)</b>	00	20	40	60	80	100
<b>Solvant (éther /chloroforme) (1V/1V) ml</b>	100	80	60	40	20	00
<b>Vanilline (ml)</b>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

### Courbes d'étalonnages pour le dosage des métabolites

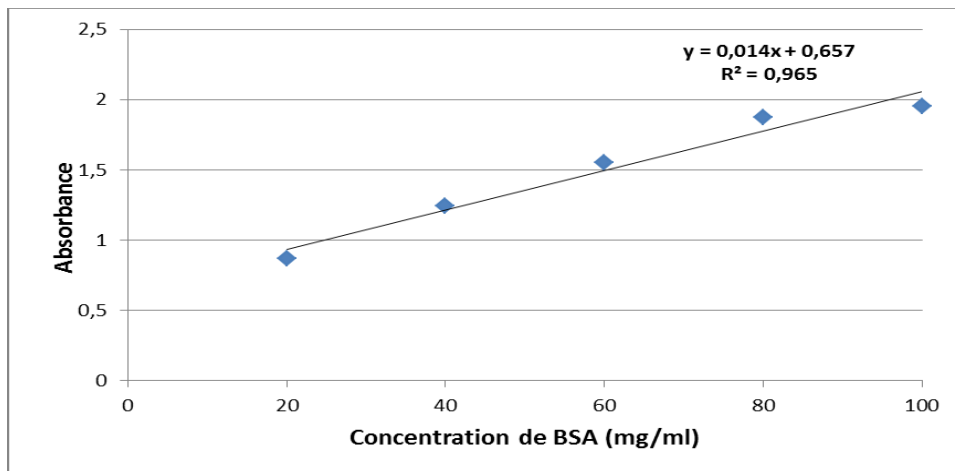


Figure (1a) : Réalisation de courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines.

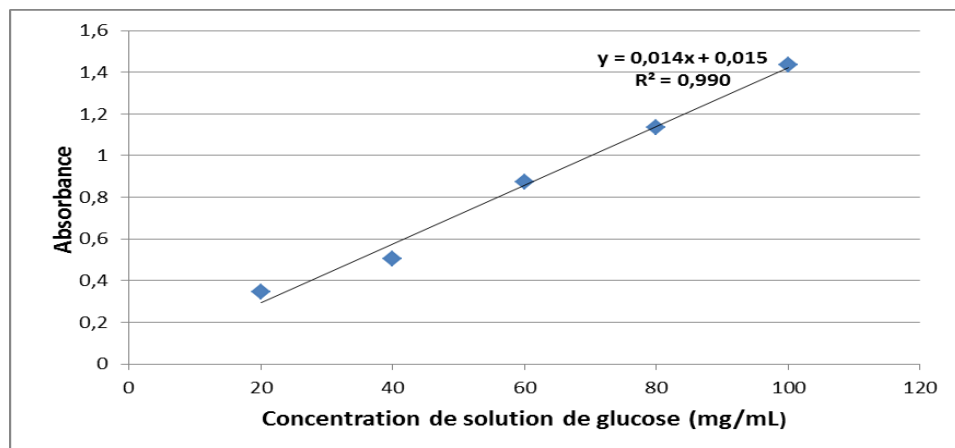


Figure (1b) : Réalisation de courbe d'étalonnage pour le dosage des glucides.

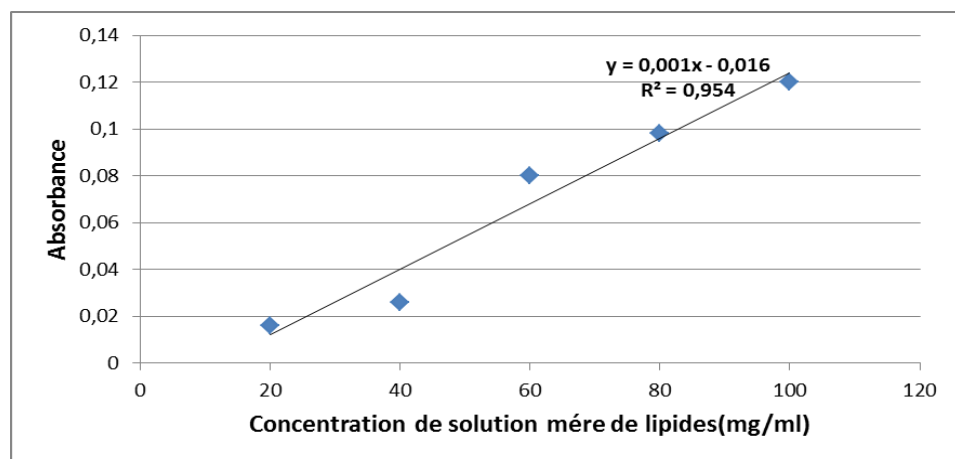


Figure (1c) : Réalisation de courbe d'étalonnage pour le dosage des lipides.

## **Annexe 2 : Production scientifique (Publications et communications)**

### **Publications internationales**

**Yousfi A**, Djabri B, Gasmi S, Lemita L. (2022). Bifenthrine & Hymexazol Toxic Effects on *Helix aspersa* and the Evaluation of the Protective Effect of Orange Essential Oils. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 26(01), 3270–3284.

### **Communications Internationales**

**Yousfi A**, Djabri B, Rouabhi R, Bouteraa Z, Toualbia N. Study of the toxic effects of Bifenthrine and Hymexazole on *Helix aspersa* and evaluation protective effet of the essential oils of orange. Medicinal Plants and Materials (MPM), Tebessa (Algeria), February 25 to 27, 2020.

**Yousfi A**, Djabri B, Rouabhi R, Bouteraa Z, Toualbia N. Study of the toxic effects of Bifenthrine and Hymexazole on *Helix aspersa* and evaluation protective effet of the essential oils of orange. 1<sup>st</sup>IC NBR-VAL, Tebessa (Algeria), septembre 24-26,2023.

### **Communications nationales**

**Yousfi A**, Djabri B, Rouabhi R, Bouteraa Z, Toualbia N. Study of the toxic effects of Bifenthrine and Hymexazole on *Helix aspersa* and evaluation protective effet of the essential oils of orange. Premier séminaire scientifique sur l'état de la biodiversité dans les parcours steppiques (SNBS), 29-29 octobre 2019.

## **Bifenthrine & Hymexazol Toxic Effects on *Helix aspersa* and the Evaluation of the Protective Effect of Orange Essential Oils**

**Amani Yousfi<sup>1</sup>, Belgacem Djabri<sup>1</sup>, Salim Gasmi<sup>2\*</sup>, Lobna Lemita<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of bioactive molecules and applications, LarbiTebessi University, Tebessa, 12002. Algeria

<sup>2</sup>Applied Biology department, Faculty of Exact, Nature and Life Sciences, LarbiTebessi University, Algeria,

\*Corresponding author: Dr. Salim Gasmi. *Email: [Salim.gasmi@univ-tebessa.dz](mailto:Salim.gasmi@univ-tebessa.dz), Tel: +213550861697*

### **ABSTRACT**

The aim of this work is to study of the toxicity induced by two types of pesticides (bifenthrin (BF) and hymexazole (HY)) at the hepatopancreatic level in *Helix aspersa*, which is a bioaccumulator organism and bioindicators in environmental pollution, as well as the evaluation of the protective effect of orange essential oils (OEO).

This is an experimental study conducted in the laboratory on 40 *Helix Aspersa* snails that have been divided into four groups (10 snails each): (i) a control group, (ii) a group injected by the OEO (0.151 UL /g), (iii) a group injected by the combination BF (0.83 mg /ml) and HY (90 ug /g) and (IV) a group injected by the OEO, BF and HY mixture. The treatment was stopped after 90 days. Five oxidative stress markers (MDA, GSH, GST, GPX and CAT) as well as mitochondrial respiration have been measured. In this study, the results show that the BF and HY mixture induces an increase in MDA and GSH levels as well as an increase in the enzymatic activity of the GST, Catalase, and GPX at the hepatopancreatic level. We have also shown that these two pesticides cause a decrease in the level of the mitochondrial respiration. In addition, this results show that OEO supplementation restored most of oxidative stress markers to levels close to those of control group. Our study suggests that OEO can be used as an effective antioxidant to alleviate the of oxidative stress intensity induced by the BF and HY mixture.

**Keywords** :-Bifenthrine, Hymexazol, essential oil, orange, *Helix Aspersa*, toxicity, protective effects, oxidant stress, mixtures.

### **Introduction**

Phytosanitary products include several classes, the three main ones of which are: fungicides, herbicides and insecticides. These three classes alonerepresent almost all of the world market



(97%) [1]. In Algeria, the use of insecticides, fertilizers, detergents and other phytosanitary products is increasingly spreading with the development of agriculture, but also in the context of control of harmful vectors. This use of toxic chemicals is likely to cause serious soil pollution and water bodies and threatens the health of the population [2].

Bifenthrin is a Pyrethroid used against a range of agricultural pests [3]. BF comes in the form of a beige waxy product. It is practically insoluble in water but soluble in most organic solvents and remains stable at 25 °C and 50 °C for two years [4]. Its properties such as low solubility in water and photo-stability make it an effective insecticide and acaricide against a wide range of leaf pests in agriculture [5, 6]. Compared to other Pyrethroids, the toxic effects of bifenthrin are more important. Indeed, some studies describe the alteration of biochemical, hematological and histopathological parameters because of its toxicity [7,8].

Hymexazole is the active substance of a systemic seed fungicide marketed in Algeria under the name of Tachigazol. It belongs to the chemical family of Triazines, [9]. Hymexazole comes in the form of a liquid soluble in methanol, acetone, ethyl acetate, hexane, toluene and dichloromethane [10].

The data on the ecotoxicity of the BF and the HY are rare. To carry out toxicological studies, it is necessary to have indicators of environmental disturbance through organisms or a set of organisms that are used as sentinels by studying the physiological, biochemical and ecological changes that affect them. The snail (*Helix aspersa*) constitutes a biological model widely used in toxicological studies [11, 12, 13, 14, 15]. Invertebrates in the structure of communities and the functioning of terrestrial and aquatic ecosystems justify the interest of extending ecotoxicological research and procedures to these animal groups [12].

The toxicity induced by the two pesticides, at the hepatopancreatic level in *Helix aspersa* causes significant oxidative stress and changes in the activity of antioxidant enzymes. In order to reduce the harmful effects of pesticides, several chemicals with antioxidant properties have been proposed. Orange essential oils (*Citrus sinensis*) are widely used by pharmaceutical industries and phytotherapy and are known for their antioxidant properties which can be grouped into non-volatile and volatile fractions [16].

The first objective of this study is to assess the toxic effects of exposure to the mixture of these two pesticides (BF+HY) on certain biomarkers of oxidative stress at the hepatopancreatic level.

The second objective is to estimate the possible protective effect of essential oils of the orange peel to reduce the toxic effects of these substances on the snail.

## **Material and methods**

### **Plant material**

The oranges were bought at the Tébessa commune market during the month of December 2020. Mature and healthy fruits were selected. The identification of the species *Citrus Sinensis* (*Thomson Navel*) was made by Ms. Hioun (botanist working at the University of Tébessa) on the basis of descriptive criteria (presence of seeds, navel, skin, color). The orange peel was cut into small pieces and dried in the shade for 15 days at room temperature.

### **OEO extraction**

The extraction of the essential oils of the orange peel was carried out by hydrodistillation using the Clevenger-type apparatus. One hundred grams (100 g) of plant material was introduced with 1200 ml of distilled water in a balloon. After installing and closing the assembly, the balloon heating is set up with optimum heating adjustment to allow stability of the extraction at a constant and well controlled speed. The steam loaded with essential oil arrives in the condenser. The total duration of the extraction is estimated at 3 h. The essential oil is distinguished from hydrosol (aromatic water) by its difference in density and color. The OEO was separated and then recovered and kept in an amber bottle tightly closed and stored at 4 °C.

### **Animals**

The biological material used in our research work is the *Helix aspersa* snail, commonly known as a little-gris, which is a gastropod mollusk, a terrestrial pulmonary pen belonging to the Helicidae family. The snails used (in the number of 40 snails) are adults with an average weight of 12 g ( $\pm$  0.35g) collected in a site untreated by pesticides located in the Bekkaria region (Wilaya of Tébessa). They are then transferred to the laboratory where they are put in transparent plastic boxes with perforated cover containing water soaked in water to maintain humidity. They were fed on fresh eastern lettuce leaves. The boxes are cleaned regularly 3 times a week and the diet has been renewed daily. The snails were kept for an adaptation period of 15 days before the treatment, which was spread over a period of three months in optimal environmental conditions: Photoperiod of 18h of light/24h, temperature  $20 \pm 2$  °C and hygrometry of 80 to 95 %.

### Chemical products

**Bifenthrine:** According to Nieradko(2015) [17], the bifenthrine insecticide nomenclature used in this study is [2-methylbifényl-3-ylmethyl (Z)-(IRS) -cis-3 (2-Chloro-3, 3, 3-Trifluoroprop-1-Enyl)-2, 2-Dimethyl Cyclopropane Carboxylate] was purchased in a store selling agricultural equipment in the town of Tebessa and marketed under the name Tristar, 10% EC.

**Hymexazol:** [C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>: 5-methyl-3 (2h) -isoxazalone] [9] used in this study was also purchased in a store selling agricultural equipment in the town of Tebessa and marketed Under the name Snake, 30% SL.

### Experimental protocol

The experiments were carried out on 40 snails (*Helix aspersa*). Four (04) groups were created (10 snails each) as follows:

**Group 1 (T):** Control, the snails were injected with physiological water (20 µl/g/d).

**Group 2 (OEO):** The snails were injected by the OEO with a dose of 0.151µl/g/d body weight.

**Group 3 (BF + HY):** The snails were injected with HY (90 µg/g/d) + BF (0.83 mg/ml/g) of body weight.

**Group 4 (OEO + BF + HY):** The snails were injected with the mixture (OEO + BF + HY) with the same doses. OEO was administered 30 minutes before pesticides.

The injection was carried out using a micro-serringue over a period of 90 days.

After the treatment period, snails are kept on an empty stomach for 48 hours to empty their digestive system. They are then sacrificed by freezing at -20 °C and then dissected to remove hepatopancreas.

### Dosage of glutathione and lipid peroxidation

#### • GSH

The dosage of glutathione carried out according to the method described in Weckbker and Cory (1988) [18]. The principle of this determination is based on the absorbance of 2nitro-5-mercapturical.

#### • MDA

The MDA can be detected by a colorimetric reaction with thiobarbitric acid (TBA). MDA detection after degradation of polyunsaturated fatty acids is 3 or 4 double peroxidated bonds. The dosage of MDA is carried out according to the method described in Esterbaeret *al.* (1992) [19].

### **Dosage of antioxidant enzymes**

#### **✓ GPX**

Enzymatic activity of glutathione peroxidase was measured by the procedure described in Flohe and Gunzler (1984) [20], using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a substrate. The absorbance was recorded at 420 nm.

#### **✓ GST**

The measurement of glutathione S Transferase (GST) activity was determined according to Habig *et al.* (1974) [21]. It is on the basis of the conjugation reaction between the GST and a substrate, the CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) as a glutathionic cofactor (GST), the conjugation leads to the synthesis of a new molecule: 1S-glutathionyl-2,4-dinitrobenzene to measure the activity of the GST. The decrease of absorbance is recorded for three minutes by a spectrophotometer at a wavelength of 340 nm.

#### **✓ CAT**

The spectrophotometric dosage of the Catalase activity (CAT) was carried out according to the method of Cakmak and Horst (1991) [22]. The reduction in absorbance is recorded for 3 minutes using a spectrophotometer at a wavelength of 240 nm and an extinction coefficient = 39400 L • μm<sup>-1</sup> • CM<sup>-1</sup>.

### **Mitochondria extraction**

The extraction of mitochondria was made according to the method described by Kristal *et al.* (1991) [23]. It is based on the preparation of a homogenate followed by differential centrifugation. The cells were placed in an isolation pad containing 1 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5, 70 mM Saccharose, 210 mM Mannitol, at +4 °C. Then, the homogenate was transferred to a centrifugal tube of several differential centrifugations at 4 °C. Finally, the mitochondrial base was washed twice and then suspended in 1 ml of isolation buffer to obtain the fresh mitochondrial suspension, a fraction of which will be used directly in the evaluation of mitochondrial breathing, the rest is kept at -80 °C for the rest of the dosages.

### **Mitochondrial Respiration test**

Respiration has been estimated using an oxygraph (hansatech) using an oxygen electrode according to the method described by Rouabhiet *et al.* (2006) [24] and Rouabhiet *et al.* (2009) [25].

### **Statistical analysis**

Statistical calculations were carried out using the Minitab 18.1 statistical software and Excel 2007 software (Microsoft, Inc.). Our data were analysed statistically using one-way analysis of variance, followed by the Tukey test for the comparison between the different groups between them. The differences are considered significant as follows: significant when P ≤ 0.05, highly significant when P ≤ 0.01, very highly significant when P ≤ 0.001.

### **Results**

#### **Orange peel yield in essential oils**

Orange peel essential oil yield recorded in this study is 1.05%.

### GSH and MDA assessment

We have observed a very highly significant increase ( $p \leq 0.001$ ) of the MDA rate in the lot treated by the HY+BF compared to witnesses ( $1.36 \pm 0.06 \mu\text{M} / \text{mg}$ ), while in the lot treated by the HY+BF combined with OEO we have noted a very highly significant decrease in the rate of MDA ( $p \leq 0.001$ ) ( $0.62 \pm 0.06 \mu\text{M} / \text{mg}$ ) against ( $0.99 \pm 0.09 \mu\text{M} / \text{mg}$ ) among witnesses (fig. 01).

Treatment of snails with the HY+BF for 90 days leads to a very highly significant increase ( $p \leq 0.001$ ) of the GSH content at the hepatopancreatic level ( $3.83 \pm 4.52 \times 10^{-5} \mu\text{M} / \text{mg}$ ) and decrease very highly significant after administration of OEO the snails compared to the control group (fig. 02).

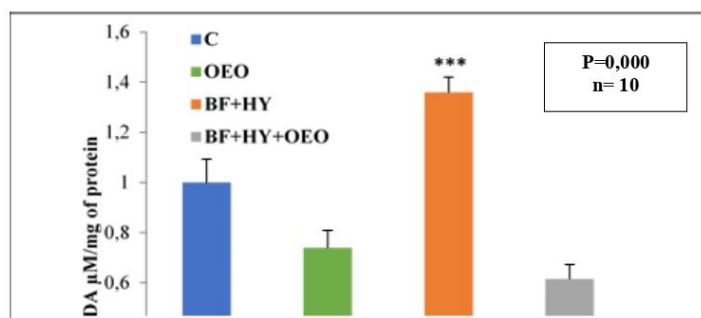


Fig 01. Variation of MDA rate ( $\mu\text{M} / \text{mg prot}$ ) in hepatopancreas of *Helix aspersa* after 90 days of treatment ( $P < 0.001$ ).

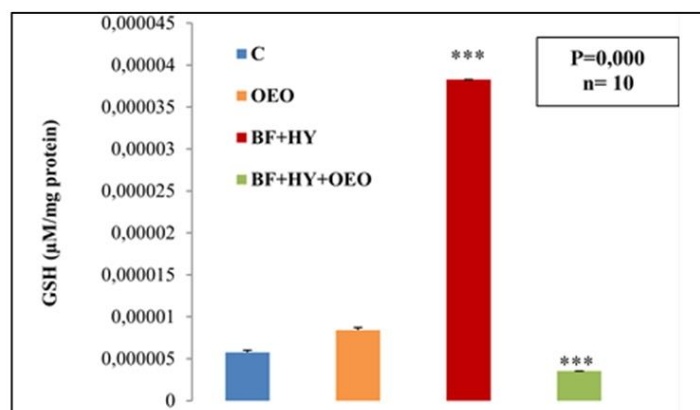


Fig 02. Variation of GSH content ( $\mu\text{M} / \text{mg prot}$ ) in hepatopancreas of *Helix aspersa* after 90 days of treatment ( $P < 0.001$ ).

### Evaluation of the enzymatic activity of GPX, GST and CAT

The treatment with HY+BF has led to an increase in the enzymatic activity of the GST, CAT and significant decrease in GPX compared to the control. However, the group treated with a combination of OEO and HY+BF shows a decrease in GST and CAT and an increase in GPX respectively, in comparison with the control group (figs 03, 04 and 05).

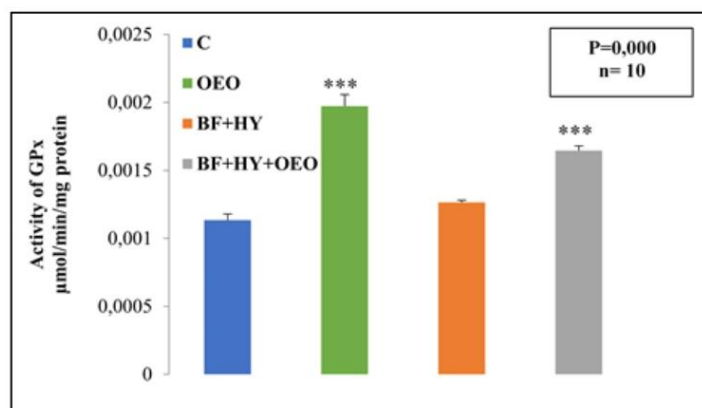


Fig 03. Variation of GPx activity ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ ) in hepatopancreas of *Helix aspersa* after 90 days of treatment ( $P < 0.001$ ).

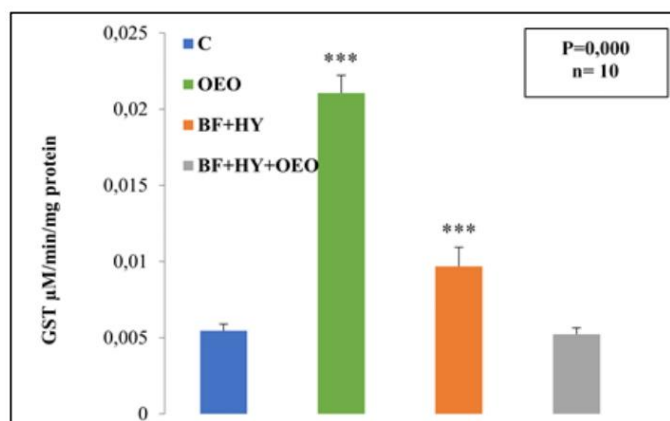
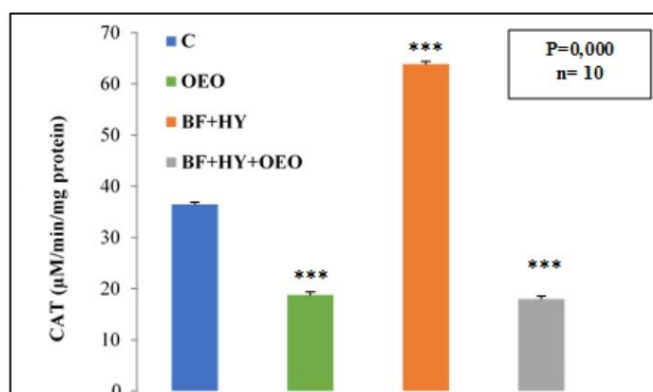


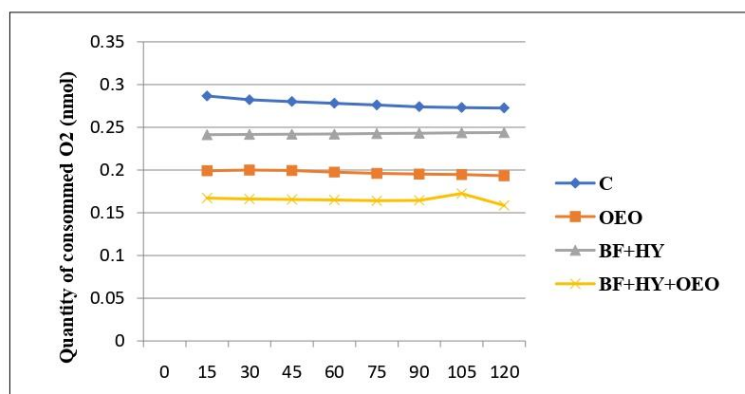
Fig. 04. Variation of GST activity ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg prot}$ ) in hepatopancreas of *Helix aspersa* after 90 days of treatment ( $P < 0.001$ ).



**Fig. 05. Variation of CAT activity ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mgprot}$ ) in hepatopancreas of *Helix aspersa* after 90 days of treatment ( $P<0.001$ ).**

#### Mitochondrial respiration assessment

Our results illustrate a decrease in oxygen consumption at the mitochondrial level for all groups of snails compared with the control group. We have noted a slowdown in respiratory metabolism in particular in the snails treated by mixture of BF + HY.



**Fig 6. Effect of mixture (BF + HY) on mitochondrial respiration (nmol/sec) after 90 days of treatment .**

## Discussion

Pesticides enter the body of the snail through various ways (oral, dermal or by injection) and cross several barriers before reaching the hepatopancreas which is an organ for detoxifying xenobiotics. Hepatopancreas, an important site of metabolism, accumulation, biotransformation, and the excretion of many xenobiotics, is one of the most studied organs [26].

In this research we were interested on the one hand on the hepatotoxicity of the mixture bifenthrin + hymexazol and on the other hand on the hepatoprotective properties of orange essential oils after chronic exposure in accordance with previous studies that have studied the toxicity of pesticide mixtures on a soil pollution bioindicator *Helix aspersa* [2, 15].

Currently, existing data are insufficient to conclude on the effect of pesticide mixture (hymexazol+bifenthrin) on gastropods on the one hand because of the lack of such studies in the literature and on the other hand because some studies have shown that the effect of a mixture does not necessarily reflect the effects of individual substances [27]. The possible interactions between the components of a mixture are therefore quite complex and make the prediction of the global effect very difficult [28]. The comparison of our results with those of the literature will be done, if possible, with the work carried out on pesticides of the same family and on other biological models close to snails.

The biomarkers of oxidative stress measured in this study are the rate of GSH and MDA and the activity level of CAT, GST and GPx, which are the most important parameters that can be useful in the evaluation of the hepatotoxic effects of BF and HY mixture.

A very significant increase in GSH content is recorded in our study after exposure to BF + HY mixtures at the hepatopancreatic level. Similar results have been observed by Salama *et al.* (2005) [29], in the same kind of gastropod after exposure to methomyl and chlorpyrifos, also the activity of this enzyme is in accordance with the results indicated by Zeriri (2013) [30], in earthworms treated by methomyl in comparison with the control group.

The rate of malondialdehyde is often used as an indicator of lipid peroxidation of membranes. Indeed, according to Bebianno *et al.* (2005) [31] and Al-Mutairi and Craik (2007) [32]. The increase in the rate of malondialdehyde indicates a lipid peroxidation. The Pampanin *et al.* (2005) [33] latter is followed by changes and a degradation of membrane structures, there follows a loss of receptors and enzymes of the membrane. The MDA level increases in



proportion to the concentrations of two pesticides (BF + HY). This result is in accordance with the results of other studies that have highlighted an increase in lipid peroxidation after treatment with endosulfan and chlorpyrifos in rats [34].

The increase in the rate of MDA could be due to the generation of toxic free oxygen radicals. Bouaricha [35] studied the toxicity of biopesticide based on benzoate emamectin on the *Helix Aspersa* terrestrial snail. He found a dose dependent of MDA in the hepatopancreas. The same results are reported by Bourbia (2012) [15] who showed that snails exposed to a chronic dose of mixtures BF + HY increased the level of GP<sub>x</sub> and GST and CAT in a very highly significant way compared to the controls.

A gradual increase in the rate of GP<sub>x</sub> has been observed in the *Helix pomatia* treated by the CU (100 µM), this would be due to the primary defense mechanism against the reactive species of the "ERO" oxygen which catalyzes the conversion of peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hydrogen in H<sub>2</sub>O in hepatopancreas cells [36].

Sbartaiet al. (2009) [37] and Benbouzide (2012) [38] have also shown an inhibition of the respiration of paramecies in the presence of bifentazate and phosphoramidate. The results of these two studies are consistent with ours. In fact, we have highlighted an inhibition of the respiratory metabolism of the *Helix Asperca* snails particularly in the mixtures BF + HY. These results suggest the release of free radicals at the mitochondrial level. The current results indicate that compounds:bifenthrine and hymexazole are very effective in creating this poisoning and influencing snail.

In this study, the hepato-protector effect of OEO was corrected for all enzymatic parameters (MDA, GSH, GST, CAT, GP<sub>x</sub>). Some recent publications have reported that certain essential oils are more effective than some synthetic antioxidants [39]. Various experimental studies have shown the existence of an important relationship between the essential oils of the orange peel and the decrease in the oxidation of low -density lipoproteins in the blood [40]. The antioxidant effects of essential oils and plant extracts are mainly due to the presence of hydroxyl groups in their chemical structure [41].

## Conclusion

In this work, we are interested in the toxic effect of BF + HY mixtures and the protective effect of OEO on a cellular and subcellular level. Their mixtures exercise toxic action in *Helix*

*aspersa* adults, resulting in an increase in the activities of the GST, GP<sub>x</sub> and CAT as well as the rates of GSH and MDA. These changes are probably linked to an increase in the release of reactive oxygen species. In addition, we have shown that the OEO can effectively protect from cell death induced by the BF + HY mixture in the hepatopancreatic tissue of *Helix aspersa*.

#### **Compliance with Ethical Standards:**

This study has no funding from any institution.

#### **Conflict of Interest:**

There is no conflict of interest.

#### **References**

- [1] Louat, F, Etude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle *Drosophilamelanogaster*. Sciences agricoles, Université d'Orléans, Français, **2013**. pp 224, p1.
- [2] Zouaghi, M. F., Berrebbah, H., Boudoucha, I., Rekaik, I, Evaluation of the toxicity of a mixture insecticides used on a biological model: the snail *helix aspersa*, *Studia Universitatis "Vasile Goldiș"*, *Seria Științele Vieții Vol. 30, issue 2*., **2020**, pp. 69 – 75, p1.
- [3] Frances, S.P, Evaluation of bifenthrin and permethrin as barrier treatments for *militis* caryentents against mosquitoes in queens land. AUSTRALIA, Journal of the American Mosquito Control Association 23(2), **2007**. 208-212, p208.
- [4] Beausoleil, C., Bonnard, N., Falcy, M., Jargot, D, Bifenthrine. Fiche toxicologique 274, Paris, INRS édition. Aturereview. Équiterre. Canada., **2009**, pp 68.
- [5] Dar, M. A., Raina, R., Mir, A. H., Verma, P. K., Pankaj, N. K., & Sultana, M, Protective Role of L-ascorbic Acid in Oxidative Stress Induced by Repeated Oral Administration of Bifenthrin in Wistar Rats. *Journal of Animal Research*: v.6 n.1, **2016**, p. 39-42.
- [6] Walker, M.H., and Keith, L.H, EPA's Pesticide Fact Sheet Database. Lewis Publishers, Chelsea., **1992**. MI : 2-12.
- [7] Shakoori, A.R., Naveeda, T., and Sameem, M.A, Response of melathion-resistant and susceptible strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) to bifenthrin toxicity. *Pak. J. Zoology*, **1994**. 26(2): 169-178.

- [8] Ahmed, S., Saleem, M.A., and Khurram, R.K, Effect of cypermethrin (10 EC) and bifenthrin (10 EC) on levels of acid and alkaline phosphatases in a strain of *tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: tenebrionidae). *Pak. Entomol.*, **2004**, 26: 47-51.
- [9] Tahar, W., Bordjiba, O., Aimeur, N, Effet de l'hymexazole et de la prométhryne sur la qualité physico-chimique et biologique des sols agricoles. *Rev. Sci. Technol.*, **2017**, Synthèse 35: 37-44.
- [10] European Food Safety Authority, Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance hymexazol. *EFSA Journal.*, **2010**, 8:8. p 17.
- [11] Little, E., Archeski, R., Flerov, B., Koslovskay, V, Behavioural indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Environ. Contam. Toxicol.*, **1990**, 19, 380-385.
- [12] Gasmi S. 2018. Classic Labyrinth Test for Neurobehavioral Evaluation in Wistar Rats. *Bioprotocol*. <https://bio-protocol.org/e3007>.
- [13] Youness, M, Impact de la formulation et du mélange de deux pesticides (mésothrine et tébuconazole) sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes., **2013**. N° d'Ordre : D. U. 2378, p321.
- [14] Gasmi S et al. Preventive effects of *citrullus colocynthis*. *L* plant extract on deltamethrin pesticide induced pneumotoxicity in wister rats. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2022. 11(6).
- [15] Bourbia-Ait-Hamlet, S, Évaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*., **2012**, p 177.
- [16] Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Dugo, P., Dugo, G, Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal.*, **2005**. 20(2): 136-140pp.
- [17] Nieradko-Iwanicka, B., Borzecki, A., & Jodłowska-Jedrych, B, Effect of subacute poisoning with bifenthrin on locomotor activity, memory retention, haematological, biochemical and histopathological parameters in mice. *Journal of Physiology and Pharmacology.*, **2015**, 66, 1, 129-137 p 129.

- [18] Weckbker, G., & Cory, J. G, Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett.*,**1988**. 40, 257-264.
- [19] Esterbaer, H., Gebicki, J., Puhl, H., &Jungens, G, The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.*,**1992**. p13, pp 341.
- [20] Flohe, L., Gunzler, W.A, Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* , **1984**, 105, 114–121.
- [21] Habig, H., Pabst, M.J., Jokoby, W.B, Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **1974**, 249, 7130–7139.
- [22] Cakmak, I., Horst, W.J, Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum.*, **1991**, 83, 463–468.
- [23] Kristal, B. S., Park, B. K., &Yu, B. P, 4-hydroxynonanal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J. Biol. Chem.*, **1996**,271, 6033-6038.
- [24] Gasmi S, Benaicha B, Rouabhi R, Kebieche M. Hematotoxicity Resulting from Chemotherapy in Patients with Breast Cancer in eastern Algeria. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 2021. 25(6), 20308–20319.
- [25] Gasmi, S. Neurotransmission dysfunction by mixture of pesticides and preventive effects of quercetin on brain, hippocampus and striatum in rats. *Toxicol. Environ. Health Sci.* **2020**.12, 203–212.
- [26] Odendaal, J.P., Reinecke, A.J, Quantifying histopathological alterations in the hepatopancreas of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a biomarker of cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2003**. 56(2): 319-325.
- [27] Padhi, B.K., Pelletier, G., Williams, A., Berndt-Weis, L., Yauk, C., Bowers, W.J., and Chu, I, Gene expression profiling in rat cerebellum following in utero and lactational exposure to mixtures of methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Toxicological Letters.*,**2008**. 176(2): 93-103.
- [28] Lodovici, M., Aiolfi, S., Monserrat, C., Dolara, P., Medica, A., Di, Simplicio, P, Effect of a mixture of 15 commonly used pesticides on DNA levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and

- xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*, **1994**. 13(3): 163-168.
- [29] Salama, A.K., Osman, K.A., Saber, N.A., Soliman, S.A, Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **2005**. 8: 92-96.
- [30] Zeriri, I, Toxicité potentielle d'un insecticide sur un invertébré de la famille des coelomates., **2013**. pp94,p57.
- [31] Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A, Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathy-modiolusazoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol*, **2005**. 75, p.354–373.
- [32] Al-Mutairi D. A., Craik J.D., Batinic-Haberle I., Benov L T, Induction of oxidative cell damage by photo - treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. *Free radical research*, **2007**. 41, 89-96.
- [33] Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C, Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venic Lagoon (Italy). *Mar.Pollut. Bull*, **2005**.50, 1548-15557.
- [34] Chebab, S., Belli, N., Leghouchi, E., Lahouel, M, Stress oxydatif induit par deux pesticides : l'endosulfan et le chlorpyrifos. *Environnement, Risques & Santé – Vol. 8, n° 5, septembre-octobre*, **2009**, p430.
- [35] Bouaricha, H, Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium* sp.). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, **2013**.55p.
- [36] Halliwell and Chirico S, Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*. **1993**.57, p.715-724
- [37] Sbartai I ; Berrebbah H., Rouabhi R., Sbartai H. and Djebbar M.R., Behavior of *Paramecium* sp treated with bifenazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *American Eurasian J. Toxicol.*, **2009**. Sci1,13-18.

- [38] Benbouzib, H , Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliés. Thèse de doctorat de l'université'Annaba.,**2012**. p 87.
- [39] Hussain, A. I., Anwar, F., and Shahid, M, a Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Menthaspicata* L) from Pakistan. *Journal of Essential OilResearch*.,**2010**. 22 (1) : 78-84.
- [40] Hussain, A. I, Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae.Thèsedoctorat, université'Agriculture Faisalabad, Pakistan.,**2009**, p 257.
- [41] Gonzalez-molina, E., Dominguez-perles, R., Moreno, D.A., Garcia-viguera, Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.,**2010**.51: 327-345 pp.