



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Larbi Tébessi -Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la vie

Département des êtres vivants

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie (SNV)

Filière: Sciences Biologiques

Option: Ecophysiologie Animale

Thème:

Impact des pratiques agricoles sur une espèce bio-indicatrice de la pollution (Mollusque : Gastéropode).

Présenté par:

OUARGHI NADJLA

SOUAHI SAOUSSEN

Devant le jury:

Dr. TINE Samir

Université de Tébessa

Président

Pr. TINE-DJEBBAR Fouzia

Université de Tébessa

Promoteur

Dr. BOUZERAA Hayette

Université de Tébessa

Examineur

Melle. ATTIA Laila

Université de Tébessa

Membre invité

Date de soutenance : Le 31 Mai 2018

Année Universitaire : 2018 /2019

Note : /20

Remerciements

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur Samir TINE, Maître de conférences (Université Larbi Tébessi, Tébessa) pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Ma gratitude et ma reconnaissance s'adresse à Mme Fouzia TINE-DJEBBAR ma Directrice de thèse (Professeur au Département des êtres vivants, Université Larbi Tébessi, Tébessa) pour avoir accepté de diriger mes recherches. Je la remercie pour sa patience, sa disponibilité permanente et pour les conseils avisés qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie infiniment Melle Hayette BOUZERAA, Maître de conférences (Université Larbi Tébessi, Tébessa), pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail et d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Mes plus vifs remerciements et toute ma considération à Melle Laila ATTIA (Doctorante au Département des êtres vivants, Université Larbi Tébessi, Tébessa) qui a bien codirigé ce travail et de me faire l'honneur d'assister à ce jury.

Enfin, à toute l'équipe de Biologie Animale, je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Merci 

Dédicace

À Nos parents

Nos familles

Et Nos amies

Merci beaucoup à toutes et à tous.



Résumé

En Algérie, l'utilisation des pesticides, des fertilisants, des engrais, et autres produits phytosanitaires connaît une augmentation au cours de ces dernières années avec le développement de l'agriculture, mais aussi dans le cadre des actions de lutte contre les vecteurs nuisibles. Ces traitements ont des conséquences environnementales et des conséquences sanitaires à long terme liées aux infiltrations de ces substances non dégradables dans les sols, dans les sources et les nappes phréatiques, puis vers les écosystèmes : les végétaux, les animaux et particulièrement l'homme.

Notre objectif était d'étudier les effets d'un insecticide, le Decis, un herbicide, le Zoom et un engrais, le Weatfert appliqués par voie orale, à deux concentrations : recommandé et recommandée X2 sur l'escargot terrestre *Helix vermiculata*, utilisé comme espèce bioindicatrice de la contamination des sols. Les expérimentations ont été menées sur la croissance, sur la composition biochimique et sur deux biomarqueurs de l'hépatopancréas.

Le suivi de la croissance de *Helix vermiculata* montré l'inhibition de la croissance des escargots (poids frais) sous l'effet de tous les traitements.

Des perturbations significatives sont notées dans la composition biochimique de l'hépatopancréas (contenu en glucides totaux, protéines totales et lipides totaux) après deux mois de traitement.

Enfin, nos résultats révèlent aussi une induction du système de détoxification des molécules testées, le Decis, le Zoom et Weatfert augmente l'activité spécifique des deux biomarqueurs, le glutathion peroxydase et le catalase.

Mots Clès: *Helix vermiculata*, pesticides, croissance, composition biochimique, GPx, Catalase.

Abstract

In Algeria, the use of pesticides, fertilizer and other phytosanitary products has been increasing in recent years with the development of agriculture, but also in the context of actions to combat harmful vectors. These treatments have environmental consequences and long-term health consequences related to the infiltration of these non-degradable substances into soils, sources and aquifers, and then to ecosystems: plants, animals and especially man.

Our objective was to study the effects of an insecticide, the Decis, an herbicide, the Zoom and a fertilizer, the Weafert, applied orally, at recommended and recommended X2 concentrations on the terrestrial snail *Helix vermiculata*, used as a bioindicator species of soil contamination. The experiments were conducted on the behaviour, on morphometric parameter (weight of snails), on the biochemistry and two biomarkers of the hepatopancreas.

Monitoring growth of *Helix vermiculata* showed the inhibition of the growth of snails (weight) under all the treatments.

Significant perturbations are shown in the biochemical composition of hepatopancreas (lipids, carbohydrates and proteins) after two months of treatment.

Finally, our results showed also an induction in the detoxification system, Decis, Zoom and Weafert are increased the activity of the two biomarkers : peroxidase-gluthation and catalase.

Snails provide key soil functions that favour many positive ecosystem services. These services are important for agroecosystem sustainability but can be degraded by intensive cultural practices such as use of pesticides and fertilizers.

Keywords: *Helix vermiculata*, pesticides, growth, biochemical composition, GPx, catalase.

ملخص

في الجزائر، عرف استعمال المبيدات والأسمدة، تزايدا في السنوات الاخيرة نظرا لتطور الفلاحة، وايضا لمحاربة الناقلات الضارة. هذه الاخيرة لها عدة اضرار بيئية وصحية على المدى الطويل مرتبطة بتسرب هذه المواد الغير متحللة داخل التربة الينابيع والمياه الجوفية ومنه نحو النظام البيئي: النباتات الحيوانات وخصوصا الانسان.

الهدف من هذا العمل: دراسة تأثير المبيد الحشري Decis، المبيد العشبي Zoom، و السماد Weatfert، بجرعتين: الجرعة الموصي بها و الجرعة المضاعفة (جرعة موصي بها X 2) على حلزون *Helix vermiculata* المستعمل كمؤشر حيوي لتلوث التربة. واجريت التجارب على نمو الحلزون، المكونات البيو كيميائية ومؤشرين حيويين لكبد الحلزون.

متابعة نمو *Helix vermiculata* اظهرت تثبيط في نمو الحلزون (الوزن) تحت تأثير المبيدان والسماد.

اضطرابات كبيرة سجلت في كمية المكونات البيو كيميائية للكبد (السكريات، البروتينات والليبيدات) بعد شهرين من العلاج. أخيرا، اظهرت النتائج تحريض في نظام ازالة السمية، العلاج ب: Decis، Zoom، و Weatfert، كشف عن زيادة في نشاط المؤشران الحيويان: Gpx و catalase.

الكلمات المفتاحية: *Helix vermiculata*، مبيدات، مكونات بيوكيميائية، نمو، Gpx، catalase.

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Morphologie d' <i>Helix vermiculata</i> .	04
02	Anatomie interne d'un escargot.	06
03	Présentation du site d'échantillonnage, cimetière de Bakkaria-Tébessa.	08
04	Extraction des glucides, protéines et lipides totaux.	11
05	Effets du Decis (DR et DRX2) sur la croissance des escargots juvéniles d' <i>Helix vermiculata</i> (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de huit semaines ($m \pm SEM$, $n=3$ répétitions comportant chacune 16 individus).	16
06	Effets du Zoom (DR et DRX2) sur la croissance des escargots juvéniles d' <i>Helix vermiculata</i> (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de huit semaines ($m \pm SEM$, $n=3$ répétitions comportant chacune 16 individus).	17
07	Effets du weatfert (DR et DRX2) sur la croissance des escargots juvéniles d' <i>Helix vermiculata</i> (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de huit semaines ($m \pm SEM$, $n=3$ répétitions comportant chacune 16 individus).	17

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Les concentrations de Decis, Zoom et Weatfert appliquées au cours de nos expérimentations.	09
02	Dosage des protéines totales : réalisation de la gamme d'étalonnage.	12
03	Dosage des glucides totaux : réalisation de la gamme d'étalonnage.	12
04	Dosage des lipides totaux : réalisation de la gamme d'étalonnage.	13
05	Taux de glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au Decis administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	18
06	Taux de glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au Zoom administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	19
07	Taux de glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au weatfert administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps).	19
08	Taux de protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au Decis administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	20
09	Taux de protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au Zoom administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	20
10	Taux de glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au weatfert administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	21
11	Taux de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au Decis administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	22

12	Taux de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au Zoom administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	22
13	Taux de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au weatfert administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	23
14	Activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au Decis administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	23
15	Activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au Zoom administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	24
16	Activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au weatfert administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	25
17	Activité spécifique de la GPx ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au Decis administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	25
18	Activité spécifique de la GPx ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au Zoom administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	26
19	Activité spécifique de la GPx ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) dans l'hépatopancréas de <i>Helix vermiculata</i> après 8 semaines de traitement au weatfert administré par ingestion ($m \pm \text{sem}$, $n=3$ répétitions comportant chacune un morceau de 100mg de l'hépatopancréas). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	26

LISTE DES ABREVIATIONS

ASS : Acide Sulfosalicylique.

BBC : Bleu brillant de coomasie.

CAT : Catalase.

CDNB : 1-Chloro, 2,4-Dinitrobenzène.

cm : centimètre

Fig. : Figure.

g : Gramme.

GPx : Glutathion peroxydases.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

M : Mole.

mg : Milligramme.

min : Minute.

ml : Millilitre.

mM : Millimolaire.

NaCl : chlorure de sodium.

nm : Nanomètre.

NPK : Azote, phosphate, potassium.

pH : Potentiel hydrogène.

t/mn : Tours/minute.

TCA : Acide Trichloracétique.

%: Pourcentage.

°C: Degré Celsius.

µg : Microgramme.

µl : Microlitre.

µM : MicroMol.

Trs : tours

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

m : moyenne

n : nombre de répétitions

p : coefficient de signification

Table des matières

Résumé	
Abstract	
المخلص	
Remerciement	
Dédicace	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
2. Matériel et méthodes	04
2.1. Présentation de l'espèce:.....	04
2.1.1. Description anatomique:.....	05
2.1.1.1. Anatomie interne de l'escargot:.....	05
2.1.1.2. Appareil génital:	06
2.1.1.3. Reproduction:.....	06
2.1.2. Croissance et survie de l'escargot:.....	07
2.2. Collecte et échantillonnage d' <i>Helix vermiculata</i> :.....	07
2.3. Technique d'élevage au laboratoire:.....	08
2.4. Présentation du traitement:.....	08
2.4.1. Insecticide (Décis):.....	08
2.4.2. Herbicide (Zoom):.....	08
2.4.3. Engrais (Weatfert):.....	09
2.5. Le traitement:	09
2.6. Dissection de l'escargot et prélèvement des organes:	09
2.7. Traitement sur la croissance:	09
2.8. Extraction et dosage biochimique:.....	10
2.8.1. Dosage des protéines totales:	12
2.8.2. Dosage des glucides totaux:.....	12
2.8.3. Dosage des lipides totaux:	13
2.9. Dosages des biomarqueurs:.....	13
2.9.1. Dosage de l'activité de catalase (CAT):.....	13
2.9.2. Dosage de l'activité de glutathion peroxydase (GPx):.....	14
2.10. Analyse statistique:.....	15
3. Résultats	16

Table des matières

3.1. Effets de traitement sur le poids de l'escargot:.....	16
3.1.1. Effet de l'insecticide (Décis):.....	16
3.1.2. Effet de l'herbicide (Zoom):.....	16
3.1.3. Effet de l'engrais (Weatfert):.....	17
3.2. Effets des traitements sur la composition Biochimique de l'hépatopancreas:.....	17
3.2.1. Effets des traitements sur le taux de glucides totaux:.....	17
3.2.1.1. Effet du decis sur le taux de glucides totaux:.....	18
3.2.1.2. Effet du Zoom sur le taux de glucides totaux:.....	18
3.2.1.3. Effet du Weatfert sur le taux de glucides totaux:.....	19
3.2.2. Effets des traitements sur le taux de Protéines totaux:.....	19
3.2.2.1. Effet du decis sur le taux de Protéines:.....	19
3.2.2.2. Effet de Zoom sur le taux de Protéines totaux:.....	20
3.2.2.3. Effet de Weatfert sur le taux de Protéines totaux:.....	21
3.2.3. Effets des traitements sur le taux de lipides totaux:.....	21
3.2.3.1. Effet du decis sur le taux de lipides totaux:	21
3.2.3.2. Effet du Zoom sur le taux de lipides totaux:.....	22
3.2.3.3. Effet de Weatfert sur le taux de lipides totaux:.....	22
3.2.4. Effets des traitements sur L'activité de catalase:.....	23
3.2.4.1. Effet du decis sur L'activité de catalase:	23
3.2.4.2. Effet du Zoom sur L'activité de catalase:	24
3.2.4.3. Effet du Weatfert sur L'activité de catalase:.....	24
3.2.5. Effets des traitements sur l'activité de Glutathion peroxydase:.....	25
3.2.5.1. Effet du decis sur l'activité de Glutathion peroxydase:	25
3.2.5.2. Effet du Zoom sur l'activité de Glutathion peroxydase:	25
3.2.5.3. Effet du Weatfert sur l'activité de Glutathion peroxydase:	26
4. Discussion	27
4.1. Effets des traitements sur la biométrie d' <i>Helix vermiculata</i> :.....	27
4.2. Effets des traitements sur la composition biochimique d' <i>Helix vermiculata</i> :.....	27
4.3. Effets des traitements sur les deux biomarqueurs GPx et Catalase:.....	29
4.3.1. Effets sur l'activité de la catalase (CAT):.....	29
4.3.2. Effets sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx):.....	30

Conclusion et perspective

Références bibliographique

Introduction

I. INTRODUCTION

Les composés organiques présents dans les différentes sphères de l'environnement ont des origines très variées. Le devenir environnemental de ces composés ainsi que leur impact sur les différents écosystèmes sont très dépendants de leurs interactions avec le milieu environnant. Parmi les contaminants organiques, impliqués dans les phénomènes de pollution chimique, les pesticides ou les composés phytosanitaires. Ces derniers sont introduits de l'environnement par l'activité anthropique, principalement l'agriculture, pour améliorer les rendements de la production des cultures (Errami, 2012).

En Algérie, l'utilisation des insecticides, des fertilisants, des engrais, et autres produits phytosanitaires s'accroît avec le développement de l'agriculture (Bouziani, 2007). Les fertilisants minéraux ou organiques (lisiers, boues de stations d'épuration) sont dispersés à la surface des sols afin d'accroître les rendements des végétaux cultivés. Le principe de leur usage est fondé sur la constatation que l'on emporte avec la récolte d'une certaine quantité des nutriments : phosphore, azote, potassium, et dans une moindre mesure, soufre, magnésium et autres oligoéléments (François, 2012).

L'utilisation des pesticides semble remonter à 1000 ans avant J.C (soufre, Arsenic, Roténone). Les pesticides représentent une part importante des pollutions environnementales actuelles. Le terme « pesticide » possède une définition étendue, comprenant les « produits phytosanitaires », les « produits phytopharmaceutiques » ou les « biocides ». Il concerne donc toutes les substances naturelles ou synthétiques utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes (micro-organismes, animaux ou végétaux) jugés indésirables ou nuisibles, non seulement en contexte agricole, mais également dans les domaines de l'hygiène de la santé publique, de la santé animale et dans les traitements de surfaces non-agricoles (Aubertot *et al*, 2005 ; ORP, 2014).

Les activités anthropiques, en constante intensification, induisent une grande diversité de pollutions environnementales, et en particulier des pollutions chimiques de l'air, du sol, des sédiments et de l'eau (Rhind, 2009 ; Sandermann, 2004). Différents composés xénobiotiques ou toxiques sont couramment associés aux processus d'utilisation et de diffusion des pesticides. Les relations entre pesticides (environ 1000 molécules actives sur le marché en 2012) et environnement sont à double sens : les pesticides modifient l'environnement en mettant en œuvre une centaine de mécanismes écotoxiques et inversement

Introduction

l'environnement (oxygène, ozone, humidité, pH, métaux, bactéries, champignons, etc...) modifie les pesticides, leurs impuretés (dioxine) et leur métabolites (Chevalier L *et al*, 2001)

Malgré un souci croissant de protection de l'environnement, lors de l'utilisation des pesticides, une certaine quantité de ces substances se retrouve dans l'environnement (Pimentel, 1995 ; Arias-Estévez *et al*, 2008). Les voies de dispersion et de transfert de pesticides sont nombreuses. Les gouttelettes de ces produits peuvent atteindre directement le sol sans être stoppées par le feuillage, ou alors indirectement, lorsque la pluie va lessiver les gouttelettes, non encore absorbées par les feuilles (Belhaouchet, 2014). La ré-volatilisation à partir du sol et des végétaux joue également un rôle important dans la contamination de l'air. Enfin, le lessivage et le ruissellement, lors des précipitations, vont entraîner la contamination des eaux de surface et souterraines (Druart, 2011 ; INERIS, 2005). La présence de polluants constitue un stress induisant des modifications au niveau physiologique et métabolique dans l'organisme (Timbrell, 1994), ce dernier peut réagir par des réponses mécanistiques limitant les effets toxiques des contaminants en protégeant les cellules et en facilitant leur excrétion. Bien que les mécanismes de défense cellulaire soient actuellement mieux connus, il est cependant nécessaire de les approfondir en raison notamment des interactions existant entre les xénobiotiques présents simultanément dans le même milieu (Testud & Grillet, 2007 ; Guler *et al*, 2010).

L'utilisation des invertébrés comme bioindicateurs de la qualité des écosystèmes a une longue histoire dans les milieux aquatiques (Phillips, 1977) et terrestres (Eijsackers, 1983). Selon la définition générale de (Spellerberg., 2005), un indicateur biologique peut être défini comme une espèce reflétant l'état du milieu dans lequel elle vit (Hopkin, 1993 ; Edward *et al*. 1996). Il existe deux types de bio-indicateurs, bio indicateur d'accumulation stocke un polluant issu de son environnement et un bio indicateur d'effet ou d'impact réagit à une ou plusieurs substances issues de son environnement, introduites par épandage de déchets, pratiques agricoles ou contaminations industrielles (Joëlle, 2005).

Les gastéropodes terrestres (escargots) présentent un important pouvoir bioaccumulateur de métaux. Ces organismes capables de survivre sur des sites contaminés en métaux sont ainsi, considéré comme des concentrateurs efficaces de métaux traces des habitats terrestres pollués. Cette résistance résulte de leur capacité de retenir et d'inactiver les métaux toxiques soit par compartimentation intracellulaire et excrétion, soit par liaison avec

Introduction

des protéines dont les métallothionéines (surtout le Cadmium) permettent leur stockage durant de longues périodes (Grara N, 2016).

Notre étude entre dans cette thématique et vise à évaluer les réponses d'une espèce bioindicatrice de pollution, l'escargot *Helix vermiculata* à deux types de pesticides (Insecticides : Decis et Herbicide : Zoom) et un engrais (Weatfert).

Plusieurs paramètres ont été étudiés :

- ✓ Aspect morphométrique par la détermination de l'évolution du poids corporel des séries témoins et traitées chaque semaine pendant 2 mois.
- ✓ Aspect biochimique par la détermination du taux des glucides, lipides et protéines au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix vermiculata* des séries témoins et traitées.
- ✓ Dosage des biomarqueurs de détoxification tels que, la glutathion peroxydase (GPx) et la Catalase.

MATERIEL
ET
METHODE

2. MATERIEL ET METHODES

Le présent travail consiste à évaluer la toxicité des pesticides et engrais les plus utilisés dans la région de Tébessa, à l'égard de *Helix vermiculata*, organisme non visé. Plusieurs aspects ont été étudiés : la toxicité, la croissance, la composition biochimique et les biomarqueurs chez les escargots jeunes-éclos et juvéniles.

2.1. Présentation d'*Helix vermiculata* (Müller, 1774).

Helix vermiculata est un escargot comestible connu aussi sous le nom scientifique d'*Eobania vermiculata* (Müller, 1974) et le nom commun escargot bande de chocolat.

Le corps : un escargot consiste en un pied unique, une tête et une masse viscérale enroulée qui est placée dans la coquille. Les glandes de mucus placées dans la partie antérieure du pied, il y a aussi des glandes de mucus sur le reste du corps protégeant l'escargot contre la perte d'eau.

Coquille : très solide, aplatie, globuleuse, présentant des dessins variés, avec ou sans bandes spirales. de couleur blanc jaunâtre avec 4 à 5 bandes marron foncé, parfois interrompues ou fusionnées (Remy., 1930). Ouverture "tombante" aux bords nettement évasés, sans ombilic, il vit dans les zones ouvertes plutôt ensoleillées (Mini-guide). La taille de la coquille (hauteur x diamètre) : 21 x 26 mm.



Figure 1. Morphologie d'*Helix vermiculata* (Saoussen et Nadjla, 2018).

La position systématique de cette espèce est la suivante

Règne :	Animalia
Embranchement :	Mollusca
Classe :	Gastéropoda
Ordre :	Stylomatophora
Super famille :	Hélicacae
Famille :	Hélicidae
Sous famille :	Helicinae
Genre :	Helix
Espèce :	<i>Helix vermiculata</i> (Müller, 1774).

2.1.1. Description anatomique

2.1.1.1. Anatomie interne de l'escargot

À l'intérieur de la coquille, se trouve une cavité du manteau, qui contient le cœur, le rein et le poumon. L'escargot possède une respiration pulmonaire. Le poumon est formé par la cavité palléale, espace situé entre la masse viscérale et le manteau qui recouvre l'intérieur de la coquille. Il s'ouvre à l'extérieur par l'orifice respiratoire dont on peut observer aisément les mouvements rythmiques d'ouverture et de fermeture.

Le tube digestif commence par le bulbe buccal, et par une forte masse musculaire, la radula. L'œsophage reçoit les conduits de deux glandes salivaires. Quant aux canaux de l'hépatopancréas (qui est une volumineuse glande digestive) ils se déversent dans l'estomac (Gaillard, 1991).

Le système nerveux sympathique est constitué par une paire de ganglions buccaux situés sous le bulbe buccal. Ils sont reliés par deux cordons nerveux aux ganglions cérébroïdes et innervent la plus grande partie du tube digestif. Le système nerveux central est situé dans la région céphalique. Il est formé d'une chaîne de ganglions formant un double collier péri œsophagien complexe (Girande, 1972).

Le cœur est constitué d'une oreillette antérieure et d'un ventricule postérieur. Le sang ou hémolymphe contient un pigment, l'hémocyanine. Il est incolore sous sa forme désoxydée et bleu sous sa forme oxydée. Le sang est propulsé dans le réseau artériel via deux aortes. L'aorte antérieure irrigue le pied et la postérieure le tortillon. Le sang revient au cœur par un système de veines et de sinus veineux (Girande, 1972).

2.1.1.2. Appareil génital

L'escargot est hermaphrodite. Cette particularité explique la complexité de l'appareil, formé d'organes à la fois mâles et femelles et d'organes uniquement mâles ou femelles.

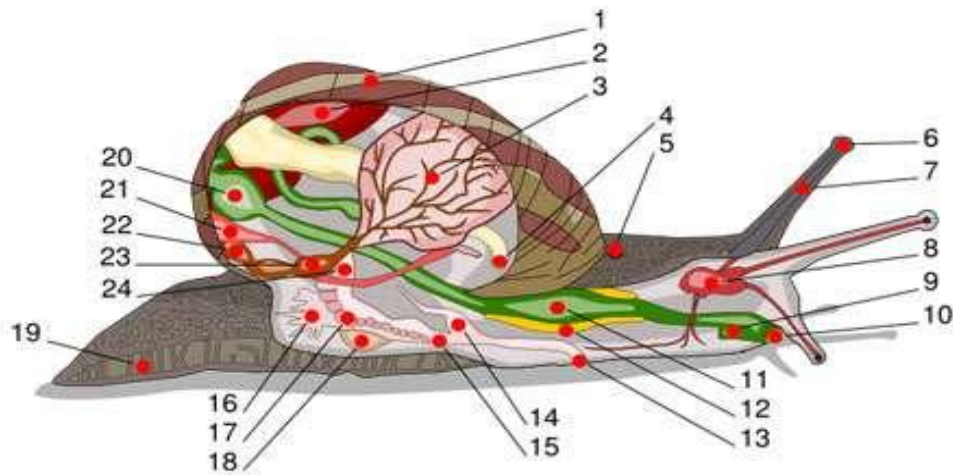


Figure 2 : Anatomie interne d'un escargot (Quibik, 2007).

Légende. 1 : coquille ; 2 : foie ; 3 : poumon ; 4 : anus ; 5 : pore respiratoire ; 6 : œil ; 7 : tentacule ; 8 : cerveau ; 9 : conduit salivaire ; 10 : bouche ; 11 : panse ; 12 : glande salivaire ; 13 : orifice génital ; 14 : pénis ; 15 : vagin ; 16 : glande muqueuse ; 17 : oviducte ; 18 : sac de dards ; 19 : pied ; 20 : estomac ; 21 : rein ; 22 : manteau ; 23 : cœur ; 24 : canal déférent.

2.1.1.3. Reproduction

H. vermiculata, comme tous les Gastéropodes Stylommatophores, est un hermaphrodite simultané : les adultes présentent à la fois des organes mâles et des organes femelles fonctionnels (Gómez, 2001), mais sont incapables de s'auto-fertiliser (Falkner *et al*, 2001).

L'accouplement est nécessaire pour la reproduction naturelle. Les escargots s'accouplent et échangent des spermatozoïdes. Ceux-ci sont stockés dans le réceptacle séminal jusqu'au moment où les ovules arrivent à maturité. La fécondation se réalise au niveau de la jonction du canal hermaphrodite avec la glande à albumen ; elle est suivie par la formation d'une coquille calcaire, puis par la ponte. L'accouplement dure de 10 à 12h. Suivant les régions, les escargots s'accouplent durant toute la période d'activité avec une périodicité bien définie, ce qui synchronise les individus (Girande, 1972).

Ponte : l'intervalle entre l'accouplement et la ponte est variable. En conditions constantes de température et d'hygrométrie (20° C et 85%), les durées moyennes sont de 10 à 15 jours. Pour pondre, l'escargot creuse dans la terre ou le sable un «nid de ponte », la ponte dure 12 à 48 heures. Généralement, chez un animal en ponte, seule la coquille est visible, le reste du corps (le pied) est à l'intérieur du nid. Les œufs, petites sphères blanches de 4 mm de diamètre et pesant 30 à 40 mg, sont émis un à un par l'orifice génital. Un escargot pond en moyenne 120 œufs par ponte (Girande, 1972).

2.1.2. Croissance et survie de l'escargot

La croissance de l'escargot correspond à une prise de poids pouvant atteindre jusqu'à 14g en conditions contrôlées favorables (photopériode 18 h de lumière par 24 h, 20°C et 80-90% d'humidité) et à un accroissement de la coquille en longueur, mais également en épaisseur (Gomot de Vaufleury, 2001). La croissance des escargots est caractérisée par 4 phases. Ils sont appelés « jeunes éclos » jusqu'à environ 1 g (correspondant à 1 mois), puis sont qualifiés de juvéniles jusqu'à environ 5 g et de subadultes jusqu'à 8-9 g. Lorsque les escargots atteignent la taille adulte après environ 4 mois de croissance en conditions contrôlées favorables, ils se bordent (phénomène caractérisé par le bord de la coquille qui s'incurve et par un épaississement du bord du manteau). La croissance de la coquille s'arrête alors, du moins en longueur, et les escargots, devenus adultes, terminent leur maturation sexuelle et deviennent aptes à se reproduire. En milieu naturel, la croissance est beaucoup plus longue et dure de 1 à 2 ans selon les conditions climatiques. La durée de vie en milieu naturel est en moyenne de 3-4 ans (Gomot de Vaufleury, 2001).

2.2 Collecte et échantillonnage d'*Helix vermiculata*

Dans notre étude, les échantillons sont collectés de la région de Bekaria, à 12 km de la ville de Tébessa, son climat est semi-aride, sec et froid.

L'échantillonnage a été effectué manuellement et d'une manière aléatoire au niveau de cimetière de Bekkaria (Fig. 3) durant la période étalée du mois de janvier jusqu'au mois d'avril. Une fois les escargots sont collectés, ils seront triés au laboratoire selon les différentes phases de développement : les jeunes éclos, les juvéniles, les sub-adultes et les adultes.



Figure 3. Présentation du site d'échantillonnage, cimetière de Bekaria-Tébessa (Saoussen et Nadjla, 2018).

2.3. Technique d'élevage au laboratoire

L'élevage des escargots se fait au laboratoire de Biologie Animale, dans des terrariums en verres (Longueur : 20 cm, largeur : 20 cm, hauteur : 20 cm) recouvertes d'un tulle afin d'assurer une bonne aération. Il est maintenu à une température de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et une humidité de (31%). Pour maintenir une humidité adéquate, une éponge humide a été déposée au fond des terrariums. Le nettoyage est effectué chaque trois jours (Daumer *et al*, 2007).

2.4. Présentation du traitement

Au cours de notre expérimentation, on a utilisé deux types de pesticides (Insecticide : Decis et Herbicide : Zoom) et un engrais (Weatfert).

2.4.1. Decis : Decis est un insecticide à base de deltaméthrine, substance active de la famille des pyréthrinoïdes de synthèse. Il possède un large spectre d'action, il agit par contact et par ingestion sur un grand nombre d'insectes suceurs et broyeurs. Ce dernier est caractérisé par une action très rapide (remarquable effet de choc) et un effet répulsif sur les insectes ravageurs volants.

2.4.2. Zoom : Zoom est un herbicide sélectif, partenaire idéal pour protéger les cultures des dicotylédones sur blés. Constitué principalement de Dicamba 66% et Triasulfuron 4%, sa formulation Granulés dispersées dans l'eau (WG). Ses deux matières actives agissent principalement par inhibition de la croissance des adventices qui deviennent nécrotiques et meurent en quelques semaines.

2.4.3. Weatfert : Weatfert est un engrais qui a un pouvoir acidifiant élevé, constitué de 8% d'Azote ammoniacal (NH₄), 36 % phosphore (P₂O₅), 15 % Potasse (K₂O), base sulfate entièrement soluble dans l'eau à 35% (SO₃). Le Weatfert ne contient pas de Calcium et de chlore. Riche en potasse et joue un rôle important dans l'amélioration du rendement.

2.5. Le Traitement

Le traitement (Zoom, Decis et Weatfert) ont été appliqués, chacun avec deux doses : une dose recommandée et une dose recommandée x2, sur 16 individus par lot (Tableau 1). Le traitement est répété chaque trois jour pendant deux mois. Le suivi des individus se fait chaque semaine pendant 2 mois par ingestion.

Tableau 1. Les concentrations de Decis, Zoom et Weatfert appliquées au cours de nos expérimentations.

Doses	Decis	Zoom	Weatfert
Dose recommandée	50 µl/100 ml	0,15 g/L	0,5 g
Dose recommandée X2	100 µl/100 ml	0,3 g/L	1 g

2.6. Dissection de l'escargot et prélèvement des organes

A la fin de la 8ème semaine de traitement, les escargots sont pesés. Ensuite, les animaux sont sacrifiés par décapitation et les têtes sont récupérées dans le tampon adéquat pour des analyses ultérieures. Les escargots sont décoquillés et leurs hépatopancréas rapidement excisés et pesés. Ils sont destinés aux mesures de la composition biochimique et des biomarqueurs.

2.7. Traitement sur la croissance

-Poids frais de l'escargot : est mesuré à l'aide d'une balance de précision modèle de façon hebdomadaire, avant et pendant la durée du traitement. Les pesées sont toujours réalisées avant le nettoyage de l'enceinte d'essai (Gomot, 1997a).

-Poids frais de la coquille et le poids frais de l'hépatopancréas sont mesurés à l'aide de la même balance utilisée précédemment. Cette pesée est effectuée après le sacrifice des animaux, à la fin de la 8ème semaine de traitement.

L'inhibition de la croissance est calculée par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = ((P_0 - P_t) / P_0) \times 100$$

P_0 : poids de l'escargot en 0 jour.

P_t : poids de l'escargot après une période de traitement.

2.8. Extraction et dosage biochimique

Après la dissection, l'extraction (Fig. 18) des différents métabolites (protéines totales, glucides totaux et lipides totaux) a été réalisée selon le procédé de (Schibko *et al*, 1966) sur un fragment (100mg) de l'hépatopancréas prélevé, conservé dans 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20% et broyé. Après une première centrifugation (5000 trs / min, 10 mn), le surnageant I obtenu est utilisé pour le dosage des glucides totaux selon la méthode de (Duchateau & Florkin, 1959). Au culot I, on ajoute 1 ml de mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 trs/min, 10 mn), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides (Goldworthy *et al*, 1972) et le culot II, dissout dans de la soude (0,1 N), servira au dosage des protéines selon (Bradford, 1976).

Tous les dosages sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé.

Matériel et méthode

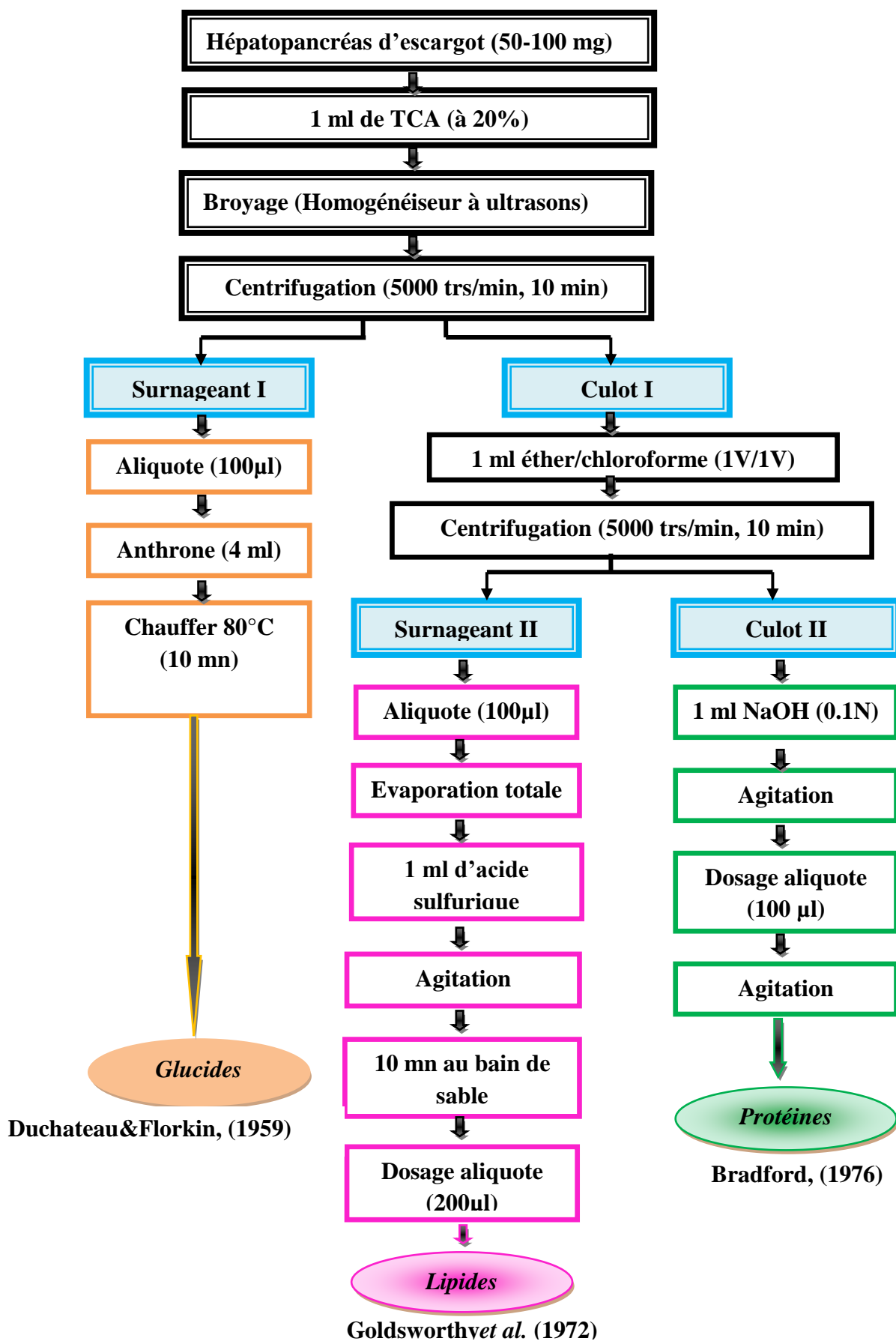


Figure 4. Extraction des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko *et al*, 1967).

2.8.1. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976) dans une fraction aliquote de 100 μ l à laquelle on ajoute 4 ml de réactif du bleu brillant de comassie (BBC) G 250 (Merck). Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (BSA) titrant 1 mg/ml (Tableau 2).

Tableau 2. Dosage des protéines totales : réalisation de la gamme d'étalonnage.

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

2.8.2. Dosage des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de Duchateau & Florin (1959). Cette méthode consiste à additionner 100 μ l du surnageant contenu dans un tube à essai, 4 ml du réactif d'anthrone et de chauffer le mélange à 80 °C pendant 10 min, une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présente dans l'échantillon, la lecture de l'absorbance est faite à une longueur d'onde de 620 nm. La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de glucose (1mg/ml) (Tableau 3)

Tableau 3. Dosage des glucides totaux : réalisation de la gamme d'étalonnage.

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

2.8.3. Dosage des lipides totaux

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy *et al*, (1972) en utilisant le réactif sulfophosphovanillinique. Le dosage des lipides se fait sur des prises aliquotes de 100 μ l des extraits lipidiques ou de gamme étalon auxquelles on évapore totalement le solvant puis on ajoute 1ml d'acide sulfurique concentré, les tubes sont agités, et mis pendant 10 mn dans un bain de sable à 100 °C. Après refroidissement, on prend 200 μ l de ce mélange au quel on ajoute 2,5 ml de réactif sulfophosphovanillinique. Après 30 mn à l'obscurité, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide orthophosphorique, des complexes roses. La solution mère des lipides est préparée comme suit : on prend 2,5 mg d'huile de table (tournesol 99% triglycérides) dans un tube eppendorf et on ajoute 1 ml d'éther chloroforme (1V/1V) (Tableau 4).

Tableau 4. Dosage des lipides totaux : réalisation de la gamme d'étalonnage.

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

2.9. Dosage des biomarqueurs

L'hépatopancréas excisé du reste de la masse viscérale a servi au dosage de la glutathion peroxydase (GPx) et de la catalase (CAT). Tous les dosages ont été menés sur des échantillons biologiques prélevés après 8 semaines d'exposition aux différents traitements. Par ailleurs, la concentration en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminée suivant la méthode de Bradford (1976), afin de pouvoir calculer les différentes activités spécifiques.

2.9.1. Dosage de l'activité de catalase (CAT)

La mesure de la CAT est déterminée selon la méthode de la technique de Claiborne (1935), dont le principe repose sur la mesure spectrophotométrique de la réduction de l'eau oxygénée (H_2O_2) en une molécule d'oxygène (O_2) et deux molécules d'eau (H_2O) en

Matériel et méthode

présence de la CAT. Les fragments de l'hépatopancréas sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5). L'homogénat est centrifugé à 15000 trs/min pendant 10 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage de la CAT s'effectue dans une fraction aliquote de 50 µl du surnageant dilué de façon à se situer entre 1 et 1,5 mg de protéine/ml, soit 0,05 à 0,75 mg dans la cuve, à laquelle on ajoute 750 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) et 200 µl H₂O₂ (500 mM) préparé extemporanément [1,42 ml H₂O₂ à 30 volume (garder en chambre froide), 25 ml tampon phosphate (100 mM, pH 7,4)]. Après agitation, la lecture est effectuée au spectrophotomètre après 15 secondes d'attente toute les 5 secondes pendant 30 secondes à une longueur d'onde de 240 nm contre un blanc avec 800 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) et 200 µl H₂O₂ (500 mM).

L'activité spécifique est calculée selon la formule suivante:

$$X = \frac{Do_{max} - Do_{min}}{0.04} \text{ mg de protéines}$$

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

Do max: densité optique maximum obtenue.

Do min: densité optique minimum obtenue.

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

2.9.2. Dosage de l'activité de glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique du GPx est mesurée par la méthode de Floche & Gunzler (1984), en utilisant l'H₂O₂ comme substrat.

Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml du Tampon phosphate (pH 7,8) et centrifugés à 3000 trs/min pendant 10 min. 200 µl du surnageant récupéré est additionné à 400 µl de GSH (0,1 mM) et 200 µl du Tampon phosphate (0,067 M). 200 µl d'H₂O₂ (1,3 mM) ont ajoutés pour initier la réaction, pendant 10 min, puis la réaction est arrêtée par addition de 1ml de TCA (1%). Après le dépôt du mélange dans de la glace pendant 30 min, il subit une centrifugation (3000 trs/min pendant 10 min) puis 480 µl de surnageant est

placé dans une cuve auquel on ajoute 2,2 ml de Na_2HPO_4 (0,32 M) et 320 μl de DTNB (1mM). La lecture des absorbances est effectuée au spectrophotomètre dans les 5 minutes à une longueur d'onde de 412 nm.

2.10. Analyse statistique

Les moyennes \pm SEM sont calculées pour chaque groupe d'expérience. Le test t de Student, l'analyse de la variance à un critère de classification ont permis de mettre en évidence les différences entre les échantillons pour toutes les expérimentations. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 13.31.

Résultats

3. RESULTATS

3.1. Effets du traitement sur le poids des escargots

L'effet des deux pesticides et de l'engrais sur le poids frais moyen des escargots est présenté dans les figures 10, 11 et 12.

3.1.1. Effet de l'insecticide (Decis)

L'effet de Decis sur le poids frais moyen des escargots est présenté dans la figure 14. Il ressort de nos résultats, une inhibition de la croissance des individus traités à 2, 5 et 7 semaines d'expositions au traitement avec les deux doses appliquées (DR et DRX2).

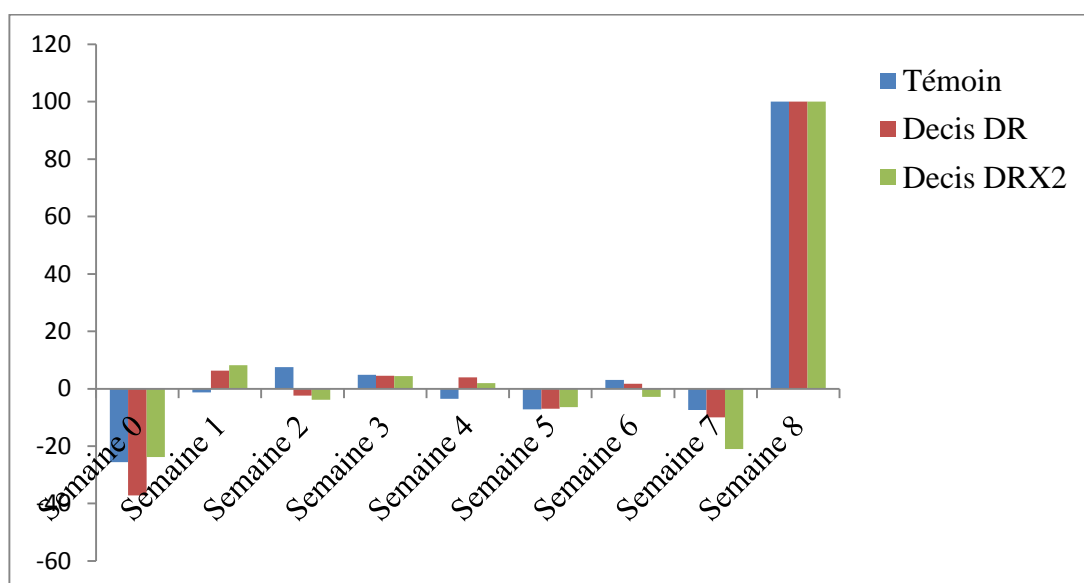


Figure 05. Effets du Decis (DR et DRX2) sur la croissance des escargots juvéniles *d'Helix vermiculata* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de huit semaines ($m \pm SEM$, $n=3$ répétitions comportant chacune 16 individus).

3.1.2. Effet de l'herbicide (Zoom)

Les résultats affichent une inhibition de la croissance des individus traités à 1, 3 et 5 semaines d'expositions au traitement avec les deux doses appliquées (DR et DRX2). Par contre, aucun effet n'a été signalé pour les temps restant.

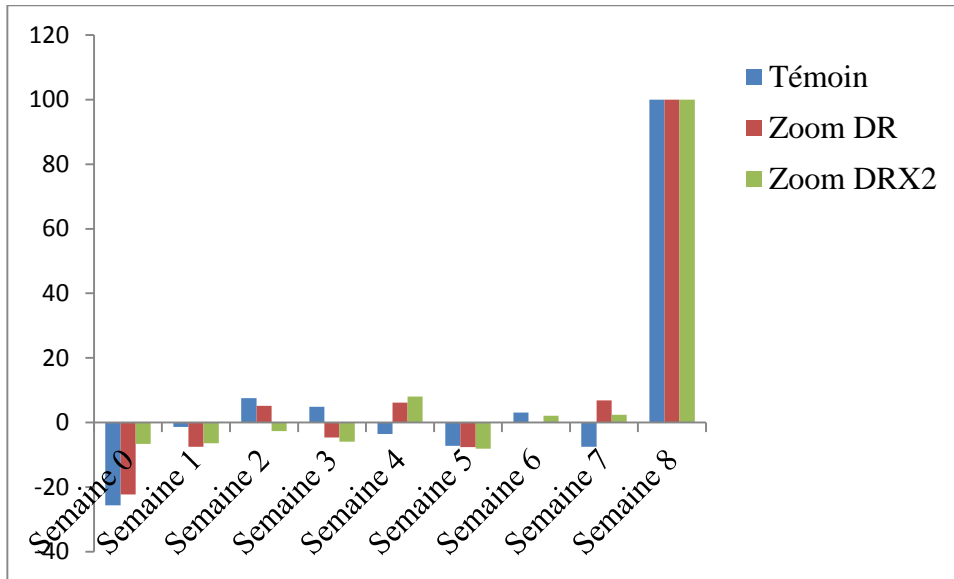


Figure 06. Effets du Zoom (DR et DRX2) sur la croissance des escargots juvéniles *d’Helix vermiculata* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d’insecticide) pendant une période de huit semaines ($m \pm SEM$, $n=3$ répétitions comportant chacune 16 individus).

3.1.3 Effet du Weatfert

L’effet de l’engrais Weatfert sur le poids frais moyen des escargots est présenté dans la figure 12. Ce traitement provoque une légère inhibition du poids des escargots traités par la dose recommandée de Weatfert durant la 3^{ème} et la 6^{ème} semaine.

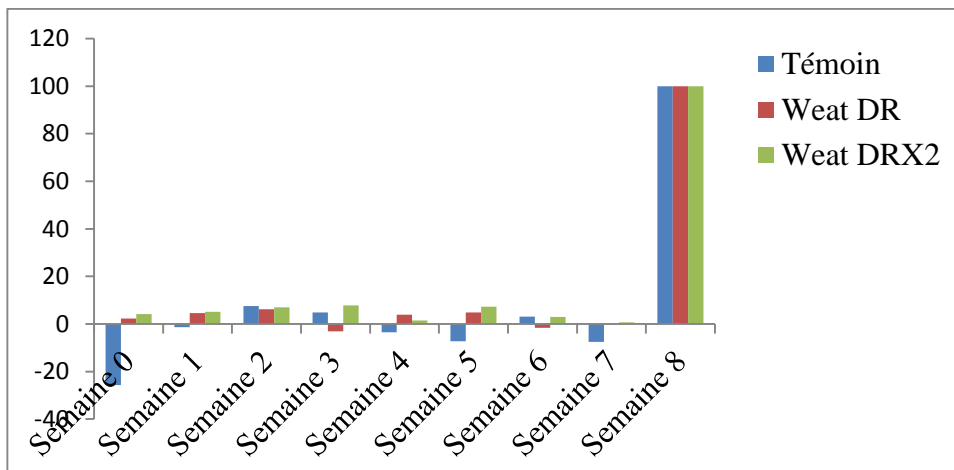


Figure 07. Effets du weatfert (DR et DRX2) sur la croissance des escargots juvéniles *d’Helix vermiculata* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d’insecticide) pendant une période de huit semaines ($m \pm SEM$, $n=3$ répétitions comportant chacune 16 individus).

Discussion

4. Discussion

4.1 Effets des traitements sur la biométrie d'*Helix vermiculata*

Dans notre étude, nous avons noté en premier lieu une réduction du poids des escargots traités par les deux pesticides et l'engrais (Decis, Zoom et Weatfert) en comparaison avec les témoins. En effet, des études ont montré que l'inhibition de la synthèse d'une hormone de croissance essentielle chez les escargots provoque un prolongement du stade de développement. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Bourbia *et al*, 2013), où on observe une diminution du poids frais des escargots traités par certains pesticides.

Ainsi, (Sabrina *et al*, 2016) ont montré la répulsion de cet escargot après traitement aux nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures). En plus, (Viard *et al*, 2004) ont fait des constatations similaires en présence d'une contamination en plomb : c'est l'extrême concentration en plomb dans le sol, détectée par les escargots, qui limite leur taux de consommation et donc inhibe partiellement leur croissance. De plus, (Coeurdassier *et al*, 2001) ont observé une diminution dose-dépendante de la croissance et de la survie des escargots induite par le diméthoate.

4.2 Effets des traitements sur la composition biochimique d' *Helix vermiculata*

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

Concernant le taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas, nous avons noté une diminution non significative chez les escargots traités par les pesticides. Cette diminution à cause de la déplétion du taux de glycogène dans les tissus hépatiques de l'escargot. Ces résultats sont en accord avec les travaux (El-Wakil & Radwan, 1991). (Padmaja et Rao, 1994) ont d'ailleurs suggérés que la diminution du taux de glycogène dans les tissus de l'escargot d'eau douce *Bellamya dissimilis* (Müller), exposé à l'Endosulfan, le Méthyl parathion, le Quinalphos et le Nuvan peut être due à l'utilisation du glycogène pour générer l'énergie nécessaire pour faire face à l'hypoxie provoquée par ces nanoparticules. La déplétion en glycogène des tissus hépatiques peut être également interprétée comme une réponse non spécifique au stress chimique avec cependant des conséquences sur la mobilisation à long

terme des réserves énergétiques et ainsi sur la sensibilité au stress et la susceptibilité des individus aux maladies (Schwaiger *et al*, 1997).

Plusieurs investigations sur les effets des polluants organiques sur le métabolisme énergétique ont été menées. La diminution des réserves de glycogène est une réponse notée chez plusieurs gastéropodes pulmonés exposés à des insecticides OPs et carbamate, notamment *Biomphalaria alexandrina*, *Bulinus trincatus* (Sharaf *et al*, 1975) et *L. acuminata* (Mahendru & Agarwal, 1981 ; Singh & Agarwal, 1989). Chez *L. palustris* exposée à l'hexachlorobenzène en mésocosme (Baturu *et al*. 1995) observent une stimulation de l'activité enzymatique d'hydrolyse des polysaccharides et une réduction de la teneur en glycogène dans le manteau et la masse viscérale. Pour la même espèce exposée à des alkylphénols en mésocosme, (Jumel & Lagadic, 2000) rapportent une augmentation de la demande énergétique des animaux qui se traduit par une mobilisation rapide des réserves de glycogène du manteau et une diminution de la teneur en protéine et de la masse de la glande à albumen. L'exposition en mésocosme de *L. stagnalis* au fomésafène provoque une réduction des réserves en glycogène des animaux qui peut être impliquée dans la réduction de l'activité ovipositoire (Jumel *et al*, 2000).

(Guedouche, 2017) a noté une augmentation du taux de glucides dans l'hépatopancréas des escargots traités par l'Urée et NPK. Ainsi, il n'a pas d'effet de l'Uree et de NPK sur le métabolisme des glucides. La diminution des réserves de glycogène est une réponse notée chez plusieurs gastéropodes pulmonés.

Les résultats vont dans le même sens que ceux de (Peccini *et al*, 1994) et (Masaya *et al*, 2002) qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins). Par contre (Guedouche, 2017) chez la même espèce d'escargots *Helix vermiculata*, traités par les deux doses de l'Uree et de NPK, elle trouve une diminution non significative de protéines totales comparées aux escargots témoins (aucun effet sur le métabolisme des protéines).

Nos résultats sont en accord avec ceux de (Sabrina *et al*, 2016) qui a trouvé que le taux des protéines dans l'hépatopancréas diminué d'une manière dose –dépendante en présence des nanoparticules de silice (Si) par rapport aux témoins. Nos résultats sont conformes avec ceux de (Bourbia *et al*, 2013), une diminution dose-dépendante des protéines totales a été notée chez les escargots traités par les deux insecticides (Le thiaméthoxam La téfluthrine) comparés

aux escargots témoins. En effet, les protéines sont principalement impliquées dans l'architecture de la cellule. Pendant les périodes de stress chronique, ils constituent aussi une autre source d'énergie (Padmaja Rao, 1994). Dans des conditions de stress, les escargots ont besoin de plus d'énergie pour détoxifier la substance toxique. Lorsque les escargots ont une quantité limitée de glucides et de lipides, la source d'énergie alternative pour répondre à la demande accrue d'énergie est les protéines (Moussard, 1999). En outre, ces résultats sont semblables à ceux de (Radwan *et al*, 2008). Ainsi, ils ont rapporté que l'effet significatif des deux carbamates testés sur la diminution des taux de protéines au bout de 7 jours implique la possibilité que ces molécules exercent des effets cytotoxiques, qui dépendent fortement de l'interférence avec le niveau des lipoprotéines et le taux de biosynthèse.

Une diminution non significative des lipides totaux a été notée chez les escargots traités par les pesticides décis DR, DRx2 au cours le période de traitement, zoom DR au cours de la période de traitement, avec ceux de (Bourbia et al, 2013), Une diminution des lipides totaux a été notée chez les escargots traités par les insecticides commerciaux à base de thiaméthoxam (0, 25, 50, 100 et 200 mg/L) après six semaines de traitement comparés aux escargots six semaines de témoins. En effet, les lipides constituent le carburant énergétique privilégié proposé aux tissus en cas de besoins après les hydrates de carbone. Le même effet a été montré l'application à la nanoparticule à base de l'oxyde de fer et l'oxyde de silis sur *Helix aspersa*. Ainsi que, les travaux de (Grara et al, 2012), ont mis en évidence une baisse significative du taux des lipides au niveau des deux organes étudiés. De plus, une augmentation non significative des lipides totaux chez les escargots traites par la dose D1 de l'Uree.

4.3. Effets des traitements sur les deux biomarqueurs GPx et Catalase

4.3.1. Effets sur l'activité de la catalase (CAT)

La catalase est une enzyme responsable de la détoxification des quantités significatives de peroxydes d'hydrogènes (H_2O_2). La catalase joue un rôle important dans la défense enzymatique des oxydants en protégeant la cellule du peroxyde d'hydrogène en les convertissant en oxygène et Nos résultats montrent que les pesticides Decis, Zoom et l'engrais weatfert utilisées aux doses choisies, induisent significativement l'activité spécifique de la catalase chez *Helix vermiculata*, Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatifs au niveau des membranes cellulaires. Des résultats similaires ont été observés par (Salama *et al*, 2005), chez une autre espèce de gastéropode *Helix aspersa* après exposition au méthomyl et au chlorpyrifos. L'activité accrue de CAT a été montrée dans

Helix aspersa exposés à des poussières métalliques contenant du Cu, du Zn, du Pb, du Cr, du Ni et du Fe (Grara et al, 2009). Escargot *H. trunculus* lorsqu'il est exposé au cadmium, le carbofuran et le lindane a montré une augmentation de l'activité de CAT. (Omeo et al, 2006). (Radwan et al, 2010b) ont signalé une augmentation du taux de CAT exposée au cuivre (Cu), au plomb (Pb) et au zinc (Zn). CdCl₂ et ZnSO₄ ont également montré induire l'activité de CAT dans *Achatinafulica* (Chandran et al, 2005). Dans une autre étude, (Khalil et al, 2015) ont signalé une augmentation de l'activité CAT chez *Lanistes carinatus* exposés au chlorpyrifos jusqu'à 21 jours puis une diminution de l'enzyme. L'activité a été observée chez *Biomphalaria alexandrina* exposée à l'atrazine et au Roundup (glyphosate) a montré une diminution de l'activité CAT (Barky et al, 2012).

4.3.2. Effets sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme antioxydante qui réduit efficacement les peroxydes de H₂O₂ et de lipides à l'eau et aux alcools lipidiques, respectivement, et oxyde à son tour le glutathion en disulfure de glutathion. Le glutathion réduit joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox intracellulaire des cellules vasculaires en fournissant des équivalents réducteurs pour de nombreuses voies biochimiques (Fatiha, Rhian 2007).

Notre résultats révèle que les escargots traités par les pesticides sont subissent à une augmentation significative chez les escargots *Helix Vermiculata*, ces résultats en accord avec les travaux de (guedouche, 2017) qui ont trouvé que les escargots traités par les deux doses de l'Uree et de NPK sont subissent a augmenté l'activité de GPX chez la même espèce des escargots *Helix vermiculata*. De puis avec les travaux de (Kavithal et al, 2013) qui ont trouvé que la nanoparticule de cadmium à une dose de 100 et 120 ppm/Kg a augmenté l'activité de GPX chez l'invertébreMudCarb (*Schyllaolivacea*).

Cet effet qui montre une augmentation progressive de l'activité spécifique de GPX en fonction de la concentration de NPS chez les escargots *Daphnia magna* traité par l'oxyde de titane (5 et 10 mg/L) (Zhu et al, 2010).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspective

Conclusion et perspectives

Notre travail vise à évaluer l'impact de deux pesticides (insecticide : Decis et herbicide : Zoom) et un engrais (weatfert) sur une espèce bioindicatrice de pollution des sols, *Helix vermiculata*. Plusieurs aspects ont été déterminés ;

-Aspect biométrique : le traitement appliqué a provoqué des perturbations biométriques avec une inhibition de la croissance.

-Aspect biochimique : a permis de mettre en évidence une réduction des réserves énergétiques avec comme effet marqué sur les lipides.

-Biomarqueurs enzymatiques : par la détermination de l'activité spécifique de la catalase et la GPx. Les résultats ont révélé une augmentation de l'activité de ces deux biomarqueurs traduisant l'induction du système de détoxification par ces organismes.

A l'avenir, il serait intéressant de compléter ces résultats par une étude de l'effet de ces produits sur le potentiel reproducteur de ces bioindicateurs. Par ailleurs, le dosage d'autres enzymes du système de détoxification (estérases, mono-oxygénase à P450) pourrait contribuer à mieux comprendre le mécanisme d'action de ces produits. De plus, une étude histologique de l'hépatopancréas est indispensable pour déterminer les sites cibles de ces produits.

Référence

A

- **Arias-Estévez M**, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto JC, García-Río L (2008) The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture Ecosystems & Environment* 123(4): 247-260.
- **Aubertot JN, Barbier JM., Carpentier A, Gril JJ, Guichard L, Lucas P, Savary S, Savini I, Voltz M.** 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective, INRA et Cemagref (France).

B

- **Barky FA, El-Homossany K, M S AE, Ismail SM (2012)** Influence of Atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104(1):9–18.
- **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.
- **Belhaouchet N** (2014) Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix aspersa* ». These Doctorat LMD. Université Badji Mokhtar-Annaba. 17-82.
- **Bourbia S. 2013.** Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Mémoire de doctorat, Université Badji Mokhtar. Annaba. 1 : 41-42, 1 : 44-45 58 pages.
- **Bouziati M., 2007.** L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de médecine et de la santé. *Santé Maghreb*. [consulté le, 11/12/2011]. <http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm>.
- **Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a single dye-binding. *Analytic. Biochem.*, **72** : 248- 254.

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

C

- **Chandran R, Sivakumar AA, Mohandass S, Aruchami M (2005)**. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 140(3-4):422-6.
- **Chevalier L., Desbuquois C., Le Lannic J. and Charrier M., 2001**. Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. 324(11): 979-987.
- **Cochon AC, DellaPenna AB, Kristoff G, Piol MN, San Martín de Viale LC, Verrengia Guerrero NR (2007)** Differential effects of paraquat on oxidative stress parameters and polyamine levels in two freshwater invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68:286–292.
- **Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M., 2001**. The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: Effects of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 (9): 1951-1957.

D

- **Daguzan J.**, 1982. L'escargot et l'héliciculture. Informatique technique des services vétérinaires. Malacologie muséum. Paris, pp 165.
- **Daguzan J.**, 1983. L'escargot et l'héliciculture. Informatique technique des services vétérinaires. Malacologie muséum. Paris, pp 165.
- **Daumer M.L, Beline F, Guiziou F, Sperandio M.** Influence of pH and Biological Metabolism on Dissolved Phosphorus during Biological Treatment of Piggery Wastewater. *Biosystems Engineering.*, 96:3 (2007) 379–386.
- **Daumer M.L, Beline F, Guiziou F, Sperandio M.** Influence of pH and Biological Metabolism on Dissolved Phosphorus during Biological Treatment of Piggery Wastewater. *Biosystems Engineering.*, 96:3 (2007) 379–386.
- **Duchateau G. & Florkin M., 1959**. Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Arch. Insect. Physiol. Biochem.*, **67**: 306-314.

E

- **Edward, C.A., Subler, S., Chen, S.K., Bogomolov, D.M.,** 1996. Essential criteria for selecting bioindicator species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems. In: Van Straalen, N.M., Krivolutsky, D.A., (Eds). *Bioindicator Systems for Soil Pollution*. Kluwer, Amsterdam, The Netherlands, 67-84.
- **Eijsackers, H.,** 1983. Soil fauna and soil microflora as possible indicators of soil pollution. *Environmental Monitoring and Assessment*, **3**: 307-316.
- **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.

F

- **Falkner, G., Obrdlik, P., Castella, E. & Speight, M.C.D. (2001)** *Shelled Gastropoda of western Europe*. Friedrich Held Gesellschaft, München, Germany.
- **François R,** 2012. Elements d'écologie, Ecologie appliquée : Action de l'homme sur la biosphère, 7^{ème} édition. Editions Dound, Paris. Pp, 199-202.

G

- **Gaillard, J.,** 1991. Les mollusques, document photocopié du module de la conférence
- **Gaillard, J.,** 1991. Les mollusques, document photocopié du module de la conférence sur les animaux venimeux au Museum d'Histoire Naturelle de Paris, juillet 1999. 1-18.
- **Goldsworthy G.J., Mordue W., and Guthkelch J. 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol* 18 (3): 545.
- **Gomot-de Vaufléury A.,** 2001. Regulation of growth and reproduction. *The biology of terrestrial molluscs*. Barker GM. Oxon, CABI: 331-355.
- **Grara Nedjoud,** 2016. Etude biochimique et histopathologique de la toxicité des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord- Est Algérien) chez *Helix aspersa* (Biochemical and Histopathology study of the toxicity of metal dust emitted by the Annaba steel complex in Northeastern Algeria in the snail *Helix aspersa*).
- **Grara N., Boucenna M., Atilia A., Berrebbah H., Djebar M.R., 2012.** Stress oxydatif des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-Est

algérien) chez l'escargot *Helixaspersa*. *Environnement, Risques & Santé*. 11(3): 221-229.

- **Guler GO, Cakmak YS, Dagli Z, Aktumsek A and Ozparlak H (2010)** Organochlorine pesticide residues in wheat from Konya region, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48: 1218-1221.
- **Grara N, Berrebbah, Rachid R, Atailia A, Djebbar M.R (2009)** Impact of pollution by industrial metallic dust on bioaccumulator organism *Helixaspersa*. *Global Vet* 3:276–280.

H

- **Hopkin, S.P., 1993.** In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. In : Calow P (Ed). *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell, Oxford, 397- 427.
- **INERIS (2005)** Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation. Institut national de l'environnement industriel et des risques. [consulté le : 04/05/2011].

J

- **Joëlle, M., 2015.** L'adaptation des escargots. Lycée Jules- Hordouin Mansart de
- **Jumel A., Gaboriau G., Lagadic L., 2000.** Mixture toxicity of fomesafen and nonylphenolpolyethoxylates on the reproduction of the pond snail *Lymnaea stagnalis*: preliminary results in laboratory and in mesocosms. *Eurotox Congress*. Londres, Angleterre.
- **Jumel A., Lagadic L., 2000.** Metabolism of polysaccharides in *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) exposed to 4-nonylphenol and nonylphenoldodecylethoxylate in mesocosms. *Third SETAC World Congress. Global Environmental Issues in the 21st Century: Problems, Causes and Solutions*. Brighton, Angleterre.

K

- **Kavithal R., Deepa R., Sivagnanam S., Padmajal, M. 2013.** Cadmium Nanoparticle Induced Histological and Biochemical changes in Hepatopancreas of Mud Crab *Scylla olivacea*, *Journal of Academia and Industrial Research*. (2) : 205- 209.
- **Khalil AM (2015)** Toxicological effects and oxidative stress responses in freshwater snail, *Lanistes carinatus*, following exposure to chlorpyrifos. *Ecotox Environ Saf* 116:137–142.

M

- **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.
- **Malika, 2017.** Effet de certains engrais sur une espèce de gastéropode, *Helix vermiculata* : Biochimie et biomarqueurs
- **Mohamed DEBBAB, 2014,** contribution à l'étude de résidus d'une formulation de cyperméthrine dans certains légumes et leur effet sur l'activité antioxydante de ces denrées.
- **Moussard C., 1999.** La biochimie, Biochimie structurale et métabolique, Médecine, Pharmacie, Sciences. De Boeck & Larcières a.s., Bruxelles. 294 p.
- **Müller O.F., 1774.** *Vermium terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succincta historia. Volumen alterum.* - pp. I XXXVI [= 1-36], 1-214, [1-10]. *Havnia & Lipsia*. Heineck et Faber, p. 59.

O

- **ORP,** Observatoire des Résidus de Pesticides, ANSES. 2014. [En ligne] <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/> [consulté le 10 juin 2014].

P

- **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, *Bellamya dissimilis* (Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53: 142-148.
- **Phillips, D.J.H., 1977.** The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. A review. *Environmental Pollution*, 13: 281-317.
- **Pimentel D (1995)** Amounts of pesticides reaching target pest: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 8: 17-29.

R

- **Radwan M.A., Essawy A.E., Abdelmeguid N.E., Hamed S.S., Ahmed A.E., 2008.** Biochemical and histochemical on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snail treated with carbamate pesticides. *Pesticides Biochemistry and Physiology*. 90: 154- 167.
- **Radwan MA, El-Gendy KS, Gad AF (2010b)** Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of *Thebapissana* exposed to heavy metals. *Arch Environ Contam Toxicol* 58(3):828-

- **Romeo M, Gharbi-Bouraoui S, Gnassia-Barelli M, Dellali M, Ai'ssa P (2006)** Responses of *Hexaplex (Murex) trunculusto* selected pollutants Science of the Total Environment 359:135– 144.

S

- **Sabrina et al, 2016** Effet de deux molécules nanométriques sur les paramètres physiologiques des escargots « *Helixaspersa* » 1 :41-42, 44-45 Saint Cyr l'école (académie de Versailles), pp 7.
- **Salama A.K., Osman K.A., Saber N.A., Soliman S.A., 2005.** Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helixaspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 8: 92-96.
- **Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi, R., Sbartai H., Smaghe G. and Djebbar M.R. 2009.** Behavior of *Paramecium* sp. treated with bifenthrin with special emphasis on respiratory metabolism. Protein and generation time. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci.* 1.p.13-18.
- **Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A., Toussaint, M.L., Badot, P.M., 2002a.** Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helixaspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere*, **48**: 571-579.
- **Schwaiger J., Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Tribskorn R., 1997.** The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6: 75-86.
- **Sharaf A.A., Mohamed A.M., Abu El-Ghar M.R., Mousa A.H., 1975.** Control of snail hosts of Bilharziasis in Egypt. 3. Effect of the organophosphorus insecticide dursban on carbohydrate metabolism of the snail *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinustruncatus*. *Egyptian Journal of Bilharziosis*. 2: 49-61.
- **Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyneck C., New Hall. & Feidman L., 1966.** A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analyt. Biochem.*, **19** : 415-528.
- **Spellerberg, I.F., 2005.** Monitoring ecological change. Second Edition, Cambridge.

T

- **Testud F and Grillet JP** (2007) Insecticides organophosphorés, carbamates, pyrèthrinoïdes de synthèse et divers. EMC. Toxicologie-Pathologie Professionnelle. 16-059-C-15
- **Timbrell JA**, Draper R, Waterfield CJ, (1994) Biomarkers in toxicology: new uses for some old molecules? *Toxicology and Ecotoxicology News* 1(1): 4-14 University Press, Cambridge, England, 410 p.

Z

- **Zhu., Chang Y., Chen Y .S.** 2010. Toxicity and bioaccumulation of Ti O₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. 88-91.