



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 de biologie Appliquée



MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Science biologique

Option: santé et environnement

Thème:

Effet du carbofuran sur le système enzymatique chez un gasteropode (*Helix Aspersa*)

Présenté par:

AZIZI Dalel

CHERGUI Meriem

Devant le jury:

M ^{me} . HAMEL Mahdia	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Président
M ^{me} . ROUACHDIA Roukaya	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Rapporteur
M ^{me} . YAHIA Hada	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Examineur

Date de soutenance: 29/05/2016.

Année universitaire:

2015/2016

ملخص

عملنا التجريبي متعلق بتقييم سمية مبيد حشري الكربوفيران مطبق على نوع حيواني من القواقع موجود في المناطق الرطبة الشرقية للوطن الحزون *Helix aspersa*. تعرضت الحزونات الترابية إلى تطبيق ثلاث تراكيز مختلفة من الكربوفيران لمدة زمنية قدرت بثلاث أيام، سبع وأخرى خمسة عشر يوماً.

عملنا مرتكز على تقييم النشاط الأنزيمي على مستوى البنكرياس الكبدي من خلال معايرة بعض المؤشرات الحيوية مثل GSH GST و GPx كما قمنا بمتابعة بعض الآليات الشكلية والسلوكية للحزونات الترابية الخاضعة تحت المبيد الحشري.

أظهرت نتائجنا تغييرات بدلالة الجرعة و فترات العلاج تفعيل نظام إزالة السمية بحيث ارتفع نشاط الإنزيم GST وانخفض نشاط GSH و GPx. من ناحية أخرى ارتفع وزن البنكرياس الكبدي بالمقارنة مع العينات الشاهدة.

أظهر الفحص السلوكي تغييرات سلوكية أولها فقدان الانجذاب نحو الأكل كأول ردة فعل نحو السمية في المحيط.

الكلمات الدالة: المؤشرات الحيوية ، *Helix aspersa* ، الكربوفيران ، نظام إزالة السموم ، البنكرياس الكبدي.

Abstract

Abstract

This work concerns the evaluation of the potential toxicity of a pesticide carbofuran on a gastropod *Helix aspersa*.

Snails are been exposed to increasing concentrations of carbofuran by digestive application during 3,7 and 15 days. We tried to estimate the oxidative stress in the hepato pancreas of *Helix aspersa*, by the follow-up of the activity GST and GPx, as well as the rate of Glutathion reduces and proteinate total.

To complete our study we followed the rate of comportementales and morphométriques parameters

The obtained results show that the rate of Glutathion reduced (GSH) decreases in a dose dependent manner accompanied with an induction of the activity Glutathion S transférase (GST) and GPx in organisms treated compared to controls.

The carbofuran induce significantly the GST,GPx and reduce significantly the rate of the GSH.

Key words: Spinosad, Biomarkers, Oxydatif stress, Histopathology, Hemolymph, *Helix aspersa*.

Résumé

Ce travail concerne l'évaluation de la toxicité potentielle d'un pesticide le carbofuran sur un gastéropode *Helix aspersa*.

Les escargots ont été exposés à des concentrations croissantes de carbofuran par voie digestive pendant 3,7 et 15 jours. Nous avons cherché à évaluer les effets d'un éventuel stress oxydatif au niveau de l'épato pancreas et ce par le suivi de l'activité de certains biomarqueurs enzymatiques : la GST, et le GPx. Nous avons également mesuré le taux de Glutathion réduit ainsi que quelques paramètres morphométriques et comportementaux.

Nos résultats montrent une induction de l'activité des enzymes antioxydantes telles que la GST et le GPx, parallèlement à une augmentation du taux de GST et à une diminution du taux de GSH et Gpx. Ceci a été observé aussi bien au niveau de la glande digestive. D'un autre côté nous avons également mis en évidence aussi un effet comportemental de carbofuran traduit par une augmentation progressive de le poids de l'hépatopancréas chez les organismes traités par rapport aux témoins.

L'examen comportementaux a révélé une perturbation des séries des symptômes comme la perte de la chimioréception; la première réponse de la toxicité.

Mots clés: Carbofuran, Biomarqueurs, Stress oxydant, *Helix aspersa*.

Remerciement

En préambule à ce mémoire nous remerciant "ALLAH" qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Mes remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté de la science de la nature et la vie et science exactes pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Nous tenant à remercier sincèrement M^{me}. ROUACHDIA, qui, en tant que promotrice de mémoire, qui est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Aussi un remerciement très chaleureux aux membres de jury: Mme. HAMEL Mahdia et YAHIA Hada.

Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire sur tout Souad technicienne de laboratoire.

Un grand merci pour moi et Meriem

Dédicace

Tous mes remerciements les plus sincères (ALLAH) en premier lieu.

Je dédie ce modeste travail à :

*Mon père, **AMMAR** l'exemple de courage, de dignité, et de sacrifice*

*Mes chères mères le symbole de tendresse, **WANNASSA** et **MABROUKA**.*

*Ma grand-mère : **HALIMA**.*

*Mes sœurs : ma jumelle d'esprit **DALILA**, **NAWA** et leur enfant **CHAIMA** et **ABD ERRAZAK**, **SAMRA** et son fils **MOTASSIM BI ALLAH**, **DJAMILA** et sa fille **AMOUNA**, **HADDA** et ses filles **ACHWAK** et **HIBA**, **AMIRA**, **BAYA** et sa filles **SABAH** et les tous restes.*

*Mes frères : **ADEL**, **LAZHER** et son fils **MOHAMED IBRAHIM**, **HAMZA** et **ALI** et sa fille **AYA** témoignage de mes amour et de mes profonde admiration. Que **DIEU** vous protège et vous prête bon santé et longue vie.*

*Mes belles-sœurs : **NAIMA** et **MALIKA** la tendre, **ATIKA**, **RBIHA**, et **SALIHA**.*

*Mes oncles : **IBRAHIM**, **SAAD**, et **MOHAMED**.*

*Mes cousins et cousines : **MARWANE**, **NACER EDDINE**, **IYAD**, **TAWBA**, et **CHAHRA**.*

*Mes amis : **AMEL**, **SABRINA**, **SABAH**, **SELMA**, **SOUHAILA**, **HANANE**, **LAMIA**, **IMENE**, **LINDA**, **FATMA**, **MOUNIRA**, **HALOUMA**, **RABAB**, **ANWER**, **FAYROUZ**, **EZAHWANI**, **HBIBA**, **JAWHARA**, **LOBNA**, **TOUTA**, **RIDHA**, **RABIE**, **SOUMIA** et **MONA**, **ZAHIRA**, **NADA**, **FATOUM**.*

Pour mes très chers amis de promotion 2016.

Et enfin je dédie mon travail à tous mes enseignants.

إهداء

إلى الرجل الأول في حياتي: والدي: حفظه الله .

إلى الأم الغالية التي لم تبخلي بعبئها أُمي . . . أحبك

إلى روح جدِّي التي لا تزال بيننا: أديب رحمة الله عليه

إلى سندي في حياتي إخوتي: سيف الدين، يعقوب، إسحاق، زينب .

إلى عائلتي شرقي خاصة خالتي سمراء: عمي مصطفى، إلى عائلتي الثانية بغرداية: عمي

بوعلام، ماما آسيا، سارة .

إلى زوجي سيد أحمد أحبك

إلى صديقات عمري: يسمين، راضية، فاطمة، شادية، غنية .

مريم

Table des matières

Table des matières

	Titre	Page
	ملخص	
	Abstract	
	Résumé	
	Dédicace	
	Remerciement	
	Table des matières	
	Liste des tableaux	
	Liste des figures	
	Liste des symboles	
	Introduction	
	Partie I: Étude Bibliographique Sur Les Pesticides	
	I-1 Généralité sur les pesticides	01
	I.1.Historique	01
	I.2. Définition	01
	I.3. Classifications des produits phytosanitaires	02
	I.4. Mode d'action des pesticides	04
	I.5. Dégradation des pesticides	04
	I.5.1. Persistance	04
	I.5.2. Produits de dégradation	05
	I.6.Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement	05
	I.7. Propriétés physico-chimiques du carbofuran	06
	I.7.1. Définition	06
	I.7.2. Propriétés physicochimiques	07
	I.8. Effets toxicologiques	08
	I.8.A. Toxicité aiguë	08
	I.8.B. Toxicité chronique	08
	I.8.C. Effets écotoxiques	08
	I.9. Toxicocinétique du carbofuran	09

Table des matières

I.9.1. Absorption	09
I.9.2. Distribution	09
I.9.3. Biotransformation	09
I.9.4. L'excrétion	09
I.10. Toxicodynamique du carbofuran	10
Partie II: Etude Bibliographique Sur l'espèce étudiée	
I.1.Présentation et classification de l'espèce bioindicatrice	11
I.1.1.Classification	11
I.2. Anatomie générale de l'escargot	12
I.2.1. Anatomie externe de l'escargot	12
I.2.2. Anatomie interne	13
I.2.3. Rythme d'activité	13
I.2.4. Estivation et hibernation	13
I.2.5. Croissance	14
I.2.6. Reproduction	14
Partie III: Systèmes de biotransformation des xénobiotiques Application en tant que Biomarqueur	
I.1. Les biomarqueurs	16
I.1.1. types de biomarqueurs	16
I.2. Systèmes de biotransformation des xénobiotiques chez les animaux, cas particulier des mollusques	17
I.2.1. Vue d'ensemble du métabolisme des xénobiotiques	17
I.3. Les enzymes du système du glutathion	19
I.3.1. Le glutathion	19
I.3.1.1. Implication dans la détoxification	19
I.3.2. Les glutathion-S-transférases GST	20
I.3.3. Les glutathion peroxydase GPX	20
II.1. Matériel et méthodes	21
II.1.1. Matériel	21
II.1.1.1. Matériel biologique	21

Table des matières

II.1.1.1. 1.Présentation et description de l'espèce bioindicateur	21
II.1.1.1.1. A.Systématique	22
II.1.1.1.1. B.Distribution géographique	22
II.1.1.2. Choix d'insecticide	23
II.1.2.Méthodes	24
II.1.2.1. Méthode d'élevage	24
II.1.2.1.1. Conditions d'élevages	24
II.1.2.2. Méthode de traitement	24
II.1.2.3. Méthode de dissection et sacrifice	27
II.1.2.4.Méthode de mesure des effets comportementaux	28
II.1.2.5. les Biomarqueurs physiologiques	28
II.1.2.6. Méthode des dosages des indicateurs du stress oxydant	29
II.1.2.6.1. Dosage du glutathion (GSH)	29
II.1.2.6.2. Dosage de l'activité glutathion-S-transférase (GST)	31
II.1.2.6.3. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)	33
II.1.2.6.4. Dosage des protéines	34
II.1.2.7. Analyse statistique	34
III. Résultats	35
III.1.Les effets comportementaux	35
III.1.1. Estimation du taux d'alimentation	35
III.1.2. Effets sur le comportement	35
III.2. Effets sur les paramètres morphométriques	35
III.2.1. La mortalité	35
III.2.2. Effets du carbofuran sur le poids de l'hépatopancréas d'<i>Helix aspersa</i>	36
III.3. Effets sur les biomarqueurs du stress oxydant	37
III.3.1. Effet du carbofuran sur le taux du glutathion (GSH)	37
III.3.2. Effets du carbofuran sur la glutathion- S-transférase (GST)	38
III.3.3. Effets du carbofuran sur le Glutathion peroxydase (GPx)	39

Table des matières

IV. Discussion	41
IV.1. Réponses comportementales	41
IV.1.1. La mortalité	41
IV.1.2. Effets du carbofuran sur le poids de l'hépatopancréas d'<i>Helix aspersa</i>	41
IV.2. Effets sur le taux des biomarqueurs du stress oxydant	42
IV.2.1. Effet du carbofuran sur le taux de glutathion (GSH)	42
IV.2.2. Effets du carbofuran sur la glutathion-S-transférase (GST)	42
IV.3.3. Effets du carbofuran sur Glutathion peroxydase (GPx)	43
Conclusion	
Référence bibliographiques	
Annexes	

Liste des tableaux

Liste des tableaux

N° Tableau	Titre	Page
01	Classification de la toxicité aigüe des pesticides	02
02	Croisements entre classification chimique et classification biologiques des pesticides	03
03	Informations générales sur le carbofuran	07
04	Propriétés physico-chimiques du carbofuran	07
05	Principaux métabolites dans la bile et l'urine	09
06	Classification d' <i>Helix aspersa</i>	11
07	Classification d' <i>Helix aspersa</i>	22
08	Mortalité des escargots adultes durant les six semaines de traitement par les deux insecticides et leurs mixtures	36

Liste des figures

Liste des figures

N° Figure	Titre	page
01	Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides	06
02	Structure spatiale du carbofuran	06
03	Morphologie externe de l'escargot	12
04	Anatomie interne de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	13
05	Voies majeures de détoxification et de bioactivation des xénobiotiques organiques chez les animaux	18
06	Structure du glutathion réduit	19
07	Elevage d' <i>Helix aspersa</i> dans le laboratoire	22
08	Traiter d' <i>Helix aspersa</i> dans le laboratoire	24
09	Schéma représentatif du protocole expérimental	25
10	Sacrifice des animaux et les prélèvements des hépatopancréas	26
11	Schéma représentatif du protocole du dosage de GSH	27
12	Protocole de dosage de la GST	30
13	Schéma représentatif du protocole des protéines tissulaires	32
14	Effets du carbofuran sur le poids de l'hépatopancréas (g) chez <i>Helix aspersa</i>	37
15	Effet du carbofuran sur le taux de GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine) chez <i>Helix aspersa</i>	38
16	Effet du carbofuran sur l'activité spécifique de GST	39
17	Effet du carbofuran sur le taux de GPx ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine) chez <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	40

Liste des symboles

Liste des symboles

Ach: Acetylcholine

AChoE: Acetylcholinestérase.

ACTA: Association de Coordination Technique Agricole.

ADN: Acide desoxyribonucléique.

AOP: Acide ortho phosphorique.

ARLA: Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire.

ARN: Acide ribonucléique.

ASS: Acide Sulfosalicylique.

ATP: Adénosine tri -phosphate.

BaPH: BaP-hydrotylse.

BBC: Bleu brillant de coomasie.

BPDE:BaP-diol epoxyde .

BSA: SerumAlbumin Bovin.

CAS:Chemical Abstracts Service.

CAT: **Catalase.**

CDNB: 1-Chloro, 2,4-Dinitrobenzène.

CL: Concentration létale.

CL50 : Concentration létale pour 50 % des organismes exposés, par rapport au témoin.

cm: centimètre.

CNRC: Conseil national de recherches du Canada.

CuOOH:hydroperoxyde de cumène.

CYP: Cytochrome P450.

DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane .

DL50: Dose létale pour 50% des organismes exposés, par rapport au témoins

DL: Dose létale

DO: Densité optique.

EDTA: Ethylène diamine tetra-acétique.

ERO: Espèces réactives de l'oxygène.

Fig: Figure.

g: Gramme.

GPx: Glutathion peroxydases.

GSH: Glutathion-S-transférases.

Liste des symboles

- GSSG:** Disulfure de glutathion (Glutathion oxydé).
- GST:** Glutathion-S-transférases.
- h:** Heur.
- H₂O₂:** Peroxyde d'hydrogène.
- HAP:** Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques .
- HCH:** Hexachlorocyclohexane.
- j:** Jour.
- Kg:** Kilogramme.
- Koe:** Coefficient de partage n-octanol-eau.
- L:** Litre.
- m:** Mètre.
- M:** Mole.
- MDA:** Malondialdehyde.
- mg:** Milligramme.
- min:** Minute.
- ml:** Milliliter.
- mM:** Millimolaire.
- NADPH:** Nicotinoamide –adénine dinucléodide phosphate réduit.
- NAP:** Naphthalene
- nm:** Nanomètre.
- NO₂:** Trioxyde d'azote.
- OMS:** Organisation mondiale de la santé.
- p.c:** Poids corporel.
- PB:** Phenobarbital.
- PCB:** Polychlorobiphényle .
- PH:** Potentiel hydrogen.
- SOD:** Superoxydodismutase.
- t/mn:** Tours/minute.
- TBA:** Acide thiobarbiturique.
- tBuOOH:** Tert-butyl-hydroperoxy.
- TCA:** Acide Trichloroacétique.
- UGT:** UDP-glucuronosyltransférase.
- UICA:** Union internationale de chimie pure et appliquée.

Liste des symboles

UIPP: Union des Industries de la Protection des Plantes.

UV: Ultraviolet.

%: Pourcentage.

°C: Degré Celsius.

µg: Microgramme.

µl: Microlitre.

µM: MicroMol.

3MC: 3-méthyl-cholantluene.

Liste des annexes

Liste des annexes

N° Annexes	Titre
01	Droite de régression exprimant les absorbances à 595 nm en fonction des quantités d'albumines
02	Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines hépato-pancréatiques
03	Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) de poids du l'hépatopancréas (g) chez <i>Helix aspersa</i>
04	Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) de l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) chez <i>Helix aspersa</i>
05	Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) du taux de GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine) chez <i>Helix aspersa</i>
06	Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) du taux de GPx ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine) chez <i>Helix aspersa</i>

INTRODUCTION

Introduction

Introduction

Après la seconde guerre mondiale, les pesticides ont permis le développement de l'agriculture et ont contribué à l'augmentation des rendements et à la régulation de la production agricole. L'utilisation des produits phytosanitaires a également limité ou éradiqué un certain nombre de maladies parasitaires très meurtrières. Cependant, aujourd'hui, les pesticides sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement. Ils sont en effet fréquemment mis en cause dans la dégradation de la qualité des eaux douces souterraines et des eaux côtières, dans la réduction de la biodiversité terrestre constatée dans les zones agricoles et dans les milieux "naturels" contaminés ou bien encore dans des cas de surmortalité des abeilles et de baisse de production des ruches. Par ailleurs, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent une corrélation entre l'utilisation professionnelle des pesticides et l'apparition de certaines pathologies dans les populations concernées. Des effets cancérigènes, neurotoxiques ou de type perturbation endocrinienne des pesticides ont été mis en évidence chez l'animal. La question des risques pour l'homme est donc posée tant au niveau professionnel qu'à celui du consommateur.

Les sources potentielles de dispersion des carbamates sont de même nature que celles des Organophosphorés essentiellement d'origine agricole, mais là encore il est extrêmement difficile de quantifier les apports liés aux usages domestiques. Les données sur les niveaux en présence de ces molécules dans les différents compartiments de l'environnement sont encore plus rares que pour les Organophosphorés.

Le gastéropode *Helix aspersa*. Occupe une position privilégiée dans l'écosystème en tant que bioindicateurs/bioaccumulateurs.

De son côté, l'escargot *Helix aspersa* est largement présent dans les écosystèmes terrestres, c'est un mollusque, qui peut nous renseigner sur la qualité de l'écosystème dans lequel il vit, il est exposé à la pollution par plusieurs voies d'exposition qui impliquent l'ingestion d'aliments souillés ainsi que le contact et l'absorption par l'épithélium du pied depuis des surfaces contaminées. **[Bliefert et Perraud., 2001]**.

L'objectif général de cette étude est d'évaluer par une étude expérimentale les effets d'exemple d'insecticide de famille carbamate grâce à l'utilisation d'un modèle bioindicateur présent dans les écosystèmes terrestres, l'escargot *Helix aspersa*.

Introduction

Ce mémoire s'articule autour de quatre parties:

Chapitre I

Le premier chapitre dresse une étude bibliographique sur les pesticides, l'espèce étudiée enfin, une étude bibliographique sur le système de biotransformation des xénobiotiques.

Chapitre II

Le deuxième chapitre expose le matériel et les méthodes utilisées pour déterminer les effets du carbofuran, insecticide de la famille des carbamates sur *Helix aspersa* par l'étude des paramètres biochimiques (mesures des quelques biomarqueurs de stress oxydants (GSH, GST et GPx).

Chapitre III

Ce chapitre consiste à présenter les résultats.

Chapitre IV

Ce chapitre est consacré à dans résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale qui synthétise les principaux résultats de ce travail.

CHAPITRE I

Chapitre I: Etude bibliographique

Partie 1- Étude Bibliographique Sur Les Pesticides

I-1 Généralité sur les pesticides

I.1. Historique

Les premières descriptions de l'utilisation des pesticides remontent à mille ans avant JC avec le soufre. En Orient, dès le XVI^{ème} siècle, l'arsenic et la nicotine étaient utilisés. Au XIX^{ème} siècle, les premières études scientifiques mettent en évidence l'intérêt du sulfate de cuivre pour détruire les plantes adventives. L'utilisation des produits phytosanitaires connaît un réel essor à partir des années 40, période à laquelle les premiers pesticides de synthèse (lindane, DDT, aldrine, ...) apparaissent sur le marché. Les résultats, très positifs quant aux rendements agricoles, ont été immédiats, cependant les premières accusations d'atteinte à la santé humaine et à l'environnement se firent entendre dès les années 60 [Carson *et al.*, 2002]. Dans les années 70 et 80, la mise sur le marché de molécules moins stables que les organochlorés n'a pas permis la diminution des contaminations. Au contraire, la consommation croissante des produits phytosanitaires en agriculture mais aussi dans d'autres secteurs d'activité a généré non seulement des contaminations des eaux de surface et souterraine mais également des brouillards et des eaux de pluie. En effet, dans les années 90, de nombreuses études scientifiques ont relaté la présence de produits phytosanitaires dans les brouillards. [Bintein et Devillers., 1996; Schomburg *et al.*, 1991].

I.2. Définition

L'étymologie du mot pesticide s'est construite à partir du suffixe «-cide » qui signifie « tuer » et de la racine anglaise pest (animal, insecte ou plante nuisible) provenant du latin Pestis (peste) qui désignait le fléau en général. Donc les pesticides sont des composés chimiques dotés de propriétés toxicologiques, utilisés par les agriculteurs pour lutter contre les animaux ou les plantes jugés nuisibles aux plantations.

Le terme pesticide couvre un champ plus vaste et général que les expressions «produit phytosanitaires» ou «produits phytopharmaceutiques» car il englobe toute substance, naturelle ou de synthèse, capable de contrôler, de repousser ou de détruire des organismes dits nuisibles, ou indésirables ou les médicaments destinés à protéger les animaux domestiques, gibiers ou de compagnie (par exemple, le collier antipuces pour chien). Contrairement aux engrais qui sont utilisés pour augmenter le rendement [Bliefert et Perraud., 2001].

Chapitre I: Etude bibliographique

I.3. Classifications des produits phytosanitaires :

Les pesticides peuvent être classés en fonction de la nature de l'espèce à combattre mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose [Fournier., 1988]. Le premier système de classification repose sur le type de parasites à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles de produits phytosanitaires selon la nature des cibles visées : les herbicides, les fongicides et les insecticides, à celles-ci s'ajoutent des produits divers tels que les acaricides (contre les acariens), les nématocides (contre les nématodes), les rodenticides (contre les rongeurs), les taupicides (contre les taupes), les molluscides (contre les limaces et les escargots), les corvicides et les corvifuges (contre les oiseaux ravageurs de culture et surtout les corbeaux) et enfin les répulsifs [ACTA., 2005].

Le deuxième système repose sur la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires (tableau 2), les principaux groupes chimiques comprennent les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoides, les triazines et les urées substituées. [Merhi., 2008; UIPP., 2009].

Tableau 01: Classification de la toxicité aiguë des pesticides [OMS., 2005].

Classification	Désignation	DL50 pour le rat (mg/Kg poids du corps)			
		Oral		Cutané	
Classe	Niveau du risqué	Solide	Liquide	Solide	Liquide
Ia	Extrêmement dangereux	≤ 5	≤20	≤10	≤40
Ib	Très dangereux	5 – 50	20 - 200	10 -100	40 -400
II	Modérément dangereux	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III	Peu dangereux	≥ 500	≥2000	≥1000	≥4000
U	Sans risque dans le cadre d'une utilisation normale	≥ 2000	≥ 4000		

Chapitre I: Etude bibliographique

Tableau 02: Croisements entre classification chimique et classification biologiques des pesticides
[Calvet *et al.*, 2005].

Groupe	Classe chimique	Exemples des molécules
Antiparasitaires (insecticide et Anticoccidiens)	Insecticides minéraux	Arséniate de plomb, fluorure d'aluminium, composés soufrés, mercurique, séléniés.
	Organochlorés	DDT (dichlorodiphényl-trichloréthane) HCH (hexachloro-cyclohexane) dont le lindane
	Organophosphorés	Dichlorvos, carbofuran, carbaryl, benfuracarbe
	Carbamates	Aldicarbe, carbofuran, carbaryl, benfuracarbe
	Pyréthroïdes	Perméthrine, cyperméthrine, déltaméthrine
	Macrolides endectocides	Ivermectine, dormectine, abamectine, moxidectine, sélénamectine, éprinomictine
Herbicides	Herbicides minéraux	Sulfates, nitrates, chlorures, chlorates, cyanamide
	Phytohormones	Pichloranne, trichlopyr, fluroxypyr, glyphosphate
	Carbamates	Asulame, diallate, sulfallate
	Dérivés de l'urée	Mouron, Dinitrophénols, Aminotriazole
	Divers	Triazines, dinitrophénols, aminotriazole
Fongicides	Dithiocarbamates	Mancozèbre, manèbe, zinèbre, propinèbre
	Carbamates	benzimidazolés Bénomyl, carbendazime
	Dérivé de l'imidazole	Kétoconazole, niconazole, imazalil, prochloraz.

Chapitre I: Etude bibliographique

I.4. Mode d'action des pesticides

Les modes d'action des pesticides sont divers. Les insecticides tuent les insectes ou empêchent le déroulement normal d'une des fonctions essentielles de leur cycle de vie (éclosion des œufs par exemple). Les fongicides s'attaquent aux spores des champignons en empêchant leur germination ou bloquent les divisions cellulaires des champignons. Enfin, les herbicides sont destinés à empêcher l'installation d'espèces végétales concurrentes dans les champs de culture en pénétrant par exemple dans la plante par ses racines (dérivés de l'urée) [Siebers *et al.*, 1993].

I.5. Dégradation des pesticides

Dès qu'ils atteignent le sol ou la plante, les pesticides commencent à disparaître : ils sont dégradés ou sont dispersés. Les matières actives peuvent se volatiliser, ruisseler ou être lessivées et atteindre les eaux de surface ou souterraines, être absorbées par des plantes ou des organismes du sol ou rester dans le sol, rarement plus de 5 à 10 ans [Leonard., 1990; Schiavonet *al.*, 1995].

La vitesse de disparition, ou le degré de persistance d'un produit, dépend d'un certain nombre de facteurs qui peuvent être [Piart., 1978]:

- mécaniques (pluie, vent) ou physiques (tension de vapeur, solubilité dans l'eau ou les lipides, codistillation avec l'eau, phénomènes d'adsorption...).
- chimiques (hydrolyse, oxydation, réduction, décarboxylation, isomérisation, photodégradation...).
- biologiques (action des micro-organismes dans le sol et réactions enzymatiques dans les végétaux dans le cas des produits endotherapiques...).

I.5.1.Persistance

Initialement, la notion de persistance a été utilisée pour les pesticides ; elle reflète la capacité de la substance à ne pas être altérée par des processus physiques, chimiques et biologiques. «La persistance correspond donc à la stabilité des composés dans l'environnement, à leur résistance à une décomposition ou à une transformation dans la nature». Il est important de souligner que les composés issus de la dégradation d'une substance initiale et ne pouvant être détruits dans la nature sont aussi considérés comme persistants mais persistants secondaires voire tertiaires. On fait par ailleurs une différence entre la persistance voulue et non désirée, dans le sens où la persistance non désirée induit un effet au-delà du temps prévu initialement (typiques des composés organiques chlorés comme le DDT). Cependant « il n'existe pas de mesure absolue de la persistance des composés.» On s'appuie plus sur des comparaisons entre différents composés.

Chapitre I: Etude bibliographique

On s'aide alors des caractéristiques physicochimiques liées à la stabilité ou la réactivité des substances (comme la vitesse de réaction, le temps de demi-vie) [Bliefert et Perraud., 2001].

I.5.2. Produits de dégradation

Une fois entrés dans l'environnement, la connaissance des produits de dégradation formés par les pesticides devient très importante afin d'évaluer leur toxicité pour la santé de l'homme et l'environnement [Zamy *et al.*, 2004]. En général les produits de dégradation sont moins toxiques que leurs composés parents [Day *et al.*, 1990 et 1996], sauf pour certaines exceptions [Guillard *et al.*, 2001; Lanyi et Dinya., 2005]. Cela s'explique de plusieurs façons: le produit dégradé peut représenter la partie active du composé parent et être ainsi plus toxique pour l'environnement ou alors le produit de dégradation s'accumule en quantité plus importantes dans l'environnement ce qui le rend plus toxique que son composé parent. . L'évaluation de la toxicité des produits de dégradation de pesticides est récente. Il n'existe que peu d'études et de données sur les produits de dégradation des pesticides, il est donc difficile de tirer des généralités sur leur toxicité [Soltani et Morsli., 2003]. L'analyse des produits de dégradation est rendue difficile par leurs faibles concentrations dans le milieu et l'analyse de composés inconnus n'est pas aisée.

I.6. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement

Malgré un souci croissant de protection de l'environnement, lors de l'utilisation des produits phytosanitaires, une certaine quantité de ces substances se retrouve dans l'environnement, principalement dans l'air par dérive sous forme de gouttelettes ou sur le sol [Piment *el.*, 1995](Fig. 1):

- ✚ Dans le sol.
- ✚ Dans les cours d'eau (eau de surface) ou il est entraîné par ruissellement.
- ✚ Dans les nappes phréatiques par infiltration (à cause de la pluie).
- ✚ Dans l'air par volatilisation ou il eut être dégradé (photo-décomposition) et/ou redéposé à un autre endroit.

Chapitre I: Etude bibliographique

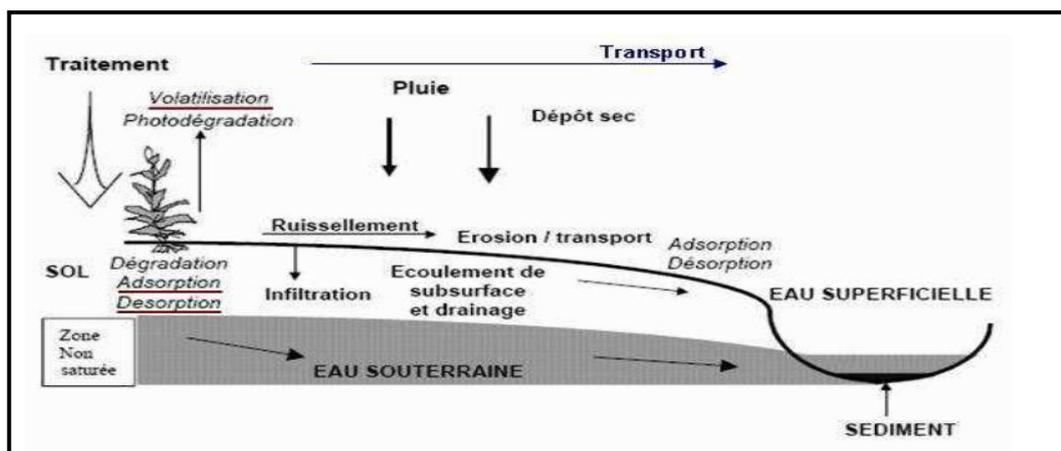


Fig01: Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides
[<http://www.ddaf45.agriculture.gouv.fr/>]

I.7. Propriétés physico-chimiques du carbofuran

I.7.1. Définition

Le carbofuran est un insecticide systémique à large spectre du groupe des carbamates dont la gestion de la résistance repose sur le mode d'action du groupe 1A (inhibiteur de l'acétylcholinestérase). Il agit par contact et par ingestion [ARLA., 2009]. Le carbofuran est un insecticide utilisé pour le traitement des semences dans le cadre de différentes cultures : cultures légumières, maïs, soja, arbustes d'ornement, cultures florales, fraisier [ACTA., 1996].

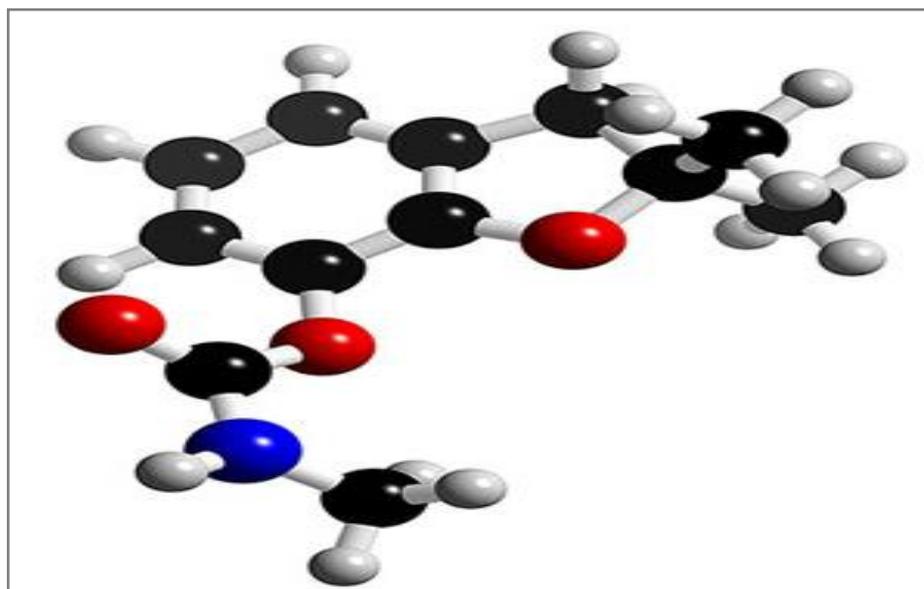
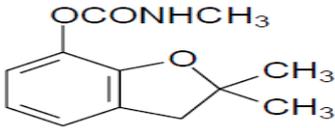


Fig02: Structure spatiale du carbofuran [<http://meddic.jp/carbofuran>].

Chapitre I: Etude bibliographique

Tableau 03. Informations générales sur le carbofuran[ARLA., 2009].

Informations	
Abréviation	CAF
Type de pesticides	Insecticide, nématicide
Famille chimique	Carbamates
Groupe	1A
Formule développée	

I.7.2. Propriétés physicochimiques

Les principales caractéristiques physico-chimiques de la substance active sont présentées dans le tableau 04.

Tableau 04 : Propriétés physico-chimiques du carbofuran [ARLA., 2009].

Propriété	Résultat
État physique et couleur	un produit solide cristallin incolore
Odeur	Inodor
Chemical Abstracts Service (CAS)	méthylcarbamate de 2,3-dihydro-2,2-diméthyl-7-benzofuranyle
Union internationale de chimie pure et appliquée (IUCPA)	méthylcarbamate de 2,3-dihydro-2,2-diméthylbenzofurane-7-yle
Numéro CAS	1563-66-2
Poids moléculaire	221,3 g/mol
Formule brute	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃
Point ou plage de fusion	153°C
Solubilité dans l'eau	320 mg/L à 20 °C et 351 mg/L à 25 °C
Spectre d'absorption ultraviolet (UV)-visible	Aucune absorption prévue à $\lambda > 300$ nm
Pression de vapeur	0,031 mPa à 20 °C et 0,072 mPa à 33 °C
Température d'ébullition	décomposition à 295°C
(log K _{ow}) à 25°C	entre 1,6 et 2,32; par conséquent pas de bioaccumulation importante.
Coefficient de partage carbone organique-eau	22cm ³ .g ⁻¹

Chapitre I: Etude bibliographique

I.8. Effets toxicologiques

I.8.A. Toxicité aiguë

Le carbofuran est extrêmement toxique par voie orale et par inhalation. La toxicité par la voie cutanée est faible. Il est peu irritant pour les yeux et la peau. Le carbofuran n'est pas un sensibilisant cutané. Le carbofuran est un inhibiteur de l'AChE. Ainsi la personne exposée à des doses supérieures à 0,25 mg/kg p.c peut développer des symptômes tels que salivation, diaphorèse, douleurs abdominales, somnolence, étourdissement, anxiété, vomissement, perte des contrôles, voire coma et arrêt cardiaque [ARLA., 2009].

I.8.B. Toxicité chronique

Les études chez les chiens, les rats et les souris ont démontré une inhibition significative des cholinestérases. En raison du caractère rapidement réversible de l'inhibition des cholinestérases et de la transformation métabolique très rapide du carbofuran. Il ne semble pas cancérigène, tératogène ou mutagène. Des études ont démontré une inquiétude potentielle concernant une possible toxicité des spermatozoïdes et des testicules après l'administration subchronique de carbofuran à des rats. Une étude sur la neurotoxicité du développement a démontré que les fœtus étaient plus sensibles à l'inhibition des l'AChE. De plus, la progéniture chez les rats dans une étude de neurotoxicité du développement a démontré des effets concernant l'ouverture vaginale et la séparation préputiale causés par une baisse de poids corporel [ARLA., 2009].

I.8.C. Effets écotoxiques

Le carbofuran est modérément à hautement toxique chez les poissons d'eau douce. Il est extrêmement toxique chez *Daphnia magna*, un invertébré aquatique d'eau douce. Il semble avoir peu tendance à se bioconcentrer dans les tissus des organismes aquatiques. Le carbofuran est extrêmement toxique chez les oiseaux avec une DL₅₀ aiguë par voie orale de 0,4mg/kg p.c chez le canard colvert et de 7,9mg/kg p.c. Il est hautement toxique chez le canard colvert exposé par voie alimentaire avec une CL₅₀ aiguë de 190 mg/kg. Cet insecticide est hautement toxique chez les abeilles avec une DL₅₀ aiguë par contact de 0,16 µg [ARLA., 2009].

Chapitre I: Etude bibliographique

I.9. Toxicocinétique du carbofuran

I.9.1. Absorption

D'après une étude réalisée sur les rats par l'absorption d'une dose orale unique de 4,4 à 21 mg/kg p.c de carbofuran marquée. Le produit est rapidement absorbé par le tube digestif.[ARLA., 2009].

I.9.2. Distribution

Le produit est concentré principalement dans le foie [ARLA., 2009].

I.9.3. Biotransformation

Il est rapidement métabolisé par hydrolyse, oxydation et conjugaison. Les principaux métabolites sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 05. Principaux métabolites du carbofurandans la bile et l'urine [ARLA., 2009].

Métabolites retrouvés dans la bile :	Métabolites retrouvés dans l'urine :
<ul style="list-style-type: none">• Conjugués glucuronides du 3-hydroxycarbofuran (~60 %)• Carbofuranphénol• 3-hydroxycarbofuranphénol• 3-cétocarbofuranphénol	<ul style="list-style-type: none">• 3-hydroxycarbofuran• 3-cétocarbofuran• carbofuranphénol• 3-hydroxycarbofuranphénol• 3-cétocarbofuranphénol (~ 51 %)

I.9.4. L'excrétion

Chez les animaux dont le canal cholédoque est accessible à partir d'une canule : le produit est éliminé dans la bile (28,5 %), l'urine (65,4 %), les fèces (0,4 %) au cours des 48 h après le traitement. Chez les animaux dont le canal cholédoque n'est accessible à partir d'une canule : le composé au noyau marqué au C¹⁴ est éliminé dans l'urine (92 %) et les fèces (3 %) au cours des 120 h après le traitement; le composé au groupement carbonyle marqué au C¹⁴ est éliminé dans l'air expiré (45%), l'urine (38%) et les fèces (<4 %) au cours des 32 h après le traitement [ARLA., 2009].

Chapitre I: Etude bibliographique

I.10. Toxicodynamique du carbofuran

C'est un inhibiteur de l'enzyme Acétylcholinestérase (AChE). Cette enzyme a pour effet de rendre inactive l'ACh (l'acétylcholinestérase dégrade l'acétylcholine en choline et en acide acétique). Avec le carbofuran, l'acétylcholine se fixe continuellement sur son récepteur, ce qui a pour effet d'éliminer les insectes via son action neurotoxique. Ce mode d'action peu spécifique a pour conséquence la possibilité d'effets toxiques chez un grand nombre d'organismes non-cibles, dont des organismes aquatiques puisque ce composé, mobile et relativement soluble dans l'eau, est susceptible de migrer rapidement vers les eaux superficielles après application [GUPTA., 1994].

Chapitre I: Etude bibliographique

Partie 2-Étude Bibliographique Sur l'espèce étudiée

I.1.Présentation et classification de l'espèce bioindicatrice

Helix aspersa ou le petit gris, est un escargot appartient à l'embranchement des Mollusques, animaux à corps mou et dépourvu de squelette, sa masse viscérale présente une torsion de 180° par rapport au pied d'où une asymétrie de certain de ses organes [Bonnet *et al.*, 1990].

I.1.1.Classification

Helix aspersa est un Mollusque gastéropode, pulmoné terrestre, aussi nommé *Cantareus aspersus*, *Cornu aspersum*, *Criptomphalus aspersus* dans la nomenclature [Barker.,2001] ou le petit gris.

Selon Bonnet & Vrillon [1990] sa position systématique est présentée dans le tableau suivant:

Tableau 06: Classification d'*Helix aspersa*. [Bonnet *et al.*, 1990]

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Mollusca</i>
Classe	<i>Gastropoda</i>
Ordre	<i>Stylommatophora</i>
Famille	<i>Helicidae</i>
Genre	<i>Helix</i>
Espèce	<i>Helix aspersa</i>
Sous-espèce	<i>Helix aspersa aspersa</i>

I.1.2. Distribution géographique

L'escargot Petit-Gris est très répandu en Europe, en particulier dans les régions méditerranéennes et océaniques. Il colonise les milieux anthropisés et peut être considéré comme une peste dans les jardins. On le retrouve également dans les dunes, les bois, les rochers, les

Chapitre I: Etude bibliographique

haies mais également dans les zones cultivées [Kerney *et al.*, 2006]. Il se nourrit principalement de plantes, de lichens et de champignons. Son régime alimentaire n'est pas spécialisé et l'escargot s'adapte en fonction des plantes qui colonisent le milieu [Chevalier., 1992].

I.2. Anatomie générale de l'escargot

I.2.1. Anatomie externe de l'escargot

Sa coquille d'extre, est de couleur brun-jaunâtre avec un diamètre variant de 20 à 35 mm et une hauteur de 25 à 40 mm. Deux grandes parties sont distinguées : le pied et les viscères. Les viscères correspondent aux organes situés à l'intérieur de la coquille et comprennent le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge également dans le pied (figure 03). Le pied comporte la sole pédieuse, musculeuse, la partie antérieure du tube digestif et le système nerveux [Kerney*et al.*, 2006].

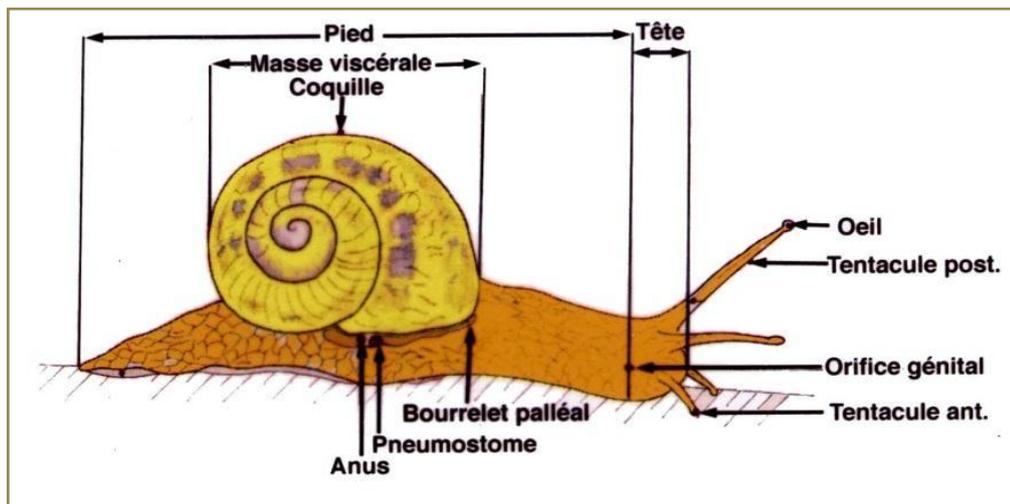


Fig. 03. Morphologie externe de l'escargot [Kerney *et al.*, 2006]

Chapitre I: Etude bibliographique

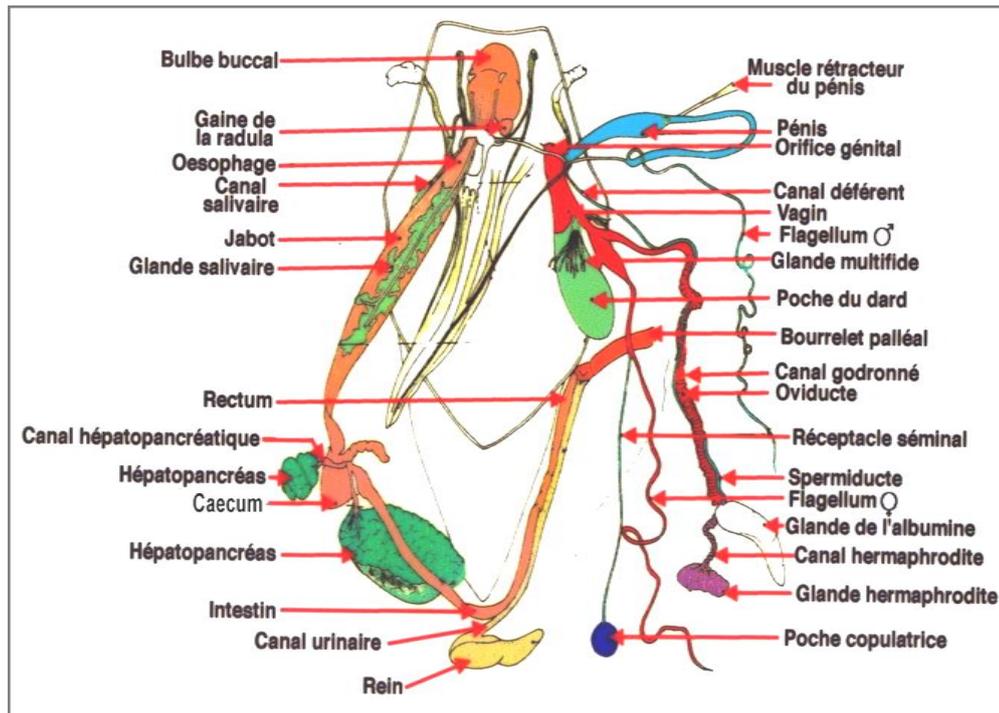


Fig. 04. Anatomie interne de l'escargot *Helix aspersa* [Beaumont., 1998].

I.2.2. Anatomie interne

I.2.3. Rythme d'activité

L'activité des escargots petit-gris est préférentiellement nocturne. Elle se synchronise avec la photopériode naturelle et débute au coucher du soleil avec un maximum six heures après celui-ci [Chevallier., 1992]. Les trois facteurs qui influencent cette activité sont l'hygrométrie du milieu (air et sol), la température et l'intensité lumineuse [Chevallier., 2001].

Les escargots sont actifs si l'humidité relative de l'air est supérieure à 80% et si la température minimale nocturne n'est pas inférieure à 9° C.

I.2.4. Estivation et hibernation

Une absence prolongée d'humidité provoque l'estivation de *Helix aspersa* [Chevallier., 1992]. L'animal se fixe alors sur un support en fermant l'ouverture de sa coquille par un voile de mucus solidifié: l'épiphragme. Il reprend son activité lorsque les conditions environnementales sont plus favorables. Lorsque la température moyenne devient inférieure à 15° C, les escargots se mettent en hibernation en se "collant" sur un support ou en s'enfouissant dans le sol ou la litière et secrètent un épiphragme d'hiver. Dans une atmosphère humide, le processus d'hibernation s'effectue en-dessous de 5° C. Le raccourcissement de la durée de jour semble avoir également une action sur la mise en hibernation [Bailey., 1981].

Chapitre I: Etude bibliographique

I.2.5. Croissance

Quatre phases de croissance ont été définies en fonction de la taille et de la masse des animaux mais aussi de leur différenciation sexuelle [Gomot., 1997a]:

- ✓ Phase infantile durant laquelle le tractus génital est non-différencié chez des animaux de 0,02 à 0,6 g,
- ✓ Phase juvénile relative à un tractus génital qui s'organise et à une gamétogenèse active. La masse est comprise entre 0,6 et 6,0 g.
- ✓ Phase de maturation sexuelle ou phase pré adulte durant laquelle les glandes annexes femelles se développent. Elle concerne des escargots non bordés (absence d'épaississement du péristome) de plus de 6 g.
- ✓ La phase adulte à croissance nulle durant laquelle les animaux sont aptes à se reproduire. Ils sont alors bordés et pèsent entre 6 et 14 g.

En général, la croissance naturelle jusqu'au stade adulte s'étale sur deux ans si bien que les individus sont le plus souvent considérés comme sexuellement matures à partir du deuxième ou troisième été suivant leur naissance [Chevallier., 1992]. Cette croissance se fait par palier au rythme des estivations et hibernations. Les facteurs qui influencent la croissance sont la température, l'humidité ambiante, l'éclairage (longueur d'onde, intensité et photopériode) ainsi que la nature du sol et de la nourriture [Gomot., 1997]. La durée de vie moyenne d'un escargot en milieu naturel est de 6 à 7 ans [Gomot., 1997a].

I.2.6. Reproduction

La période de reproduction commence au début du mois de mai et dure jusqu'à la mi-septembre. L'accouplement implique une fécondation réciproque par échange des permatophores entre les deux partenaires. Cette règle n'est cependant pas absolue et certains individus se comportent soit comme mâle soit comme femelle. L'autofécondation n'a été que très rarement constatée chez les escargots du genre *Helix* et jamais pour *H. aspersa aspersa*. La durée entre l'accouplement et la ponte varie en fonction des conditions du milieu. En conditions optimales, elle est d'une dizaine de jours mais ce délai peut atteindre un voire deux mois suivant les conditions d'environnement. [Daguzan., 1981; Chevallier., 2001].

Chapitre I: Etude bibliographique

Pour pondre, l'escargot creuse une cavité de quelques centimètres de profondeur dans le sol, y dépose ses oeufs puis rebouche le "nid de ponte". Le nombre moyen des œufs par ponte varie de 80 à 130 pour des individus de différentes origines [**Madec., 1983**].

Chapitre I: Etude bibliographique

Partie 3. Systèmes de biotransformation des xénobiotiques Application en tant que Biomarqueur

I.1. Les biomarqueurs

Le National Academy Council [1987] est l'une des premières instances à avoir défini en 1987 la notion de biomarqueur. Depuis, cette définition a été affinée et est précisée par [Lagadic *et al.*, 1991] dans les termes suivants: "un biomarqueur est un changement observable et /ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant".

Le principal intérêt des biomarqueurs est qu'ils permettent une évaluation intégrée dans le temps des polluants biodisponibles, tant en terme de présence qu'en terme des effets qu'ils sont susceptibles d'exercer sur les êtres vivants. Selon les organismes explorés, les biomarqueurs peuvent aussi rendre compte de la distribution des contaminants dans le milieu [Amiard *et al.*, 1997].

I.1.1. types de biomarqueurs

Trois types de biomarqueurs sont habituellement distingués :

✚ **Les biomarqueurs d'exposition:** indiquent qu'un organisme a été exposé à un xénobiotique et sont capables d'évaluer l'intensité de cette exposition. La mise en évidence d'un métabolite particulier du polluant ou, d'un adduit résultant de son interaction avec une molécule cible, permet de rendre compte d'une exposition actuelle ou passée.

✚ **Les biomarqueurs d'effet:** mettent en évidence des modifications biochimiques survenues dans un organisme à la suite d'un contact avec un xénobiotique. Ainsi, l'induction de diverses protéines, comme les protéines de choc thermique ou les enzymes de biotransformation des xénobiotiques, reflète la réaction d'un organisme qui a été exposé à un composé souvent indésirable. Ce marqueur doit être précoce et doit pouvoir être détecté avant que l'exposition n'entraîne des effets irréversibles.

✚ **Les biomarqueurs de susceptibilité:** révèlent la sensibilité d'un organisme aux effets indésirables d'une exposition à un composé particulier. La mise en évidence d'un polymorphisme génétique peut expliquer des variations de susceptibilités à des toxiques. [Peakall, 1994 et Timbrell *et al.* 1994]. Lors d'exposition aux IIAP, le polymorphisme des

Chapitre I: Etude bibliographique

gènes des glutathion-, S-transférases influence le niveau d'adduits à l'ADN dans les tissus humains et est donc associé à la susceptibilité individuelle au [cancérogène @utkiewicz *et al.*, 2000].

I.2. Systèmes de biotransformation des xénobiotiques chez les animaux, cas particulier des mollusques

Les mollusques, grâce à leur capacité d'accumulation, ont été les premiers organismes sentinelles utilisés dans les programmes de surveillance de la contamination chimique des écosystèmes. Les systèmes enzymatiques de biotransformation des xénobiotiques ont des biomarqueurs de choix car ils sont induits par de nombreuses classes de composés. Ils ont été largement explorés chez les mammifères au cours des trente dernières années, en particulier dans les études de prédiction de métabolisme des médicaments [Siest *et al.*, 1988]. Leur fonctionnement chez les mammifères est donc abondamment décrit dans la littérature et nous en rappellerons les grandes lignes. Par contre, ces systèmes ont encore très peu explorés chez les mollusques et nous tenterons ici de faire le point sur l'état actuel des connaissances sur le métabolisme des xénobiotiques dans cet embranchement.

I.2.1. Vue d'ensemble du métabolisme des xénobiotiques

Etant souvent de nature lipophile, les xénobiotiques pénètrent sans aucune difficulté à l'intérieur de la cellule où ils peuvent s'accumuler et générer des processus cytotoxiques.

Toutefois, les cellules ont développé des mécanismes de biotransformations visant à inactiver (inactiver) les xénobiotiques en métabolites plus hydrosolubles donc plus facilement excrétables. Ces biotransformations s'effectuent en général en trois phases schématisées par la figure 05.

Chapitre I: Etude bibliographique

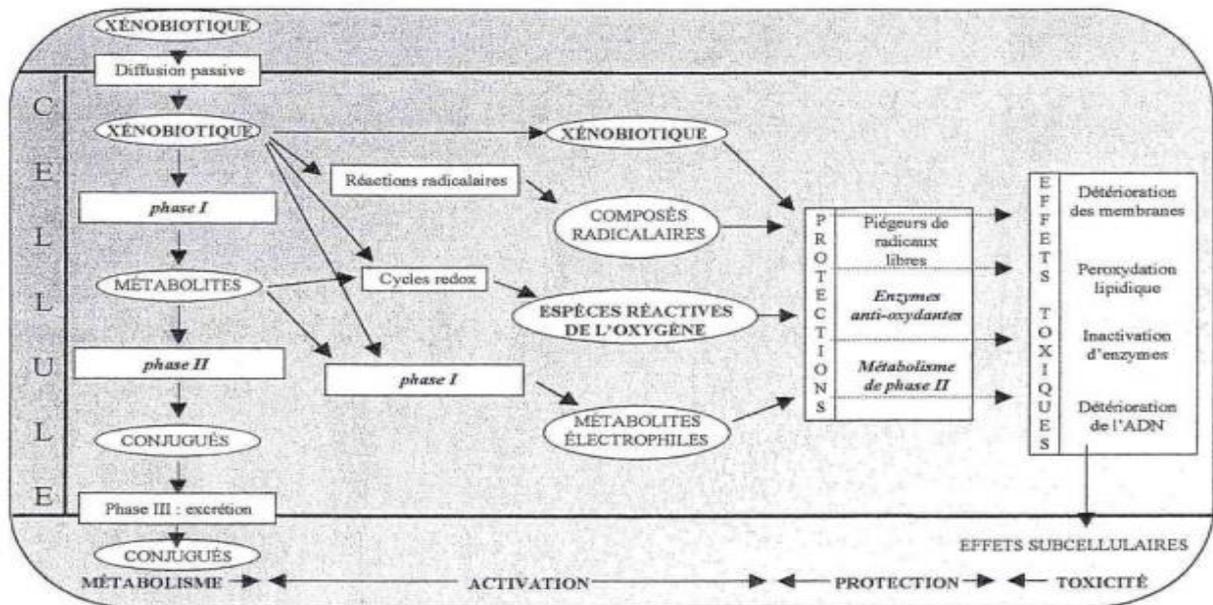


Fig.05 : Voies majeures de détoxification et de bioactivation des xénobiotiques organiques chez les animaux [Narbonne et Michel., 1997].

- ✓ **Phase I ou phase de fonctionnalisation**: elle consiste en une oxydation des xénobiotiques ce qui en augmente la polarité. Malheureusement, cette étape peut parfois générer des métabolites plus réactifs que le composé de départ. (Fig. 05)[Angerer *et al.*, 1997]. Cette phase fait intervenir les monooxygénases couplées au cytochrome P450 (CYP, EC 1,14.14.1).
- ✓ **Phase II ou phase de conjugaison**: elle a pour rôle essentiel de convertir les xénobiotiques ou, les métabolites générés lors de la phase de fonctionnalisation, en composé plus hydrosolubles en les conjuguant à des molécules endogènes telles que l'acide glucuronique, l'esulfate, l'acétale, le glutathion ou certains acides aminés. Cette phase comprend également des réactions de méthylation et d'hydrolyse des époxydes. il résulte de ces réactions une augmentation de la solubilité des xénobiotiques dont la nature est essentiellement hydrophobe. Parmi les enzymes impliquées dans la phase II, citons les LIDP-glucuronosyl-transférases (UGT, EC 2.4.L17), les sulfotransférases (ST, EC 2.8.2.1), les époxydes hydrolases (EH, EC 4.2.1.64) et les glutathion, S-transférases (GST, EC 2.5.1.18).
- ✓ **Phase III** : elle consiste en l'excrétion des xénobiotiques modifiés hors de la cellule par l'intermédiaire de pompes membranaires de nature glycoprotéique, fonctionnant selon un mécanisme ATP-dépendant.

Chapitre I: Etude bibliographique

I.3. Les enzymes du système du glutathion

I.3.1. Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (Fig. 06). Cette molécule est présente dans tous les organismes vivants et représente la très grande majorité des thiols SH intracellulaires. La forme réduite du glutathion (GSH) prédomine largement par rapport à la forme oxydée (GSSG) dans laquelle deux molécules de glutathion sont liées par un pont disulfure. Les proportions physiologiques sont d'environ 95 % pour le GSH et 5 % pour le GSSG, Cet équilibre, assuré en permanence par la glutathion réductase (GR), traduit l'importance fonctionnelle du groupement sulfhydryle du GSH [Meister., 1983].

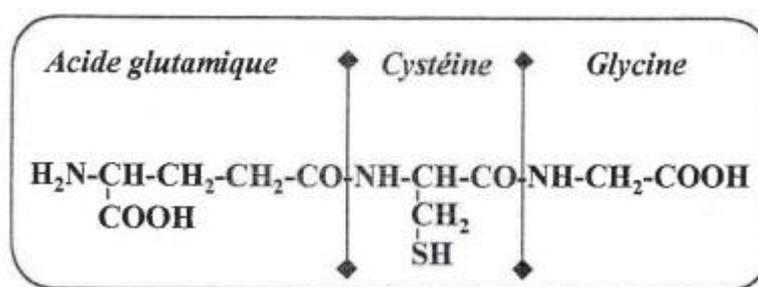


Fig.06: Structure du glutathion réduit [Meister., 1983].

I.3.1.1. Implication dans la détoxication

Les fonctions principales du GSH intracellulaire résident d'une part, dans la protection cellulaire contre les agents oxydants et d'autre part, dans son implication dans les voies de détoxication des xénobiotiques. La première fonction est assurée par la glutathion peroxydase (GPX, réaction 7) et la glutathion réductase (GR) qui maintient l'équilibre entre le GSH et le GSSG en faveur du premier (réaction 8). L'activité de la GR dépend de la production de NADPH par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (réaction 9). La seconde fonction consiste en l'addition nucléophile de GS⁻ sur le xénobiotique par l'action de la glutathion-S-transférase (GST, réaction 10). Le conjugué ainsi formé est exporté hors de la cellule par une pompe transmembranaire ATP-dépendante, pompe à GS-X, identifiée, entre autres, dans le foie et le rein [Ishikawa., 1992]. Le GS-conjugué ainsi exporté est clivé par la γ -glutamyl transférase et par une dipeptidase extra cellulaire (réactions 11 et 12).

Dans la glande digestive de l'escargot *L. stagnalis* (0,14 $\mu\text{Mol/g}$) [Wilbrink *et al.*, 1991b], la concentration en GSH est extrêmement faible en comparaison avec celles que l'on

Chapitre I: Etude bibliographique

observe chez les mammifères (4 $\mu\text{mol/g}$ dans le foie de rat, [Lagadic *et al.*, 1991, 9,5 $\mu\text{mol/g}$ dans le foie de souris, Griffith et Meister., 1978].

I.3.2. Les glutathion-S-transférases GST

Les GST (EC 2.5.1.18) font partie des enzymes dites de conjugaison de phase II du métabolisme des xénobiotiques. Ces enzymes peuvent intervenir après la phase de fonctionnalisation ou directement sur le xénobiotique. Leur rôle principal est de conjuguer le GSH à des composés contenant un centre électrophile. Cette conjugaison permet d'inactiver le xénobiotique mais également d'augmenter sa solubilité, facilitant son expulsion hors de la cellule par les pompes membranaires à GS-X. Certaines GST douées d'activité peroxydases peuvent également avoir leur rôle dans la lutte contre les ERO [Lence et Burk., 1976].

I.3.3. Les glutathion peroxydase GPX

Chez les mammifères, la famille des GPX (EC 1.11.1.9) regroupe quatre isoenzymes différentes: la GPX classique (GPXI), la GPX du tractus-intestinal (GPX2), la GPX plasmatique (GPX3) et la PHGPX (GPX4). Les trois premières GPX sont solubles et multi métriques, alors que la GPX4 est une forme microsomale de structure monomérique. Elles sont hautement spécifiques du GSH, mais peuvent réduire aussi bien les peroxydes inorganiques (peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) qu'organiques (CuOOH tert-butyl-hydroperoxyde, TBuOOH). La PHGPX est localisée dans les membranes des mitochondries, du noyau et du réticulum endoplasmique. Elle réduit spécifiquement les substrats phospholipidiques [Maiorino *et al.*, 1991].

Les GPX sont directement impliquées dans la lutte contre les ERO, puisqu'elles constituent la voie majeure de dégradation des peroxydes. Elles réduisent ces molécules, générant en parallèle du $\text{GSSG} + \text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$. Les GPX assurent une fonction anti-oxydante complémentaire aux autres antioxydants non-enzymatiques (otocop3hérol, acide ascorbique) et enzymatiques (SOD, CAT).

CHAPITRE II

Chapitre II: Matériel et méthode

II.1. Matériel et méthodes

Tous les bioessais de cette étude ont été réalisés au Laboratoire de Toxicologie, du département de Biologie, Université l'Arbie Tebessi- Tebessa.

II.1.1. Matériel

II.1.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1.1. Présentation et description de l'espèce bioindicatrice

Pour déterminer les effets des insecticides étudiés, il est nécessaire de disposer de modèle biologique représentatif du milieu étudié. Au sens écologique général, un bioindicateur peut être défini comme un organisme ou un groupe d'organismes pertinents pour déterminer qualitativement et quantitativement l'état de l'environnement [Fränze., 2006]. Les critères qualifiant une espèce bioindicateur sont parmi les suivants :

- ❖ Elle doit être suffisamment répandue et abondante sur le territoire concerné, si possible facilement détectable.
- ❖ Elle doit être le plus sédentaire possible pour refléter les conditions locales.
- ❖ Elle doit avoir une taille rendant possible l'étude de ses différents tissus et de leurs composantes (muscles, os, organes dans le cas d'un animal...).

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est un gastéropode pulmoné - l'escargot petit gris : *Helix aspersa*.

L'escargot *Helix aspersa* (Fig.07) communément appelé Petit-Gris, est un mollusque gastéropode pulmoné appartenant à l'ordre des *stylommatophores*, famille des *helicidae*, sous-famille des *helicinae* [Beaumont et Cassier., 1998]. Sa coquille, dextre, est de couleur brun-jaunâtre avec un diamètre variant de 20 à 35mm et une hauteur de 25 à 40mm. Deux grandes parties sont distinguées: le pied et les viscères. Les viscères correspondent aux organes situés à l'intérieur de la coquille et comprennent le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge également dans le pied. Le pied comporte essentiellement la sole pédieuse, musculeuse, la partie antérieure du tube digestif et le système nerveux.

Chapitre II: Matériel et méthode



Fig.07. Escargot *Helix aspersa* [Beaumont et Cassier., 1998]

II.1.1.1.1. A. Systématique:

Pour la classification, les escargots appartiennent à la classe des gastéropodes. Les escargots proprement dits (pulmonés terrestres à coquille spiralée) forment le groupe des *Stylommatophora*. Selon Bonnet et Vrillon [Bonnet *et al.*, 1990] sa position systématique est la suivante :

Tableau 07. Classification de *Helix aspersa*[Bonnet *et al.*,1990]

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Mollusca</i>
Classe	<i>Gastropoda</i>
Ordre	<i>Stylommatophora</i>
Famille	<i>Helicidae</i>
Genre	<i>Helix</i>
Espèce	<i>Helix aspersa</i>
Sous-espèce	<i>Helix aspersa aspersa</i>

II.1.1.1.1.B. Distribution géographique:

L'escargot Petit-Gris est très répandu en Europe, en particulier dans les régions méditerranéennes et océaniques. Il colonise les milieux anthropisés et peut être considéré comme une peste dans les jardins. On le retrouve également dans les dunes, les bois, les rochers, les haies mais également dans les zones cultivées [Kerney *et al.*, 2006]. Il se nourrit principalement de plantes, de lichens et de champignons. Son régime alimentaire n'est pas spécialisé et l'escargot s'adapte en fonction des plantes qui colonisent le milieu [Chevalier *et al.*, 2001].

Chapitre II: Matériel et méthode

Le sol fait également partie de son alimentation et peut influencer sa croissance [Gomot *et al.*, 1989]. Des sols pauvres en calcium peuvent constituer un facteur limitant à la croissance des escargots, le calcium étant un élément indispensable à la formation de la coquille [Dallinger *et al.*, 2001]. L'escargot compte de nombreux prédateurs, aussi bien des vertébrés, comme les oiseaux (grive), les petits mammifères (musaraigne, hérisson), les reptiles (lézard, couleuvre), que des invertébrés, comme les carabes, les vers luisants et les limaces [Barker., 2004]. L'homme le consomme également pour sa chair très appréciée.

Le Petit-Gris est surtout actif la nuit et en période humide. Le jour ou lorsqu'il fait trop sec, il entre en estivation en se fixant contre une paroi et en obturant sa coquille d'un voile blanchâtre, l'épiphragme. A partir du mois d'octobre en Europe, l'escargot hiberne en s'enfouissant dans le sol. Sa coquille est alors obturée par un épiphragme épais. Il reprend généralement son activité au printemps quand les températures avoisinent les 12-14°C [Marasco *et Murciano.*, 2003; Kerney *et al.*, 2006].

La croissance de l'escargot correspond à une prise de poids pouvant atteindre jusqu'à 14 g 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].

II.1.1.2. Choix d'insecticide

Le carbofuran (C₁₂H₁₅NO₃) est un insecticide du groupe des carbamates utilisé dans la lutte contre une grande variété d'organismes défoliateurs et fousseurs qui s'attaquent à de nombreuses cultures de fruits et de légumes. Le carbofurane est dégradé dans le sol par hydrolyse, par action microbienne et, dans une moindre mesure, par photodécomposition. Sa persistance dépend du pH, du type de sol, de la température, de la teneur en eau et de la population microbienne [CNRC., 1997]. Dans le sol, il est dégradé en différents composés comprenant le

Chapitre II: Matériel et méthode

carbofuranphénol, le 3-hydroxycarbofurane et le 3-cétocarbofurane. Des études sur le terrain ont indiqué une demi-vie de 26 à 110 jours dans le sol [NLM., 1988].

II.1.2.Méthodes

II.1.2.1. Méthode d'élevage

Les escargots utilisés sont les adultes de *Helix aspersa* collectés d'un site non traité par les pesticides, situé dans la région de Guelma (Nord-Est algérien). Les escargots sont ensuite transférés au laboratoire, où ils seront adaptés aux conditions contrôlées pendant 1 mois. Les 84 individus choisis ont une masse moyenne de 15.33 ± 0.2 g.

II.1.2.1.1. Conditions d'élevages

L'élevage des escargots est réalisé dans des conditions d'environnement optimales suivantes: photopériode 18 h de lumière par 24 h, 20°C. Ils sont répartis dans des cristallisoirs transparents, avec couvercle perforé (tulle), et chaque cristallisoir contient une éponge humide pour maintenir l'humidité, les escargots sont nourris exclusivement de feuilles de laitue fraîche. Les cristallisoirs sont nettoyés régulièrement tous les trois jours [Daumer *et al.*, 2007].



Fig.08. Elevage d'*Helix aspersa* dans le laboratoire.

II.1.2.2. Méthode de traitement

Les escargots *Helix aspersa* sont répartis en 4 lots : un lot témoin où les escargots sont nourris de laitue fraîche et trois lots traités par trois doses qui correspondent respectivement à 0.26mg/g, 0.5mg/g, et 1mg/g (les escargots sont nourris de laitue imbibées de la solution du carbofuran). Nous avons retenu trois temps de traitement : 3, 7, et 15 jours. Dans tous les cas, la nourriture apportée est renouvelée, qu'elle soit contaminée ou non, tous les 03 jours au moment du nettoyage des cristallisoirs d'élevage. Ce nettoyage est fait, autant que possible à heure fixe. Il comprend un lavage des parois des cristallisoirs à l'eau distillée, un changement de l'éponge absorbante au fond de cristallisoir ou un ramassage des fèces des escargots déposés sur substrat. Ensuite, l'ensemble des récipients d'essai est humidifié à l'eau distillée [Cosson *et al.*, 1998].

Chapitre II: Matériel et méthode



Fig09:Traiter d'*Helix aspersa* dans le laboratoire

Chapitre II: Matériel et méthode

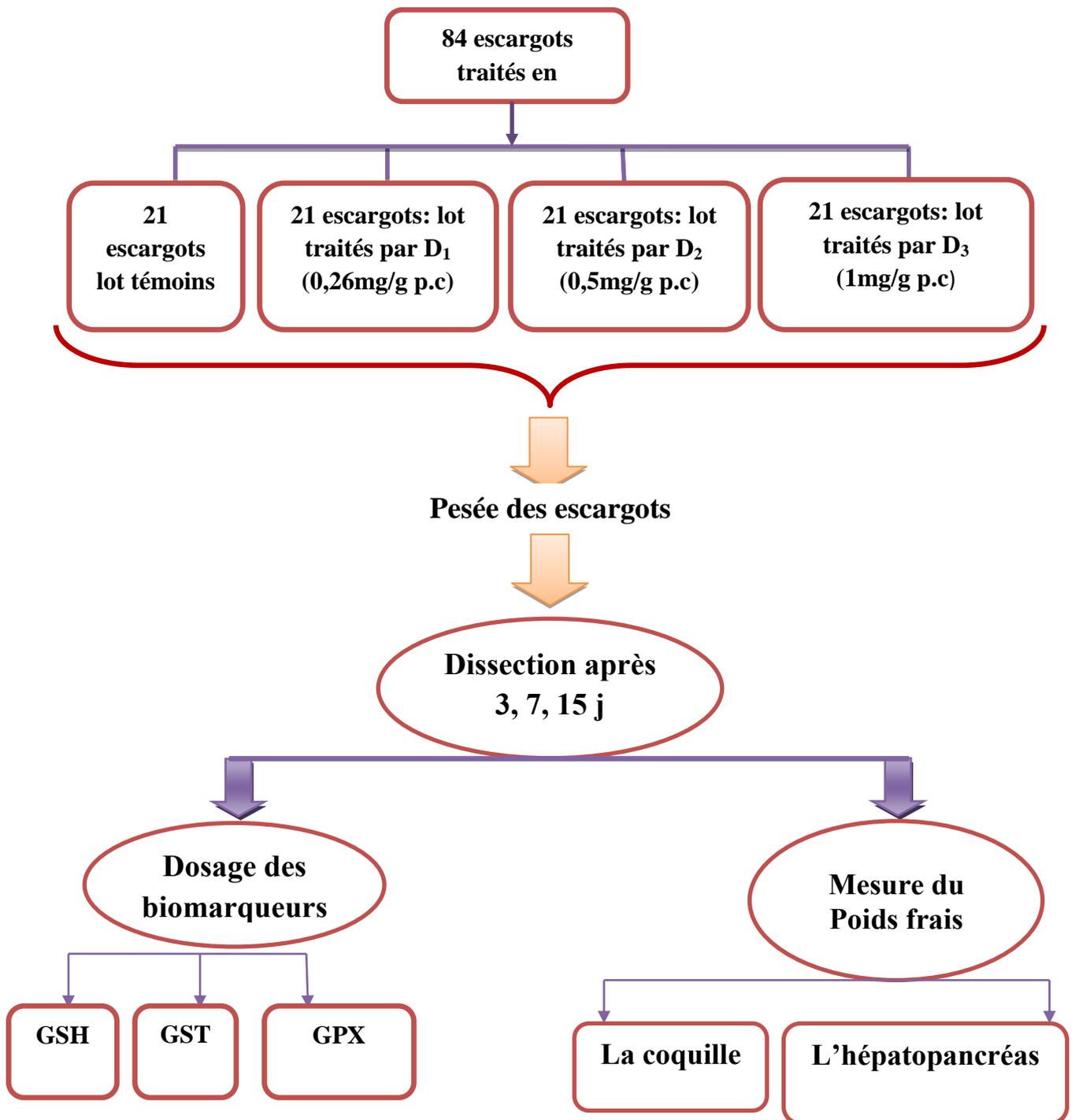


Fig10. Schéma représentatif du protocole expérimental

Chapitre II: Matériel et méthode

II.1.2.3. Méthode de dissection et sacrifice

Dans une cuvette à dissection, placer un escargot et découper la coquille avec lesciseaux en suivant le bord d'enroulement de la coquille.

Après chaque période de traitement, les escargots sont mis à jeun pendant 48 h afin que le contenu de leur tube digestif soit vide. Ceci évite d'éventuelles interférences entre les contaminants présents dans l'aliment ingéré et les quantités de contaminants réellement accumulées dans les tissus. Les boîtes où ils jeûnent sont lavées à l'eau artificielle pour éviter la réingestion des fèces. Après chaque période de traitement les animaux sont sacrifiés par congélation à -80°C puis disséqués [Coourdassieret *al.*,2001].

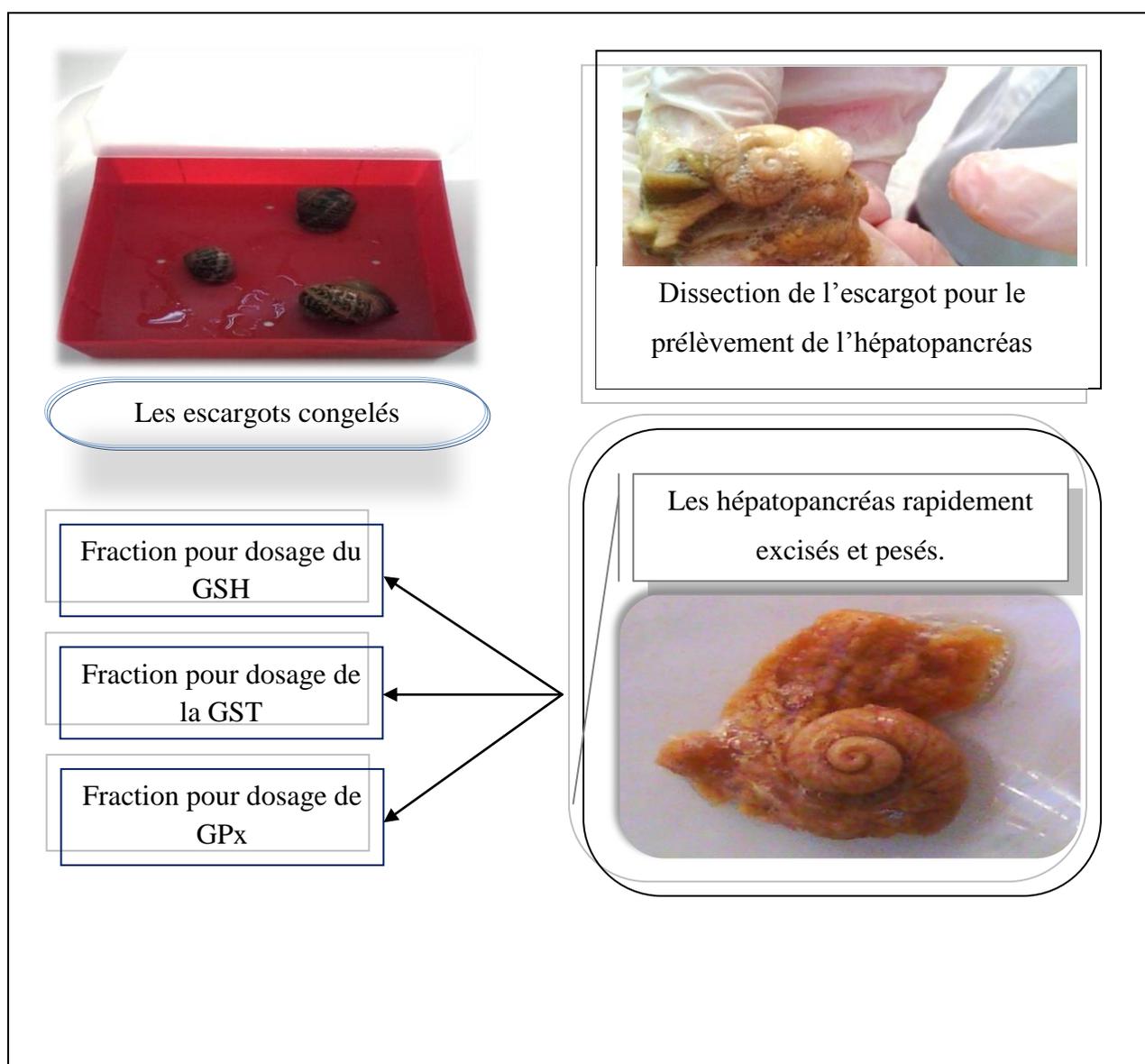


Fig.11.Sacrifice des animaux et les prélèvements des hépatopancréas

Chapitre II: Matériel et méthode

II.1.2.4.Méthode de mesure des effets comportementaux

Au cours de l'exposition au traitement, nous avons également cherché à caractériser les effets du carbofuran sur les comportements plus ou moins perturbés de *Helixaspersa*. Lorsqu'il est inactif, nous avons observé que *Helixaspersa* tendance à se réfugier sur des supports situés à quelques cm du fond de la boîte (position haute). Ceci a déjà été rapporté par d'autres auteurs [Chevallier., 1992]. A partir de ces observations, certains comportements peuvent être observés, comme se nourrir normalement ou fuir la nourriture, ou en fonction de l'activité des animaux et de leur position spatiale dans l'enceinte d'essai : par exemple, actif ou inactif en position haute ou sur les supports, ou encore, actif ou inactif sur la nourriture.

Ces comportements sont observés, les jours de changement de nourriture. Si la position dans les enceintes peut être facilement relevée, l'activité des animaux est notée de la façon suivante : la boîte est ouverte et le couvercle retourné est posé sur la paille. Après une minute, les escargots en mouvement sont considérés comme actifs, ceux qui restent immobiles sont inactifs. Cette méthode est retenue plutôt qu'une observation directe sans ouverture de la boîte car les escargots ont une activité plutôt nocturne si bien qu'au moment des observations, la quasi-totalité des escargots sont inactifs. L'activité ainsi observée représente donc plutôt un état de réceptivité et une capacité à réagir à une stimulation mécanique (déplacement et ouverture de la boîte). Les résultats sont exprimés sous forme d'observations hebdomadaires de chaque comportement vis-à-vis des concentrations d'un insecticide par rapport au témoin.

II.1.2.5. les Biomarqueurs physiologiques

Plusieurs paramètres biométriques sont considérés, à savoir:

- la **mortalité**: le contrôle de la vitalité des individus de *Helixaspersa* au cours des essais est effectué au moment des renouvellements de nourriture, de chaque semaine de test. Dans tous les cas, les individus morts sont évacués des enceintes d'essai. La mort d'un individu est généralement facile à déterminer : le pied flasque et jaunâtre est le plus souvent sorti de la coquille. La sole pédieuse n'adhère à aucune surface. Le corps luisant et très visqueux indique que la liquéfaction des tissus est en cours. L'odeur nauséabonde que dégage l'escargot est également un indicateur. En cas de doute, le pied est stimulé à l'aide d'une aiguille ou d'une paire de pinces brucelles. L'absence de réaction permet de conclure à la mort de l'individu.

- **Le poids frais de l'hépatopancréas** est mesuré à l'aide d'une balance de précision modèle OHAUS®ANALYTICAL plus[Gomot., 1997a].

Chapitre II: Matériel et méthode

II.1.2.6.Méthode desdosages des indicateurs du stress oxydant

L'hépatopancréas des adultes de l'escargot *Hélix aspersades* séries témoins et traitées par le carbofuran durant les périodes de traitement (3, 7, 15 jours) a servie au dosage du glutathion (GSH), de la glutathion-S-transférase (GST) et duGPx.

II.1.2.6.1.Dosage du glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de Weckberker et Cori [1988], le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5 mercapturique .ce dernier résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) (réactif d'Elleman) par les groupements thiols (-SH) du glutathion mesuré. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 mn de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc où les 500 µl du surnageant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée.

Chapitre II: Matériel et méthode

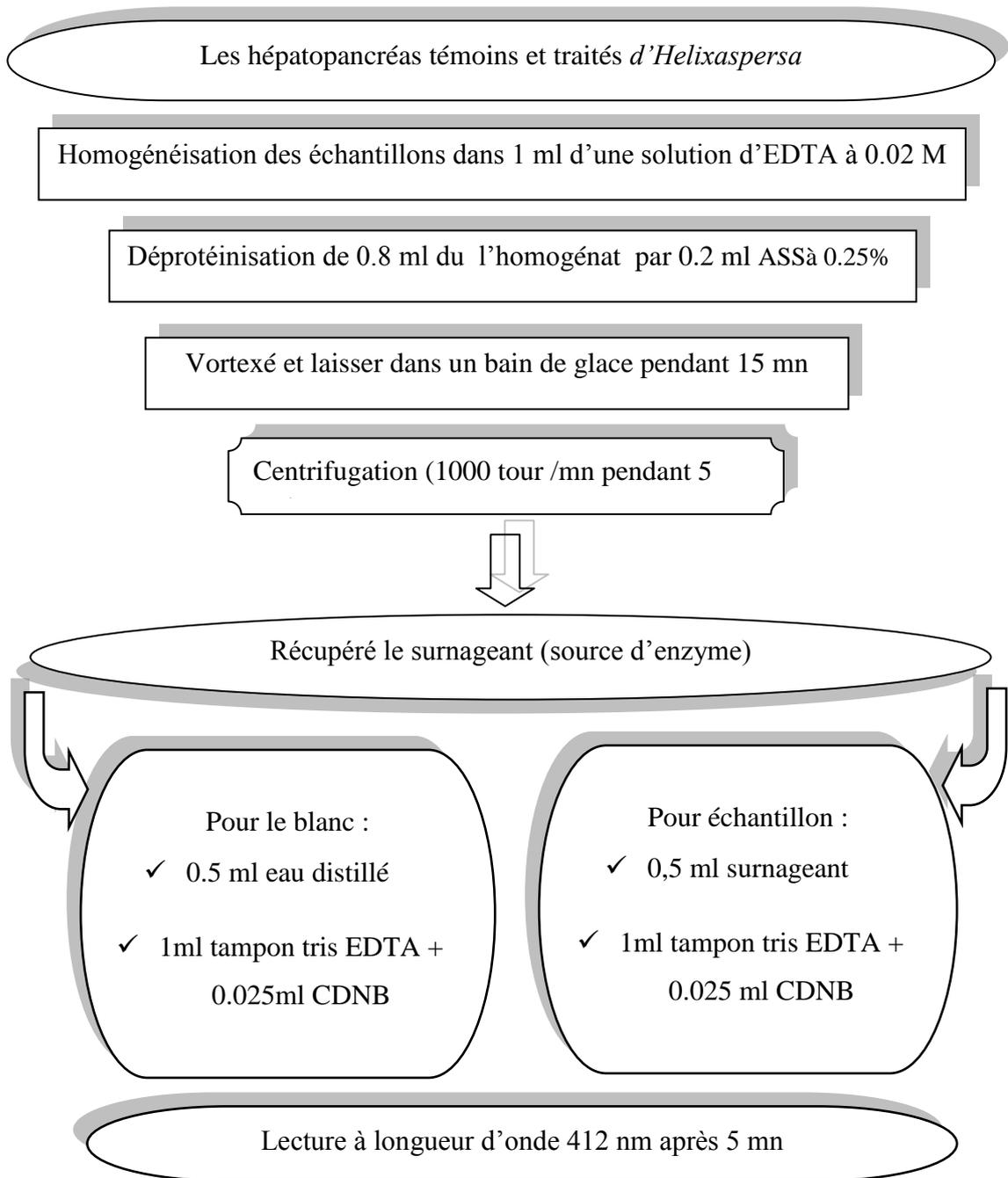


Fig.12. Schéma représentatif du protocole du dosage de GSH Weckberker et Cori [1988].

Chapitre II: Matériel et méthode

Calcul:

$$[GSH] = \frac{\Delta DO}{13100} \times \frac{Vd}{Vh} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéine}$$

$$[GSH] = \frac{DO \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \text{mg de protéine}}$$

[GSH] : micromoles de substrat hydrolysé par mg de protéines.

ΔDO : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

13100 : coefficient d'extinction molaire du groupement thiol (-SH).

Vd : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation: 1ml (0,2 ml d'ASS + 0,8 ml d'homogénat).

Vh : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation: 0,8 ml.

Vt : volume total dans la cuve: 1,525 ml.

Vs : volume du surnageant dans la cuve: 0,5 ml.

mg de protéine: quantité de protéines exprimée en mg.

II.1.2.6.2. Dosage de l'activité glutathion-S-transférase (GST)

Les glutathion -S- transférase appartiennent à une famille d'enzyme multifonctionnelle essentiellement cytotoxique, impliqués dans le transport et la biosynthèse intracellulaire, elles catalysent des réactions de conjugaison entre un peptide endogène, le glutathion, et des molécules réactives comportant des sites électrophiles. La technique que nous avons utilisée et celle d'**Habiget al.,[1974]** elle mesure la cinétique de formation entre un substrat modèle, le chlorodinitrobenzene (CDNB) et le glutathion, qui absorbe la lumière à 340 nm.

Chapitre II: Matériel et méthode

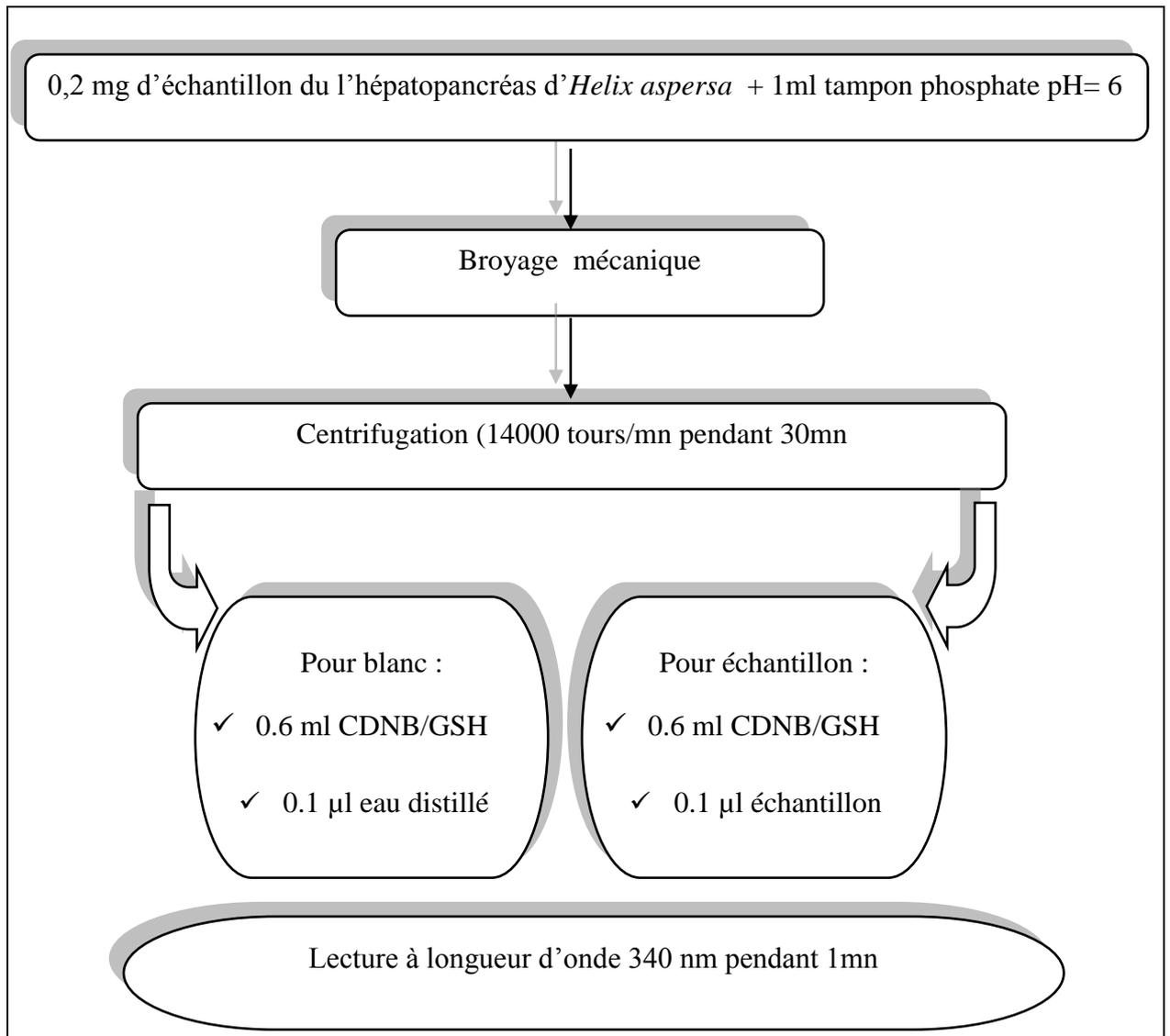


Fig.13. Protocole de dosage de la GST d'*Habig et al* [1974]

Chapitre II: Matériel et méthode

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

$$[GST] = \frac{\delta DO/min}{9,6} \times \frac{Vt}{Vh \times mg \text{ de protéine}}$$

[GST] : micromoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines.

ΔDO : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat.

9.6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Vh : volume de l'homogénat (200 μl).

Vt : volume totale de la cuve (1 400 μl).

mg de protéine : quantité de protéines exprimée en mg.

II.1.2.6.3. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de Floche et Gunzler[1984], en utilisant l' H_2O_2 comme substrat.

- L'extraction de l'enzyme : homogénéisation par le tampon phosphate) pH7.8.
- Centrifugation 10 mn a 3000 t/min.
- Récupération de surnageant (extrait enzymatique).
- 0.2 ml de surnageant +0.4ml de GSH (glutathion forme réduite a 0.1 MM (réduction enzymatique) +0.2 ml de TP a 0.067 M (tampon d'extraction pH 7.8).
- Préparer un blanc avec 0.4 ml de GSH + 0.2 ml de TP (réaction non enzymatique), Incubation au bain marie a 25°C pendant 05 min.
- 0.2 ml d' H_2O_2 (1.3 MM) pour initier la réaction.
- Laisser agir 10 mn.
- Arrêter la réaction par addition de 1 ml de TCA 1% (acide Tri Chloro -acétique).
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 mn.
- Centrifuger durant 10 min a 3000t/min.
- 0.48 ml de surnageant est place dans une cuve +2.2ml de Na_2HPO_4 (0.32) +0.32ml de DTNB (1MM).
- Formation d'un composé colore, mesurer la densité optique à 412 nm dans les 05 min.

Chapitre II: Matériel et méthode

La détermination de l'activité de la GPx:

$$X = \frac{(D0e - D0b) \times 0.04}{D0b} = \text{quantité de GSH réduite disparue (oxydée) dans}$$

0.2 extrait dans 1 ml.

L'activité de la GPx = la quantité de GSH réduit disparue $X \times \frac{5}{[\text{protéines}]}$

II.1.2.6.4. Dosage des protéines

La teneur en protéines a été quantifiée selon la méthode de Bradford [1976] qui utilise le bleu brillant de Coomassie (BBC) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf comme standard. Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm.

II.1.2.7. Analyse statistique

Dans notre étude, pour mieux visualiser les résultats obtenus, la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant Microsoft Excel 2007. Du logiciel Minitab pour l'analyse statistique et du traitement des données version 13.31.

Chaque paramètre mesuré a fait l'objet d'une analyse de variance avec $\alpha \leq 0.05$ (TEST STUDENT). Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart-type ($m \pm s$). Une analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) a été effectuée en utilisant le test ANOVA.

CHAPITRE III

Chapitre IV: Résultats

III. Résultats

III.1. Les effets comportementaux

III.1.1. Estimation du taux d'alimentation

Le taux de laitue consommée par les escargots n'a pas été mesuré car nous avons constaté que les feuilles de laitue trempées dans l'insecticide perdaient rapidement leur fraîcheur par rapport à celle des escargots témoins (trempées dans l'eau distillée), ainsi il était impossible de quantifier le taux de feuilles consommées avec précision, et il était donc impossible d'estimer le taux d'alimentation.

III.1.2. Effets sur le comportement

Les escargots exposés au carbofuran ont montré une série des symptômes. Le premier symptôme est la perte de la chimioréception, de sorte que les escargots ne sont plus attirés par la nourriture de façon dose-dépendante comparé aux escargots témoins.

La plupart des animaux ont montré une activité similaire à celle des escargots témoins pendant la période expérimentale. Cependant, à la concentration D3 (1mg/g), les individus ont tendance à être moins actifs, dès la deuxième semaine de traitement et sont préférentiellement en position haute sur le couvercle comparés aux escargots témoins. Tous les escargots fuient la nourriture, se positionnent au sommet des boîtes, et n'ont pratiquement pas d'activité locomotrice, dès la deuxième semaine de traitement. La consommation de la laitue contaminée diminuait d'une façon dose-dépendante.

III.2. Effets sur les paramètres morphométriques

III.2.1. La mortalité

Durant l'expérience, la mortalité était presque égale à zéro faible, avec seulement 03 individus sur 84 escargots, ce qui représente 0.0357 %. La mortalité (tableau. 07) est survenue comme suit : seul individu dans le groupe traité par la dose 3 (1mg/g) après les trois jours de traitement, 02 individus dans le groupe Témoin 15 j.

Chapitre IV: Résultats

Tableau 08: Mortalité des escargots adultes durant les six semaines de traitement par les deux insecticides et leurs mixtures.

Groupe \ Temps	03 J	1ère semaine	2ère semaine
Témoin	00	00	02
Dose1	00	00	00
Dose2	00	00	00
Dose3	01	00	00

III.2.2. Effets du carbofuran sur le poids de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*

La figure 14 montre une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du poids des hépatopancréas après 7 jours de traitement pour la dose 0.26 mg/g, une augmentation très hautement significative pour la dose 0.5 mg/g et une augmentation hautement significative pour la dose 1mg/g par rapport au témoin. Après 15 jours de traitement cette augmentation est significative ($P \leq 0,05$) pour la dose 0.26mg/g, hautement significative ($p \leq 0,01$) pour la dose 0.5mg/g et très hautement significative à la dose 1mg/g par rapport aux témoins.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet dose très hautement significative ($p \leq 0,01$) et un effet temps très hautement significatif ($p \leq 0,001$) par rapport à celui des escargots témoins.

Chapitre IV: Résultats

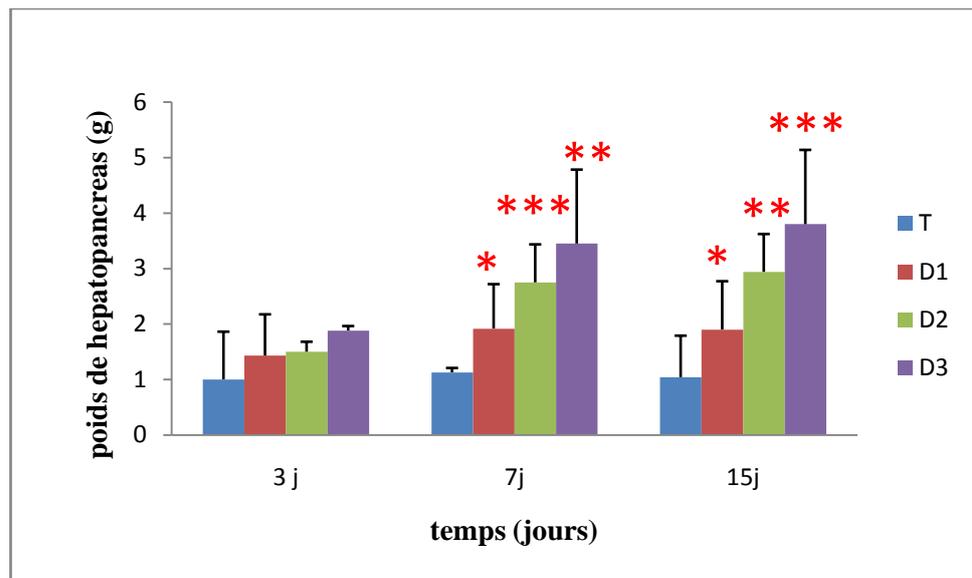


Fig.14. Effets du carbofuran sur le poids de l'hépatopancréas (g) chez *Helix aspersa* ($m \pm s$, $n = 7$) (* Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$), *** : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$) P : Seuil de signification).

III.3. Effets sur les biomarqueurs du stress oxydant

III.3.1. Effet du carbofuran sur le teneur du glutathion (GSH)

Les effets du carbofuran sur le taux de GSH chez *Helix aspersa* durant le traitement (3j, 7j et 15j) sont présentés par la figure 15. La comparaison des moyennes des taux du glutathion entre le lot témoin et les lots traités révèle l'existence d'une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) et une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) après 3 jours de traitement respectivement à la dose de 0,5 mg/g et 1 mg/g. Après 7 j de traitement, nous remarquons une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) pour les deux doses : 0,5 mg/g et de 1 mg/g. Après 15 j de traitement la diminution du taux de GSH devient hautement significative aux deux doses ($P \leq 0,01$) 0,26 et 0,5 mg/g et très hautement significative ($P \leq 0,001$) à la dose 1 mg/g par rapport aux témoins.

Les résultats de l'analyse de la variance à deux critères (ANOVA) révèlent un effet dose ($P \leq 0,001$) et un effet temps ($P \leq 0,05$). *** : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$) P : Seuil de signification).

Chapitre IV: Résultats

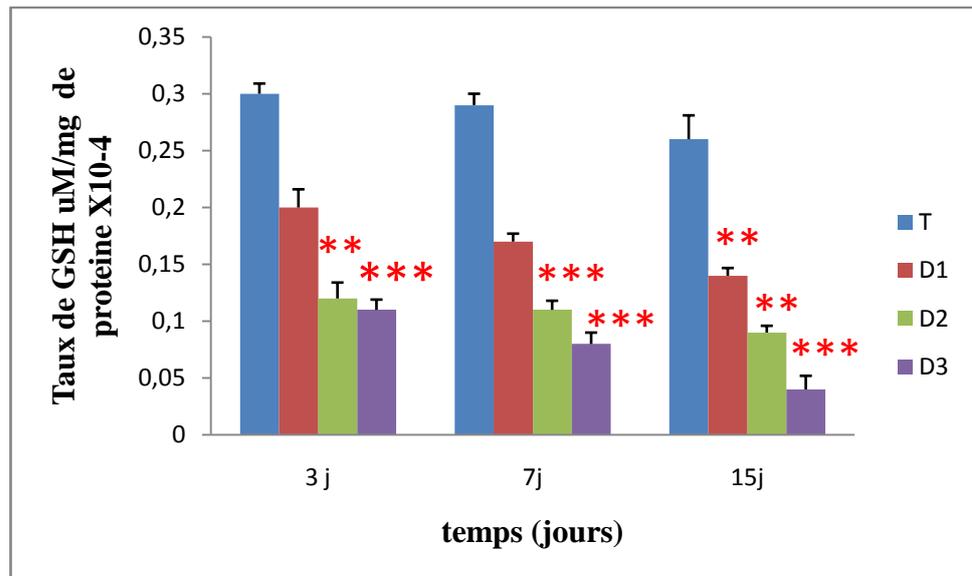


Fig.15. Effet du carbofuran sur le teneur de GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine) chez *Helix aspersa* en fonction du temps ($m \pm s$, $n = 7$) (* Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$), *** Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$), P : Seuil de signification).

III.3.2. Effets du carbofuran sur l'activité de glutathion- S-transférase (GST)

La fig. 16 illustre l'effet de trois doses croissantes de carbofuran (0,26 mg/g, 0,5 mg/g et 1mg/g) sur la GST en fonction du temps (3j, 7j et 15j). Ainsi, nous remarquons une augmentation hautement significative ($P \leq 0,01$) après 3j de traitement à la forte dose par rapport au témoin. Après 7j de traitement on observe une augmentation significative pour les deux doses 0,26 mg/g et 0,5 mg/g et hautement significative ($P \leq 0,01$) à la dose de 1mg/g. tandis que pour le traitement de 15 j on note une augmentation hautement significative à la faible dose ($P \leq 0,01$) et une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) à la forte dose par rapport au témoin.

Les résultats de l'analyse de la variance à deux critères (ANOVA) révèlent un effet dose ($P \leq 0,001$), un effet temps ($P \leq 0,001$) et une interaction dose-temps ($P \leq 0,001$).

Chapitre IV: Résultats

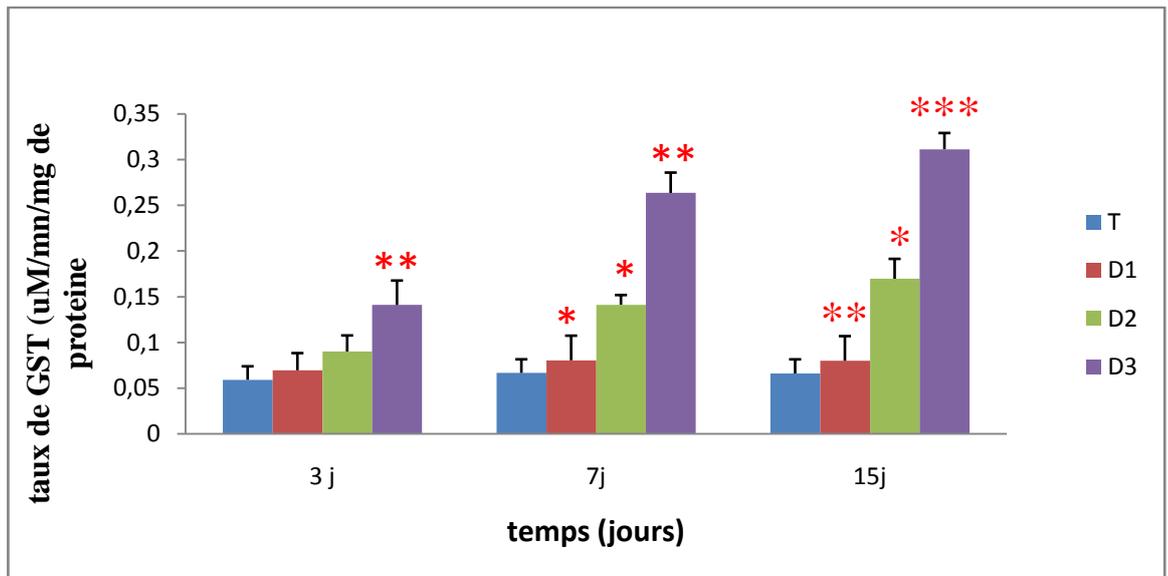


Fig 16. Effet du carbofuran sur l'activité enzymatique de GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) chez *Helix aspersa* en fonction du temps ($m \pm s$, $n = 7$) (* Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$), *** Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$), P : Seuil de signification)

III.3.3. Effets du carbofuran sur le Glutathion peroxydase (GPx)

Le carbofuran appliquée par ingestion diminue les taux du glutathionperoxydase chez *Helix aspersa* traités par trois doses (Fig.17). Après 3 j de traitement, nous constatons une diminution de façon très hautement significative ($P \leq 0,001$) du taux du GPx respectivement aux trois doses (0,26 mg/g, 0,5 mg/g et dose 1 mg/g). Après 7 j de traitement, nous remarquons une diminution significative à la dose de 1 mg /g. Après 15 j de traitement la diminution du taux de GPx devient significative aux deux doses 0.5mg/g et 1mg/g ($P \leq 0,05$) par rapport aux témoins.

Les résultats de l'analyse de la variance à deux critères (ANOVA) révèlent un effet dose ($P \leq 0,001$), un effet temps ($P \leq 0,001$) et une interaction dose-temps ($P \leq 0,001$).

Chapitre IV: Résultats

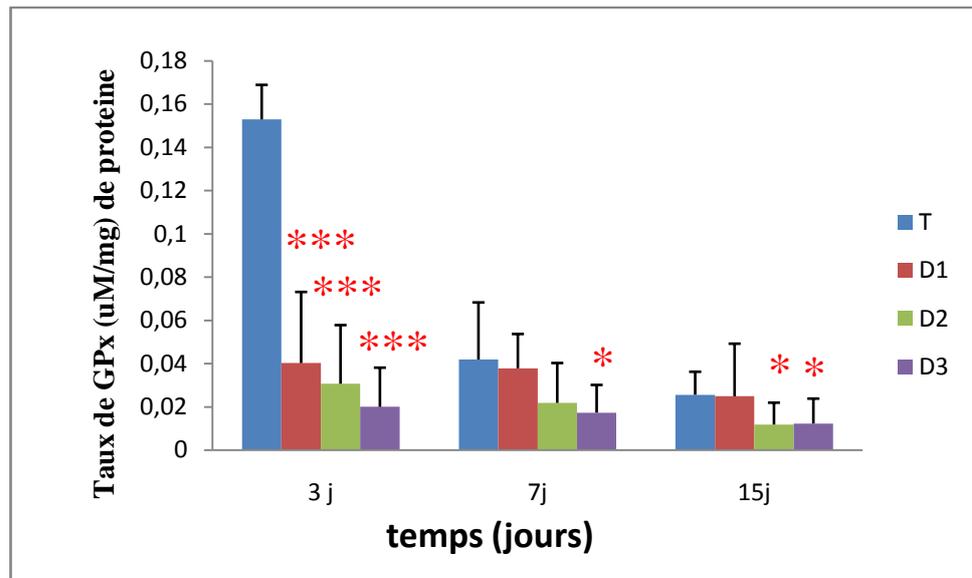


Fig.17. Effet du carbofuran sur le taux de GPx ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine) chez *Helix aspersa* en fonction du temps ($m \pm s$, $n = 7$) (* Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$), *** Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$), P : Seuil de signification).

CHAPITRE IV

Chapitre IV: Discussion

IV. Discussion

Les pesticides, les métaux lourds et autres polluants chimiques empoisonnent et perturbent l'habitat naturel des animaux et peuvent mener à un déséquilibre écologique [Luo *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2003]. L'exposition à ces substances toxiques peut produire des perturbations biochimiques, histologiques ou morphologiques, se traduisant par des altérations spécifiques d'un organe, d'un système ou d'une fonction (système hématopoïétique, fonction de reproduction...), ou d'un processus biochimique ou biologique (cancer et mutagenicité). Ces effets varient selon l'intensité, la voie, la fréquence et la durée de l'exposition mais aussi en fonction de l'espèce, du sexe, de l'âge et de l'état de santé des populations exposées. Ils peuvent être réversibles ou irréversibles, immédiats ou différés [Moussavou Moudouma, 2010].

IV.1. Réponses comportementales

Les effets inhibiteurs du carbofuran aux différentes concentrations, sur le comportement locomoteur et nutritif des adultes de l'escargot *Helix aspersa* peuvent suggérer un effet neurotoxique d'insecticide sur cette espèce de gastéropode. En effet, Les effets inhibiteurs du thiaméthoxam sur le comportement locomoteur des insectes [Bingham *et al.*, 2008] et d'abeilles [Aliouane *et al.*, 2009] et le comportement des rats [Rodrigues *et al.*, 2010] ont déjà été étudiés.

IV.1.1. La mortalité

Lorsque des organismes vivants sont soumis à des changements de leur environnement, ils sont soumis à un stress intense, entraînant la mort des organismes sans que ces derniers ne puissent réagir particulièrement lorsque leurs enzymes de détoxification sont déplétées, ce stress peut être moins intense, permettant alors à l'organisme de déployer une batterie de réponses, à travers l'activation de leurs mécanismes de détoxification, afin de lutter, de survivre et dans certains cas, de s'acclimater à ce nouveau paramètre [Lagadic *et al.*, 1997].

La mortalité est très faible peut être puisque les doses sont proches plus que la durée d'étude est courte ainsi que les doses sont pas mortelles.

IV.1.2. Effets du carbofuran sur le poids de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*

Certains organes du corps contiennent des enzymes chargées de catalyser une série de réactions permettant de détoxifier l'organisme des composés nocifs présents. La biotransformation de toute molécule xénobiotique à caractère hydrophobe met en jeu des mécanismes permettant d'augmenter son hydrosolubilité afin de faciliter son excrétion. Ce processus se déroule principalement au niveau de la glande digestive (hépatopancréas) chez les mollusques [Michel, 1993]. Nos résultats montrent une augmentation très significative

Chapitre IV: Discussion

remarquable du poids du l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* traités pourrait être due à l'accumulation du carbofuran et leur métabolites au niveau des hépatocytes en vue d'une détoxification ou d'un effet d'induction enzymatique [Wayland *et al.*, 1991](le carbofuran est concentré principalement dans le foie). Notre résultat est similaire aux résultats chez les lapins traités par les doses (2, 3, 5 et 8 mg/kg/j) d'un insecticide carbamate : le Manèbe [Mallem *et al.*, 2007].

IV.2. Effets sur le taux des biomarqueurs du stress oxydant

IV.2.1. Effet du carbofuran sur le taux de glutathion (GSH)

Une réduction significative des teneurs en GSH est enregistrée dans notre étude chez les individus de *Helix aspersa* après exposition au carbofuran. La diminution du taux de GSH enregistrée dans notre étude peut refléter l'effet du stress oxydatif causés par le carbofuran. En effet, le GSH est un antioxydant dont la diminution devrait contribuer à la protection de l'animal de l'effet du composé testé. En effet, la fixation possible de ce insecticide aux groupements thiols du GSH permettrait, éventuellement, de prévenir des dommages cellulaires.

Des résultats similaires ont été également rapportés dans différents organes et tissus suite à l'exposition des rats à d'autres insecticides carbamates, le carbofuran [Rai *et al.*, 2009; Kamboj *et al.*, 2006; Bouzeraa, 2010], l'aldicarbe et le propoxur [Matos *et al.*, 2007; Maran *et al.*, 2010] et le methiocarb [Ozden *et al.*, 2009]. Le méthomyl provoque aussi une diminution de taux de GSH [El-Khawaga, 2005; Salama *et al.*, 2005, Garg *et al.*, 2009; Garg *et al.*, 2009a; El-Demerdash *et al.*, 2013; Manawadi *et al.*, 2010a].

IV.2.2. Effets du carbofuran sur la glutathion-S-transférase (GST)

Les glutathion S-transférases représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles, essentiellement cytosoliques impliquées, dans des opérations diverses de transport et de biosynthèse intracellulaire [Georges *et al.*, 1990]. Ces enzymes sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques parmi lesquels figure la détoxification de nombreux xénobiotiques [Habig *et al.*, 1974; Lauterburg et Mitchel., 1981]. En effet, ces enzymes catalysent la réaction d'addition entre ces composés et le groupement -SH du glutathion générant ainsi des composés plus hydrosolubles par neutralisation des sites électrophiles des xénobiotiques [Hayes *et al.*, 2004]. Cependant, la fonction la plus étudiée est leur capacité de catalyse des réactions de conjugaison entre un peptide, le glutathion et des molécules réactives comportant des sites électrophiles, capables de réagir avec les macromolécules comme les acides nucléiques (ADN et ARN) [Baussant *et al.*, 2009]. La catalyse de cette conjugaison du glutathion avec certains substrats représente une étape essentielle dans la

Chapitre IV: Discussion

formation de composés qui seront moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules de départ [Chatterjee et Bhattacharya., 1984].

D'après nos résultats, nous constatons que l'augmentation de la teneur en GST est accompagnée avec la diminution du taux de GSH. Le carbofuran conjugué par le GSH est démenagé par la GST dans le but de diminuer son effet toxique sachant que la GST fait partie des enzymes substrats spécifiques qui catalysent la conjugaison de GSH avec les xénobiotiques favorisant leur élimination de l'organisme.

Les mêmes résultats sont remarquables dans les zones industrielles (FERTIAL, l'usine Arcelor Mittal d'El-Hadjar et le complexe métallurgique FERROVIAL [M. Rabah LARBA 2014]. Ces résultats sont en accord aussi avec les travaux de **Radwanetal., (1992)**, qui ont mis en évidence une induction de l'activité GST après exposition du gastéropode terrestre (*Thebapisana*) à un pesticide (Carbamate) et aussi chez l'espèce *Helix aspersa* exposé aux insecticides [Radwanet Mohamed., 2013].

IV.3.3. Effets du carbofuran sur Glutathion peroxydase (GPx)

Le GPx est une enzyme antioxydant clé qui règle le niveau des ROS (le GPx est capable de non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydro peroxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés) et donc protège les cellules contre les dégâts générés par le toxique [Coogan et al., 1989; Polacco., 1977].

Les enzymes antioxydantes sont considérées comme la première ligne de défense de l'organisme contre les radicaux libres, d'où elles préviennent l'oxydation des macromolécules biologiques. Au cours de notre étude nous avons enregistré une diminution de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) hépato pancréatique chez les escargots traités en comparaison avec les témoins.

Une observation similaire a été rapportée chez des rats exposés par voie orale au NAP [Germansky et Jarnall., 1985]. Alors que cette diminution de l'activité GPx n'est pas expliquée, on peut constater que le carbofuran conduit à un stress oxydant qui sera aggravé par la diminution de l'activité GPx.

Käkelä., et al., 1999; kusal et al., 2001 ont montré que la diminution de l'activité de la GPx hépatique chez les souris traitées par le chlorure de nickel est due principalement à une surproduction de peroxyde d'hydrogène et l'épuisement du sélénium et de GSH dans la détoxification du nickel.

CONCLUSION

Conclusion

Conclusion

Le travail réalisé, nous a permis d'étudier chez un gastéropode pulmoné *Helix aspersa* l'effet d'un insecticide carbamate, le carbofuran, sur le comportement et certains paramètres morphométriques (la mortalité, le poids d'hépatopancréas) et la mesure de quelques biomarqueurs du stress oxydant (GSH, GST, GPx) au niveau de l'hépatopancréas.

Les résultats obtenus, ont montré que l'exposition des *escargots* à trois doses (0.26mg/g, 0.5mg/g et 1 mg/g) aux différents temps testés (3, 7 et 15 jours) entraîne l'apparition d'un stress oxydatif qui se manifeste par:

- ❖ Augmentation des poids de l'hépatopancréas.
- ❖ Variation de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau.
- ❖ Augmentation de l'activité enzymatique de la GST
- ❖ Diminution de l'activité enzymatique du GPx.

Diminution du taux de GSH.

Référence bibliographique

Référence bibliographique

-A-

- ACTA, 1996. Index phytosanitaire. Association de Coordination Technique Agricole, Paris.
- ACTA., (2005) : « Index phytosanitaire ACTA » .41 èmeédition.Paris 821 p.
- Adam V., Petrlovà J., Potesil D., Lubal P., Zehnàlek J., Sures B and Kizek R., 2005. New electrochemical biosensor to determine platinum cytostatic to DNA structure. *ChemistryListy*. 99: 353-393.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 2009. Projet de décision de réévaluation du carbofuran - PRVD2009-11, Santé Canada, CANADA. Pages: 11, 12, 53, 54.
- Aliouane Y., El Hassani AK., Gary V., Armengaud C., Lambin M., Gauthier M., 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behaviour. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28(1): 113–122.
- Amiard JC, Caquet T, Lagadic L (1997) Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramdane F (eds.), *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Lavoisier Tec&Doc, Paris, Londres, New York,)Oil-)OC(. *Anabas testudineuse*(Bloch). *Toxicol. Lett* ., 22: 187 – 198.
- Anders M., Lash L., Dekant W., Elfarrar A. and Dohn D, 1988. Biosynthesis and biotransformation of glutathione- S- conjugates to toxic metabolites. *Crit. Rev. Toxicol.*; 18: 311-341.
- Angerer J, Mannschreck C, Gündel J (1997) Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health* 70:365-377.

-B-

- Bailey S.E.R., 1981. Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *Jorn. Comp. Physiol*, 142, 89-94.
- Barillet, S., 2007. Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz, France. 476 p.
- Barker G.M., 2001. *The Biology of Terrestrial Molluscs*. CAB International, Oxon,

Référence bibliographique

Wallingford, UK, 567 p

- Barker G.M., 2001. The Biology of terrestrial molluscs. Wallingford U.K, C.A.B. International. 558 p.
- Barker G.M., 2004. Natural enemies of terrestrial mollusks. Wallingford, UK, CABI Publishing, p. 644.
- Baturu W, Lagadic L (1996) Benzo[a]pyrene hydroxylase and glutathione *S*-transferase activities as biomarkers in Lymnaea stagnalis (Mollusca, gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. Environ Toxicol Chem 15:771-781
- Baussant T., Bechmann R.K., Taban I.C., Larsen B.K., Tandberg A.H., Bjørnstad A., Torgrimsen S., Naevdal A., Øysaed K.B., Jonsson G. & Sanni S., 2009. Enzymatic and cellular responses in relation to body burden of PAHs in bivalve molluscs: A case study with chronic levels of North Sea and Barents Sea dispersed oil. Mar. Poll. Bull., 58 : 1796-1807.
- Beaumont A. and Cassier P., 1998. Travaux pratiques de biologie animale. Zoologie Embryologie Histologie, Dunod, Paris. 502p.
- Beaumont et Cassier., 1998. Travaux Pratique de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3ème édition DUNOD
- Beeby A., Richmond L., 2002. Evaluating Helix aspersa as a sentinel for mapping metal pollution. Ecological Indicators. 1(4): 261-270.
- 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.
- Bintein S, Devillers J. Evaluating the environmental fate of atrazine in France, Chemosphere, 32:12 (1996) 2441-2456.
- Bliefert, C., Perraud, R., 2001. Chimie de l'environnement: air, eau, sols, déchets. De Boeck Université.
- Bonnet J.C. and Vrillon J.L., 1990. L'escargot Helix aspersa biologie – élevage. Edition INRA, 14- 15
- Bouziani M., 2007. L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de médecine et de la santé. Santémaghreb. [consulté le, 11/12/2011].
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of

Référence bibliographique

microgram quantities of protein utilizing the principle of proteinbinding, Anal. Biochemistry, 72, 248-254.

-c-

- Calvet, R E., Barriuso, C., Bedos, P., Benoit, M P. et Charnay, Y., (2005). « Les pesticides dans le sol, conséquences agronomiques et environnementales, coquet, Edition France agricole.
- Carson R. Silent Spring. 40th anniversary, Ed. New York: Houghton Mifflin; 2002.
- Catherine R., 2010. Biopesticides d'origine végétale. Édition DUNOD. 235 pages.
- Chatterjee S. & Bhattacharya S., 1984. Detoxication of industrial pollutants by the glutathione S-transferase system in the liver of.
- 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.
- Chevalier L., Desbuquois C., Le Lannic J., Charrier M., 2001. Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata). Comptes Rendus de
- Chevallier H., 1992. L'élevage des Escargots. Production et Préparation du Petit-Gris. 2ème édition. Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort. Paris. 144 p.
- Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot de Vaufleury A., Ribera D. and 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.
- Conseil national de recherches du Canada. Carbofurane : Critères pour interpréter les effets de son utilisation sur l'état de l'environnement. CNRC no. 16741, Ottawa (1979)
- Cosson R. and Amiard J.C., 1998. Utilisation des métallothionéines comme biomarqueurs d'exposition aux métaux. In L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard et F. ramade (eds), Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement, Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 77-103.
- Cossu C, Doyotte A' Babut M, Exinger A, Vasseur P (2000) Antioxydant biomarkers in freshwater bivalves, (*Jniotumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. Ecotox Environ Safety 45:106- 12r.

Référence bibliographique

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

-D-

- Daguzan J., 1981. Contribution à l'élevage de l'escargot petit-gris : *Helix aspersa* Müller (mollusque gastéropode pulmoné stylommatophore). I. Reproduction et éclosion des jeunes en bâtiment et en conditions thermohygro-métriques contrôlées. *Ann. Zootechn* 30, 249-272.
- Dallinger R., Berger B., Triebkorn-Köhler R., Köhler H., 2001. Soil biology and ecotoxicology. *The biology of terrestrial molluscs*. Barker G.M. Oxon, CABI: 489-525.
- Dallinger R., Berger B., Triebkorn-Köhler R., Köhler H., 2001. Soil biology and ecotoxicology. *The biology of terrestrial molluscs*. Barker G.M. Oxon, CABI: 489-525.
- 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.
- Day, K.E., Maguire, R.J., 1990. Acute toxicity of isomers of the pyrethroid insecticide deltamethrin and its major degradation products to *Daphnia magna*. *Environmental toxicology and chemistry* 9, 1297-1300.
- Dickinson, D. A., and Forman, H. J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*, 64, p.1019-26.
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P (1997) Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unionidae*. *Aquatic Toxicol* 39:93-110.

-E-

- Eeva T., Rainio K., Suominen O., 2010. Effects of pollution on land snail abundance, size and diversity as resources for pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*. *Science of the Total Environment*. 408 (19): 4165-4169.

Référence bibliographique

- El-Demerdash F.M., Dewer Y., Elmazoudy R.H. and Attia A.A., 2013. Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 65: 897-901.
- El-Khawaga O.Y., 2005. Role of selenium on antioxidant capacity in methomyl-treated mice. *J. Physiol. Biochem.* 61(4): 501-506.

-F-

- Flohe, I., Gunzler, W.A. (1984). Analyse of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 105, 114-121.
- Fourrier J., (1988) : « Chimie des Pesticides », Paris.
- Fränzle O., 2006. Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecological Indicators*. 6(1): 114-136.

-G-

- Galli A5 Del Chiaro D, Nieri R' Bronzetti G (1938) Studies on cytochrome P450 in *Mytilus galloprovincialis*: induction by Na-phenobarbital and ability to biotransform xenobiotics. *Mar Biol* 100:69-73.
- Gamble SC, Goidfarb PS, Porte C, Uvingstone DR (1995) Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maëmus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Mar Environ Res* 39:191-195.
- Garg D.P., Bhalla P., Kiran R., Bansal A.K. and Dhawan D.K., 2009a. Vitamin E-mediated protection in methomyl induced alterations in rat liver. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 91(4): 685-698.
- Garg D.P., Kiran R., Bansal A.N., Malhotra A. and Dhawan D.K., 2008. Role of vitamin E in mitigating methomyl acute toxicity in blood of male Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 31: 487-499.
- Georges G.S., & Buchanan G., 1990. Isolation, properties and induction of placental liver cytosolic glutathione S-transferase. *Fish. Physiol. Biochem.*, 8(6): 437-449.
- Goidfarb PS, Spry JA, Livingstone DR, Wiseman A, Gibson GG (1989) *Mar Environ Res* 28:57-60.
- Gomot A., 1997a. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 33: 209-216.
- Gomot A., 1997a. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in

Référence bibliographique

- toxicity bioassays. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 33: 209-216[31].
- Gomot A., Gomot L., Boukraa S., Bruckert S., 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa* - an experimental study of the absorption route for the stimulating factors. *Journal of Molluscan Studies*. 55: 1-7.
 - Gomot-de Vaufleury A., 2001. Regulation of growth and reproduction. *The biology of terrestrial molluscs*. Barker GM. Oxon, CABI: 331-355.
 - Grara, N., 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux .Thèse de doctorat de l'université de Annaba. 120 ,91 pages.
 - Grara, N., 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux .Thèse de doctorat de l'université de Annaba. 120 ,p.91.
 - Griffith O, Meister A (1978) Differential inhibition of glutamine and γ -glutamyl-cysteine synthetases by α -alkyl analogs of methionine sulfoximine that induce convulsions. *J Biol Chem* 253.2333-233g.
 - Guillard et al., 2001 ; Lányi, K., Dinya, Z., 2005. Photodegradation study for assessing the environmental fate of some triazine-, urea- and thiocarbamate-type herbicides. *Microchemical journal* 80, 79-87. 7732.
 - GUPTA R.C., 1994. Carbofuran toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health*, 43^{ème} éd, Pages : 383-418.
 - Habig W.H., Pabst M.J. and Jakoby W.B., 1974. Glutathione *S*-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249: 7130-7139.

-H-

- Habig W.H., Pabst M.J., & Jakoby W.B., 1974. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* , 249, 7130-7139.
- Hayes J.D., Flanagan J.U., & Jowsey I.R., 2004. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 45, 51 – 88

-I-

Référence bibliographique

- Ishikawa T (1992) The ATP-dependent glutathione γ -conjugate export pump. *Trends BiolSci* 77.463-468.

-K-

- Kamboj A., Kiran R. et Sandhir R., 2006. Carbofuran-induced neurochemical and neurobehavioral alterations in rats: attenuation by N-acetylcysteine. *Experimental Brain Research*. 170: 367-575.
- Kerney M., Cameron R. and Bertrand A., 2006. A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, DelachauxetNiestlé SA. 97 p.
- Kerney M., Cameron R. and Bertrand A., 2006. A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, DelachauxetNiestlé SA. 97 p.
- Kerney M., Cameron R., Bertrand A., 2006. A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, DelachauxetNiestlé SA. 97 p.
- Kerney M., Cameron R., Bertrand A., 2006. A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, DelachauxetNiestlé SA. 97 p.

-L-

- Lagadic L, Caquet T, Amiard JC (1991) Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramdade F (eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Masson, Paris, Miian, Barcelone, 1-7.
- Lagadic L, Caquet T, Amiard JC (1991) Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramdade F (eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Masson, Paris, Miian, Barcelone, 1-7.
- Lagadic, L., Caquet, T. & Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux* (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard & F. Ramade), Masson, Paris, p. 1-9.
- land snail , *Thebapisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*, 79,40-46
- Lauterburg D.J. & Mitchel J.R., 1981 . Gillette, bromobenzene-induced liver necrosis, protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatic intermediate. *Pharmacol.*, 11:151-169.
- Lence RA, Burk RF (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *BiochemBiophysRes Commun* 71:952-958.

Référence bibliographique

- Leonard, R., 1990. Pesticide movement into surface waters. *Pesticides in the Soil Environment*.

-M-

- Madec L., 1983. Importance des conditions climatiques et de l'origine des individus pour la reproduction de l'escargot petit-gris en élevage sous bâtiment contrôlé. Session ITAVI, Rennes.
- Maiorino M, Chu FF, Ursini F, Davies KJA, Doroshov JH, Esworthy RS (1991) Phospholipidhydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines *J Biol Chem* 266:7728-
- Mallem L., Keck G., Franck M. and Boulakoud M., 2007. Effets du manèbe sur la thyroïde et la fertilité du lapin. *Revue Méd. Vét.*, 158, p 8-9, 452-457.
- Manawadi S.I. and Kaliwal B.B., 2010a. Methomyl induced gonadal dysfunction, biochemical contents and enzyme activities in male albino mice. *International Journal of Biotechnology Applications*. 2(2): 20-32.
- Maran E., Fernandez-Franzon M., Font G. and Ruiz M.J., 2010. Effects of aldicarb and propoxur on cytotoxicity and lipid peroxidation in CHO-K1 cells. *Food Chem. Toxicol.* 48: 1592-1596.
- Marasco F., Murciano C., 2003. Les escargots. *Elevage*. Paris, Editions de Vecchi. 103 p.
- Matos P., Fontainhas-Fernandes A., Peixoto F., Carrola J. and Rocha E., 2007. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. p89: 73-80.
- Meimberg H, Schrenk C, Steinberg C, I{arenberg ,\ Kettrup A (1997) The suitability of gastropods as biomarkers. *Environ Sci Pollut Res* 4:183-188
- Meister A (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220:472-47j
- Merhi ,M., 2008. Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin ».
- Michel X., 1993. Contribution à l'étude des interactions entre les contaminants chimiques organiques et les organismes marins : bases moléculaires et applications à

Référence bibliographique

la biosurveillance de l'environnement côtier. *Thèse de l'Université de Bordeaux I*, n° d'ordre 993.

-N-

- Narbonne JF, Michel X (1997) Système de biotransformation chez les mollusques aquatiques, In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds), *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Masson, Paris, Milan, Barcelone, 11-31.
- National Academy Council (1987) Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspect* 74:3-9.
- Notten M. J. M., Oosthoek, A. J. P., Rozema, J., Aerts, R., 2006. Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the land snail *Cepaenemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. *Ecotoxicology*, 15, 295-303.

-O-

- Oerke E., Dehne H., 1997. Global crop production and the efficacy of crop production current situation and future trends. *European Journal of Plant Pathology*. 103: 203-215.
- OMS, (2005): «Organisation mondiale de la santé, The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification».
- Organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. *Water research* 38, 2305-2314.
- Ozden S., Catalgol B., Gezginci-Oktayoglu S., Arda-Pirincci P., Bolkent S. and Alpertunga B., 2009. Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 1676-1684.

-P-

- Peakall DB (1994) Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol Ecotoxicol News* 1: 55-60.
- Piart J. Etude expérimentale des phénomènes de dégradation de certains insecticides organiques de synthèse. ORSTOM, Cahiers ORSTOM Volume 13, Numéro 1, série Biologie, 1978.
- Pimentel D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pest: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 8: 17-29.

Référence bibliographique

-R-

- Radwan M.A., & Mohamed M.S., 2013. Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 91–97.
- Radwan M.A., EL-Wakil H.B., & Osman K.A., 1992. Toxicity and biochemical impact of certain oxime carbamate pesticides against terrestrial snail, *Thebapisana* (Muller). *J. Environ. Sci. Health*, 27 (6), 759-773.
- Radwan, M. A., El-Gendy, K. S., Gad, A. F., 2010. Biomarkers of oxidative stress in the
- Radwan, M. A., Essawy, A. E., Abdelmeguid, N. E., Hamed, S. S., Ahmed, A. E., 2008. Biochemical and histochemical studies on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90, 154–167.
- Rai D.K., Rai P.K., Rizvi S.I., Watal G. and Sharma B., 2009. Carbofuran-induced toxicity in rats: Protective role of vitamin C. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 61(6): 531-535.
- Regoli F., Gorbi S., Fattorini D., 2006. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environmental Health Perspective*. 114: 63-69.
- 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.

-S-

- Salama A.K., Osman K.A., Saber N.A. and Soliman S.A., 2005. Oxidative stress by different pesticides in the Land Snails, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 8(1): 92-96.
- Sarkar A., Ray D., Shrivastava A.N. and Sarker S., 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15, 333-340.
- Scheifler R., Gomot de Vaufleury A., Badot P.M., 2002a. Transfer of cadmium from

Référence bibliographique

plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: bioaccumulation and effects. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 53(1): 148-153.

- Schiavon, M., Perrin-Ganier, C., Portal, J., 1995. La pollution de l'eau par les produits phytosanitaires: état et origine. *Agronomie* 15, 157-170. t: Processes, Impacts, and Modeling, 303-349.
- Schlenk D, Buhler DR (1988) Cytochrome P-450 and phase II activities in the gumbot chiton *Cryptochiton stelleri*. *Aquatic Toxicol* 13:167 -182.
- Schomburg C.J, Glotfelty D.E, Seiber J.N. Pesticide occurrence and distribution in fog collected near Monterey California 25:1 (1991) 155-160
- Siebers, J., Haenel, H., Gottschild, D., 1993. Untersuchungen zur Verflüchtigung von Lindan unter Freilandbedingungen - Bestimmung aus Konzentrationsmessungen in Luft und aus Rückstandsmessungen. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienstes (Braunschweig)* 45, 240-246.
- Siest G, Batt AM, Fournel-Gigleux S, Galteau MM, Wellman-Bednawska M, Minn{ AmarCostesec A (1988) Induction of plasma and tissue enzymes by drugs: significance in toxicological studies. *Xenobiotica* 18:21-34.
- Soltani N., & Morsli S.M., 2003. Quantification du Dimilin R par chromatographie liquide haute performance : étude de la dégradation dans l'eau de mer. *Journal de Recherche Océanographique*, 28, 118-120.
- Suteau P, Daubeze IvI, Migaud ML, Narbonne JF (1988) PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring *Mar Ecol Prog Ser* 46:45-49.

-T-

- Timbrell Jd Drapper R' Waterfield C (1994) Biomarkers in toxicology: new uses for old molecules. *Toxicol Ecotoxicol News* 1:4-14.
- Toxnet. Toxicology Data Network. U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD (1988).

-V-

- Viarengo, A., 1994. Heavy metal cytotoxicity in marine organisms: effects on Ca²⁺ homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol*, 20, p.85-110.
- Viarengo, A., Nott, J., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine

Référence bibliographique

invertebrates. Comp.Biochem. Physiol. Comp. Pharmacol. Toxicol, 104, p.355–372.

-W-

- Wayland J. and Edward R., 1991. Hand book of pesticide Toxicology. Vol III, Classes of pesticide. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA., biological fluids. Free Radicals Biology and Medicine 24, 480-493 chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and
- Weckbecker G. and Cory J.G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 1210 cells in vitro. Cancer Letters. 40: 257- 264.
- Wilbrink M, Van De Merbel NC, Vermeulen NPE (1991b) Glutathione S-transferase activity in the digestive gland of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. CompBiochemPhysiol 99:185-189.
- Wilbrink N[Groot EJ, Jansen & De Vries Y, Vermeulen NPE (1991a) Occurrence of a cytochrome p-450- containing mixed-function oxidase system in the pond snail *Lymnaea stagnalis* Xenobiotica 21:223-233.

-Z-

- Zamy, C., Mazellier, P., Legube, B., 2004. Phototransformation of selected.

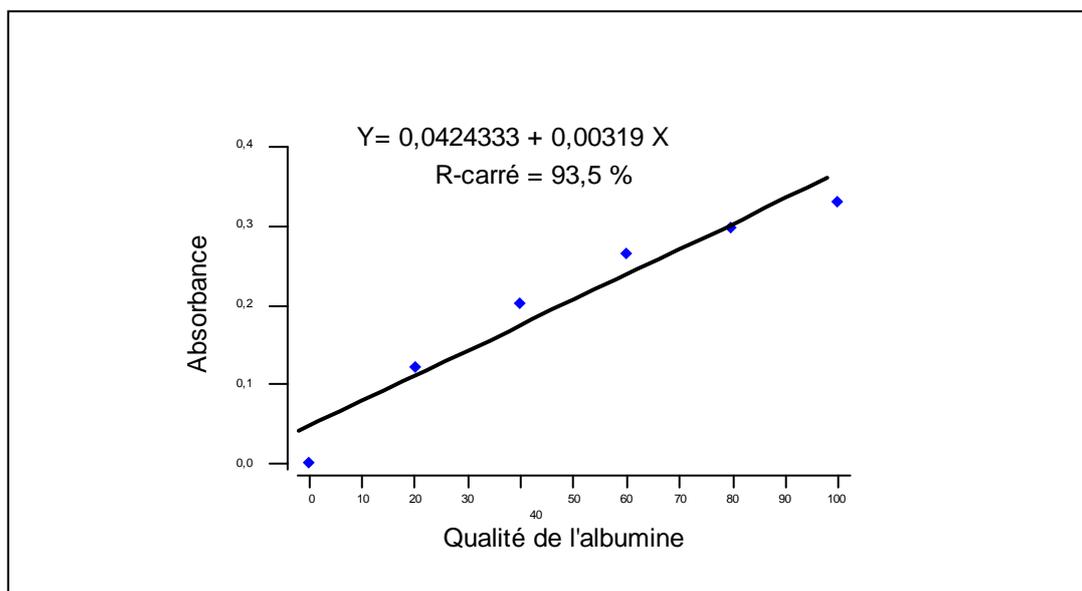
sitesWeb

- www.nature-scientia.com.
- <http://meddic.jp/carbofuran>.
- <http://www.ddaf45.agriculture.gouv.fr/>
- <http://www.heliculture.htm>.

ANNEXES

Annexes

Annexe 01. Droite de régression exprimant les absorbances à 595 nm en fonction des quantités d'albumines (μg) (R^2 : coefficient de détermination)



Annexe 02. Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines hépatopancréatiques

<i>Tubes</i>	0	1	2	3	4	5
<i>Quantité d'albumine</i>						
<i>Solution mère de BSA (μl)</i>	0	20	40	60	80	100
<i>Eau distillée (μl)</i>	100	80	60	40	20	0
<i>BBC (ml)</i>	4					

Annexe 03. Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) de poids du l'hépatopancréas (g) chez *Helixaspersa* ($m \pm s$, $n=7$)

Source	DL	SC	CM	F	P
Dose	3	47,485	15,828	18,47	0,000***
Temps	2	16,999	8,500	9,92	0,000***
Interaction	6	9,852	1,642	1,92	0,090NS
Erreur	72	61,691	0,857		
Total	83	136,027			

Annexes

Annexe 04. Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) de l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine) chez *Helixaspersa* ($m \pm s$, $n=7$)

Source	DL	SC	CM	F	P
Dose	3	0,39886	0,13295	14,97	0,000***
Temps	2	0,06675	0,03338	3,76	0,028
Interaction	6	0,06496	0,01083	1,22	0,307
Erreur	72	0,63940	0,00888		
Total	83	1,16997			

Annexe 05. Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) du taux de GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine) chez *Helixaspersa* ($m \pm s$, $n=7$)

Source	DL	SC	CM	F	P
Dose	3	2,39502	0,79834	131,88	0,000***
Temps	2	1,23786	0,61893	102,24	0,000***
Interaction	6	3,47242	0,57874	95,60	0,000 ***
Erreur	72	0,43586	0,00605		
Total	83	7,54116			

Annexe 06. Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) du taux de GPx ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine) chez *Helixaspersa* ($m \pm s$, $n=7$)

Source	DL	SC	CM	F	P
Dose	3	0,041920	0,013973	34,96	0,000***
Temps	2	0,026965	0,013483	33,73	0,000***
Interaction	6	0,042648	0,007108	17,78	0,000 ***
Erreur	72	0,028781	0,000400		
Total	83	0,140314			