



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tébessi –Tébessa

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

Département de Biologie Appliqué

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité: Pharmacotoxicologie

Intitulé : Effet d'un insecticide néonicotinoïde sur
quelques paramètres biochimiques chez
« *Helix aspersa* »

Présente par:

Bougrouz Hadjer

Boualague Abla

Devant le jury

M^{me}. BOUKAZOULA Fatma

M.C.B Université de Tébessa

Président

M^{me}. ROUACHDIA Roukaya

M.A.A Université de Tébessa

Rapporteur

M^{me}. BEN-AMARA Amel

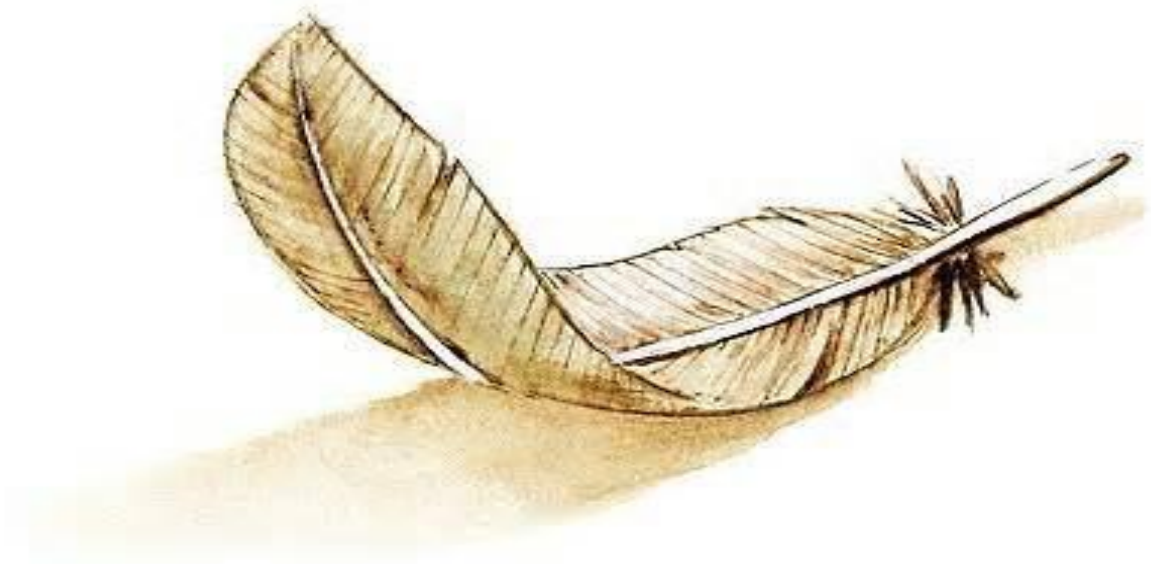
M.A.A Université de Tébessa

Examineur

Date de soutenance : 29/05/2018

Note : /20

RESUME



Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet d'insecticide appartient à la famille des néonicotinoïde : l'acétamipride sur une espèce bioindicatrice en écotoxicologie, l'escargot terrestre *Helix aspersa*.

Notre expérimentation a été réalisée chez quarante cinq escargots. En premier lieu, ils sont divisés en 3 lots de 15 escargots chacun; le premier est lot témoin, le deuxième groupe a été contaminé par une dose de 5 mg/l d'acétamipride et le troisième lot a été contaminé par une dose de 10 mg/l d'acétamipride pendant trois périodes de traitement (3, 7 et 15 jours) par voie digestive. Des dosages de quelques biomarqueurs (GSH et MDA) et un dosage biochimique (protéine et lipides) sont réalisés.

A partir de l'analyse de nos résultats, on observe une augmentation du rapport hépatosomatique des escargots contaminés à l'acétamipride. Les résultats ont montré aussi des changements notables, en fonction de la dose et la durée de traitement dans les paramètres biochimiques au niveau des hétopancréas caractérisés surtout, par une augmentation significative de la concentration des protéines. Alors que, la concentration des lipides, a été diminuée de manière significative. En outre, la contamination par l'acétamipride a activé le stress oxydatif par une augmentation de la peroxydation des lipides (MDA) accompagné par le déclenchement d'un système de détoxification qui se manifeste par la diminution significative de GSH.

Mots clés : *Helix aspersa*, l'acétamipride, biomarqueurs, hétopancréas, système de détoxification, la composition biochimique.

Abstract

The objective of this work is to study the effect of insecticide belongs to the family of neonicotinoid: acetamiprid on a species bioindicator in ecotoxicology, the terrestrial snail *Helix aspersa*

Our experiment was performed in forty-five snails. First, they are divided into 3 lots of 15 snails each; the first group was a control group, the second group contaminated with acetamiprid by a dose of 5 mg / l and the third group contaminated with acetamiprid by a dose of 10 mg / l for three periods of treatment (3, 7 and 15 days) by the digestive tract. Assays of some biomarkers (GSH and MDA) and a biochemical assay (protein and lipids) are carried out.

From the analysis of our results, we observe an increase in hepatosomatic ratio of snails contaminated with acetamiprid. The results also showed significant changes, depending on the dose and the duration of treatment in the biochemical parameters in the hepatopancreas mainly characterized, by a significant increase in the concentration of proteins. While, the concentration of lipids, has been significantly decreased. In addition, contamination with acetamiprid has increased oxidative stress which translates into an increase in lipid peroxidation (MDA) accompanied by the onset of a detoxification system that manifests itself as a significant decrease in GSH.

Key words: *Helix aspersa*, acetamiprid, biomarkers, hepatopancreas, detoxification, the biochemical composition.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير ميبيد حشري ينتمي لعائلة النيكوتينويدات (الاسيتاميبيريد) على نواقل الكثرة الاستعمال كمؤشر التلوث البيولوجي للحزون والترابي *Helix aspersa*.

تجاربنا اجريت على خمسة و اربعون حلزوناً. قسموا الى ثلاث مجموعات، كل مجموعة تحتوي 15 حلزوناً. المجموعة الاولى تمثل الشواهد، المجموعة الثانية عولجوا بتركيز قدره 5 ميليغرام / ليتر، المجموعة الثالثة عولجوا بتركيز قدره 10 ميليغرام / ليتر، خلافاً لمختلفة من العلاج (3، 7 و 15 يوما) عن طريق الامتصاص بواسطة الجهاز الهضمي. قمنا بالمعايرة لبعض المؤشرات الحيوية مثل: مستويات النشاط لانزيمي (GSH و MDA) و كذا معايرة بيوكيميائية (كمية البروتينات و كمية الدهون).

انطلاقاً من تحليل نتائجنا نلاحظ ارتفاعاً في *rapport hépatosomatique* للحزونات. نتائجنا أظهرت أيضاً تغيرات في التركيب البيوكيميائي على مستوى البكرياس الكبدية من خلال ارتفاع كمية البروتينات، في حين تركيز الدهون انخفض. من جهة أخرى أظهرت نتائجنا تغييرات في دلالة الجرعة و فترات العلاج حيث لا حظنا زيادة في مستويات أكسدة الدهون (MDA) بالإضافة إلى تفعيل نظام إزالة السموم و الذي تجسد في نقص كمية GSH.

الكلمات الدالة: المؤشرات الحيوية، البكرياس الكبدية، نظام إزالة السموم، الاسيتاميبيريد، *Helix aspersa*، التركيب البيوكيميائي

Remerciements

Avant tous nous remercions ALLAH tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir cette étude.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Mme ROUACHDIA Rouquaia, qui n'a pas hésité un instant et avec l'aide de conseils importants, sa grande disponibilité et ses encouragements tout au long de la rédaction de ce mémoire. et pour avoir proposé ce thème.

Nous tiens à remercier très chaleureusement les membres de jury, qui ont accepté la charge de juger ce mémoire.

Un très grand merci à Mme Boukazoula F ; pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Merci bien.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Ben Amara ; d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et sa gentillesse.

Merci bien.

Tous ceux et celles qui nos sont chers, tout notre proches amis de la promo 2017-2018 pharmacotoxicologie et Toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Merci à tous et à toutes.

Dédicace

*En ce moment particulier dans ma vie, je tiens à dédier ce
modeste travail :*

*A mon cher père Salih Bougrouz : vos encouragement vos conseil mon
poussé*

*d'aller loin je suis très reconnaissante de votre amour et que dieu
tout puissant préserve votre santé et vos accorde une longue vie.*

*A mon adorable et chère Maman Nedjema Bouhnik: mille dédicace ne
peut*

*exprimer ce que je dois pour tes sacrifices ta patience durant mes
études, ton soutien moral. Ce travail n'est qu'un simple témoignage
de mon grand et éternel amour. Que dieu tout puissant préserve ta
santé et t'accorde une longue vie.*

*A mon Marie Gadri Zakaria pour son soutien, ses conseils et
ses encouragements tout au long la réalisation de ce travail.*

A mes frères Hamza, Oubada, Islam et Chouaib.

A mes Sœurs Sara et Meriem.

*A toute ma belle-famille "GADRI" et je dédie en particulier ce travail
à ma belle-mère et mon beau-père.*

A toutes ma famille "BOUGROUZ", oncles, tantes, cousin, cousine.

*A mes amies le plus proche Noura, Hinda, Djenet, Abla (KHRANG)
, Asma, khawla, Fatma, Manel et Wafa*

*A toute la promotion Pharmacotoxicologie 2018 et à tous mes
enseignants qui m'ont appris avec cœur tous ce que je sais.*

Hadjer Bougrouz

Dédicace

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que nous avons toujours eu pour vous.

Une dédicace particulière A mon père MOUHAMED:

Le soleil de ma vie, le bon cœur, le meilleur père, je vous suis redevable à tous les efforts que vous avez fournis pour moi

Papa.....merci

A celle qui reliée par le paradis, A ma chère mère. (Que dieu le tout puissant accorde au défunt sa sainte miséricorde et l'accueille en son vaste paradis).

A mes beaux frères

A mes très chères sœurs

A Tous les membres de ma famille grands et petits qui méritent être aimés et à tous mes amis ; tes sacrifices, tes soutiens moral et matériel, tes gentillesse sans égal, tes profond attachement m'ont permis de réussir mes études....

A ma fidèle binôme hadjer et sa famille.

A tous mes collègues de la promotion

MASTER 02 Pharmacotoxicologie.

En particulier : Sonia, Ilham, Asma, Fathia

Abla

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Modes d'action des insecticides et acaricides	09
02	Modes d'action des fongicides	09
03	Modes d'action des herbicides	09
04	Les pesticides les plus utilisés en Algérie	14
05	Informations générales sur l'acétamipride	17
06	Les propriétés physicochimiques d'acétamipride	18
07	Classification d' <i>Helix aspersa</i>	24

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Relations générales entre les propriétés des molécules, les phénomènes correspondant et les processus concernés.	06
02	Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement.	07
03	Modes d'exposition des organismes vivant aux pesticides	08
04	Cibles des insecticides neurotoxiques	13
05	Structure spatiale d'acétamipride	17
06	Voie de métabolisme de l'acétamipride dans l'organisme	20
07	Escargot <i>Helix aspersa</i>	23
08	Morphologie externe de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	24
09	Schéma en coupe de l'anatomie de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	25
10	Escargot en hibernation avec son épiphragme	26
11	Elevage d' <i>Helix aspersa</i> dans laboratoire	28
12	Schéma représentatif du protocole expérimental	29
13	Dissection des escargots et prélèvement des hépatopancréas	30
14	Schéma représentatif du protocole du dosage de GSH	33
15	Effet d'acétamipride sur le poids de l'hépatopancréas (g) chez <i>Helix aspersa</i>	37
16	Effet d'acétamipride sur le taux des protéines totaux de l'hépatopancréas chez <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	38
17	Effet d'acétamipride sur le taux des lipides totaux de l'hépatopancréas chez <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	39
18	Effet d'acétamipride sur le taux de GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine de l'hépatopancréas) chez <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	40
19	Effet d'acétamipride sur le taux de MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine de l'hépatopancréas) chez <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	41

Liste des abréviations

4-HNE :	4-hydroxy-2-nonéнал
AA :	Acides aminés
ACT :	Acetamipride
ACh :	Acétylcholine
AChE :	Acétylcholinestérase
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ANOVA:	Analysis Of Variance
ARN :	Acide Ribonucléique
ASS :	Acide sulfosalicylique
BBC :	Bleu brillant de coomassie
C° :	Degré Celsius
CAT :	Catalase
DDA :	Acide dichloro- diphényl-acétique
DDE :	Dichloro-diphényl-dichloréthylène
DDT :	Dichloro-diphényl-trichloréthane
DJA :	Dose journalière admissible
DL50 :	Dose mortel 50
DO :	Densité optique
DTNB :	Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
EDTA :	Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
ERO :	Espèces Réactives à l'Oxygène
g :	gramme
GPx :	Glutathion peroxydase
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé
GST :	Glutathion-S-transférase
h:	heur
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HAPs :	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCH :	Hexachlorocyclohexane

j :	Jour
Kg :	Kilogramme
L :	Litre
MDA :	Malondialdéhyde
mg :	milligramme
ml :	millilitre
mmol :	milimole
mn :	minute
NOAEL:	No observed adverse effect level
O₂⁻ :	Anion superoxyde
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OP :	Insecticides organophosphorés
PBS :	(Phosphate Buffer Solution) Tampon phosphate
PCB :	Biphényles polychlorés
POC :	Pesticides organochlorés
POPs :	Polluants organiques persistants
R² :	Coefficient de détermination
-SH :	Groupement thiol
SOD :	Superoxyde dismutase
TBA:	L'acide thiobarbiturique
Vh :	Volume du l'homogénat
Vt :	Volume totale
µg :	microgramme
µl :	microlitre
µmol :	Micromoles
% :	Pourcentage

Listes des annexes

N°	Titre	Page
1A	Extraction et dosage des métabolites (glucides, lipides, et protéines) de l'hépatopancréas chez les adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> selon Shibko et al. (1966)	67
1B	Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des Protéines	68
1C	Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des lipides	68
02	Droite de régression exprimant les absorbances à 595 nm en fonction de la quantité des protéines (μg)	68
03	Droite de régression exprimant les absorbances à 530 nm en fonction de la quantité des lipides (μg)	69
04	Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) du rapport hépatosomatique (%) chez <i>Helix aspersa</i>	69
05	Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) des taux des protéines totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de l'hépatopancréas) chez <i>Helix aspersa</i>	70
06	Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) de taux des lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de l'hépatopancréas) chez <i>Helix aspersa</i>	70
07	Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) de taux de GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i>	70
08	Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) de taux de MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine) chez <i>Helix aspersa</i>	71

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Liste des annexes

Table des matières

Introduction générale

CHAPITRE I : Etude bibliographique

PARTIE 01 : Etude bibliographique sur les pesticides

I.1.1. Définition.....	04
I.1.2. Classification.....	04
I.1.2.1. Selon leur cible.....	04
I.1.2.2. Selon leur structure chimique.....	05

I.1.2.3. Selon leur persistance dans l'environnement	05
I.1.3. Propriétés des pesticides.....	05
I.1.4. Devenir des pesticides dans l'environnement	06
I.1.5. Modes d'expositions aux pesticides.....	07
I.1.6. Modes d'action des pesticides.....	08
I.1.7. Toxicité des pesticides	10
I.1.7.1. Impacts sur la santé humaine	10
I.1.7.2. Impact sur la biodiversité.....	10
I.2. Les insecticides.....	11
I.2.1. Définition	11
I.2.2. Les principaux insecticides.....	11
I.2.2.1. Les organochlorés(POC)	11
I.2.2.2. Les organophosphorés.....	11
I.2.2.3. Les carbamates.....	12
I.2.2. 4. Insecticides d'origine végétale	12
I.2.2.5. Les pyréthriroïdes.....	12
I.2.2.6. Les néonicotinoïdes.....	13
I.3. Les peroxydant.....	14
I.3.1. Effets des radicaux libres sur l'organisme.....	14
I.3.2. Les biomarqueurs de stress oxydatif.....	15
I.4. L'escargot terrestre <i>Helix aspersa</i>	16

PARTIE 02 : Etude bibliographiques sur l'acétamipride

I.1. Définition.....	17
I.2. Propriétés physicochimiques.....	18
I. 3. Toxicocinétique d'acétamipride.....	19
I. 3.1. Absorption	19
I. 3.2. Distribution.....	19
I. 3.3. Métabolisme.....	19
I. 3.4. Elimination.....	20
I.4. Toxicité d'acétamipride.....	21

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel et méthodes.....	23
II.1.1. Matériel.....	23
II.1.1.1. Matériel biologique	23
II.1.1.1. 1. Présentation et description de l'espèce bioindicatrice.....	23
II.1.1.1.1. Systématique	23
II.1.1.1.2. Anatomie générale de l'escargot	24
II.1.1.1.2.1. Anatomie externe.....	24
II.1.1.1.2.2. Anatomie interne	25
II.1.1.1.2.3. Distribution géographique	25
II.1.1.1.2.4. Estivation et hibernation	25
II.1.1.1.2.5. La croissance	26
II.1.1.1.2.6. Reproduction.....	27
II.1.1.2. Matériel chimique.....	27

II.2.2. L'acétamipride	27
II.3. Méthodes	27
II.3.1. Conditions d'élevages.....	28
II.3.3. Mode de traitement.....	28
II.3.4. Préparation et dissection des escargots.....	30
II.4. Techniques biométriques.....	31
II.4.1. Rapport hépatosomatique.....	31
II.5. Dosage des biomarqueurs biochimiques	31
II.5.1. Extraction et dosage des métabolites.....	31
II.5.1.1. Dosage des protéines totales.....	31
II.5.1.2. Dosage des lipides totaux.....	32
II.5.2. Dosage des indicateurs du stress oxydant.....	32
II.5.2.1. Dosage du glutathion (GSH).....	32
II.5.2.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	34
II.5.3. Analyse statistique.....	35

CHAPITRE III : Résultats

III.1. Effets d'acétamipride sur le rapport hépatosomatique d' <i>Helix aspersa</i>	37
III.2. Effets d'acétamipride sur la composition biochimique.....	38
III.2.1. Effets sur le taux des métabolites.....	38
III.2.1.1. Effets sur le taux des protéines.....	38
III.2.1.2. Effets sur le taux des lipides.....	39
III.3. Effets sur le taux des biomarqueurs du stress oxydant	40
III.3.1. Effet d'acétamipride sur le taux de glutathion (GSH)	40

III.3.2. Effet d'acétamipride sur le taux du malondialdéhyde (MDA).....	41
---	----

CHAPITRE IV : Discussion

IV. Discussion	43
IV.1.Effets d'acétamipride sur le rapport hépatosomatique d' <i>Helix aspersa</i>	43
IV.2. Effets d'acétamipride sur la composition biochimique.....	44
IV.2.1. Effets sur le taux des métabolites.....	44
IV.2.1.1. Effets sur le taux des protéines.....	44
IV.2.1.2. Effets sur le taux des lipides.....	45
IV.3. Effets sur le taux des biomarqueurs du stress oxydant.....	45
IV.3.1. Effet d'acétamipride sur le taux de glutathion (GSH).....	45
IV.3.2. Effet d'acétamipride sur le taux du malondialdéhyde (MDA).....	47

Conclusion générale

Références bibliographiques

Les Annexes

INTRODUCTION GENERALE



Introduction générale

Introduction générale

Au cours des deux dernières décennies, la révolution industrielle et le développement technologique dans le domaine de l'agriculture a considérablement compliqué les problèmes de l'environnement (**Andra et al., 2017**). L'explosion démographique de la population mondiale et ses besoins alimentaires et sanitaires sont les principales raisons ayant conduit à une augmentation spectaculaire de la production et l'utilisation des pesticides susceptibles d'engendrer l'apparition de plusieurs maladies (**El-Hassani et al., 2008 ; Stoytcheva, 2011**).

Un pesticide est une substance qui est sensée prévenir, détruire, repousser ou contrôler tout ravageur animal et toute maladie causée par des micro-organismes ou encore des mauvaises herbes indésirables (**Bolandet al., 2004**). Les pesticides représentent, de loin, les composés xénobiotiques les plus systématiquement introduits dans l'environnement et les plus largement utilisés sur les cultures les plus variées (**Boldt, 2006**). Les pesticides agricoles contribuent à augmenter la productivité agricole, mais posent dans le même temps des risques potentiels pour la santé humaine et l'environnement en s'accumulant dans les écosystèmes (**OCDE, 2008**). Le devenir des pesticides concerne tout milieu naturel dans son ensemble (sol, eau et air) mais le sol reste un compartiment clé car une grande proportion des pesticides appliqués lors du traitement des cultures arrive au sol, par application directe et/ou par lessivage du feuillage (**Calvet, 2005**). Selon des travaux de recherche ultérieurs, la contamination par les pesticides, même à petites doses, induit notamment avec le temps, des effets néfastes sur la santé des populations, soit par une exposition directe à ces polluants (toxicologie expérimentale, suicide), soit indirectement (exposition accidentelle) via les matrices alimentaires par exemple (**Mnif et al., 2011; Bonvallot, 2014**), sachant que seule une petite partie des doses des pesticides utilisées atteint la cible (<1%), tandis que la majeure partie (plus de 99%) est répartie dans l'environnement (**Drire, 2003 ; Wilson, 2010**). Après les dégâts environnementaux de 1970 provoqués par quelques groupes de pesticides ; trois grandes familles d'insecticides ont dominé le marché : les organophosphorés, les organochlorés, les carbamates (**Meyer, 1999 ; Wauchope et al., 2002**). Néanmoins, la résistance aux ravageurs à limité leur utilisation ce

qui a poussé les fabricants à se retourner vers la synthèse chimique de nouveaux groupes de pesticides qui seraient plus efficaces et moins toxiques pour l'environnement et les mammifères. En effet, ce passage a donné naissance à une nouvelle gamme comportant des pyréthrinoïdes et des néonicotinoïdes présentant une forte efficacité pesticide et une faible toxicité pour l'environnement (**Wozniak et al., 1990 ; Masoumi, 2009**). Les pyréthrinoïdes sont les analogues synthétiques des pyréthrines, qui sont des substances naturelles présentes dans les fleurs des plantes (**Grojean, 2002**). L'un de ces pyréthrinoïdes est la deltaméthrine (DM), qui est un composé fortement lipophile utilisé comme insecticide dont les canaux sodiques sont les principales cibles (**Rodríguez et al., 2016**). On note également l'arrivée d'un nouveau membre de la génération d'insecticides appartenant à la famille des néonicotinoïdes en l'occurrence l'acétamipride (ACT) (**Chakroun et al., 2016 ; EFSA, 2013**). En fait, ce néonicotinoïde est considéré comme ayant une excellente activité contre les insectes susceptible de provoquer des effets agonistes en se liant aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (RnAch), entraînant ainsi une excitation, une paralysie anormale et la mort d'organismes nuisibles (**Fernandez et al., 2002 ; Tian et al., 2016**).

En Algérie, les insecticides sont largement utilisés avec des précautions moindres tant dans le domaine de l'agriculture qu'à l'usage domestique, ce qui augmente leurs risques toxiques à long terme même s'ils sont exposés à de faibles doses (**Beghoul et al, 2017 ; Chakroun et al, 2016**).

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 problèmes d'infertilité ou encore du système immunitaire affaibli sont plus fréquents chez eux (**Alavanja et al., 2004; Ascherio et al., 2006; Baldi et Lebailly, 2007**). L'exposition aux pesticides est l'un des facteurs de risque qui favorise l'augmentation du stress oxydatif en produisant des radicaux libres oxygénés. Ce risque du stress oxydatif est largement accepté comme étant un composant critique de la plupart des voies pathologiques (**Bonnefont-Rousselot et al., 1997**).

L'objectif général de cette étude est d'évaluer la toxicité d'insecticide néonicotinoïdes : l'acétamipride via l'étude de quelques biomarqueurs du stress oxydatif chez un gastéropode bioindicateur de la toxicité de l'environnement *Helix aspersa*.

Pour y répondre, ce manuscrit est organisé en quatre grandes parties :

- La première partie de notre travail est une synthèse bibliographique sur le devenir et les effets des pesticides en général, et du l'acétamipride en particulier, ainsi que sur les critères de choix du modèle biologique utilisé en évaluation du risque.
- La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale réalisée sur l' *Helix aspersa* pour déterminer les effets d'acétamipride en conditions de laboratoire par l'étude des paramètres biochimiques (taux des protéines, taux des lipides) et la mesures des quelques biomarqueurs de stress oxydants (GSH, et MDA).
- La troisièmes partie les résultats et leur discussion.
- Enfin, la conclusion générale fait le bilan de la contribution apportée par cette étude à la recherche en écotoxicologie et restitue l'ensemble de ces apports dans le contexte global de l'évaluation des risques des pesticides.

CHAPITRE I
SUNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE



PARTIE01 : Etude bibliographique sur les pesticides

I.1.1. Définition

Le terme "pesticide" est une appellation générique couvrant toutes substances ou produits utilisés dans l'agriculture et dans d'autres secteurs pour combattre les prédateurs des cultures, des produits agricoles ou encore pour protéger les espaces publics contre les insectes, les végétaux, les animaux ou les microorganismes nuisibles (**Stachowski-Haberkorn, 2008 ; ACTA, 2005**). 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 les médicaments destinés à protéger les animaux domestiques, gibiers ou de compagnie (**Bliefert et Perraud, 2001**).

La diffusion de ces composés chimiques dans l'environnement par contamination de l'air, le sol, l'eau et les produits alimentaires provoque l'exposition continue des organismes vivants d'une manière tant aiguë que chronique à des risques de toxicité susceptible d'engendrer des diverses pathologies (**Toumi, 2013 ; Pandey et Mohanty, 2015**).

I.1.2. Classification des pesticides

Les pesticides peuvent être regroupés de manière différente selon l'aspect sous lequel ils sont étudiés. Ils peuvent être classés en fonction de leur cible, de leur structure chimique, de leur persistance dans la nature, de leur mode ou mécanisme d'action (**Guler et al., 2010 ; Djefal, 2014**).

La classification reposant sur le mécanisme d'action présente un intérêt moindre car des pesticides de structures chimiques différentes peuvent avoir des mécanismes d'action similaires ; c'est le cas par exemple des organophosphorés et des carbamates (**Guler et al., 2010 ; Mohajeri et al., 2011**). De plus, le mécanisme d'action de certains pesticides n'est pas complètement élucidé (**Testud et Grillet, 2007**). Donc, il y a beaucoup des critères de classement pour les pesticides, parmi ces critères nous citons les suivants :

I.1.2.1. Selon leur cible

D'après leur cible à contrôler, les pesticides sont divisés en herbicides désignés pour tuer les mauvaises herbes ; en insecticides pour combattre les insectes ; en fongicides qui luttent contre les champignons ; en acaricides pour tuer les acariens ; en hélicides ou molluscicides pour éradiquer les nématocères ; en rodenticides ou raticides pour combattre les rongeurs vertébrés (**Guler et al., 2010 ; Toumi, 2013 ; Utip et al., 2013**).

I.1.2.2. Selon leur structure chimique

D'après la nature chimique de la substance active qui compose majoritairement les produits phytosanitaires. Compte tenu de la variété des propriétés physico-chimique des pesticides disponibles sur le marché, il existe un très grand nombre de familles chimiques. Les plus anciennes et principaux groupes chimiques sont Les organochlorés, Les organophosphorés, Les carbamates, les triazines, benzimidazoles, triazoles, pyréthriinoïdes de synthèse, néonicotinoïdes, pyrimidines et autres. Ce système de classification ne permet pas de définir de manière systématique un composé. Certains pesticides peuvent en effet être composés de plusieurs fonctionnalités chimiques. Ils peuvent alors être classés dans une ou plusieurs familles chimiques (Testud et Grillet, 2007 ; Guler et al., 2010).

I.1.2.3. Selon leur persistance dans l'environnement

Les pesticides sont classés en deux types principaux :

-Les pesticides conservatifs (persistants): qui ne sont pas éliminés du milieu, qu'ils soient dissous dans l'eau ou fixes sur le matériel particulaire. Ce sont des pesticides organiques non biodégradables (Belhaouchet, 2014). La classification de Polluants Organiques Persistants (POPs) regroupe tous ces polluants conservatifs tels que les HAPs, PCBs, dioxines, furans, dieldrine, chlordane, DDT, HCH, lindane, endrine, aldrine, Mirex, toxaphene, chlordane, heptachlore. La production et l'utilisation de ces pesticides ne sont pas autorisées par plusieurs conventions internationales à cause de leur risques sur l'homme et l'environnement (Ademe, 2005 ; Toumi, 2013 ; Utip et al., 2013).

-Les pesticides non conservatifs (non persistants): qui à terme, disparaissent dans peu de temps à cause de leur biodégradabilité rapide tels que certains OP, pyréthriinoïdes, néonicotinoïdes et biopesticides (Belhaouchet, 2014).

I.1.3. Propriétés des pesticides

Le devenir des pesticides dans l'environnement, dépend de leurs propriétés ainsi que celles des différents compartiments concernés (le sol, les eaux, et l'air). Quatre ensembles de propriétés sont à considérer pour les pesticides ; ce sont les propriétés physico-chimiques, chimiques, spectroscopiques et biologiques. Elles se distinguent fondamentalement les unes des autres par les phénomènes auxquels elles correspondent (figure1)(Calvet et al., 2005).

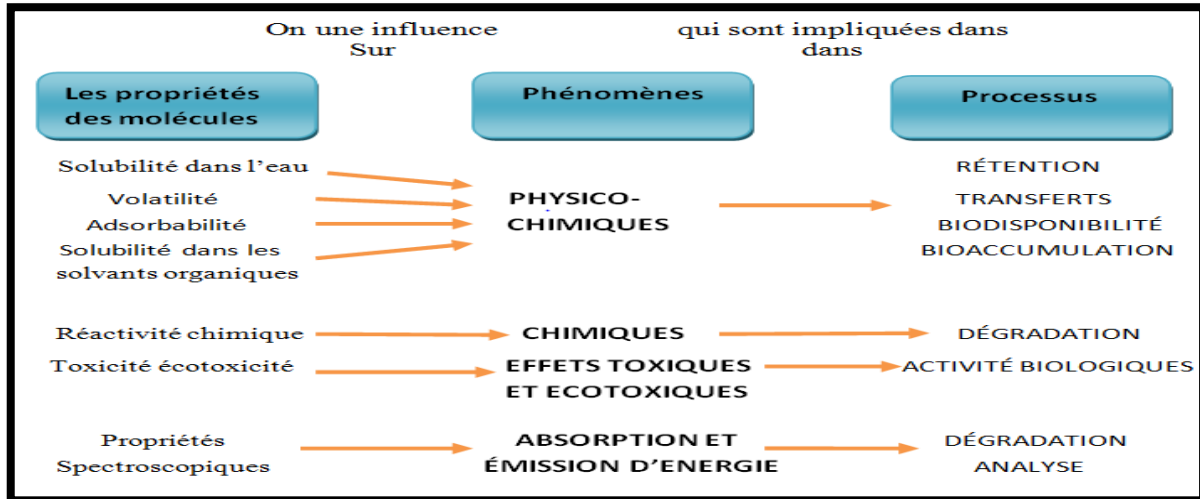


Figure01: Relations générales entre les propriétés des molécules, les phénomènes correspondant et les processus concernés (Calvet et al., 2002)

I.1.4. Devenir des pesticides dans l'environnement

Malgré un souci croissant de protection de l'environnement, lors de l'utilisation des pesticides, une certaine quantité de ces substances se retrouve dans l'environnement (Pimentel, 1995 ; Arias-Estévez et al., 2008). Les voies de dispersion et de transfert de pesticides sont nombreuses. Les gouttelettes de ces produits peuvent atteindre directement le sol sans être stoppées par le feuillage, ou alors indirectement, lorsque la pluie va lessiver les gouttelettes, non encore absorbées par les feuilles (Belhaouchet, 2014).

Les pesticides peuvent être entraînés par dérive loin des zones de culture visées ou être directement volatilisés vers l'atmosphère lors de leur pulvérisation (Toumi, 2013). La révolatilisation à partir du sol et des végétaux joue également un rôle important dans la contamination de l'air. Enfin, le lessivage et le ruissellement, lors des précipitations, vont entraîner la contamination des eaux de surface et souterraines (INERIS, 2005). La présence de polluants constitue un stress induisant des modifications au niveau physiologique et métabolique dans l'organisme (Timbrell, 1994).

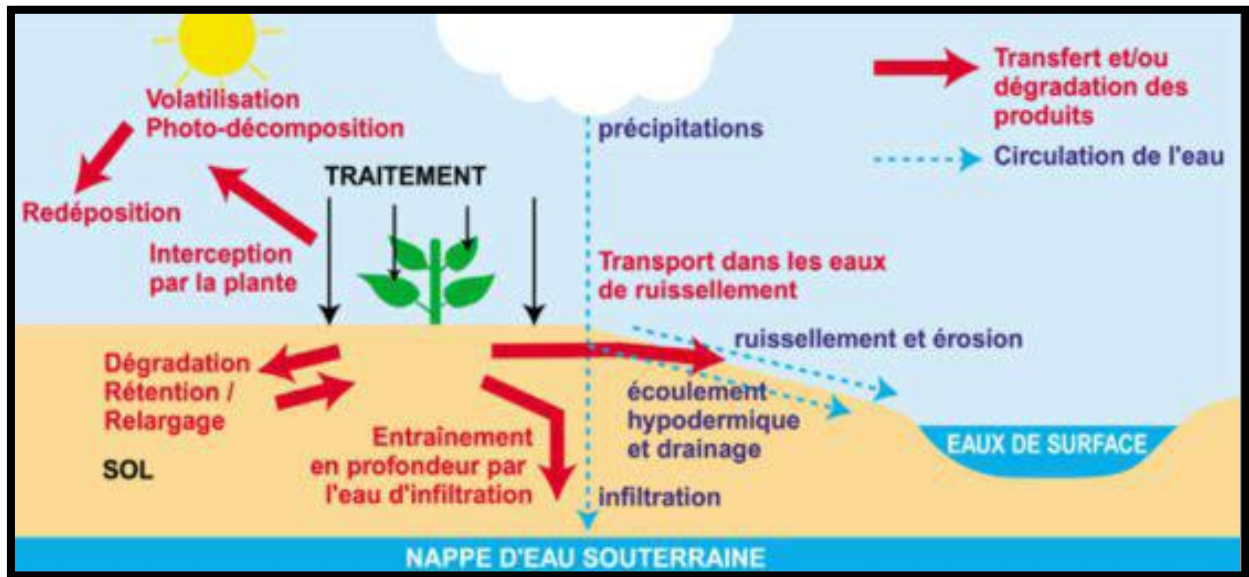


Figure 02 : Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (-<http://www.ddaf45.agriculture.gouv.fr/>)

I.1.5. Modes d'expositions aux pesticides

Les pesticides sont utilisés, non seulement dans l'agriculture, mais aussi dans divers secteurs (industries, collectivités territoriales) ainsi qu'en usage domestique et vétérinaire. Des problèmes de résidus dans les légumes, les fruits etc., sont aussi mis en évidence (**Belhaouchet, 2014**). Les pesticides peuvent contaminer les organismes vivants via multiple voies d'exposition (figure3). En effet, ces polluants pouvant pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion des matrices alimentaires contaminées et encore par inhalation de l'air pollué (**Utip et al., 2013**).

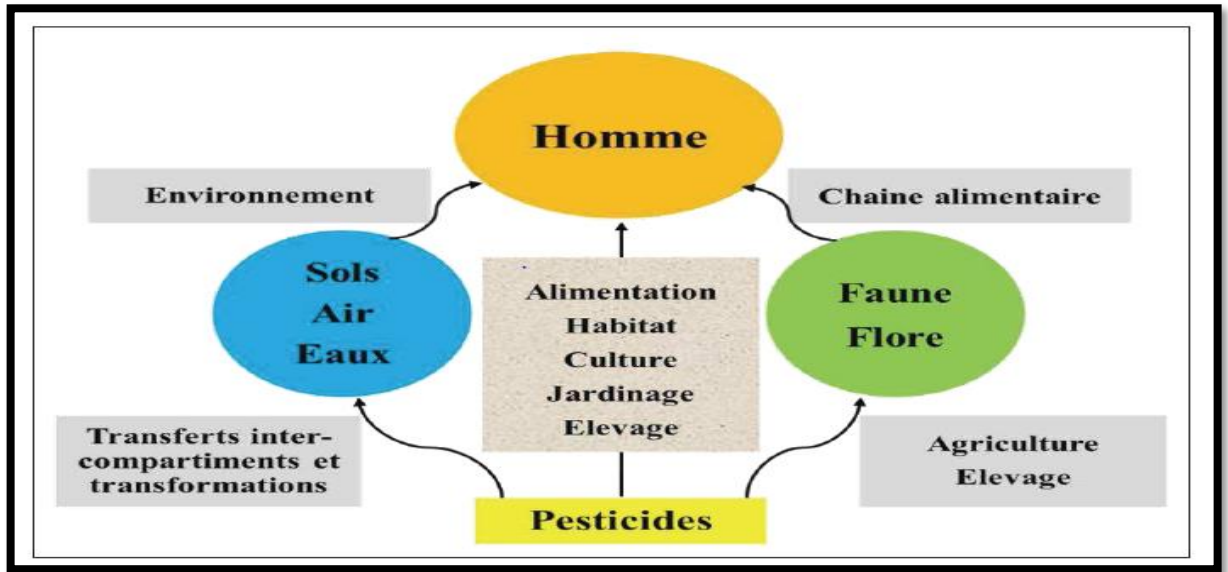


Figure 03 : Modes d'exposition des organismes vivants aux pesticides (Barriuso, 2004)

I.1.6. Modes d'action des pesticides

Par mode d'action, on entend généralement le mécanisme par lequel la substance va exercer son effet sur la cible biologique du ravageur visé ; mais cette cible peut exister aussi chez d'autres individus non-cibles. Si on prend par exemple les insecticides carbamates, ils inhibent l'ACHé qui est une enzyme intervenant dans le processus de la neurotransmission, cette cible existe aussi chez les mammifères, homme compris, qui sont des organismes non-cibles mais dont le fonctionnement du système nerveux pourra être perturbé lors d'exposition à ces produits peu spécifiques. Il faut noter aussi que chez les organismes cibles et non cibles, ces produits peuvent entraîner d'autres effets sans lien avec le mécanisme d'action principal. (Alain Periquet et *al.*, 2004). Nous nous limiterons à décrire les principaux modes d'action sur les organismes cibles dans les tableaux 1, 2 et 3 qui seront regroupées par familles de produits phytosanitaires que sont les insecticides, les fongicides et les herbicides (Alain Periquet et *al.*, 2004).

Tableau 01 : Modes d'action des insecticides et acaricides (Alain Periquet et al., 2004)

<ul style="list-style-type: none"> • Action sur le système nerveux <p>→ Action sur les synapses, la transmission axonale et sur les neuromédiateurs</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Action sur la respiration <p>→ Inhibition du transport des électrons dans les mitochondries, de la phosphorylation oxydative</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Action sur la cuticule <p>Inhibition de la chitine</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbateurs de mue <p>Action sur l'ecdysone et sur l'hormone Juvénile</p>

Tableau02: Modes d'action des fongicides (Alain Periquet et al., 2004)

<ul style="list-style-type: none"> • Action sur les processus respiratoires <p>→ Inhibition de phosphorylation oxydative</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Autres modes d'action <p>→ Action sur les membranes et la croissance → Inhibition de l'élongation des tubes germinatifs (la germination) → Modification de la perméabilité cellulaire</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Action sur les microtubules <p>→ Combinaison avec la tubuline</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Action sur les biosynthèses <p>→ Biosynthèse des stérols, de l'ARN et de l'ADN, des mélanines</p>

Tableau 03: Modes d'action des herbicides (Alain Periquet et al., 2004)

<p>Inhibition de la photosynthèse</p> <p>→ Inhibition du PS I et du PS II</p>	<p>Inhibiteurs de la synthèse des caroténoïdes</p> <p>→ Inhibition de la PDS et de la 4-HPPD</p>
<p>Inhibition de la synthèse des lipides</p> <p>→ Inhibition de l'enzyme ACCas des élongases et des enzymes de cyclisation du GGPP</p>	<p>Perturbateurs de croissance</p> <p>→ Inhibition du transport auxinique et de la synthèse de la cellulose</p> <p>→ Inhibiteurs de la synthèse des chlorophylles</p>
<p>Inhibition de la synthèse des acides aminés (chloroplastes)</p> <p>→ Inhibition de la synthèse de la glutamine, des AA aromatiques et ramifiés</p>	<p>Perturbation de la régulation de l'auxine AIA</p> <p>→ Inhibiteurs de la division cellulaire, blocage de la tubuline, du fuseau achromatique, blocage de la synthèse de l'acide folique</p>

I.1.7. Toxicité des pesticides

L'utilisation des pesticides, en zones agricoles et en zones urbanisées, engendrent des conséquences sur la santé humaine et la biodiversité.

I.1.7.1. Impacts sur la santé humaine

L'exposition de l'Homme aux pesticides s'effectue par le sol, l'eau, l'air ainsi que les aliments. Les risques sanitaires liés à l'exposition des personnes aux pesticides peuvent être liés à des intoxications aiguës (absorption accidentelle, contact cutané, inhalation lors de la manipulation ou lors de l'application des produits). Les principaux organes cibles sont le système nerveux central, le foie et les glandes surrénales, le système respiratoire. Les produits les plus souvent incriminés sont : les insecticides, les fongicides, puis les herbicides. De fortes suspicions subsistent sur le rôle des pesticides dans le développement de pathologies chroniques (cancers (de cerveau, de la prostate), troubles neurologiques, troubles de la reproduction). Des présomptions ont été portées sur le rôle des pesticides dans le développement d'autres pathologies, tels que les troubles neuro-dégénératifs (Parkinson) et de la reproduction, des problèmes de fertilité, des effets hématologiques (leucémies, lymphomes...)(**Kheddam-Benadjal, 2012**).

I.1.7.2. Impact sur la biodiversité

Les pesticides se retrouvent dans les différents maillons de la chaîne alimentaire. Ils agissent sur tous les êtres vivants des bactéries aux mammifères par ingestion ou inhalation et s'accumulent tout au long des chaînes alimentaires : Pour 187 espèces d'oiseaux menacées dans le monde, la première source de pression est la pollution chimique, comprenant les engrais, les pesticides et les métaux lourds pénétrant les eaux de surface et l'environnement terrestre (**Kheddam-Benadjal, 2012**). Par ailleurs, de nombreux cas mortels d'oiseaux ont été recensés en raison de l'ingestion directe de granulés ou d'insectes ayant ingéré des toxiques. Les insecticides à large spectre comme les carbamates, les organophosphorés et les pyréthriinoïdes peuvent provoquer le déclin de population d'insectes bénéfiques tels que les abeilles, les araignées et les coléoptères. Les mammifères peuvent aussi être touchés par la nourriture contaminée (perturbation de la différenciation sexuelle) lors d'une exposition péri ou néonatale à certains produits comme l'aldrine, l'atrazine, le chlordane ou la dieldrine (**AFPDPAB, 2007**). Par ailleurs, l'Agence canadienne ARLA considère trois néonicotinoïdes la clothiadinine, l'acétamipride, le thiaméthoxame comme des perturbateurs endocriniens, pour les mammifères et les oiseaux (**Michel Nicolle, 2015**). Les herbicides sulfonilurées

metsulfuron et dans une moindre mesure le chlorsulfuron sont à l'origine d'une réduction de la croissance des bactéries du sol *Pseudomonas*. Le captane (un fongicide) et l'herbicide (glyphosate) et les insecticides organophosphorés ont également causé un changement parmi les espèces des communautés bactériennes du sol (AFPDPAB, 2007).

I.2. Les insecticides

I.2.1. Définition

Des produits utilisés pour tuer les insectes et les animaux par la perturbation des processus vitaux par action chimique. Les insecticides peuvent être des produits chimiques organiques ou inorganiques. La source principale est la fabrication de produits chimiques, bien que quelques-uns être issus de plantes (François, 2007). Les insecticides sont classés par leurs structures chimiques et par leurs modes d'action en plusieurs familles dont on va citer les plus importantes :

I.2.2. Les principaux insecticides

I.2.2. 1. Les organochlorés(POC)

Ce sont des composés organiques, obtenus par la chloration de différents hydrocarbures insaturés, de moins en moins employés en raison de leur longue rémanence. Du fait de leurs possibilités de bioaccumulation et de biomagnification de long des chaînes alimentaires, ils contaminent l'environnement et persistent très longtemps dans les réserves lipidiques des organismes. L'un de ces produits par exemples le DDT a été introduits dans les années 40 et largement utilisés en agriculture et dans les programmes de lutte sanitaire. Le DDE, métabolite liposoluble du DDT, peut aussi s'accumuler dans le tissu graisseux, alors que le DDA, Métabolite plus hydrosolubles. Ce sont des produits persistants. Dans la plupart des pays développés, l'usage des organochlorés, tels le DDT, l'aldrine, le chlordane, le diedrine, l'endrine, l'heptachlore, le mirex, le toxaphène, l'hexachlorobenzène, est interdit du fait de leurs propriétés rémanentes et cumulatives (Bloomquist, 1996).

I.2.2. 2. Les organophosphorés

Ce sont des esters de l'acide phosphorique. Ils appartiennent à la famille chimique des anticholinestérasiques, dont bloquent l'activité enzymatique de l'AChE et empêchent ainsi la transmission de l'influx nerveux. Ils inactivent cette enzyme par phosphorylation d'un résidu sérine du site actif. Les effets ne sont pas immédiats mais l'inactivation de l'enzyme est

irréversible, contrairement aux carbamates. Ils peuvent produire chez l'homme des contractions involontaires des muscles, des convulsions, la paralysie et, à l'extrême, la mort.

Dans cette catégorie citons le Bromophos, le Dianizon, le Malathion, le Phosmet, le Dichlorvos, etc(Michel, 1999).

I.2.2. 3. Les carbamates

Ce sont des insecticides dérivés de l'acide carbamique, qui agissent en inhibant l'activité enzymatique de l'AChE et d'autres estérases par un mécanisme voisin de celui des organophosphorés, mais l'inhibition peut être réversible dans certains cas. Le carbaryl est le carbamate le plus utilisé en raison de son spectre d'action très étendu pour les contrôles des insectes et en raison de sa faible toxicité chez les mammifères. Le carbofuran, l'aldicarbe, le carbosulfan ou encore le fénoxyarbe sont également des carbamates largement utilisés. Les carbamates sont peu stables dans le sol, donc ils sont de plus en plus utilisés pour remplacer les organochlorés trop persistants. Ils ne sont ni cancérigènes ni tératogènes pour l'homme (Bloomquist, 1996).

I.2.2. 4. Insecticides d'origine végétale

Ces insecticides sont extraits de diverses plantes par macération, infusion ou décoction. Parmi les insecticides d'origine végétale : la nicotine (extraite au niveau des feuilles et des tiges du tabac, *Nicotianatabacum*), la roténone (extrait de racine, feuille ou graine de légumineuses), la ryanoline (cette substance est extraite de *Ryania speciosa*) (Chevalier et al., 2001).

I.2.2. 5. Les pyréthriroïdes

Les pyréthrines sont connues depuis 2000 ans. En effet, la littérature chinoise mentionne l'utilisation d'insecticides d'origine végétale par les chinois depuis le 1^{er} siècle après Jésus Chris (Testud et Grillet, 2007). En 1973, la découverte d'une nouvelle série de pyréthrines synthétiques « les pyréthriroïdes » doués d'une photostabilité sensiblement accrue et d'un large spectre d'efficacité permettant une utilisation agricole et même vétérinaire de ces pyréthriroïdes (Charreton, 2015). Les Pyréthriroïdes sont des insecticides utilisés pour lutter contre les parasites des grandes cultures (arachide, betterave, canne à sucre, céréales, pomme de terre, coton, mil) et contre les parasites des arbres fruitiers et les légumes (Toumi, 2013).

Ils agissent sur le système nerveux central et périphérique des insectes en provoquant une excitation nerveuse répétée aux travers des pompes à sodium (Testud et Grillet, 2007).

I.2.2. 6. Les néonicotinoïdes

Les insecticides de type néonicotinoïdes sont des analogues synthétiques de la nicotine, qui est un alcaloïde naturel extrait des feuilles de tabac, utilisée depuis des siècles comme insecticide (Jeschke et al., 2011). Les néonicotinoïdes sont des neurotoxiques ; leurs cible est le récepteur post-synaptique à l'Ach dont le blocage induit paralysie et mort de l'insecte (Seifert, 2005). Les néonicotinoïdes constituent un ensemble de substances chimiques exclusivement utilisées pour leur action insecticide dans le domaine agricole et pour leur action biocide dans les domaines domestiques et professionnels. Sept substances néonicotinoïdes sont (ou ont été) exploitées depuis leur introduction sur le marché dans les années 90 : la clothianidine, le dinotéfurane, l'imidaclopride, le nitenpyrame, le thiaclopride, le thiaméthoxame et l'acétamipride (David et al., 2007 ; Anderson, 2015).

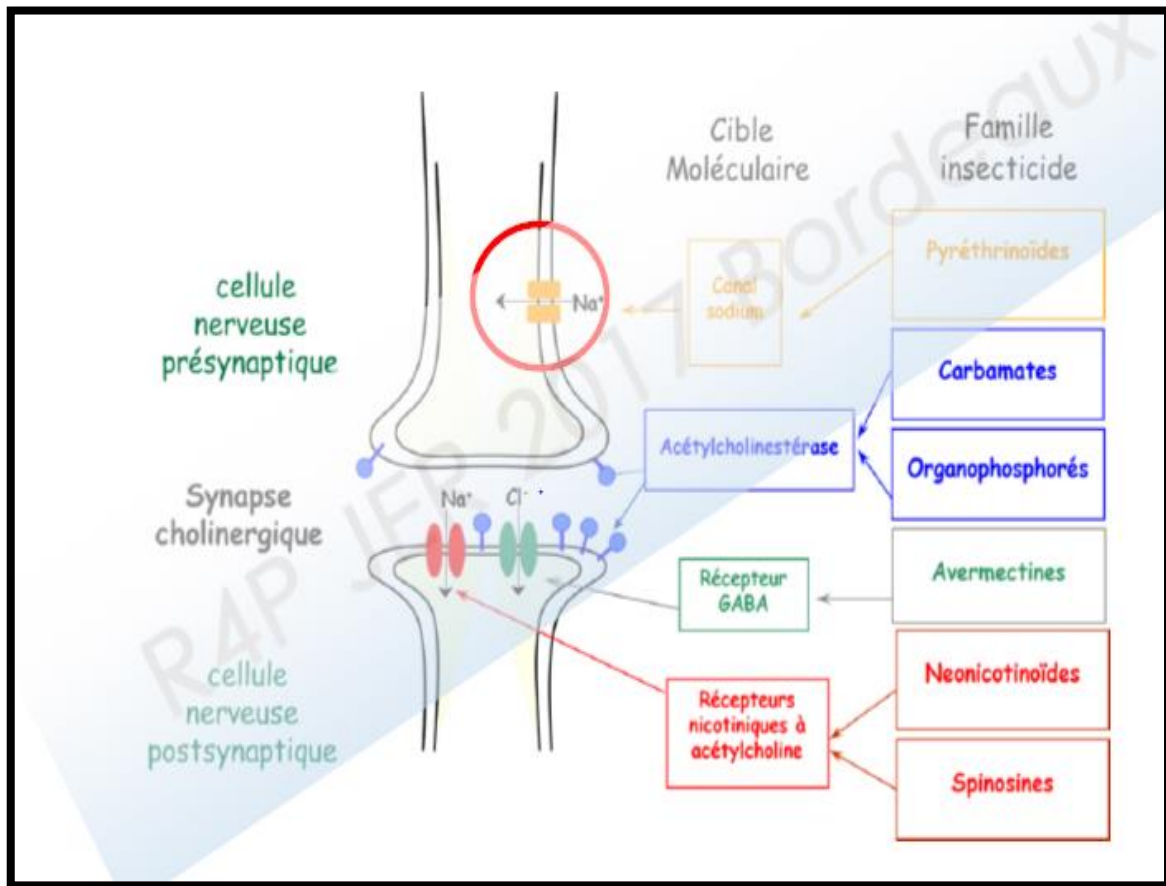


Figure 04 : Cibles des insecticides neurotoxiques (<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00005703/document>)

Tableau 04 : Les pesticides les plus utilisés en Algérie (**Bouziანი, 2007**)

Nom commercial	Type	Matière active
Probinèbe	Fongicide	Probinèbe
Manèbe	Fongicide	Manèbe
Lannate	Insecticide	Méthomyl
Karaté	Insecticide	Lamda-cyhalathrine
Decis	Insecticide	Delthamitrine
2,4 D	Herbicide	acide dichloro-2,4 phenoxy acétique
Restalan	Insecticide	Acétamipride
Cruiser/Actara	Insecticide	Thiaméthoxame

I.3. le stress oxydant

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses antioxydants. Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe ce qui le rend instable (**Gardès-Albert et al., 2003**), formés par la perte ou le gain d'électrons à partir d'un composé non radicalaire (**Berger, 2006; Fontaine, 2007**). Les ERO possèdent deux sources de production, exogène comme les produits de radiation, les médicaments, les pesticides et les solvants organiques (**Vergely et Rochette, 2005 ; Flora et al., 2008**), et les sources endogènes notamment résident dans la mitochondrie, via sa chaîne respiratoire (**Favier, 2003**). La production de ces espèces pro-oxydantes est normale à faible concentration et s'accompagne d'un rôle physiologique important. A concentration élevée, leurs effets deviennent délétères pour les cellules, les tissus et diverses fonctions physiologiques (**Goldsworthy et al., 1972**).

I.3.1. Effets des radicaux libres sur l'organisme

- ✓ **Peroxydation lipidique** : Les acides gras polyinsaturés comme les acides linoléiques ou arachidoniques sont les cibles privilégiées des ERO, ceci conduit à une réaction en chaîne de peroxydation lipidique, qui modifie la fluidité et la perméabilité de la membrane pouvant aboutir à la lyse cellulaire (**Martínez-Cayuela, 1995**). Les hydroperoxydes lipidiques formés sont dégradés principalement en malondialdéhyde (MDA) et 4-hydroxynonéal (4-HNE) (**Chatterjee et Bhattacharya, 1984**)

- ✓ **Oxydation des protéines** : Les ERO induits des modifications dans les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines par la formation des dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (**Aurousseau,2004 ; Baudin, 2006**).
- ✓ **Oxydation de l'ADN** : Les ROS peuvent réagir avec la base de guanine (G) de l'ADN, pour la transformer en 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OH2DG) qui est capable d'induire des mutations spécifiques dans l'ADN pouvant conduire au développement du cancer (**Collins et al., 1997**). Ces derniers provoquant ainsi le développement du diabète, des maladies neuro-dégénératives et des maladies cardio-vasculaires (**Rahman et al., 2006**).

I.3.2. Les biomarqueurs de stress oxydatif

Pour empêcher ces dommages cellulaires, ou les limiter, les organismes ont développé des systèmes de défense antioxydants. Les principaux antioxydants non-enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et l'acide urique. Le glutathion (GSH sous sa forme réduite) est particulièrement important car c'est le substrat de plusieurs enzymes antioxydants (**Halliwell et Gutteridge, 1999**). Il se présente sous la forme réduite GSH et la forme oxydé (GSSG[·]). Le ratio GSH/GSSG est souvent utilisé comme marqueur du niveau d'oxydation d'une cellule. La maintenance d'un niveau élevé de glutathion est donc essentielle pour prévenir d'éventuels dégâts oxydatifs. Les principales enzymes antioxydants sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) et la glutathion S-transférase (GST). Ces molécules vont interrompre la chaîne de réaction radicalaire chez les mollusques (**Stegeman, 1992**). La SOD est la première ligne de défense enzymatique, catalyse la conversion de l'anion superoxyde (O₂^{·-}) produit par la chaîne respiratoire mitochondrial en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Badary et al., 2003**). La (GPx) c'est la deuxième ligne de défense enzymatique, empêche la formation des radicaux libres, elle peut réduire d'une part l' H₂O₂ en H₂O et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcool (ROH) (**Favier, 2003 ; Fontaine, 2007**). La CAT est présent principalement dans les peroxysomes, lysosomes et les mitochondries. Neutralise le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et oxygène moléculaire (**Casetta et al., 2005**). Dans ce travail, on va étudier la variation de taux de GSH et le MDA comme biomarqueurs de stress oxydatif.

I.4. L'escargot terrestre *Helix aspersa*

Au sens écologique général, on définit le concept de bioindicateur comme étant : « espèces ou groupes d'espèces qui, par leur présence et/ou leur abondance, sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie » (**Guelorget et Perthuisot, 1984**). Les organismes bioindicateurs d'effets doivent être sensibles à de faibles perturbations de l'environnement tandis que les organismes indicateurs de bioaccumulation doivent tolérer les contaminants à de fortes concentrations et présenter des propriétés bioaccumulatrices. De nombreuses études ont démontré que les mollusques gastéropodes comme les escargots terrestres *Helix aspersa* sont des bioindicateurs de pollution notamment des métaux et des HAPs (**Barker, 2004 ; Elia et al., 2003; Grara et al., 2012**). Ces consommateurs primaires occupent une place particulière dans l'écosystème à l'interface sol-air-végétation. De ce fait, ils intègrent plusieurs sources de contamination (sol, atmosphère, végétaux) par voies digestive, respiratoire et/ou cutanée. Ils participent à la décomposition et à la fragmentation de la matière organique et sont impliqués dans de nombreuses chaînes alimentaires, y compris celle menant à l'homme (**Barker, 2004**).

PARTIE 02 : Etude bibliographique sur l'acétamipride

I.1. Définition

Un insecticide chimique de la famille des néonicotinoïdes est un produit systémique spécifiquement fabriqué pour tuer ou repousser des organismes entrant en compétition avec les plantes cultivées (Terayama et al., 2016). Il joue un rôle d'inhibition irréversible sur l'acétylcholinestérase laissant une concentration élevée de l'acétylcholine dans la fente synaptique favorisant une sensibilisation continue des récepteurs à l'acétylcholine (nAChR). Sa caractéristique physicochimiques le rend peu persistant dans l'environnement (Sheets, 2010 ; Testud, 2014).

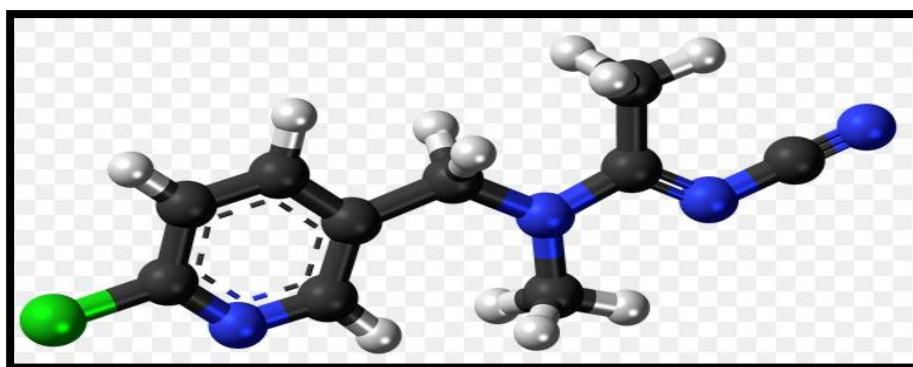


Figure 05 : Structure spatiale d'Acétamipride (Jeschke P et al., 2011)

Tableau 05 : Informations générales sur l'Acétamipride (Jeschke P et al., 2011)

Informations	
Synonymes	Acétamipride (ACT)
Type de pesticides	Insecticide
Famille chimique	Néonicotinoïdes
Groupe	4A
Formule chimique	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄
Structure	

I. 2. Propriétés physicochimiques

L'acétamipride est un insecticide systémique. Un produit systémique est un produit qui pénètre dans la sève de la plante puis se diffuse dans toutes les parties (PPAAO, 2013). Ils sont utilisés dans le traitement des arbres fruitiers, des rosiers, des semences de céréales et de betteraves, ainsi que dans le traitement des bâtiments ou les locaux d'élevage d'animaux domestiques (Couteux et Lejeune, 2012). Contre un grand nombre d'insectes piqueurs suceurs (pucerons, mouches blanches, thrips, cicadelles), chenilles de papillons. Le tableau 06 récapitule l'essentiel des propriétés physico-chimiques et biologiques de l'acétamipride.

Tableau 06 : Les propriétés physicochimiques d'Acétamipride (Testud, 2014)

Propriété	Résultat
Propriétés physicochimiques, couleur et Odeur	Poudre blanche peu hydrosoluble (3 à 4 g/L selon pH) et non volatile (tension de vapeur < 1 µPa à 25°C), Inodore
Nom chimique	(E)-N1-[(6-Chlor-3pyridyl)methyl]-N2-cyano-N1 methylacetamidin
Numéro CAS	135410-20-7
Poids moléculaire	222,68 g/mol
Point ou plage de fusion	98,9°C
Solubilité dans l'eau	4,25 g/L
Persistance d'action	Demi-vie sur le sol comprise entre 1 et 8 jours.
Teneurs max en résidus dans les denrées	0,01 à 5mg/kg selon le type de culture
DJA	70 µ g/kg/jour pour l'homme
DL50	195 mg/kg par voie orale. >2000 mg/kg par voie dermale chez le rat
NOAEL	7 mg/kg/jour
Organes cibles	SNC : ataxie et trémulations. Foie : hypertrophie Centrolobulaire
Génotoxicité et Reprotoxicité	Résultats équivoques sur tests in vitro, négatifs sur tests in vivo, Pas d'effet tératogène (rat, lapin)

I. 3. Toxicocinétique d'acétamipride

I. 3.1. Absorption

Après l'ingestion des matières contaminée, la pénétration digestive est la majeure voie de contamination par l'acétamipride. Aussi, la voie percutanée est prédominante en milieu professionnel agricole par ce pesticide (**Testud, 2014 ; Terayama et al., 2016**). Les études animales de toxicité par voie dermique indiquent qu'elle est vraisemblablement extrêmement faible (**Di Prisco, 2013**). Par contre, la voie respiratoire est négligeable compte tenu de l'absence de volatilité des molécules d'acétamipride, dont les tensions de vapeur sont toutes inférieures à 1 Pa à 25°C. Il peut néanmoins exister une déglutition secondaire de microgouttelettes d'aérosols inhalées (**David et al., 2007 ; Terayama et al., 2016**).

I. 3.2. Distribution

La nature lipophile des néonicotinoïdes comme l'acétamipride facilite leur passage de toutes les barrières biologiques. La distribution digestive est rapide et complète ; le pic plasmatique est obtenu à la deuxième heure. La barrière hémato-méningée des mammifères est très peu perméable au l'acétamipride (**David et al., 2007 ; EFSA, 2016; Terayama et al., 2016**).

I. 3.3. Métabolisme

Communes à l'ensemble des molécules. Les voies métaboliques d'acétamipride passent par les cytochromes P450 cérébraux (**Dively, 2015**). Le principal métabolite conduit à N-méthyl (6-chloro-3-pyridyl) méthylamine, qui est conjugué au méthyl (**Terayama et al., 2016**). L'oxydation d'acétamipride produit du N'-[(6-chloro-3-pyridyl) méthyl]-N-cyanoacetamide; une voie accessoire donnerait naissance à du méthylamine (figure6). Dont l'affinité pour les récepteurs nicotiques des mammifères serait proche de celle de la nicotine) (**AGRITOX, 2015 ; Tian et al., 2016**).

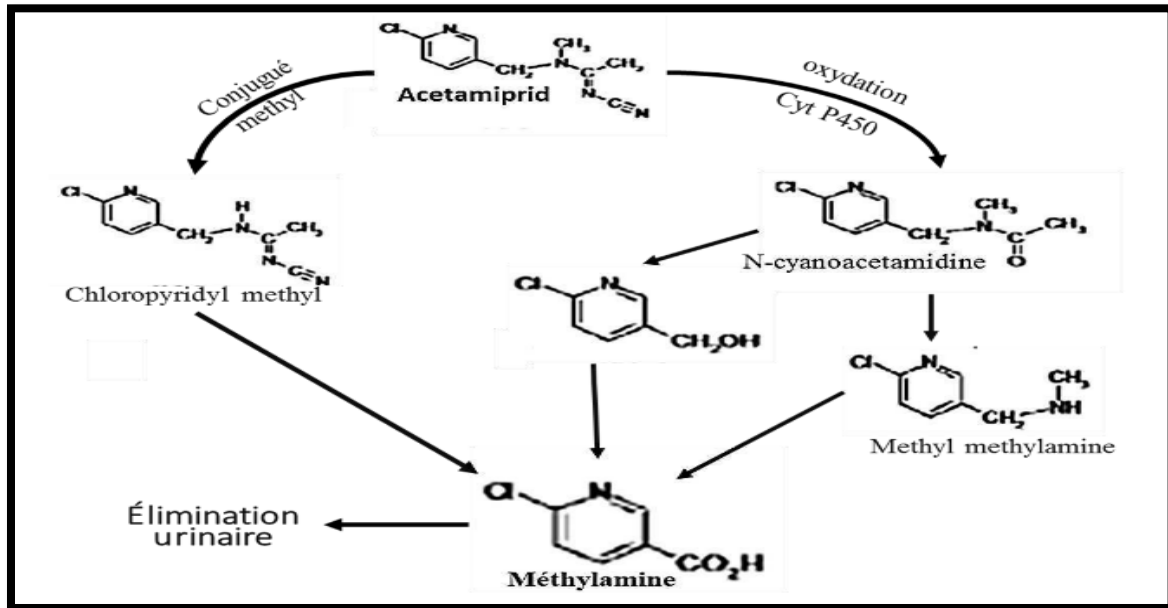


Figure 06 : Voie de métabolisme de l'acétamipride dans l'organisme (Gasmi, 2018).

I. 3.4. Elimination

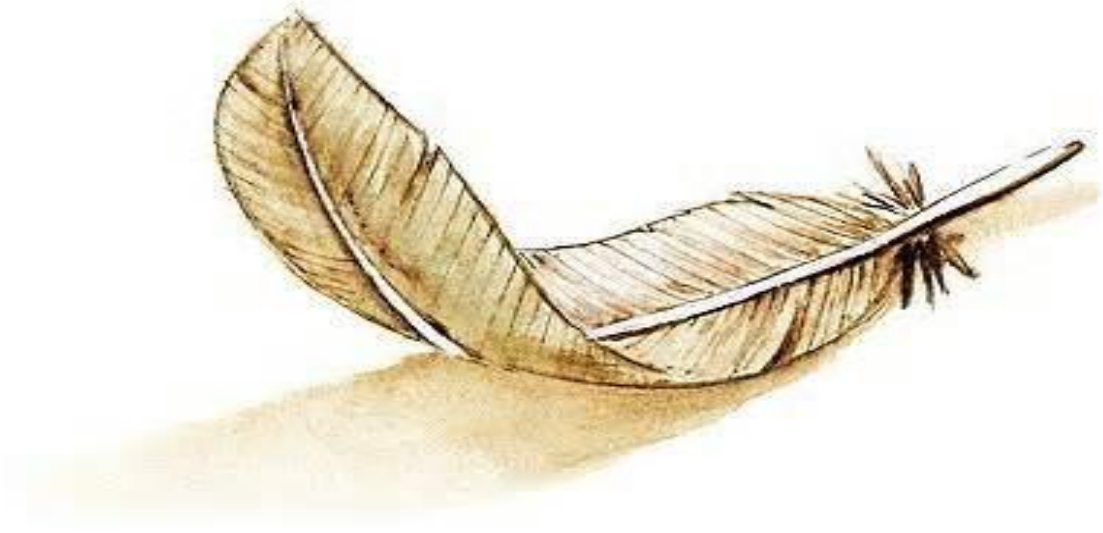
Dans l'organisme, une fraction de l'ordre de 10% de ce pesticide est éliminée sous forme inchangée. L'acétamipride est converti en méthylamine, plus active que la molécule mère. Il n'y a pas d'accumulation d'acétamipride dans l'organisme; plus de 90 % d'une dose orale sont éliminés en moins de 72 heures, la totalité en 96 heures. Les voies urinaire (figure6) et fécale sont les principales voies d'élimination pour l'acétamipride(Seifert, 2005 ; Sheets, 2010 ; Chen *et al.*, 2014).

I. 4. Toxicité de l'acétamipride

La toxicité aiguë d'acétamipride pour les mammifères est variable selon les espèces dont la DL50 varie de 125 à 475 mg/kg. Les animaux intoxiqués présentent au bout de 2 à 6 heures une apathie, des tremblements avec ataxie, une hypothermie et un arrêt respiratoire(Seifert, 2005 ; Sheets, 2010 ; Terayama *et al.*, 2016). Selon Kimura-Kuroda *et al.* (2012). l'acétamipride conduit à des anomalies morphologiques du développement cérébral et des troubles du comportement chez les mammifères. Il se produit une stimulation du système nerveux central se traduisant cliniquement par des convulsions tonico-cloniques violentes. Surviennent également des nausées, vomissements, une diarrhée, une paresthésie de

la langue et de la face. (Terayama et al., 2016). Jeschke et al.(2011) à identifié un effet potentiel nocif sur le développement des neurones et des structures cérébrales chez un fœtus ou un jeune enfant. Les défaillances cardiaque et respiratoire entraînent la mort en quelques heures. L'inhalation des poussières d'acétamipride fait apparaître une irritation de bouche et des poumons avec hypersécrétion bronchique (Woodcock et al., 2016). L'agence canadienne pour la régulation de la lutte antiparasitaire (ACRLA) considère que l'acétamipride est un perturbateur endocrinien potentiel et suspecte des effets sur la reproduction chez les mammifères et les oiseaux ont touchant principalement la thyroïde(Jeschke et al., 2011 ; Chen et al., 2014 ; Terayama et al., 2016).Les études de cancérogènes animale sont plus ou moins négatives pour l'acétamipride, il est classé non cancérogène pour l'homme par Environmental Protection Américaine Agency (McKelvey et al., 1988 ; Parks et al., 1988 ; Obata et al., 2001). Par ailleurs d'autres études montrent les effets sublétaux de ce pesticide sur la sensibilité au sucre, sur la motricité et sur la mémoire des abeilles qui ont été contaminées soit par application topique sur le thorax soit par administration orale. À la suite d'une consommation orale d'acétamipride à 1µg/abeille, la sensibilité des abeilles au sucre augmente. L'acétamipride à la dose de 0,1µg/abeille, induit une baisse de la mémoire à long terme. Ces effets ne sont pas observés après application topique d'acétamipride. Par ailleurs, à la dose de 0,1 et 0,5µg/abeille, l'acétamipride augmente l'activité locomotrice et la sensibilité à l'eau (Nauen et al., 2001; Guez et al., 2003).

CHAPITRE II
MATERIEL ET
METHODES



II. 1. Matériel et méthode

Tous les tests biologiques de notre étude ont été réalisés au Laboratoire de Toxicologie Appliquée du département de Biologie, Université Larbi Tébessi – Tébessa.

II. 1.1. Matériel

II. 1.1.1. Matériel biologique

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

Le matériel biologique utilisé dans ce travail est un gastéropode pulmoné: *Helix aspersa*, plus connu sous le nom de Petit-Gris, est une sous-espèce d'escargot (Gastropoda) de la famille des Helicidae du genre *Helix* et de l'espèce *Helix aspersa*. L'escargot « petit-gris », *Helix aspersa*, semble plutôt adapté à un climat de type océanique ou de type méditerranéen. 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 (Jean, 1990).



Figure 07: Escargot *Helix aspersa* (Daguzan, 1981)

II. 1.1.1.1. Systématique

Les escargots sont des mollusques. Ils appartiennent à la classe des gastéropodes. Les escargots proprement dits (gastéropodes terrestres ayant des poumons et une coquille spiralée) forment le groupe des Stylommatophores (Barker, 2001).

Tableau07 : Classification d' *Helix aspersa* (Barker, 2001)

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

II. 1.1.1.2. Anatomie générale de l'escargot

II. 1.1.1.2.1. Anatomie externe

Le diamètre de cette escargot est varié de 30 à 40 mm pour un poids vif adulte se situant entre 6 et 15g. La coquille est moins globuleuse et de couleur brune avec des dessins foncés dont la forme varie avec l'origine (Jean, 1990). Deux grandes parties sont distinguées : le pied et les viscères (Chevallier, 1992). Le pied a une couleur grise tirant sur le vert (Jean, 1990). Et il comporte la sole pédieuse, musculuse, la partie antérieure du tube digestif et le système nerveux, 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 (Chevallier, 1992).

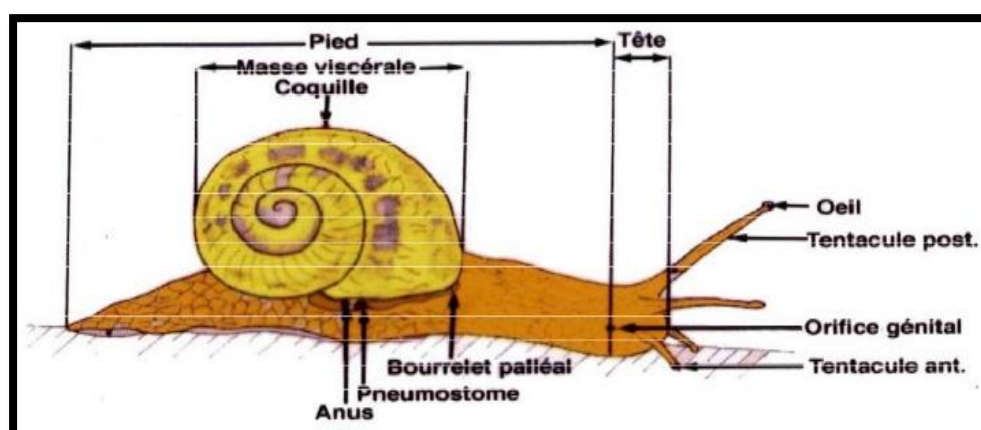


Figure08 :Morphologie externe de l'escargot (Kerney et al., 2006)

II. 1.1.1.2.2. Anatomie interne

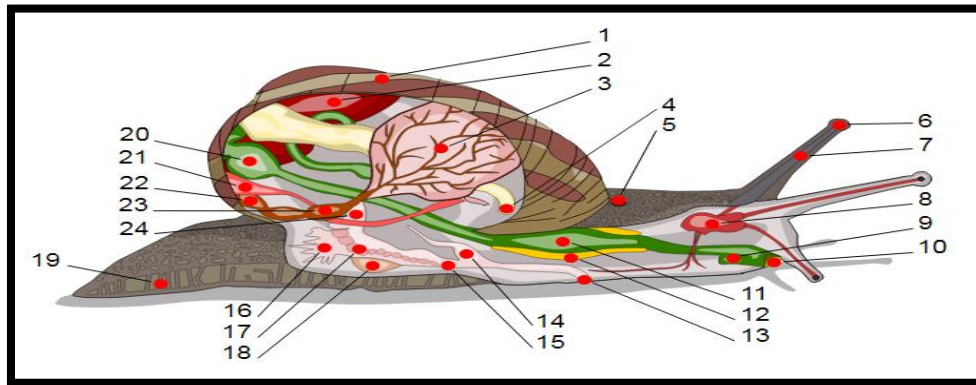


Figure09 : Schéma en coupe de l'anatomie d'un escargot (Daguzan, 1981)

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

II.1.1.1.2.3. Distribution géographique

L'escargot Petit-Grisplus répandu en Europe. En particulier dans les régions méditerranéennes et océaniques (Chevallier, 1992). Cet escargot habite toute la France et abonde partout dans les bois, les vignes et les jardins (Bailey, 1981). Mais sa présence est plus importante dans les régions littorales. On le rencontre également en Grande-Bretagne, en Espagne et dans tout le bassin méditerranéen (Jean, 1990).

II.1.1.1.2.4. Estivation et hibernation

Helix aspersa aspersa, escargot terrestre, n'est actif que lorsque l'humidité est suffisamment élevée. Dans le cas contraire, l'animal se rétracte à l'intérieur de sa coquille qu'il obture par un voile muqueux (courte inactivité) ou par un épiphragme, ce qui lui évite la déshydratation. La photopériode et la température sont des variables saisonnières qui induisent les états d'inactivité. Hibernation et estivation sont donc des réponses à des stress environnementaux prévisibles. La photopériode est le principal facteur qui déclenche l'activité ou l'inactivité des escargots, selon qu'ils sont soumis à des régimes lumineux mimant des jours longs (plus de 15 h de lumière) ou courts. La connaissance de ce phénomène

est primordiale pour une exploitation rationnelle de l'animal, permettant ainsi, en jouant sur les durées d'éclairement journalier, de stimuler la croissance et la reproduction ou, au contraire, l'entrée en hibernation (**Daguzan, 1981**). L'épiphragme est une membrane constituée d'une matrice mucoprotéique sécrétée par le bord du manteau, renforcée de carbonate de calcium. Plus particulièrement au niveau d'une tache blanche de quelques millimètres de diamètre. Cette zone appelée « Kalkfleck ». De part sa structure, permet des échanges gazeux avec le milieu extérieur (**Jean, 1990**).



Figure10 : Escargot en hibernation avec son épiphragme (**Jean, 1990**)

II.1.1.1.2.5. La croissance

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). 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 à 4 ans (**Gomot de Vaufleury, 2001**).

II.1.1.1.2.6. Reproduction

La reproduction des escargots a lieu au printemps et en été. Les escargots terrestres sont hermaphrodites protandres (d'abord mâles puis femelles) et s'accouplent une ou plusieurs fois avant la ponte. Lors de l'accouplement, il se peut qu'un seul des deux escargots reçoive un spermatophore du fait que les spermatozoïdes ne soient pas encore arrivés à maturation chez l'autre escargot. En effet, ils ne sont pas tous matures au même moment du fait de l'asynchronisme du développement du tractus génital pendant la croissance (Gomot, 1997). L'accouplement peut durer plus de 12h. La fécondation a lieu au niveau de la chambre de fertilisation, à la surface de la glande à albumen, généralement une quinzaine de jours après l'accouplement. Les ovocytes fécondés sont alors entourés d'albumen sécrété par la glande à albumen, qui constitue les réserves nutritives pour le développement embryonnaire, puis d'une coque calcaire. Pour pondre, l'escargot creuse avec sa tête une cavité d'une profondeur de 2-3 cm dans le sol, et y dépose une ponte constituée d'une centaine d'œufs en moyenne (Kerney et al., 2006).

II.2. Matériel chimique

II.2.1. L'acétamipride

L'acétamipride a été utilisé sous forme de préparation commerciale. Nous avons choisi deux doses (5 et 10 mg/L) inférieures à des concentrations appliquées en culture. En effet, l'insecticide est appliqué à des concentrations de 1000ml/10 m². Ainsi, les concentrations choisies se rapportent à des concentrations plus faibles que celles rencontrées par les escargots en culture.

II.3. Méthode

Les escargots utilisés sont les adultes d'*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 deux semaines. Cependant, ils sont nourris exclusivement de feuilles de laitue fraîche (Figure 11). Les 45 individus choisis ont une masse moyenne de $11,49 \pm 3,38$ g. En premier lieu, ils sont divisés en 3 lots : un premier lot témoin de 15 escargots et deux autres lots de 15 escargots chacun. Le deuxième et le troisième lot d'escargots sont destinés aux traitements au l'acétamipride.

II.3.2. Conditions d'élevage

Les escargots utilisés dans notre expérimentation sont des adultes. Les escargots sont élevés dans des conditions d'environnement suivantes: photopériode de 9h de lumière/24h, température 20°C et 80-90% d'humidité. Ils sont répartis dans des cristallisoirs transparents, recouvertes avec des tulles maintenues par des élastiques (pour l'oxygénation), et chaque cristallisoir contient une éponge humide pour maintenir d'humidité, l'alimentation (feuilles de laitue fraîche) est fournie dans les cristallisoirs. Les cristallisoirs sont nettoyées régulièrement tous les trois jours (Gomot, 1997; Coeurdassieret *al.*, 2001).



Figure11 : Elevage d' *Helix aspersa* dans laboratoire

II.3.3. Mode de traitement

Nous avons retenu deux doses d'acétamipride dans l'alimentation et un milieu témoin. Les escargots sont répartis en 3 lots de 15 escargots pour chaque traitement. Les périodes du traitement sont : 3, 7, 15 jours (figure 12). L'acétamipride est ajoutée à la nourriture par pulvérisation après leur mélange avec l'eau distillée. Dans tous les cas, la nourriture apportée est renouvelée, qu'elle soit contaminée ou non, tous les trois jours au moment du nettoyage des cristallisoirs. 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 des cristallisoirs ou un ramassage des fèces des escargots déposés sur l'alimentation. Ensuite, l'ensemble des cristallisoirs est humidifié à l'eau distillée (Coeurdassier, 2001)

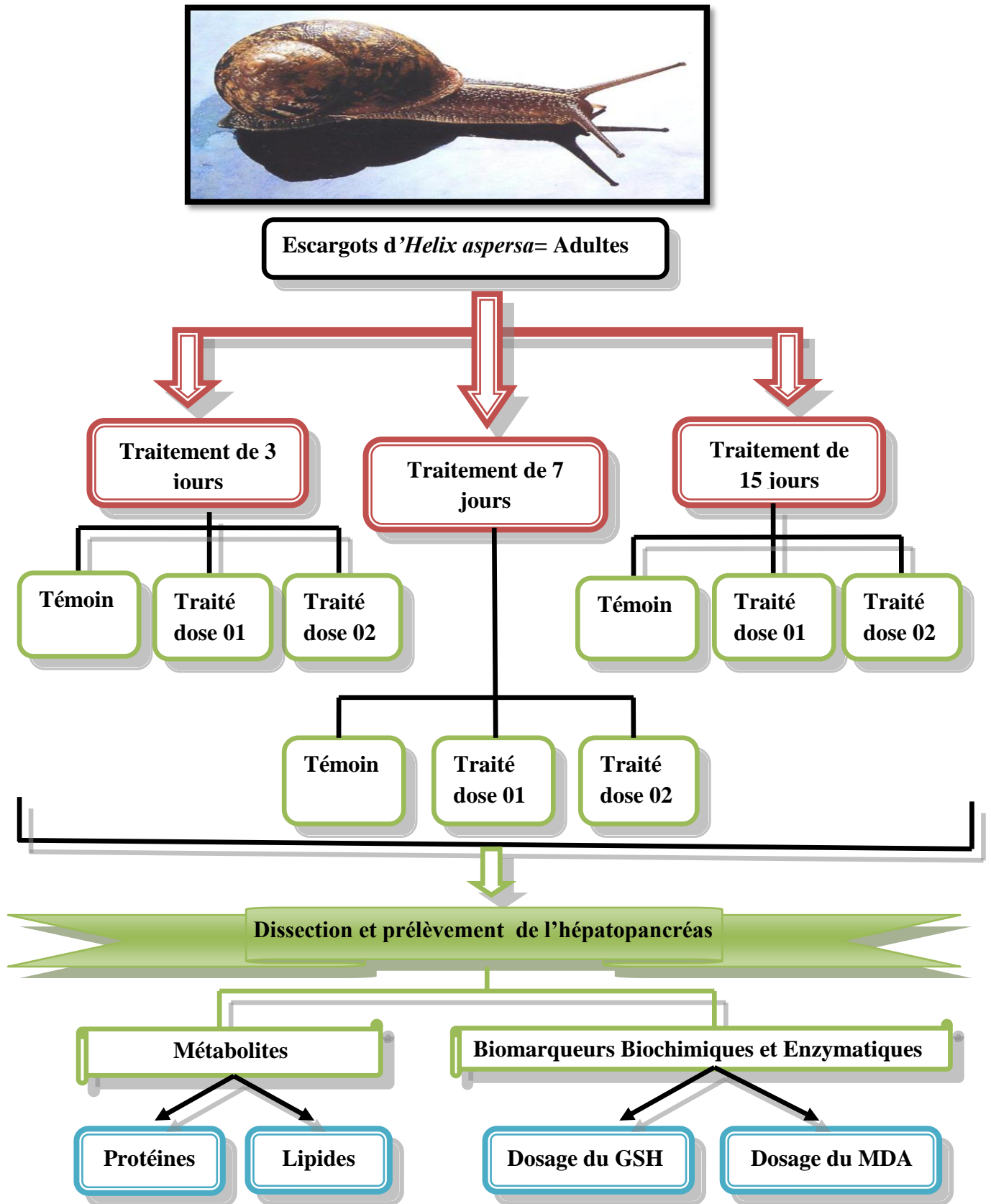


Figure12: Schéma représentatif du protocole expérimental

II.3.4. Préparation et dissection des escargots

Après chaque période de traitement, les escargots sont mis à jeun pendant 48 heures 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 cristallisoirs où ils jeûnent sont lavés à l'eau artificielle, pour éviter la ré-ingestion des fèces. Les escargots sont ensuite sacrifiés par congélation à -20°C puis disséqués. L'hépatopancréas est enlevé (Coeurdassier, 2001).

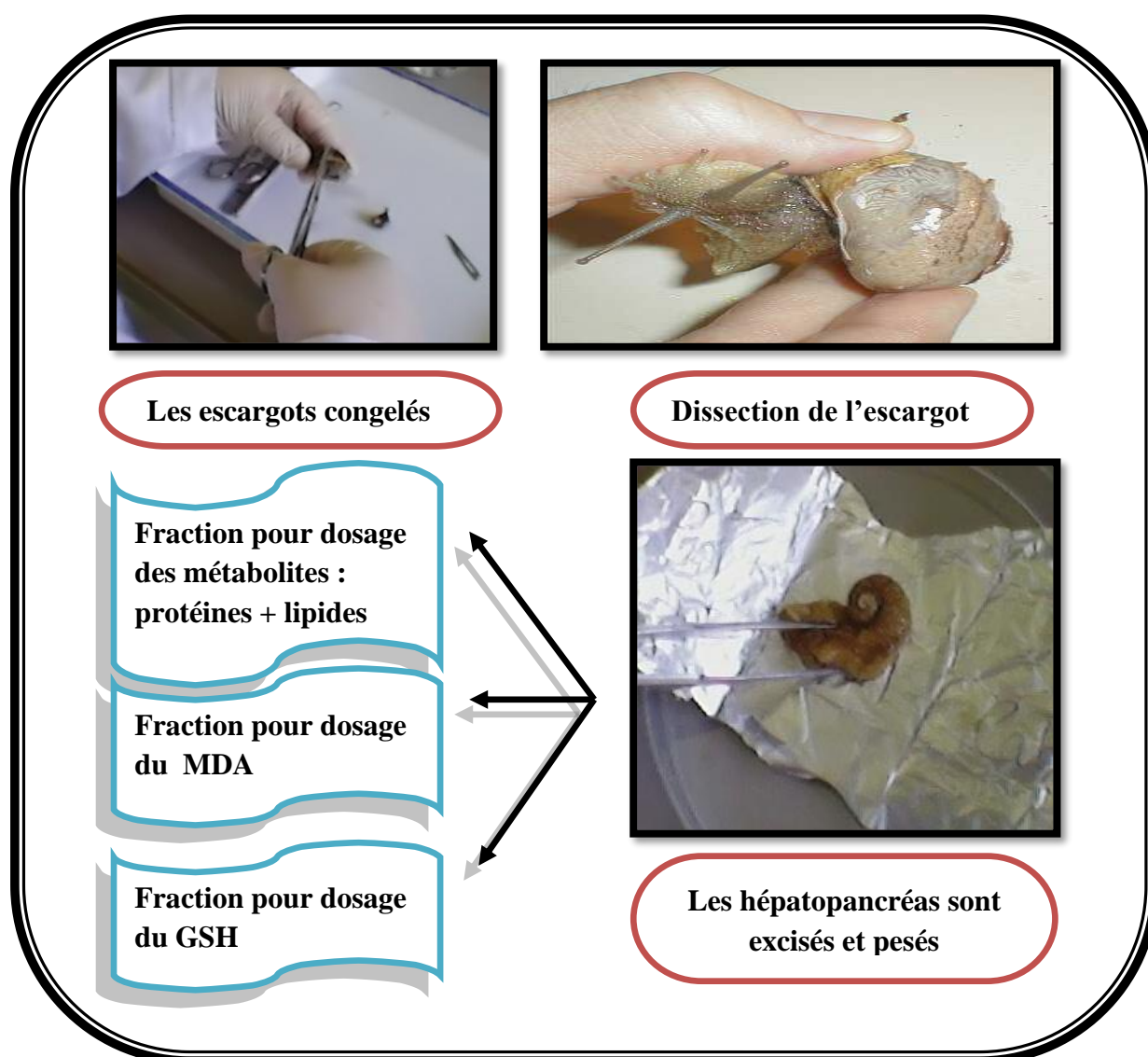


Figure13 : Dissection des escargots et prélèvement des hépatopancréas.

II.4. Techniques biométriques

II.4.1. Rapport hépatosomatique

Le rapport hépatosomatique (RHS) est exprimé selon **Bougis (1952)** par la formule suivante :

$$\text{RHS (\%)} = \text{PH/PT} \times 100$$

- **PH** : Poids de l'hétopancréas (mg),
- **PT** : Poids total du corps (mg).

II.5. Dosage des biomarqueurs biochimiques

Les paramètres biochimiques mesurés dans cette étude sont les teneurs en métabolites (protéines totales et lipides totaux).

II.5.1. Extraction et dosage des métabolites

Après la dissection, l'extraction des différents métabolites (protéines totales et lipides totaux) a été réalisée selon le procédé de **Schibko et al. (1966)**, sur un fragment (100 mg) de l'hétopancréas prélevé et conservé dans 1ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 % et broyés (les principaux étapes sont résumés dans l'annexe 1A). Après une première centrifugation (5000 tours/mn à 4°C, 10 mn), on obtient le surnageant I et culot I. Au culot I, on ajoute 1ml du mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 tours/mn, 10mn), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides totaux selon **Goldsworthy et al. (1972)** et le culot II pour le dosage des protéines selon **Bradford (1976)**. Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes de 100 µl et les taux des différents métabolites de l'hétopancréas ont été quantifiés grâce aux équations des droites de régression déterminées à partir des courbes de références.

II.5.1.1. Dosage des protéines totales

La teneur en protéines totales a été quantifiée selon la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise le bleu brillant de Coomassie (BBC) comme réactif (50mg de BBC + 25ml d'éthanol, agitation pendant deux heures + 50ml d'acide orthophosphorique et compléter à 500ml avec de l'eau distillée) et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard (annexe 1A). Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorant en bleu. La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm.

II.5.1.2. Dosage des lipides totaux

Le dosage des lipides est effectué selon la méthode de **Goldsworthy et al. (1972)**, utilisant la sulphosphovanillinique comme réactif (0,38 g de vanilline, 55ml d'eau distillée et 195ml d'acide orthophosphorique à 85%) et une solution mère de lipides comme standard (annexe 1B), qui est préparée en utilisant l'huile de table selon la procédure suivante: 2,5 mg d'huile de table + 1 ml de solvant éther/chloroforme (1V/1V). Après évaporation des prises aliquotes de 100µl de surnageant II dans un bain de sables à 40°C, on additionne 1ml d'acide sulfurique concentré (96%), les tubes fermés sont agités et chauffés dans un bain de sable à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, on prélève 200µl de chaque tube auxquels on ajoute 2,5 ml de réactif sulfophosphovanillinique et on agite. Après 30 minutes à l'obscurité. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et l'acide orthophosphorique avec couleur rose. La densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm.

II.5.2. Dosages des indicateurs du stress oxydant

Les hépatopancreas des adultes de l'escargot *Helix aspersa* des séries témoins et traitées par l'acétamipride durant les périodes de traitement (3, 7, 15 jours) à servir au dosage du glutathion (GSH) et de MDA.

II.5.2.1. Dosage du glutathion (GSH)

Le taux du GSH est quantifié selon la méthode de **Weckberker et Cory (1988)**, dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) 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. Le taux de GSH est estimé selon la formule suivante :

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

- **[GSH]** : micromoles de substrat hydrolysé par mg de protéines.
- **Δ DO** : 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 + 0,8ml 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

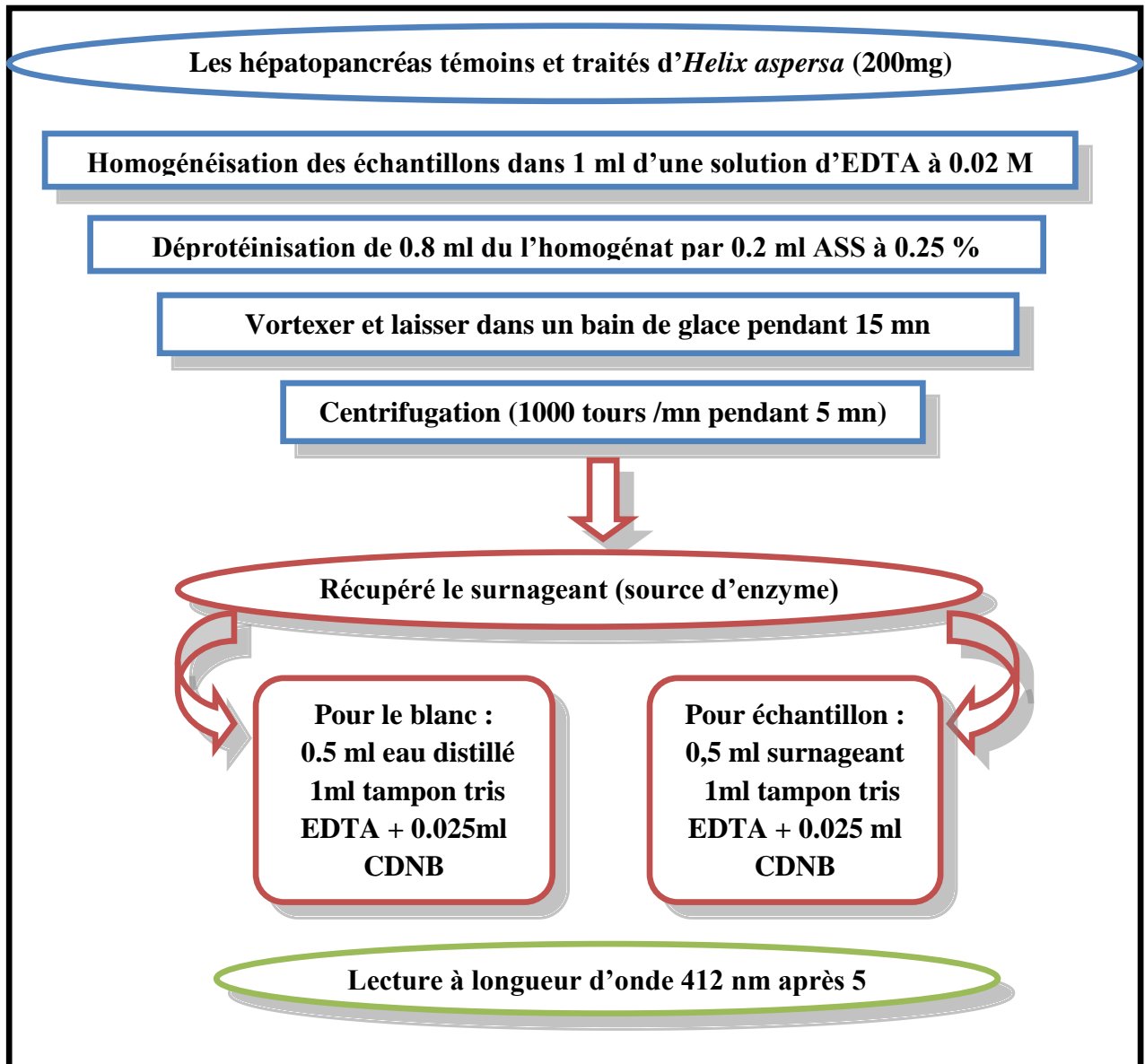


Figure 14:Schéma représentatif du protocole du dosage de GSH(Weckberker etCory,1988)

II.4.2.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'aide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 doubles liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipoperoxydation *in vitro*. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'**Esterbauer et al. (1992)**. Dont le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm. La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert.

$$(\text{nmol /mg protéine}) = \text{DO} \cdot 10^6 / \epsilon \cdot L \cdot X \cdot F_d$$

- **C**: Concentration en nmoles /mg de protéine;
- **DO** : Densité optique lue à 530 nm ;
- **E** : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
- **L** : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;
- **X** : Concentration de l'extrait en protéines (mg /ml) ;
- **Fd** : Facteur de dilution : $F_d = 0.2083$.

Les hépatopancréas témoins et traités de *Helix aspersa* (200 mg) sont prélevés et broyés à l'aide d'un microciseau et l'ultrason dans un 1 ml de tampon tris-HCL (50 mM, Ph 7,5) [1,5137 g tris + 0,0730 g EDTA + 42,78 g sucrose + 250 ml d'eau distillé]. Une fois l'homogénéisation réalisée, une centrifugation est effectuée pendant 10 mn à 10000 tours/mn et le surnageant récupéré servira au dosage du MDA.

Le dosage est réalisé avec 375 µl du surnageant additionné de 150 µl de la solution tampon TBS (tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) [Dissoudre 8.775 g NaCl dans 1 L d'eau distillée, puis poser 6.057 g Tris et compléter le volume à 1 l par solution NaCl (150 mM) et ajuster le pH à 7.4 en ajoutant HCL ou NaOH]. Et ajouter 375 µl de solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) [Dissoudre 20 g TCA dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution TCA 20% et agiter à chaud]. Vortexer et Centrifuger à 1000 tours /min. Prélever 400 µl du surnageant, ajouter 80 µl du HCL 0.6 M [51.56

ml d'HCL pur et compléter le volume à 1L par l'eau distillée]. Et ajouter 320 µl de solution Tris-TBA (Tris 26 Mm). [Dissoudre 3.149g Tris dans 1L d'eau distillée, puis poser 17.299g TBA et compléter le volume à 1l par la solution Tris (26mM). Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes. La densité optique a été enregistrée à $\lambda=530$ nm

II.5.3. 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 $\alpha \leq 0.05$ (TESTT). 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

RESULTATS



III. Résultats

III.1. Effets d'acétamipride sur le Rapport Hépatosomatique

La figure 15 montre une augmentation nonsignificative ($p>0,05$) du rapport hépatosomatique après 3,7 et 15 jours de traitement pour les deux doses d'acétamipride par rapport aux témoins.

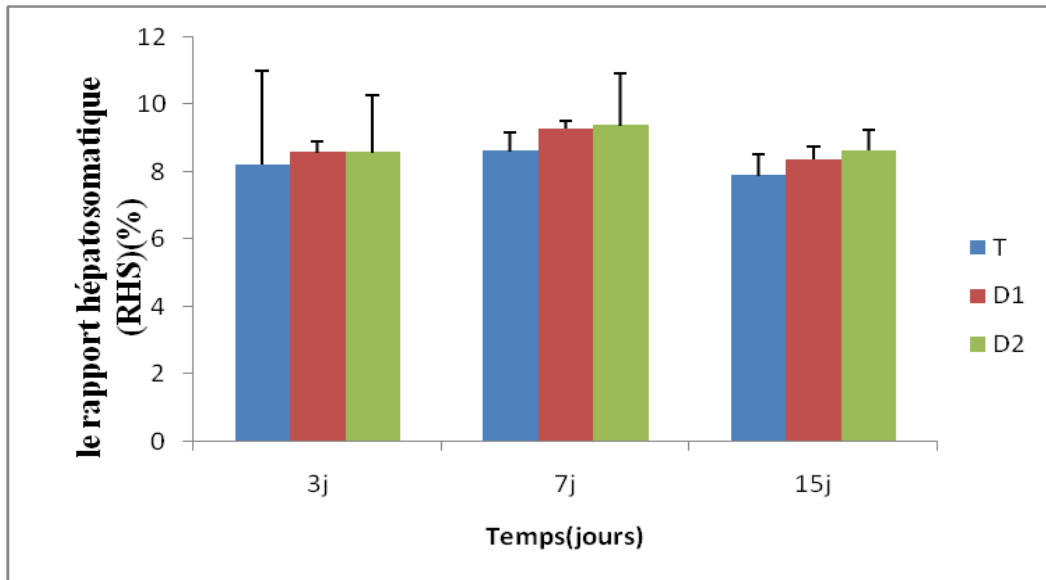


Figure15 : Effets d'acétamipride sur le rapport hépatosomatique(%) chez *Helix aspersa*($m\pm s, n=5$)

III.2. Effets d'acétamipride sur la composition biochimique de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*

III.2.1. Effets sur le taux des métabolites

III.2.1.1. Effets sur le taux des protéines totales

Les effets d'acétamipride sur le contenu en protéines totales chez *Helix aspersa* durant le traitement (3 j, 7 j et 15 j) sont présentés par la figure 16. La comparaison des moyennes des teneurs en protéines entre le lot témoin et le lot traité révèle l'existence d'une différence significative ($P \leq 0,05$) à la dose 1 après 3 jours de traitement, et une différence hautement significative ($P \leq 0,01$) à la dose 2 après 7 et 15 jours de traitement.

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

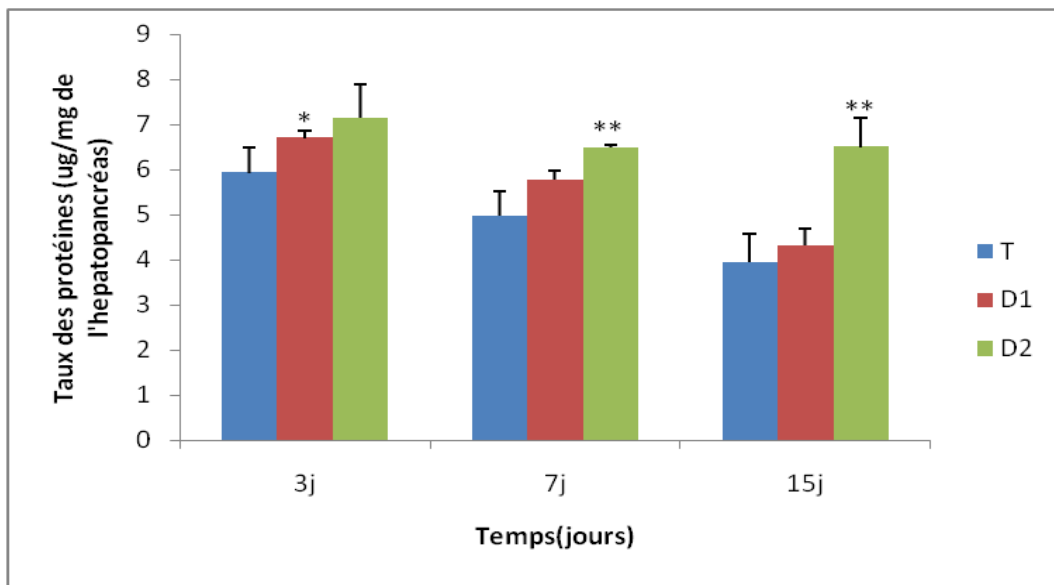


Figure 16: Effet d'acétamipride sur le taux des protéines totales chez *Helix aspersa* en fonction du temps ($m \pm s$, $n = 5$) (* Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$), ** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$))

III.1.1.2. Effets sur le taux des lipides

Les résultats portés par la figure17 révèlent que le traitement des escargots par l'acétamipride induit une diminution des lipides hépatopancréatiques. Chez les escargots traitées à la faible dose (dose 1), la diminution est hautement significative ($P \leq 0,01$) après 3 et 7 jours et très hautement significative ($P \leq 0,001$) après 15 jours de traitement, alors qu'à la forte dose cette diminution devient très hautement significative ($P \leq 0,001$) pour les trois périodes de traitement par rapport aux témoins.

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

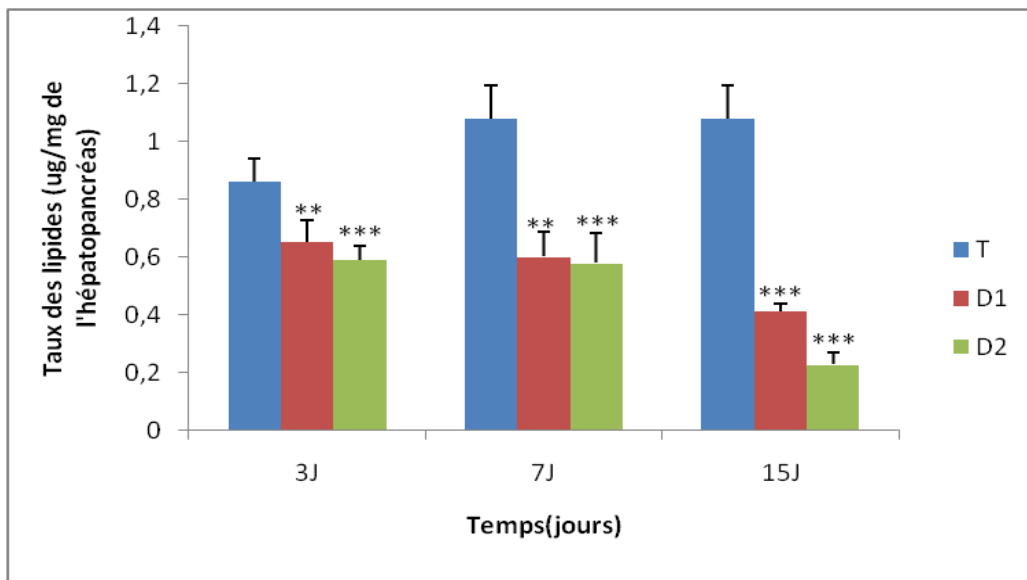


Figure17 :Effet d'acétamipride sur le taux des lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de l'hépatopancréas) chez *Helix aspersa* en fonction du temps ($m \pm s$, $n = 5$) (** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$), *** Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$), P : Seuil de signification)

III.3. Effets sur le taux des biomarqueurs du stress oxydant

III.3.1. Effet d'acétamipride sur le taux de glutathion (GSH)

La figure 18 met en évidence les variations du taux du glutathion chez *Helix aspersa* traités par deux doses d'acétamipride. Après 3 jours de traitement, nous constatons une diminution de façon très hautement significative ($P \leq 0,01$) du taux de GSH pour les deux doses. Après 7 jours de traitement, nous remarquons une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) pour les deux doses. Après 15 jours de traitement la diminution du taux de GSH devient très hautement significative aux deux doses ($P \leq 0,001$) 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 temps-dose ($P \leq 0,001$).

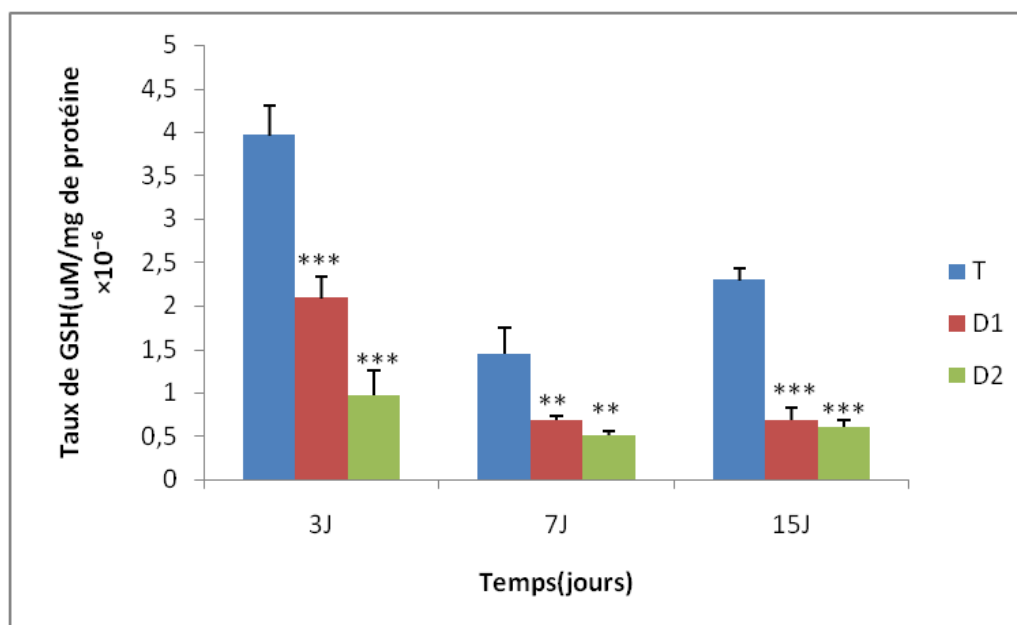


Figure 18: Effet d'acétamipride sur le taux de GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine de l'hépatopancréas) chez *Helix aspersa* en fonction du temps ($m \pm s$, $n = 5$) (** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$), *** Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$), P : Seuil de signification).

III.3.2. Effet d'acétamipride sur le taux du malondialdéhyde (MDA)

La figure19 met en évidence l'évolution du niveau de production de MDA en présence d'acétamipride chez *Helix aspersa*. Le résultat montre une augmentation hautement significative ($P \leq 0,01$) et très hautement significative ($P \leq 0,001$) du taux du MDA après 3 jours de traitement respectivement à la dose de 5 mg/l et à la dose de 10 mg/l. Après 7 jours du traitement l'MDA augmente de façon très hautement significative ($P \leq 0,001$) pour les deux doses. Après 15 jours l'augmentation est hautement significative ($P \leq 0,01$) et très hautement significative respectivement à la dose de 5 mg/l et à la dose de 10 mg/l d'acétamipride 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 ($P \leq 0,001$).

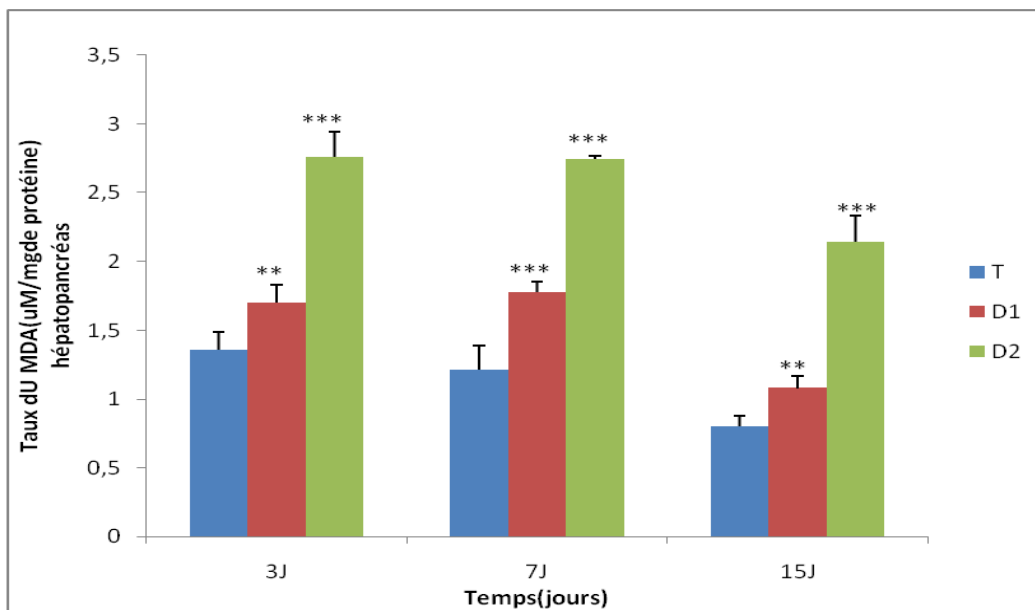


Figure19 :Effet d'acétamipride sur le MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine de l'hépatopancreas) chez *Helix aspersa* en fonction du temps ($m \pm s$, $n = 6$) (** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$)),*** Différence très hautement significative comparant aux témoins ($P \leq 0,001$), P : Seuil de signification)

CHAPITRE *IV DISCUSSION*



IV. Discussion

Le stress oxydatif est l'un des principaux mécanismes de toxicité associés à une panoplie de xénobiotiques dans l'environnement, parmi lesquels, on retrouve les pesticides et les produits phytosanitaires (Lauvverys et al., 2007 ; Lukaszewicz., 2008 ; Michael et al., 2016). Des quantités importantes de pesticides sont rejetées dans l'environnement, induisant

ainsi une contamination chronique d'un nombre croissant d'écosystèmes (Sarkar et al., 2006). Cette contamination altère les organismes vivants à tous les niveaux d'organisation. La conservation de la biodiversité dans l'environnement doit être un objectif primordial pour la production des activités (Caoduro et al., 2014). De ce fait, l'utilisation d'organismes bioindicateurs pour la biosurveillance écotoxicologique s'impose grâce à des biomarqueurs qui rendent compte des niveaux de pollution auxquels sont soumis ces organismes. L'exposition aux pesticides peut produire des perturbations biochimiques, histologiques ou morphologiques, se traduisant par des altérations spécifiques d'un organe, d'un processus biochimique ou biologique. 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 (Maran et al., 2010).

Dans cette présente étude, nous nous sommes intéressés, à la mise en évidence d'un éventuel effet d'acétamipride sur les paramètres biochimiques et enzymatiques chez *Helix aspersa*.

IV.1. Effets d'acétamipride sur le rapport hépatosomatique d'*Helix aspersa*

L'indice hépatosomatique (RHS) est basé sur le rapport du poids du foie et du poids de l'individu, et il permet d'évaluer l'activité métabolique du foie. L'RHS est souvent utilisé pour évaluer l'état de santé des organismes. Les modifications du rapport hépatosomatique (RHS) au cours du temps, permettent de suivre les cycles hépatiques et précisent le rôle du foie au cours de la croissance (Virginie MAES, 2014). Nos résultats montrent une augmentation non significative du rapport hépatosomatique des escargots *Helix aspersa* après 3, 7 et 15 jours de traitement pour les deux doses d'acétamipride. Notre résultat est similaire aux résultats chez des truites (*Oncorhynchus mykiss*) exposées aux pesticides (endosulfan et disulfoton) (Arnold et al., 1995), et chez des poissons marins (*Synechogobius hasta*) exposés au cuivre (Liu et al., 2010). Le même résultat a été prouvé par Yang et Baumann (2006)

chez le poisson ; la barbotte brune (*Ameiurus nebulosus*), contaminés par d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). **Chouahda et al. (2009)** ont signalé une augmentation du rapport hépatosomatique chez des poissons femelles adulte de *Gambusia affinis* après l'administration de (5µg/L et 2,5µg/L) de cadmium.

IV. 2. Effets d'acétamipride sur la composition biochimique de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*

Les activités enzymatiques et les réserves d'énergie ont été explorées comme des marqueurs biochimiques potentiels pour une variété d'organismes différents parce que ces paramètres sont très sensibles, moins variables et conservés entre les espèces et souvent plus faciles à mesurer (**Forbes et al., 1997; McLoughlin et al., 2000 ; Agrahari et al., 2007**).

IV.2.1. Effets sur le taux des métabolites

IV.2.1.1. Effets sur le taux des protéines

L'augmentation significative du taux des protéines d'une manière dose dépendante à l'acétamipride peuvent s'expliquer par la synthèse des enzymes et peptides de défense contre le déséquilibre homéostatique du stress oxydatif ; par l'induction de la synthèse des protéines de stress en rapport avec le phénomène de bioactivation /biotransformation d'une part et d'autre part par la peroxydation lipidique générée par les radicaux libres (**Anadn et al., 1991 ; Benbouzib, 2012 ; Rouabhi et al., 2015**). De plus, pendant le stress, les animaux synthétisent les protéines de stress. Ainsi, l'augmentation observée du niveau de protéines pourrait être expliqué par une augmentation de la synthèse protéique des escargots en réponse à un tel stimulus (**Radwan et Mohamed, 2013**). Nos résultats sont en bon accord avec ceux rapportés par **Radwan et Mohamed (2013)** qui ont trouvé une augmentation significative de la protéine totale chez *Helix aspersa* après une exposition à 0,2 DL50 d'imidaclopride pendant 1, 3 et 7 jours. De plus notre résultat sont conformes aux travaux réalisés sur des rats mâles de la souche *Wistar* traités par un insecticide néonicotinoïde l'acétamipride (**Chakrounet al., 2016**). D'autres études ont aussi montré une augmentation significative des protéines totales après une exposition à un sol pollué par l'imidaclopride chez les vers de terre pendant une semaine. Une augmentation de la teneur totale en protéines a été détecté également chez des juvéniles de *P. scaber*, après deux semaines de se nourrissant de 5 mg d'imidaclopride / g de nourriture sèche (**Drobne et al., 2008**). Le même effet a été montré par les travaux de (**Bourbia, 2013**) après l'application d'insecticides commerciaux à base de thiaméthoxame

avec des doses de 0, 25, 50, 100 et 200 mg/L sur *Helix aspersa* après six semaines de traitement.

IV.2.1.2. Effets sur le taux des lipides

La diminution dose-dépendante du taux des lipides après exposition de *Helix aspersa* à l'acétamipride peut être due au stress chimique causé par le composé testé. En effet, des résultats rapportés que l'effet nocif des composés chimiques pourrait être attribué à l'augmentation de la formation de malondialdéhyde (MDA) ; le résultat de l'activation de la peroxydation lipidique (dégradation des acides gras polyinsaturés) par les radicaux libres (Dixit et al., 2001 ; Alpha Jalloh et al., 2009). Ou peut être due à une synthèse réduite de lipides ou à une activité de la lipase impliquée dans l'oxydation des lipides. Selon Kemajl Bislimi et al., 2015) la diminution de taux de lipides dans les escargots traités est la conséquence des radicaux libres oxygénés qui sont à l'origine d'une dégradation des lipides à travers la β -oxydation. Nos résultats en concordance avec les résultats obtenus chez *Helix aspersa* exposés à des doses sublétales d'imidaclopride après 1, 3 et 7 jours de traitement (Radwan et Mohamed, 2013). Le même effet a été montré par les travaux de (Bourbia, 2013) après l'application d'insecticides commerciaux à base de thiaméthoxame avec des doses de 0, 25, 50, 100 et 200 mg/L sur *Helix aspersa* après six semaines de traitement, et de Kemajl Bislimi et al., 2015, qui ont trouvé une diminution du taux de lipides dans les escargots après l'étude de l'effet de la pollution industrielle sur certains paramètres biochimiques chez l'escargot de jardin *Helix Pomatia L.*

IV.3. Effets sur le taux des biomarqueurs du stress oxydant

IV.3.1. Effet d'acétamipride sur le taux de glutathion (GSH)

L'une des réactions majeure de la détoxification assurant la protection de l'organisme vivant dans un milieu pollué est la conjugaison avec le groupement thiol (-SH) du glutathion. Le GSH est un tripeptide bien connu pour être un élément de la première ligne de défense contre le stress oxydant et considéré dès lors un composé essentiel qui maintient l'intégrité cellulaire grâce à sa propriété réductrice et sa participation active dans le métabolisme cellulaire dont il assure la protection des membranes cellulaires contre les dommages provoqués par les radicaux libres (Sies et Akerboom, 1984 ; Martinez-Alvarez et al., 2005 ; Lam, 2009 ; Sauer, 2014 ; Aoun et Tiranti, 2016). Certains des rôles importants de glutathion sont la réduction ou l'inactivation des ERO par la formation de glutathion disulfure (GSSG) et la

conjugaison du glutathion réduit (GSH) pour l'élimination des xénobiotiques (**Di-Monte et Lavasani, 2002 ; Arora et al., 2016 ; Rjeibi, 2016**). Une réduction significative des teneurs en GSH est enregistrée dans notre étude chez *Helix aspersa* après exposition à l'acétamipride. De plus, le GSH est un antioxydant dont leur diminution devrait contribuer à la protection de l'animal de l'effet du composé testé. En effet, la fixation possible de cet insecticide aux groupements thiols du GSH permettrait, éventuellement, de prévenir des dommages cellulaires. Dans cette étude, l'augmentation observée de la peroxydation lipidique et une diminution concomitante du niveau de GSH, ce qui suggère que l'augmentation de la peroxydation peut être une conséquence de l'épuisement de GSH, ou peut être interprété par une inhibition indirecte de GSH par leur liaison avec les molécules oxydatives produites au cours du métabolisme des pesticides après exposition d'une part et d'autre part, par leur utilisation par la GST dans les réactions de conjugaisons avec les insecticides testés (**Birsen Aydin, 2011**). En accord avec nos résultats, la diminution du taux de GSH a été également observée dans l'hépatopancréas de deux adultes d'*Helix aspersa* et d'*Helix aspersa* et leur juvéniles traités par l'insecticide le thiaméthoxame à des doses de 200 et 400 mg/L après 96 heures d'exposition (**Douafer, 2015**). De plus, la diminution du taux de GSH a été également observée dans l'hépatopancréas d'*H. aspersa* traité par les pesticides : carbofuran et parquat (**Salama et al., 2005**) et chez la même espèce exposée aux métaux lourds (**Abdel-Halim et al., 2013**) ; de même **Nowaskowa et al. (2012)** étudient le système de défense anti-oxydative chez *H. aspersa* exposé à différents métaux (Zn, Fe, Cd, Pb et Mg) et la réduction de GSH est proportionnelle à la quantité de métaux accumulés dans l'hépatopancréas. Egalement, l'évaluation *in vivo* de biomarqueur du stress oxydatif dans la glande digestive de *Theba pisana* exposé à des doses sublétales de pesticide à base de cuivre, montre une baisse significative du taux de GSH (**El-Gendy et al., 2009**). Ainsi notre résultat est similaire aux résultats chez des souris mâles traités par les doses de 14,976 mg / kg) d'imidaclopride (**Kawther et al., 2010**). En outre, **Ramazan Bal et al. (2012)** ont étudié les effets d'imidaclopride sur le taux de GSH dans les organes reproducteurs des rats mâles après l'exposition à 20 mg / kg / jour pendant 60 jours, ils ont découvert des résultats identiques. **Birsen Aydin (2011)** est signalé une diminution significative du taux de GSH, dans les organes lymphoïdes des rats après l'exposition à des doses de 112,5 et 22,5 mg / kg / jour pendant 30 jours de thiaclopride.

IV.3.2. Effet d'acétamipride sur le taux du malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est considéré comme un biomarqueur de stress oxydatif en général, et de peroxydation lipidique en particulier (Grara et al., 2012). Il est un oxydant majeur produit d'acide gras polyinsaturé peroxydé (Zhang et al., 2004). Le MDA est le résultat de l'attaque des lipides polyinsaturés par des ERO dans certaines conditions de stress, en particulier avec des contaminants organiques (HAPs, PCBs, pesticides) et inorganiques (métaux). Dans plusieurs travaux, le MDA a été utilisé comme un biomarqueur de peroxydation lipidique chez l'escargot (Grara et al., 2012). Dans la présente étude, une augmentation du taux de MDA dans l'hépatopancréas. Ceci montre bien que l'acétamipride est capable de promouvoir la génération des ERO, qui se traduit par la peroxydation lipidique dans les tissus hépatiques et suggérant leurs effets délétères dans ces tissus à travers la génération des radicaux libres (Mona K Galal et al., 2014 ; Kapoor et al., 2010 ; Kamal et Hashem, 2012). Dans notre travail, l'augmentation de MDA et une diminution du niveau de GSH ont été observés dans l'hépatopancréas ce qui suggère que l'augmentation de la peroxydation lipidique peut être une conséquence de l'épuisement de GSH (Birsén Aydin, 2011). Nos résultats sont conformes aux travaux réalisés sur des souris mâles traités par une dose létale (14,976 mg / kg) d'imidaclopride (Kawther et al., 2010), et chez des rats *Wistar* après exposition subaiguë à l'acétamipride (Chakroun et al., 2016). En outre, Devan et al. (2015) ont montré que l'acétamipride augmente la peroxydation lipidique dans le foie des rats. Kapoor et al. (2010) ont signalé une augmentation significative du taux de MDA dans le foie et les reins après administration à 20 mg / kg / jour d'imidaclopride pendant 90 jours chez des rats femelles; de même Kapoor et al. (2010) ont étudié les effets de l'imidaclopride sur la peroxydation lipidique chez des rats femelles, ils ont découvert des résultats identiques. En outre, Ince et al. (2013) ont rapporté que l'administration à 15 mg / kg / jour d'imidaclopride pendant 28 jours provoque une augmentation significative du niveau de MDA chez la souris. Et l'administration orale à des doses sublétales (0, 5, 2 et 8 mg / kg) d'imidaclopride pendant 90 jours, entraîne une augmentation de MDA dans l'appareil reproducteur des rats mâles (Ramazan Bal et al., 2012). De plus, Birsén Aydin (2011) a montré que l'exposition des rats à des doses de 12,5 et 22,5 mg / kg / jour pendant 30 jours de thiaclopride (un insecticide néonicotinoïde) provoque une augmentation du niveau de MDA dans tous les organes lymphoïdes.

CONCLUSION



Conclusion

Conclusion

Les pesticides sont des produits chimiques de nature organique ou métallique qui sont actuellement présents sous forme de résidus dans tous les compartiments de

l'environnement. Bien que des solutions alternatives à leur utilisation intensive soient en développement (cultures biologiques, plantes OGM, « vaccination » des plantes grâce à l'application de stimulateurs de défenses naturelles...), elles ne remplaceront probablement pas, ni dans l'immédiat ni totalement, les applications de pesticides. Le problème de la contamination se pose donc encore pour de nombreuses années.

L'utilisation des pesticides en agriculture est néfaste pour les espèces non ciblées. En général, les effets économiques de l'augmentation de la production agricoles ont été très positifs; cependant, leurs risques écotoxicologiques sont à prendre en considération. A cette fin, 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.

Ainsi, le principal objectif de notre travail était d'étudier les effets d'insecticide : l'acétamipride, appliquées par voie orale sur *l'Helix aspersa*. En effet, l'escargot étant un bioindicateur/bioaccumulateur majeur de la pollution environnementale particulièrement par les pesticides. Cette sensibilité se manifeste par une perturbation dans le métabolisme globale à travers la perturbation des paramètres biochimiques (les teneurs en métabolites : protéines totales et lipides totaux) au niveau du l'hépatopancréas, et perturbation des biomarqueurs du stress oxydant (GSH et MDA), qui sont en train de devenir une partie intégrante de l'évaluation de la santé des écosystèmes.

Notre résultat montre que les compositions biochimiques de l'hépatopancréas sont également affectées par l'acétamipride, avec une augmentation significative des protéines, et diminution significative des lipides. D'un autre côté, la contamination par l'acétamipride a activé le stress oxydatif par une augmentation de la peroxydation des lipides (MDA) accompagné par le déclenchement d'un système de détoxification qui se manifeste par la diminution significative de GSH.

Les perspectives de notre travail sont encore nombreuses sur ce sujet :

- Confirmer ces résultats par des études histopathologiques de l'hépatopancréas.
- Approfondir les essais au niveau de l'hémolymphe des escargots
- Etudier la toxicité de ce pesticide sur les œufs des escargots et des juvéniles.
- Il serait intéressant de prolonger la durée d'exposition des animaux afin de savoir si les perturbations fonctionnelles observées pourraient aboutir à l'apparition d'une pathologie moléculaire au niveau des cellules hépatiques et/ou des autres tissus
- Il serait intéressant d'essayer de doser les insecticides ou leurs métabolites, d'abord dans l'hépatopancréas et le cerveau, et d'y déterminer la présence éventuelle de métabolites. Ceci nous permettra également de savoir si l'effet observé est attribuable à l'ensemble des deux composés ou à une substance spécifique.
- Déterminer le mécanisme d'action de la toxicité cellulaire : par exemple déterminer les cibles affectées (ADN, protéines ou voies de signalisation, ...) ou la gravité des effets (réversibilité, adaptabilité cellulaire).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



Références Bibliographiques

A

1. **Abdel-Halim K.Y., Abo El-Saad A.M., Talha M.M., Hussein A.A., Bakry N.M., 2013.** Oxidative stress on land snail *Helix aspersa* as a sentinel organism for ecotoxicological effects of urban pollution with heavy metals. *Jour. Chemos.* 93(6):1131-8.
2. **ACTA, 2005.** Index Phytosanitaire. 41^{ème} éd. Paris. France. p820.
3. **Adam V., Petrlovà J., Potesil D., Lubal P., Zehnàlek J., Sures B., Kizek R., 2005.** New electrochemical biosensor to determine platinum cytostatic to DNA structure. *Chemistry Listy.* 99: 353-393.
4. **Agence Française pour le Développement et la Promotion de l'Agriculture Biologique., 2007.** Etude bibliographique des solutions techniques et agronomiques permettant de réduire l'usage de produits phytosanitaires en grandes cultures. p 04.
5. **Agrahari S., Pandey K.C., Gopal K., 2007.** Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 268-272.
6. **AGRITOX, 2015.** <http://sevron.co.uk/msds/agritox-msds-download-2/>, Visited: 11/2015.
7. **Alain Periquet., Michel Boisset., Francine Casse., Michel Catteau., Jeen- Michel Lecerf., Corole Leguille., Jérôme Laville., Saïda Barnat., 2004.** Pesticides, risques et sécurité alimentaire. France. p 20-21.
8. **Alavanja M. C. R., hoppin J. A., Kamel F., 2004.** Health effects of chronic pesticide and childhood cancer and Neurotoxicity. *Annu Rev Public Health.* 25: 155-197.
9. **Alpha Jalloh M., Chen J., Zhen F., Zhang G., 2009.** Effect of different N fertilizer forms on antioxidant capacity and grain yield of rice growing under Cd stress. *Journal of Hazardous Materials.* 162 : 1081-1085.
10. **Anadn A., Martinez L., Diaz M., Bringas P., Fernandez M., 1991.** Effect of deltamethrin on antipyrine pharmacokinetics and metabolism in rat. *Arch Toxicol.* 65: 156-159 .
11. **Anderson J.C., Dubetz C., Palace V.P., 2015.** Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects, *Science of The Total Environment.* 505: 409-422.
12. **Andra S.S., Austin C., Patel D., Dolios G., Awawda M., Arora M., 2017.** Trends in the application of high resolution mass spectrometry for human biomonitoring: An analytical primer to studying the environmental chemical space of the human exposome. *Environment International.* doi: 10.1016/j.envint. 2016.11.026.

13. **Aoun M., Tiranti V., 2016.** Mitochondria: A crossroads for lipid metabolism defect in neurodegeneration with brain iron accumulation diseases. *Inter Journal Bioch & Cell Bio.* P 1-18.
14. **Arnold H., Pluta H. J., Braunbeck T., 1995.** Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton *in vivo*: ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 33: 17–43.
15. **Arora D., Haris S., Kumar S., Pratap S., Tripathi A., Mandal A., Shankar S., Kumar SH., Shukla H., 2016.** Evaluation and physiological correlation of plasma proteomic fingerprints for Deltamethrin induced hepatotoxicity in Wistar rats. *LFS 14866*: 04-25.
16. **Ascherio A., Chen H., Weisskopf M.G., O'reilly E., Mcculloughm L., Calle E.E., Schwarzschild M.A., Thun M.J., 2006.** Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 60: 197-203.
17. **Aurousseau B., 2004.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux : Conséquence sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim.* 15(1), 67-82.

B

18. **Badary O.A., Abd EI-Gawad H.M., Taha R.A., 2003.** Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats. *Pharmacol Biochem Behavior.* 74: 997-1003.
19. **Bailey S.E.R., 1981.** Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *J. Comp. Physiol.* 142: 89-94.
20. **Baldi I., Lebailly P., 2007.** Cancers and pesticides. *Rev Prat.* 57: 40-44.
21. **Barker G.M., 2004.** Natural enemies of terrestrial mollusks. Wallingford, UK, CABI Publishing. p644.
22. **Barker G.M., 2001.** The Biology of Terrestrial Molluscs. CAB International. Oxon.Wallingford.UK. p567.
23. **Barriuso E., 2004.** Estimation des risques environnementaux des pesticides. Editions INI. p12.
24. **Baudin B., 2006.** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mitoch Cardio.* 2(1): 43-52.
25. **Beghoul A., Kebieche M., Gasmi S., Chouit Z., Amiour C., Lahouel A., Lakroun Z., Rouabhi R., Fetoui H., Soulimani R., 2017.** Impairment of mitochondrial integrity and redox status in brain regions during a lowdose long-term exposition of rats to pyrethrinoids: the preventive effect of quercetin. *Environ Sci Pollut Res* Doi: 10.1007/s11356-017-9675-0.
26. **Belhaouchet N., 2014.** Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution *Helix aspersa*.

- Thèse de Doctorat LMD. Université Badji Mokhtar-Annaba.p17-82.
27. **Benbouzib H., 2012.** Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliés. Thèse de doctorat. Université Annaba. p 87.
 28. **Berger M., 2006.** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition clinique et métabolisme. 20: 48-53.
 29. **Birsen Aydin., 2011.** Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. journal of Pesticide Biochemistry and Physiology.100: 165–171.
 30. **BliefertC., PerraudR., 2001.** Chimie de l'environnement: air, eau, sols, déchets. De Boeck Université.
 31. **Bloomquist J.R., 1996.** Insecticides: chemistries and characteristics. In: E. B. Radcliffe and W. D. Hutchison [eds.], Radcliffe's IPM World Textbook. [consulté le, 10/10/2011]. <http://ipmworld.umn.edu>, University of Minnesota, St. Paul, MN.
 32. **Boland J., Koomen I., Lidth de Jeude J.V., Oudejans J., 2004.** AD29F Les pesticides: composition, utilisation et risques. Ed. Agromisa Foundation, Wageningen. p 86.
 33. **Bonnefont-Rousselot D., Jaudon M.C., Issad B., Cacoub P., Congy F., Jardel C., Delattre J., Jacobs C., 1997.** Antioxidant status of elderly chronic renal patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. Nephrol Dial Transplant. 12: 1399-1405.
 34. **Bonvallot N., 2014.** application de la métabolomique à l'étude du lien entre les expositions environnementales aux pesticides pendant la grossesse et le développement de l'enfant. Thèse de Doctorat. SEVAB. INRA. p256.
 35. **Bourbia S., 2013.** Evaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateurs de la pollution des sols *Helix aspersa*. Thèse de doctorate. Université Badji Mokhtar Annaba. p58.
 36. **Bouziani M., 2007.** L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de médecine et de la santé. Santé maghreb. [consulté le, 11/12/2011].
 37. **Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, Analytical Biochemistry.72, 248-254.

C

38. **Casetta I., Govoni V., Granieri E., 2005.** Oxidative stress, antioxidants and neurodegenerative diseases. Curr Pharm.11(52): 20-33.
39. **Calvet R., Barriusoe., Bedos C., Benoit P., Charnay M. P., Coquet y., 2005.** Les pesticides dans le sol conséquences agronomiques et environnementales. Frans. p47.

40. **Caoduro G., Battiston R., Giachino P.M., Guidolin L., Lazzarin G., 2014.** Biodiversity indices for the assessment of air, water and soil quality of the “Biodiversity Friend” certification in temperate areas. *Biodiver. Journal*. 5 (1):69-86.
41. **Chakroun S., Ezzi L., Grissa I., Kerkeni E et al., 2016.** Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res*. Doi: 10.1007/s11356-016-9.
42. **Charreton M., Decourtye A., Henry M et al., 2015.** A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. *Plos One*. 10(12): 1-15.
43. **Chatterjee S., Bhattacharya S., 1984.** Detoxification of industrial pollutants by the glutathione-S-transferase system in the liver of *Anabas testideneus* (Bloch). *Toxicol. Lett.*, hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol*. 9, 306-312.
44. **Chen M., Tao L., McLean J., Lu C., 2014.** Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures. *Journal Agric Food Chem*. 62(26): 82-90.
45. **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 l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. 324(11): 979-987.
46. **Chevallier H., 1992.** L'élevage des Escargots. Production et Préparation du Petit-Gris. 2^{ème} édition. Edition du point vétérinaire. Maisons-Alfort.
47. **Chouahda S., Soltani. N., 2009.** Impact du cadmium et du halofenozide sur les indices métriques des femelles adultes d'un poisson culiciphage, *Gambusia affinis*. *Sciences & Technologie C – N°29 juin*. p9-14.
48. **Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot de Vaufléury A., Ribera D., Badot P.M., 2001.** The garden snail *Helix aspersa* as a bioindicator of organophosphorus exposure: Effects of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 (9): 1951-1957.
49. **Collins A., 1997.** Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. *Environ Mol Mutagen*. 30: 139-46.
50. **Couteux A., Lejeune V., 2012.** Index phytosanitaire. Association de Coordination Technique Agricole. p23.

D

51. **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 thermohygrométriques contrôlées. Ann. Zootechn. 30 : 249-272.
52. **David D., George I.A., Peter J.V., 2007.** Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human. Clin Toxicol. 45: 48-56.
53. **Devan R.K.S., Mishra A., Prabu P.C., Mandal T.K., Panchapakesan S., 2015.** Sub-chronic oral toxicity of acetamiprid in Wistar rats. Journal of Toxicol Environ Chem. 97:1236–1252.
54. **Di Prisco G., Cavaliere V., Annoscia D et al., 2013.** Neonicotinoid clothianid in adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. Proceedings of the National Academy of Sciences. 110(46): 18466-18471.
55. **Di Monte D., Lavasani M., 2002.** Manning-Bog Ab. Environmental factors in Parkinson's disease. Neurotoxicology. 23: 487-502.
56. **Dively G.P., Embrey M.S., Kamel A et al., 2015.** Assessment of Chronic Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Health. Plos One. Doi: 10.1371/journal.pone.0118748.
57. **Dixit V., Pandey V., Shyam R., 2001.** Differential responses to cadmium in roots leave of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J. Exp. Bot.* 52, 1101-1109.
58. **Djeffal A., 2014.** Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate « méthomyl » chez le rat Wistar : Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar-Annaba. p132.
59. **Douafer L., 2015.** Réponses *in situ* et en laboratoire de deux espèces communes de gastéropodes (*Helix aspersa* et *Helix aperta*) à une contamination des agrosystèmes par un insecticide néonicotinoïde (Actara): activité de l'AChE et stress oxydatif. Thèse de doctorat. Université Annaba. p99.
60. **Draper H.H., Hadley M., 1990.** Malondialdehyde détermination as index of lipid peroxidation. Meth. Enzymol. 186, 241-431.
61. **DRIRE (Direction Régionale de l'Industrie de la Recherche et de l'Environ dans l'actualité), 2003.** p33.
62. **Drobne D., Blažič M., Van Gestel C.A.M., Lešer V., Zidar P., Jemec A., Trebše P., 2008.** Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). Chemosphere. 71, 1326-1334.

E

63. **EFSA., 2013.** Panel on Plant Protection Products and their Residues. Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. EFSA Journal. 11(12):34-71.
64. **EFSA., 2016.** Pesticides and bees: EFSA to update neonicotinoid assessments [en ligne] Disponible à l'adresse : <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160111>. Site consulté le 10 juillet 2016.
65. **El- Gendy K.S., Radwan M.A., Gad A.F., 2009.** In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. Chemosphere. 77 :339-344.
66. **El Hassani A.K., Dacher M., Gary V et al., 2008.** Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee. Arch Environ Contam Toxicol. 54(653).
67. **Elia A.C., Galarini R., Taticchi M.I., Dörr A.J.M., Mantilacci L., 2003.** Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety. 55, 162-167.
68. **Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jungens G., 1992.** the role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic. Biol. Med. 13,341.

F

69. **Favier A., 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108-115.
70. **Fernandez-Vega C., Sancho E., Ferando M.D., Andreu-Moliner E., 2002.** Thiobencarb induced changes in acetylcho-linesterase activity of the fish *Anguilla*. Pestic Biochem and Physiol. 72: 55-63.
71. **Flora S.J., Mittal M., Mehta A., 2008.** Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. Indian Journal Med Res. 128(4): 501-52.
72. **Fontaine E., 2007.** Radicaux libres et vieillissement. Cah Nutr Diét. 42(2): 110-115.
73. **Forbes V.A., Forbes T.L., Rivière J.L. 1997.** Écotoxicologie: théorie et applications. Editions Quae. Paris. p 424.
74. **François R., 2007.** Introduction à l'écotoxicologie, Fondaments et application. Ed Lavoisier, Paris. pages : 437- 450-455, 456-461.

G

75. **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., 2003.** Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. L'actualité chimique. 91-95.
76. **Gasmi Salim, 2018.** Neurotoxicité de deux pesticides (Acétamipride et Deltaméthrine) et la prévention de cette toxicité par la quercétine chez le rat. Thèse de Doctorate. Université de Tébessa. p 217.
77. **Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J., 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. General and Comparative Endocrinology. 18: 545-551.
78. **Gomot A., 1997.** Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme. Bull. Acad. Natle. Méd. 181 :59-75.
79. **Gomot-de Vaufleury A., 2001.** Regulation of growth and reproduction. The biology of terrestrial molluscs. Oxon, CABI.331-355.
80. **Grara N., Boucenna M., Atilia A., Berrebbah H., Djebar M.R., 2012.** Stress oxydatif des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-Est algérien) chez l'escargot *Helix aspersa*. Environnement, Risques & Santé. 11(3): 221-229.
81. **Grojean S., 2002.** Etude de la réponse neuronale dans un modèle d'asphyxie cérébrale chez le rat nouveau-né. Influence d'une hyperbilirubinémie associée. Thèse de doctorat. p 318.
82. **Guelorget O., Perthuisot J.P., 1984.** Indicateurs biologiques et diagnose écologique dans le domaine paralique. Bulletin d'Ecologie. 15(1), 67-76.
83. **Guez D., Belzunces L.P., Maleszka R., 2003.** Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. PharmacolBiochem Behav. 75: 217-22.
84. **Guler G.O., Cakmak Y.S., Dagli Z., Aktumsek A., Ozparlak H., 2010.** Organochlorine pesticide residues in wheat from Konya region, Turkey. Food and Chemical Toxicology. 48: 1218-1221.

H

85. **Halliwell B., Gutteridge J., 1999.** Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press.

I

86. **Ince S., Kucukkurt I., Demirel H.H., Turkmen R., Zemheri F., Akbel E., 2013.** The role of thymoquinone as antioxidant protection on oxidative stress induced by imidacloprid in male and female Swiss albino mice. *Journal of Toxicol Environ Chem.* 95: 318–329.
87. **INERIS (Institut national de l'environnement industriel et des risques), 2005.** Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation. [consulté le : 04/05/2011].

J

88. **Jean., Claude Bonnet., Pierrick., Aupiel., Jean Louis Vrillon., 1990.** L'escargot *helix aspersa* biologie élevage. Paris: INRA.
89. **Jeschke P., Nauen R., Schindler M., Elbert A., 2011.** Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agric Food Chem.* 59(2): 897-908.

K

90. **Kamal A. Amin., Khalid S. Hashem., 2012.** Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC Veterinary Research.* 8:45.
91. **Kapoor U., Srivastava M.K., Bhardwaj S., Srivastava L.P., 2010.** Effect of imidacloprid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female rats to derive its No Observed Effect Level (NOEL). *J Toxicol Sci.* 35:577–581.
92. **Kawther S. EL-Gendy., Nagat M. Aly., Fatma H., Mahmoud., Anter Kenawy., Abdel Khalek H., El-Sebae., 2010.** The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Journal of Food and Chemical Toxicology.* 48 : 215–221.
93. **Kemajl Bislimi., Avni Behluli., Ilir Mazreku., Agim Gashi., Sali Aliu., 2015.** Effect of Industrial Pollution in Some Biochemical Parameters of the Garden Snail (*Helix Pomatia L.*) in the Region of “Trepça” smelter in Mitrovica, Kosovo. *International Conference on Environment Science and Engineering.* V83. 5. DOI: 10.7763/IPCBE.
94. **Kerney M., Cameron R., Bertrand A., 2006.** A Field guide to the land snails of Britain and north-west Europe. Paris: Delachaux et Niestlé SA. p 97.
95. **Kheddam-Benadjal N., 2012.** Enquête sur la gestion des pesticides en Algérie et recherche d'une méthode de lutte alternative contre *Meloidgyne incognita (Nematoda : Meloidgynidae)*. Mémoire de magister. Université EL Harrach Alger. p 15-17.
96. **Kimura K.J., Komuta Y., Kuroda Y., Hayashi M., Kawano H., 2012.** Nicotine-Like Effects

of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats. 7(2): 32-43.

L

97. **Lam P.K.S., 2009.** Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean and Coastal Management*.52: 348-354.
98. **Lauvverys R., Vincent H., Dominique L., 2007.** Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles. Masson. 31-288.
99. **Liu X. J., Luo Z., Xiong B. X., Liu X., Zhao Y. H., Hu G. F., Lv G. J., 2010.** Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*. *Ecotox. Environ. Safe*. 73: 1286–1291.
100. **Lukaszewicz-Hussain A., 2008.** Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. *Food Chem Toxicol*. 46(1): 82-96.

M

101. **Maran E., Fernandez-Franzon M., Font G., Ruiz M.J., 2010.** Effects of aldicarb and propoxur on cytotoxicity and lipid peroxidation in CHO-K1 cells. *Food Chem. Toxicol*. 48: 1592-1596.
102. **Martinez-alvarez R.M., Morales A.E., Sanz A., 2005.** Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish biology and Fisheries*. 15:75-88.
103. **Martfnez-Cayuella M., 1995.** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 77: 147-161.
104. **Masoumi A., 2009.** *Journal of Alzheimer's Disease*. 703-717.
105. **McKelvey T., Hollwarth M.E., Granger D.N., Engerson T.D., Landler U., Jones H.P., 1988.** Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Amerc Journal Physiol*. 254: 753-760.
106. **McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M., Yu H., 2000.** Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 2085-2092.
107. **Meyer EK., 1999.** Toxicosis in cats erroneously treated with 45 to 65% permethrin products. *Journal of Amerc Vet Med Assoc*. 2: 198-203.
108. **Michael F., Hughes E.A., 2016.** Environmentally relevant pyrethroid mixtures: A study on the correlation of blood and brain concentrations of a mixture of pyrethroid insecticides to

- motor activity in the rat. *Toxicology*. 359-360(10): 19-29.
109. **Michel B., 1999.** *Traité de toxicologie générale du niveau moléculaire à l'échelle planétaire*; Ed. Springer Verlag. France. p798.
110. **Michel Nicolle, 2015.** Néonicotinoides et santé humaine. *Journal of Toxicol Environ Health*.12:1-2.
111. **Mnif W., Hassine A.I., Bouaziz A., Bartegi A., Thomas O., Roig B., 2011.** Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int Journal Environ Res Public Health*. 2265-2303.
112. **Mohajeri S.A., 2011.** Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review. *Hum Exp Toxicol*. 30(9): 1119-1140.
113. **Mona K Galal., Abdel Azim A Khalaf., Hanan A Ogaly., Marwa A Ibrahim., 2014.** Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14:458.

N

114. **Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U., Schmuck R., 2001.** Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag Sci*. 57, 577-86.
115. **Nowakowska A., Laciak T., Caputa M., 2012.** Organ profiles of the antioxidants system and the accumulation of metals in *Helix aspersa* snails. *Pol. Jour. Environ. Stud*. 21 (5):1369-1375.

O

116. **Obata T., Kubota S., Yamanaka Y., 2001.** Allopurinol suppresses paranonylphenol and 1methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP⁺)-induced hydroxyl radical generation in rat striatum. *Neuroscience Letters*. 3069(2): 9-12.
117. **OECD, 2002.** *La performance environnementale de l'agriculture dans les pays de l'OCDE de puis 1990*. Ed. OECD Publishing, England. p 657.

P

118. **Pandey S.P., Mohanty B., 2015.** The neonicotinoid pesticide IMD and the DTC fungicide mancozeb disrupt the pituitary-thyroid axis of a wildlife bird *Chemosphere*. MAR. 122(2): 27-34.
119. **Parks D.A., Williams T.K., Beckman J.S., 1988.** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am Journal Physiol*. 254: 768-774.

120. **Programme de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest – PPAAO., 2013.** Fiche conseil pour la matière active : Acetamipride, Réseau National des Chambres d'Agriculture du Niger. p1-2.

R

121. **Radwan M.A., Mohamed M.S., 2013.** Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 95:91-97.

122. **Rahman I., Kode A., Biswas S.K., 2006.** Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protocols.* 1, 3159-3165.

123. **Ramazan Bal., Mustafa Naziroğlu., Gaffari Türk., Ökkes Yılmaz., Tuncay Kuloğlu., Ebru Etem., Giyasettin Baydas., 2012.** Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Jornal of cell biochemistry and function.* DOI: 10.1002/cbf.2826.

124. **Rjeibi I., 2016.** Oxidative damage and hepatotoxicity associated with deltamethrin in rats: The protective effects of *Amaranthus spinosus* seed extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 84(8): 853-860.

125. **Rodríguez J.L., Ares I.V., Castellano M., Martínez M.R, Martínez A., Anadónn MA., 2016.** Effects of exposure to pyrethroid cyfluthrin on serotonin and dopamine levels in brain regions of male rats. *Envi Research Environmental Research.* 146(7): 388-394.

126. **Rouabhi R., Gasmi S., Boussekine S., Kebieche M., 2015.** Hepatic oxidative stress induced by zinc and opposite effect of selenium in *oryctolagus cuniculus*. *Journal Environ Anal Toxicol.* 5: 289-298.

S

127. **Salama A.K., Osman K.A., Saber N.A., Soliman S.A., 2005.** Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 8: 92-96.

128. **Sarkar A., Ray D., Shrivastava A.N., Sarker S., 2006.** Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology.* 15, 333- 340.

129. **Sauer E., 2014.** Liver delta aminolevulinate deshydratase activity is inhibited by neonicotinoids and restored by antioxidants agents *Int J Environ Res Public Health.* 11(11): 11676-11690.

130. **Shibko S., Koivistoinen P., Tratyneek C. A., Newhall A.R., Freidman L., 1966.** A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, Lipid and

- Glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytic Biochemistry*. 19: 415-429.
131. **Seifert J., 2005.** Neonicotinoids. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. Elsevier. 196-200.
132. **Sheets L P., 2010.** Imidacloprid: a neonicotinoid insecticide. In: *Hayes handbook of pesticide toxicology*. Paris: Elsevier. 20: 55-64.
133. **Sies H., Akerboom T.P.M., 1984.** Glutathione disulfide (GSSG) efflux, from cells and tissues. *Methods in Enzymology*. 105: 445-451.
134. **Stachowski-Haberkorn S., 2008.** Méthodes d'évaluation de l'impact de pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huître creuse Université de Bretagne Occidentale. p 187.
135. **Stegeman J., 1992.** Nomenclature for hydrocarbon-inducible cytochrome P450 in fish. *Marine Environmental Research*. 34, 133-138.
136. **Stoytcheva M., 2011.** Pesticides in the Modern World-Risks and Benefits. InTech. ISBN 978-953. p 560.

T

137. **Terayama H., Endo H., Tsukamoto H et al., 2016.** Acetamiprid Accumulates in Different Amounts in Murine Brain Regions. *Inter Journal Environ Res Public Health*. Doi: 10.3390/ijerph13100937.
138. **Testud F., Grillet J.P., 2007.** Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers. EMC. *Toxicologie-Pathologie Professionnelle*. 16-59.
139. **Testud F., 2014.** Insecticides néonicotinoïdes. EMC-Pathologie professionnelle et de l'environnement. EMC-Toxicologie-Pathologie. Doi: 10.1016/S1877-7856(13)62786-5.
140. **Tian Y., Yuan Wang., Zhi Sheng., Tingting Li., Xu Li., 2016.** A colorimetric detection method of pesticide acetamiprid by fine-tuning aptamer length, *Analytical Biochemistry*. 513: 87-92.
141. **Timbrell J.A., Draper R., Waterfield C.J., 1994.** Biomarkers in toxicology: new uses for some old molecules? *Toxicology and Ecotoxicology News*. 1(1): 4-14.
142. **Toumi H., 2013.** Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur différentes souches de *Daphnia magna*. Thèse de doctorat. p 208.

U

143. **Utip B., Young B., Ibiang E., Victor I., Bassey E., Francis A., 2013.** Effect of Deltamethrin and Ridomil on Sperm Parameters and Reproductive Hormones of Male Rats. *Toxicol Environ Health*. 9-14.

V

144. **Vergely C., Rochette L., 2005.** Le stress oxydatif : Les radicaux libres, des composés à fonction biologique méconnue : à côté de leur action physiopathologique, ce sont des régulateurs avant d'être des destructeurs. *Affections Métaboliques AMC pratique*. 114: 28-30.
145. **Virginie MAES, 2014.** Le métabolisme énergétique chez un cyprinidé d'eau douce, le gardon *Rutilus rutilus* : vers le développement de nouveaux biomarqueurs en lien avec la contamination par des produits phytosanitaires. Thèse de doctorate. Université de Reims Champagne-Ardenne. p105.

W

146. **Wauchope RD., Yeh S., Linders J et al., 2002.** Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Management Science*. 58(5): 419-445.
147. **Weckbecker G., Cory J.G., 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 1210 cells in vitro. *Cancer Letters*. 40: 257- 264.
148. **Wilson B., 2010.** Cholinesterase, Section X: organophosphorous insecticides. In: *Handbook of pesticide toxicology*. Third Edition. Robert Krieger. 1457-1478.
149. **Woodcock B.A., Isaac N.J.B., Bullock J.M., Roy D.B., Garthwaite D.G., Crowe A., Pywell R.F., 2016.** Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature* doi: 10.1038/ncomms12459.
150. **Wozniak D., Olney J.W., Kettinger L., Prie M., Miller JP., 1990.** Behavioral of the rat. *Psychopharmacology*. 47-56.

Y

151. **Yang Xuan., Baumann Paul C., 2006.** Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. *Journal of Ecological Indicators*. 6 : 567–574.

Z

152. **Zhang Y.T., Zheng Q.S., Pan J., Zheng R.L., 2004.** Oxidative damage of biomolecules in mouse liver induced by morphine and protected by antioxidants. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 95, 53-58.

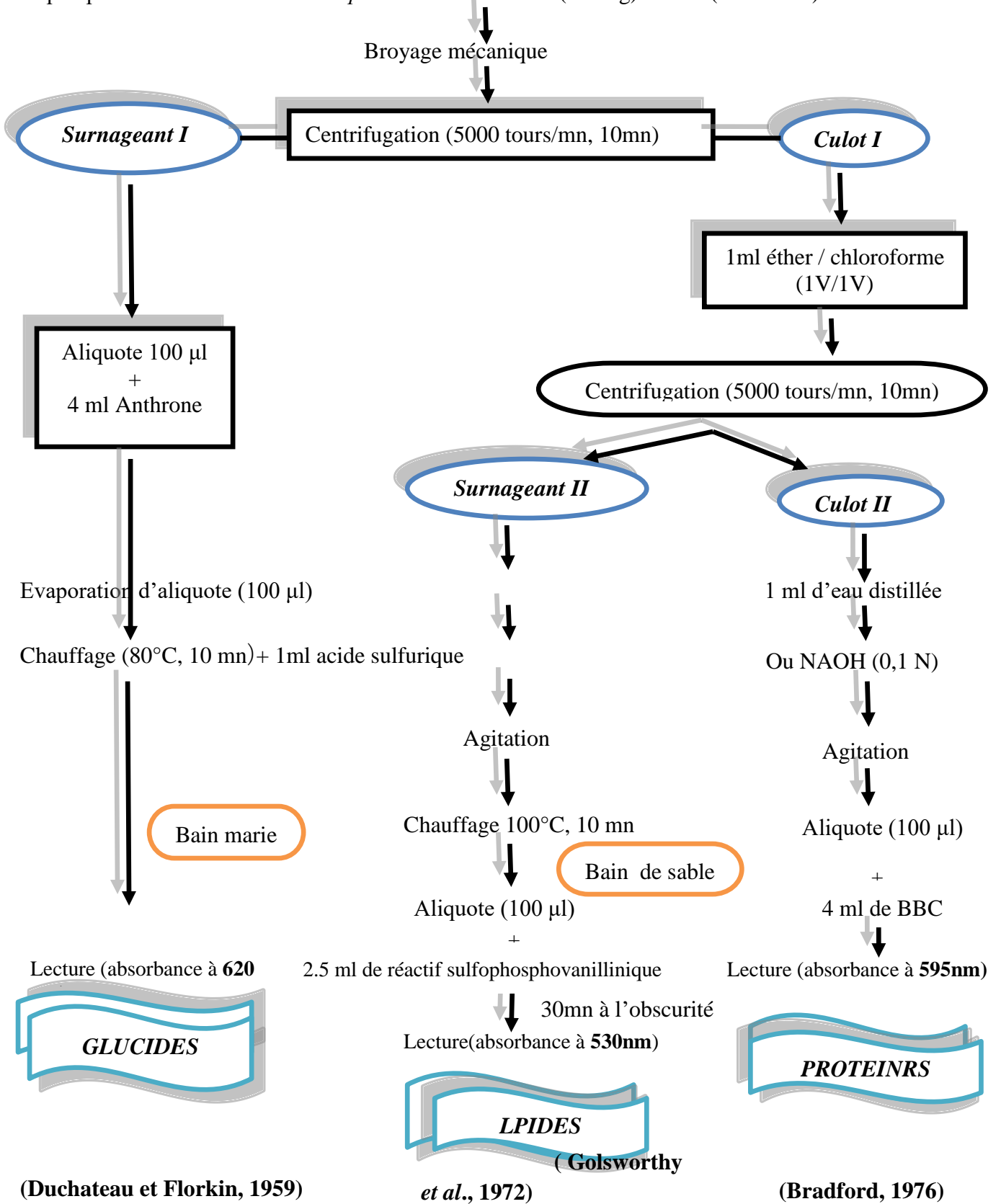
Références Web graphiques

153. <http://svtaucollege.Wifeo.com/documents/LaqhilaReda.pdf>. [En ligne]
154. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00005703/document>
155. <http://www.ddaf45.agriculture.gouv.fr/>

ANNEXES



Annexe 1A. Extraction et dosage des métabolites (glucides, lipides, et protéines) del'hépatopancréas chez les adultes de l'escargot *Helix aspersa* selon Shibko et al (1966)
Hépatopancréas d'adulte d'*Helix aspersa* témoin ou traité (100mg) + 1 ml (TCA 20%)



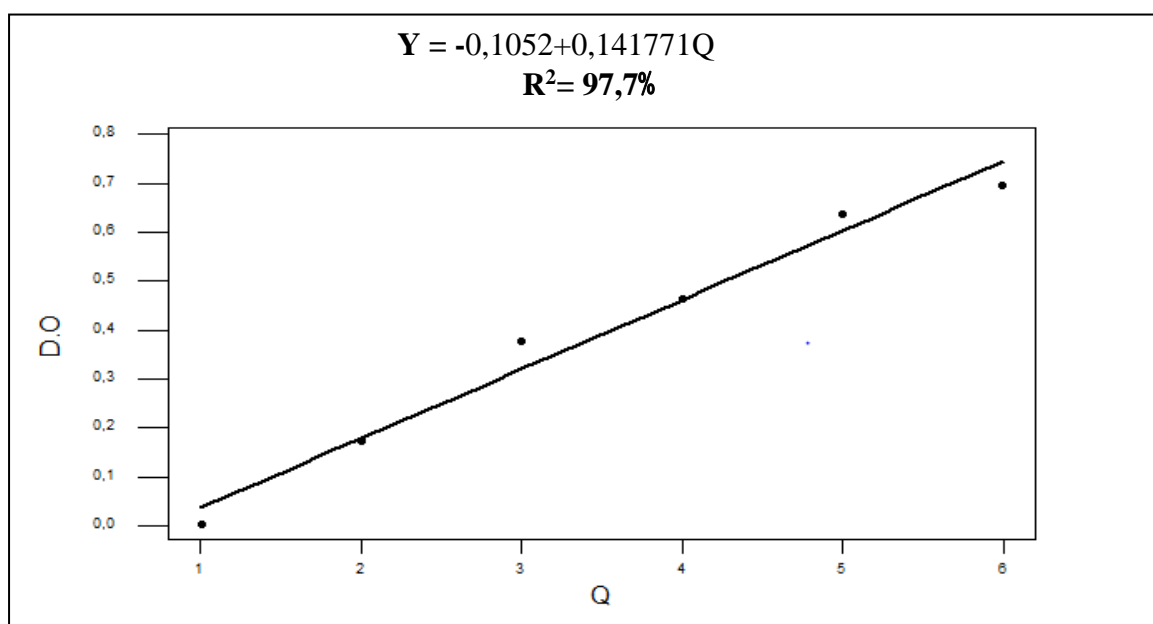
Annexe 1B. Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines hépatopancréatiques

<i>Tubes</i>	0	1	2	3	4	5
<i>Quantité d'albumine 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					

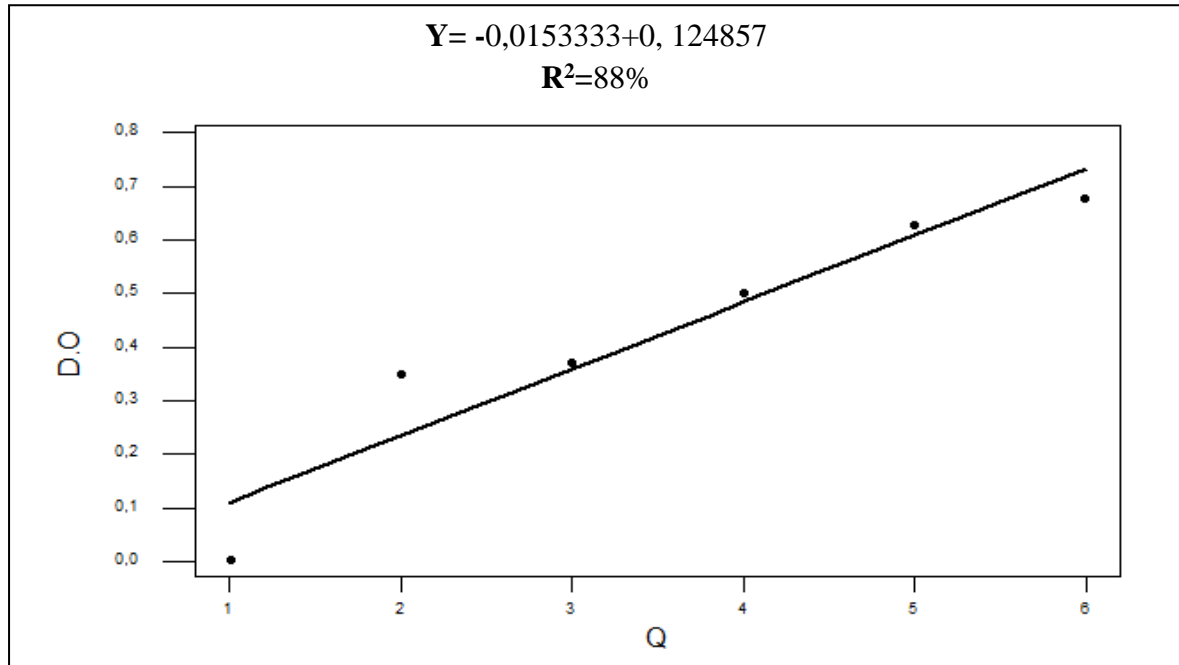
Annexe 1C. Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des lipides hépatopancréatiques

<i>Tubes</i>	1	2	3	4	5	6
<i>Solution mère de lipide (µl)</i>	0	20	40	60	80	100
<i>Solvant éther/chloroforme (µl)</i>	100	80	60	40	20	0
<i>Réactif sulphosovanillinique (ml)</i>	2.5					
<i>Quantité de lipides (µg)</i>	0	50	100	150	200	250

Annexe 02. Droite de régression exprimant les absorbances à 595 nm en fonction de la quantité des protéines (µg) (R² : coefficient de détermination)



Annexe 03. Droite de régression exprimant les absorbances à 530 nm en fonction de la quantité des lipides (μg) (R^2 : coefficient de détermination)



Annexe 4. Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, temps) du rapport hépatosomatique (%) chez *Helix aspersa*

Source	DL	SC	CM	F	P
période	2	14,095	7,048	2,64	0,085
dose	2	8,188	4,094	1,53	0,230
période*dose	4	2,048	0,512	0,19	0,941
Erreur	36	96,278	2,674		
Total	44	120,610			

Annexe 5. Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, période) du taux des protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de l'hépatopancréas) chez *Helix aspersa* ($m \pm s, n=5$)

Source	DL	SC	CM	F	P
période	2	44,3728	22,1864	103,08	0,000***
dose	2	8,1160	4,0580	18,85	0,000***
période*dose	4	1,7899	0,4475	2,08	0,104
Erreur	36	7,7487	0,2152		
Total	44	62,0274			

Annexe 6. Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, période) du taux des lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de l'hépatopancréas) chez *Helix aspersa* ($m \pm s, n=5$)

Source	DL	SC	CM	F	P
période	2	0,25736	0,12868	19,01	0,000***
dose	2	2,51672	1,25836	185,87	0,000***
période*dose	4	0,48523	0,12131	17,92	0,000***
Erreur	36	0,24373	0,00677		
Total	44	3,50303			

Annexe 7. Analyse de la variance à deux critères de classification (dose, période) du taux des GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine de l'hépatopancréas) chez *Helix aspersa* ($m \pm s, n=5$)

Source	DL	SC	CM	F	P
période	2	17,6775	8,8388	192,55	0,000***
dose	2	28,7105	14,3552	312,72	0,000***
période*dose	4	5,8337	1,4584	31,77	0,000***
Erreur	36	1,6526	0,0459		
Total	44	53,8742			

Annexe 8 .Analyse de la variance à deux critère de classification (dose, période) du taux des MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine de l'hépatopancreas) chez *Helix aspersa*($m \pm s, n=5$)

Source		DL	SC	CM F	P
période	2	3,4443	1,7222	99,03	0,000***
dose	2	16,2040	8,1020	465,91	0,000***
période*dose	4	0,1150	0,0287	1,65	0,182
Erreur	36	0,6260	0,0174		
Total	44	20,3893			