



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 : Biologie des êtres vivants

MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Spécialité : BIOLOGIE ANIMALE
Option : ECOPHYSIOLOGIE ANIMALE

Thème

**Impact d'un pesticide sur la croissance, et
sur les paramètres physiologiques et
biochimiques d'un escargot terrestre,
*Eobania vermiculata***

Présenté par : Melle Gaba Tahani

Melle Rezaiguia Zahra

Membres de Jury :

Pr. TINE Samir	Président	U. Larbi Tébessi-Tébessa
Pr. TINE-DJEBBAR Fouzia	Rapporteur	U. Larbi Tébessi-Tébessa
Dr. BOUAZDIA Karim	Examineur	U. Larbi Tébessi-Tébessa

Année universitaire : 2021/2022

Note :.....

Mention :.....

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la santé et la patience pour terminer ce modeste travail

*Nos plus vifs remerciements à notre professeur et encadreur **Pr. TINE-DJEBBAR Fouzia**, pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience et ses conseils avisés et son aide très précieux durant la préparation de ce travail.*

Un grand remerciement aux honorables membres du jury :

***Dr. BOUAZDIA Karim** d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.*

***Pr. TINE Samir** d'avoir accepté la présidence du jury de notre travail, qu'elle trouve ici toutes nos expressions respectueuses.*

Nos remerciements s'adressent également à ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

Sommaire

Titres	Pages
I. INTRODUCTION	1
II. MATERIEL ET METHODES	3
2.1. Présentation de l'espèce <i>Eobania vermiculata</i>	3
2.2. Présentation du pesticide	4
2.3. Collecte des escargots	5
2.4. Elevage des escargots	6
2.5. Traitement	6
2.6. Dissection de l'escargot et prélèvement des organes	7
2.7. Biomarqueurs physiologiques	8
2.7.1. Poids frais de l'escargot	8
2.7.2. Diamètre	8
2.8. Extraction et dosage des constituants biochimiques	8
2.8.1. Dosage des protéines totales	9
2.8.2. Dosage des lipides totaux	9
2.8.3. Dosage des glucides totaux	10
2.9. Dosage des biomarqueurs du stress oxydatif	12
2.9.1. Dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH)	12
2.9.2. Dosage de la glutathion-péroxydase (GPx)	12
2.9.3. Dosage des glutathion S-transférases (GSTs)	13
2.10. Dosage des biomarqueurs enzymatiques	14
2.10.1. Dosage de la phosphatase alcaline	14
2.10.2. Dosage de l'alanine amino transférase ALT (TGP)	14
2.10.3. Dosage de l'aspartate amino transférase AST (TGO)	14
2.11. Dosage des enzymes digestives	15
2.11.1. Dosage de l'activité de la protéase	15
2.11.2. Dosage de l'activité de la lipase	15
2.11.3. Dosage de l'activité de l' α amylase	16
2.11.4. Dosage de l'activité de la chitinase	16
III. RESULTATS	18
3.1. Effet du traitement sur le comportement d' <i>E. vermiculata</i>	18
3.2. Effet du traitement sur les paramètres physiologiques	18
3.2.1. Effet sur la mortalité	18
3.2.2. Effet sur le poids et le diamètre de la coquille	18

3.3. Effet sur la composition biochimique	19
3.4. Effet sur les biomarqueurs du stress oxydatif	20
3.5. Effet sur les biomarqueurs physiologiques	21
3.6. Effet du traitement sur les enzymes digestives	22
3.6.1. Effet sur l'activité de la protéase	22
3.6.2. Effet sur l'activité de la lipase	23
3.6.3. Effet sur l'activité de l'α-amylase	23
3.6.4. Effet sur l'activité de la chitinase	23
IV. DISCUSSION	25
4.1. Effet du traitement sur la mortalité	25
4.2. Réponses comportementales des escargots	25
4.3. Effet du traitement sur la croissance des escargots	26
4.4. Effet du traitement sur la composition biochimique	27
4.5. Effet du traitement sur les biomarqueurs du stress oxydatif	28
4.5.1. Effet sur l'activité de la lactate déshydrogénase	28
4.5.2. Effet sur l'activité des glutathion-S-transférases	29
4.5.3. Effet sur l'activité de la glutathion peroxydase	29
4.6. Effet sur les biomarqueurs physiologiques	29
4.7. Effet sur les enzymes digestives	30
V. CONCLUSION	32
VI. RESUMES	33
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	36

*LISTE DES
TABLEAUX*

Liste des Tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 1	Caractéristiques physico-chimiques des 2 molécules actives du pesticide utilisé.	4
Tableau 2	Dosage des protéines totales dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage.	9
Tableau 3	Dosage des lipides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage.	10
Tableau 4	Dosage des glucides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage.	10

*LISTE DES
FIGURES*

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
Figure 1	Aspect général de l'espèce <i>Eobania vermiculata</i> (photo personnelle).	3
Figure 2	Présentation de l'insecticide LAZER (photo personnelle).	4
Figure 3	Présentation du cimetière de Taghda (google earth).	5
Figure 4	Site de collecte (photo personnelle).	6
Figure 5	Elevage d' <i>E. vermiculata</i> au laboratoire (photo personnelle).	7
Figure 6	Dissection des escargots et prélèvement des organes (photos personnelles).	7
Figure 7	Mensuration du diamètre de la coquille (photo personnelle).	8
Figure 8	Extraction des protéines, glucides et lipides totaux (Shibko <i>et al.</i> , 1967).	11
Figure 9	Effet du LAZER sur le poids du corps (mg) (A) et le diamètre de la coquille (cm) (B) des juvéniles d' <i>H. vermiculata</i> ($m \pm SEM$, $n = 5$ répétitions, chacune contenant 10 individus) : Test t de Student.	19
Figure 10	Effet du LAZER sur le taux de protéines (A), glucides (B) et lipides totaux (C) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) chez les juvéniles d' <i>H. vermiculata</i> ($m \pm SEM$, $n=3$ pools contenant chacun des portions de 100-200 mg de tissu frais) : Test t de Student.	20
Figure 11	Effet du LAZER sur l'activité spécifique de la LDH (A), des GSTs (B) et de la GPx (C) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les juvéniles d' <i>H. vermiculata</i> ($m \pm SEM$, $n=3$ pools contenant chacun 100-200 mg de tissu frais) : Test t de Student.	21
Figure 12	Effet du LAZER sur l'activité spécifique de la PAL (A), de la ALT (B) et la AST (C) (U/mg de protéines) chez les juvéniles d' <i>H. vermiculata</i> ($m \pm SEM$, $n=3$ pools contenant chacun 100-200 mg de tissu frais) : Test t de Student.	22
Figure 13	Effet du LAZER sur l'activité spécifique de la protéase (A), lipase (B), α -amylase (C) et chitinase (D) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les juvéniles d' <i>H. vermiculata</i> ($m \pm SEM$, $n=3$ pools contenant chacun 100-200 mg de tissu frais) : Test t de Student.	24

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Les pesticides et leurs effets sur la santé humaine et l'environnement sont devenus un sujet de préoccupation majeure. 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). Le terme « pesticide » possède une définition tendue, comprenant les « produits phytosanitaires », les « produits phytopharmaceutiques » ou les « biocides ». Il concerne donc toutes les substances naturelles ou synthétiques utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes (micro-organismes, animaux ou végétaux) jugés indésirables ou nuisibles, non seulement en contexte agricole, mais également dans les domaines de l'hygiène de la santé publique, de la santé animale et dans les traitements de surfaces non-agricoles (Aubertot *et al.*, 2005).

Après la seconde guerre mondiale, l'homme a utilisé des produits chimiques dans la lutte contre les ravageurs des cultures pour l'augmentation des rendements et la régulation de la production agricole et pour répondre aux besoins alimentaires qui prennent de plus en plus de l'ampleur, en raison de la croissance démographique (Bourbia-Ait Hamlet, 2013 ; Djatita, 2019). 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). L'un des résultats les plus critiques de cette technologie et de cette agriculture est la dégradation de l'environnement en particulier, le sol étant la partie la plus fondamentale des terres cultivées qui ont été gravement touchées (Prashar & Shah, 2016), ce qui affecte les organismes ciblés ainsi que les organismes non ciblés comme les escargots.

Ils sont reconnus comme des indicateurs écologiques pertinents (Corotet *et al.*, 1999). En effet, ils représentent une biomasse significative au sein de la communauté des invertébrés du sol et occupent une situation privilégiée à l'interface sol-plante atmosphère (Barker, 2001). De plus, ces gastéropodes terrestres, intègrent des sources et voies de contamination multiples et possèdent des capacités de bioaccumulation importantes pour de nombreux polluants organiques (Coourdassier *et al.*, 2001; Bairi *et al.*, 2017). Enfin, ils représentent des réponses biochimiques (Ismert *et al.*, 2002 ; Regoli *et al.*, 2006) quand ils sont exposés aux contaminants et constituent un élément des

réseaux trophiques qui contribue au transfert des polluants du sol et/ou des plantes aux prédateurs (Scheifler *et al.*, 2002).

Notre étude entre dans cette thématique et vise à évaluer les réponses d'une espèce bioindicatrice de pollution, *Eobania vermiculata* à un pesticide, le LAZER.

La première partie de notre étude est consacrée à l'évaluation de l'effet du traitement sur les paramètres morphométriques de cette espèce ; par la détermination de l'évolution du poids corporel des escargots témoins et traités pendant 2 semaines.

La deuxième partie vise à évaluer les effets de cet insecticide LAZER (Dose recommandée) sur la composition biochimique ; par la détermination des taux de protéines, glucides et lipides au niveau de l'hépatopancréas d'*E. vermiculata* des séries témoins et traitées.

La troisième partie examine les effets du Lazer sur les biomarqueurs du stress oxydatif ; Lactate déshydrogénase (LDH), Glutathion-péroxydase (GPx) et les Glutathion -S- Transférases (GSTs).

Concernant **la quatrième partie**, on a évalué ce pesticide sur les biomarqueurs enzymatiques tels que la Phosphatase alcaline, l'alanine amino transférase ALT (TGP) et l'aspartate amino transférase AST (TGO).

La dernière partie, consiste à évaluer l'activité des enzymes digestifs ; Protéase, Lipase, α -amylase et Chitinase chez les escargots témoins et traités.

*MATERIEL ET
METHODES*

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation de l'espèce *Eobania vermiculata*

Eobania vermiculata (Müller, 1774) est un mollusque gastéropode de famille des Helicidae, répandue dans les pays du bassin méditerranéen. Elle est la seule espèce du genre *Eobania*. Caractérisée par une coquille robuste, mesure de 21 à 35 mm de diamètre et de 14 à 25 mm de hauteur. Le nombril est fermé (sauf dans les formes juvéniles) et le péristome blanchâtre. La couleur de la coquille peut être blanc-crème ou encore plus souvent avec des bandes brun foncé ou rougeâtre. La largeur des bandes est très variable et irrégulière, elles sont souvent interrompues par un treillis blanchâtre (Fig. 1).

La position systématique de l'espèce *Eobania vermiculata* (Müller, 1774) est la suivante :

Règne	Animalia
Embranchement	Mollusques
Classe	Gastéropodes
Sous classe	Pulmonés
Ordre	Stylomatophora
Famille	Helicidae
Sous famille	Helicinae
Genre	Helix
Espèce	<i>Helix vermiculata</i> (Müller, 1774).

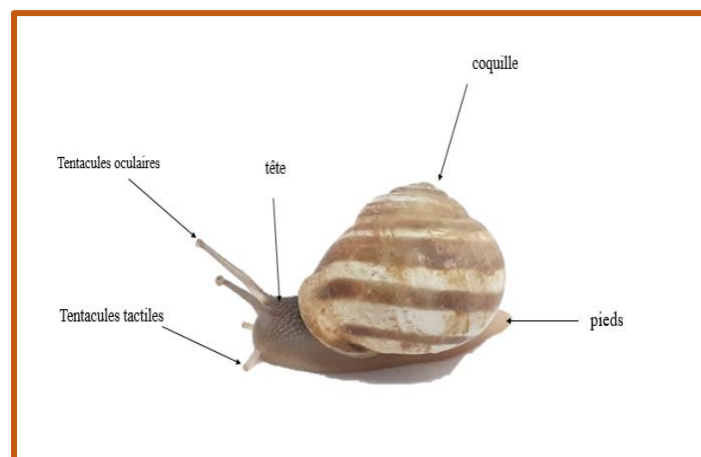


Figure 1. Aspect général de l'espèce *Eobania vermiculata* (photo personnelle).

2.2. Présentation du pesticide

Le pesticide appliqué dans cette étude est l'insecticide LAZER (Fig. 2). Il est polyvalent à base de Lambda-cyhalothrine (5%) et Pyrimicarbe (10 %). Cet insecticide est caractérisé par sa triple action : action de contact, action par effet de vapeur, action translaminaire et par une action très rapide remarquable (effet de choc). Il est utilisé contre les punaises, les pucerons et les tordeuses (Agro Rayen, 2021). Ses caractéristiques physico-chimiques sont mentionnées dans le tableau 1.



Figure 2. Présentation de l'insecticide LAZER (photo personnelle).

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques des 2 molécules actives du pesticide utilisé.

Nom	Formule chimique	Poids moléculaire	Point de fusion	Solubilité dans l'eau	Densité Relative	Demi-vie
Lambda-cyhalothrine	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	449,8 g/mol	49,2 °C	Insoluble	1,3	7 à 248j
Pyrimicarbe	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	238,29g/mol	89 °C	Soluble	0,4 – 0,6	35 à 55j

2.3. Collecte des escargots

Les escargots ont été collectés à partir du cimetière de Taghda ($35^{\circ}24'10.3''$ Nord $8^{\circ}08'10.8''$ Est) (Fig. 3) à 2 km de l'est de la ville de Tébessa. La température moyenne de la région, est de $16,3^{\circ}\text{C}$ et les précipitations de 371 mm en moyenne et un couvert végétal herbacé varié, qui devient dense au printemps. La collecte des escargots est réalisée manuellement et de manière aléatoire durant le mois de Novembre 2021 (Fig. 4). Une fois au laboratoire, ils ont été triés selon différentes phases de développement : jeunes éclos, juvéniles et adultes, et ils sont nourris exclusivement de feuilles de laitue fraîche. Les individus utilisés au cours de nos expérimentations, sont des juvéniles d'un poids moyen de 6,4g et d'un diamètre moyen de la coquille de 2,4 cm.

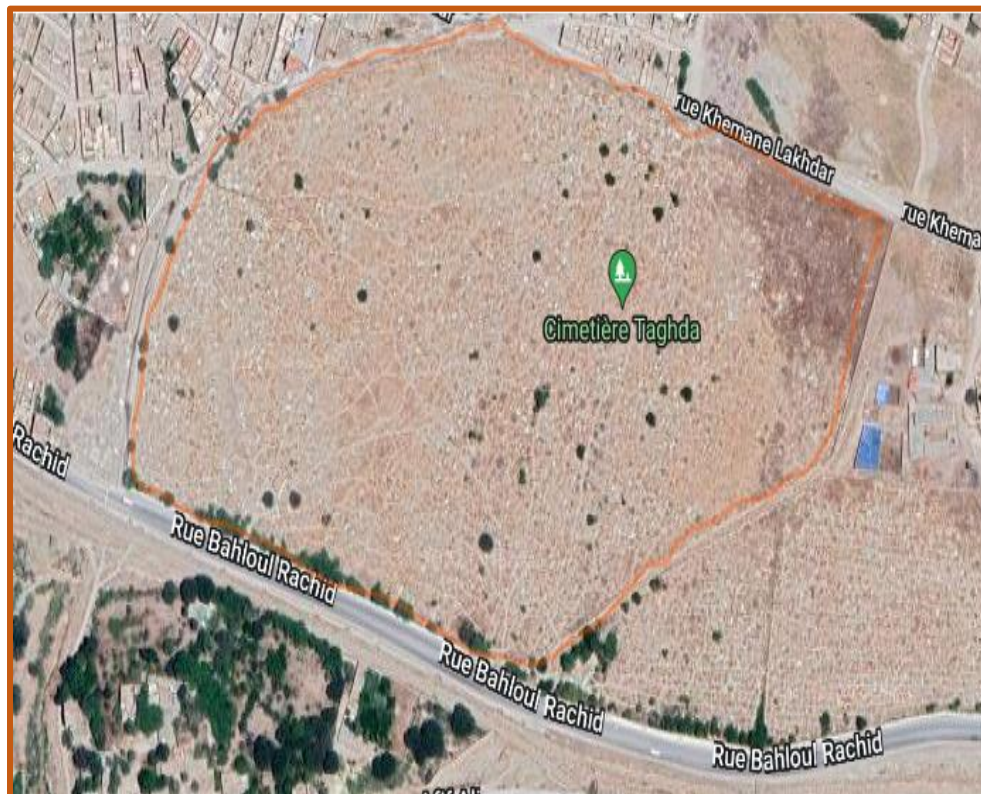


Figure 3. Présentation du cimetière de Taghda ([google earth](#))



Figure 4. Site de collecte (photos personnelles).

2.4. Elevage des escargots

Après une semaine d'adaptation aux conditions du laboratoire, les escargots juvéniles sont répartis en 7 terrariums en verre (Longueur : 20 cm, largeur : 20 cm, hauteur : 20 cm), remplis de 2 kg de sol non traité, et recouverts d'un tulle afin d'assurer une bonne aération. Une éponge humide est déposée au fond du terrarium pour assurer une humidité adéquate.

2.5. Traitement

Après la pesée des escargots à l'aide d'une balance de précision (RADWAG, 0,000 mg), ils ont été répartis en 2 lots :

- Lot 1 : Lot témoin composé de deux terrariums pour les juvéniles.
- Lot 2 : Lot traité avec une dose recommandée (DR) du LAZER composé de six terrariums pour les juvéniles.

Les individus témoins et traités maintenus dans des terrariums (20×20×20 cm) (Fig. 5) sont nourris de laitue fraîche (escargots témoins), ou de laitue pulvérisée 10 fois avec la solution d'insecticide. Toutes les dilutions d'insecticide ont été préparées avec de l'eau distillée (6,25 ml d'insecticide avec 25 ml d'eau distillé). Le renouvellement de la solution d'insecticide et le nettoyage des terrariums se font chaque semaine. La nourriture est fournie chaque trois jours. Pour déterminer l'effet de l'insecticide, l'expérience est menée durant 2 semaines (exposition subaiguë) sous des conditions contrôlées de laboratoire.



Figure 5. Elevage d'*E. vermiculata* au laboratoire (photo personnelle).

2.6. Dissection de l'escargot et prélèvement des organes

Chaque semaine de traitement, les escargots sont pesés. Ensuite, les escargots sont décoquillés et leurs hépatopancréas et glandes albumen rapidement excisés et pesés. On place les organes isolés dans les tubes Eppendorf dans des tampons adéquats.



Figure 6. Dissection des escargots et prélèvement des organes (photos personnelles).

2.7. Biomarqueurs physiologiques

2.7.1. Poids frais des escargots

Le poids du corps des escargots (tissu mou et coquille) a été pesé à l'aide d'une balance de précision de façon hebdomadaire, avant et pendant la durée du traitement. Les pesées sont toujours réalisées avant le nettoyage de l'enceinte d'essai (Vaufleury & Pihan, 2002).

2.7.2. Diamètre

Pour chaque individu étudié, le diamètre est mesuré chaque semaine à l'aide d'un pied à coulisse (Fig.07).



Figure 7. Mensuration du diamètre de la coquille (photo personnelle).

2.8. Extraction et dosage des constituants biochimiques

Des portions de l'hépatopancréas (100-200 mg) des individus témoins et traités (DR) ont été prélevés chaque semaine et conservées dans 1 ml de TCA (acide trichloracétique) à 20%. L'extraction des principaux constituants biochimiques (protéines, glucides et lipides) a été réalisée selon le procédé de Shibko *et al.* (1967). Après homogénéisation aux ultrasons, puis centrifugation (5000 tours/min à 4°C pendant 10 min), le surnageant I obtenu, servira pour le dosage des glucides totaux selon la méthode de Duchateau & Florkin (1959). Au culot I, on ajoute 1 ml de mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 trs/min, 10 mn), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides (Goldsworthy

et al., 1972) et le culot II, dissout dans de la soude (0,1 N), servira au dosage des protéines selon Bradford (1976).

2.8.1. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976), dans une fraction aliquote de 100 µl, à laquelle on ajoute 4 ml de réactif du bleu brillant de comassie (BBC) G250 (Merck). La durée de la conservation du réactif est de 2 à 3 semaines à 4 °C. Celui-ci révèle la présence des protéines par une coloration bleue. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (Sigma) (BSA) titrant 1 mg/ml (Tableau 2).

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

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

2.8.2. Dosage des lipides totaux

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972), en utilisant le réactif sulfophosphovanillinique. Le dosage des lipides se fait sur des prises aliquotes de 100 µl des extraits lipidiques ou de gamme étalon auxquelles on évapore totalement le solvant puis on ajoute 1ml d'acide sulfurique concentré, les tubes sont agités, et mis pendant 10 mn dans un bain de sable à 100°C. Après refroidissement, on prend 200 µl de ce mélange auquel on ajoute 2,5 ml de réactif sulfophosphovanillinique (Tableau 3). Après 30 mn à l'obscurité, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide orthophosphorique, des complexes roses. La solution mère de lipides est préparée comme suit : on prend 2,5 mg de l'huile de table (tournesol 99% triglycérides) dans un tube Eppendorf et on ajoute 1 ml d'éther chloroforme (1V/1V).

Tableau 3. Dosage des lipides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage.

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

2.8.3. Dosage des glucides totaux

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

Tableau 4. Dosage des glucides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage.

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

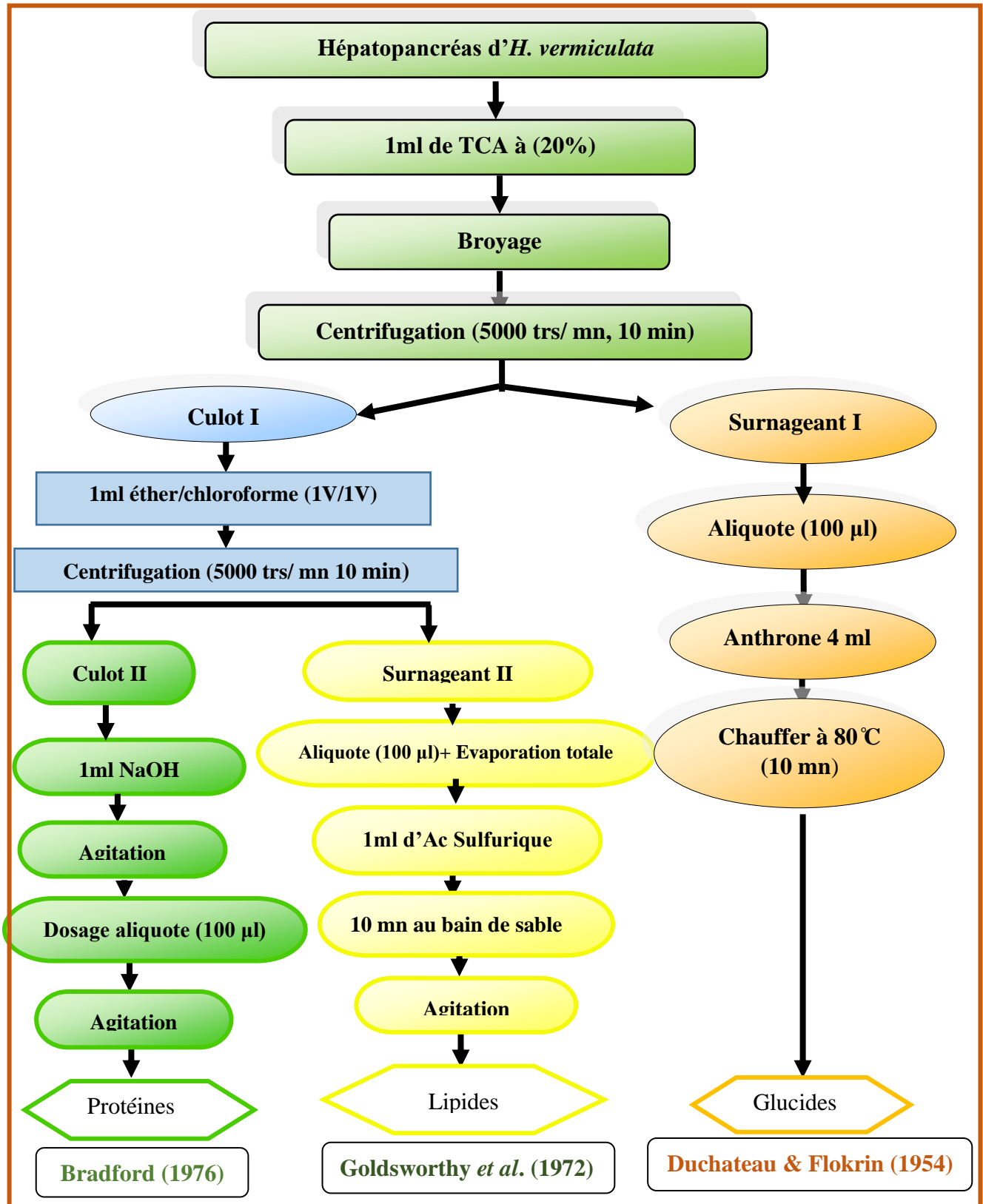


Figure 8. Extraction des protéines, glucides et lipides totaux (Shibko *et al.*, 1967).

2.9. Dosage des biomarqueurs du stress oxydatif

2.9.1. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)

L'activité de la déshydrogénase (LDH) a été mesurée selon la méthode de Hill & Lévi (1954) ; à l'aide d'un kit de test de BIOLABO (France). Des fragments de la glande digestive (100-200 mg) ont été homogénéisés dans 1 ml de tampon Tris/HCl (0,1 M : pH 7,2). L'homogénat a été centrifugé (4000 trs/min, pendant 10 min) puis le surnageant récupéré sera utilisé comme source d'enzymes. L'essai a été effectué avec 200 µl de surnageant ajouté à 1000 µl de tampon de substrat plus un coenzyme.

La lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 340 nm pendant deux minutes (0 s ; 30 s ; 1min ; 2min). L'activité spécifique de la LDH est exprimée en µM/min/mg de protéine selon la formule suivante :

$$(\Delta\text{Abs}/\text{min}) \times 8095 = \text{UI/L de LDH}$$

2.9.2. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la GPx a été déterminée selon la méthode de Flohe & Gunzler (1984). Des fragments de la glande digestive (100-200 mg) ont été homogénéisés dans 1 ml de tampon de phosphate (pH 7,8). L'homogénat a été centrifugée (4000 trs/min, pendant 10 minutes) puis le surnageant récupéré utilisé comme source d'enzymes. Cette activité a été exprimée en µmol de GSH/min/mg de protéine. La méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme substrat en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en GSSG sous l'influence de la GSH-Px.

Dans un tube sec, 200µl de surnageant est additionné à 400 µl de GSH à 0,1 mM (réaction enzymatique) et 200µl de KNaHPO₄ à 0,067 M (tampon d'extraction pH 7,8). Pour le blanc, le tube contient 400 µl de GSH et 200µl de KNaHPO₄ (réaction non enzymatique). Après une incubation au bain marie à 25°C pendant 5 min, on ajoute 200µl d'H₂O₂ (1,3mM) pour initier la réaction ; puis 1ml de TCA (1%) est additionné pour arrêter la réaction. Le mélange mis dans de la glace pendant 30 min est centrifugé pendant 10 min à 3000 tr/min et 480 µl de surnageant

recupéré est placé dans une cuve ; à laquelle on ajoute 2,2 ml de Na₂HPO₄ (0,32 M) et 0,32 ml de DTNB (1mM). La densité optique est lue à 412 nm après 5 min. La détermination de l'activité de la GPx se fait de la façon suivante :

$$Q = \frac{(DO \text{ échantillon} - DO \text{ étalon}) \times 0.04}{DO \text{ étalon}}$$

$$\text{Activité de la GPx } (\mu\text{M GSH}/\text{min}/\text{mg protéines}) = \frac{Q}{\text{mg protéines}}$$

Q : Quantité du GSH disparu (oxydé).

DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.

DO étalon : Densité optique de l'étalon.

0,04 : Concentration du substrat (GSH)

2.9.3. Dosage des glutathion S-transférases (GSTs)

L'activité des glutathion S-transférases (GSTs) est déterminée selon la méthode de [Habig et al. \(1974\)](#). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur, le glutathion (GSH) et mesurée à une longueur d'onde de 340 nm dans un spectrophotomètre. Les fragments de l'hépatopancréas des individus traités et témoins sont pesés puis broyées dans 1ml de tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH 6). L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé (4000 trs/min pendant 10 min), le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme. Le dosage consiste à faire réagir 200 µl de surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM) /GSH (5 mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0,1M, pH 6)]. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 10 individus avec une série témoin. La lecture des absorbances est effectuée toutes les 1 mn pendant 5minutes contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant. L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta DO / mn}{9,6} \times \frac{Vt}{Vs} / mg \text{ de protéines}$$

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

ΔDO : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps

9,6: coefficient d'extinction molaire du CDNB.

Vt: volume total dans la cuve : 1,4 ml [0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

Vs: volume du surnageant dans la cuve : 0,2 ml.

mg de protéines: quantité de protéines exprimée en mg.

2.10. Dosage des biomarqueurs enzymatiques

2.10.1. Dosage de la phosphatase alcaline

La détermination cinétique de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) est réalisée selon la méthode recommandée par BIOLABO (France).

Dans un tube sec 20 μ l de surnageant sont additionnés à 1 ml de réactif de (R2) dissout dans le tampon (R1). Après agitation, la lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 405 nm chaque minute pendant 3 min.

2.10.2. Dosage de l'alanine amino transférase ALT (TGP)

Cette activité enzymatique est mesurée à l'aide d'un kit de BIOLABO (France). Dans une cuve, 100 μ l de surnageant sont additionnés à 1ml de réactif de R2 dissout dans le tampon, R1. Après agitation et incubation pendant 1minute, la lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 340 nm chaque minute pendant 3 minutes. L'activité de l'ALT est calculée selon la formule suivante :

$$(\Delta A/\text{min} \times 1750) = \text{U/L de TGP}$$

2.10.3. Dosage de l'aspartate amino transférase AST (TGO)

Cette activité enzymatique est mesurée à l'aide d'un kit de BIOLABO (France). Dans une cuve, 100 μ l de surnageant sont additionnés à 1ml de réactif de R2 dissout dans le tampon R1. Après agitation et incubation pendant 1minute. La lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde de 340 nm chaque minute pendant 3 minutes. L'activité de l'AST est calculée selon la formule suivante :

$$(\Delta A/\text{min} \times 1750) = \text{U/L de TGP}$$

2.11. Dosage des enzymes digestives

L'hépatopancréas des juvéniles d'*Eobania vermiculata* des séries témoins et traitées, a fait l'objet d'un dosage de l'activité de quatre enzymes digestives : α -amylase, chitinase, protéase et lipase. Les portions d'hépatopancréas sont homogénéisées dans 1 ml de tampon universel. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé à 13000 trs/min pendant 20 min et le surnageant récupéré est conservé jusqu'au dosage où il servira comme source d'enzyme. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque série. Par ailleurs, la concentration en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminée suivant la méthode de Bradford (1976), pour pouvoir calculer les activités spécifiques des enzymes.

2.11.1. Dosage de l'activité de la protéase

L'activité protéasique est déterminée selon la méthode décrite par Garcia-Carreno & Haard (1993) utilisant la caséine comme substrat. Le mélange réactionnel est : 100 μ L d'extrait enzymatique, 100 μ l de tampon universel et 200 μ l de solution de caséine (1%) dans le tampon Phosphate salin (PBS) à pH 7,0. Le mélange est incubé à 37°C pendant 1 h. La réaction est ensuite stoppée par addition de 800 μ l d'acide trichloroacétique (TCA) à 5%, permettant la précipitation des protéines. Le mélange est centrifugé à 8000 trs pendant 15 min. La lecture des absorbances est effectuée à 280 nm. L'activité enzymatique est déterminée grâce à une gamme étalon de tyrosine (0 - 2 mM ml) préparée à partir d'une solution mère de tyrosine (10 mM). L'activité spécifique des protéases est exprimée en mM/min/mg de protéine.

2.11.2. Dosage de l'activité de la lipase

Le dosage de lipase est réalisé selon la méthode de Tsujita *et al.* (1989) qui utilise le pNPB (p-nitrophenyl butyrate) comme substrat. Une fraction aliquote de 10 μ l d'extrait enzymatique est additionnée à 18 μ l de pNPB (50 mM) et 172 μ l de tampon universel ; le mélange est incubé pendant 30 minutes à 37 °C. L'absorbance est mesurée à 405 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions (18 μ l d'eau distillée remplaçant le pNPB). Une unité de lipase libérera 1 μ M de pNP (p- nitrophenol) par minute à 37°C lorsque le p-nitrophenyl butyrate est utilisé comme substrat. Une gamme d'étalonnage de p-Nitrophenol (0 - 0,025 uM/ml) est réalisée grâce à une

solution mère de p-Nitrophenol (0,05 M/ml). L'activité spécifique de la lipase est exprimée en $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine.

2.11.3. Dosage de l'activité de l' α -amylase

Le dosage d' α -amylase est réalisé selon [Bernfeld \(1955\)](#) qui utilise le DNS comme réactif et l'amidon (1%) comme standard. La méthode du DNS (acide 3,5 dinitrosalicylique) dite méthode de sucre réducteur est une méthode colorimétrique basée sur la réaction du DNS avec les groupes réducteurs libérés après hydrolyse de l'amidon sous l'action de l'alpha amylase. Le protocole de dosage est réalisé comme suit : 20 μl d'extrait enzymatique sont ajoutés à 100 μl de tampon universel et 40 μl d'amidon. Après une incubation de 30 minutes à 35°C, la réaction est stoppée par l'addition de 100 μl de DNS et un chauffage de 10 minutes au bain marie (100°C). Après refroidissement à température ambiante 100 μl d'eau distillée sont ajoutés.

L'absorbance est mesurée à 540 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions (20 μl d'eau distillée remplaçant la source d'enzyme). Le calcul de l'activité enzymatique est effectué grâce à une courbe d'étalonnage de maltose (0 - 1 $\mu\text{M}/\text{ml}$) réalisée à partir d'une solution mère de maltose (180 mg/ml) l'activité spécifique d'alpha-amylase est exprimée en $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine.

2.11.4. Dosage de l'activité de la chitinase

Le dosage de l'activité chitinase est réalisé selon le protocole de [Miller \(1959\)](#) basé sur l'hydrolyse enzymatique de la chitine (polymère de chitobiose) en N-acétyl-D glucosamine (Monomère de sucre réducteur). Une fraction aliquote de 250 μl d'extrait enzymatique est additionnée à 250 μl de chitine colloïdale (1%); le mélange est ensuite incubé pendant 30 min à 50°C sous agitation (120 trs/min) avant d'être transféré au bain marie (100°C pendant 5 min). Après refroidissement à température ambiante et centrifugation à 5000 trs/min pendant cinq minutes, 150 μl de surnageant sont additionnés à 300 μl de tampon universel et 200 μl de DNS. Le mélange est incubé 10 minutes au bain marie à 100°C puis refroidi à 4°C. L'absorbance est mesurée à 540 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions (250 μl d'eau distillée remplaçant l'enzyme). L'activité enzymatique a été estimée grâce à une gamme étalon de N-

acétylglucosamine (0 - 0,144 mg/ml) préparée à partir d'une solution mère de N-acétylglucosamine (0,5 mg/ml). L'activité spécifique est exprimée en mM/min/mg de protéine.

RESULTATS

III. RESULTATS

3.1. Effet du traitement sur le comportement d'*E. vermiculata*

Au cours de l'expérience, les escargots exposés à l'insecticide ont montré une série de symptômes avec une diminution de la consommation de la laitue contaminée d'une façon dose-dépendante. Les escargots s'échappent de la nourriture car ils se positionnent au-dessus des terrariums et ne montrent aucune activité locomotrice comparativement aux escargots témoins.

3.2. Effet du traitement sur les paramètres Physiologiques

3.2.1. Effet sur la mortalité

En général, la mort d'un individu est facile à déterminer : le pied flasque et jaunâtre est le plus souvent l'escargot sorti de la coquille. La sole pédieuse n'adhère à aucune surface. Ainsi, le corps de l'escargot devient luisant et très visqueux, c'est un indice de la liquéfaction des tissus. L'escargot mort dégage une odeur nauséabonde. Pour confirmer la mort de l'individu, on stimule le pied à l'aide d'une aiguille ou d'une paire de pinces et lorsqu'aucune réaction n'est observée on conclut la mort de l'individu.

Au cours des essais, le contrôle de la vitalité des individus d'*H. vermiculata* est effectué chaque semaine, les individus morts sont évacués des enceintes d'essai. Aucune mortalité n'a été observée durant les 2 semaines de traitement.

3.2.2. Effet sur le poids et le diamètre de la coquille

La comparaison des moyennes par le test t de Student, indique une diminution non significative ($p > 0,05$) du poids et du diamètre de la coquille des individus traités avec le LAZER (DR) par rapport aux témoins au cours de toutes les périodes testées (0, 1 et 2 semaines) (Fig. 9A.B).

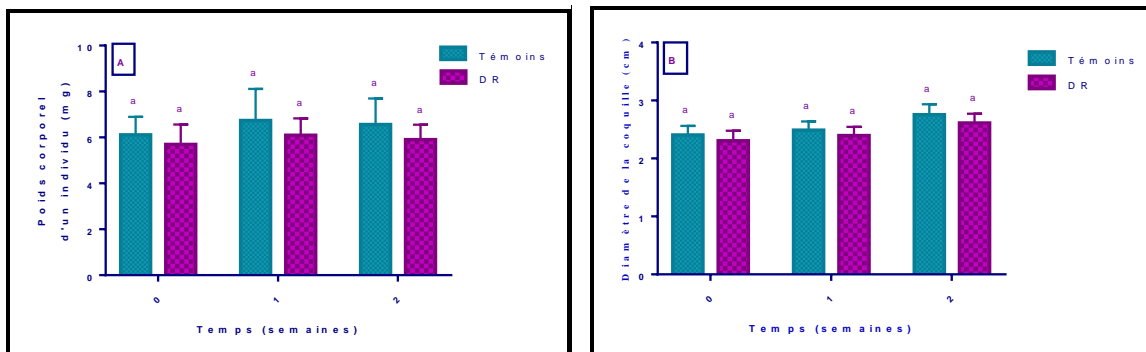


Figure 9. Effet du LAZER sur le poids du corps (mg) (A) et le diamètre de la coquille (cm) (B) des juvéniles d'*H. vermiculata* ($m \pm SEM$, $n = 5$ répétitions, chacune contenant 10 individus) : Test t de Student.

3.3. Effet sur la composition biochimique

L'insecticide, le LAZER a été appliqué avec la dose recommandée sur les juvéniles d'*H. vermiculata*, leurs effets ont été évalués sur la composition biochimique de l'hépatopancréas (protéines, glucides et lipides).

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative du taux des protéines totales ($F_{3,8} = 2118$), pendant toute la période testée (S1 : Témoin vs DR ; $p=0,0283$; S2 : Témoin vs DR ; $p<0,0001$) comparativement aux témoins (Fig. 10A).

Les résultats représentés dans la figure 10B indiquent une diminution du taux de glucides totaux de l'hépatopancréas ($F_{3,8} = 180,1$), après 1 semaine (S1 : Témoin vs DR ; $p=0,0346$) et 2 semaines (S2 : Témoin vs DR ; $p= 0,0023$) de traitement comparativement aux témoins.

Concernant le taux de lipides totaux, les résultats obtenus indiquent une réduction significative de ce métabolite dans l'hépatopancréas des juvéniles traités avec le LAZER ($F_{3,8} = 57,64$), après la première (S1 : Témoin vs DR ; $p<0,0001$) et la deuxième semaine de traitement (S2 : Témoin vs DR ; $p<0,0009$) comparativement aux témoins (Fig. 10C).

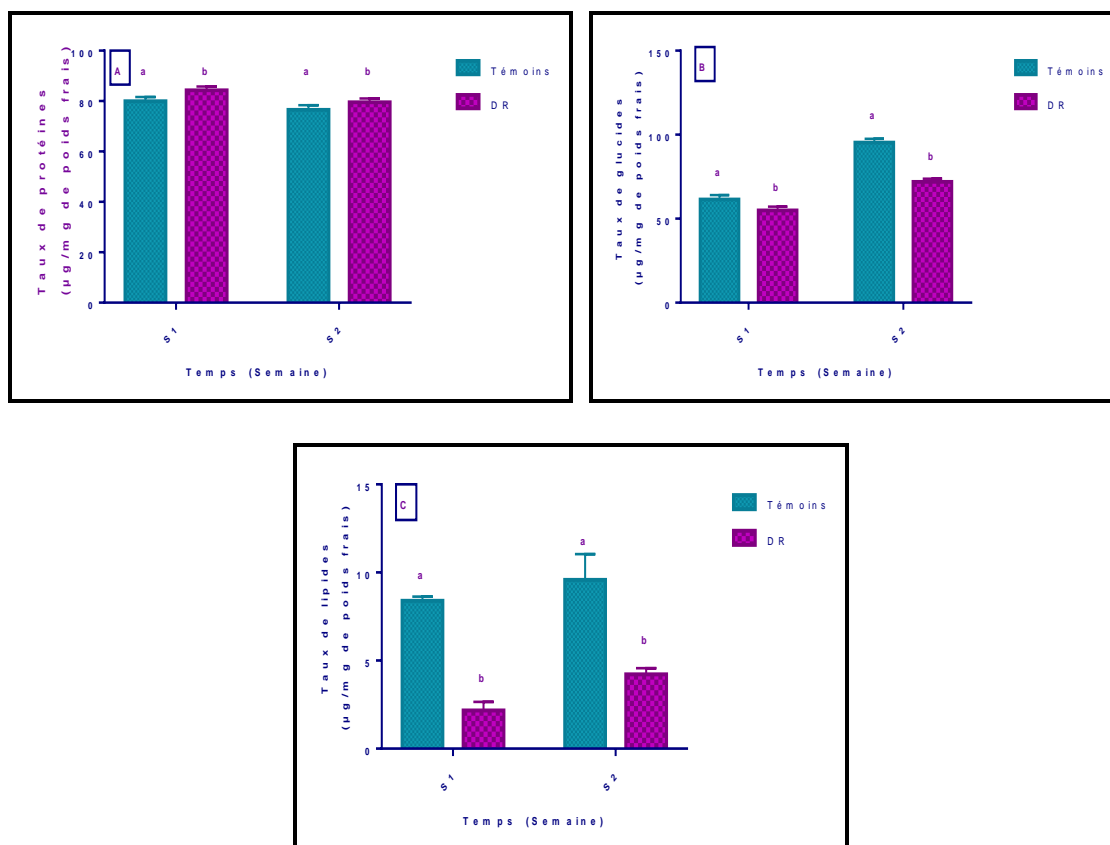


Figure 10. Effet du LAZER sur le taux de protéines (A), glucides (B) et lipides totaux (C) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) chez les juvéniles d'*H. vermiculata* ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ pools contenant chacun des portions de 100-200 mg de tissu frais) : Test t de Student.

3.4. Effet sur les biomarqueurs du stress oxydatif

Les résultats obtenus dans la figure 11A présentent l'effet de l'insecticide LAZER sur l'activité spécifique de la LDH chez les juvéniles d'*H. vermiculata* après deux semaines de traitement. Les résultats montrent une augmentation significative de ce biomarqueur chez les traités au cours de la première (Témoin vs DR ; $p < 0,0001$) et la deuxième semaine (Témoin vs DR ; $p < 0,0001$) comparativement aux témoins.

Concernant l'activité spécifique des glutathion-S-transférases (Fig.11B), les résultats ont induit une diminution significative de ce biomarqueur chez les juvéniles d'*H. vermiculata* à 1 semaine (Témoin vs DR S1 ; $p < 0,0001$) et à 2 semaines de traitement (Témoin vs DR ; $p < 0,0001$) comparativement aux témoins.

Enfin, le taux de la Glutathion-peroxydase révèle une augmentation significative de ce biomarqueur chez les juvéniles d'*H. vermiculata* traités au cours de la première et la deuxième semaine (S1 : Témoin vs DR : $p < 0,0001$; S2 : Témoin vs DR ; $p < 0,0001$) comparativement aux témoins (Fig.11C).

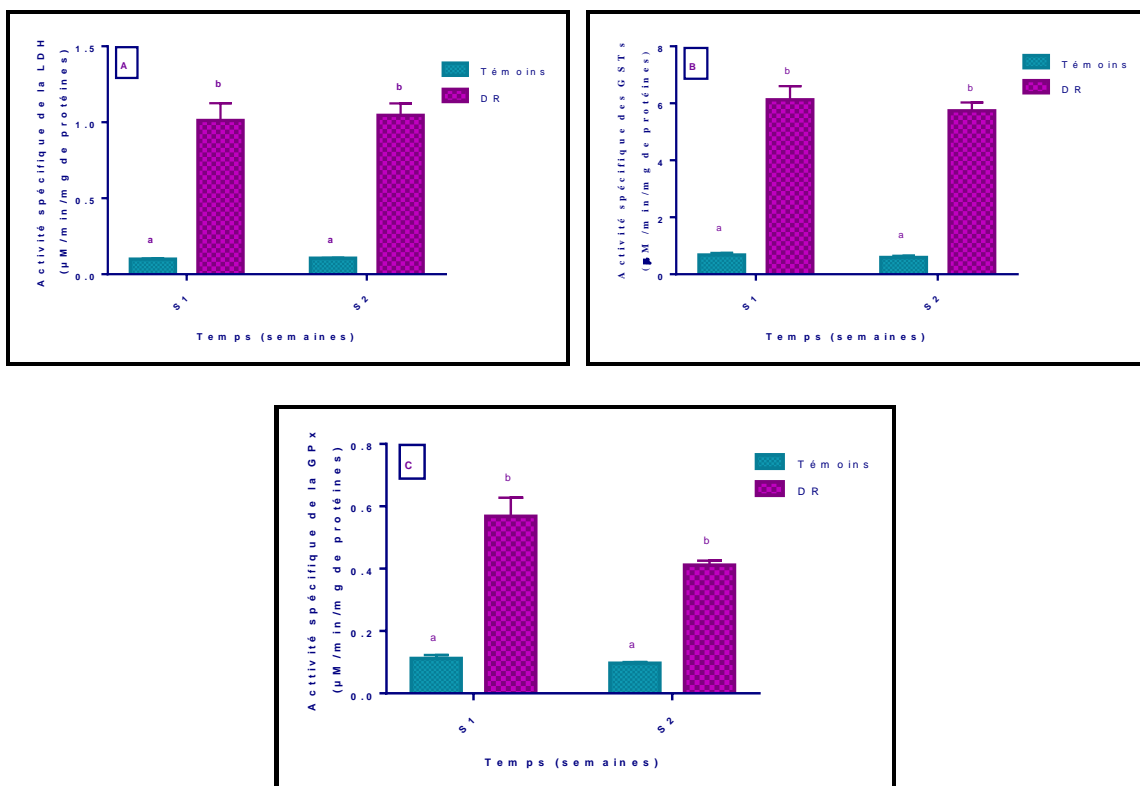


Figure 11. Effet du LAZER sur l'activité spécifique de la LDH (A), des GSTs (B) et de la GPx (C) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les juvéniles d'*H. vermiculata* ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ pools contenant chacun 100-200 mg de tissu frais) : Test t de Student.

3.5. Effet sur les biomarqueurs physiologiques

Les résultats obtenus dans la figure 12A présentent l'effet de l'insecticide, LAZER (DR) sur l'activité spécifique de la phosphatase alcaline chez les juvéniles d'*H. vermiculata* après deux semaines de traitement. Ces derniers montrent une augmentation significative de ce biomarqueur chez les traités au cours de la première et la deuxième semaine (S1 : Témoin vs DR ; $p < 0,0001$; S2 : Témoin vs DR ; $p < 0,0001$) comparativement aux témoins.

Une augmentation significative de l'activité spécifique de l'alanine amino transférase ALT (TGP) a été observée chez les juvéniles d'*H. vermiculata* traités par le LAZER (DR) après la deuxième

semaine seulement (Témoin vs DR ; $p=0,0093$). Aucun effet n'a été enregistré au cours de la première semaine (Témoin vs DR ; $p=0,1295$) (Fig. 12B).

Les résultats mentionnés dans la figure 12C montrent que cet insecticide n'exerce aucun effet sur l'aspartate amino transférase AST (TGO) chez les juvéniles d'*H. vermiculata* traités au cours de la première et la deuxième semaine (Témoin vs DR ; $p>0,05$).

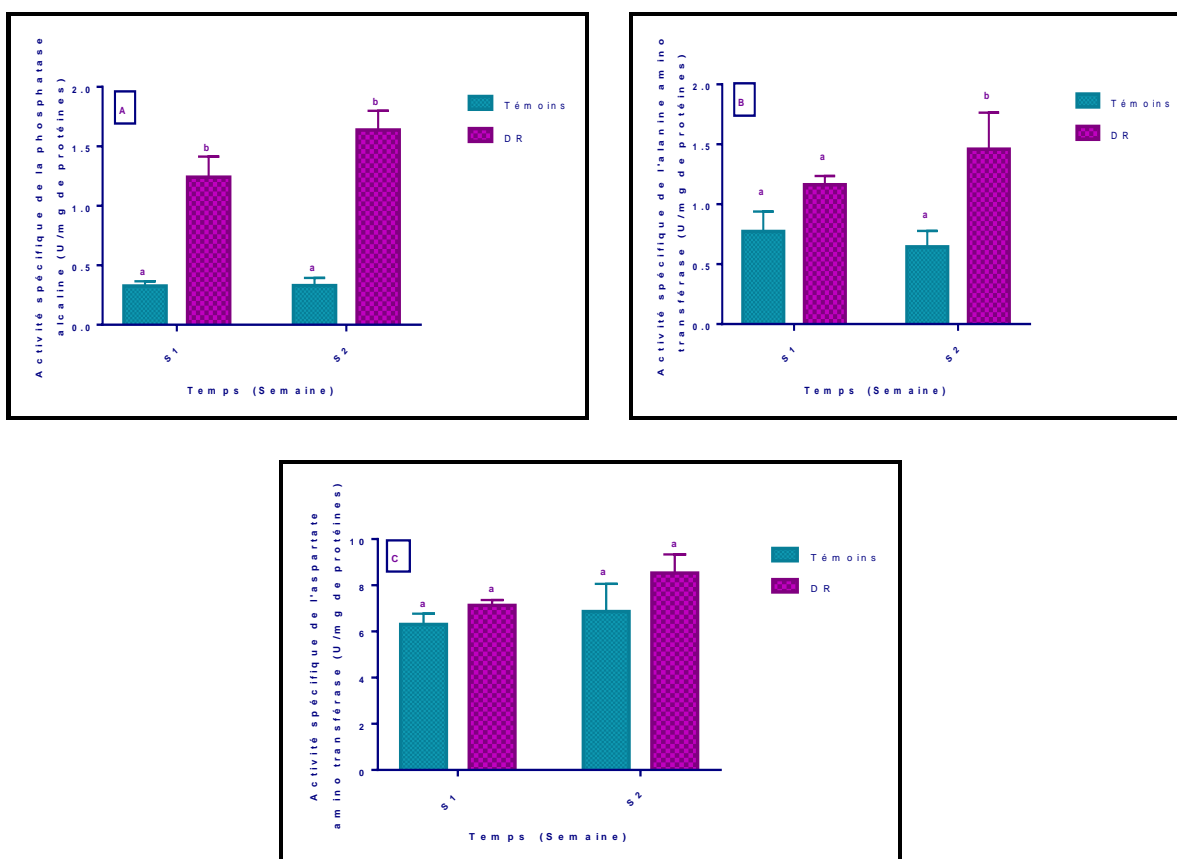


Figure 12. Effet du LAZER sur l'activité spécifique de la PAL (A), de la ALT (B) et la AST (C) (U/mg de protéines) chez les juvéniles d'*H. vermiculata* ($m \pm SEM$, $n=3$ pools contenant chacun 100-200 mg de tissu frais) : Test t de Student.

3.6. Effet du traitement sur les enzymes digestifs

3.6.1. Effet sur l'activité de la protéase

Les résultats représentés dans la figure 13A révèlent une diminution significative de l'activité de cette enzyme chez les juvéniles traités (DR) au cours de la première et la deuxième semaine (S1 : Témoin vs DR : $p=0,0035$; S2 : Témoin vs DR : $p=0,0051$) comparativement aux témoins.

3.6.2. Effet sur l'activité de la lipase

En ce qui concerne l'activité spécifique de la lipase chez les juvéniles *H. vermiculata* après deux semaines de traitement avec le LAZER (DR) (Fig. 13B), les résultats montrent une diminution significative au cours de la première (Témoin vs DR ; $p=0,0016$) et la deuxième semaine (Témoin vs DR ; $p=0,0052$) comparativement aux témoins.

3.6.3. Effet sur l'activité de l' α -amylase

Les résultats du dosage de l' α -amylase montrent une diminution de l'activité de ce biomarqueur chez les traités au cours de la première et la deuxième semaine (S1 : Témoin vs DR : $p<0,0001$; S2 : Témoin vs DR ; $p=0,0005$) comparativement aux témoins.

3.6.4. Effet sur la chitinase

L'activité spécifique de la chitinase chez les juvéniles *H. vermiculata* témoins et traités avec le LAZER (DR), est mentionnée dans la figure 13D.

Les résultats montrent une diminution de l'activité de cette enzyme chez les traités au cours de toute la période testée (S1 : Témoin vs DR ; $p=0,0006$; S2 : Témoin vs DR ; $p<0,0001$) comparativement aux témoins.

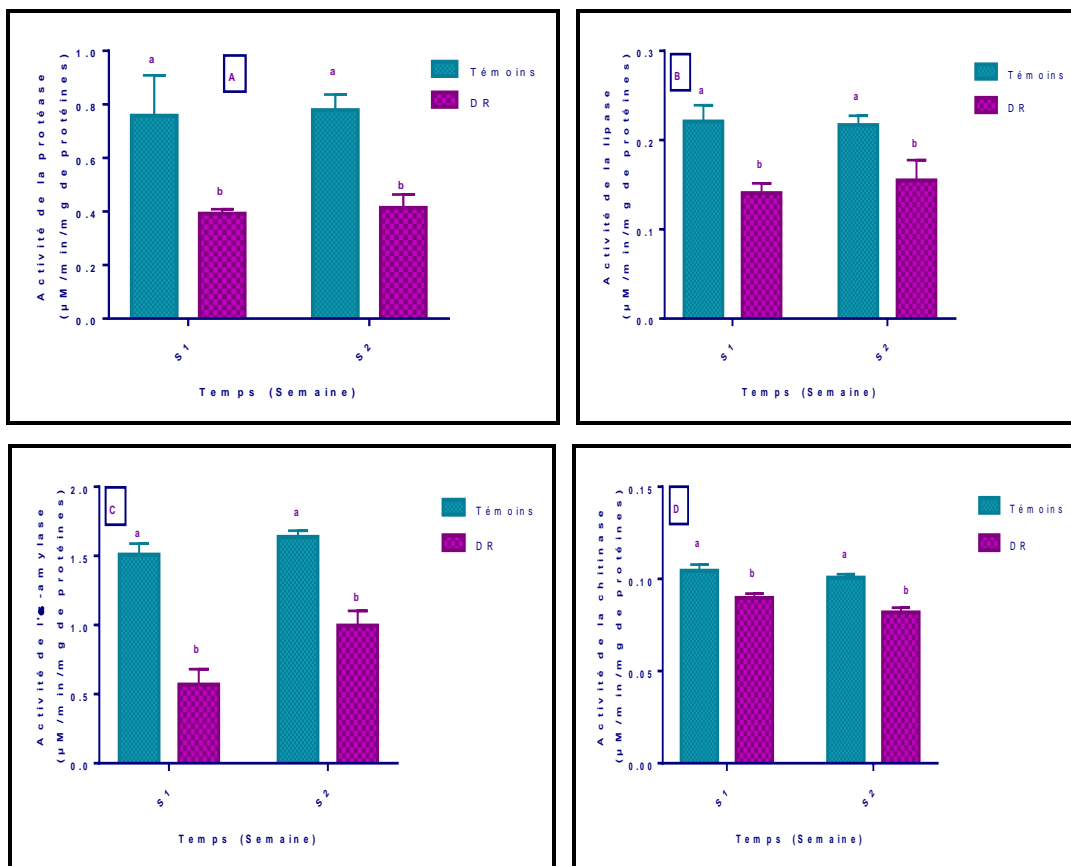


Figure 13. Effet du LAZER sur l'activité spécifique de la protéase (A), lipase (B), α -amylase (C) et chitinase (D) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les juvéniles d'*H. vermiculata* ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ pools contenant chacun 100-200 mg de tissu frais : Test t de Student.

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

4.1. Effet du traitement sur la mortalité

Les essais toxicologiques au laboratoire sont des outils importants pour prédire les effets des substances toxiques dans les écosystèmes terrestres. Utilisant les escargots dans ces tests est une technique attrayante puisque ces derniers présentent beaucoup d'avantages ; leur collecte facile, leur alimentation simple et leur réactions rapides aux contaminants présents dans l'environnement (Gomot-de Vaufleury & Bispo, 2000 ; Radwan *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus au cours de nos expérimentations ont montré une mortalité nulle chez les escargots traités avec le Lazer. Par contre, le taux de mortalité observé chez *Helix aspersa* traité pendant 8 semaines avec le thiaméthoxame et le tefluthrine est de 10,66% (Ait Hamlet *et al.*, 2019). Les résultats de Mona & El Kazafy (2019) ont montré des taux de mortalité de 100%, 73,3% et 60,0% après l'application d'une faible concentration d'indoxacarbe, d'abamectine et de spiromésifène, respectivement, chez des adultes d'*E. vermiculata*. De plus, une augmentation du pourcentage de mortalité a été constatée chez *Helix aspersa* traité par le ZnO pendant quatre semaines, car les résultats affichent des taux de 30%, 50% et de 40% pour les concentrations suivantes : 5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g respectivement (Grara *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'étude d'Abdelmonem (2016) montre une mortalité de 16,63 %, 47,77 % et 92,22 % chez l'espèce, *Eobania vermiculata* exposée à 25, 125 et 500 µg respectivement de l'insecticide, Lannate. Cependant, les mortalités observées chez *H. vermiculata* traité par le Decis, le Zoom et le Weatfert affichent des taux de 11,6 % ; 3,57% et 8,03% respectivement (Attia *et al.*, 2022). Un taux de mortalité de 13% a été observé chez *Helix aspersa* traité avec le carbaryl (5mg/kg) pendant 14 jours (Schuytema *et al.*, 1994).

4.2. Réponses comportementales des escargots

Au cours de cette étude, plusieurs comportements ont été observés au cours de l'exposition des escargots aux traitements tels que l'incapacité des escargots à se nourrir normalement et l'évitement de la nourriture, diminution de l'activité locomotrice et le positionnement des animaux au sommet des terrariums.

Les travaux de Bourbia-Ait Hamlet (2013) ont montré que tous les escargots fuient la nourriture, se positionnent au sommet des boîtes, et n'ont pratiquement pas d'activité locomotrice, dès la

première semaine de traitement par le téfluthrine, le thiaméthoxam. De plus, la consommation de la laitue contaminée diminuait d'une façon dose-dépendante. Les mêmes observations ont été constatées chez *H. vermiculata* traité par le Decis, le Zoom et le Weatfert (Attia *et al.*, 2021). Les travaux de Coeurdassier *et al.* (2001), ont montré une diminution de la consommation alimentaire ce qui a provoqué une inhibition de la croissance et de la survie des escargots traités par le diméthoate.

4.3. Effet des traitements sur la croissance des escargots

Les modifications de la masse corporelle sont utilisées comme biomarqueurs écologiques pertinents, car on croit que les pertes élevées de cette masse ont des effets négatifs sur la survie et la reproduction (Dittbrenner *et al.*, 2010).

Le LAZER (lambda cyhalothrine et Pyrimicarbe) n'exerce aucun effet sur la prise du poids et le diamètre de la coquille des escargots juvéniles pendant toute la période de traitement. Par contre, Coeurdassier *et al.* (2001) ont observé une diminution de la croissance dose-dépendante chez les escargots traités par le diméthoate. Les résultats obtenus par Attia *et al.* (2021) ont montré que l'application de l'insecticide, le Zoom, de l'herbicide, le Decis et de l'engrais, le Weatfert a induit une inhibition de la croissance des juvéniles d'*H. vermiculata* traduite par une diminution du poids corporel et du diamètre de la coquille. En revanche, Gomot (1997) explique que le mécanisme impliqué dans l'inhibition de croissance des escargots nourris avec de la nourriture contaminée est difficile à identifier. Il pourrait s'agir d'une inhibition dans la synthèse d'une hormone de croissance essentielle au développement des escargots et/ou de leurs organes. Aussi en présence de fortes concentrations des traitements, l'inhibition de la prise de poids peut être due à la répulsion de la nourriture, et donc au jeûne prolongé des escargots.

Dans d'autres études, une augmentation remarquable du poids de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* traité pourrait être due à l'accumulation du carbofuran et leurs métabolites au niveau des hépatocytes en vue d'une détoxification ou d'un effet d'induction enzymatique (Wayland *et al.*, 1991).

En ce qui concerne le diamètre de la coquille, des résultats similaires ont été signalés par Druart (2011) qui n'a observé aucun effet sur le diamètre de la coquille, après 168 jours de leur exposition au Glyphosate et au Glufosinate. Par contre, les résultats de Schuytema *et al.* (1994) ont montré une réduction significative du poids et du diamètre de la coquille d'*Helix aspersa* traité à

l'aminocarbe, au méthyle parathion et au paraquat ; les réponses observées variaient selon le type de pesticides et la dose administrée. Une diminution de 30% du diamètre de la coquille des escargots a été également démontrée par Gimbert *et al.* (2008). D'autre part, Bluzat & Seuge (1979) ont montré une diminution de la croissance des coquilles chez le mollusque, *Lymnea stagnalis* traité par le carbaryl et le lindane.

4.4. Effet du traitement sur la composition biochimique

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

Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes connues (Mahler *et al.*, 1968). Ils sont principalement impliqués dans l'architecture de la cellule, et pendant les périodes de stress chronique, ils constituent aussi une autre source d'énergie (Padmaja & Rao, 1994). Nos résultats montrent une augmentation significative du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas. Des résultats similaires ont été signalés par Besnaci *et al.* (2022) chez *Helix aspersa* traité avec l'oxyde de silicium, aussi une augmentation du taux de protéines a été observée chez *Biomphalaria alexandrina* traitée par deux pesticides, Roundup et Atrazine (Barky *et al.*, 2012). Les travaux de Attia *et al.* (2021) ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines chez la même espèce, *E. vermiculata* sous l'effet d'un stress chimique par l'engrais Weatfert. Aussi, le traitement des vers de terre de l'espèce *Lumbricus terrestris* traités par le Sekator et le TSP (herbicide et engrais) révèle une augmentation significative de ce métabolite (Mekahlia *et al.*, 2016). Par contre, le traitement de la même espèce, *Eobania vermiculata* par deux engrais ; l'Urée et le NPK ne montre aucun effet sur les protéines totales comparées aux escargots témoins (Gueddouch., 2017).

Les glucides sont des molécules organiques qui jouent un rôle plus important comme source d'énergie. L'application de l'insecticide, le LAZER sur *H. vermiculata* induit une diminution du taux de glucides au niveau de l'hépatopancréas. Les mêmes observations ont été mentionnées après exposition des escargots au paracétamol au niveau des deux organes d'*Helix aspersa* (hépatopancréas et rein) (Tebboub *et al.*, 2021). De même, la réduction du glycogène tissulaire a été signalée chez les escargots de boue (*Amphibola crenata*) exposés au cadmium (De Silva *et al.*,

2018) et chez *H. vermiculata* traité par le Decis, le Zoom et le Weatfert (Attia *et al.*, 2021). De même Halaimia (2022) a observé une réduction des réserves énergétiques chez les vers de terre, *Aporrectodea caliginosa* traitée par les engrais chimiques NPK et TSP. Par contre, aucun effet n'a été signalé chez *Helix vermiculata* traitée par l'Urée et le NPK (Gueddouch, 2017).

Les lipides jouent un rôle extrêmement important dans le fonctionnement normal d'une cellule. Ils servent non seulement de forme de stockage d'énergie très réduite, mais ils jouent également un rôle intime dans la structure des membranes cellulaires et des organites trouvés dans la cellule (Kandil *et al.*, 2009). Les résultats de notre recherche montrent une diminution du taux de lipides totaux chez les escargots traités par le pesticide LAZER au cours le période de traitement. Des résultats similaires ont été constatés par Bourbia (2013) après traitement des escargots par le thiaméthoxame, chez *H. aspersa* traité par Nanoparticule (ZnO) (Grara *et al.*, 2016) et chez *H. vermiculata* traité par le Weatfert, le Decis et le Zoom (Attia *et al.*, 2021).

4.5. Effet du traitement sur les biomarqueurs du stress oxydatif

4.5.1. Effet sur l'activité de la lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme qui contribue à faciliter le processus de transformation du sucre en énergie, afin que les cellules puissent les utiliser. C'est une enzyme glycolytique importante présente dans pratiquement tous les tissus (Kaplan & Pesce, 1996). Ce biomarqueur joue un rôle clé dans le maintien de l'équilibre entre le catabolisme et l'anabolisme des glucides (Chen *et al.*, 2001). La présente étude a montré une augmentation de l'activité du LDH chez les escargots d'*E. vermiculata* traités avec le LAZER par rapport aux groupes témoins. Des résultats similaires ont été observées chez *Lymnaea natalensis* exposé au niclosamide (Farid *et al.*, 2009), chez *E. vermiculata* exposé au lannate (Khalil, 2016), au Weatfert, au Zoom et au Decis (Attia, 2022) et chez *Helix aspersa* traité aux métaux lourds (Abdel-Halim *et al.*, 2013).

L'élévation de l'activité de la LDH pourrait être le résultat de la synthèse accrue d'enzymes pour se défendre contre le stress et augmenter les sources de production d'énergie par la dégradation des nucléotides et des acides aminés riches en énergie (Mosleh *et al.*, 2003).

4.5.2. Effet sur l'activité des glutathion-S-transférases

Les glutathion-S-transférases représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles, essentiellement cytosoliques impliquées, dans des opérations diverses de transport et de biosynthèse intracellulaire (Vontas *et al.*, 2000). Les résultats de notre étude montrent une augmentation de ce biomarqueur au niveau de l'hépatopancréas des escargots *E. vermiculata* traités avec le LAZER comparativement aux témoins. Les mêmes résultats ont été signalés chez *H. vermiculata* traité par les pesticides et l'engrais, chez *T. pisana* traité par le Carbamate (Radwan *et al.*, 1992) et l'Abamectine (EL-Gendy *et al.*, 2009), chez *C. penctatus* traité par le Malathion (Pandey *et al.*, 2005), chez *C. aspersum* traité par l'Imidaclopride (Radwan & Mohamed, 2013), chez *H. aspersa* traité par le Thiaméthoxame (Aït Hamlet *et al.*, 2016), chez *C. apertus* exposé au Carbaryl (Leomanni *et al.*, 2015).

L'augmentation de l'activité des GSTs semble être une réponse aux polluants, ce qui entraîne l'induction du système de protection antioxydant ainsi que l'élimination des polluants par la formation de conjugués de glutathion (Bhavan & Geraldine, 2000).

4.5.3. Effet sur l'activité de la glutathion peroxydase

La GPx est l'un des systèmes de défense antioxydant très puissant, il réduit le H₂O₂ en H₂O et protège l'organisme contre l'effet cancéreux de cette substance (Zhu *et al.*, 2010). Nos résultats montrent une augmentation significative de l'activité de la GPx chez *E. vermiculata* traité au pesticide, LAZER. Des résultats similaires ont été signalés chez les vers de terre d'*E. fetida* traité par l'AgNP (Das *et al.*, 2018), chez *E. vermiculata* exposé à l'engrais, Weatfert (Attia *et al.*, 2021) et chez *Biomphalaria Alexandrina* exposée à un engrais azoté (El-Deeb *et al.*, 2017). De plus, une induction de l'activité de cette enzyme a été signalée dans l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* traités par les nanoparticules de l'oxyde du fer (Fe₂O₃) (Besnaci *et al.*, 2019).

4.6. Effet sur les biomarqueurs physiologiques

La phosphatase alcaline (PAL) est responsable de la dégradation des esters de phosphate. De plus, elle est utilisée comme indicateur de l'état des voies d'absorption et de transport dans la membrane cellulaire. Notre étude montre une augmentation significative de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) chez *H. vermiculata* traité à l'insecticide, le LAZER. Des résultats

identiques ont été mentionnés chez les rats traités par le chlorpyrifos (Benzidane, 2012), et chez les lapins traités par le chlorure de nickel et le chlorpyrifos (Toualbia, 2018). Par contre, les résultats de Kihal *et al.* (2016) ont révélé une diminution de ce biomarqueur chez les souris traitées par la deltaméthrine et la cyperméthrine. Ces observations ont été signalées dans plusieurs travaux (El-Missiry, 1993 ; El-Fakharany *et al.*, 2011 ; El-Demerdash *et al.*, 2012). En outre, l'application du spiromesifène sur les rats montre également une diminution de l'activité de PAL (Amiour & Leghouchi, 2017).

En ce qui concerne les transaminases (TGP ; TGO) qui sont des enzymes présentes à l'intérieur des cellules, en particulier au niveau du foie et des muscles, elles interviennent dans une multitude de réactions biologiques. Nos résultats montrent une augmentation de l'activité de la TGO chez les escargots traités par le LAZER par rapport aux témoins. Des résultats similaires ont été enregistrés chez les lapins traités par le pesticide métribuzine traduite par une élévation de l'activité de ces transaminases (Rezzag & Serouti, 2015 ; Kihal *et al.*, 2016). L'étude de Chiali *et al.* (2013) montre également une augmentation de l'activité des transaminases (TGO et TGP) chez les rats exposés à de faibles doses de la métribuzine. L'activité de l'ALAT et ASAT a significativement augmenté chez les escargots traités avec le lannate de méthomyle (Abdelmonem, 2016).

4.7. Effet sur les enzymes digestives

Dans l'intestin, les enzymes digestives hydrolysent les macromolécules alimentaires en des molécules plus petites facilitant ainsi leur absorption. Les protéines, l'amidon et les triglycérides constituent la majorité des macromolécules alimentaires et sont hydrolysés respectivement par les protéases, les amylases et les lipases. La synthèse et la sécrétion des enzymes digestives sont contrôlées durant le processus de digestion par différents mécanismes nerveux, hormonal paracrine et prandial (Lehane *et al.*, 1995). La digestion est également influencée par les conditions physico-chimiques de l'intestin principalement le pH (Douglas, 2013).

Les protéases sont importantes dans la digestion des aliments et convertir les protéines en acides aminés nécessaires pour l'organisme. Les lipases sont des enzymes qui hydrolysent les liens des molécules lipidiques (Yazdani *et al.*, 2014).

Dans notre recherche, le LAZER cause la diminution de l'activité de la protéase et de la lipase. Les mêmes résultats ont été constatés chez les larves d'*E. kuehniella* traitées par l'HE de *Teucrium polium* (Shahriari *et al.*, 2017), *C. medinalis* exposé aux insecticides botaniques (Senthil-Nathan *et al.*, 2006), chez *Helicoverpa armigera* exposée à l'HE d'*Artemisia annua* (Malahat *et al.*, 2015). En revanche, les insecticides botaniques peuvent affecter la sécrétion de certains types de protéases (Zibae & Bandani, 2010 ; Khosravi & Jalali, 2013). Par contre, Soliman & Ghareeb, 2021 ont rapporté une augmentation du taux de la protéase et une forte diminution de l'activité de la lipase chez *Eobania vermiculata* traité aux nitrate d'ammonium et certains biopesticides. La diminution de l'activité de la lipase pourrait induire une perturbation des processus de digestion et d'absorption (Napoleão *et al.*, 2013).

L' α -amylase est une enzyme digestive qui hydrolyse les liaisons des polysaccharides tels que l'amidon en maltose (disaccharide) et le glycogène en glucose (Terra & Ferreira, 2005). Nos résultats montrent que l'application du pesticide, le LAZER sur les escargots a réduit l'activité α -amylase, ce qui concorde avec plusieurs travaux. Cette réduction a été constatée chez *P. americana* (Paranagama *et al.*, 2001), chez *P. interpunctella* (Rharrabe *et al.*, 2008), *Glyphodes pyloalis* (Khosravi et Sendi, 2013) et chez *Tribolium castaneum* (Sami, 2014) traités avec l'azadirachtine. En outre, Bigham *et al.* (2010) a signalé une diminution de l'activité de α -amylase chez les larves de *M. domestica* traitées par l'HE de *Teucrium polium*. Les mêmes observations ont été constatée chez *E. kuehniella* traitée aux pesticides botaniques (Shahriari & Sahebzadeh, 2017). En ce qui concerne les résultats de Soliman & Ghareeb, 2021, tous les traitements (nitrate d'ammonium et certains biopesticides) ont entraînés une nette baisse de l'activité de cette enzyme chez *Eobania vermiculata*.

Les chitinases hydrolysent les liaisons glycosidiques des molécules de chitine (Merzendorfer & Zimoch, 2003) et elles interviennent dans la formation et la dégradation de la membrane péritrophique qui protège l'épithélium intestinal (Shen & Lorena, 1997). Nos résultats montrent que l'insecticide LAZER réduit l'activité de la chitinase chez *H. vermiculata*. Des résultats similaires ont été rapportés chez les larves et les adultes mâles et femelles de *D. melanogaster* traités avec l'azadirachtine (Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2016).

CONCLUSION

V. CONCLUSION

Le travail réalisé, nous a permis d'évaluer chez un escargot, *Eobania vermiculata*, l'effet d'un pesticide, LAZER appliqué par ingestion, sur la mortalité, la croissance et la composition biochimique. L'activité des biomarqueurs du stress oxydatif, les biomarqueurs physiologiques et les enzymes digestives ont été également déterminés.

L'application de ce pesticide induit une perturbation de la croissance des juvéniles, traduite par une diminution du poids des individus et du diamètre de la coquille. L'étude biochimique montre que le traitement appliqué, induit un épuisement des réserves énergétiques (glucides et lipides) et une augmentation du taux de protéines chez les juvéniles d'*H. vermiculata*.

De plus, ce traitement provoque une induction des biomarqueurs du stress oxydatif, tels que la glutathion peroxydase (GPX), la lactate déshydrogénase (LDH), et les glutathion -S transférases (GSTs). Par ailleurs, une augmentation significative des biomarqueurs physiologiques tels que l'alanine amino transférase ALT (TGP), l'aspartate amino transférase AST (TGO) et la phosphatase alcaline (PAL) a été constatée.

L'activité spécifique des enzymes digestives chez les juvéniles d'*E. vermiculata* est également perturbée sous l'effet du pesticide. Les résultats révèlent une diminution significative de l'activité de l' α -amylase, la chitinase, la lipase et la protéase.

A l'avenir, il serait intéressant de poursuivre la recherche pour bien connaître le mécanisme d'action de ce pesticide en évaluant :

- L'effet de cet insecticide sur les paramètres de reproduction chez cette espèce
- L'effet sur un biomarqueur de neurotoxicité, l'acétylcholinestérase (AChE)
- L'effet de ce traitement sur la structure histologique de l'hépatopancréas.

RESUMES

VI. RESUME

La présente étude a été menée afin d'évaluer les effets d'un pesticide LAZER, sur les juvéniles d'un gastéropode bioindicateur de pollution, *Helix vermiculata* dans les conditions de laboratoire.

Les effets de cet insecticide ont été examinés sur la croissance, la composition biochimique et les biomarqueurs du stress oxydatif des juvéniles d'*H. vermiculata*. Les biomarqueurs physiologiques et les enzymes digestives ont été également déterminés.

Les résultats obtenus montrent que le LAZER n'exerce aucun effet sur la croissance des juvéniles d'*H. vermiculata* (poids et diamètre). Par ailleurs, l'étude biochimique montre que l'insecticide induit un épuisement des réserves énergétiques (glucides et lipides) et une augmentation du taux de protéines chez les juvéniles d'*H. vermiculata*.

L'application de ce pesticide a provoqué également une augmentation des biomarqueurs du stress oxydatif, tels que la LDH, la GPx, et les GSTs. En outre, ce traitement provoque une augmentation des biomarqueurs physiologiques tels que la PAL et la TGP, tandis qu'aucun effet n'a été signalé sur l'activité du TGO.

L'insecticide LAZER perturbe également l'activité des enzymes digestives chez les juvéniles traités comparativement aux témoins. En effet, le traitement réduit l'activité spécifique de la protéase, la lipase, l' α amylase et la chitinase.

Mots clés : *Helix vermiculata*, Insecticide, Croissance, Composition biochimique, Biomarqueurs du stress oxydatif, Enzymes digestives.

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the effects of the insecticide LAZER on juveniles of a gasteropod bioindicator of pollution, *Helix vermiculata* under laboratory conditions.

The effects of this insecticide were examined on the growth, biochemical composition and oxidative stress biomarkers of juveniles of *H. vermiculata*. Additionally, physiological biomarkers and digestive enzymes were also determined.

The results obtained show that LAZER has no effect on the growth of juveniles of *H. vermiculata* (weight and shell diameter). However, the biochemical study shows that the insecticide induces a depletion of energy reserves (carbohydrates and lipids) and an increase in protein rate in juveniles of *H. vermiculata*.

In addition, the application of this pesticide caused an increase in oxidative stress biomarkers, such as LDH, GPx, and GSTs.

Also, this treatment revealed an increase in the physiological biomarkers such as PAL and TGP. While, no effects have been reported on TGO activity.

LAZER insecticide also disrupted the activity of digestive enzymes in treated juveniles compared to controls. Indeed, the treatment reduces the specific activity of protease, lipase, α - amylase and chitinase.

Keywords: *Helix vermiculata*, Insecticide, Growth, Biochemical composition, Biomarkers, Oxidative stress, Digestive enzymes.

يهدف العمل المقدم إلى تقييم آثار مبيد حشري LAZER على المؤشر الحيوي لللافقاري ; الحلزونات غير الناضج ، *Helix vermiculata* تحت ظروف المختبر.

تم فحص آثار هذا المبيد الحشري على النمو، والتركيب الكيميائي الحيوي والمؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي للحلزونات غير الناضجة *H. vermiculata*. بالإضافة إلى ذلك، المؤشرات الحيوية الفسيولوجية و الإنزيمات الهضمية تم دراستها.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها ان LAZER ليس له أي تأثير على نمو الحلزونات غير الناضجة ، *Helix vermiculata* ، ومن ناحية أخرى يؤدي الى انخفاض في محتوى الكربوهيدرات والدهون وزيادة محتوى البروتين بالإضافة إلى ذلك، تسبب تطبيق هذا المبيد في زيادة المؤشرات الحيوية مثل GPX ، LDH و GSTs . من ناحية أخرى، زيادة كبيرة في المؤشرات الحيوية الفسيولوجية PAL و TGP و في حين لم يذكر أي تأثير على TGO.

كما يعطل المبيد الحشري LAZER نشاط الإنزيمات الهضمية في الحلزونات غير الناضجة المعالجة مقارنة بالشواهد. في الواقع يقلل المبيد من نشاط البروتيناز، الليباز ، α -الاميلاز، الكيتيناز.

الكلمات المفتاحية: *Helix vermiculata*، المبيدات الحشرية، النمو، التركيب الكيميائي الحيوي، المؤشرات الحيوية، الإجهاد التأكسدي، الإنزيمات الهضمية

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdel-Halim, K. Y., El-Saad, A. A., 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. *Chemosphere*. 93(6): 1131-1138.

Abdelmonem, M. K. (2016). Impact of methomyl lannate on physiological parameters of the land snail *Eobania vermiculata*. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 74: 1-7.

Aït Hamlet, S., Bensoltane, S., Djekoun, M. & Berrebbah, H. (2016). Evaluation of acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and catalase activities in the land snail *Helix aspersa* exposed to thiamethoxam. *Journal of Entomology and Zoology*. 4: 369-374.

Aït Hamlet, S., Djekoun, M., Bensoltane, S. & Berrebbah, H. (2019). Effets du thiaméthoxame et de la téfluthrine sur les biomarqueurs physiologiques de l'escargot terrestre *Helix aspersa*. *Agrobiologia*. 9(2) : 1491-1498.

Amiour, C. & Leghouchi, E. R. (2017). Étude de la toxicité chez les rats d'un mélange de pesticides commercialisés. Mémoire de Master. Université de Jijel.

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*. 100: 32-61.

Attia, L. (2022). Impact des pratiques agricoles sur les organismes non visés, cas d'un gastéropode bioindicateur de pollution, *Helix vermiculata* (Müller, 1774). Thèse de Doctorat en Biologie Animale, Université de Larbi Tébessi. 88p.

Attia, L., Tine, S., Tine-Djebbar, F., & Soltani, N. (2021). Potential hazards of an inorganic fertilizer (Weatfert) for the brown garden snail (*Eobania vermiculata* Müller, 1774): Growth, Histological and Biochemical changes and biomarkers. *Applied Ecology and Environmental Research*. 19(3):1719-1734.

Aubertot, J. N., Barbier, J. M., Carpentier, A., Gril, J. N., Guichard, L., Lucas, P., & Savini, I. (2005). Pesticides, agriculture, environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Thèse de Doctorat. INRA.

B

Bairi, Y., Sifi, K., & Soltani, N. (2017). Growth and responses of biomarkers in the snail *Helix aspersa* (Mollusca, Gastropoda) used as bioindicator of soil pollution in Northeast of Algeria. In *Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration* Springer, Cham. Pp. 339-341.

Barky, F. A., Abdelsalam, H. A., Mahmoud, M. B., & Hamdi, S. A. (2012). Influence of Atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 104(1): 9-18.

Beghoul, A., Kebieche, M., Gasmı, S., Chouit, Z., Amiour, C., Lahouel, A., & Soulimani, R. (2017). Impairment of mitochondrial integrity and redox status in brain regions during a low-dose long-term exposition of rats to pyrethrinoids: the preventive effect of quercetin. *Environmental Science and Pollution Research*. 24(24) : 19714-19722.

Benzidane, C. (2012). Effet toxique des résidus des pesticides utilisés sur la flore de la région de Sétif. Mémoire de Magister en Biodiversité et gestion des écosystèmes, Université Ferhat Abbas, Sétif. 87p.

Bernfeld, P. (1955). Amylases, alpha and beta. *Methods in enzymology* I. 149-158.

Besnaci, S., Bensoltane, S., & Djekoun, M. (2019). Oxidative stress and histological changes Induced by the nano-Fe₂O₃ in *Helix aspersa*. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 20(2): 119-133.

Besnaci, S., Bouacha, M., Chaker, A., Babouri, Y., & Bensoltane, S. (2022). Impact des nanoparticules de silice fumée SiO₂ sur des indicateurs du stress oxydatif chez *Helix aspersa*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 91(1) : 11-22.

Bezzar-Bendjazia, R., Kilani-Morakchi, S., & Aribi, N. (2016). Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 133: 85-90.

Bhavan, P., & Geraldine P (2000). Aberration in various parameters of bioenergetic in the *Macrobrachium malcomsonii* following exposure to endosulfan. Aquaculture. 1:141-150.

Bigham, M., Hosseinaveh, V., Nabavi, B., Talebi, K., & Esmailzadeh, N. S. (2010). Effects of essential oil from *Teucrium polium* on some digestive enzyme activities of *Musca domestica*. Entomological Research. 40(1) : 37-45.

Bluzat, R., & Seuge, J. (1979). Etude de la toxicité chronique de deux insecticides (carbaryl et lindane) à la génération F1 de *Lymnea stagnalis* L. (mollusque gastéropode pulmoné). I. Croissance des coquilles. Hydrobiologia. 65(3) : 245-255.

Bourbia Ait Hamlet, S. (2013). Évaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar. 177p.

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(1-2): 248-254.

C

Chen, K., Liu, Q., Xie, L., Sharp, P.A., & Wang, D.I.C. (2001). Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. Biotechnology & Bioengineering. 72(1): 55-61.

Chiali, F. Z., Merzouk, H., Merzouk, S. A., Medjdoub, A., & Narce, M. (2013). Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. Pesticide Biochemistry and Physiology. 106(1-2): 38-44.

Coeurdassier, M., Saint-Denis, M., Vaufleury, A. G. D., 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: An International Journal*. 20(9) : 1951-1957.

Cortet, J., Gomot de Vaufleury, A., Poinsoot- Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., & Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*. 35 (3): 115-134.

D

Das, P., Barua, S., Sarkar, S., Chatterjee, S.K., Mukherjee, S., Goswami, L., & Bhattacharya, S.S. (2018). Mechanism of toxicity and transformation of silver nanoparticles: Inclusive assessment in earthworm-microbe-soil-plant system. *Geoderma*. 314: 73-84.

De Silva, N. A., Marsden, I. D., Gaw, S., & Glover, C. N. (2018). Acute waterborne cadmium toxicity in the estuarine pulmonate mud snail, *Amphibola crenata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 158 : 274-283.

Djatita, O. (2019). Évaluation des effets de l'herbicide Cossack sur les paramètres physiologiques de l'escargot « *Helix aspersa* ». Mémoire en vue de l'obtention d'un Diplôme de Master en Toxicologie, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A. P : 27.

Douglas, A. E. (2013). Alimentary canal, digestion and absorption. *The Insects: Structure and Function*. 46-80.

Druart, C., Millet, M., Scheifler, R., Delhomme, O., & De Vaufleury, A. (2011). Glyphosate and glufosinate-based herbicides: fate in soil, transfer to, and effects on land snails. *Journal of soils and sediments*. 11(8) : 1373-1384.

Duchateau, G., & Florkin, M. (1959). Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. 67(2): 306-314.

E

El-Deeb, F.A.A., Marie, M.A.S., Hasheesh, W.S., Hussein, R.M.A., & Sayed, S.S.M. (2017). Biomarkers of oxidative stress in *Biomphalaria alexandrina* snails for assessing the effects of certain inorganic fertilisers. *Molluscan Research*. 37(4): 289-294.

El-Demerdash, F.M., Dewer, Y., Elmazoudy, R.H., & Attia A.A. (2013). Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 65: 897-901.

El-Fakharany, I.I., Massoud, A.H., Derbalah, A.S., & Saad Allah M.S. (2011). Toxicological effects of methomyl and remediation technologies of its residues in an aquatic system. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 3(13): 332-339.

El-Gendy, K. S., Radwan, M. A., Gad, A. F., Khamis, A. E., & Eshra, E. H. (2019). Use of multiple endpoints to investigate the ecotoxicological effects of abamectin and thiamethoxam on *Theba pisana* snails. *Ecotoxicology and environmental safety*. 167: 242-249.

El Missiry, M.A. & Othman, A.I. (1993). Influence of lannate on biochemical and hematological parameters in old rats. *Journal of Egyptian German Society of Zoology*. 11: 219-229

F

Farid, N. M., Hamed, R. R., & Shokeer, A. G. (2009). Glutathione and its related enzymes in fasciola snails (*Lymnaea natalensis*): purification and characterization of glutathione transferase. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 5(4): 317-325.

Flohe, L., & Gunzler, W. A. (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods. Enzymology*. 105: 114-120.

G

Garcia-Carreno, F. L., & Haard, N. F. (1993). Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuronco des planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*. 17(2): 97-113.

Gimbert, F., Mench, M., Coeurdassier, M., Badot, P. M., & De Vaufleury, A. (2008). Kinetic and dynamic aspects of soil–plant–snail transfer of cadmium in the field. *Environmental Pollution*. 152(3) : 736-745.

Goldsworthy, G. J., Mordue, W., & Guthkelch, J. (1972). Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*. 18(3): 545-551.

Gomot, A., Rerat, A., Nordmann, R., & Boudene, C. (1997). Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. Utilisation des escargots comme bioindicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme.. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. 181(1): 59-75.

Gomot-de Vaufleury, A., & Bispo, A. (2000). Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. 1. Sublethal effects on growth. *Environmental science & Technology*. 34(9): 1865-1870.

Grara, N., Bouloudenine, M., Khaldi, F., Zenir, Z., & Abdemadjid, S. (2015). Caractérisation Morphophysologique de la Toxicité du ZnO (Nanoparticule manufacturée) sur l'escargot l'*Helix aspersa* bioindicateur de pollution de l'environnement. *Journal of Materials and Environmental Science*. 6 (9) : 2596-2603.

Gueddouche, M. (2017). Effet de certains engrais sur une espèce de gastéropode, *Helix vermiculata* : Biochimie et biomarqueurs. Mémoire de Master, Université Larbi Tébessi, Tébessa.

℥

Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249(22) :7130-7139.

Hill, B.R., & Levi, C. (1954). Elevation of a serum component in neoplastic disease. *Cancer Research*. 14 (7) : 513-515.

Halaimia, S. (2022). Evaluation des risques écotoxicologiques des engrais chimiques (NPKs et TSP) sur une espèce bioindicatrice de pollution, *Aporrectodea caliginosa*: croissance, composition biochimique et biomarqueurs du stress environnemental. Thèse de Doctorat en Biologie Animale, Université de Laarbi Tébessi. 136p.

I

Ismert, M., Oster, T., & Bagrel, D. (2002). Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolizing enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere*. 46(2): 273-280.

K

Kandil, M. A., El-Deeb, H. I., Mobarak, S. A., & Eweis, E. A. (2009). Biochemical impacts of methomyl and abamectin and their binary mixtures with acetylsalicylic acid against the land snails *Eobania vermiculata* and *Monacha obstructa*. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin*. 135: 545-561.

Kaplan, L. A., & Pesce, A. J. (1996). *Chemistry Theory, Analysis, and Correlation*. Mosby-Year Book. Pp: 1064.

Khalil, A.M. (2016). Impact of methomyl lannate on physiological parameters of the land snail *Eobania vermiculata*. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 74: 1-7.

Khosravi, R., & Sendi, J. J. (2013). Toxicity, development and physiological effect of *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* essential oils on *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of King Saud University Science*. 25 (4): 349-355.

Kihal, A., Labiad, W., & Mekircha, F. E. (2016). Recherche des effets toxiques d'une mixture binaire de deux pyrèthrinoides chez les souris. Thèse de Doctorat. Université de Jijel.

L

Lehane, M. J., Blakemore, D., Williams, S., & Moffatt, M. R. (1995). Regulation of digestive enzyme levels in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 110(2): 285-289.

Leomanni, A., Schettino, T., Calisi, A., Gorbi, S., Mezzelani, M., Regoli, F., & Lionetto, M. G. (2015). Antioxidant and oxidative stress related responses in the Mediterranean land snail *Cantareus apertus* exposed to the carbamate pesticide Carbaryl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 168: 20-27.

Mahler, H. R., & Brown, B. J. (1968). Protein synthesis by cerebral cortex polysomes: characterization of the system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125(2): 387-400.

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: An International Journal*. 19(8): 2085-2092.

Mekahlia, M.N., Tine, S., Menasria, T., Amieur, H., & Salhi, H. (2016). In vitro biomarker responses of earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to herbicide sekator and phosphate fertilizer. *Water, Air & Soil Pollution*. 227(1): 1-8.

Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*. 206 (24): 4393-4412.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31(3): 426-428.

Mona, A. H., & Al-Kazafy, H., S. (2019). Assessment of some new pesticides as molluscicides against the adult and eggs of chocolate banded snail, *Eobania vermiculata*. *Bulletin of the National Research Centre*. 43 :1-5.

Mojarab-Mahboubkar, M., Sendi, J. J., & Aliakbar, A. (2015). Effect of *Artemisia annua* L. essential oil on toxicity, enzyme activities, and energy reserves of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Protection Research*. 55(4) : 372-377.

Mosleh, Y.Y., Ismail, S.M.M., Ahmed, M.T., & Ahmed, Y.M. (2003). Comparative toxicity and biochemical responses of certain pesticides to the mature earthworm *Aporrectodea caliginosa* under laboratory conditions. *Environmental Toxicology*. 18(5): 338-346.

P

Padmaja, R.J., & Rao, M.B. (1994). Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53(1): 142-148.

Pandey, S., Kumar, R., Sharma, S., Nagpure, N. S., Srivastava, S. K., & Verma, M. S. (2005). Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air-breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61(1): 114-120.

Paranagama, P. A., Kodikara, K. A. B. C. H., Nishantha, H. M. I., & Mubarak, A. M. (2000). Effect of azadirachtin on midgut enzymes of cockroaches (*Periplanata americana*). *Journal of the National Science Foundation*. 29: 69-79.

Prashar, P., & Shah, S. (2016). Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. *Sustainable Agriculture Reviews*. 19: 331-361.

R

Radwan, M. A., El-Gendy, K. S., & Gad, A. F. (2010). Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*. 79(1): 40-46.

Radwan, M. A., El-Wakil, H. B., & Osman, K. A. (1992). Toxicity and biochemical impact of certain oxime carbamate pesticides against terrestrial snail, *Theba pisana* (Müller). *Journal of Environmental Science & Health Part B*. 27(6): 759-773.

Radwan M.A., & Mohamed M.S. (2013). Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 95: 91-97.

Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., & Piva, F. (2006). Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environmental Health Perspectives*. 114(1) : 63-69.

Rezzag, M. O. S., & Serouti, A. (2015). Contribution à l'étude de l'effet de la métribuzine sur la cytotoxicité et la reproduction chez les lapines (*Oryctolagus cuniculus*). Mémoire de Master en Biochimie Appliquée, Université Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued. 91p.

Rharrabe, K., Amri, H., Bouayad, N., & Sayah, F. (2008). Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research*. 44(3): 290-294.

S

Sami, A. J. (2014). *Azadirachta indica* derived compounds as inhibitors of digestive alpha-amylase in insect pests: Potential bio-pesticides in insect pest management. *European Journal of Experimental Biology*. 4(1): 259-264.

Scheifler, R., Gomot-De Vaufleury, A., Toussaint, M. L., & Badot, P. M. (2002). Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere*. 48(6): 571-579.

Schuytema, G. S., Nebeker, A. V., & Griffis, W. L. (1994). Effects of dietary exposure to forest pesticides on the brown garden snail *Helix aspersa* Müller. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 26(1): 23-28.

Senthil Nathan, S., Chung, P. G., & Murugan, K. (2006). Combined effect of biopesticides on the digestive enzymatic profiles of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) (the rice leaffolder) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64 (3): 382-389.

Shahriari, M., Sahebzadeh, N., Zibae, A., Khani, A., & Senthil-Nathan S. (2017). Metabolic response of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) to essential oil of ajwain and thymol. *Toxin Review*. 36: 1-6.

Shen, Z., & Jacobs-Lorena, M. (1997). Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 272(46): 28895-28900.

Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyek, C.A., Newhall, A.R., & Friedman, L. (1967). 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. *Analytical Biochemistry*. 19(3): 514-528.

T

Tebboub, L., Tebboub, K., Boulahdid, A., & MF, Z. E. (2021). Etude de l'effet du paracétamol sur un modèle biologique d'escargot *Helix aspersa*. Mémoire de Master, Université-Jijel.

Terra, W. R., & Ferreira, C. (2005). Biochemistry of digestion. *Comprehensive molecular insect science*. 4 : 171-224.

Toualbia, N. (2018). Étude de la toxicité mixte de chlorure de nickel et de chlorpyrifos sur les lapins *Oryctolagus cuniculus*. Thèse de Doctorat, Université Larbi Tébessi.

Tsujita, T., Ninomiya, H., & Okuda, H. (1989). p-nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *Journal of Lipid Research*. 30(7): 997-1004.

V

Vaufleury, A. G. D., & Pihan, F. (2002). Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: metal bioavailability and bioaccumulation. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 21(4): 820-827.

Vontas, J. G., Enayati, A. A., Small, G. J., & Hemingway, J. (2000). A simple biochemical assay for glutathione S-transferase activity and its possible field application for screening glutathione S-transferase-based insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 68(3): 184-192.

W

Wayland, J., & Edward, R. (1991). Hand book of pesticide Toxicology. Vol III, Classes of pesticide.

Y

Yazdani E., Jalali Sendi J., & Hajizadeh J. 2014. Effect of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. essential oils on toxicity, food consumption, and biochemical properties of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis Walker* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Protection Research*. 54 (1): 53-61.

Yazdani, E., Sendi, J. J., Aliakbar, A., & Senthil-Nathan, S. (2013). Effect of *Lavandula angustifolia* essential oil against lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis Walker* (Lep: Pyralidae) and identification of its major derivatives. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 107(2): 250-257.

Z

Zibaee A., & Bandani A.R. (2010). Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on the digestive enzymatic profiles and the cellular immune reactions of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauveria bassiana*. *Bulletin of Entomological Research*. 100 (2): 185-196.

Zhu, X., Chang, Y., & Chen, Y. (2010). Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 78(3): 209-215.