



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Biologie des êtres vivants



MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Ecophysiologie Animale

Thème :

**Effet d'un insecticide sur les organismes non-visés, cas
d'un gastéropode, *Eobenia vermiculata***

Présenté par :

M^{elle} Meroua Asmane

M^{elle} Riham Bekkai

Devant le jury

Dr. TINE Samir

Pr. TINE-DJEBBAR Fouzia

Pr. TALEB Salima

Université de Tébessa

Université de Tébessa

Université de Tébessa

Promoteur

Présidente

Examinatrice

Date de soutenance : Le 14 Juin 2021

Année Universitaire : 2020/2021

Note : /20

Mention :

Remerciements

*Nous tenons d'abord à remercier le tout puissant, notre **DIEU**, le clément et le miséricordieux, de nous avoir donné la clair voyance et la persévérance, pour mener à terme ce travail, prière et salut sur notre prophète **MOHAMED**.*

A nos parents et tous nos frères et sœurs de leur soutien et leur grande affection et les grands efforts pour nous aider à réaliser ce travail.

*Nos plus vifs remerciements à notre professeur et encadreur **Dr. Tine SAMIR**, son savoir, son ouverture d'esprit, ses conseils ont marqué à jamais notre pensé.*

Un grand remerciement aux honorables membres du jury :

***Pr. TALEB Salima** d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.*

***Pr. Tine-Djebbar Fouzia** 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

I.INTRODUCTION	01
II. MATERIEL ET METHODES	03
2.1. Présentation d' <i>Eobenia vermiculata</i>	03
2.2. Présentation du pesticide	04
2.3. Collecte des escargots	05
2.4. Elevage des escargots	06
2.5. Traitement	06
2.6. Dissection de l'escargot et prélèvement des organes	07
2.7. Biomarqueurs physiologiques	07
2.7.1. Mortalité	07
2.7.2. Poids frais de l'escargot	07
2.8. Extraction et dosage des constituants biochimiques	08
2.8.1. Dosage des protéines totales	08
2.8.2. Dosage des glucides totaux	08
2.8.3. Dosage des lipides totaux	08
2.9. Extraction et dosage de la vitellogénine	09
2.10. Dosage des biomarqueurs	09
2.10.1. Dosage de l'acétylcholinestérase	10
2.10.2. Dosage des glutathion S-transférases	10
2.10.3. Dosage du glutathion	11
2.11. Etude histopathologie de l'hépatopancréas	11
2.11.1. Fixation	12
2.11.2. Inclusion	13
2.11.3. Coupe	13
2.11.4. Coloration	14
2.11.5. Montage	14
2.11.6. Observation	14
2.12. Analyses statistiques	14

III. RESULTATS	15
3.1. Effet du traitement sur le comportement d' <i>E. vermiculata</i>	15
3.2. Paramètres Physiologiques	15
3.2.1. Effet sur la mortalité	15
3.2.2. Effet sur la croissance	16
3.3. Effet du traitement sur les constituants biochimiques d' <i>E. vermiculata</i>	16
3.4. Effet du traitement sur la vitellogénine	17
3.5. Effet du traitement sur les acides nucléiques	18
3.6. Effet du traitement sur les biomarqueurs	18
3.7. Histopathologie	19
IV. DISCUSSION	22
4.1. Réponses comportementales	22
4.2. Effet du traitement sur la mortalité	22
4.3. Effet du traitement sur la croissance	22
4.4. Effet sur la composition biochimique	23
4.4.1. Effet sur les lipides	23
4.4.2. Effet sur les protéines	24
4.4.3. Effet sur les glucides	25
4.6. Effet sur les acides nucléiques	27
4.7. Effet sur les biomarqueurs	28
4.7.1. Effet sur l'activité spécifique des GSTs	29
4.7.2. Effet sur le taux du GSH	29
4.6.3. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE	30
4.8. Histopathologie	31
V. CONCLUSION	30
VI. RESUME	31
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34

Liste des Figures

Figure	Titre	Page
Figure 01	Aspect général d' <i>Eobenia vermiculata</i> .	03
Figure 02	Présentation de pesticide utilisé	04
Figure 03	Présentation de la région de Bekkaria	05
Figure 04	Site de collecte.	06
Figure 05	Elevage d' <i>E. vermiculata</i> au laboratoire	07
Figure 06	Dissection des escargots et prélèvement des organes (photo personnelles)	07
Figure 07	Déshydratation et inclusion des échantillons de l'hépatopancréas	13
Figure 08	Coupes des blocs des échantillons à l'aide d'un microtome Leica (photos personnelles)	14
Figure 09	Différents comportements d'escargots durant la période de traitement (photo personnelles)	15
Figure 10	Effet de l'insecticide sur le taux d'inhibition la croissance (%) chez <i>Eobenia vermiculata</i> ($m \pm SEM$, n=4 répétitions de 10 individus chacune) : test t de Student.	16
Figure 11	Effets du pesticide sur le taux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) de lipides (A), protéines (B) et glucides (C) chez les adultes d' <i>E. vermiculata</i> au cours de différentes périodes ($m \pm SEM$, n=3 répétitions de 10 individus chacune) : test HSD de Tukey.	17
Figure 12	Effet de l'insecticide sur le taux la vitellogénine ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) chez <i>E. vermiculata</i> au cours de différentes périodes ($m \pm SEM$, n=3 répétitions) : test HSD de Tukey.	17
Figure 13	Effet de l'insecticide, Lazer sur le taux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) d'ADN (A) et d'ARN (B) chez <i>E. vermiculata</i> au cours de différentes périodes ($m \pm SEM$, n=3 répétitions) : test HSD de Tukey.	18
Figure 14	Effet de l'insecticide, Lazer sur l'activité spécifique ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) de l'AChE (A) et la GST (B) et sur le taux du GSH (C) chez <i>E. vermiculata</i> au cours de différentes périodes ($m \pm SEM$, n=3 répétitions) : test HSD de Tukey	19
Figure 15	Observations au microscope optique des coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d' <i>E. vermiculata</i> , témoin (A) et traités (B), (C) par les deux doses de l'insecticide lazer après 1 mois de traitement par voie orale (100×).	21

Liste des Tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau 01	Description du pesticide appliqué	04
Tableau 02	Caractéristiques physico-chimiques des 2 molécules actives du pesticide utilisé.	04
Tableau 03	Dosage des protéines totales dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage	08
Tableau 04	Dosage des glucides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage	09
Tableau 05	Dosage des lipides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage	09
Tableau 06	Mortalité des escargots adultes durant les quatre semaines de traitement	15

I. INTRODUCTION

Avant l'utilisation des produits phytosanitaires, les systèmes de culture étaient conçus pour assurer le meilleur compromis entre le risque phytosanitaire et le potentiel de production de la culture. Cependant, les pertes en rendement des productions agricoles dues aux maladies, aux ravageurs et aux mauvaises herbes pouvaient atteindre des proportions importantes (Oerke & Dehne, 1997).

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 ; Djabatita, 2019).

A cet effet, l'utilisation des produits phytosanitaires, les pesticides et les engrais cause une contamination terrestre et aquatique entraînant une influence négative sur la biodiversité et ils s'intègrent facilement aux chaînes trophiques où ils subissent une éventuelle bioamplification.

Les Mollusques l'un des groupes les plus importants qui contribuent à la biodiversité terrestre. Il existe dans le monde entre 30.000 à 35.000 espèces de mollusques terrestres (Tsai, 2004). Ces espèces sont souvent utilisées pour contrôler la pollution de l'air et du sol et l'eau (Dallinger, 1994 ; Astani *et al.*, 2012). Les mollusques gastéropodes terrestres présentent des caractéristiques physiologiques, biologiques et écologiques variées, permettant ainsi de comparer l'influence de ces différents paramètres sur leurs réponses à la contamination de l'environnement (Gomot de Vaublery & Pihan, 2000 ; Laskowski & Hopkin, 1996)

Notre étude entre dans cette thématique et vise à évaluer les réponses d'une espèce bioindicateur de pollution, *Eobenia vermiculata* à un type de pesticide (Lazer). Plusieurs paramètres ont été étudiés :

1. Aspect morphométrique par la détermination de l'évolution du poids corporel des escargots témoins et traités pendant 1 mois.
2. Aspect biochimique par la détermination du taux des glucides, lipides et protéines au niveau de l'hépatopancréas d'*E. vermiculata* des séries témoins et traitées.
3. Détermination du taux de la vitéllogénine au niveau de la glande albumen après 1 mois de traitement.

4. Dosage des biomarqueurs de neurotoxicité, Acétylcholinestérase (AChE) et de détoxification : Glutathion -S- Transférases, et son cofacteur le glutathion (GSH).
5. Dosage des acides nucléiques : ADN et ARN.
6. Exploration histopathologique de l'hépatopancréas après traitement avec le pesticide.

II. MATERIEL ET METHODES

Tous les bioessais ont été réalisés au Laboratoire Eau et Environnement, Université Larbi Tébessi, Tébessa.

2.1. Présentation d'*Eobenia vermiculata*

Helix vermiculata est un mollusque gastéropode pulmoné comestible terrestre aussi nommé *Eobania vermiculata* (Müller, 1774). Sa coquille est aplatie, chagrinée, déprimée globuleuse très convexe en dessus (Kerny, 1999), de taille modérée, plutôt faible par rapport à *Helix aspersa* et de couleur blanc jaunâtre avec 4 à 5 bandes marron foncé, parfois interrompues ou fusionnées (Rémy, 1930). Le diamètre de la coquille de cette espèce peut atteindre environ 30 m (Chevalier, 1983).

La position systématique de cette espèce est la suivante :

Règne : Animalia

Embranchement : Mollusques

Classe : Gastéropodes

Sous classe : Pulmonés

Ordre : Stylomatophora

Super famille : Hélicacae

Famille : Hélicidae

Sous famille : Hélicinae

Genre : *Helix*

Espèce : *Helix vermiculata* (Müller, 1774).

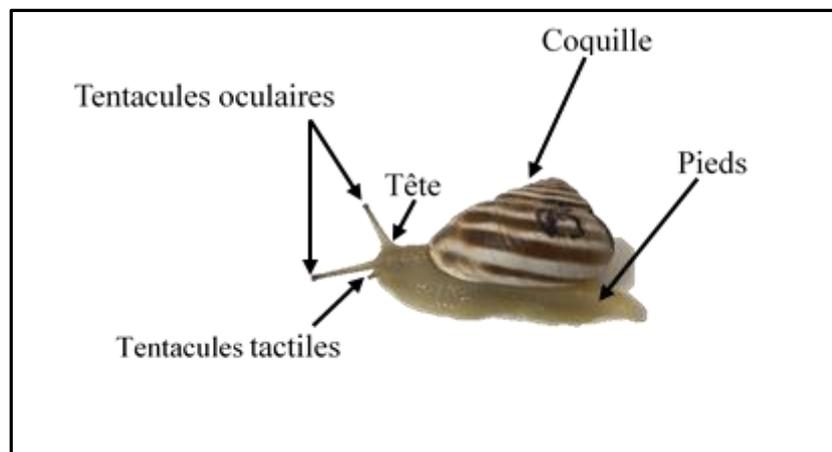


Figure 1 : Aspect général d'*Eobenia vermiculata*.

2.2. Présentation du pesticide

Dans cette étude on a appliqué un pesticide Lazer (insecticide). C'est un insecticide à base de Lambda-cyhalothrine (5%) et Pyrimicarbe (10 %). Son spectre d'activité est très large, il agit sur les punaises les pucerons et les tordeus. Il 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). Ses caractéristiques physico-chimiques sont mentionnées dans le tableau 2.



Figure 2. Présentation de pesticide utilisé

Tableau 1. Description du pesticide appliqué.

Nom	Nature	Société	Composition	Doses recommandées
LAZER	Pesticide	Agro-Rayen	Lambda-cyhalothrine 5% Pyrimicarbe 10 %	Céréales : 1 à 1,5 L /ha Culture maraichère : 1L /ha Arbre fruitier : 0,75 à 1 L /ha Vigne : 1L/ha

Tableau 2. 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 d'un cimetière de la région de Bekaria ($35^{\circ} 22' 20''$ nord, $8^{\circ} 14' 32''$ est) à 12 km de l'est de la ville de Tébessa (Fig.3), loin de toute activité industrielle ou source de pollution. La température moyenne 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 janvier 2021. Une fois au laboratoire, ils ont été triés selon différentes phases de développement : jeunes éclos, juvéniles et adultes, puis adaptés aux conditions du laboratoire pendant une semaine. Pendant cette période, les escargots sont nourris exclusivement de feuilles de laitue fraîche. Les individus utilisés au cours de nos expérimentations, sont des adultes d'un poids moyen de 4,5g et d'un diamètre moyen de 2.5 cm .



Figure 3. Présentation de la région de Bekkaria.



Figure 4. Site de collecte.

2.4. Elevage des escargots

Après une période d'adaptation, les escargots adultes sont répartis en 14 terrariums en verre (Longueur : 20 cm, largeur : 20 cm, hauteur : 20 cm), remplis de 2 kg de sol non traité, et recouverts d'une tulle afin d'assurer une bonne aération. Une éponge humide est déposée au fond du terrarium pour assurer une humidité adéquate. Le nettoyage est effectué chaque trois jours. L'élevage est maintenu à une température de $16,23 \pm 1,35^{\circ}\text{C}$ et une humidité de 31,14% (Daumer *et al.*, 2007).

2.5. Traitement

En premier lieu, les escargots ont été pesés dans une balance de précision (RADWAG, 0,000mg), puis répartis sur 3 lots comme suit (Fig. 6) :

- Lot 1 : Lot témoin composé de deux terrariums
- Lot 2 : Lot traité avec la Dose 1 (0,25%), composé de six terrariums
- Lot 3 : Lot traité avec la Dose 2 (0,50%), composé de six terrariums

Chaque lot (de 90 escargots), à son tour, est réparti en six groupes de 15 individus, chacun et maintenus dans un terrarium (20×20×20 cm). Les groupes d'escargots sont nourris de laitue fraîche (escargots témoins), ou de laitue imbibée (durant 30 s) de solution d'insecticide. Toutes les dilutions d'insecticide ont été préparées avec de l'eau distillée. Les solutions insecticides sont renouvelées chaque trois jours. La nourriture est fournie chaque trois jours lors du nettoyage des terrariums.

Pour déterminer l'effet de l'insecticide, l'expérience est menée durant 4 semaines sous des conditions contrôlées de laboratoire citées auparavant.



Figure 5. Elevage d'*E. vermiculata* au laboratoire.

2.6. Dissection de l'escargot et prélèvement des organes

Chaque semaine de traitement, les escargots sont pesés. Ensuite, les animaux sont sacrifiés par décapitation, et les têtes sont récupérées dans le tampon adéquat pour des analyses ultérieures. Les escargots sont décoquillés et leurs hépatopancréas et glandes albumen rapidement excisés et pesés (Fig. 10).

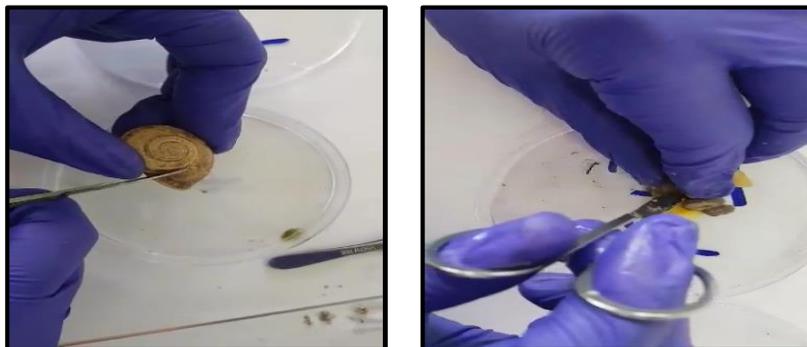


Figure 6. Dissection des escargots et prélèvement des organes (photo personnelles)

2.7. Biomarqueurs physiologiques

Plusieurs paramètres sont considérés, à savoir :

2.7.1. Mortalité : le contrôle de la vitalité des individus d'*E. vermiculata* au cours des essais est effectué chaque semaine. Les individus morts sont évacués des enceintes d'essai. La mort d'un individu est généralement facile à déterminer : le pied flasque et jaunâtre, la sole pédieuse n'adhère à aucune surface et le corps luisant et très visqueux indique que la liquéfaction des

tissus est en cours. L'odeur nauséabonde que dégage l'escargot est également un indicateur. En cas de doute, le pied est stimulé à l'aide d'une aiguille. L'absence de réaction permet de conclure à la mort de l'individu.

2.7.2. Poids frais de l'escargot (tissus mous + coquille) est mesuré 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 (Gomot, 1997a).

2.8. Extraction et dosage des constituants biochimiques

Des portions de l'hépatopancréas des individus témoins et traités (D1 et D2) ont été prélevées chaque semaine et conservées dans 1 ml de TCA (acide trichloroacétique) à 20%. L'extraction des principaux constituants biochimiques (protéines, glucides et lipides) a été réalisée selon le procédé de Shibko *et al.* (1966). 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 commassie (BBC) G250 (Merck). Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (BSA) titrant 1 mg/ml (Tableau 4).

Tableau 3. 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 glucides totaux

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de Duchateau & Florkin (1959). Cette méthode consiste à additionner 100 µl de surnageant contenu dans un tube à essai, 4 ml

du réactif d'anthrone et de chauffer le mélange à 80°C pendant 10 min, une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présente dans l'échantillon. La lecture de l'absorbance est faite à une longueur d'onde de 620 nm. La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de glucose (1mg/ml) (Tableau 5).

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 (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

2.8.3. Dosage des lipides totaux

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972), en utilisant le réactif sulfophosphovanillinique. Le dosage des lipides se fait sur des prises aliquotes de 100 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. Après 30 mn à l'obscurité, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide orthophosphorique, des complexes roses. La solution mère des lipides est préparée comme suit : on prend 2,5 mg d'huile de table (tournesol, 99% triglycérides) dans un tube eppendorf et on ajoute 1 ml d'éther/chloroforme (1V/1V) (Tableau 6).

Tableau 5. Dosage des lipides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage.

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

2.9. Extraction et dosage de la vitellogénine

Une fois, les glandes albumen prélevées, elles sont mises dans un tube eppendorf avec 500 µl de Tampon Tris-HCl-NaCl (pH 7,4) puis broyées aux ultrasons pendant 30 secondes à 2 répétitions. L'homogénat est centrifugé à 5000 trs / min pendant 10 minutes. Il en résulte 3 couches distinctes, une couche surnageante qui représente les lipides, un culot contenant des glycoprotéines et une couche intermédiaire renfermant les vitellogénines. Cette dernière est

récupérée à l'aide d'une simple seringue médicale, déposée dans un autre tube eppendorf, puis maintenue au congélateur jusqu'au dosage.

2.10. Dosage des biomarqueurs

Les portions de l'hépatopancréas ont fait l'objet d'un dosage d'un biomarqueur de la neurotoxicité, l'acétylcholinestérase (AChE) et des biomarqueurs de détoxication, les glutathion S-transférases (GSTs) et le glutathion (GSH). Par ailleurs, les protéines totales des différents échantillons ont été dosées, selon la méthode de Bradford, afin de pouvoir calculer les activités spécifiques des enzymes et le taux du glutathion.

2.10.1. Dosage de l'acétylcholinestérase

Les portions de l'hépatopancréas des séries témoins et traitées (D1 et D2) prélevées chaque semaine de traitement sont pesées, ensuite homogénéisées dans 1ml de la solution détergente D [38,03 mg EGTA (acide éthylène glycol-bis, β -aminoéthyl éther NNN'N' tétra-acétique), 1ml Triton X 100%, 5,845 g NaCl (chlorure de sodium), 80 ml tampon tris (10mM, pH 7)] qui solubilise les membranes. Après centrifugation (5000 trs/ min pendant 5 min), le surnageant est récupéré et servira comme source d'enzyme. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 10 individus avec une série témoin.

Le dosage de l'AChE est réalisé selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) sur une fraction aliquote de 100 μ l à laquelle on ajoute 100 μ l de DTNB préparé extemporanément [39,6 mg DTNB, 15 mg CO_3HNa (bicarbonate de sodium), 1 ml tampon tris (0,1 M, pH 7)] et 1 ml de tampon tris (0,1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes, 100 μ l de substrat acétylthiocholine préparé extemporanément [23,6 mg ASCh, 1 ml eau distillée] sont ajoutés. La lecture des absorbances s'effectue toutes les 4 mn pendant 20 minutes à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc où 100 μ l de solution détergente remplace les 100 μ l de surnageant.

L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante :

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

X: micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines).

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

$1,36 \times 10^4$: coefficient d'extinction molaire du DTNB (M-1 cm-1).

Vt : volume total dans la cuve : 1,3 ml [0,1 ml surnageant + 0,1 ml DTNB + 1 ml tampon tris (0,1 M, pH 7) + 0,1 ml acétylthiocholine].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,1 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

2.10.2. Dosage des glutathion S-transférases

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 larves témoins et traitées prélevées à 24 heures après traitement, sont pesées puis broyées dans 1ml de tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH 6). L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé (13000 trs/min à 2°C pendant 30 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 5 minutes 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).

Δ DO: 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.

2.10.3. Dosage du glutathion

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de Weckberker & 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 thiol (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm.

Le dosage s'effectue après homogénéisation des larves témoins et traitées prélevées après 24h dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M [7,448g EDTA, 1000 ml eau distillée]. Afin de protéger les groupements thiols du glutathion, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0,25 % [0,25g ASS, 100 ml eau

distillée] où 0,2 ml du ASS sont additionnés à 0,8 ml d'homogénat. Le mélange après agitation est plongé dans un bain de glace pendant 15 mn, puis centrifugé à 1000 trs/mn pendant 5 mn. Une fraction aliquote de 500 µl de l'homogénat est ajoutée à 1 ml du tampon tris/ EDTA (0,02 M, pH 9,6) [63,04 g tris, 7,4448 g EDTA, 1000 ml eau distillée] et 0,025 ml de DTNB (0,01 M) [3,96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu]. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 10 individus avec une série témoin. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc où les 500 µl de surnageant sont remplacés par 500µl d'eau distillée.

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta DO}{13,1} \times \frac{Vd}{Vh} \times \frac{Vt}{Vs} / mg \text{ de protéines}$$

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

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

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH).

Vd : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1 ml [0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat].

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

Vt : volume total dans la cuve : 1,525 ml [0,5 ml surnageant + 1 ml tris / EDTA + 0,025 ml DTNB].

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

mg de protéines: quantité de protéines exprimée en mg.

2.11. Etude histopathologique de l'hépatopancréas

Cette partie a été consacrée à la réalisation d'une étude histopathologique de l'hépatopancréas des escargots *E. vermiculata*, afin de compléter la panoplie des paramètres morphométriques et biochimiques sous l'effet du traitement. Pour rendre visible les atteintes du tissu hépatopancréatique, nous avons utilisé la microscopie optique.

A la fin de la 4^{ème} semaine de traitement et après le sacrifice des escargots, 3 individus choisis au hasard au niveau des lots (témoins et traités) ont été disséqués pour extraire l'hépatopancréas. Ce dernier subit les étapes suivantes : fixation, inclusion, coupe, coloration et montage décrites ci-dessous pour des observations en microscopie optique.

Toutes ces étapes ont été réalisées au laboratoire de biologie cellulaire -Cytologie- du Centre Hospitalo-universitaire d'Hussein Dey-Hôpital Nefissa HAMOUD (ex Parnet-Alger).

2.11.1. Fixation

La fixation permet la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit impérativement être réalisée après la dissection de l'escargot (séparation du pied et des viscères quand les escargots sont encore vivants), par immersion de l'échantillon dans un grand volume de liquide fixateur, Formol 30%. Compte tenu de leur taille, les échantillons séjournent trois jours dans ce fixateur (Preece, 1972).

2.11.2. Inclusion

Cette étape a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Les échantillons sortis du formol sont rincés plusieurs fois à l'eau du robinet. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine : de par son caractère hydrophobe, les échantillons doivent donc subir, dans un premier temps, une déshydratation par immersion successives dans des bains d'alcool à degré croissant à l'aide d'un automate. Ensuite, l'alcool est remplacé par du xylène (trois bains de deux heures chacun) afin d'imprégner les échantillons par le solvant de la paraffine. Dans un deuxième temps, les échantillons sont placés sur une plaque chauffante dans un bain de paraffine liquide (56-58°C) afin qu'elle imprègne totalement l'échantillon. Après une nuit, les échantillons sont inclus dans la paraffine à l'aide de moules (barres de Let orientées selon le plan de coupe choisi (longitudinal ou transversal)).



Figure 7. Déshydratation et inclusion des échantillons.

2.11.3. Coupe

Les coupes des blocs de paraffine de 4µm d'épaisseur sont réalisées par un microtome de type Leica et sont collées sur des lames.



Figure 8. Coupes des blocs des échantillons à l'aide d'un microtome Leica (photo personnelles)

2.11.4. Coloration

Comme les colorants sont en solution aqueuse, les lames doivent être déparaffinées avant de pouvoir être réhydratées (coloration à l'hématoxyline-éosine). Le déparaffinage consiste à chauffer les lames, jusqu'à fusion de la paraffine, avant de les immerger dans un bain de xylène pendant 30 min. Ensuite, les lames sont plongées dans un bain d'alcool absolu, puis colorées par l'utilisation de l'hématoxyline pendant 10 sec. Après deux autres rinçages, on les plonge dans l'éosine pendant 30 sec

2.11.5. Montage

Les lames colorées sont montées entre lames et lamelles avec une résine synthétique, le baume de Canada. Les lames sont alors prêtes pour être observées au microscope optique.

2.11.6. Observation

L'observation des coupes histologiques de l'hépatopancréas est réalisée avec un microscope.

2.12. Analyses statistiques

L'analyse statistique est réalisée par le logiciel GRAPH PAD PRISM 7. Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne \pm l'écart-moyen (SEM). Les quantités des métabolites (protéines, glucides et lipides) sont déterminées à partir des courbes d'étalonnage dont l'équation de la droite de régression exprime l'absorbance en fonction de la quantité du standard utilisé (albumine, glucose et huile de tournesol). L'analyse de la variance à un critère de classification et le test HSD de Tukey ont été utilisés.

III. RESULTATS

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

Pendant l'expérience, les escargots exposés à l'insecticide ont montré une série de symptômes : les escargots fuient la nourriture, se positionnent au sommet des terrariums et ne montrent aucune activité locomotrice comparé aux escargots témoins. La consommation de la laitue contaminée diminuait d'une façon dose-dépendante. De plus, on a noté que les escargots traités entre en période de quiescence par rapport aux témoins.

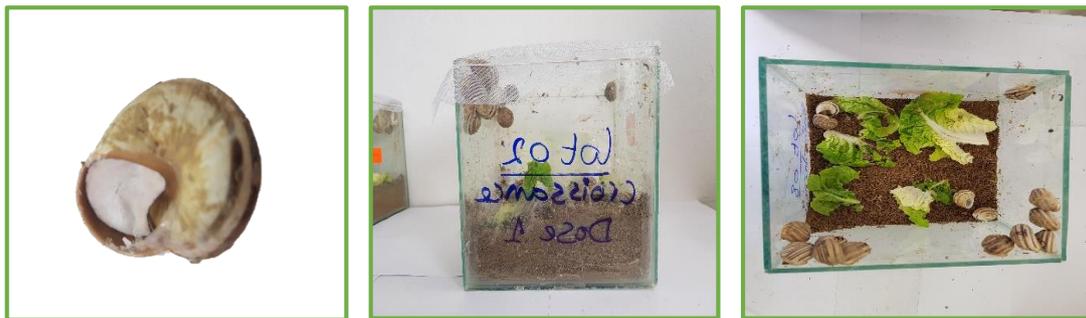


Figure 9. Différents comportements d'escargots durant la période de traitement (photo personnelles)

3.2. Paramètres Physiologiques

3.2.1. Effet sur la mortalité

Au cours des essais, le suivi de la viabilité des individus d'*E. vermiculata* est effectué chaque semaine. Nous avons constaté que le nombre total de mortalités des escargots témoins est de 4 individus durant les 4 semaines de traitement et qui augmente chez les séries traitées avec la dose 1 et la dose 2.

Tableau 6. Mortalité des escargots adultes durant les quatre semaines de traitement.

Période (Semaine)	Dose 1	Dose 2
1	2	1
2	2	2
3	1	3
4	2	1
Total	7	7

3.2.2. Effet sur la croissance

La croissance des escargots adultes est notée chaque semaine pendant la période de traitement (1 mois). Les résultats montrent une augmentation significative de l'inhibition de la croissance de 60 % durant les 2 premières semaines jusqu'à 90% au cours de la troisième et la quatrième semaine. L'effet dose a été signalé au cours des deux dernières semaines (Semaine 3 : $t=3,333$; $df=8$; $p=0,0052$ et Semaine 4 : $t=6,901$; $df : 8$; $p=0,0001$).

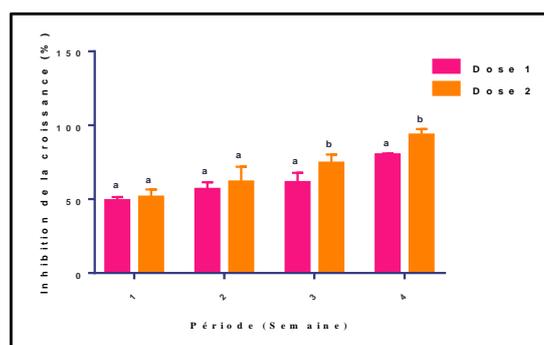


Figure 10. Effet de l'insecticide sur le taux d'inhibition la croissance (%) chez *E. vermiculata* ($m \pm$ SEM, $n=4$ répétitions de 10 individus chacune) : test t de Student.

3.3. Effet du traitement sur les constituants biochimiques d'*E. vermiculata*

Le pesticide a été appliqué sur les adultes d'*E. vermiculata* avec deux doses (D1 et D2). Ses effets ont été évalués sur la composition biochimique (glucides, lipides et protéines) de cette espèce à différentes périodes de traitement (1, 2, 3 et 4 semaines).

D'après les résultats représentés dans la Figure 21A, on note une diminution significative du taux de lipides après traitement avec les deux doses appliquées au cours de la deuxième ($F_{2,6}=27,05$; $P=0,001$), la troisième ($F_{2,6}=27,51$; $P=0,01$) et la quatrième semaine ($F_{2,6}=90,33$; $P<0,0001$). Par contre, à la première semaine on remarque l'effet du traitement seulement avec la dose la plus élevée ($F_{2,6}=74,94$; $P<0,0001$).

En ce qui concerne le taux de protéines, le traitement provoque une augmentation significative avec les deux concentrations appliquées au cours de la première semaine ($F_{2,6}=12,93$; $P=0,067$), la deuxième ($F_{2,6}=165,8$; $P<0,0001$) et la quatrième semaine ($F_{2,6}=9,463$; $P=0,0139$). Au cours de la troisième semaine, une augmentation significative a été signalée seulement après traitement à la dose 2 ($F_{2,6}=82,45$; $P<0,0001$).

Les résultats du dosage des glucides mettent en évidence une diminution significative après traitement avec les deux doses appliquées au cours des deux dernières semaines (Semaine 3 : $F_{2,6}=52,93$; $P=0,0002$; Semaine 4 : $F_{2,6}=86,01$; $P<0,0001$). Un effet dose a été signalé au cours de cette même période (Semaine 1 : Dose 1 vs Dose 2 : $p=0,0032$; Semaine 2 : Dose 1 vs Dose

2 : $p=0,0014$). Par ailleurs, aucun effet traitement n'a été signalé au cours de la première semaine ($p>0,05$).

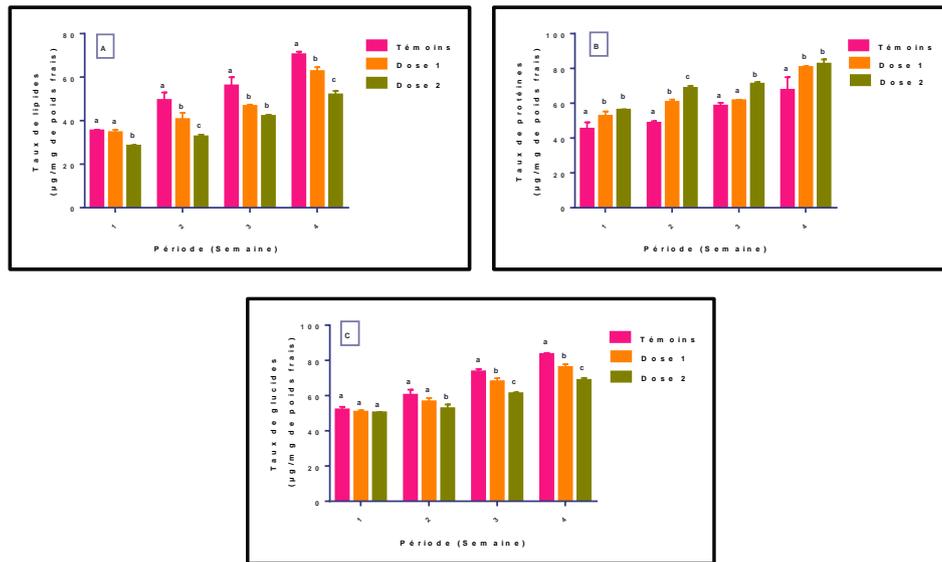


Figure 11. Effets du pesticide sur le taux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) de lipides (A), protéines (B) et glucides (C) chez les adultes d'*E. vermiculata* au cours de différentes périodes ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ répétitions de 10 individus chacune) : test HSD de Tukey.

3.4. Effet du traitement sur la vitellogénine

Les résultats du dosage présentés dans la figure 24, montre une diminution significative du taux de la vitellogénine au cours de la première ($F_{2,6}=57,83$; $p=0,0001$) et la deuxième semaine ($F_{2,6}=992,5$; $p<0,0001$) avec les deux doses appliquées, et seulement avec la dose la plus élevée pour la troisième ($F_{2,6}=63,75$; $p<0,0001$) et la quatrième semaine ($F_{2,6}=29,19$; $p=0,0008$).

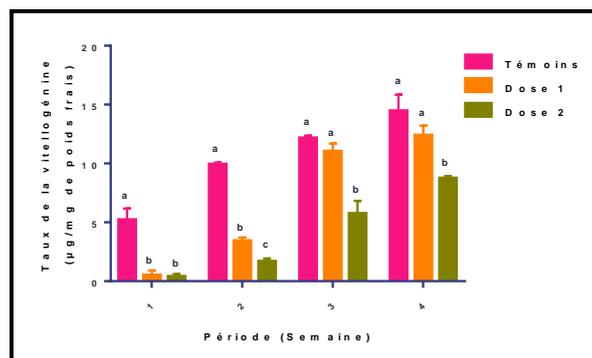


Figure 12. Effet de l'insecticide sur le taux la vitellogénine ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) chez *E. vermiculata* au cours de différentes périodes ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ répétitions) : test HSD de Tukey.

3.5. Effet du traitement sur les acides nucléiques

L'insecticide a été appliqué sur *E. vermiculata* avec deux doses et ses effets ont été évalués sur le taux d'ADN et d'ARN au cours de différentes périodes de traitement (1, 2, 3 et 4 semaines) (Fig. 25).

Les résultats du taux de l'ADN présenté dans la figure 25 montre une augmentation significative durant la 1^{ère} ($F_{2,6}=359,3$; $p<0,0001$), la 2^{ème} ($F_{2,6}=594,7$; $p<0,0001$) et la 3^{ème} ($F_{2,6}=379,7$; $p<0,0001$) avec la dose la plus élevée et au cours de la 4^{ème} semaine de traitement ($F_{2,6}=759,3$; $p<0,0001$) chez les séries traitées avec les deux doses appliquées.

Le taux de l'ARN marque également une augmentation significative chez les séries traitées par les deux doses appliquées par rapport aux séries traitées et cela au cours de tous les temps testés : la première semaine ($F_{2,6}=230,9$; $p<0,0001$), la 2^{ème} ($F_{2,6}=117,5$; $p<0,0001$), la 3^{ème} ($F_{2,6}=28,61$; $p=0,0009$) et la quatrième semaine ($F_{2,6}=24,85$; $p=0,0012$).

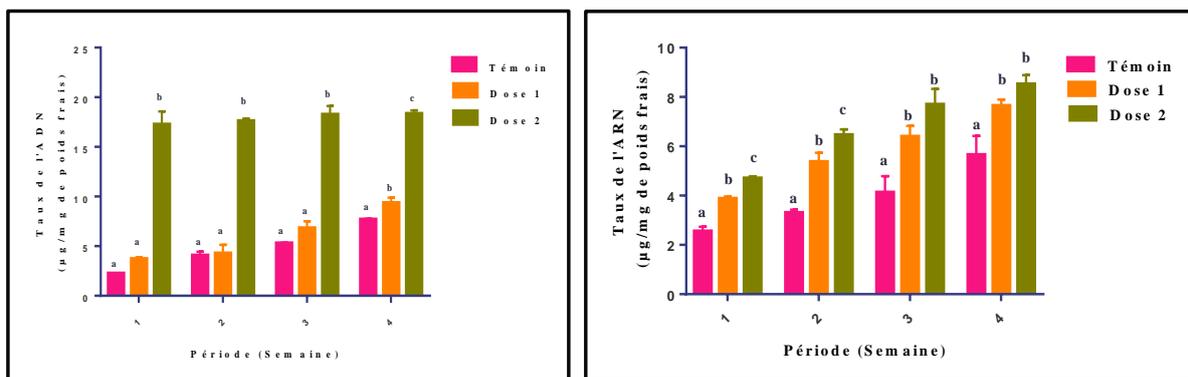


Figure 13. Effet de l'insecticide, Lazer sur le taux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais) d'ADN (A) et d'ARN (B) chez *E. vermiculata* au cours de différentes périodes ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ répétitions) : test HSD de Tukey.

3.6. Effet du traitement sur les biomarqueurs

Le pesticide appliqué (Dose 1 et Dose 2) a été évalué sur les biomarqueurs enzymatiques (AChE et GST) et non enzymatique (GSH) à différentes périodes de traitement. Les résultats sont représentés dans la Figure 26A, B et C.

Les résultats du dosage du biomarqueur de neurotoxicité (Acétylcholinestérase) révèlent une diminution significative de l'activité spécifique de cette enzyme chez les traités à la Dose 1 et la Dose 2 au cours de la deuxième semaine ($F_{2,6}= 52,61$; $p=0,0002$), la troisième semaine ($F_{2,6}= 27,81$; $p=0,0009$) et la quatrième semaine ($F_{2,6}= 150,9$; $p<0,0001$) par rapport aux témoins. Aucun effet dose n'a été signalé au cours de la première semaine ($p>0,05$).

Concernant l'activité spécifique des glutathion-S-transférases, on note une augmentation significative de ce biomarqueur de détoxification après traitement avec seulement la dose la plus élevée au cours de la deuxième ($F_{2,6}= 21,14$; $p=0,0019$), la troisième ($F_{2,6}= 16,11$; $p=0,0039$) et la quatrième semaine ($F_{2,6}= 22,94$; $p=0,0015$). Par ailleurs, ce traitement affecte ce biomarqueur avec les deux doses au cours de la première semaine ($F_{2,6}= 16,14$; $p=0,0039$), aucun effet dose n'a été observé au cours de cette période (Dose 1 vs Dose 2 : $p>0,05$).

Enfin, le taux du GSH révèle une diminution significative chez les traités avec les deux concentrations appliquées au cours de la première ($F_{2,6}= 76,84$; $p<0,0001$) et la deuxième semaine ($F_{2,6}= 72,62$; $p<0,0001$) avec un effet dose (CL₂₅ vs CL₅₀ : $p=0,0276$ et $0,0015$). Par contre, cette diminution est signalée après traitement avec seulement la dose la plus élevée au cours de la troisième ($F_{2,6}= 23,63$; $p=0,0014$) et la quatrième semaine ($F_{2,6}= 8,096$; $p=0,0198$).

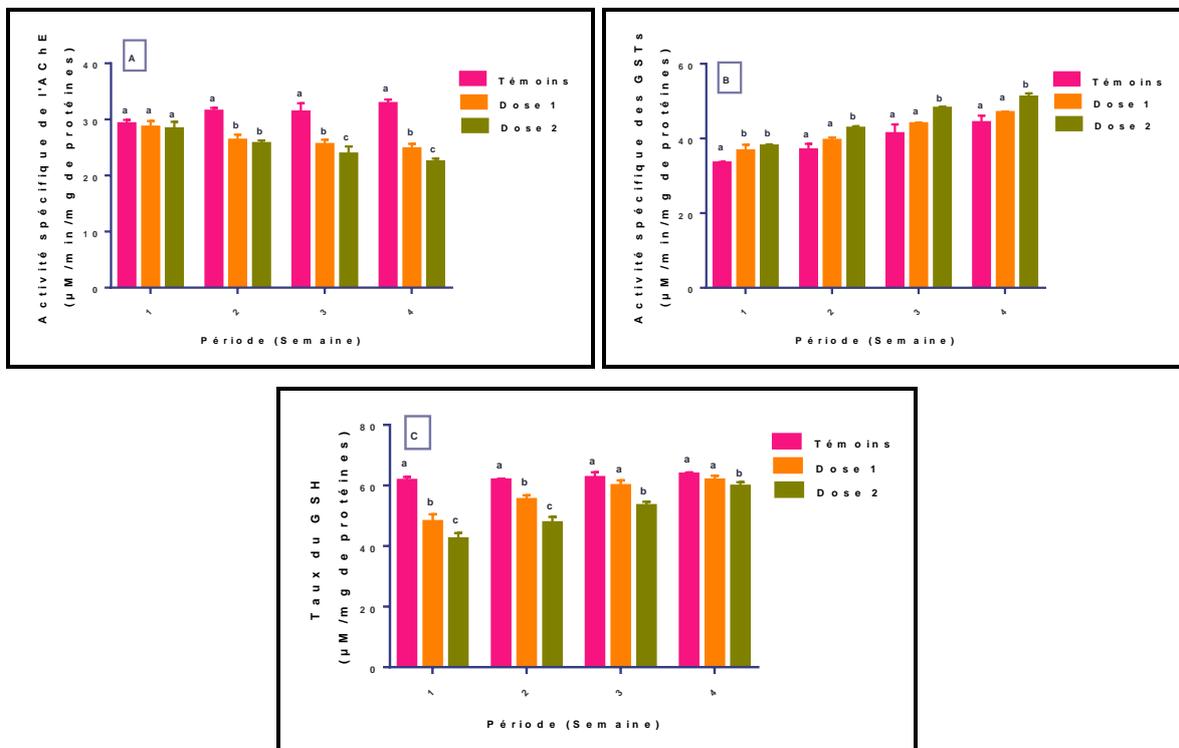


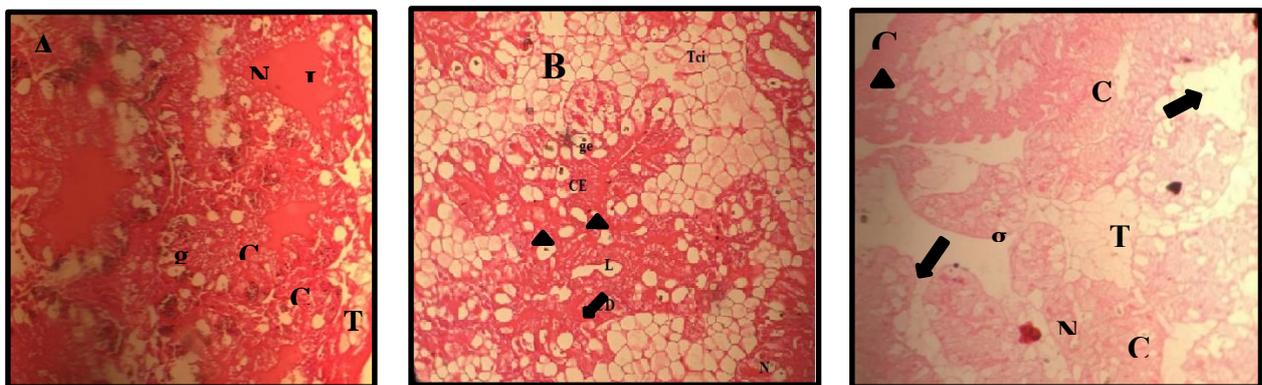
Figure 14. Effet de l'insecticide, Lazer sur l'activité spécifique ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) de l'AChE (A) et la GST (B) et sur le taux du GSH (C) chez *E. vermiculata* au cours de différentes périodes ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ répétitions) : test HSD de Tukey.

3.6. Effet du traitement sur l'histopathologie de l'hépatopancréas

Une section histologique de l'hépatopancréas du groupe témoin (1 mois) est illustrée dans la figure (18A et B). Cette coupe montre que le tissu de la glande digestive est constitué essentiellement par la juxtaposition de nombreux tubules digestifs de différentes formes et tailles, séparés par l'espace intertubulaire, constitué de vaisseaux hémolymphatiques et

d'hémocytes. La lumière des tubules est bordée par un épithélium simple associant plusieurs types cellulaires. Les cellules qui le composent présentent des morphologies diverses mais révèlent trois types cellulaires principales : les cellules digestives, les cellules à calcium, et les cellules excrétoires (Zaldibar *et al.*, 2008). Les tubules sont maintenus cohérents par le tissu intertubulaire connectif. Les cellules digestives constituent la principale composante cellulaire de l'épithélium des tubules de la glande digestive, et sont relativement polymorphes selon le stade de la digestion (Hamed *et al.*, 2007 ; Heusser & Dupuy, 2011).

Après 1 mois de traitement avec l'insecticide Lazer, l'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots contaminés a montré des altérations en réponse aux deux doses. A la dose 1 de Lazer (**Fig. 18B**), un début d'inflammation des membranes des tubules digestifs et la dégénérescence partielle de certaines cellules digestives. Quelques tubules ont montré une lumière partiellement rétrécie. A la 2ème dose, une inflammation et rétrécissement de la lumière des tubules digestifs, de manière dose dépendante (**Fig. 18C**) par rapport aux témoins.



Tissu connectif intertubulaire : **Tci** ; Lumière du tubule digestif : **L** ; Cellules digestives : **CD** ; Cellules excrétoires : **CE** ; Granules excrétoires : **ge** ; Noyau : **N**. (A) Escargot témoin, (B) Escargot traité (Dose 1), (C) escargot traité (Dose 2).

Inflammation tissulaire : **▲** ; Dégénérescence cellulaire : **➔**

Figure. 15. Observations au microscope optique des coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d'*E. vermiculata*, témoin (A) et traités (B), (C) par les deux doses de l'insecticide lazer après 1 mois de traitement par voie orale (100×).

IV. DISCUSSION

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à évaluer les effets d'un insecticide, le Lazer (Lambda-cyhalothrine et Pyrimicarbe) sur les paramètres physiologiques, biochimiques et histologiques d'un gastéropode, *E. vermiculata* pendant une période de 30 jours de traitement dans les conditions du laboratoire.

4.1. Réponses comportementales

Notre étude a montré les effets inhibiteurs de l'insecticide, Lazer sur le comportement locomoteur et nutritif des adultes d'*E. vermiculata*. Des travaux réalisés sur l'espèce, *Theba pisan* traitée par l'abamectine, le thiaméthoxame et l'acrylamide ont montré une diminution de la consommation alimentaire suite aux traitements (Kawther *et al.*, 2019). En effet, des travaux antérieurs réalisés au niveau de notre laboratoire ont signalé les mêmes effets sur le comportement locomoteur d'*E. vermiculata* après traitement aux engrais, urée et NPK (Gueddouche, 2017). Ces réponses comportementales ont été également observées suite au traitement d'*Helix aspersa* par un herbicide, le Cossack (Djatita, 2019).

4.2. Effet du traitement sur la mortalité

Le nombre de mortalité observé chez les escargots, *E. vermiculata* au cours de notre étude était faible, avec seulement 7 individus au cours de quatre semaines de traitement.

Des études antérieures ont montré des résultats similaires avec une mortalité faible de 9,16% chez *Helix aspersa* après traitement par deux insecticides appartenant à la famille des néonicotinoïdes, le thiaméthoxam et la téfluthrine (Bourbia, 2013).

Le taux de mortalités observées chez *Helix aspersa* suite à un traitement par le carbaryl pendant 14 jours est de 13% (Schuytema *et al.*, 1994). Tandis que, le traitement par le glyphosate ne montre aucune mortalité à l'égard de cette même espèce. Les mortalités des escargots dépendent de l'espèce testée et de sa sensibilité vis-à-vis de ces substances testées.

4.3. Effet du traitement sur la croissance

Les escargots exposés au Lazer (lambda cyhalothrine et Pyrimicarbe) apparaissent sensibles à cet insecticide dans les conditions de laboratoire. Toutefois, en présence de fortes concentrations de ces composés, l'inhibition de la prise de poids peut être due à la répulsion de la nourriture, et donc au jeûne prolongé des escargots.

En effet, Kawther *et al.* (2019), ont rapporté que l'inhibition de la croissance des escargots, *Theba pisan* est de 21,78 % après traitement à l'abamectine, de 28,04% après traitement à la

thiaméthoxame et 10,89 % après traitement à l'acrylamide au cours de la deuxième semaine d'exposition. Des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire ont montré une inhibition du taux de la croissance après une exposition de 2 mois à un traitement par les engrais (NPK et Urée) chez la même espèce (Gueddouche, 2017).

Selon Gomot (1997), le mécanisme impliqué dans l'inhibition de la croissance des escargots nourris avec de la nourriture contaminée est difficile à identifier. Il pourrait s'agir d'une inhibition de synthèse d'une hormone de croissance essentielle à la croissance des escargots.

4.4. Effet 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 (Forbes *et al.*, 1997 ; Mc Loughlin *et al.*, 2000).

4.4.1. Effet sur les lipides

Les lipides sont la seconde source d'énergie utilisé lors d'un stress (Sujatha *et al.*, 1996 ; Bhavan & Géraldine, 1997). Ils peuvent aussi être mobilisés en premier lorsque la nourriture devient rare (Sargent *et al.*, 1989 ; Hashemi *et al.*, 2008). Une diminution des concentrations en lipides est généralement observée quand la concentration en glucides devient faible ou quand la demande énergétique est trop forte (Blem, 1992).

Les résultats obtenus au cours de notre expérimentation, montrent que le traitement par le Lazer, cause une diminution du taux de lipides au cours de la période testée. Ces résultats sont similaires à ceux de Favez *et al.* (2012) qui ont montré que l'exposition de *Biomphalaria alexandrina* à la CL₁₀ de l'atrazine et du Roundup provoque une réduction du taux de lipides. Par ailleurs, les travaux de Gueddouche (2017) révèlent une augmentation du taux de lipides totaux lors de l'exposition des escargots aux engrais, urée et NPK. ATTIA *et al.* (2021) ont montré que la même espèce exposée à des concentrations croissantes de l'engrais, Weatfert pendant 3 mois diminue le taux de lipides chez les séries traitées par rapport aux témoins.

4.4.2. Effet sur les protéines

Face à un stress, les organismes ont besoin de beaucoup d'énergie pour lutter et se maintenir, et cette énergie peut être stimulée par le catabolisme des protéines (Ribeiro *et al.*, 2001). Une diminution de la concentration en protéines peut être due à la formation de lipoprotéines utilisées pour réparer les dommages causés aux organites des cellules et des tissus (Rambabu

& Rao, 1994 ; Sancho *et al.*, 1998) ou peut être attribuée à une diminution de l'activité métabolique générale (Baudrimont *et al.*, 1997 ; Geret *et al.*, 2003). Cette diminution indique donc une protéolyse qui permet la production d'acides aminés libres. Ces acides aminés peuvent être utilisés par le cycle de Krebs pour fournir de l'énergie ou par la gluconéogenèse pour fournir du glucose.

Des résultats similaires ont été signalés par Attia *et al.* (2021) qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines chez la même espèce, *E. vermiculata* sous l'effet d'un stress chimique, le Weatfert, un engrais chimique. De plus, le traitement d'un autre modèle biologique, vers de terre (*Lumbricus terrestris*) par un herbicide, le Sekator et un engrais, le TSP révèle une augmentation significative de ce constituant (Mekahlia *et al.*, 2015).

Par contre, une augmentation du taux de protéines a été observée chez *Biomphalaria alexandrina* traitée par deux pesticides, Roundup et atrazine (Fayez *et al.*, 2012) et chez *Eobenia vermiculata* traitée par deux engrais, Urée et NPK (Guedouche, 2017).

4.4.3. Effet sur les glucides

Lors du contact entre un organisme et un contaminant, les premiers évènements mesurables ont lieu au niveau moléculaire par l'interaction du xénobiotique avec des molécules endogènes (Lagadic *et al.*, 1997a). L'exposition des organismes vivants à des polluants est susceptible d'engendrer une perturbation de leur métabolisme énergétique (Calow, 1991).

Il existe trois types de réserves énergétiques : glucides, lipides et protéines. La première source d'énergie, utilisée lors d'un stress correspond généralement aux glucides, et plus particulièrement au glycogène (Umminger, 1977). Dans ces conditions, une diminution de ces réserves est remarquée pour assurer un apport suffisant d'énergie (Carefoot *et al.*, 1993).

Nos résultats montrent que le taux de glucides diminue significativement après l'exposition des escargots à l'insecticide, le Lazer avec les deux doses appliquées.

Des travaux antérieurs ont montré les mêmes résultats avec une réduction de ce contenu chez *Helix aspersa* après traitement par un mélange de deux insecticides appartenant à la famille des néonicotinoïdes Fidor Super 70 et Aceplan (Boudoucha & Rekaik, 2019). Par contre, des résultats antérieurs ont montré une augmentation de ce contenu chez *E. vermiculata* après traitement par deux types d'engrais : le NPK et l'Urée (Gueddouche, 2017).

Nos résultats corroborent avec ceux de Attia *et al.* (2021) qui ont constaté une diminution du taux de glucides dans les tissus de l'escargot, *E. vermiculata* (Müller, 1774) exposée à un engrais, le Weatfert. Cette perturbation peut être due à l'utilisation du glycogène pour générer l'énergie nécessaire pour faire face à l'état de stress provoqué par ces pesticides. Par ailleurs, le traitement de *Biomphalaria alexandrina* exposée au glyphosate induit une réduction de la teneur en glycogène au cours de la période d'exposition (Fayez *et al.*, 2012). En outre, les résultats de Banaee *et al.* (2019) ont montré une diminution du taux de glucose chez *Galba truncatula* traitée par le cadmium seul et en combinaison avec le Diméthoate.

4.5. Effet sur la vitellogénine

La glande albumen est une glande volumineuse, située à la jonction du canal hermaphrodite et du spermiducte au niveau de la poche de fécondation. C'est une glande exocrine, tubulo-acineuse, à activité cyclique : elle produit du glycogène en hiver, du galactogène et des protéines en été. Ces deux dernières substances interviennent au moment de la ponte et constituent la couche périvitelline des œufs (Goudsmit, 1975). Pendant la reproduction, la vitellogénine (VTG) est transportée dans les ovocytes vitellogéniques comme précurseur du lipovitelline du jaune d'œuf (LV). La synthèse de la VTG est affectée par les facteurs de stress environnementaux, elle est largement utilisée comme biomarqueur dans les études de perturbation endocrinienne (Fernando *et al.*, 2012).

Au cours de nos expériences, la quantité de vitellogénine chez les escargots traités par les 2 doses du Lazer, a diminué par rapport aux témoins.

Des résultats similaires ont été signalés par Guedouche (2017), où elle a noté une diminution de ce constituant suite à un traitement par deux engrais, l'urée et le NPK. Par contre, une augmentation de la vitellogénine a été constatée chez les espèces de gastéropodes : *Valvata piscinalis*, et *Lithoglyphus naticoides* (Beatrice *et al.*, 2009) et chez une crevette *Macrobrachium* après exposition aux xénobiotiques (Fernando *et al.*, 2012).

4.6. Effet sur les acides nucléiques

Les êtres vivants sont constitués de certaines biomolécules complexes (acides nucléiques et protéines) intervenant dans certains processus physiologiques notamment la reproduction (Bergeron & Regnault, 1980).

Le dosage des acides nucléiques a une importance particulière en raison de la relation entre le rapport ADN / ARN et les niveaux de croissance chez une grande variété d'organismes marins tels que les phytoplanctons (Berdalet & Dortch, 1991 ; Berdalet & Estrada, 1993), les bactéries

(Kerkhof & Ward, 1993 ; Jeffrey *et al.*, 1996 ; Mordy & Carlson, 1991), les poissons (Buckley & Lough 1987 ; Bulow, 1987) et les invertébrés (Sutcliffe, 1970). L'exposition à des xénobiotiques, induit des changements dans le matériel génétique ainsi que dans la protéosynthèse car il a été prouvé que certains de ces molécules (par exemple, le DDT) agissent au niveau cellulaire et stimulent la transcription des gènes. Ces substances semblent affecter soit les histones ou les protéines acides qui sont impliqués dans le contrôle de l'expression génétique (Vladimir *et al.*, 1991).

La présente étude montre que les acides nucléiques chez les individus traités aux insecticides Lazer sont perturbés. Les résultats obtenus révèlent une diminution du taux d'ADN et du taux d'ARN chez les juvéniles d *Helix vermiculata* à différentes périodes.

Plusieurs études réalisées ont démontré la réduction des taux d'ADN et d'ARN, suite à une exposition aux pesticides chez l'escargot *Lymnaea natalensis* traité par mefloquine (Thabet & Bakry, 2019), chez les escargots *Theba pisana* la teneur en ADN semble être affectée après l'action directe d'abamectine et de thiaméthoxame (Nutan & Ravindra, 2010) et chez *Biomphalaria Alexandrina* (Barky, 2012).

4.7. Effet sur les biomarqueurs

Les marqueurs biologiques ou biomarqueurs concernent l'étude des changements physiologiques, biochimiques, moléculaires ou comportementaux révélant l'exposition présente ou passé d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier pour mettre en évidence l'exposition à un ou plusieurs contaminants (Badiou, 2007).

Les biomarqueurs, peuvent fournir des informations sur les stratégies et/ ou les mécanismes moléculaires et cellulaires qu'un organisme développe pour faire face aux effets néfastes de cette molécule. Cet aspect préventif leur permet donc de diagnostiquer de façon précoce des dysfonctionnements physiologiques de l'individu, c'est-à dire avant que des dommages tissulaires ou des effets néfastes sur les principales fonctions biologiques ne soient détectables (Van der Oost *et al.* 2003). Les espèces supports sélectionnées pour l'étude de la réponse des biomarqueurs (peuvent en fonction de leur habitat et de leur position dans le réseau trophique, fournir des informations sur la façon dont se comportent les polluants ans les écosystèmes (Lagadic *et al.*, 1997a ; Stegeman *et al.*, 1992).

Nous nous focaliserons dans cette étude sur certains biomarqueurs les plus utilisés actuellement sur les organismes terrestres (Saint-Denis *et al.*, 2001 ; Brown *et al.*, 2004 ; Xiao *et al.*, 2006 ; Gambi *et al.*, 2007 ; Reinecke *et al.*, 2007).

4.7.1. Effet sur l'activité spécifique des GSTs

Le système de défense antioxydant est présent chez toutes les cellules aérobies et neutralise les réactions chimiques intermédiaires produites par voie endogène et/ou le métabolisme des xénobiotiques. L'activité du système antioxydant peut subir une augmentation ou une inhibition sous l'effet d'un stress chimique (Winston & Di Giulio, 1991). Les GSTs (Glutathion-S-transférases) sont des enzymes de biotransformation de la phase II, dont la fonction est de conjuguer à une molécule de GSH une grande variété de substrats pour permettre leur élimination dans la bile ou l'urine. Ces substrats peuvent être des molécules endogènes, ou des xénobiotiques tel que : les pesticides (Narbonne *et al.*, 1991). L'activité des glutathion S-transférases augmentait dans les organismes en fonction de la concentration des xénobiotiques dans le milieu (Van veld & Lee, 1988).

L'activité spécifique de la GST chez *E. vermiculata* a marqué une augmentation au cours de la période testée et qui se traduit par une mise en place du processus de détoxification qui est une forme de défense d'escargot contre le pesticide.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus chez la carpe traitée par lambda-cyhalothrine + thiaméthoxame (Barbara, 2018), l'escargot *Theba pisana* (El-Gendy, 2019), chez *Helix aspersa* traitée par les métaux lourds (Abdel-Halim, 2013), et chez *Helix vermiculata* traité par un engrais, weatfert (Attia *et al.*, 2021).

4.7.2. Effet sur le taux du GSH

Le GSH est requis pour l'activité de plusieurs enzymes, il participe avec le glutathion réductase à l'établissement de ponts disulfures dans de nombreuses protéines et dans des hormones polypeptides et prend part au métabolisme des xénobiotiques présents dans la majorité des tissus. Le glutathion joue un rôle principal dans la réduction de tout peroxyde organique, en présence de glutathion peroxydase (GPx). Il est utilisé par les glutathion-S-Transférases, mais également par d'autres enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydant, telles que la GSH réductase et la GSH peroxydase. Il peut également intervenir seul pour réduire des protéines portant des groupements thiols oxydés ou détoxifier des radicaux libres ou des agents oxydants. Dans la cellule, le GSH est donc un antioxydant essentiel. (Rahman & MacNee, 2000). Le stress oxydant est susceptible d'être provoqué par des polluants,

des variations environnementales ainsi que des facteurs endogènes notamment des taux élevés en acide gras polyinsaturés et teneurs élevées en oxygène. Cependant beaucoup d'organismes semblent dotés de systèmes antioxydants qui se mettent en activité lors d'un stress oxydant (Cossu *et al.*, 1997). Plusieurs travaux ont montré que des activités antioxydants sont induites par des polluants organiques (HAP, PCB...) ou des métaux lourds. La lipoperoxydation n'exclut pas l'induction de ces activités mais elle traduit leur inefficacité à faire face au stress (Cossu *et al.*, 1997).

Le stress oxydant n'est pas toujours lié à la pollution. Il peut être le résultat des facteurs physiologiques (reproduction...) ou environnementaux (climat...) ; il se traduit par l'activation de systèmes antioxydants. Lorsque l'induction des enzymes antioxydants est suffisante, elle permet l'adaptation des individus et le retour à la normale alors que leur inhibition est souvent associée à des effets de toxicité (Cossu *et al.*, 1997).

L'analyse de nos résultats sur le taux du glutathion montre une diminution au cours de la période testée (1 mois) chez l'escargot *Helix vermiculata*.

Par ailleurs les résultats d'El-Gendy *et al.* (2019) ont mis en évidence une diminution du taux du GSH chez *Theba pisana* traitée par abamectine et thiaméthoxam, chez *Biomphalaria alexandrina* (El-Shenawy *et al.*, 2016), et chez *Helix aspersa* traité par les métaux lourds (Abdel-Halim, 2013).

La diminution du GSH pourrait être expliquée par une consommation accrue de ce cofacteur par les GSTs afin de détoxifier l'organisme. De plus, elle traduit également une réduction du système antioxydant non enzymatique.

4.6.3. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE

Dans les jonctions inter-neuronales ou neuromusculaires, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui permet la transmission de l'influx nerveux. Libéré dans l'espace synaptique, ce neurotransmetteur se fixe sur les récepteurs cholinergiques au niveau de la membrane post-synaptique. L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur entraîne une dépolarisation membranaire à l'origine du potentiel d'action.

L'acétylcholinestérase est l'enzyme qui dégrade par hydrolyse ce médiateur chimique afin de stopper rapidement la stimulation du récepteur (Bocquené & Galgani, 1998). Les insecticides organophosphorés et les carbamates sont les principaux contaminants de l'environnement qui inhibent l'activité acétylcholinestérase (Reinecke *et al.*, 2007).

En effet l'exposition à des doses données d'insecticide, peut conduire progressivement à une inhibition irréversible de l'AChE, et produit un effet toxique ; neurotoxicité qui est définie par un changement structural ou une altération fonctionnelle du système nerveux (Braquenier, 2009 ; Samuel & Laurent, 2005). L'analyse des résultats obtenus chez *Helix vermiculata* traité par l'insecticide Lazer révèle une diminution de l'activité enzymatique de l'AChE. Cette diminution est probablement due à l'inhibition de cette enzyme par le traitement. Nos résultats sont en accord avec ceux de Fayez (2012) qui a signalé une diminution de l'activité enzymatique de l'AChE, chez l'espèce *Biomphalaria alexandrina* traitée par Atrazine et Roundup, chez *Galba truncatula* traitée par le Pyrimicarbe seul et en combinaison avec le plomb (Marziyeh *et al.*, 2018). Par ailleurs, une diminution significative a été observée chez *Galba truncatula* après traitement par le Diméthoate seul et en combinaison avec le cadmium (Banaee, 2019).

4.7. Histopathologie

L'examen histologique de l'hépatopancréas d'*E. vermiculata* exposée à un pesticide a révélé des altérations tissulaires.

Selon Attia *et al.* (2021), les escargots terrestres, *Helix vermiculata* traités par un engrais minéral, le Weatfert, ils ont également révélé des altérations dans la structure de la glande digestive. Grara *et al.* (2016) ont montré que l'espèce, *Helix aspersa* exposé à des concentrations croissantes de poussières métalliques a permis de mettre en évidence les altérations qui ont affecté le tissu hématique chez les escargots. De plus, des altérations histologiques du tube digestif sous l'effet de l'engrais ont été observées chez un escargot aquatique, *Lanistes carinatus* (Sheir, 2015). Les travaux de Ait Hamlet *et al.* (2020) ont révélé une altération de l'architecture tissulaire suite à une exposition d'*Helix aspersa* à un traitement par la tartrazine.

V. CONCLUSION

Notre étude a permis d'évaluer l'effet d'un insecticide chez une espèce bioindicatrice de pollution, *Eobenia vermiculata* sur différents paramètres physiologiques (croissance et mortalité), biochimiques (protéines, lipides, glucides), enzymatiques (GST, GSH, AChE) et histopathologiques.

Le taux de mortalité marque une augmentation au cours du traitement et en fonction des doses appliquées. De plus, on note un changement dans le comportement des escargots qui ont plus tendance à se mettre en hibernation et à s'éloigner de la nourriture. Une inhibition de la croissance a été également signalée à partir de la 2ème semaine de traitement avec les 2 doses appliquées.

Le traitement appliqué a provoqué une perturbation de la composition biochimique de la glande digestive via une augmentation des protéines et une diminution des réserves énergétiques (glucides et lipides) au cours des différentes périodes de traitement. Par ailleurs, une diminution de la vitellogénine a été observée au niveau de la glande albumen suite à ce traitement. Le taux des acides nucléiques ADN et ARN a été perturbé après application du Lazer.

L'évaluation des biomarqueurs indique que l'insecticide Lazer semble être neurotoxique puisqu'une diminution significative de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase a été enregistrée à partir de la 2ème semaine de traitement. De plus, cet insecticide induit une activation du système de détoxification par le biais d'une augmentation de l'activité de la GST et une diminution du taux du glutathion, important cofacteur.

L'étude histopathologique a confirmé la sensibilité de l'espèce par rapport au traitement appliqué à travers des atteintes tissulaires bien visibles, au niveau de l'hépatopancréas.

À l'avenir, il serait intéressant de compléter le travail par l'évaluation de l'effet de ce traitement sur le potentiel reproducteur des escargots. Il faudrait notamment mesurer d'autres enzymes de détoxification.

VI. RESUME

L'utilisation intensive et anarchique des pesticides, au cours des dernières années, a conduit à l'apparition de multiples problèmes d'ordres écologiques, environnementaux et sanitaires. En effet, la présence de ces substances même à de faibles quantités dans les produits agricoles et les eaux, peut poser d'éventuels risques sanitaires.

Notre étude vise à étudier expérimentalement la toxicité d'un insecticide largement utilisé, "Lazer" sur les escargots, *Eobenia vermiculata*. Les résultats obtenus montrent dans un premier temps que l'exposition au Lazer a entraîné une diminution dans la masse corporelle, une perturbation du métabolisme biochimique marquée essentiellement par une diminution des glucides et des lipides totaux et une augmentation significative des protéines au niveau de l'hépatopancréas.

De plus, le traitement a manifesté un effet neurotoxique via une inhibition de l'activité de l'AChE et une induction de l'activation du stress oxydatif par le biais d'une augmentation des GSTs et une réduction du taux du GSH.

Par ailleurs, on note des troubles au niveau du taux des acides nucléiques (ADN et ARN) au niveau de la glande digestive et de la vitellogénine au niveau de la glande albumen.

Mots clés : *Eobenia vermiculata*, insecticide, toxicité, croissance, stress oxydant, composition biochimique, histopathologie.

Abstract

The intensive and uncontrolled use of pesticides in recent years has led to the emergence of multiple ecological, environmental and health problems. Indeed, the presence of these substances even in small quantities in agricultural products and water, can pose possible health risks.

Our study aims to experimentally investigate the toxicity of a widely used insecticide, "Lazer" on snails, *Eobenia vermiculata*. The results obtained show initially that exposure to Lazer led to a decrease in body mass, a disruption of the biochemical metabolism marked primarily by a decrease in carbohydrates and total lipids and a significant increase in proteins at the level of the hepatopancreas.

In addition, the treatment demonstrated a neurotoxic effect via inhibition of AChE activity and induction of activation of oxidative stress through increased GSTs and reduced GSH levels.

In addition, there are disorders in the level of nucleic acids (DNA and RNA) in the digestive gland and vitellogenin in the albumen gland.

Keywords: *Eobenia vermiculata*, insecticide, toxicity, growth, oxidative stress, biochemical composition, histopathology,

ملخص:

أدى الاستخدام المكثف وغير المنضبط لمبيدات الآفات في السنوات الأخيرة إلى ظهور العديد من المشاكل البيئية والبيئية والصحية. في الواقع ، إن وجود هذه المواد حتى بكميات صغيرة في المنتجات الزراعية والمياه ، يمكن أن يشكل مخاطر صحية محتملة.

تهدف دراستنا إلى التحقيق التجريبي في سمية مبيد حشري يستخدم على نطاق واسع ، "الليزر" على القواقع ، *Eobenia vermiculata*. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في البداية أن التعرض للليزر أدى إلى انخفاض في كتلة الجسم ، واضطراب في التمثيل الغذائي الكيميائي الحيوي تميز بشكل أساسي بانخفاض الكربوهيدرات والدهون الكلية وزيادة معنوية في البروتينات على مستوى الجسم. بالإضافة إلى ذلك ، أظهر العلاج تأثيراً عصبياً عن طريق تثبيط نشاط AChE وتحريض تنشيط الإجهاد التأكسدي من خلال زيادة GSTs وخفض مستويات GSH.

بالإضافة إلى وجود اضطرابات في مستوى الأحماض النووية (DNA و RNA) في الغدة الهضمية و vitellogenin في الغدة الزلالية.

الكلمات المفتاحية: *Helix vermiculata* ، مبيد حشري ، سمية ، إجهاد مؤكسد ، التركيبة البيوكيميائية ، الاجماض النووية ، التركيبة النسيجية

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-Halim, K.Y. A., Abo El-Saad, A.M.B., Talha, M.M.A., 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. 93:1131-1138.

AgroRayen : site des produits phytosanitaires : <https://agrorayane.com/>.

Astani, M., Vosoughi, A.R., Salimi, L., Ebrahimi, M. (2012). Comparative study of heavy metal (Cd, Fe, Mn, and Ni) concentrations in soft tissue of gastropod *Thais mutabilis* and sediments from intertidal zone of Bandar Abbas. *Advances in Environmental Biology*. 6: 319-32.

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.

Badiou, A. (2007). Caractérisation cinétique et moléculaire du biomarqueur acétylcholinestérase chez l'abeille, *Apis mellifera*. Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, FRA.

Banaee, M., Suredab, A., Taheria, S., Hedayatzadeh, F. (2019). Sub-lethal effects of dimethoate alone and in combination with cadmium on biochemical parameters in freshwater snail, *Galba truncatula*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 220: 62-70.

Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury, B., Ribeyre, F., Boudou, A. (1997). Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ, Toxicol, Chem*. 16: 2096-2105.

Beatrice, G., Francois, G., Chantale A., Christian B., Abbaci K., Hélène B., Dévier, M., Jeanne, G. (2009). Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. *Aquatic Toxicology*. 92 :155-167.

Bensalem-Djidi, F. (2014). Effet de deux hypotenseurs le lisinopril et l'enalapril sur quelques paramètres de la reproduction d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*

(Lépidoptère : Pyralidé). Thèse en vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat 3eme cycle. Spécialité : Biologie Animale Environnementale. Université Badji Mokhtar, Annaba. 97 p.

Berdalet, E. & Estrada, M. (1993). Relationships between nucleic acid concentrations and primary production in the Catalan Sea (Northwestern Mediterranean). *Marine Biology*. 117:163-170.

Berdalet, E., Dortch, Q. (1991). New double-staining technique for RNA and DNA measurement.

Berger, B., Dallinger, R. (1993). Terrestrial snails as quantitative indicators of Environmental pollution. *Environmental Monitoring and Assessment*. 25: 65-84.

Bergeron, R., Regnault, J.P. (1980). Reproduction et développement. Collection Biomoduls. Edition études vivantes. Monreale, Paris. 28 : 19-28.

Bhavan, P.S., Geraldine, P. (1997). Alterations in Concentrations of Protein, Carbohydrate, Glycogen, Free Sugar, and Lipid in the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on Exposure to Sublethal Concentrations of Endosulfan. *Pestic, Biochem. Phys.* 58:89–101.

Blem, C. R. (1992). Lipid reserves and body composition in post reproductive anurans. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*.103: 653–656.

Bocquené, G., Galgani, F. (1998). Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds. *Techniques in Marine Environmental Science*. 22 : 1-12.

Boudoucha, I., Rekaik, I. (2019). Evaluation de la toxicité d'un mélange d'insecticides utilisé sur un modèle biologique, *Helix aspersa*. Mémoire de master. 31p.

Bourbia-Ait Hamlet, S. (2013). Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Thèse en vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat 3eme cycle. Spécialité : Biologie Animale Environnementale. Université Badji Mokhtar, Annaba. 39 p.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method of the quantitation microgram quantities of protein utilising the principale dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248 - 254.

Braqueunier, J.B. (2009). Etude de la toxicité développementale d'insecticides organophosphorés : Analyse comportementale de la souris CD1. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat, Université de Liège.217p.

- Brown, L.A., Ihara, M., Buckingham, S.D., Matsuda, K., Sattelle, D.B.** (2006). Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemistry*. 99: 608-15.
- Buckley, L.J., Lough, R.G.** (1987). Recent growth, biochemical composition, and prey field of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) on George's Bank. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 44 :14-25.
- Bulow, F.J.** (1987). RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: R. C. Summer felt and G. E. Hall (ed.), *The age and growth of fish*. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 45 - 64.
- Burton, K.** (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemical Journal*. 62(2): 315 – 323.
- Calow, P., Sibly, R.** (1990). A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications *Functional Ecology*. 4:283–288.
- Carefoot, T. H., Qian, P. Y., Taylor, B. E., West, T., Osborne, J.** (1993). Effect of starvation on energy reserves and metabolism in the Northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*. *Aquaculture*. 118 : 315-325.
- Chevalier, H., 1983.** Les escargots comestibles commercialisent en Europe occidentale. *Informatique technique des services vétérinaires : l'escargot et l'héliciculture*. Paris, France, p 31.
- Clasen, B.A., Vania, L., Loro, B., Camila, R., Murussi, B., Tiecher, T.L.C., Bibiana Moraes, B.B., Zanella, R.D.** Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. 740:737-743.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P.** (1997). Biomarqueurs de stress oxydant chez les annaux aquatiques.149-161.
- Dallinger, R.** (1993).Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates.In: Rainbow, P. *Ecotoxicology of Metals in invertebrates*. Lewis, Boca Raton, FL.245-289.
- Daumer, M., Thaler, K., Kruis, E., Feneberg, W., Staude, G., et al.** (2007). Steps towards a miniaturized, robust and autonomous measurement device for the long-term monitoring of patient activity. *Acti Belt. Biomed Tech (Berl)*. 52: 149–155.

- 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. Spécialité : Toxicologie Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A. p 27.
- Duchateau, G., Florkin, M.** (1959). Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 67: 306 - 314.
- El-Gendy, K.S., Radwan, M. A., Gad, A.F., Khamis, A.E., El-Sayed H.E.** (2019). Physiological traits of land snails the bapisana as simple end points to assess the exposure to some pollutants. *Environmental Science and Pollution Research* .26:6922–6930.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M.** (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7:88 - 95.
- Fabre, M.C., Descamps, M., Baert, J. L.** (1990). Identification and partial characterization of vitellin and vitellogenin from *Scolopendra cingulate* Latreille (Myriapoda: Chilopoda). In proceedings of the 8 th international Conference on Myriapodology, Innsbruck, Austria. Ber. Nat-ined. Verein Innsbruck. 117- 121.
- Fayez A., Barky, Hala A. Abdelsalam, Momeana, B. Mahmoud, A, Salwa, A.H. Hamdi** (2012). Influence of Atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails Medical Malacology Department, Theodor Bilharz Research Institute, Giza, Egypt. 104: 9-18.
- Fernando, G.C., Horacio, H.** (2012). Vitellogenin and Lipovitellin from the prawn *Macrobrachium borellii* as hydrocarbon pollution biomarker marine pollution bulletin. 64:1631-1636.
- Gagnairea, B., Franc., Gagné, O.B., André, C.B., Blaise, C.B., Abbaci, K.A., Budzinski, H.C., Dévier, M.H.C., Garric, J.** (2009). Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins *Aquatic Toxicology*. 92:155–167.
- Gaillard, J.** (1991). Les Mollusques, document polycopie du module de la conférence sur les animaux venimeux au Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, Juillet 1999. 1-18.
- Gambi, N., Pasteris, A., Fabbri, E.** (2007). Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Comparative Biochemistry and*

Physiology, Part C.145: 678-685.

Geret, F., Serafim, A., Bebianno, M. (2003). Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*. *Ecotoxicology*. 12:417–426.

Goldsworthy, A.C., Mordue, W., Guthkelch, J. (1972). Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*.18: 306-314.

Gomot-de Vaufleury, A., 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*.21: 820-827.

Goudsmit, E. M. (1975). Neurosecretory stimulation of galactogen synthesis within the *Helix pomatia* albumen gland during organ culture. *J. exp. Zool.* 191 : 193-197.

Grara N., Atilia A., Boucenna M., Berrebbah H., Djebbar M., (2016). Etude biochimique et histopathologique de la toxicité des poussières métalliques du

Grizimek, B., Fontaine, M. (1973). *Le Monde Animal*, Edition stauffacher S.A. Zurich volume III : Mollusque Echinodermes .19-23, 123-134.

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

Hamed, S. S., Abdelmeguid, N. E., Essawy, A. E., Radwan, M. A., Hegazy, A. E., Hashemi, S., Blust, R., De Boeck, G. (2008). Combined effects of different food rations and sublethal copper exposure on growth and energy metabolism in common carp. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54 :318–324.

Heusser, S., Dupuy, HG., (2011). Synthèse de la structure tissulaire à la réalisation des fonctions chez les Gastéropodes Pulmonés (I) Eléments d’histologie et de physiologie des espèces *Helix aspersa* et *Helix pomatia*. *Folia Chonchiliologica*. 10:3-25

Jeffrey, W.H., Von Haven, R., Hoch, M.P., Coffin, R.B. (1996). Bacterioplankton RNA, DNA, protein content and relationships to rates of thymidine and leucine incorporation. *Aquatic Microbial Ecology*.10:87 - 95.

- Kawther, E., Mohamed, A., Amira, F., Awatef, E., El-Sayed, H.** (2019). Physiological traits of land snails *Theba pisana* as simple endpoints to assess the exposure to some pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*. 26:6922–6930.
- Kerkhof, L., Ward, B.B.** (1993). Comparison of nucleic acid hybridization and fluorometry for measurement of the relationship between RNA/DNA ratio and growth rate in a marine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:1303 – 1309.
- Kerney, M.P.** (1938). Cameron RAD.A Field Guide to the Land Snails of Britain and NW Europe. William Collins Sons & Co. Ltd, London.288p.
- Kerney, M.P., Cameron, R.A.D.** (1979). A field guide to the land snails of Britain and North-West Europe. Collins, London, United Kingdom. 288 p.
- El-Gendya, KS., Radwana, MA., Gadb, AF., Khamisa, AE., Eshrab, EH.** (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.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F.** (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Paris, Masson. 418 p.
- Lagadic, L., Caquet, T.J.C., Amiard., Ramade, F.** (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson. 419P.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C.** (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : principes and définitions. In : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Masson, Londres, Paris, New York.1-9.
- Laskowski, R., Hopkin, S.P.** (1996). Effect of Zn, Cu, Pb and Cd on fitness in snail (*Helixaspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 34: 59-69.
- Mekahlia, M.N., Tine, S., Menasria, T., Amieur, H., Salhi, H.** (2015). In Vitro Biomarker Responses of Earthworm *Lumbricus terrestris* Exposed to Herbicide Sekator and Phosphat Fertilizer Water, Air & Soil Pollution. *International Journal of Environmental Pollution*. 227: 15.
- Mordy, C.W., Carlson, D.J.** (1991). An evaluation of fluorescence techniques for measuring DNA and RNA in marine microorganisms. *Marine Ecology Progress Series*.73: 283 - 293.

- Müller, O. F.** (1774). Vermium terrestrium et fluviatilium, sen animalium infusoriorum, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succincta historia. Testacea—Heineck et Faber, Havnie et Lipsiae. Vol 2.
- Nahla, S., El-Shenawy, F., Affi, A., Sara, A., Maha, F., Mohamed S.** (2016). Biochemical and histopathological changes of *Biomphalaria alexandrina* snails exposed to bisphenol A. Toxicological & Environmental Chemistry.
- Narbonne, J.F., Garrigues, P., Ribera, D., Raoux, C., Mathieu, A., Lemaire, P., Salaün, J.P., Lafaurie, M.** (1991). Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean sea. Comparative Biochemistry and Physiology. 100: 37-42.
- Oerke, E., Dehne, H.** (1997). Global crop and the efficacy of crop production current situation and futures trends. European Journal of Plant Pathology. 103: 203-215.
- Rahman, I., MacNee, W.** (2000). Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. Eur Respir. 16: 534-54.
- Raisi, M., Reza Pourkhabbaz, M., Banaee, M., Reza, A., Javanmardi, S.** (2018). Effects of Pirimicarb carbamate insecticide alone and in combination with lead (Pb) on biochemical parameters of soft tissues in freshwater snail, *Galba truncatula*. Aquat. Biol. 6(3):126-137.
- Rambabu, J. P., 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). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53: 142–148.
- Reinecke, S.A., Reinecke, A.J.** (2007). Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. Ecotoxicology and Environmental Safety. 66: 92-101.
- Reinecke, S.A., Reinecke, A.J.** (2007). Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. Ecotoxicology and Environmental Safety. 66: 92-10.
- Ribeiro, S., Sousa, J. P., Nogueira, A. J. A., Soares, A. M. V. M.** (2001). Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. Ecotox. Environ, Safe. 49: 131–138.

- Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Ribera, D.** (2001). Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 395-404.
- 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.
- Sancho, E., Ferrando, M. D., Fernández, C., Andreu, E.** (1998). Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. *Ecotox, Environ, Safe*. 41: 168–175.
- Sargent, J., Henderson, R. J., Tocher, D. R.** (1989). The lipids In Halver JE (Ed) *Fish Nutrition*. Academic Press, London. 154–209.
- Schneider, W.C.** (1957). Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In: *Methods in Enzymology* (Sidney, P. Colowick and Nathan, O. Kaplan, eds). Academic Press, New York.
- Schuytema, G.S., Nebeker, A.V., Griffis W.L.** (1994). Effects of dietary exposure to forest pesticides on the brown garden snail *Helix aspersa* Muller. *Archives of Environmental contamination and Toxicology*. 26: 23-28.
- Sherin K. Sheir.** (2015). The role of Caselio (plant fertilizer) exposure on digestive gland histology and heavy metals accumulation in the freshwater snail, *Lanistes carinatus*. 5 :223-233
- Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyek, C.A., Newhall, A.R., Friedman, 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. *Analytical Biochemistry*.19 : 514 -528.
- Ait Hamlett, S., Bensoltane, S., Berrebah, H.** (2020). Effets aigus de l'exposition à la tartrazine (E102) sur le comportement et l'histologie d'un modèle biologique l'escargot terrestre *Helix aspersa*. 1: 43-51
- Soliman El-Shenawy, N., Afifi Ali El Deeb, F., Ali Mansour, S., Soliman, M.F.M.** (2016). Biochemical and histopathological changes of *Biomphalaria alexandrina* snails exposed to bisphenol A, *Toxicological & Environmental Chemistry*. 277-2248.

- Sujatha, C.H., Nair, S.M., Chacko, J.** (1996). Tributyltin oxide induced physiological and biochemical changes in a tropical estuarine clam. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56:303–310.
- Thabet, M., Bakry, F.A.** (2019). Effect of mefloquine on biological and biochemical aspects of *Lymnaea natalensis* snails infected with *Fasciola gigantica*. *The Journal of Basic and Applied Zoology*.
- Tsai, C.L.** (2004). Introduction of slugs in plant quarantine. *Council of Agriculture plant protection.* 5:113-119.
- Umminger, B.L.** (1977). Relation of whole blood sugar concentration in vertebrates to standard metabolic rate. *Comp. Biochem. Physiol.*55: 457–460.
- Van der Oost. R., Beyer. J., Vermeulen, N. P. E.** (2003) .Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.* 13: 57–149.
- Van Veld, P., Lee, R.** (1988). Intestinal glutathione S-transferase activity in flounder *Platichthys flesus* collected from contaminated and reference sites. 46: 61- 63.
- Vladimir, L., Jan, S., Frantisek, M., Vladimir, M., Tomas, S.** (1991). Methods for assessing exposure of human and non-human biota. Edited by R.G. Tardiff and B. Goldstein (F) SCOPE. 265 p.
- Weckberker, G., Cory, J.G.** (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters.* 40: 257 – 264.
- Williams, P.H., Humphries, C.J.** (1996). Comparing character diversity among biotas in K. J. Gaston (ed.). *Biodiversity. Biology of Numbers and Differences.* London: Chapman and Hall.54-76.
- Winston, G.W.** (1991). Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative biochemistry and Physiology.* 100: 173-176.
- Xiao, N., Jing, B., Ge, F., Liu, X.** (2006). The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere.* 62: 1366-1373.
- Zaldibar, B., Cancio, I., Soto, M., Marigomez, JE.** (2008). Modifications de la composition du type cellulaire dans la glande digestive des limaces et son influence sur les biomarqueurs après transplantation entre un site relativement non pollué et un site chroniquement pollué par les métaux : 367-379.