



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tebessi-Tébessa-

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

Département de : Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Science de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: Pharmacotoxicologie

Thème :

*Evaluation de l'effet protecteur des huiles
essentielles de l'écorce d'orange chez les escargots
intoxiqués par l'hymexazole*

Présenté par :

YOUSFI Djamila

DJEDDAI Sara

Devant le jury :

Mr. MENACEUR Fouad	MCA	Université Larbi Tebessi-Tébessa	Président
Mr. DJABRI Belgacem	Prof	Université Larbi Tebessi-Tébessa	Rapporteur
Mme. BOUADILA Soulef	MAA	Université Larbi Tebessi-Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance: 19/06/2019

Note :..... Mention :.....

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا

إنك أنت العليم الحكيم

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سورة البقرة: الآية: 31

Remerciements

Louange à " Dieu" le tout puissant de nous avoir guidé durant toutes les années et nous a permis de réaliser ce mémoire en nous donnant la force, le courage, la patience et la violence.

Nous tenons très sincèrement à remercier notre encadreur

DJABRI BELGACEM

Pour avoir accepté de diriger ce travail, et pour ces précieux conseils et sa patience durant toute la préparation de ce mémoire de Master.

Nous remercions aussi chaleureusement l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail :

*le président **MENACEUR FOUAD** et l'examinatrice Mme **BOUADILA SOULEF** pour vos suggestions qui contribueront à l'amélioration de la qualité scientifique de ce travail.*



Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

*A mes chers parents, pour leur
endurance et leurs sacrifices sans limites
A mes frères et sœurs, en reconnaissance de
leur affection toujours constante Tous mes
proches*

A mes amis e mes camarades de promotion

A tous mes enseignants surtout

DJABRI BELgACEM

pour encadrement

*A tous ceux qui m'ont aidé dans la
réalisation de ce mémoire*

DJAMILA



Dédicace

*A mon exemple éternel, ma source
de joie et bonheur, celui qui s'est toujours
sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes
efforts, la flamme de mon cœur, ma vie
et mon bonheur ;maman que j' adore.*

*A mon cher fiancé Abd El Muttalib
pour son encouragement permanents
et son soutien moral.*

A mon cher frère Walid et sa femme Bariza.

A mes chers frères Seif et Ayoub

A ma très chère sœur Nour et son mari Amine.

*Que ce travail soit l'accomplissement de
vœux tant allègues, et le fruit de votre
soutient infailible.*

Merci d'être toujours là pour moi.

Sara

ملخص

الهيميكسازول هو مبيد للفطريات النشطة الخاصة بالهذور، له سمية معتدلة. وخاصة على جنس الفيوزاريوم بسبب الضرر الناجم عن الإجهاد التأكسدي. من المعروف أن الزيوت الأساسية لقتور البرتقال لها نشاط مضاد للأكسدة. الغرض من هذه الدراسة هو تقدير سمية الهيميكسازول على الحزون اللولبي وتقييم التأثير الوقائي للزيوت الأساسية لقتور البرتقال. هذه دراسة تجريبية أجريت في المختبر على 40 حلزوناً تم علاجها يومياً عن طريق الحقن لمدة 21 يوماً. تم تقسيم الحلزونات إلى أربع مجموعات (10 حلزونات في كل مجموعة) : الأولى الشاهد وعولجت بالماء المقطر و الثانية عولجت بالزيوت الأساسية لقتور البرتقال (0.151 ميكرونتر / جم من الوزن الصافي) أما الثالثة فعولجت بالهيميكسازول (90 ميكروغرام / غرام من الوزن الصافي) والرابعة بمزيج الهيميكسازول والزيوت الأساسية لقتور البرتقال بنفس الجرعات. تم قياس بعض المعلمات الكيميائية الحيوية للأنسجة (الكربوهيدرات والبروتينات والدهون) وبعض معايير الإجهاد التأكسدي (CAT، GST، GPx، GSH، MDA).

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن الهيميكسازول يسبب اضطراب مستويات الأيض كما يتضح من خلال انخفاض مستويات الدهون (56,02 ± 31,85) وزيادة مستويات الكربوهيدرات (133,19 ± 54,62) في حين بقيت مستويات البروتين دون تغيير (45,45 ± 4,23). بالإضافة إلى ذلك ، انخفضت مستويات هرمون النمو في الجسم مع العلاج بالهيميكسازول ، بينما زادت مستويات MDA والنشاط الأنزيمي لـ GPx و GST و CAT. هذه النتائج تظهر أيضاً أن مكملات الزيوت الأساسية لقتور البرتقال قد حسنت توازن إزالة السموم وقللت من الآثار الضارة للهيميكسازول. يبدو أن الأساسية لقتور البرتقال من مضادات الأكسدة الفعالة لتقليل الخلل بين تكوين الجذور الحرة وأنظمة مضادة للأكسدة في الجسم ، وبالتالي لتقليل شدة الإجهاد التأكسدي الناجم عن الهيميكسازول.

الكلمات المفتاحية: الهيميكسازول ، الزيوت الأساسية ، *Helix aspersa* ، المؤشرات البيوكيميائية، المؤشرات التاكسدية.

Abstract

Hymexazol is a systemic fungicide for active seeds, particularly on the genus *Fusarium*. It has a moderate toxicity causing damage induced by oxidative stress. Orange essential oils are known to have antioxidant activity. The purpose of this study was to estimate the toxicity of hymexazol to *Helix aspersa* and to evaluate the protective effect of the essential oil of orange peel.

This is an experimental study which is conducted in the laboratory on 40 snails *Helix aspersa* that were treated daily by injection for 21 days. The snails were divided into four groups (10 snails each), the first batch serving as a control (T), the second batch was treated with essential oils of orange peel (0.151 μ l / g live weight), batch 3 was treated with hymexazol (90 μ g/g / g body weight) and the last lot was treated with orange peel essential oils (HEO) combined with hymexazol at the same doses. Hépatopencreas were collected to measure certain tissue biochemical parameters (carbohydrates, proteins and lipids) and some parameters of oxidative stress (MDA, GSH, GPx, GST and CAT).

The results of this study show that hymexazol induces disruption of metabolite levels as revealed by decreased lipid (56,02 \pm 31,85) levels and increased carbohydrate (133,19 \pm 54,62) levels while protein levels remained unchanged (45,45 \pm 4,23). In addition, GSH levels decreased in combination with hymexazol therapy, while MDA levels and enzymatic activity of GPx, GST and CAT increased. These results also show that supplementation of essential oils from orange peel has improved the detoxifying balance and decreased the adverse effects of hymexazole. HEO appears to be an effective antioxidant to reduce the imbalance between free radical formation and the body's antioxidant systems, and consequently to reduce the intensity of oxidative stress induced by hymexazol.

Key words: Hymexazole, Essential oils, *Helix aspersa*, biochemical markers, enzymatic markers.

Résumé

L'hymexazole est un fongicide systémique des semences actif notamment sur le genre *Fusarium*. Il possède une toxicité modérée à l'origine de dommages induits par le stress oxydatif. Les huiles essentielles d'orange sont reconnues comme possédant une activité antioxydante avérée. La présente étude visait à estimer la toxicité de l'hymexazole sur *Helix aspersa* et évaluer l'effet protecteur de l'huile essentielle de l'écorce d'orange.

Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur 40 escargots *Helix aspersa* qui ont été traités quotidiennement par injection pendant 21 jours. Les escargots ont été répartis en quatre groupes (10 escargots chacun) dont le premier lot sert de témoin (T), le second lot a été traité par les huiles essentielles de l'écorce d'orange (0,151 µl/g poids vif), le 3^{ème} lot a été traité par l'hymexazole (90 µg/g /g de poids vif) et le dernier lot a été traité par les huiles essentielles de l'écorce d'orange (HEO) combiné aux l'hymexazole aux mêmes doses. Les hépatopancreas ont été prélevés afin de doser certains paramètres biochimiques tissulaires (glucides, protéines et lipides) et certains paramètres du stress oxydatif (MDA, GSH, GPx, GST et CAT).

Les résultats de cette étude montrent que l'hymexazole induit une perturbation des taux de métabolites révélée par la diminution du taux des lipides ($56,02 \pm 31,85$) et une augmentation des taux des glucides ($133,19 \pm 54,62$) tandis que les taux de protéines sont restés inchangés ($45,45 \pm 4,23$). Par ailleurs, le taux de GSH a diminué en association avec le traitement par l'hymexazole alors que les taux de MDA et l'activité enzymatique des GPx, GST et CAT ont augmenté. Ces résultats montrent aussi, que la supplémentation des huiles essentielles de l'écorce d'orange a amélioré l'équilibre de détoxification et a diminué les effets néfastes de l'hymexazole. L'HEO semble être un antioxydant efficace pour réduire le déséquilibre entre la formation des radicaux libres et les systèmes antioxydants de l'organisme, et par conséquent atténuer l'intensité du stress oxydant induit par l'hymexazole.

Mots clés : l'hymexazole, Huiles essentielles, *Helix aspersa*, marqueurs biochimiques, marqueurs enzymatique.

Table des matières

<i>Remerciment</i>	
<i>Dédicace</i>	
<i>ملخص</i>	
<i>Abstract</i>	
<i>Résumé</i>	
<i>Introduction</i>	
Partie bibliographique	
I. Généralités sur les pesticides	04
I.1. définitions	04
I.2. Devenir des pesticides dans l'environnement	04
I.3. Les possibles modes d'expositions de l'homme aux pesticides	05
I.4. Classification des pesticides	06
I.4.1. Herbicides	06
I.4.2. Insecticides	06
I.4.3. Fongicides	06
I.4.3.1. Exemple de l'Hyméxazole	07
I.4.3.1.1. Définition	07
I.4.3.1.2. Propriétés physicochimiques	07
I.4.3.1.3. Utilisation de d'hymexazole	08
I.4.3.1.4. Toxicocinétique de l'hymexazole	08
I.4.3.1.5. Mécanisme d'action	09
I.4.3.1.6. Effets toxicologiques	09
I.4.3.1.7. Effets écotoxiques	10
Chapitre II: Stress oxydant	
II. Généralités sur le stress oxydant	12
II. 1. Stress oxydatif	12
II.1. Définition	12
II.2. Radicaux libres	13
II.3. Type des radicaux libres	13
II.3.1. Espèces réactives à l'oxygène (ERO)	13
II.3.1.1. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes	15
II.3.2. Espèces réactives de l'azote (ERNs)	15
II.4. Modes d'action des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN)	16
II.5. Sources de production de radicaux libres	17
II.6. Principales cibles biologiques des ERO	18
II.6.1. Effets des ERO sur les macromolécules biologiques	18
II.6.2. Conséquence des stress oxydant...	19
II.6.2.1. Peroxydation lipidique	19
II.6.2.2. Oxydation des protéines	20
II.6.2.3. Atteintes de l'ADN	20
II.7. Systèmes de défense antioxydants	21
II.8. Modes d'action des antioxydants	22
II.9. Les différentes localisations cellulaires des antioxydants	23
II.10. Origines des antioxydants	24
Chapitre III .Les huiles essentielles de l'écorce d'orange	
III .1. Introduction	26
III .2. Généralités sur l'orange	26

Table des matières

III .2.1. Description de l'arbre	26
III .2.2. Classification botanique de <i>Citrus sinensis</i>	27
III .2.3. Composition chimique et valeur nutritive d'orange	27
III .2.4. Structure de l'orange	28
III .3. Huiles essentielles de <i>Citrus sinensis</i>	29
III. 3.1. Définition	29
III. 3.2. Localisation et lieu de biosynthèse	29
III. 3.3. Composition chimique	30
III. 3.4. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles	30
III. 4. Extraction des huiles essentielles	30
III. 4.1. Pression à froid	30
III. 4.2. Hydrodistillation	31
III. 4.3. Entraînement à la vapeur d'eau	31
III. 5. Activités biologiques des huiles essentielles	32
III. 5.1. Activité antioxydant	32
III. 5.2. Activité anti-inflammatoire	32
III. 5.3. Activité antiallergique	32
III. 5.4. Activité antimicrobienne et antivirale	32
III. 5.5. Activité anti-cancer	33
III. 6. Toxicité des huiles essentielles	34
IV. 1. Introduction	35
IV. 2. Présentation et classification de l'espèce (<i>Helix aspersa</i>)	36
IV. 3. Anatomie générale d' <i>Helix aspersa</i>	36
IV. 3.1. Le corps	36
IV. 3.2. La coquille	38
IV. 4. Biologie et physiologie d' <i>Helix aspersa</i>	39
IV. 4.1. Appareil digestif	39
IV. 4.2. Système nerveux	39
IV. 4.3. Appareil circulatoire et respiratoire	39
IV. 4.4. Appareil génital	39
IV. 5. Reproduction d' <i>Helix aspersa</i>	40
IV. 6. Rythmes de vie d' <i>Helix aspersa</i>	40
IV. 6.1. Activité journalière	40
IV. 6.2. Activité saisonnière	41
IV. 6.3. Estivation	41
IV. 6.4. Hibernation	41
IV. 7. Alimentation	41
IV. 8. Croissance	42
Partie expérimentale	
I. Matériel et méthodes	44
I.1. Matériel	44
I.1.1. Matériel végétal	44
I.1.2. Matériel animal	44
I.2. Méthodes	46
I.2.1. Extraction des huiles essentielles	46
I.2.2. Rendement	46
I.2.3. Mode de traitement	47
I.2.4. Sacrifices et prélèvements d'organes	47
I.2.5. Méthode de dosage	49
I.2.5.1. Dosage des métabolites contenus dans l'hépatopancréas (protéines, lipides et	49

Table des matières

glucides)	
I.2.5.1.1. Dosage des protéines	51
I.2.5.1.2. Dosage des lipides	51
I.2.5.1.3. Dosage des glucides	51
I.2.6. Analyse des paramètres enzymatiques	52
I.2.6.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	52
I.2.6.2. Dosage du glutathion (GSH)	53
I.2.6.3. Dosage du Glutathion peroxydase (Gpx)	54
I.2.6.4. Dosage de l'activité glutathion-S-transférase(GST)	55
I.2.6.5. Dosage de l'activité catalase(CAT)	56
I.3. Etude statistique	57
II. Résultats	59
II.1. Rendement de l'écorce d'orange en huiles essentielles	59
II.2. Effets de l'HZ et des HEO sur les paramètres biochimiques au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Helixaspersa</i>	59
II.2.1. Effet sur le taux des protéines	59
II.2.2.Effet sur le taux des lipides	60
II.2.3.Effet sur le taux des glucides	61
II.3.Effets du l'HZet les HEO sur les paramètres du stress oxydant au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Helixaspersa</i>	62
II.3.1. Effet surle taux de malondialdehyde (MDA)	62
II.3.2.Effet sur le taux du glutathion réduit (GSH)	63
II.3.3.Effet sur l'activité de GPx	64
II.3.4. Effet sur l'activité de GST	65
II.3.5. Effet sur l'activitéde la catalase (CAT)	66
III. Discussion	68
Conclusion	71
Références bibliographiques	73
Les annexes	88

Liste des tableaux

Liste des Tableaux

N° du Tableaux	Titre	Page
01	Principales caractéristiques physico-chimiques de la substance active	07
02	Caractéristiques des espèces réactives de l'oxygène	15
03	Caractéristiques des espèces réactives de l'azote (ERNs)	16
04	Principales sources de production des radicaux libres	17
05	Principaux modes d'action de quelques antioxydants	23
06	Les deux types de protection antioxydant de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants.	24
07	Caractéristiques générales de <i>Citrus sinensis</i>	26
08	Principaux composés de l'orange	27
09	La réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines aux niveaux de l'hépatopancréas.	88
10	Dosage des protéines : résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage	88
11	La réalisation de la gamme d'étalonnage pour les lipides aux niveaux de l'hépatopancréas.	88
12	Dosage des lipides : résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.	89
13	La réalisation de la gamme d'étalonnage pour les glucides aux niveaux de l'hépatopancréas.	90
14	Dosage des glucides: résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage	90

Liste des figures

Liste des Figures

N°de la figure	Titre	Page
01	Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement	05
02	Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides	06
03	Structure chimique de l'hymexazole	07
04	Schéma montrant le stress oxydant	12
05	Etapas de la réduction de l'oxygène et la formation des intermédiaires partiellement réduits sont détaillées	14
06	Différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) et leurs mécanismes de productions	16
07	Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène. XO : xanthine oxydase ; P-450 : cytochrome P-450	18
08	Mécanismes de la peroxydation lipidique	19
09	Peroxydation des acides gras polyinsaturés	20
10	Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires	21
11	Systèmes biologiques de défenses anti-oxydantes	22
12	Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes anti oxydantes (en noir)	23
13	Coupe transversale de fruit de <i>Citrus sinensis</i>	29
14	Escargot <i>Helix aspersa</i>	35
15	Schéma de l'anatomie d'un escargot	37
16	Coquilles d' <i>Helix aspersa</i>	38
17	Ecorce sèches d'orange	42
18	Les escargots <i>Helix aspersa</i>	43

Liste des figures

19	L'élevage des escargots dans le laboratoire	43
20	Procédé d'hydro-distillation	44
21	Etapes de la dissection des escargots et Prélèvement des organes L'hépatopancréas	46
22	Extraction et dosage des métabolites (glucides, lipides, et protéines) de l'hépatopancréas chez les adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	48
23	Variations du taux des protéines au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements	56
24	Variations du taux des lipides au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.	57
25	Variations du taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.	58
26	Variations du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.	59
27	Variations du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.	60
28	Variation de l'activité de GPx au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements	61
29	Variation de l'activité de GST au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements	62
30	Variation de l'activité de la catalase au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités après en fonction des traitements.	63
31	Droite de régression exprimant les absorbances à 595 nm en fonction de concentration BSA (mg/l) (R^2 : coefficient de détermination).	88
32	Droite de régression exprimant les absorbances à 530 nm en fonction de concentration de solution mère de lipides (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination).	89
33	Droite de régression exprimant les absorbances à 620 nm en fonction de concentration de solution de glucose (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination)	90

Liste des figures

Liste des photos

Liste des abréviations

Liste des abréviations

HE	Huiles Essentielles.
HZ	l'hymexazole
HEO	Huiles Essentiellesde l'ecorced'orange
MDA	Malondialdehyde.
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène.
ERO	Espèces Réactives Oxygénées.
SOD	Superoxyde dismutase.
TBS	Tris-buffered saline.
TCA	Trichloroacétique.
TNB	Acide 5-thio-nitrobensoïque.
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
Vt	Volume totale.
Vh	Volume du l'homogénat.
µl	Microlitre.
DTNB	Acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïde.
-SH	Groupements Thiols.
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique.
ASS	Acide sulfoosalicylique.
CDNB	1-chloro-2-4 dinitrobenzène.
TBA	l'acide thiobarbiturique.
ERNs	Espèces réactives de l'azote
ROOH	lipoperoxyde.
AGPI	Acide gras polyinsaturés.
-SH	Groupement thiol.
GPx	Glutathion Peroxydase.
GSH	Glutathion réduit.
GST	Glutathion-S-transférase.

Introduction



Introduction

Actuellement, le terme « pesticide » est une appellation générique désignant toutes les substances naturelles ou synthétiques utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes (microorganismes, animaux ou végétaux) jugés indésirables ou nuisibles pour l'agriculture, mais également pour d'autres applications (hygiène et santé publiques, soins vétérinaires, traitements de surfaces non-agricoles...etc.) (ACTA, 2005). Les pesticides sont utilisés, non seulement dans l'agriculture, mais aussi par divers autres acteurs (industries, collectivités territoriales) ainsi qu'en usage domestique et vétérinaire.

Parmi ces pesticides figure l'hymexazole qui est la substance active d'un fongicide commercialisé en Algérie sous le nom de tachigazol. Il appartient à la famille chimique des Triazines. Malgré ces bénéfices importants dans de nombreux domaines, son utilisation croissante provoque des effets nocifs sur les systèmes biologiques (IPCS, 1990).

Les plantes médicinales et leurs extraits telles que les huiles essentielles sont largement utilisées pour les propriétés favorables de leur principes actifs qui ont un rôle thérapeutique comme agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobiens, et antioxydants qui défendent contre le stress oxydatif (Ouelbani et al., 2016). L'huile essentielle de l'écorce d'orange est reconnue pour avoir des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes avec plusieurs avantages potentiels pour la santé.

L'escargot *Helix aspersa* ou petit gris devient un important bio-indicateur, reflétant fidèlement la qualité de milieu dans lequel il vit. De plus, il a l'avantage d'être présent un peu partout, facile à identifier, à échantillonner et à élever.

L'objectif de la présente étude se focalise, dans un premier temps, sur l'estimation de l'intoxication par l'hymexazole chez *Helix aspersa* et dans un second temps sur l'évaluation d'un éventuel effet protecteur des huiles essentielles extraites à partir de l'écorce d'orange. Afin d'atteindre cet objectif, ce mémoire est divisé en deux parties :

- Une partie bibliographique dans laquelle seront rapportées certaines informations de base nécessaires pour la compréhension du travail expérimental.
- Une partie expérimentale expliquant le matériel utilisé et la méthodologie adoptée ainsi que la présentation des résultats et leur discussion.

Partie
Bibliographique



I. Généralités sur les pesticides

I.1. Définitions

Le terme pesticide dérive du « Pest », mots anglais désignant tout organisme vivant (virus, bactéries, champignons, herbes, vers, mollusques, insectes, rongeurs, mammifères, oiseaux) susceptible d'être nuisible à l'homme et/ou à son environnement (**Periquet, 1986**). Actuellement, le terme de « pesticide » désigne une appellation générique indiquant toutes les substances naturelles ou synthétiques utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables ou nuisibles pour l'agriculture, mais également pour d'autres applications (hygiène et santé publiques, soins vétérinaires, traitements de surfaces non-agricoles...) (**ACTA, 2005**). Sous le terme de pesticides, on distingue les deux types de produits (**Calvet et al., 2005**):

- ❖ **Produits phytopharmaceutiques** : pesticides à usages agricole et non agricole (parcs et jardins, entretien des abords d'axes de transport...) pour la protection des plantes ;
- ❖ **Produits biocides** : pesticides destinés à tous les usages non agricoles hormis ceux voués à la protection des végétaux (désinfectants, insecticides ménagers, traitement des charpentes, produits antisalissure...).

Les pesticides sont le plus souvent classés en fonction du ravageur visé : herbicides (contre les "mauvaises herbes"), insecticides (contre les insectes, leurs larves et leurs œufs), fongicides (contre les champignons), molluscicides (contre les limaces et escargots), rodenticides (contre les taupes et rongeurs), corvicides (contre les oiseaux ravageurs), nématicides (contre les vers), acaricides (contre les arachnides)...etc (**Fillatre, 2011**).

I.2. Devenir des pesticides dans l'environnement

Malgré un souci croissant de protection de l'environnement, lors de l'utilisation des produits pesticides, une certaine quantité de ces substances se retrouve dans l'environnement, principalement dans l'air par dérive sous forme de gouttelettes ou sur le sol (**Pimentel, 1995**). Ils peuvent alors être soumis à différents processus (**Figure 01**) :

- ❖ la photo-dégradation (**Marcheterre et al., 1988**);
- ❖ la dégradation par le phénomène d'hydrolyse aqueuse (**Wolfe et al., 1990**) ou de biodégradation grâce aux micro-organismes présents dans le sol (**Colin, 2000**);
- ❖ la rétention dans le sol jusqu'à la formation de résidus liés par adsorption (par exemple l'accumulation des fongicides à base de cuivre dans les sols);

- ❖ le transport vers d'autres compartiments environnementaux par des processus physicochimiques (volatilisation) ou via un vecteur, l'eau par lixiviation ou ruissellement ou les particules de sol (Van Der Werf, 1996).

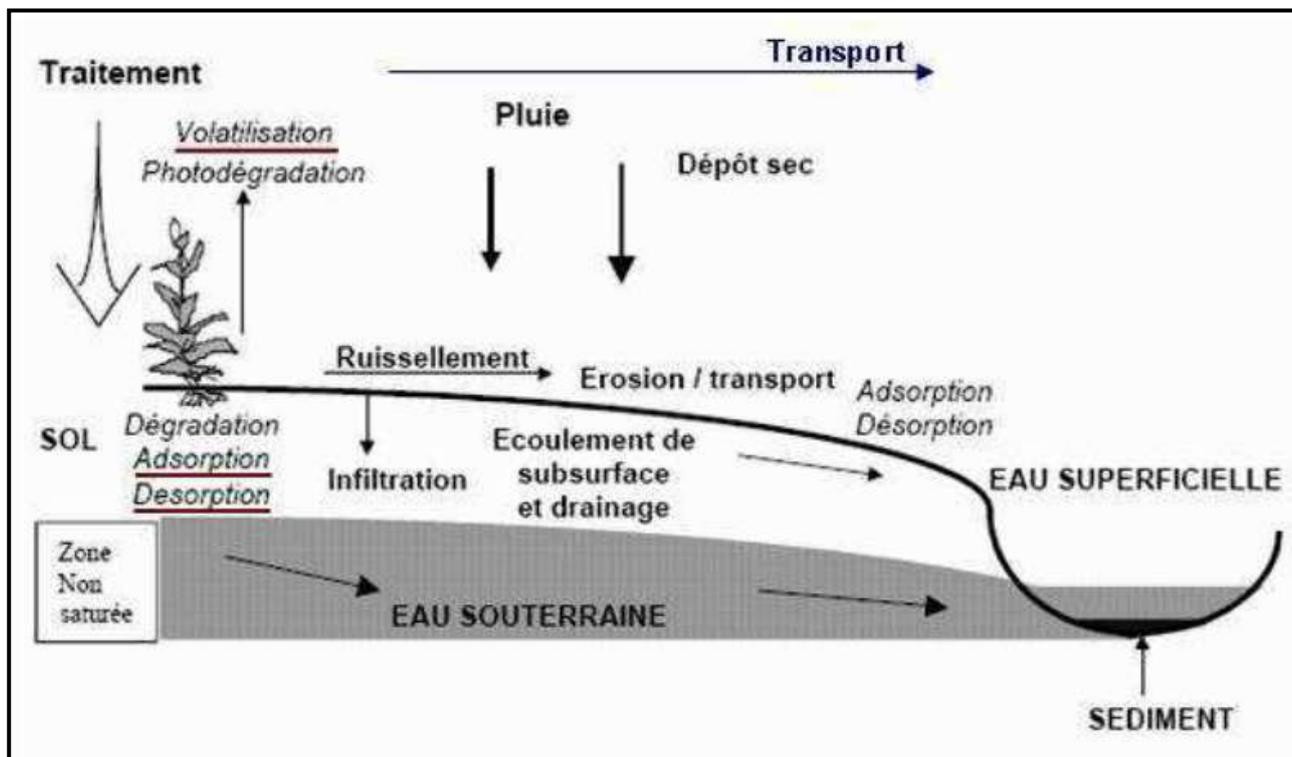


Figure 01: Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (INERIS, 2005).

I.3. Possibles modes d'expositions de l'homme aux pesticides

Les pesticides sont utilisés, non seulement dans l'agriculture, mais aussi par divers autres acteurs (industries, collectivités territoriales) ainsi qu'en usage domestique et vétérinaire. Des problèmes de résidus dans les légumes, les fruits...etc., sont aussi mis en évidence. L'exposition aux pesticides se caractérise donc par une multiplicité des voies d'exposition, ces substances pouvant pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation. La grande variété de produits rend difficile l'évaluation des expositions des populations, qu'il s'agisse de la population exposée professionnellement (agriculteurs ou manipulateurs), ou de la population générale. La **Figure 02** résume les possibles modes d'exposition de l'environnement et de l'homme aux pesticides (CEC, 2002).

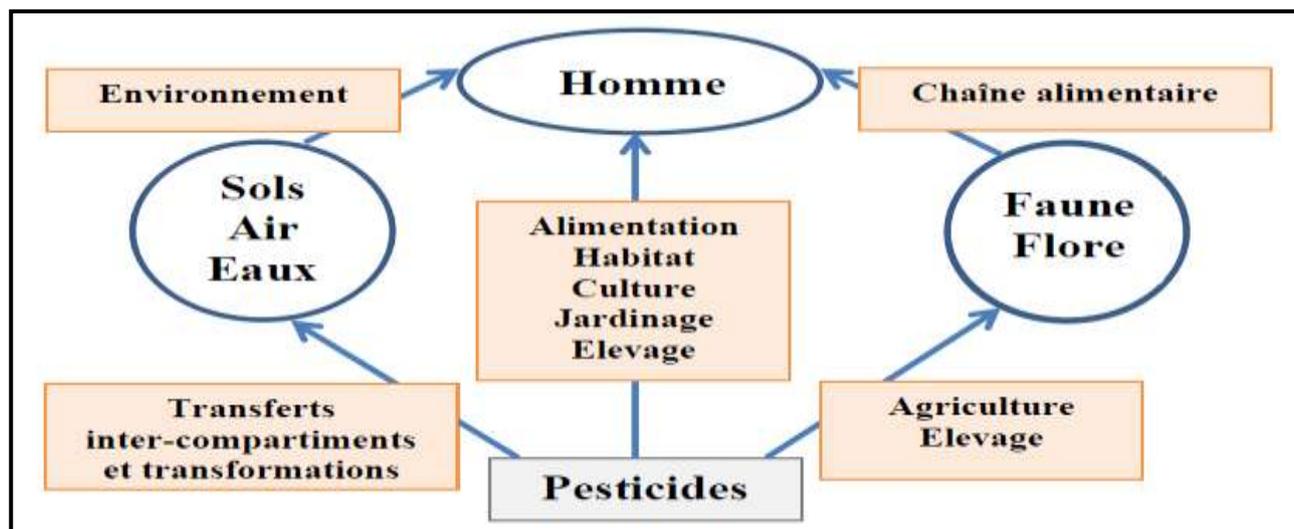


Figure 02 : Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (CEC, 2002).

I.4. Classification des pesticides

La classification des pesticides se repose sur la nature de l'espèce nuisible à combattre ex herbicide, insecticides, fongicides, nématocides, rodenticides...etc. On peut aussi admettre une classification selon la nature chimique, le mode d'action exercé, l'effet obtenu ou le moment et le lieu d'application. Les classes les plus communément rencontrées sont les herbicides, les fongicides et les insecticides. Elles ont une grande diversification chimique de produits organiques et inorganiques (Lederer, 1983).

I.4.1. Herbicides :

Les herbicides sont appelés parfois désherbants, notamment en horticulture. Ce sont des matières actives ou des produits formulés ayant la propriété de tuer les végétaux et permettent d'éliminer les mauvaises herbes adventices des cultures (Andersen et al., 2002)

I.4.2. Insecticides

C'est un grand groupe pesticide utilisé pour éliminer les insectes porteurs de maladies et lutter contre les parasites cultivées. Ce groupe comporte trois grandes familles auxquelles appartiennent les insecticides organiques de synthèse : les organochlorés, les organophosphorés, et les carbamates (Hodgeson et al., 2004)

I.4.3. Fongicides

Les fongicides sont une famille de produits phytopharmaceutiques ayant très fréquemment employés contre les maladies cryptogamiques, les fongicides assurent une excellente protection contre le développement des champignons parasites et permettent l'obtention de plantes saines

(CEC, 2003). Nous nous focalisons particulièrement sur l'exemple de l'hymexazole car il représente le sujet de cette étude.

I.4.3.1. Exemple de l'hymexazole

I.4.3.1.1. Définition

L'hymexazole est la substance active d'une fongicide systémique des semences provenant de Golden Union Agrochemical, commercialisé en Algérie sous le nom de Tachigazol. Il appartient à la famille chimique des Triazines, de formule chimique brute : $C_4H_5NO_2$, de formule développée 5-méthyl-3-(2H)-isoxazolone et dont la structure chimique est présentée dans la figure suivante (Figure 1) (Tahar et al., 2017)

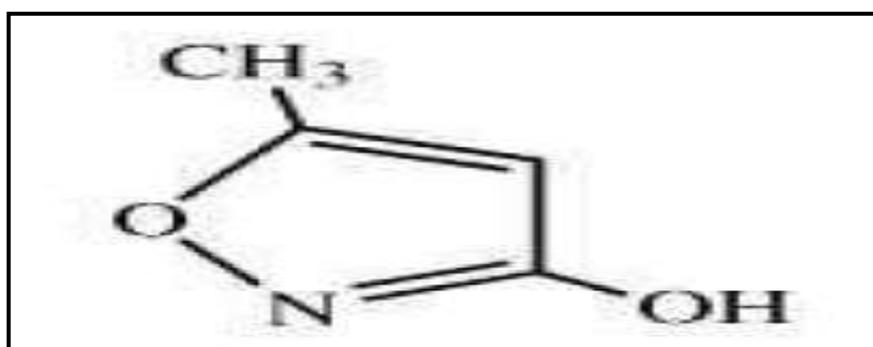


Figure 03 : Structure chimique de l'hymexazole (Tahar et al., 2017)

I.4.3.1. 2. Propriétés physicochimiques

Les principales caractéristiques physico-chimiques de la substance active sont présentées dans le **Tableau 01**.

Tableau 01 : Principales caractéristiques physico-chimiques de la substance active (EFSA, 2010)

Propriété	Caractéristique
Classification	Fongicide
Nom chimique	Le 3-hydroxy-5-méthylisoxazole; 5-méthylisoxazol-3-ol
Formule moléculaire	$C_4H_5NO_2$
Poids moléculaire	99,15
Forme	Cristaux
Couleur	Incolore
Odeur	légère odeur spéciale
Point de fusion	87
Masse volumique	0,551
Solubilité dans l'eau	58.2g / L (pH 3, 20)
Autre solubilité	Dans le méthanol 968, l'acétone 730, l'acétate d'éthyle 437, l'hexane 12.2, le toluène 176, dichlorométhane 602 (tous en mg / l, 20).
Valeur du Ph	6-9
Point d'éclair	non inflammable

I.4.3.1. 3. Utilisation de d'hymexazole

L'hymexazole es utilisé dans le contrôle des maladies transmises par le sol et causées par *Fusarium*, *Aphanomyces*, *Pythium* et *Corticium* etc., dans les cultures de riz, de betterave à sucre, de betterave fourragère, des légumes, des cucurbitacées, des plantes ornementales, des oeillets et des plants d'arbres forestiers. Appliqué en arrosage du sol, à 30-60 g / hl, soit par incorporation dans le sol, et également utilisé en tant que traitement des semences de betterave à sucre et la betterave fourragère, à 5-90 g / kg de semences. Il présente également une activité de stimulation de la croissance des plantes (Ypema, 2003).

I.4.3.1.4. Toxicocinétique de l'hymexazole

❖ Absorption

D'après une étude réalisée sur les rats mâles, l'hymexazole administré par voie orale unique était rapidement absorbé, de l'ordre de plus de 95% de la dose (Utip et al., 2013).

❖ Distribution

Chez le rat, l'hymexazole est largement distribué dans les différents tissus de l'organisme des quantités plus élevées ont été trouvées dans le foie et les reins et des quantités plus faibles dans le cerveau, les muscles et la graisse corporelle principalement dans les 12 heures suivant l'administration de l'hymexazole par voie orale (IPCS, 1990).

❖ Métabolisme

Le métabolisme de l'hymexazol, 3-hydroxy-5-méthylisoxazole, marqué avec le C¹⁴ en position 3 ont été examinés après une administration orale unique à des rats mâles. L'hymexazole était rapidement absorbé et distribué dans les tissus; des quantités plus élevées ont été trouvées dans le foie et les reins et des quantités plus faibles dans le cerveau, les muscles et la graisse corporelle. Pendant 96 heures, 97% de la radioactivité totale était excrétée dans l'urine et 0,89% dans les fèces, et 0,86% dans l'air expiré. Deux métabolites ont été détectés dans les urines. Leurs structures chimiques ont été déterminées, respectivement, en tant que 3- (beta-D-glucopyranuronosyloxy) -5-méthylisoxazole et 5-méthyl-3-isoxazolyl sulfate (Ando et al., 1974).

❖ Elimination

L'hymexazole est éliminée de façon sensiblement équivalente, par les urines et les fèces chez le rat l'élimination urinaire représente 97%, l'élimination fécale 0,89% et 0,86% dans l'air expiré. L'hymexazole peut être éliminée soit sous forme de 3-(beta-D-glucopyranuronosyloxy) -5-méthylisoxazole et 5-méthyl-3-isoxazolyl sulfate, soit sous forme inchangée (Decourtye, 2004).

I.4.3.1.5. Mécanisme d'action

Parmi les fongicides ayant une activité contre les champignons d'Oomycète (hors propamocarbe), l'hymexazol est unique car qu'il fournit une activité contre certains Aphanomyces. En outre, l'hymexazole est actif contre *Pythium*, *Fusarium*, et *Corticium*. Certaines espèces de *Phytophthora* sont inhibées par l'hymexazole. Il ne possède pas d'activité contre les oomycètes de la famille des péronosporacées. Des enquêtes sur son mode d'action ont été menées sur *Fusarium oxysporum* et *Pythium spp.* Sur *Fusarium*, il a été suggéré que l'hymexazol interfère avec les synthèses d'ARN et d'ADN (2). Sur *Pythium*, il a été suggéré que l'hymexazol interfère uniquement avec la synthèse de l'ARN. L'hymexazol affecte la croissance mycélienne et la sporulation de *Pythium* mais pas les zoospores et la germination. À l'entrée dans la cellule, l'hymexazole se transforme rapidement en glucosides. L'O-glucoside a une activité fongicide, alors que le N-glucoside n'est pas fongitoxique. Le N-glucoside a été associé à certains effets favorisant la croissance des plantes, tels que la stimulation du développement des poils radiculaires latéraux chez les plantules (Ypema, 2003).

I.4.3.1.6. Effets toxicologiques

❖ Toxicité aiguë

La DL₅₀ par voie orale est 1600 mg / kg de poids corporel chez le rat. La DL₅₀ chez les lapins par voie cutanée est supérieure à 2000 mg/kg. Il est considéré légèrement irritant pour les yeux et la peau chez les lapins, et provoque une sensibilité cutanée chez les cobayes. Concernant la toxicité par inhalation aiguë chez le rat, la CL₅₀ aéropartée de l'Hymexazole est supérieure à 0,65 mg/L. Ces valeurs représentent les concentrations auxquelles les symptômes d'empoisonnement aéropartés possibles sont maximaux (A.R.L.A.S.C., 2007).

❖ Toxicité chronique

Chez le rat, le rein et le foie sont particulièrement sensibles aux lésions dues à l'hymexazole. Ces lésions sont provoquées par des doses à partir de 63 mg/kg de poids corporel par jour chez les mâles après une exposition de 2 ans (Ando et al., 1974).

❖ Effets mutagéniques

L'Hymexazole est non mutagène. Les mutations géniques sur les cellules germinales et sur les cellules de mammifères (hamster chinois par 61,67 à 2 220 µg/ml) ont montré des effets négatifs (CEC, 2003).

❖ Effets sur la reproduction

Une étude sur la reproduction des rats, alimentés jusqu'à 61 mg/kg/j n'a entraîné à aucun effet néfaste attribuable au traitement sur les indices de reproduction (accouplement, gestation, fertilité, viabilité). Quant aux signes de sensibilité des petits, les effets sur les testicules n'ont été observés qu'après exposition in utero et post-natale (**Sánchez et Goka, 2006**).

I.4.3.1.7. Effets écotoxiques

Il existe peu de données d'écotoxicité sur d'autres organismes, tels que les oiseaux : la DL50 aiguë par voie orale pour la caille japonaise est 1085, pour le canard colverts elle dépasse 2000 mg/kg. Pour le poisson, la CL₅₀ après 96 h est de 460 pour la truite arc et de 165 mg/L pour la carpe (après 48 h). Les données concernant les doses toxiques pour certaines autres espèces sont comme suit : Daphnies CE50 (48 h) 28 mg/L, les algues NOEL 29 mg/L, les abeilles DL₅₀ (48 h, par voie orale et par contact) >/abeille. Les vers de terre (*Eisenia foetida*) CL₅₀ après 14 jours > 15,7 ppm (**Hill, 1989**).

Chapitre II

Stress oxydatif



II. Généralités sur le stress oxydant et les productions antioxydant

L'oxygène est un gaz indispensable à la vie mais il peut être toxique par lui-même et par la formation de radicaux libres qui ont de nombreux effets délétères. Les organismes vivant en aérobiose possèdent des systèmes de défense. Ainsi, à l'état physiologie, il existe un équilibre entre la production des radicaux libres et les systèmes antioxydants. Dans certaines conductions, il apparait un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des défenses antioxydantes. On parle alors de stress oxydant (Baudin, 2006).

II.1.Stress oxydatif

II.1.1.Définition

Le stress oxydant se définit comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue d'espèce ré d'ERO, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydant (Figure 04) (Defraigned et Pincemail, 2008).



Figure 04 : Schéma montrant le stress oxydant (Belaïch et Boujraf, 2016).

ERO : espèces réactives de l'oxygène ; ERN : espèces réactives de l'azote.

II.2. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante "libre" en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable. Il va donc se réduire en oxydant un autre composé, c'est le système redox (**Goudable et Favier, 1997**).

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés (**Evans et al., 2002 ; Chavane et Melinkeri, 2013**) :

- ❖ Addition d'un électron libre à un non radical : $NR + e^- \rightarrow R^\cdot$
- ❖ Perte d'un électron par un non radical : $NR - e^- \rightarrow R^\cdot$
- ❖ Scission homolytique d'une liaison covalente : $A-B \rightarrow A^\cdot + B^\cdot$

II.3. Type des radicaux libres

Il existe deux grandes familles d'espèces réactives (**Sies, 1991**) : les espèces réactives à l'oxygène (ERO) et les espèces réactives à l'azote (ERN).

II.3.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces Réactives Oxygénées (**ERO**) sont des molécules contenant de l'oxygène, mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule de dioxygène (**Morel et Barouki, 1999**). L'oxygène peut subir des étapes successives de réduction conduisant à la formation d'ERO (**Figure 05**). Les ERO sont produites au début de la réduction ou l'oxydation de l'oxygène singlet 1O_2 en anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Celle-ci va déclencher une cascade de réactions qui donnent naissance aux multiples dérivés de l'oxygène actif. Cette production des ERO se fait en présence de métaux, de molécules organiques ou d'enzymes (oxydases ou complexes de la chaîne respiratoire) (**Barouki, 2006**).

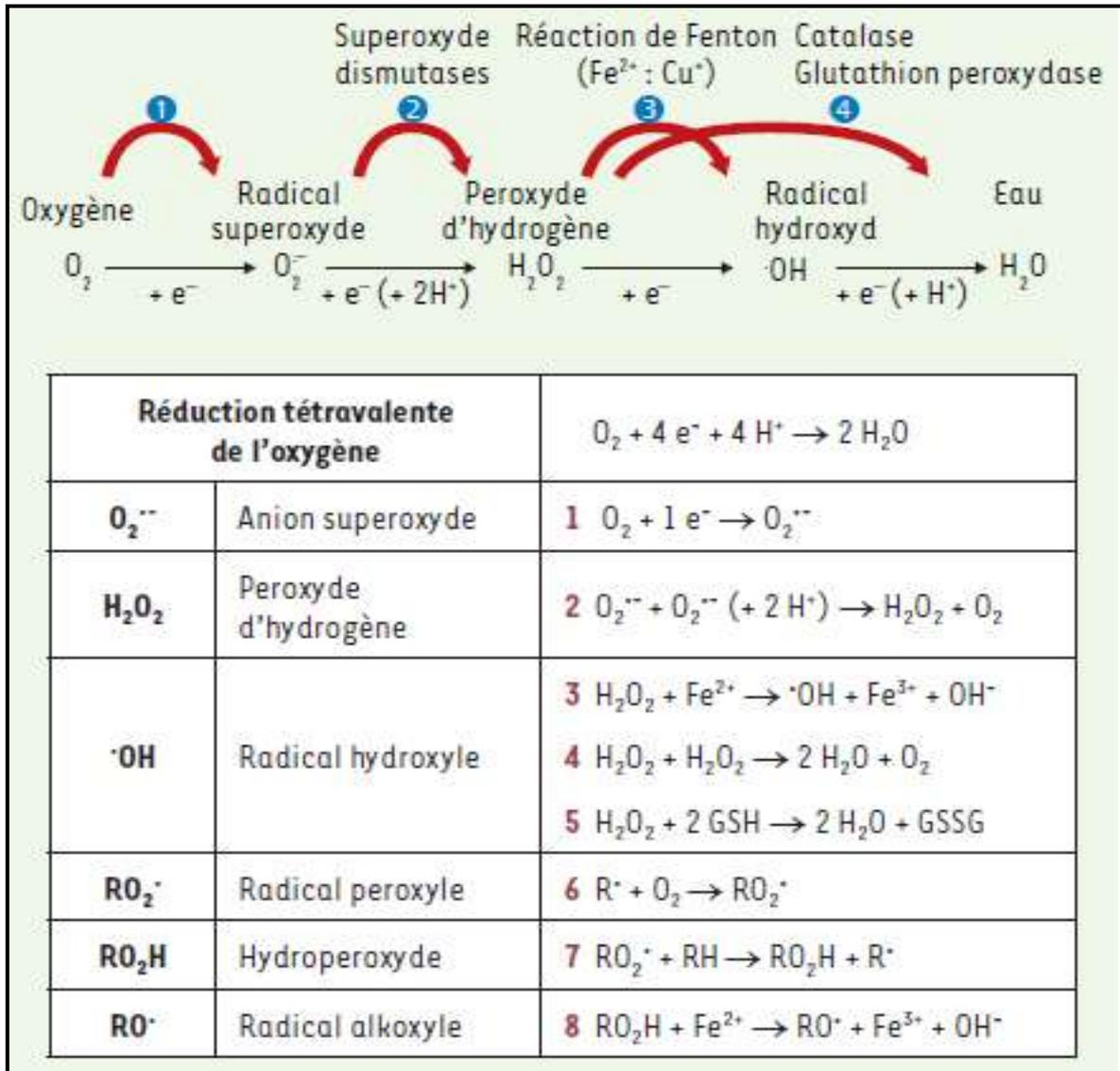


Figure 05 : Etapes de la réduction de l'oxygène et la formation des intermédiaires partiellement réduits sont détaillées (Migdal et Serres, 2011).

Les caractéristiques des espèces réactives de l'oxygène sont résumées dans le **Tableau 02**. Beaucoup d'ERO possèdent des électrons non appariés. Ceux-ci incluent des molécules telles que l'oxygène qui doit sa grande réactivité à sa structure particulière. Cette molécule est inévitablement à l'origine des espèces radicalaires simple, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) dérivé est peu réactif. Relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme. Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives telles que radical hydroxyl ($\cdot OH$) est très réactif peu diffusible. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ne possède pas d'une structure radicalaire car il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs stable et faiblement toxique, antiseptique, peut former HO. En effet l'Oxygène singulet (1O_2) représente la forme active très instable et extrêmement très réactif face à des molécules riches en électrons (Tessier et Marconnet, 1995).

Tableau 02. Caractéristiques des espèces réactives de l'oxygène (Tessier et Marconnet, 1995).

Noms	Symboles	Caractéristiques
Oxygène moléculaire	O ₂	Bi-radical, stable, faible pouvoir oxydant
Radical anion superoxide	O ₂ ^{•-}	Radical peu réactif, stable, non toxique, oxyde les catécholamines, peut former HO [•]
Oxygène singulet	¹ O ₂	Non radical, très réactif, très instable face à des molécules riches en électrons
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂	Non radical, stable, faiblement toxique, antiseptique, peut former HO [•]
Radical hydroxyle	HO [•]	Très réactif, peu diffusible, initiateur principal de la Lipoperoxydation altère protéines, ADN

II.3.1.1. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes

De façon physiologique, les ERO existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables. Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Et contribuent à la synthèse de l'ADN, des hormones stéroïdes, des acides biliaires, des acides gras insaturés, aux réactions dépendantes de la vitamine B12, à la biosynthèse des mitochondries, Ils sont les médiateurs de multiples fonctions de signalisation (signaux redox) et de transcription essentielles pour le fonctionnement normal et la survie des cellules, ainsi que de la programmation de leur élimination. Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire (Migdale et Serres, 2011).

II.3.2. Espèces réactives de l'azote (ERNs)

Les espèces réactives de l'azote (ERNs) sont des dérivés du métabolisme de l'oxygène qui interviennent également dans le phénomène du stress oxydant et complètent ainsi la famille des ERO. Les ERN sont issues de l'activité de l'enzyme NO-synthase qui libère le mono-oxyde d'azote (NO[•]). Ce dernier va donner plusieurs dérivés d'ERN. Il s'agit donc principalement du monoxyde d'azote est très diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques qui donne naissance au peroxynitrite (ONOO⁻) dérivé très toxique provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL non radicalaire est instable. En effet le dioxyde d'azote est un puissant déclencheur de la peroxydation lipidique par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés (Haleng *et al.*, 2007 ; Blandine, 2006 ; Halliwell et Gutteridge, 1997 ; Ghafourifar et Cadenas, 2005). Le Tableau 03 montre les différentes caractéristiques des espèces réactives de l'azote.

Tableau 03 : Caractéristiques des espèces réactives de l'azote (Tessier et Marconnet, 1995)

Noms	Symboles	Caractéristiques
Monoxyde d'azote	NO•	très diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques
Dioxyde d'azote	NO ₂	déclencheur de la peroxydation lipidique
Peroxyde nitrite	ONOO ⁻	très toxique, non radicalaire est instable, très graves en plus de l'oxydation des LDL

II.4. Modes d'action des ERO et des ERN

Dans l'organisme, il existe plusieurs types des radicaux libres dont les mécanismes d'action sont différents(Figure 06).

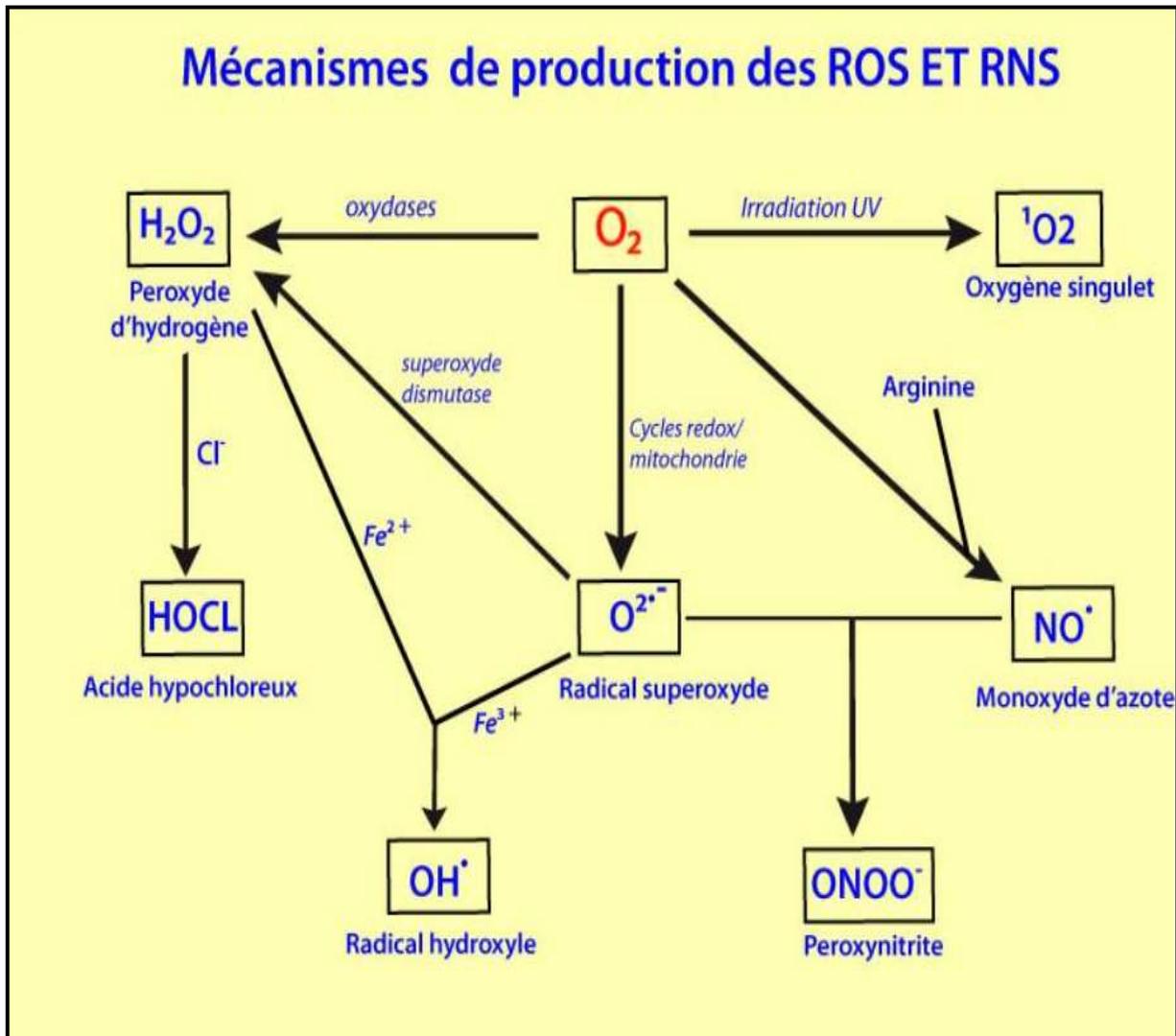


Figure 06 : Différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) et leurs mécanismes de productions (Boubali, 2017).

II.5. Sources de production de radicaux libres

La production de ces espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O₂ pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau, au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés (**Beaudeau et al., 2006**).

Les différentes sources de production de radicaux libres sont représentées dans le **Tableau 04**. Elles sont classées en deux catégories :

- **Sources endogènes** : les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme (**Belkheiri, 2010**).
- **Sources exogènes** : les êtres vivants sont exposés quotidiennement à des polluants (Fumée de cigarette, rayons ultraviolets, radiations...) susceptibles d'être à l'origine de la production de radicaux libres, une fois dans l'organisme (**Favier, 2003**).

Tableau 04 : Principales sources de production des radicaux libres (**Belkheiri, 2010 ; Favier, 2003**).

Sources endogènes	<ul style="list-style-type: none"> • Production de radicaux libres lors des respirations oxydatives (mitochondries) • Cellules phagocytaires • Métabolisme de l'acide arachidonique • Système xanthine/Xanthine oxydase
Sources exogènes	<ul style="list-style-type: none"> • Rayonnement électromagnétique • Métaux de transition • Pesticides -Médicaments...

Les sources endogènes et exogènes produisant les ERO sont nombreuses : chaîne respiratoire mitochondriale, cytochromes P-450, activité de la NADPH oxydase, myéloperoxydase, NO synthase, xanthine oxydase ainsi que les facteurs environnementaux (**Figure 07**).

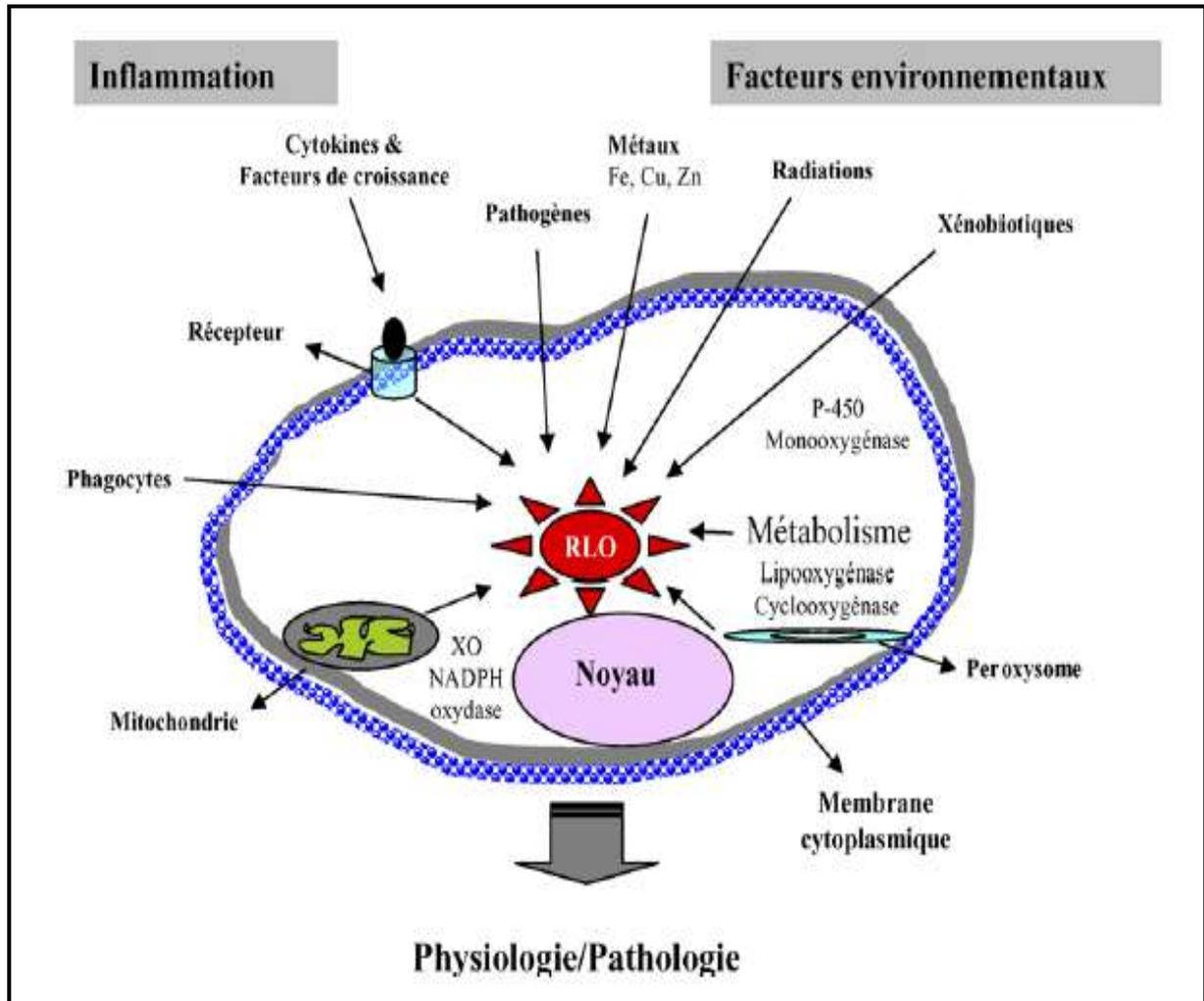


Figure 07 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso et al., 2007).

XO : xanthine oxydase ; P-450 : cytochrome P-450.

II.6. Principales cibles biologiques des ERO

Les radicaux libres sont instables et cherchent à s'apparier avec un électron d'une autre molécule. Ils sont à l'origine de réactions en chaîne qui conduisent à des destructions cellulaires. Leurs structures cibles essentielles sont l'ADN, les membranes cellulaires mais aussi toutes les molécules pouvant être déstabilisées.

II.6.1. Effets des ERO sur les macromolécules biologiques

Dans le cas où les systèmes de défense ont été dépassés, les radicaux s'attaquent aux macromolécules biologiques dans l'environnement direct de leur lieu de production. Les radicaux étant très réactifs et ayant donc une durée de vie courte, toutes les molécules biologiques possédant des doubles liaisons sont susceptibles d'être touchées et des produits de dégradation sont engendrés (bases oxydées et coupures de l'ADN nucléaire et mitochondrial, produits de peroxydations lipidiques, protéines oxydées, cholestérol oxydé...etc.) (Laurent, 2005).

II.6.2. Conséquences du stress oxydant

II.6.2.1. Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ERO sont les lipides, spécialement ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires et notamment les acides gras mono- et polyinsaturés des phospholipides membranaires. Ils sont à l'origine de réaction de peroxydation (**Figure 08**). Il s'agit d'une succession de réactions radicalaires à l'origine de la libération de molécules réactives. En l'absence d'antioxydants, la réaction s'auto-entretient car les espèces produites peuvent à nouveau réagir entre elles (**Chaudhary et al., 1996**).

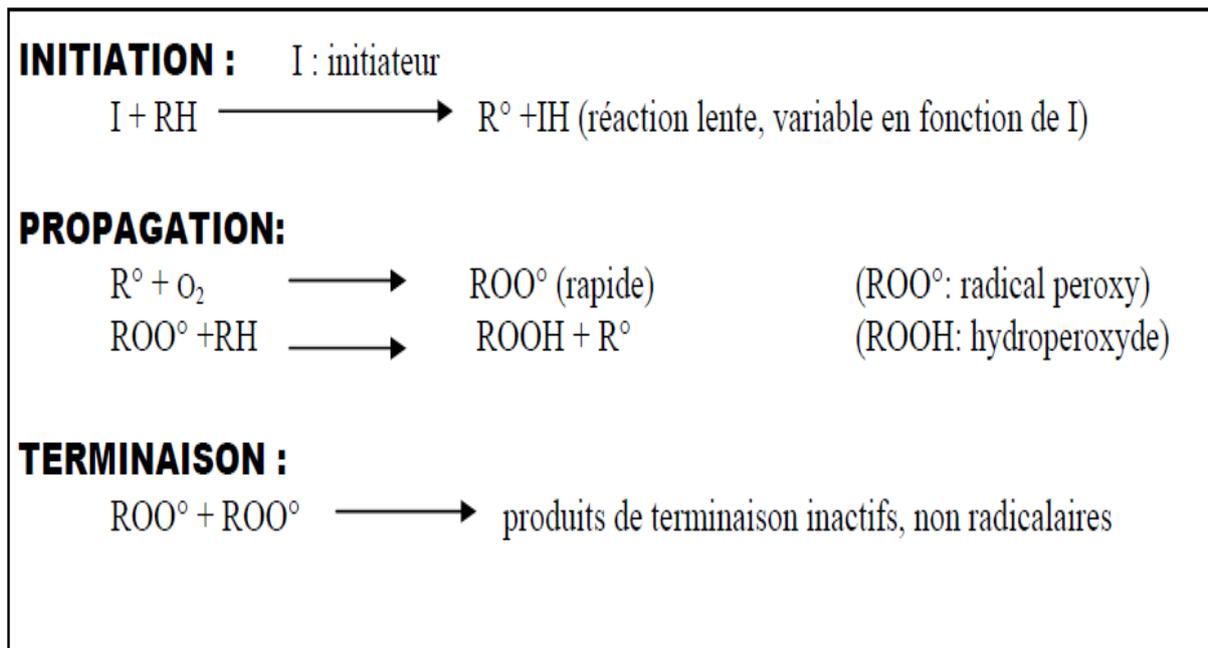


Figure 08 : Mécanismes de la peroxydation lipidique (**Pastre, 2005**).

Ce phénomène de peroxydation lipidique peut se produire dans des conditions physiologiques et il se trouve exacerbé dans des conditions pathologiques. La peroxydation lipidique, se déroule en trois phases (**Figure 09**):

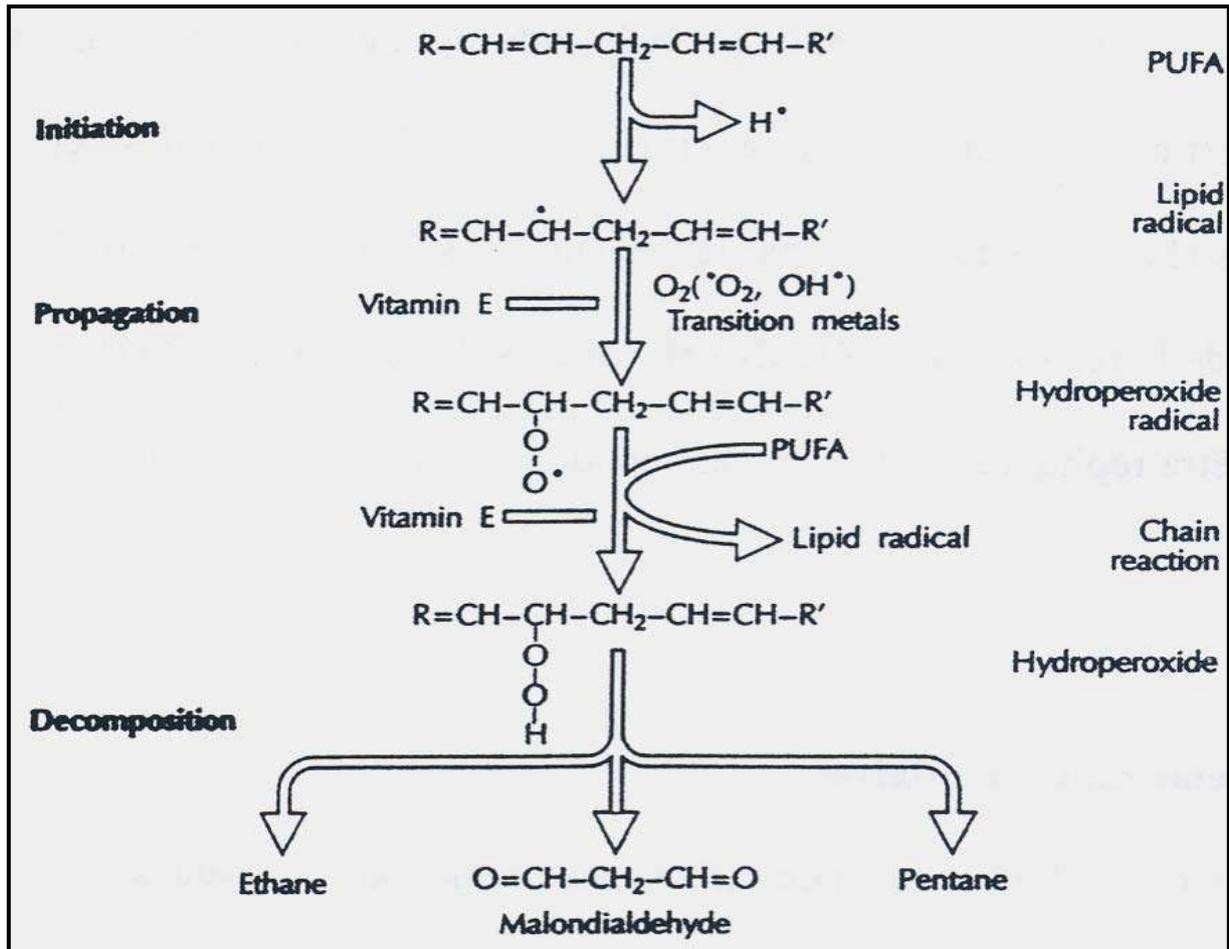


Figure 09 : Peroxydation des acides gras polyinsaturés (Laurent, 2005).

II.6.2.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont une cible importante des ERO. Les radicaux libres peuvent réagir avec les différents acides aminés et donc altérer la structure des protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées. C'est donc toute la machinerie cellulaire qui peut être affectée (Favier, 2011).

II.6.2.3. Atteintes de l'ADN

Les ADN nucléaires et mitochondriaux constituent une cible cellulaire importante. Le spectre des lésions de l'ADN est large (Figure 10): modifications des bases uriques et pyrimidiques, perte de bases (sites abasiques) cassures simple- ou double-brins, altérations des sucres (2-désoxyriboses) et aussi pontages ADN-protéines (Cadet et al., 2003).

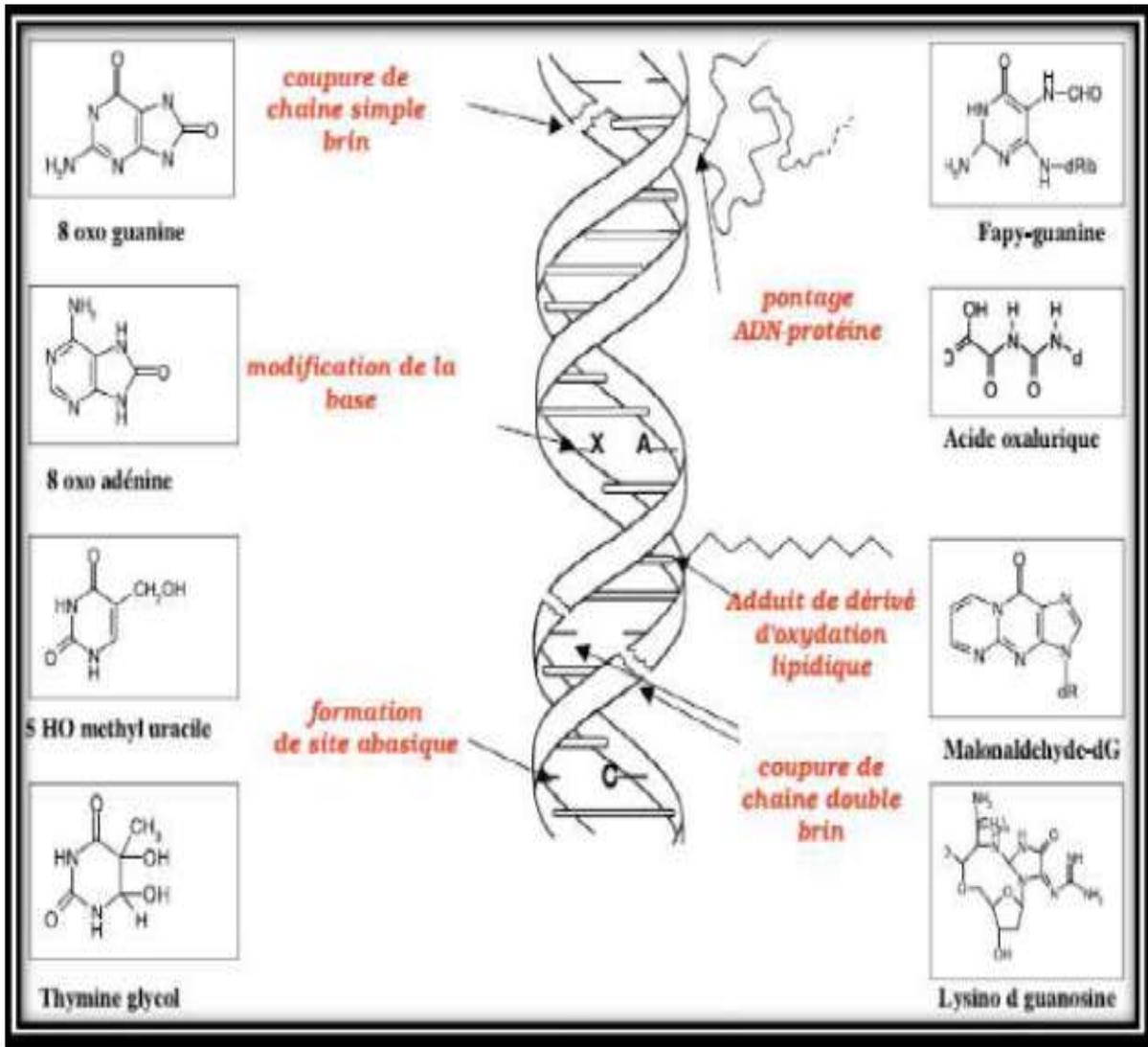


Figure 10 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (Wallace *et al.*, 2008).

II.7. Systèmes de défenses antioxydant

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Les antioxydants s'utilisent pour réduire l'oxydation du produit auquel ils sont mélangés. L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes. Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers. Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres (Ribeiro *et al.*, 2001). Les systèmes de défenses antioxydantes agissent à différents niveaux de la cascade d'activation de l'oxygène (Figure 11) et sont de plusieurs natures. Les cellules contiennent un spectre d'antioxydants chimiques et enzymatiques qui travaillent de concert pour minimiser les réactions oxydatives dans la cellule (Kehrer, 1993).

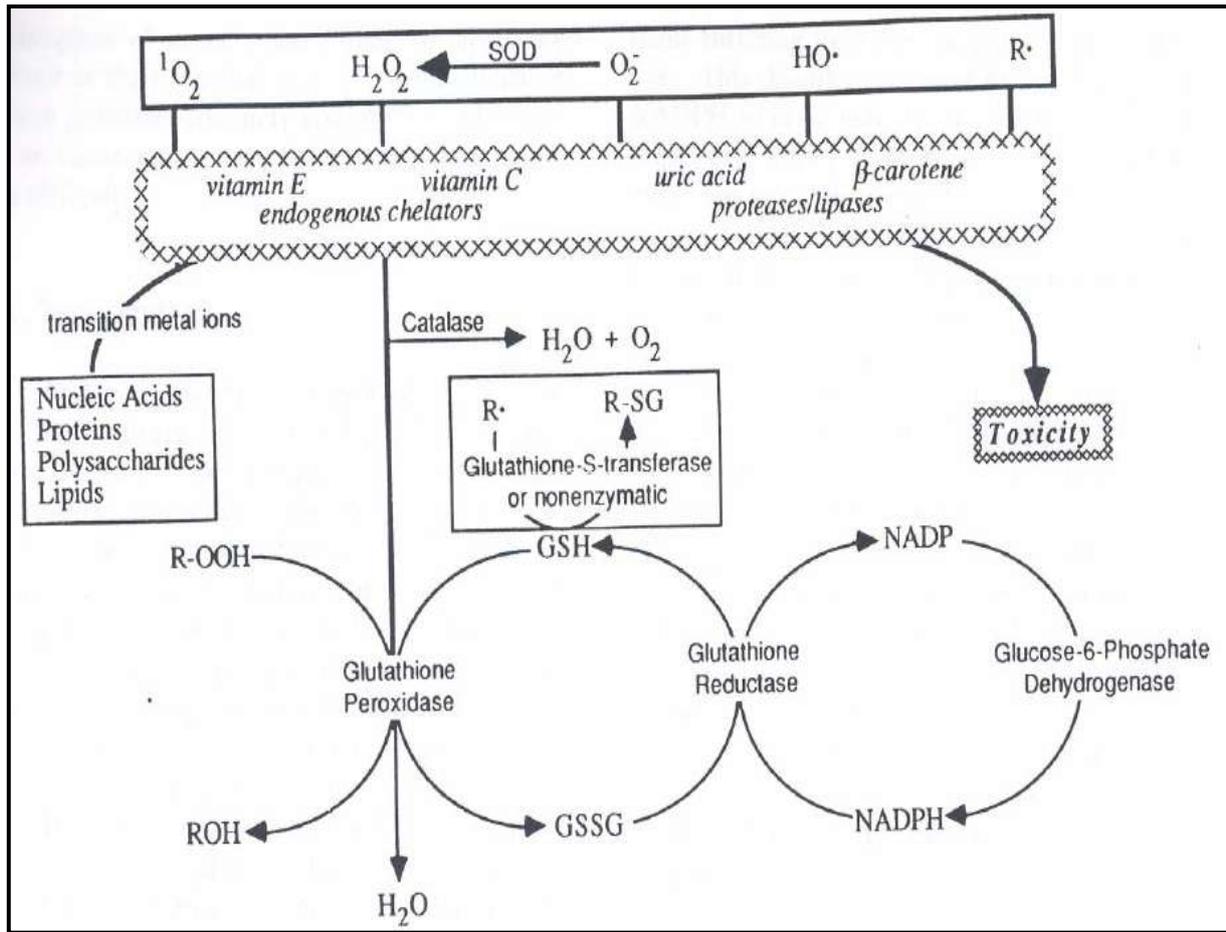


Figure 11 : Systèmes biologiques de défenses antioxydant d'après (Kehrer, 1993).

II.8. Modes d'action des antioxydants

Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydant dont les mécanismes d'action sont différents (Haleng et al., 2007). Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories (Tableau 05)

- **Système de défense primaire** : ex : la catalase (CAT), le glutathion (GSH). Ces Antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- **Système de défense secondaire** : ex : les tocophérols. Ces molécules sont dites «chainbreaking». Elles réagissent avec les ROO· et/ou les R·, bloquant ainsi les réactions de propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter le passage de formes peu réactives (O_2^-) à très réactives (OH^\cdot) (Pastre, 2005).

Tableau 05 : Principaux modes d'action de quelques antioxydants (Haleng et al., 2007).

Système de défense antioxydants	Nature	Mode d'action
Défenses non enzymatiques	Vitamine E	Fixation des métaux de transition
	Vitamine C	
	Bêta carotène	
	Ubiquinone, acide urique...	
Défenses enzymatiques	Superoxydedismutase	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde
	Catalase	Métabolise H ₂ O ₂
	Glutathion peroxydase	Action réductrice sur H ₂ O ₂ et les hydroperoxydes

II.9. Différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle : les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles. Ils seront particulièrement efficaces sur les radicaux libres présents dans chaque type de milieu, respectivement (Figure 12) (Pastre, 2005).

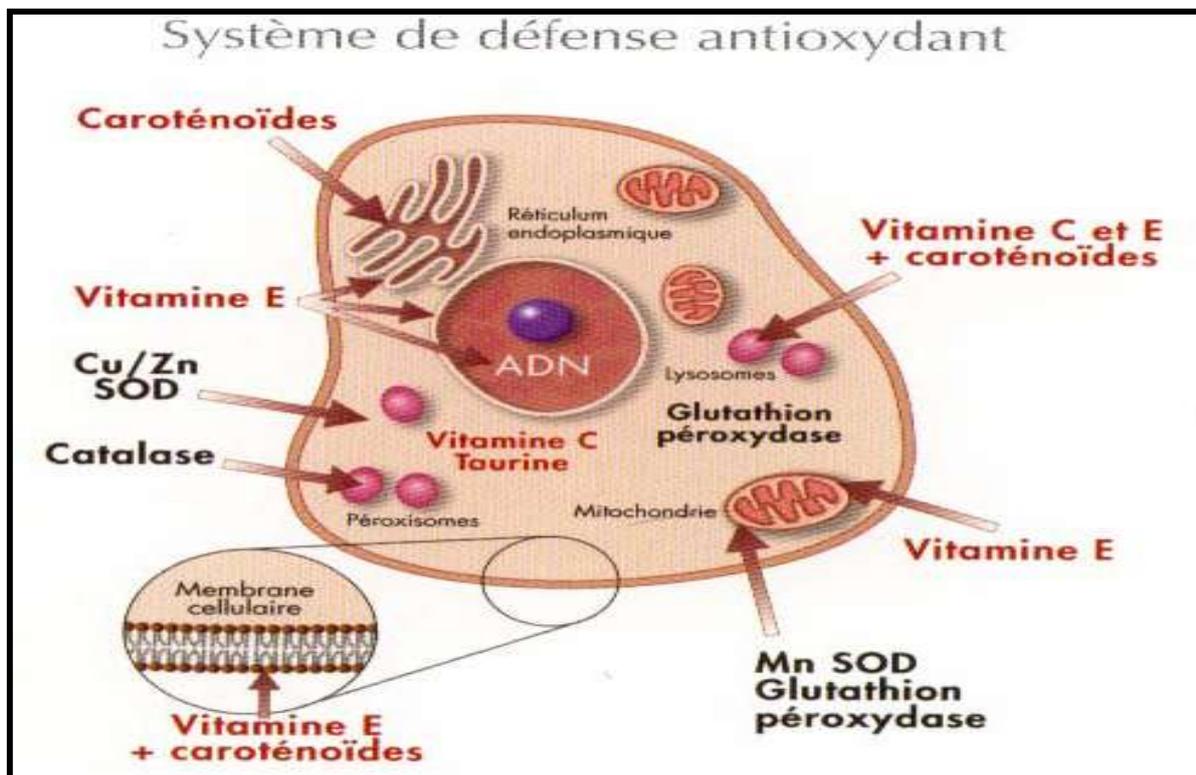


Figure 12 : Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydantes (en noir) (OPARA, 2002).

II.10. Origines des antioxydantes

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories (**Tableau 06**) avec :

A-Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes c'est à dire les enzymes antioxydants directement synthétisées par l'organisme.

B-Systèmes antioxydants non enzymatiques d'origine alimentaire c'est-à-dire les nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation. Cette dernière classe d'antioxydants nous intéresse particulièrement puisque nous verrons s'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules. (**Pastre, 2005**).

Tableau 06 : Les deux types de protection antioxydantes de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants (**Pastre, 2005**).

Systèmes antioxydants enzymatiques Endogènes	Systèmes antioxydants non enzymatiques d'origine alimentaire
<ul style="list-style-type: none"> • Superoxydedismutase • Glutathion peroxydase • Catalase • Lipases, protéases, endonucléases (éliminent les molécules oxydées) • Albumine, ferritine (complexent les ions divalents) 	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamine E • Vitamine C • Taurine • Caroténoïdes (lycopène, lutéine...) • Polyphénols • Minéraux et oligo-éléments • Les huiles essentielles

Chapitre III

Les huiles essentielles de l'écorce d'orange



III.1. Introduction

Les agrumes est l'une des récoltes de fruits les plus importantes dans le monde. Leur production mondiale est estimée à plus de 115 millions de tonnes par an dont 517 milles tonnes sont produites en Algérie (CADILLAT ,1969). Cette dernière occupe la 19^{ème} place mondiale et la 2^{ème} dans l'Union Maghrébin Arabe. Les agrumes incluent les citrons, les mandarines, les pomelos, les cédrats, les oranges, les pamplemousses et les limes ...etc. Les oranges sont les plus consommées en raison de leur bonne saveur, leur valeur nutritive élevée et leur composition riche en molécules bioactives (plus de 170 composés photochimiques sont décrits). Les sous-produits d'orange tels que les écorces présentent une source de composés biologiquement actifs elles sont riches en vitamine C et en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques en particuliers les flavonoïdes et les huiles essentielles. Ces dernières sont les composés les plus importants grâce à leurs diverses activités biologiques tels que les activités antimicrobiennes, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant.

III.2. Généralités sur l'orange

III.2.1. Description de l'arbre

L'oranger est un arbre, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant et légèrement ailé. La floraison blanche très parfumée, les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir, de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange. Il existe plusieurs variétés les plus connues la Sanguine, Thomson navel, valencia latté, Washington navel Powell, Florida pineapple, orange portugaise etc.... (LOUSSERT, 1989).

Les caractéristiques générales de l'espèce *Citrus sinensis* ont récapitulées dans le **Tableau 07**.

Tableau 07: Caractéristiques générales de *Citrus sinensis* (Bénédicte et Michel, 2011).

Espèce	Caractéristiques générales
<i>Citrus sinensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aspect général : arbre au port harmonieux et croissance rapide, il peut atteindre de grande taille en pleine terre (7 à 8m) • Fleurs : blanches et immaculées, très parfumées. • Feuilles : vert profond, légèrement ailées. • Fruits : de forme et de coloration variable en fonction des différents groupes auxquelles ils appartiennent. La pulpe juteuse diffère en couleur et en acidité selon les variétés.

III.2.2. Classification botanique de *Citrus sinensis*

Selon **Padrini et Lucheroni (1996)**, la classification de *Citrus sinensis* est la suivante

- **Ordre** : Sapindales
- **Sous-ordre** : des géranieae
- **Classe** : des dicotyledoneae
- **Famille** : Rutaceae
- **Genre** : *Citrus*
- **Espèce** : *Citrus sinensis*

III.2.3. Composition chimique et valeur nutritive d'orange

L'orange contient de glucides (40% de saccharose), de la vitamine C, vitamines P, B 1, B9, E, provitamine A. Riche en calcium, riche en pectines, elle a un rôle de régulateur du transit intestinal. Elle contient une flore mésophile (levures et lactobacilles) indispensable pour une bonne digestion (**Bousbia, 2011**). Les principaux composés de l'orange sont résumés dans le Tableau 08.

Tableau 08 : Principaux composés de l'orange (**Bousbia, 2011**)

Constituants	Teneurs
Glucides	8.5 à 12 % dans le fruit à maturité, représenté par le saccharose (40 %). Fructose et glucose
Acides organiques	1.2 %, surtout de l'acide citrique et de l'acide malique
Autres composés Energétiques	Lipides concentrés dans les pépins peu de protéines
Vitamines	Teneur élevée en vitamine C (40 à 80 mg pour 100g). Vitamines hydrosolubles qui sont toutes des vitamines du groupe B (B1 et B9, en particulier), vitamine A (0.05 à 0.2 mg pour 100g), vitamine E (0.24mg pour 100g).
Minéraux	Calcium, Magnésium, Potassium et Phosphore
Oligo-éléments	Fer, Cuivre, Zinc, Manganèse, Nickel, Iode, trace de Bore et de Sélénium
Fibres	Une teneur de 2.4 % en moyenne, elles ont l'originalité d'être riches en pectine (environ 50 %)
Flore mésophile	Levures et lactobacilles indispensables à sa bonne digestion
Substances aromatiques	Ce sont des composés complexes caractéristiques de ce fruit (aldéhydes, esters... etc.), des essences odorantes
Pigments	Donnent à la pulpe sa couleur plus ou moins marquée jaune orangé pour les flavonoïdes et les caroténoïdes, jaune pour les xanthophylles, rouge ou rouge violacé pour les anthocyanes

III.2.4. Structure d'orange

Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur époque de maturité. Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique (**kimball, 1999; Polese, 2008; Bachès et Bachès, 2011 ; Haineault, 2011**). D'un point de vue botanique, les agrumes sont des fruits charnus de type baie avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées : l'épicarpe appelé flavédo, le mésocarpe appelé albédo et l'endocarpe (pulpe) présentée dans la (**Figure 13**).

- **L'épiderme** : composé de cires épicuticulaires en forme de plaques. La quantité de cires dépend de la variété, des conditions climatiques et de la croissance.
- **Le Flavédo** : caractérisé par sa couleur jaune, verte ou orange. Il abrite les vésicules oléifères qui sont caractérisées par des parois très fines et fragiles qui renferment l'huile essentielle.
- **L'Albédo** : fait de cellules à structures tubulaires qui forment une véritable toile avec la plupart du volume tissulaire comprimé dans l'espace intercellulaire. L'épaisseur de l'albédo varie selon le type d'agrumes et le type de cultures. Il est très riche en flavonoïdes, responsable de l'amertume du jus.

La pulpe est formée de :

- **L'endocarpe** : des fruits avec les carpelles dans lesquelles se trouvent les vésicules contenant le jus, qui d'un point de vue biosynthétique devrait être considéré comme le liquide relâché par le cytoplasme et par les vacuoles des cellules internes des vésicules (10 à 14 sections).
- **La Moelle** : la partie la plus interne du fruit est formée par un tissu spongieux similaire à celui de l'albedo.
- **La Navalisation**: correspond à la formation d'un autre petit fruit plus ou moins avorté, soit à l'intérieur soit repoussé l'extérieur, formant une protubérance comme on le rencontre chez l'orange navel.

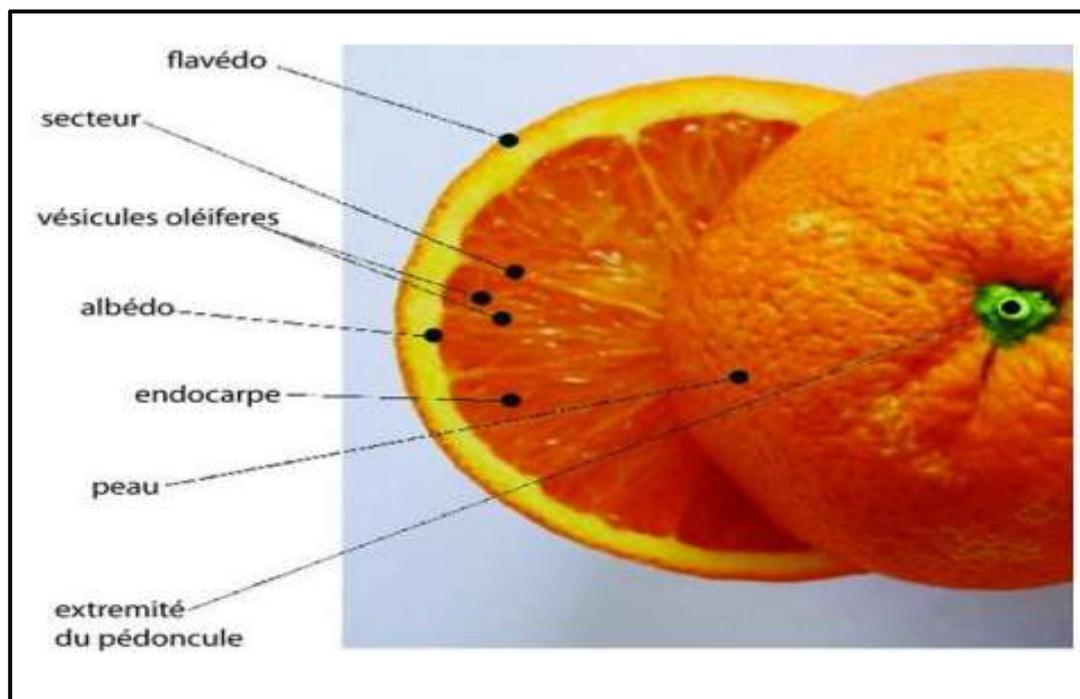


Figure 13 : Coupe transversale de fruit de *Citrus sinensis* (Polese, 2008).

III.3. Huile essentielle de *Citrus sinensis*

III.3.1. Définition

L'office fédéral de la santé publique (OFSP, 2009) a défini l'huile essentielle comme l'extrait naturel de plantes ou d'arbres aromatiques. Les substances aromatiques naturelles, appelées essences, sont produites dans des glandes spécialisées de différentes parties des plantes (fleur, feuille, tige, écorce, racine, fruit, graine). L'huile essentielle ne se compose que de substances aromatiques volatiles, elle est soluble dans l'huile et dans l'alcool mais pas dans l'eau. Il existe plusieurs techniques pour obtenir des huiles essentielles dont la principale et la plus ancienne est la distillation à la vapeur d'eau.

III.3.2. Localisation et lieu de biosynthèse

Les plantes du genre *Citrus* font partie de la famille des *Rutaceae* qui sont caractérisées par la présence, dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpes des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique. Ce sont des poches dont la formation initiale est identique à celle des poches schizogènes, mais en plus des cloisonnements radicaux, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisonnements tangentiels, ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices (Goris, 1967).

III.3.3. Composition chimique

Bien qu'une huile essentielle puisse contenir un grand nombre d'éléments biochimiques, les molécules les plus fréquemment rencontrées sont : les terpènes, les alcools, les cétones, les aldéhydes, les esters et les éthers. Ces molécules peuvent agir en synergie, ce explique à la fois leur efficacité, mais aussi la polyvalence, dans la mesure où elles y sont le plus souvent, certes à des concentrations différentes, toutes présentes dans les huiles essentielles. L'ensemble de leurs constituants se caractérise par un faible poids moléculaire (**Girard, 2010**). Les principales compositions chimiques sont les Monoterpènes (notamment le limonène), les alcools mono-terpéniques (notamment linalol, alpha-terpinéol, géraniol), les cétones les coumarines et les aldéhydes (**Lola et al, 2002**).

III.3.4. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par des facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée (**Besombas, 2008**). Les conditions externes soit géographiques (latitude, altitude), édaphiques (nature du sol) ou climatiques (ensoleillement ou photopériodisme, température, pluviométrie) ont un effet sur la composition des essences (**Olle et Bender, 2010**). Les conditions culturelles telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (**Aprotosoiaie et al., 2010**).

III.4. Extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles, etc.), de la nature des composés (les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins, etc.), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (**Hellal, 2011**).

III.4.1. Pression à froid

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé de pression à froid (**Lesley, 1996 ; Roux, 2008 ; Ferhat et al., 2010 ; Fillatre, 2011**). Ce

procédé est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères. L'essence obtenue est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme, l'essence est alors isolée par décantation (**Roux, 2008 ; Ferhat et al., 2010**). Diverses techniques manuelle ou mécanique, traitant le fruit entier ou seulement les écorces sont utilisées (**Ferhat et al., 2010**). Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux, 2008**). Cependant l'utilisation de grande quantité d'eau dans ce procédé peut altérer la qualité des huiles essentielles par dissolution des composés oxygénés, par hydrolyse et par transport de microorganismes (**Lucchesi, 2005 ; Ferhat et al., 2010**).

III.4.2. Hydrodistillation

L'hydro distillation demeure la technique la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements (**Bruneton, 1993 ; Ferhat et al., 2010**). Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (**Bruneton, 1993 ; Lucchesi, 2005 ; Baser et Buchbauer, 2010 ; Ferhat et al., 2010**). Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (**Lucchesi, 2005 ; Ferhat et al., 2010**).

III.4.3. Entraînement à la vapeur d'eau

Les parties de plantes utilisées sont déposées sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic, sans que le matériel végétal ne soit pas en contact avec l'eau (**Belaiche, 1979 ; Lucchesi, 2005 ; Ferhat et al., 2010**). Les particules de vapeur d'eau, se dirigeant vers le haut, font éclater les cellules contenant l'essence et entraînent avec elles les molécules odorantes. La vapeur passe ensuite à travers un récipient réfrigérant où la température diminue, provoquant le déclenchement des molécules huileuses des particules de vapeur, qui se condense en eau. L'huile et l'eau se séparent du fait de leurs poids spécifiques différents (**Padrini et Lucheroni, 1996**). Pendant l'entraînement à la vapeur d'eau, la matière végétale est exposée à une température élevée et à l'action chimique de l'eau, et dans ces conditions, la fragilité thermique des constituants de l'huile ou l'hydrolyse de certains d'entre eux conduisent à la formation d'artéfacts (**Lucchesi, 2005; Ferhat et al., 2010**).

III.5. Activités biologiques des huiles essentielles

III.5.1. Activité antioxydante

Les poly phénols jouent un rôle important comme système de défense contre les RL, leurs activité antioxydant se produit par plusieurs mécanismes: Absorption des rayons UV: la naringenine et la rutine ont un effet protecteur contre les UV, en empêchant ainsi la surproduction des RL (**Tripoli et al., 2007**). Renforcement de l'activité des enzymes antioxydants : les citroflavonoïdes jouent un rôle important dans l'augmentation de l'activité antioxydant du superoxyde-dismutase et de la catalase et par la modulation de l'expression de gène de su-peroxyde dismutase, catalase et de glutathion peroxydase (**Tripoli et al., 2007**). Neutralisation des RL et chélation des métaux :des études réalisées in vitro et in vivo ont montré la capacité des poly phénols d'agrumes à neutraliser les RL et a chélater les métaux principalement le fer (**Del-Rio et al.2004**) Inhibition de la lipoperoxydation : diverses études expérimentales ont montré l'existence d'une relation importante entre les flavonoïdes de citrus limon et la diminution de l'oxydation de taux des lipoprotéines de faible densité LDL dans le sang (**Gonzalez-Molina et al. 2010**)

III.5.2. Activité anti-inflammatoire

Ils sont capables d'inhiber les kinases et phosphodiesterases essentiels pour l'activation et la transduction du signal cellulaire. Ils ont également une incidence sur l'activation de certains nombre de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, y compris les lymphocytes T et B (**Manthey et al., 2001**).

III.5.3. Activité antiallergique

Les citrus sont également des propriétés antiallergiques qui sont dues à sa richesse en quercetine, hespéridine et diosmine, étant des inhibiteurs de l'histamine, un neurotransmetteur implique dans les réactions allergiques et l'inflammation (**Gonzalez-Molina et al.2010**)

III.5.4. Activité antimicrobienne et antivirale

Plusieurs études expérimentales ont montré que les flavonoïdes des agrumes ont une activité antimicrobienne très importante :

- La quercetine et l'hespéridine inhibent l'infectiosite et la réplication de l'herpès simplex, le poliovirus, le virus parainfluenza et le virus syncytial (**Tripoli et al., 2007**).

- Hesperetine, l'aglycone d'héspéridine, possède une activité antimicrobienne modérée contre *salmonella typhi* et *salmonella typhimurium*.

III.5.5. Activité anti-cancer

La richesse de certaines plantes en métabolites secondaires comme les flavonoïdes est à l'origine de leur efficacité dans la prévention et le traitement des cancers. Les flavonoïdes sont considérés comme des agents antiprolifératifs et cytotoxiques vis-à-vis plusieurs lignées de cellules cancéreuses.

III.6. Toxicité des huiles essentielles

En dépit de leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être non-toxiques. La majorité des huiles essentielles, à de très fortes doses, causent des effets toxiques (**Hammer et Carson, 2011**). Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe (**Bernadet, 1983**).

Les huiles essentielles de *Citrus* sont photo-toxiques à cause des furocoumarines qui sont photo sensibilisantes. Ils provoquent une décoloration de la peau en un rouge lors d'une application externe avec une exposition au soleil sous l'action des rayons ultraviolets. Cependant, l'ingestion des huiles essentielles du *Citrus sinensis* extraites soit par hydro distillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (**Robert et Lobstein, 2005**)

Chapitre IV:
Helixaspera



IV.1. Introduction

Helix aspersa est une espèce bien connue des escargots. Il s'agit d'un escargot très répandu sur la façade méditerranéenne algérienne. Son aire de répartition éco-biogéographique s'étend à toute l'Afrique du nord et à l'Europe. L'espèce a été décrite par le zoologue Danois Otto Friedrich Müller en 1774 (Quibik, 2007). Il devient un bio-indicateur, reflétant la qualité du milieu dans lequel il vit car il est présent un peu partout et il est facile à identifier, à échantillonner et à élever.

En raison de sa capacité à stocker les informations dans ses tissus, l'escargot est idéalement situé à l'interface entre le sol, les plantes et l'air. Il mange le sol et la végétation, et il possède un poumon dans lequel on peut retrouver des particules. Les scientifiques peuvent alors, lors des analyses, trouver différentes sources de contamination. *Helix aspersa* est capable de concentrer les substances dans son corps, en particulier dans sa glande digestive. Plus on laisse l'animal longtemps sur place, plus il va accumuler les substances et va les concentrer dans ses tissus. Des choses qu'on ne peut pas détecter dans les sols parce qu'elles sont présentes à trop petites doses.



Figure14: Escargot *Helix aspersa* (Quibik, 2007).

IV.2. Présentation et classification de l'espèce *Helix aspersa*

Helix aspersa ou petit gris existe en Algérie en très grand nombre dont la taille varie de quelques millimètres à quelques centimètres. Il appartient à l'embranchement des mollusques, la classe des gastéropodes et la famille des Hélicidés (Bonnet et al., 1990). Selon Bonnet et al. (1990) l'escargot *Helix aspersa* est classé comme suit :

- **Règne** : Anima
- **Embranchement** : Mollusques
- **Classe** : Gastropodes
- **Sous-classe** : Euthyneurs
- **Super-ordre** : pulmonés
- **Ordre** : Stylommatophores
- **Famille** : Helicidae
- **Genre** : Hélix
- **Espèce** : *Hélix aspersa*

IV.3. Anatomie générale d'*Hélix aspersa*

Hélix aspersa est un mollusque gastéropode pulmoné stylomatophore appartenant à la famille des helicidae, c'est une espèce indigène aux rivages de la méditerranée et peut vivre de 2 jusqu'à 5 ans. 99% de l'activité de l'escargot, y compris ses repas, ont lieu de nuit avec un pic de 2 à 3h après la tombée de la nuit ; la fraîcheur nocturne et la rosée facilitent son déplacement (Chase, 1986). La taille d'un individu adulte entre 28 et 35mm pour un poids allant de 7g (Figure 15) et plus, son corps entier peut loger à l'intérieur de la coquille enroulée en spire (Daguzan, 1981)

3.1. Le corps

Son corps est constitué d'un pied unique, d'une tête et d'une masse viscérale enroulée qui est placée à l'intérieur de la coquille. Sa tête dispose de deux paires de tentacules rétractiles, appelées « cornes » ou « antennes » dans le langage familier. Dans la partie supérieure de la tête, la première paire de « cornes » abrite les yeux mais la vue est un sens peu utilisé. Ils possèdent surtout un bulbe olfactif sous l'œil et la deuxième paire de tentacules est un organe olfactif et tactile (épithélium) qui est en revanche très utilisé par l'escargot. Son corps comporte un orifice génital impair situé en arrière des tentacules, sur le côté droit de la tête, cet orifice assure une double fonction sexuelle mâle et femelle.

Le pied d'*Helix aspersa*, est un organe qui soutient le corps et permet à l'escargot de progresser par reptation. Sa partie inférieure contient des glandes qui secrètent le mucus de façon

continue, créant ainsi une trace évidente brillante derrière lui. Deux ouvertures sont localisées dans la partie supérieure du pied, près du bord de la coquille, ce sont l'ouverture respiratoire et, l'anus (**Bonnet 1990**).

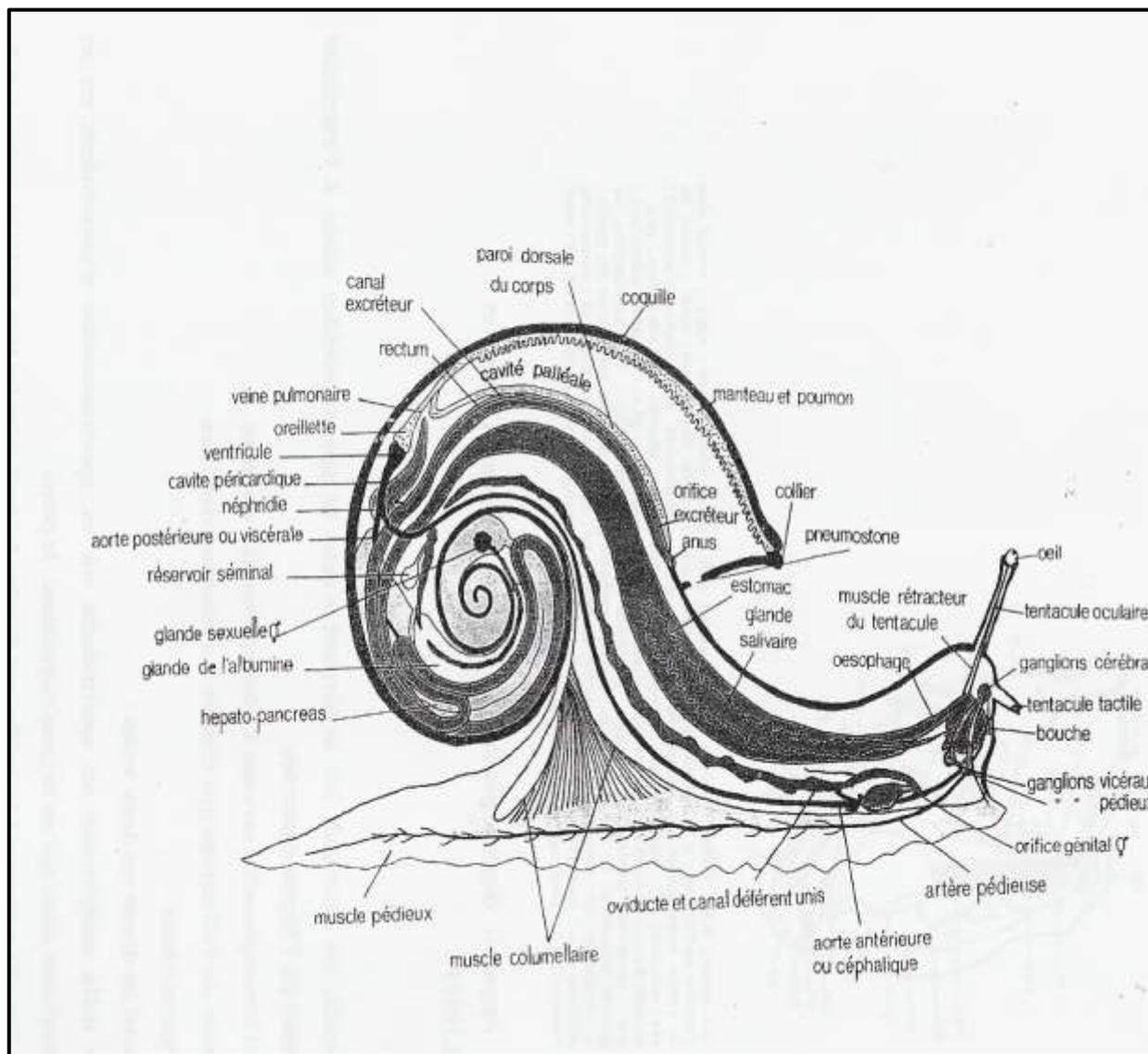


Figure 15: Schéma de l'anatomie d'un escargot selon (James, 1904)

Le manteau est une enveloppe de peau qui abrite les viscères de l'escargot. En effet, cette partie du corps comporte le tube digestif, l'appareil circulatoire, les reins et les gonades. Le manteau secrète dorsalement une coquille calcaire protectrice, il forme un repli postérieur délimitant une cavité palléale qui communique largement avec l'extérieur. Le manteau abrite également les branchies ou débouchent les orifices extérieurs (**Jean Marc Ridet, 1992**). L'importance du manteau est considérable, son rôle est doublé :

- En premier lieu il intervient dans la fabrication de la coquille. En effet, sa face externe est recouverte d'un tissu sécrétant différentes couches d'une substance organique : la conchyoline (Bellono et al ; 1971) ou la perlucine (Grégoire, 1961) abondamment imprégnée de sels calcaires.
- En seconde lieu, la surface interne du manteau délimite avec la surface contigüe du corps, une cavité : la cavité palléale que l'on dénomme aussi parfois la cavité respiratoire.

3.2. La coquille

Chez *Helix aspersa*, la coquille représente approximativement un tiers du poids total de l'escargot (Figure 16). Elle est la clef d'identification des différentes espèces. Elle est souvent très régulière et peut prendre plusieurs formes, soit conique, spiralée ou hélicoïdale (Kiddy, 1999). La coquille se compose à 99% de matière minérale, elle grossit avec l'escargot durant toute sa phase de croissance (Apia, 2004). La coquille est sécrétée par un épais pli de peau qui couvre la masse viscérale. La surface de la coquille montre de nombreux stries de croissance parallèles, qui sont les témoins de différentes étapes de la croissance de l'escargot, elle contient aussi de trois à quatre spirales orientés dans le sens des aiguilles d'une montre (enroulement dextre) et qui part du sommet de la coquille appelée également apex (Désire, 1962). Sur une coquille sciée on peut voir un axe plein appelée la columelle autour duquel s'enroule le cône calcaire qui constitue la coquille (Désire, 1962).



Figure 16: Coquilles d' *Helix aspersa* (Sakho, 2013).

IV.4. Biologie et physiologie d'*Helix aspersa*

IV.4.1. Appareil digestif

En raison de la torsion à 180° du corps de l'escargot, le tube digestif forme une boucleramenant l'anus vers l'avant. La bouche se prolonge par un bulbe buccal à l'intérieur duquelse trouve une langue musculaire recouverte d'une lame cornée : la radula, son rôleest de broyer les aliments. Dans la partie postérieure du bulbe buccal on trouve deux glandessalivaires. Ce bulbe se prolonge par un œsophage qui se renfle en un estomac, lui-même prolongé par un intestin formant une double circonvolution autour de l'hépatopancréaset aboutissant à l'anus (**Sandrine et al., 2003**).

IV.4.2. Système nerveux

Le système nerveux sympathique est constitué par une paire de ganglions buccaux situéssous le bulbe buccal. Ils sont reliés par deux cordons nerveux aux ganglions cérébroïdeset innervent la plus grande partie du tube digestif. Le système nerveux central est situédans la région céphalique. Il est formé d'une chaîne de ganglions formant un double collierpéri œsophagien complexe.(**Sandrine et al., 2003**).

IV.4.3. Appareil circulatoire et respiratoire

Le cœur est constitué d'une oreillette antérieure et d'un ventricule postérieur.Le sang ou hémolymphé contient un pigment, l'hémocyanine. Il est incoloresous sa forme désoxydée et bleu sous sa forme oxydée. Le sang est propulsé dans le réseau artériel via deux aortes. L'aorte antérieure irrigue le pied et la postérieure le tortillon. Le sang revient au cœur par un système de veines et de sinus veineux. Le poumon est une poche formée de l'épithélium palléal, irrigué par les vaisseaux pulmonaires, l'air y circule au travers du pneumostome par des mouvements de contraction de son ouverture (**Sandrine et al., 2003**).

IV.4.4. Appareil génital

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

- une gonade, ou ovotestis, où se forment ovules et spermatozoïdes située à l'extrémité postérieure de l'hépatopancréas.
- un canal hermaphrodite servant à l'évacuation des gamètes.
- une glande de l'albumine qui élabore les réserves vitellines
- un ovospermiducte Puis l'appareil se divise en deux voies :

- la voie mâle comprenant un spermiducte où les spermatozoïdes s'accumulent en un spermatophore ainsi qu'un organe copulateur, le pénis.
- la voie femelle comprend la poche qui sécrète le dard calcaire lors de l'accouplement,
- le vagin et l'orifice génital. (**Sandrine et al., 2003**).

IV.5. Reproduction

L'escargot est un animal hermaphrodite, c'est à dire mâle et femelle à la fois. Toutefois, pour reproduire, l'accouplement est obligatoire, l'autofécondation n'étant pas possible. Les escargots sont en phase mâles lorsqu'ils s'accouplent. Le climat, la température ont une grande importance sur l'âge de maturité sexuelle de l'escargot. L'accouplement peut durer plusieurs heures (10 à 12 heures). La ponte aura lieu 15 à 30 jours après l'accouplement.

Pour pondre l'escargot creuse un nid dans la terre de 4 à 5 cm de profondeur. La durée de la ponte est comprise entre 12 et 48 heures, elle aboutit à la mise de 80 à 140 œufs. Dans la nature *Helix Aspersa* peut pondre de 50 à 200 œufs.

La durée de l'incubation et de l'éclosion est comprise entre 15 et 30 jours, suivant les conditions climatiques, les jeunes vont rester 2 à 5 jours avant de sortir à la surface pour se nourrir. Leur poids est de 0,02 à 0,04 g. En élevage, les modalités de la reproduction sont identiques. L'éleveur va jouer sur les conditions de température, d'éclairage et d'humidité de façon à créer artificiellement les conditions qui règnent dans la nature au printemps. Le contrôle rigoureux des paramètres d'ambiance va accélérer un peu le processus à tous les niveaux. Par ailleurs, en élevage on ne garde les reproducteurs que pour la période de ponte, soit 8 à 10 semaines. Cette manière d'agir correspond à l'étalement des pontes au cours d'une saison de reproduction : peu de ponte au début, un pic après 4 à 6 semaines, et un déclin jusqu'à 8-10 semaines. Au cours de cette période les escargots peuvent pondre plusieurs fois (**Chase, 1986**).

IV.6. Rythmes de vie d'*Helix aspersa*

L'escargot possède deux rythmes d'activité l'un journalier et l'autre saisonnier :

IV.6.1. Activité journalière

Elle est en relation étroite avec la photopériode. Cette activité peut être inhibée par des conditions thermiques et hygrométriques défavorables, dans des conditions optimales (T° et H°), l'escargot sort de sa coquille et devient actif dès la tombée de la nuit jusqu'au lever du jour, il en profite pour se nourrir. La phase d'inactivité relative a une durée inférieure à 18 heures, durant cette phase l'escargot est au repos et ne manifeste que peu d'activité locomotrice, sexuelle ou

nutritionnelle. L'escargot est un animal nocturne: trois nuits d'activité sont suivies d'une nuit de repos et son activité débute au printemps et s'achève en novembre ou il rentre en hibernation.

IV.6.2. Activité saisonnière

Les escargots harmonisent leurs rythmes biologiques sur le rythme des saisons, ils se règlent sur l'élément de l'environnement, en l'occurrence la longueur du jour.

IV.6.3. Estivation

Un rythme de vie demi-ralentie d'été, On observe ce comportement dans des régions où l'été est particulièrement chaud et sec. L'animal se présente complètement rétracté à l'intérieur de sa coquille (operculé) dont l'ouverture est fermée; par l'intermédiaire des matières muqueuses et calcaires secrétées par le mollusque lui-même. Durant l'estivation, la respiration et les mouvements cardiaques sont normaux mais il y a diminution rapide des réserves d'eau et des réserves énergétiques. (Sandrine et al., 2003).

IV.6.4. Hibernation

Un rythme de vie ralenti d'hiver : durant la période hivernale, l'escargot entre en léthargie. Il secrète devant l'ouverture de sa coquille un rideau de mucus solidifié: l'épiphragme. L'animal vit sur ses réserves, en particulier sur le glycogène emmagasiné. Pendant l'hibernation, tous les métabolismes sont ralentis. Au cours de l'hibernation, un escargot peut perdre jusqu'à 30 % de son poids (perte en eau). Au printemps, les réserves perdues seront très rapidement récupérées. (Sandrine et al., 2003).

IV.7. Alimentation

Helix aspersa est phytophage (phyllophage et sacciforme), coprophage (Ou frugivore), détritivore et parfois cannibale. Il peut s'attaquer aux plantes cultivées des jardins, causant parfois de gros dégâts aux récoltes. Il héberge dans son intestin une flore bactérienne qui participe à la digestion des végétaux. Les bactéries se maintiennent en vie durant l'estivation ou l'hibernation, en se nourrissant du mucus qui est sécrété par l'épithélium intestinal (Charrier et al., 2006). Selon Iglesias et Castillejo (1998), le petit gris s'alimente la nuit et se nourrit tout particulièrement de feuilles de la grande ortie appelée encore ortie dioïque ou ortie commune.

IV.8. Croissance

En générale, la croissance naturelle jusqu'au stade adulte s'étale sur deux ans, si bien que les individus sont le plus souvent considérés comme sexuellement matures à partir du deuxième ou troisième été suivant leur naissance. Les facteurs qui influencent sur la croissance sont la température, l'éclairement (longueur d'onde, intensité et photopériode) (**Aupinel et Daguzan, 1989**). La durée de vie moyenne d'un escargot en milieu naturel est de 6 à 7 années. Chez les adultes, l'accroissement du poids total du corps est alors dû presque uniquement à celui de la coquille. Quatre phases de croissance ont été définies en fonction de la taille, mais aussi de la différenciation sexuelle : la phase infantile, la phase juvénile, la phase adulte à croissance nulle et la phase sénile (**Gomot et Enée, 1980**)

Partie Pratique



I. Matériels et méthodes

Cette étude a été menée dans le but d'évaluer l'effet protecteur des huiles essentielles de l'écorce d'orange chez les escargots *Helix aspersa* intoxiqués par l'hymexazole.

Les expérimentations effectuées dans cette étude ont été accomplies dans le Laboratoire de recherche sur les molécules bioactives et applications et le laboratoire de toxicologie, du département de Biologie appliquée.

I.1. Matériels

I.1.1. Matériel végétal

Les oranges ont été achetées au niveau du marché de la wilaya de TEBESSA au cours des mois de novembre à mars et ont été choisies sur la base de critères descriptifs de l'espèce *Citrus sinensis* (variété Thomson navel). Les oranges sélectionnés sont mûres et saines. Les écorces ont été coupées en petits morceaux puis séchées à l'ombre pendant une semaine à température ambiante (**Figure 17**).

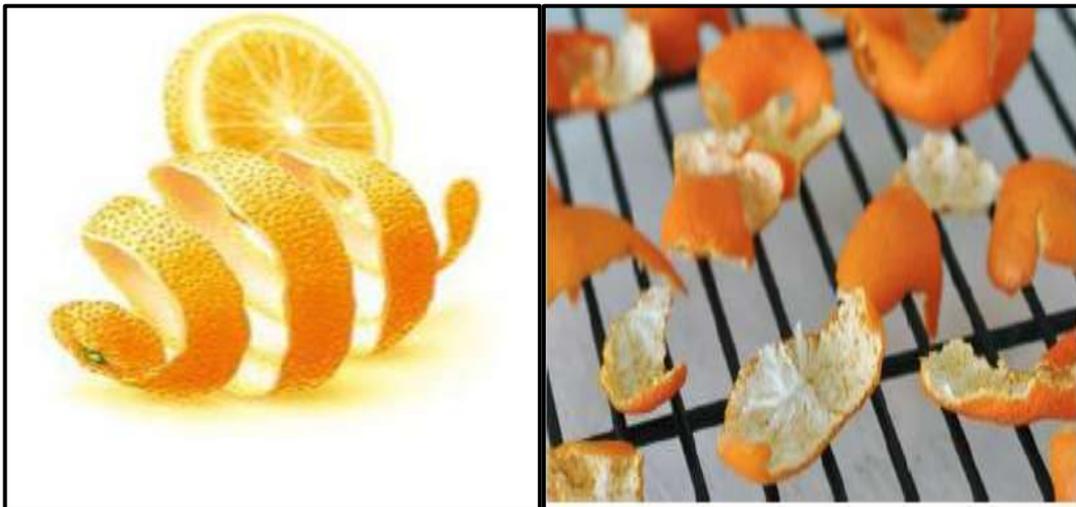


Figure 17: Ecorce sèche d'orange (*Citrus sinensis*).

I.1.2. Matériel animal (modèle biologique)

Le modèle biologique utilisé dans cette expérience est l'escargot *Helix aspersa* (**Figure 18**) qui est un gastéropode pulmoné (petit gris) collectés d'un site non traité par les pesticides, situé dans la région de Bekkaria de la Wilaya de Tébessa. Les escargots sont ensuite transférés au laboratoire pour l'adaptation avant le traitement. Au total, 40 escargots ont été utilisés dans notre expérimentation. Ils sont tous adultes avec un poids moyen de 12g ($\pm 0,35$ g).

Partie pratique



Figure 18 : Les escargots *Helix aspersa*.

Les escargots ont été soumis à une période d'adaptation de 15 jours, aux conditions d'environnement optimales suivantes : photopériode de 18h de lumière/24h, température $20 \pm 20^{\circ}\text{C}$ (Gomot et vaufleury, 2000). Ils sont répartis dans des boîtes de plastique transparentes, avec couvercle perforé, et chaque boîte contient une éponge humide pour maintenir d'humidité, l'alimentation (Salade) (Figure 19). Les boîtes de plastique sont quotidiennement nettoyées l'après-midi et l'alimentation a été renouvelée quotidiennement.



Figure 19: L'élevage des escargots dans le laboratoire.

I.2. Méthodes

I.2.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles de l'écorce d'orange a été réalisée par hydro-distillation. Il s'agit de la méthode la plus simple et la plus utilisée. L'appareil utilisé pour l'hydro-distillation est de type Clevenger (**Figure 20**). Il est constitué d'un chauffe-ballon, un ballon en verre pyrex, une colonne, un réfrigérant et un collecteur. Chacun de ces éléments a un rôle précis : le ballon en verre pyrex sert à placer 100 g de l'écorce d'orange sèche où sont introduits avec 1200 ml d'eau distillée. Après installation et fermeture du montage, la mise en marche du chauffe-ballon est effectuée avec un réglage optimum du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction à une vitesse constante et bien maîtrisée. La colonne contenant le réfrigérant condense. La vapeur chargée d'huile essentielle arrive dans le collecteur. La durée totale de l'extraction est estimée à 3 h (jusqu'à ce qu'on obtienne plus d'HE).

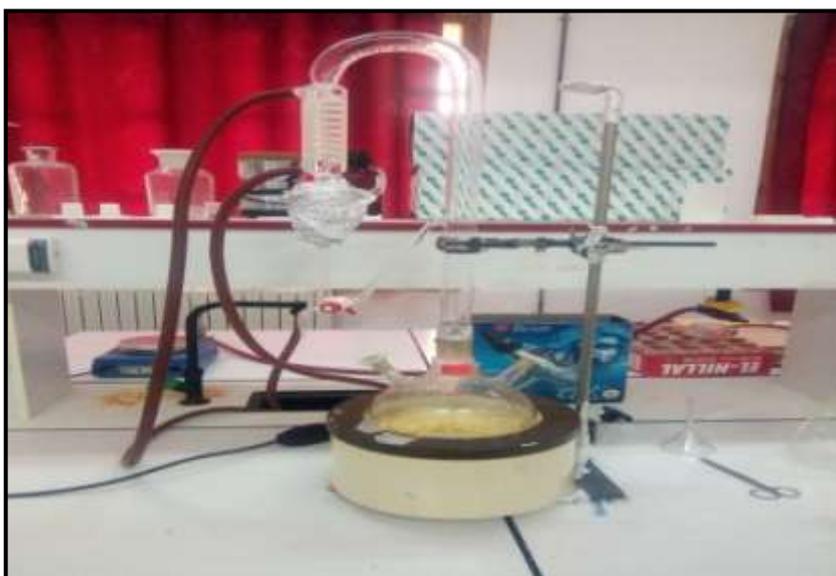


Figure 20 : Procédé d'hydro-distillation.

I.2.2. Rendement

Le rendement de l'huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la matière sèche de la plante.

$$R = P_{HE} \times 100 / P_{MS}$$

R: Rendement en HE (en %).

PHE: Poids d'HE en g.

PMS : Poids de matière sèche de la plante en g.

I.2.3. Mode de traitement

Après une période d'adaptation de 15 jours, nous avons commencé un traitement quotidien par injection pendant 21 jours. Les Quarantes 40 escargots utilisés dans notre expérimentation sont adultes avec un poids moyen de 12g (± 0.35 g). Ils sont divisés en 4 lots : un premier lot témoin de 10 escargots et trois autres lots de 30 escargots chacun. Le deuxième, le troisième et le quatrième lot d'escargots sont destinés aux traitements au L'hymexazole, à l'huile essentielle de l'écorce d'orange et aux mixtures respectivement.

- ❖ **Lots n°1 (T)** : escargots traités par l'eau distillée (20 μ l/g/j) par injection
- ❖ **Lots n°2 (HEO)**: escargots traités par huiles essentielles de l'écorce d'orange administrée par injection avec une dose de (0,151 μ l/g/j) de poids corporel. Cette dose a été utilisée par **Omoniwa et al. (2014)**.
- ❖ **Lots n°3 (HZ)**: escargots traités par l'hymexazole avec une dose de (90 μ g/g/j) de poids corporel. Cette dose a été déduite à partir des données trouvées dans **EFSA (2010)**.
- ❖ **Lots n°4 (HEO+HZ)**: escargots traités par huiles essentielles de l'écorce d'orange et l'hymexazole avec les mêmes doses.

Remarque : l'huile essentielle de l'écorce d'orange a été administrée 30 minutes avant les pesticides dans les lots HEO et HEO+HZ.

I.2.4. Sacrifices et prélèvements d'organes

Après la période du traitement, les escargots sont mis à jeun pendant 48 heures afin que le contenu de leur tube digestif soit vide. Ceci évite d'éventuelles interférences entre les contaminants présents dans l'aliment ingéré et les quantités de contaminants réellement accumulés dans les tissus. Les boîtes où ils jeunent sont lavées à l'eau artificielle, pour éviter la ré-ingestion des fèces. Les animaux sont ensuite sacrifiés par congélation à -20° C puis disséqués. Les coquilles sont enlevées, la tête et l'hépatopancreas ont été excisés, lavés avec l'eau physiologique (**Figure 21**).

Partie pratique



Figure 21 : Etapes de la dissection des escargots et Prélèvement des organes
L'hépatopancréas.

Après la dissection, l'hépatopancréas a été prélevé et divisé en 08 fragments pour chaque mesure des bios-marqueurs :

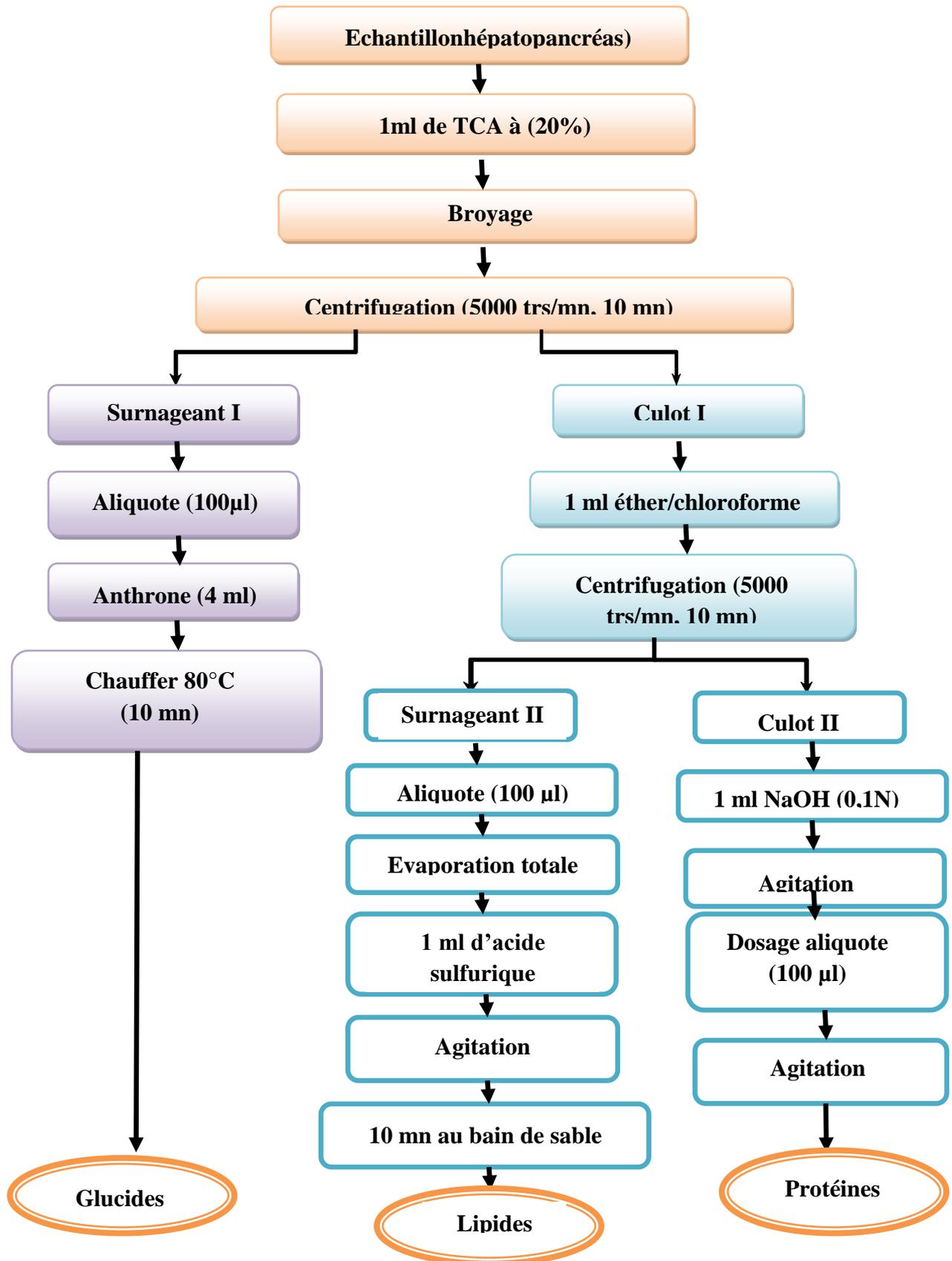
- ❖ Un fragment pour le dosage de protéines.
- ❖ Un fragment pour le dosage de glucides.
- ❖ Un fragment pour le dosage de lipides.
- ❖ Un fragment pour le dosage de la Malondialdéhyde (MDA).
- ❖ Un fragment pour le dosage du glutathion (GSH).
- ❖ Un fragment pour le dosage de la Glutathion peroxydase (GPx).
- ❖ Un fragment pour le dosage de la glutathion -s-transférase (GST).
- ❖ Un fragment pour le dosage de la catalase (CAT).

I.2.5. Méthode de dosage

I.2.5.1. Dosage des métabolites contenus dans l'hépatopancréas (protéines, lipides et glucides)

Le dosage des différents métabolites (protéines, lipides et glucides) contenus dans l'hépatopancréas des escargots a été réalisé selon le procédé de **Shibko et al., (1966)**. Après un broyage et centrifugation (5000 tours/mn pendant 10mn), le surnagent I a été récupéré afin de doser les glucides. Le culot I a été également récupéré. A ce dernier, 1 ml d'un mélange éther/chloroforme (V/V) a été ajouté et une deuxième centrifugation (5000 tours/mn pendant 10mn) a été réalisée. Le surnagent II a été récupéré afin de doser les lipides tandis que le culot II a été traité avec 1 ml de NAOH (0,1N) pour le dosage du taux des protéines totales (**Figure 22**).

Partie pratique



Duchateau et Florkin, (1959)

Goldsworthy et al., (1972)

Bradford, (1976)

Figure 22: Extraction et dosage des métabolites (glucides, lipides, et protéines) de l'hépatopancréas chez les adultes de l'escargot *Helix aspersa* selon (Shibko et al. 1966).

I.2.5.1.1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été déterminé selon la méthode de (**Bradford, 1976**) qui consiste à utiliser le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH_2) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. L'apparition de la couleur bleu reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines.

Pour accomplir cet essai, nous avons procédé comme suit :

- ❖ Prélever 0.1ml de l'homogénat.
- ❖ Ajouter 5ml de réactif de Bradford.
- ❖ Agiter et laisser 5 minutes.

❖ Lecture

La lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde de 595 nm

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (**annexe 01**).

I.2.5.1.2. Dosage des lipides

Le taux des lipides a été déterminé selon la méthode de **Goldsworthy et al. (1972)**. Cette méthode utilise la vanilline comme réactif (0,38g de vanilline, 195ml d'acide ortho-phosphorique à 85% et 55ml d'eau distillée) et solution mère de lipides (2,5mg/ml) comme standard. Et additionné 1ml d'acide sulfurique (98%), après agitation, les chauffer un bain marie (100°C pendant 10min) ; de chaque tube 200µl sont ensuite prélevés et il est ajouté 2,5ml de réactif.

❖ Lecture

Les absorbances ont été lues après 30 min d'obscurité à une longueur d'onde de 530 nm (**annexe 02**).

I.2.5.1.3. Dosage des glucides

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de **Duchateau et Florin, (1959)**. Elle consiste à additionner 100 µl du surnageant contenu dans un tube à essai, 4 ml de 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 présent dans l'échantillon

❖ Lecture

La lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde de 620 nm (**annexe 03**).

I.2.6. Analyse des paramètres enzymatiques

I.2.6.1. Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

❖ Principe

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 doubles liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipopéroxydation in vitro. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode **Draper et Hadley (1990)**.

❖ Mode opératoire

- Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (pH7, 4).
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT.
- Mélanger à l'aide d'un vortex et centrifuger à 1000 tour/min pendant 10min.
- Prélever 400 µl du surnageant.
- Ajouter 80 µl du HCL 0.6 M.
- Ajouter 320 µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.

Lecture de la densité optique à $\lambda=530$ nm.

❖ Calcul

La concentration du MDA est calculée selon la loi de **Beer-Lambert** :

$$C(\text{nmol /mgdeprotéine}) = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot \chi \cdot Fd}$$

- **DO** : Densité optique lue à 530 nm;
- **ϵ** : Coefficient d'extinction molaire du MDA = 1,56 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹;
- **L** : Longueur du trajet optique = 0,779 cm;
- **X** : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml);
- **Fd** : Facteur de dilution : Fd = 0,2083.

I.2.6.2. Dosage du glutathion (GSH)

❖ Principe

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé de **Weckbeker et Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5, 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Elleman) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalicylique 0,25%) afin de garder uniquement les groupements-SH spécifique du glutathion (**weckbeker et Cory, 1988**)

❖ Mode opératoire

- Une fois préparé, l'homogénat est déprotéinisé ; 0,8 ml de ce dernier auquel on ajoute 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0,25%.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifugé pendant 5min à 1000 t/min.
- Prélever 0,5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml de tampon tris-HCL+EDTA (0,02M), PH=9,6.
- Mélanger et ajouter 0,025 ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0,01M dissous dans le méthanol absolu.
- Laisser pendant 5min à température ambiante. puis lecture de la DO à $\lambda = 412$ nm.

❖ Calcul

La concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5} \text{ /mg de protéines}$$

-DO : Densité optique ;

-1 : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0,8 ml homogénat + 0,2 ml SSA);

-1,525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant

(0,5 ml surnageant + 1 ml Tris -EDTA + 0,025 ml DTNB);

-13100 : Coefficient d'absorbance (contenant le groupement -SH à 412 nm);

-0,8: Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans un 1 ml;

-0,5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1,525 ml.

I.2.6.3. Dosage du Glutathion peroxydase (GPx)

❖ Principe

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante (**Flohe et Gunzler, 1984**):



❖ Mode opératoire

- Dans un tube sec, 0,2 ml de surnageant est additionnée à 0,4 ml de GSH à 0,1 mM (réaction enzymatique) + 0,2 ml de KNaHPO₄ à 0,067 M (tampon d'extraction pH 7,8).
- Le tube blanc contient 0,4 ml de GSH + 0,2 ml de KNaHPO₄ (réaction non enzymatique).
- Incubation au bain marie à 25° C pendant 05 min puis addition de 0,2 ml d'H₂O₂ (1,3mM) pour initier la réaction.
- Incubation 10 min.
- Addition de 1ml de TCA 1% T pour arrêter la réaction.
- Le mélange se met dans la glace pendant 30 min. Centrifugation durant 10 min à 3000t/min. 0,48 ml de surnageant sont placés dans une cuve est additionnés de 2,2 ml de Na₂HPO₄ (0,32M) + 0,32 ml de DTNB à 1mM.
- Mesure de la densité optique à 412 nm dans les 05 min.

Partie pratique

❖ Calcul

La détermination de l'activité de la GPx se fait de la façon suivante :

$$\text{L'activité de la GPx} = \text{La quantité de GSH réduit disparue} \times \frac{5}{\text{La concentration de protéine}}$$

La quantité GSH réduit qui sera oxydée (disparue) est déterminée comme suit :

$$X = \frac{(\text{DOe} - \text{DOb}) \times 0.04}{\text{DOb}} = \text{quantité de GSH réduit disparue (oxydée)}.$$

X = Activité de GSH consommée / min / mg de protéine

DOb = Densité optique de GSH réduit du blanc

DOe = Densité optique de GSH réduite de l'extrait

I.2.6.4. Dosage de l'activité glutathion-S-transférase (GST)

❖ Principe

La mesure de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST) 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-Chloro2,4 di nitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH), la conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyl 2-4 Di nitrobenzène (**Habig et al., 1974**). Permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante:



❖ Mode opératoire

La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST. Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 1400 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200 µl du surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM). La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 340nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

❖ Calcul

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

$$\text{GST (nmol GST /min/mg de protéine)} = \frac{(\text{DO}_{\text{échant}}/\text{min} + \text{DO}_{\text{blanc}}/\text{min})}{9,6 \times \text{mg de protéine}}$$

-Do : Densité optique de l'échantillon /min ;

-Do/min blanc : Densité optique du blanc /min ;

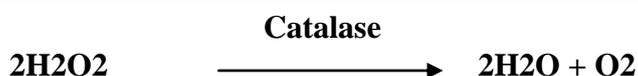
-9,6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm.

I.2.6.4. Dosage de l'activité catalase(CAT)

❖ Principe

Les catalases sont présents dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymestétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces

réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi, 1984).



L'activité de la catalase (CAT) est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 min à pH 7,4, 200 µl d'H₂O₂ (500mM) sur 20 µl de l'homogénat, à une température d'incubation de 25°C. Les résultats ont été exprimés en µ moles d'H₂O₂ par minute et par mg de protéines.

❖ Mode opératoire

- La lecture contre le blanc réactifs (Tampon phosphate)
- La quantité du surnageant doit être déterminée en fonction de la quantité de protéines qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/ml, soit une quantité de 10 à 20 µl de solution diluée

Partie pratique

- L'activité décroît rapidement, il est important de mettre toujours le même temps de pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.
- La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durent 60 s de mesure.
- Le coefficient d'extinction d' H_2O_2 étant de $0,043 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

❖ Calcul

L'activité de la CAT peut être calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Activité CAT} = \frac{\Delta \text{DO} \times d}{\epsilon \times X \times L \times 0.02}$$

- **d** : dilution de l'échantillon au début
- **ϵ** : Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée, $\epsilon \text{ H}_2\text{O}_2 = 0,043 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} = 0,043 \mu\text{mol cm}^{-1}\text{ml}^{-1}$
- **L** : largeur de la cuve (longueur du Trajet optique) en cm
- **X** : quantité des protéines en mg/ml.

Avec :

ΔDO : variation de la densité optique par minutes (AF-AI)

- AI (Absorbance initiale): 15s
- AF (Absorbance finale): 1min

I.3. Etude statistique

Les digrammes ont été tracés grâce au logiciel Excel10. Les traitements statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement statistique des données (Version13, 31). Pour chaque paramètre, les différences entre les lots ont été évaluées grâce à une analyse de variance à un critère de classification (ANOVA) suivie par un test de Tukey pour comparer les différents lots entre eux y compris le lot témoin.

Les résultats sont représentés sous la forme : moyenne \pm écart type, et les différences ont été considérées comme significative si $p < 0,05$.

Résultats



Résultats

II. Résultats

II.1. Rendement de l'écorce d'orange en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle de l'écorce d'orange enregistré dans cette étude est de 1,05%.

II.2. Effets de l'HZ et des HEO sur les paramètres biochimiques au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa*

II.2.1. Effet sur le taux des protéines

Les variations du taux des protéines au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots témoins et traités sont représentées dans la **Figure 23**. Nous remarquons que le taux de protéines n'a pas été affecté ni par l'HZ, ni par l'HEO, ni par leur association en comparaison avec les témoins. En effet, le taux de protéines enregistré chez les témoins était de 47,87mg/L alors que celui enregistré chez les escargots traités par l'HZ était de 45,45 mg/L. En cas de traitement par l'HEO, nous avons enregistré un taux moyen de protéines de 45,10 mg/L tandis que la combinaison HZ et HEO a permis d'enregistrer un taux de 45,67 mg/L. L'étude statistique n'a pas révélé de différence significative entre ces différents groupes ($P \geq 0,05$).

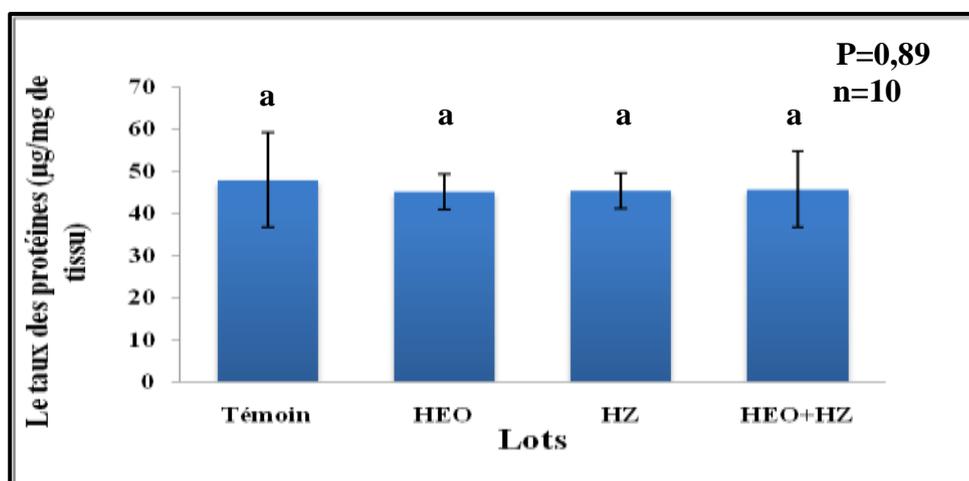


Figure 23 : Variations du taux des protéines au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.

HEO : Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge ; **HZ** : Hymexazole

HEO +HZ: Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge et Hymexazole.

a : les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

n : le nombre d'escargots dans chaque lot.

Résultats

II.2.2.Effet sur le taux des lipides

Les variations du taux des lipides au niveau hépatopancréas chez les escargots témoins et traités sont représentées dans la **Figure 24**. Nos résultats signalent une diminution non significative du taux des lipides au niveau du lot traité par l'HZ comparé aux témoins (56,02mg/L vs.104, 68 mg/L). Le Co-traitement HEO et l'HZ augmente le taux des lipides à des valeurs proches à celle des témoins (100,64 mg/L). Notons que le lot traité par l'HEO seule ne montre également aucune modification significative par rapport aux témoins (112,33 mg/L).

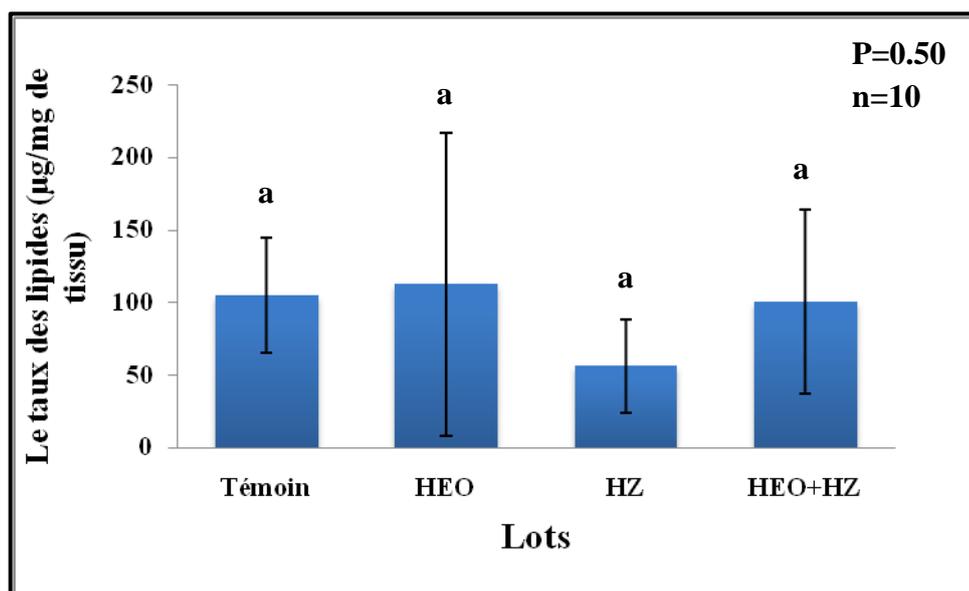


Figure 24 : Variations du taux des lipides au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.

HEO : Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge ; **HZ** : Hymexazole

HEO +HZ: Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge et Hymexazole.

a : les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

n : le nombre d'escargots dans chaque lot.

Résultats

II.2.3.Effet sur le taux des glucides

Les variations du taux des glucides au niveau des hépatopancréas des escargots témoins et traités sont représentées dans la **Figure 25**. Nous remarquons que le taux des glucides a significativement augmenté chez les escargots traités par l'HZ que ce soit en présence ou en absence d'un co-traitement par les HEO comparés aux témoins ($p \leq 0.001$). En effet, les valeurs du taux des glucides passent de 84,39 mg/L enregistré chez les témoins à 133,19 mg/L et 137,44 mg/L enregistrés respectivement chez lot HZ et le lot HEO-HZ. Ceci indique que le traitement par les HEO n'a pas d'effet régulateur sur le taux des glucides en cas d'intoxication de l'HZ. Il est à noter que le lot traité par les huiles essentielles d'oranges seules n'enregistre aucune modification du taux moyen des glucides au niveau hépatopancréatique comparés aux témoins.

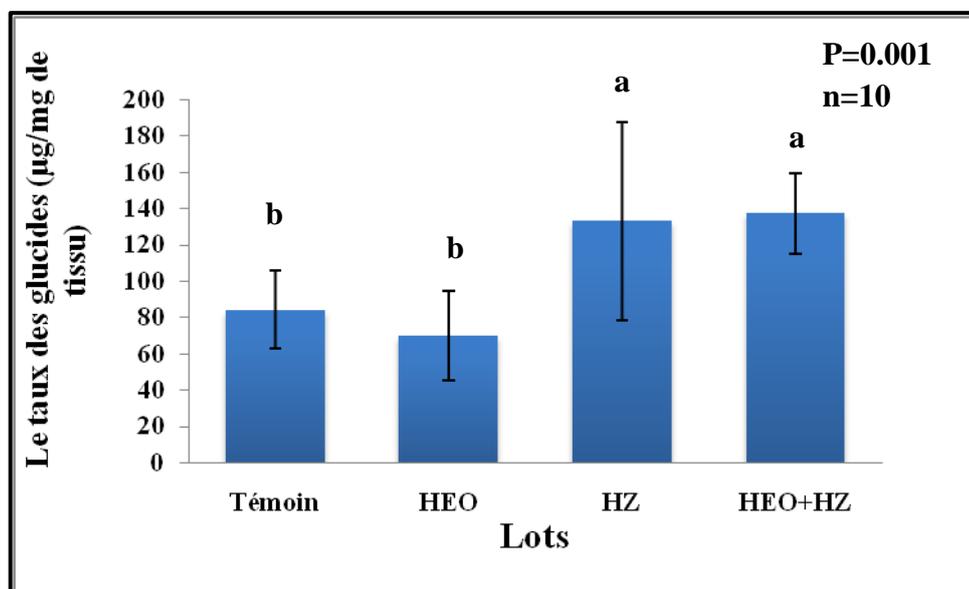


Figure 25 : Variations du taux des glucides au niveau de l'hépatopancreas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.

HEO : Huiles Essentielles de l'écorce d'Orange ; **HZ :** Hymexazole

HEO +HZ: Huiles Essentielles de l'écorce d'Orange et Hymexazole.

a : les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

n : le nombre d'escargots dans chaque lot.

Résultats

II.3. Effets du l'HZ et les HEO sur les paramètres du stress oxydant au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa*

II.3.1.Effet sur le taux de Malondialdéhyde (MDA)

La **figure 26** révèle les variations du taux de MDA au niveau hépatopancréatique chez les escargots témoins et traités. Nous observons une augmentation non significative ($p > 0,05$) du taux de MDA chez le lot traité par l'HZ par rapport aux témoins ($4,84 \times 10^{-7} \mu\text{M}/\text{mg}$ de protvs. $3,82 \times 10^{-7} \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot.) tandis que chez le lot traité par l'HZ combiné aux HEO, le taux moyen du MDA reste proche à celui des témoins ($3,75 \times 10^{-7} \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot.). Par ailleurs, le lot traité par l'HEO seul enregistre aucune différence significative du taux de MDA avec les témoins ($3,82 \times 10^{-7} \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot.).

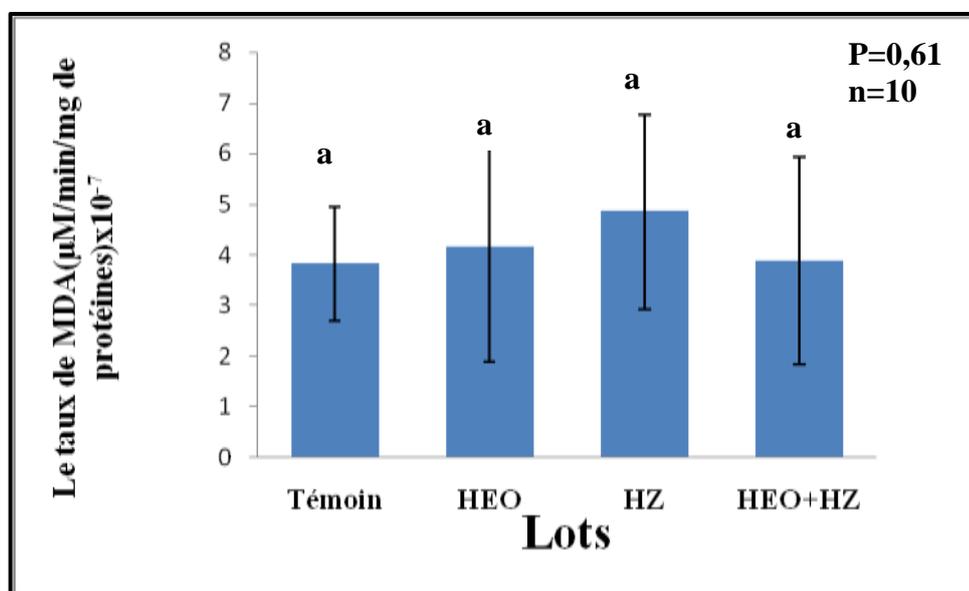


Figure 26 : Variations du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.

HEO : Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge ; **HZ :** Hymexazole

HEO +HZ: Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge et Hymexazole.

a : les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

n: le nombre d'escargots dans chaque lot.

Résultats

II.3.2.Effet sur le taux du glutathion réduit (GSH)

Les variations du taux de GSH au niveau hépatopancréatique chez les escargots témoins et traités sont représentées dans la **Figure 27**. Nos résultats signalent une diminution du taux de GSH au niveau du lot traité par l'HZ comparée aux témoins ($5,78 \times 10^{-8} \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot vs $1,25 \times 10^{-7} \text{ mg/L}$), cependant cette diminution est non significative ($p > 0,05$). Le co-traitement des HEO et de l'HZ augmente le taux du GSH à des valeurs semblables à celles des témoins ($1,21 \times 10^{-7} \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot.). Notons que le lot traité par l'HEO seule ne montre aucune modification significative par rapport aux témoins ($1,40 \times 10^{-7} \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot.).

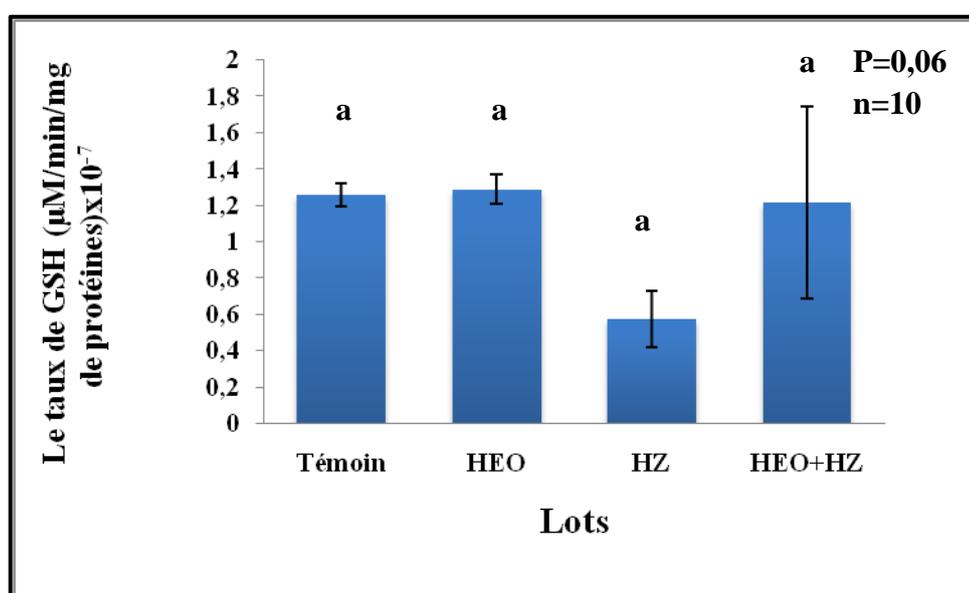


Figure 27 : Variations du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.

HEO : Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge ; **HZ :** Hymexazole

HEO +HZ: Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge et Hymexazole.

a : les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

n : le nombre d'escargots dans chaque lot.

Résultats

II.3.3. Effet sur l'activité de GPx

Les variations de l'activité de GPx au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots témoins et traités sont représentées dans la **Figure 28**. Nos résultats montrent que l'activité de GPx a augmenté chez les escargots traités par rapport aux témoins surtout pour le lot traité par l'HZ (0,0045 μ M/mg de prot. vs 0,0034 μ M/mg de prot.) et le lot traité par l'HEO (0,0043 μ M/mg de prot.). Cette augmentation est très hautement significative ($p \leq 0.001$). Par ailleurs, dans le lot traité par la combinaison HEO et HZ, le taux de GPx prend une valeur très proche des témoins (0,0035 μ M/mg de prot.).

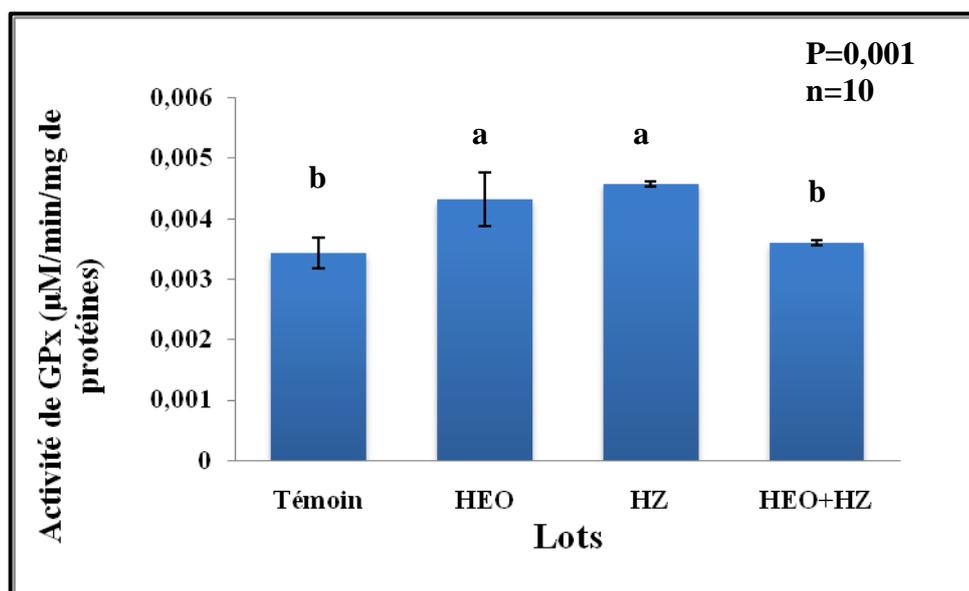


Figure 28 : Variation de l'activité de GPx au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.

HEO : Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge ; **HZ** : Hymexazole

HEO +HZ: Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge et Hymexazole.

a : les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

n : le nombre d'escargots dans chaque lot.

Résultats

II.3.4.Effet sur l'activité de GST

Les variations de l'activité de GST au niveau hépatopancréas chez les escargots témoins et traités sont représentées dans la **Figure 29**. Selon les résultats obtenus, on observe une augmentation non significative ($p > 0,05$) de l'activité de GST chez le lot traité par l'HZ par rapport aux témoins ($0,1237 \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot. vs $0,0675 \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot.). Chez le lot traité par l'HEO seule, l'activité de GST n'a pas enregistré de modification notable en comparaison avec le témoin ($0,0559 \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot.). Par ailleurs, chez le lot traité par l'HEO en combinaison avec l'HZ, le taux moyen de GST diminue de façon non significative ($p > 0,05$) comparée aux lots témoins ($0,0924 \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot.).

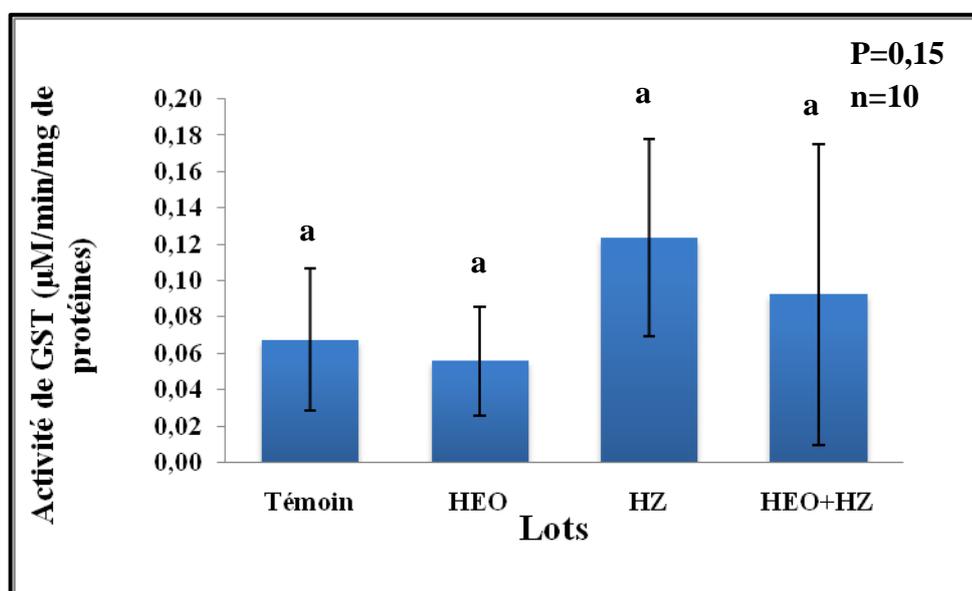


Figure 29 : Variation de l'activité de GST au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités en fonction des traitements.

HEO : Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge ; **HZ** : Hymexazole

HEO +HZ: Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge et Hymexazole.

a : les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

n: le nombre d'escargots dans chaque lot.

Résultats

II.3.5.Effet sur l'activité de la catalase (CAT)

Le suivi de l'activité de la catalase au niveau hépatopancréatique chez les escargots témoins et traités sont représentées dans la **Figure 30**. Nos résultats montrent que cette activité est augmentée au niveau du lot traité par l'HZ par rapport aux témoins (4,794 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de prot vs. 1,924 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de prot). Cette augmentation est hautement significative ($p \leq 0.01$). Les autres lots donnent des taux d'activité semblables aux témoins.

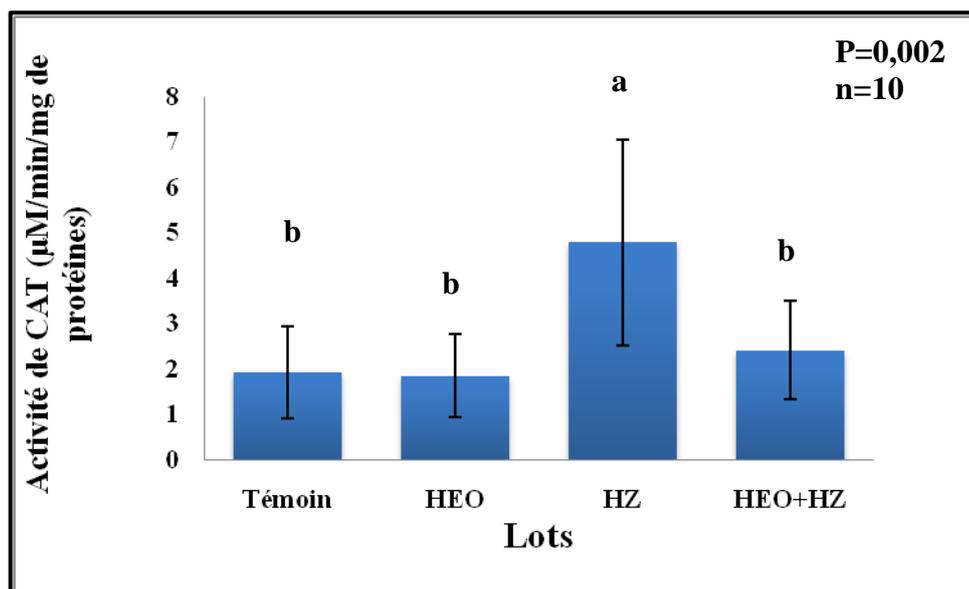


Figure 30 : Variation de l'activité de la catalase au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités après en fonction des traitements.

HEO : Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge ; **HZ :** Hymexazole

HEO +HZ: Huiles Essentielles de l'écorce d'Oronge et Hymexazole.

a : les moyennes affectées par des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

n : le nombre d'escargots dans chaque lot.

Discussion



Discussion

Le présent travail a estimé l'intoxication par l'hymexazole sur un modèle biologique qui est l'escargot petit gris ou *Helix aspersa* et a évalué l'effet protecteur des huiles essentielles d'orange. Dans la littérature, les travaux réalisés sur *Helix aspersa* sont rares. De même, nous avons remarqué une rareté des travaux toxicologiques sur l'hymexazole. La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature va se faire, si possible, avec les travaux réalisés sur les pesticides de la même famille et sur d'autres modèles biologiques proches des escargots. Récemment, des études de biodistribution ont indiqué que l'hymexazole s'accumule principalement dans l'hépatopancréas et est excrété lentement (Odendaal et Reinecke, 2003; Hamed et al., 2007; Radwan et al., 2008; Zaldibar et al., 2008).

1. Effet de l'hymexazole sur les paramètres biochimiques

D'après les résultats de cette étude, l'exposition à l'hymexazole a induit une perturbation du métabolisme général des cellules hépatopancréatiques. Les résultats obtenus montrent une augmentation du taux des glucides chez les escargots traités par l'hymexazole en comparaison avec les témoins. Cette augmentation peut être expliquée par plusieurs hypothèses notamment l'augmentation des réserves énergétiques, ou par des changements structuraux ou de perméabilités des membranes cellulaires c'est-à-dire l'effet inhibiteur de l'hymexazole sur l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase, de la succinate déshydrogénase et $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ et l'interférence avec la chaîne de transport énergétique résultant une accumulation endocellulaire des glucides (Carpy et al., 2000). Cette augmentation s'accorde avec les travaux de (Jumel et Lagadic, 2000) qui enregistrent une augmentation du glucose d'une manière significative pendant la période expérimentale chez les escargots traités avec le pesticide Fluazifop-p-butyl. Cela peut être dû à l'absence de tout effet des HEO sur le métabolisme glucidique.

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'utilisation des huiles essentielles de l'écorce d'orange n'a pas corrigé cette perturbation du taux des glucides. Comme étant molécule antioxydante, il s'avère que ces composés chimiques ont bien rétabli le taux des lipides aux valeurs normales.

En ce qui concerne le taux des protéines, nous avons trouvé que le taux moyen de protéines n'a pas été affecté ni par l'hymexazole, ni par les huiles essentielles de l'écorce

d'orange, ni par leur association en comparaison avec les témoins. Donc il n'y'a aucun effet sur le métabolisme des protéines.

Nos résultats montrent une diminution du taux des lipides en concorde avec les résultats de **(Padmaja et Rao, 1994)**. Cette diminution peut s'expliquer par la dégradation des lipides par l'activation de la peroxydation lipidique à cause des radicaux libres. Ces résultats sont confirmés par le taux élevé du MDA. Selon les résultats obtenus lors de l'utilisation des huiles essentielles de l'écorce d'orange comme étant molécule antioxydant il s'avère que ces composés chimiques ont bien rétabli le taux des lipides aux valeurs normales. Ce pouvoir préventif pourrait être attribué aux caractères antioxydant de ces composés chimiques qui se manifeste à différents niveaux, par leur action réductrice, leur capacité à piéger et neutraliser les formes toxiques de l'oxygène, et les formes radicalaires des lipides. Par ailleurs, certains d'entre eux peuvent également inhiber la lipooxygénase (une enzyme qui catalyse l'oxydation des acides gras **(Williams et al., 2004 ; Benahmed., 2010)**).

2. Effet del'hymexazole sur les paramètres du stress oxydant

Le stress oxydant dans les cellules ou les tissus se réfère à renforcer la production d'espèces réactives de l'oxygène et/ou la déplétion dans le système de défense antioxydant. Les ERO générés dans les tissus sont efficacement piégés par le système enzymatique antioxydant comme la GPx, catalase et GST, ainsi que les antioxydants non enzymatiques comme le MDA et GSH **(Schlorff et al., 1999)**. Le glutathion agit comme un antioxydant physiologique de protection dans des systèmes biologiques **(Fatima et Mahmood, 2007)**. Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telles la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde desmutase **(Morin et al, 2001)**. Pour la protection, le GSH porte une fonction thiol qui constitue un système antioxydant de la première défense en se liant par sa fonction SH aux métabolites toxiques.

2.1. Effet sur le taux de MDA

L'augmentation du taux de Malondialdéhyde (MDA) indique une augmentation de la peroxydation lipidique. Cette dernière est suivie de changement et de dégradation des structures membranaires. Il est suivi d'une perte des récepteurs et des enzymes de la membrane. Les radicaux libres conduisent à des dommages lipidiques et à la peroxydation des acides gras polyinsaturé **(Geyu et al., 2014)**. La production de MDA est parallèle à la peroxydation lipidique. La mesure de la MDA est le test le plus largement utilisé comme biomarqueur de stress oxydatif

Discussion

Dans ce travail nous avons mis en évidence une augmentation non significative du taux moyen du MDA en présence de l'hymexazole. Cette absence de significativité du test statistique est expliquée par la variabilité à l'intérieur des lots expérimentaux qui est vraisemblablement élevée. Nos résultats sont en concordance avec les travaux de **(Geyu et al., 2014)**, qui ont montré que dans l'hépatopancréas des escargots le taux de MDA était élevé d'une façon non significative chez les groupes traités en comparaison avec le groupe témoins. Cette augmentation nous a confirmé que l'hymexazole a altéré les contenus de la membrane plasmique confirmant ainsi le taux réduit des lipides dans nos résultats **(Wu et al., 2009 ; Ghosh et al., 2010 ; Li et al., 2010)**. Après l'addition des huiles essentielles de l'écorce d'orange, cette augmentation a été neutralisée ramenant les valeurs du MDA à des niveaux proches à celles des témoins **(Xinyan, 2018)**.

2.2. Effet sur le taux de GSH

Le glutathion (GSH sous sa forme réduite) est un tri-peptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine **(dergin et al, 2000)**. En présence d'ERO, le glutathion réduit s'oxyde pour former du glutathion oxydé (GSSG). La mesure de l'homéostasie redox du glutathion est un bon indicateur de l'état oxydatif cellulaire. Afin d'obtenir une représentation plus précise de l'importance du stress oxydant dans la toxicité des pesticides, il importe de mesurer le rapport GSH/GSSG. La mesure du taux de GSSG n'a pu être possible dans ce travail à cause du manque des réactifs. Pour cette raison nous nous satisfaisons de mesurer uniquement le taux de GSH.

D'après nos résultats nous avons observé une diminution du taux de GSH chez les escargots traité par l'hymexazole ce qui concorde avec les résultats de **(Fen, 2009)**. L'activité enzymatique nécessite la présence des coenzymes et cofacteur ce qui explique le taux réduit de GSH des cellules hépatopancréatique des escargots après exposition aux pesticides et hyperactivité enzymatique. Le niveau réduit de GSH dans l'intoxication par l'hymexazole pourrait être dû à l'utilisation accrue de la production submerger des radicaux libres par l'hymexazole.

2.3. Effet sur l'activité de GPx

La glutathion peroxydase (GPx) est une scléroprotéine (cinq iso formes) qui réduit les peroxydes (transformé H_2O_2 a H_2O non toxique) aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. (Geyu *et al.*, 2014 ; Byung *et al.*, 2008).

D'après nos résultats on observe une augmentation de l'activité GPx chez les escargots traités par l'hymexazole. Cette augmentation s'accorde avec les travaux de (Zhu *et al.*, 2010) qui utilisant l'hexaconazole sur *Daphnia magna*, qui montre une augmentation progressive de l'activité spécifique de GPX . Cet effet pourrait être dû à l'augmentation du stress oxydatif qui renforce l'activité des enzymes antioxydants chez les animaux (Halliwell et Chirico, 1993).

2.4. Effet sur l'activité de GST

Les GST sont des enzymes multifonctionnelles impliquées dans l'étape de conjugaison du (glutathion réduit) à un grand nombre de xénobiotiques (Boyer, 2006). Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme des cellules, du corps gras et des muscles alaires (Hauburge et Amichot, 1998). Elles ont un rôle important dans la détoxification de substance xénobiotique et interviennent en catalysant la conjugaison de ces substances avec le groupement thiol du glutathion endogène (Jakoby et Habig, 1980). Donc, le rôle majeur du glutathion est de convertir des composés lipophiles en molécules hydrophiles facilement excrétables (Habig *et al.*, 1974). Les GST permettent le développement de la résistance envers les agents chimiothérapeutiques, les insecticides, les herbicides et les antibiotiques microbiens. Elles jouent un rôle important dans la physiologie du stress, le transport intracellulaire et dans les différentes voies de biosynthèse (George, 1994).

D'après nos résultats on observe une augmentation non significative de l'activité GST chez les escargots traités par l'hymexazole par rapport aux témoins. De ce fait, de nombreuses études ont montré après exposition aux polluants une augmentation et/ou réduction de la GST dans divers organismes aquatiques (Geracitanon *et al.*, 2004 ; Ait alla *et al.*, 2006). Cet effet pourrait être traduit par une mise en place du processus de détoxification qui est une forme de défense contre le pesticide (insecticide) (Oruc et Uner, 2000).

2.4. Effet sur l'activité de la CAT

Les catalases (CAT) sont des enzymes péroxysoniales dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatifs au niveau des membranes cellulaires, comme certains pesticides (**Livingstone et al., 1993**)

Notre étude montre une augmentation de l'activité CAT chez les escargots traités par l'hymexazole par rapport aux témoins. Cette augmentation s'accorde avec les travaux de (**Cossu et al., 1997**) qui montre une augmentation de l'activité CAT a déjà été relevée chez d'autres organismes comme les poissons et les bivalves exposés à des polluants organiques (HAP, PCB, pesticides et engrais chimiques). Cet effet pourrait être traduit par la réponse adaptative au stress oxydatif entraîné par les pesticides et la destruction de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la SOD et la CAT améliore la toxicité induite par le chlorpyrifos de la même façon que par des substances capables de piéger le radical hydroxyle ($\bullet OH$) (**Sivajothi et al., 2008**).

Des études récentes ont démontré que les composés chimiques des huiles essentielles de l'écorce d'orange jouent un rôle important comme système de défense contre les ERO, et leur activité antioxydante se produit par plusieurs mécanismes: l'augmentation de l'activité antioxydante de la superoxyde-dismutase et de la catalase et par la modulation de l'expression de gènes de superoxyde-dismutase, catalase et de glutathion peroxydase (système antioxydant: GPx, GST, CAT et SOD). (**Tripoli et al., 2007**). Diverses études expérimentales ont montré l'existence d'une relation importante entre les huiles essentielles de l'écorce d'orange et la diminution de l'oxydation de taux des lipoprotéines de faible densité LDL dans le sang (**Gonzalez-Molina et al. 2010**).

*Conclusion et
perspectives*



Conclusion Et perspectives

Conclusion

L'objectif de la présente étude était d'estimer l'intoxication par l'hymexazole chez *Helix asperca* et d'évaluer l'éventuel effet protecteur des huiles essentielles extraites à partir de l'écorce d'orange. Les résultats obtenus permettent de conclure que :

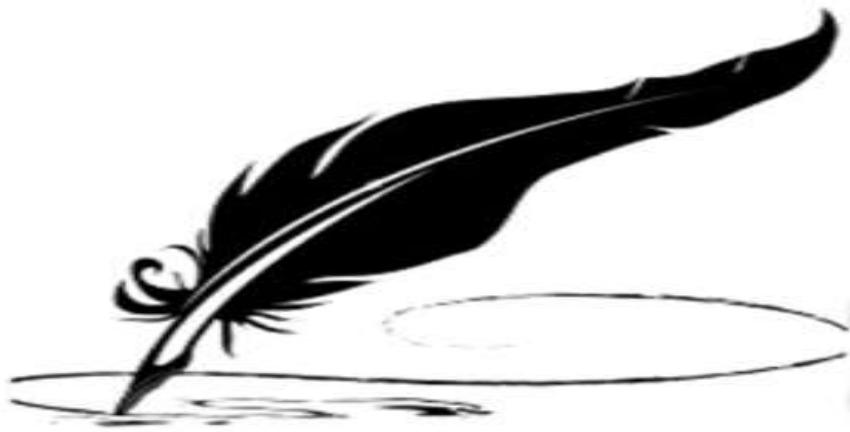
- Les taux des métabolites biochimiques au niveau hépatopancréatique ont été perturbés notamment une diminution des taux de lipides et une augmentation des taux de glucides par rapport aux témoins.
- L'activité enzymatique de glutathion peroxydase est augmentée sous l'effet de l'hymexazole. De même, et l'intoxication par l'HZ est à l'origine d'une augmentation de l'activité de GST et CAT.
- Le taux du marqueur de peroxydation lipidique (MDA) a enregistré une augmentation associée à une diminution de la teneur en GSH.
- Par ailleurs, les huiles essentielles de l'écorce d'orange préviennent dans la plupart des cas à corriger les paramètres perturbés et, par conséquent, neutraliser les effets toxiques de l'Hymexazole.

Nos résultats permettent de proposer les huiles essentielles d'Orange dans quelconque schéma thérapeutique de l'intoxication par l'Hymexazole sans risque d'effet secondaires.

Afin d'approfondir les résultats dans la présente étude, il semble approprié de conduire des recherches futures axées notamment sur :

- Evaluer les effets d'une exposition chronique aux huiles essentielles d'Orange sur une période plus longue afin de mettre en évidence leurs effets toxiques.
- Conduire cette recherche sur d'autres modèles biologiques.
- Approfondir l'étude par des techniques plus complètes au niveau subcellulaire et moléculaire.

*Références
bibliographiques*



Référence bibliographiques

A

- **ACTA, 2005.** Index Phytosanitaire ACTA 2005. 41ème éd. Paris. *Association de Coordination Technique Agricole*. France. 820pp.
- **Ando M., Nakamura T., Nakagawa M.1974.**Metabolism of Hymexazol, 3-Hydroxy-5-methylisoxazole, in the Rats.*Agr. Bioi. Chem.* 38:12. 2451 – 2456pp.
- **Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 2007.** Rapport d'évaluation du l'hymexazol - ERC2007-01. Santé Canada, CANADA. 105pp.
- **Ando M., Nakamura T., Nakagawa M.1974.**Metabolism of Hymexazol, 3-Hydroxy-5-methylisoxazole, in the Rats. *Agr. Bioi. Chem.* 38:12. 2451 - 2456pp.
- **Andersen H R.,Vinggaard A M.,Rasmussen T H.2002.**Effects of currently used pesticide in assays for estrogenity androgenicity, and aromatase activity in vitro.*Toxicol .Appl . Pharmacol.* 179:1-12 pp.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A.2007.**Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydesdismutases:rôle dans les maladies rhumatismalesReactiveoxygenspecies and superoxidedismutases: role in joint diseases *.Revue du Rhumatisme.*74 : 636–643 pp.
- **Ait Alla A., Mouneyrac C., Moukrim A &Pellerin J. 2006.** Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the OuedSouss estuary (Bay of Agadir, Morocco).*Comp.Biochem.Physiol.C.*143:23–29pp.
- **APIA (Agence de Promotion des Investissements Agricoles). 2004.** L'élevage d'escargots -Partie monographique. Ministère de l'Agriculture, de l'Environnement et des Ressources Hydrauliques. 20 :108-209 pp.
- **Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V.,Stanescu U. 2010.**The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA.*58:46-54pp.
- **Aupinel P., Daguzan J. 1989.** Étude du rôle de la photopériode sur l'activité métabolique des jeunes escargots « petits-gris » (*Helix aspersa* Müller) et mise en évidence de l'existence d'une phase photosensible.*Haliothis.* 19: 47-55pp.
- **Akoby W B., Habig W H. 1980.**Glutathiontransferase. In Jakoby,W. B Enzymatic basis of detoxification. Academic press.New York. 2:63- 94 pp.

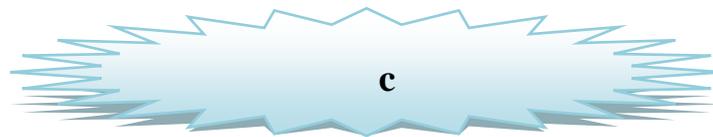
Référence bibliographiques

B

- Boucenna M. 2010.**Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les aciéries 1 et 2 du complexe sidérurgique d'EL-Hadjar sur un modèle bioaccumulateur *Helix aspersa*. Mémoire de magister. Université Badji Mokhtar. Annaba. 74 pp.
- Bradford M. M. A.1976.**Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254pp.
- Beaudeau J.L., Peynet J., Bonnefont-Rousselot D., Therond P., Delattre J., Legrand A.2006.**Stress oxydant Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote Implication dans la transcription et la régulation des gènes. *Ann. Pharm. Fr.*64 : 373-381pp.
- Barouki R. 2006.** Stress oxydant et vieillissement. *M/S.* 20: 266-272pp.
- Baudin B.2006.**Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires .2(1) :43-52pp.
- Belaïch R., Boujraf S.2016** .Facteurs inflammatoires et stress oxydantchez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques .*Médecine .des maladies. Métaboliques.* 10 : 1 :38-42pp.
- Belkheiri N.2010.**Dérivés phénoliques à activité antiathérogènes .Thèse de 3^{ème} cycle.université de paulsabatie Toulouse, France. 244 pages.
- Bachès B., Bachès M. 2011.** Agrumes, nouvelle édition ULMER. 20 :7- 127 pp.
- Baser K H C., Buchbauer G. 2010.**Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC.* United States of America. 30:808-994pp.
- Bellono E., Camusso L., Stefani A. 1971.** Encyclopédie du monde animale (Poissons – Invertébrés). Tome III. Librairie Aristide Quillait. Paris e(VII).20 :421-465pp.
- Benahmed F. 2010.** Stress oxydatif chez des plantules de *Vicia faba* I, soumises a différentes contraintes abiotiques (stress salin, stress hydrique et stress aux métaux lourds). Mémoire de magister en biologie : biochimie végétale appliquée. Université d'Oran Es-Sénia .10:1-16pp.
- Bénédicte ., Michel B. 2011.** Agrumes comment les choisir ET cultiver facilement. Les Editions Eugen Ulmer. Paris.20 :127 pp.
- Bernadet M. 1983.***Phyto-aromathérapie pratique, usage thérapeutique des plantes médicinales et huiles essentielles*, Eds. Dangles, France.30 : 203-384 pp.

Référence bibliographiques

- **Besombas C .2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat.* Université de La Rochelle.10 : 208- 289 pp.
- **Bonnet J.G., Aupinel P., Vrillon J. L. 1990.** L'escargot *Helix aspersa*, biologie-élevage ; Institut National de l'Agronomi, paris.20 :102-124pp.
- **Bousbia N. 2011.** *Extraction des huiles essentielles riches en anti- oxydants à partir de produits naturels et de co - produits agroalimentaires.* Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse et Ecole Nationale Supérieure Agronomique. p.89
- **Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.20 :80- 91pp.
- **Buchbauer G. 2010.** Biological Activities of Essential Oils, In Baser K.H.C. et Buchbauer G. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications.* Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America.66:235 – 280pp.
- **Byung K.Y.,GukN.k ., Yong I.J., Hun J.,Pradeep M., chi-hyu. 2008.** Hypolycemic effects of exo-biopolymers produced by Five Different medicinal mushrooms in STZ-induced diabetic Kat-the Kaream society of mycology.16: 45-49pp.



- Chavan V.U., Melinkeri R.R. 2013.** Study of protein carbonyl group, nitric oxide and MDA (index of lipid peroxidation) as biomarkers of oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Natl J Community Med.* 4(2):294-9 pp.
- Chaudhary A K., Reddy G R., Blair I A., and Marnett L J. 1996.** Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: *Carcinogenesis.* 17:1167-1170pp.
- **Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charnay M.P. Coquet Y. 2005.** Les pesticides dans le sol, Conséquence agronomique et environnementales. ed. France Agricole. 637 pp
- **Colin F., 2000.** Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires. Cas de l'Atrazine dans le bassin versant de Sousson (Gers, France). Unité mixte Cemagref-ENGREF. Structure des systèmes spatiaux. 233 p.

Référence bibliographiques

- **CEC, 2002.** Making the environment Healthier for Our Kids - An overview of environmental challenges to the health of North America's children.
- **CEC, 2003.** A european environment and health strategy. *Commission of the European community.*
- **Carp S.A., Kobel W., Doe J. 2000.** Health risk of pesticide: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews.*3:1:1-25pp.
- **Carson C. F. et Hammer K. A. 2011.** Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.* United Kingdom: John Wiley et Sons Ltd.89: 204-238pp.
- **Charrier M., Fonty G., Gaillard-Martinie B., Ainouche K. et Andant G.2006.** Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biological Research.* 39 :4: 669-681pp.
- **Chase R. 1986.** Lessons from Snail Tentacles, *Chemical Senses.* 11: 4: 411-426pp.
- **Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A., Vasseur P.1997.** Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Uniotumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in fieldstudies. *Ecotoxicology and Environmental Safet.*38:122-131pp.



D

- **Duchateau G., Florkin.1959.** For treahalosemie of insects and its signification. *Arch.Insect. Physiol. Biochem.* 67:306-314pp.
- **Defraigne d J O., Pincemail J. 2008.** Stress oxydant et antioxydants :mythes et réalités. *Rev .Med. Liège.*63: 10-19pp.
- **Decourtye A., Devillers J., Cluzeau S.2004.** Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental .Safety .*57:3: 410-419pp.
- **Daguzan J. 1981.** Contribution à l'élevage de l'escargot petit-gris ; *Hlix aspersa* Muller (mollusque gastéropode pulmoné stylommatophor). La reproduction et éclosion des jeunes en bâtiment et en condition thermo hygrométrique contrôlées. *Ann. Zootechnie.* 30 : 249- 272pp.

Référence bibliographiques

- **Del Rio, J.A., Fuster M. D., Gomez P., Porrás I., Garcia-Lidon A.,Ortuno A. 2004.** *Citrus limon*: a source of flavonoid of pharmaceutical interest. *Food chem.*84:457-461pp.
- **Désir CH. et villeneuve F. 1962.** L'escargot petit gris, livre de zoologie édition Bordas, paris.16 :62-68pp.



E

- Evans J. L., Goldfine I. D., Maddux B. A., Grodsky G. M.2002.**Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.*23: 599-622 pp.
- **European Food Safety Authority. 2010.** Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance hymexazol. *EFSA .Journal .*8:8:1653 -1663 pp.



F

- Favier A. 2003.** Le stress oxydant. *L'actualité Chimique.* 24: 108-115.pp
- Favier A. 2011.** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité.Chimique.* 65 (4) 108-115pp.
- Favier A. 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques.* *L'actualité Chimique.*108-115 pp.
- **Fillatre Y. 2011.** Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de doctorat, spécialité chimie analytique. Université ANGERS, Ecole doctorale : Matières, molécules, matériaux des pays de Loire. 267 pp.
- **Fen W., Feng G., Minbo L.B., Huihui Y., Yongping H., Jianwen L. 2009.** Oxidative stress contributes to pesticides toxicity in human embryonic kidney cells *Toxicology in Vitro* Elsevier.20:120-180pp.

Référence bibliographiques

- **Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. 2010.** *Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions*. Ed. Office des publications universitaires, Alger. 10 :157-190pp.



- **Goth L.1991 a.** Serum catalase: Reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clin Chem.*37:12: 2043-2047pp.

- **Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J.1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol* 18:3: 545pp.

-**Goudable J., Favier A. 1997.** Radicaux libres oxygènes et antioxydants. *Nutr. Clin. Mdtabol.* 11:115-120pp.

-**Ghafourifar P., Cadenas E. 2005.** Mitochondrial nitricoxidesynthase. *Trends PharmacolSci.* 26: 190-5 pp.

- **George S. g. 1994.** Enzymology and molecular biology of phase 2 xenobiotic conjugation enzymes in fish. In Malins, D.C., Ostrander, G. K. *Aquatic toxicology, molecular Biochem and cell. Perspect.* Lewis, Boca Raton, FL. 16:37- 85pp.

- **Geracitano L. A., Luquet D., Monserrat J. M., Bianchini A. 2004.** Histological and morphological alterations induced by copper exposure in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Mar. Environ. Res.*58: 263–267pp.

- **Geyu L., Yuepu P., Lihong Y., Ran L., Bing Y., Yaoyao S., Yanfen L. 2014.** Influence of Different pesticides on Hepatic and Renal Functions in Rats with Correlation to Oxidative Stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A: Current Issues.* pp.72:11-12pp.

-**Ghosh M., Bandyopadhyay M., Mukherjee A. 2010.** toxicity of pesticide: plant and human lymphocytes. *Chemosphere.* 8:1253-1262pp.

- **Girard G. 2010.** Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco -Dentaires d'hier à au jour d'hui : Mise au point d'un modèle préclinique de lésion buccale de type aphte pour tester les effets thérapeutiques des huiles essentielles. *Thèse de doctorat en pharmacie.* Université Henri Poincaré – Nancy. 20 :60-100pp.

- **Gomot L., Enée J. 1980.** Biologie de la reproduction de l'escargot *Helix aspersa* Muller: la phase de croissance et de différenciation sexuelle. *Atti. Accad. Fisiocrit sienna.* 37: 73-85pp.

Référence bibliographiques

- **Gonzalez-molina E., Dominguez-perles R., Moreno D.A., Garcia-viguera.**
2010. Natural bioactive compounds of *citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51: 327-345pp.
- **Goris A. 1967.** *Manuel de botanique*. Ed. Clin. 10: 265-268 pp.
- **Grégoire C. 1961.** Structure of Conchiolin Cases of the Prisms in *Mytilus edulis* Linné. The Rockefeller University Press. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 9: 395-400pp.



- **Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. 1974.** Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139pp.
- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. 2007.** Le stress oxidant. *Rev. Med. Liege*. 62: 10: 628-638pp.
- **Halliwell B., Gutteridge J. 1997.** Free radicals in biology and medicine: 187pp.
- **Hoang T.C., Rogevich E.C., Rand G.M., Gardinali P.R., Frakes R.A., Bargar T.A., 2008.** Copper desorption in flooded agricultural soils and toxicity to the Florida apple snail (*Pomacea paludosa*): Implications in Everglades restoration. *Environmental Pollution*. 154 (2): 338-347.
- **Hodgeson D A., Vyverman W., Verleyen E., Sabbe k., Leavitt P R., Taton A., Squier A H., Sánchez-Bayo F., Goka K., 2004.** Influence of light in acute toxicity bioassays of imidacloprid and zinc pyriithione to zooplankton crustaceans. *Aquatic Toxicology*. 78: 262-71pp.
- **Hill I.R. 1989.** Aquatic organisms and pyrethroids. *Pesticides Sciences*. 27: 429-465pp.
- **Habig W. H., Pabst M. J & Jakoby W. B., 1974.** Gluthatione-S - Transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. biol. chem.* 249: 7130- 7139pp.
- **Haineault S .2011.** Les Vertus Thérapeutiques des agrumes, 3^{ème} édition Quebecor. 10:130-152 pp.
- **Halliwell, B. (1993).** Dietary polyphénol: good, bad, or different for your health?, *Cardiovasc Res*. 73:2:47-34pp.
- **Hamed S.S., Abdelmeguid N.E., Essawy A.E., Radwan M.A., Hegazy A.E. 2007.** Histological and Ultrastructural Changes Induced by Two Carbamate Molluscides on the digestive Gland of *Eobania vermiculata*. *Journal of Biological Sciences*. 7:6: 1017-1037pp.

Référence bibliographiques

- **Haubruge E., Amichot M. 1998.** Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. France. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*2 : 3: 161-174pp.

- **Hellal Z. 2011.** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.10 : 1-78pp.



I

- **Ineris, 2005.** Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation. Institut national de l'environnement industriel et des risques. [consulté le, 04/05/2011].

- **Iglesias J., Castillejo J. 1998.** Field observations on feeding of the land snail *Helix aspersa* Müller. Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain. *Oxford Journals, Life Sciences, Journal of Molluscan Studies*.65: 411-423.pp.



J

- **Jean-Marc R., Roland P., François J. M. 1992.** Zoologie les protozoaires aux Metazoaires. Ellipses.20 :107- 224 pp.

- **Jumel A., Lagadic L. 2000.** Metabolism of polysaccharides in *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) exposed to nonylphenoldodecylethoxylate. *Third SETAC World Congress. Global Environmental Issues in the 21th Century: Problems, Causes and Solutions*. Brighton, Angleterre.14:33-90pp.

Référence bibliographiques

K

- Kehrer J. P.1993.** Free radicals as mediators of tissue injury and disease . *Crit. Rev. Toxicol.* 23: 21-48 pp.
- **Keely B J.2004.**Environmental factors influencing the pigment composition of in situ benthic microbial communities in east .*Antarctic.microbial. ecology.*37:247-263 pp
- **Kimball D.A .1999.**Description of citrus fruits. In: "citrus processing: A complete guide".Ed. An Aspen publication.10: 7-35 pp.

L

- Laurent C.2005.**Rôle du stress oxydatif dans le développement des effets cellulaires radio-induits au niveau cutané :application aux irradiations localisées accidentelles.Thèse de doctorat de l'Université de Versailles .*Saint.Quentin.en.Yvelines.*1-226pp.
- Lederer W.H.1983.**R.D.Fensterheim Arsenic Industrial.biomedical.environmental perspectives. 1er edition.*Van. Nostrond .Reinbold.*New York.
- **Lesley B. 1996.***Plantes médicinales et aromatiques.* Ed. Lavoisier. Paris.20: 58-61pp.
- **Li J.J., Hartono D., Ong C.N., Bay B.H., Yung L.Y. 2010.** Autophagy and oxidative stress associated with pesticides.*Biomaterials.* 31: 5996-6003pp.
- Livingstone D.R., Lemaire P., Matthews A., Peters L.D., Bucke D., Law R.J. 1993.**Prooxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses.16:106-204pp.
- **Loussert R. 1989.** Les agrumes 2. *Production Edition Lavoisier.* Paris.30 :104-157 pp.
- **Lucchesi M.E. 2005.** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. *Thèse de doctorat* en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.20 :1-143pp.

Référence bibliographiques

M

- Migdal C., Serres M.2011.**Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant .Médecine/sciences.27 :405-412pp.
- Morel Y., BaroukiR .1999.**Repression of gene expression by oxidative stress.Biochem. 3: 481-96pp.
- Marcheterre L., Choudhry G., Webster G., 1988.**Environmental Photochemistry of Herbicides.Reviews of Environmental Contaminations and Toxicology. 103: 61-126.
- **Manthey J.A., Guthrie N., Grohmann K.2001.**Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*.8: 135-153pp.

O

- Omoniwa S. O., Muhammad O .N., Omoniwa P. B., and Usman A. L. 2014.**Effect of Leaf Essential Oil of Citrus sinensis on Haematological Parameters of Alloxan-induced Diabetic Rats. *Article no. IBRR .2:3*: 113-120pp.
- **Odendaal J.P., Reinecke A.J. 2003.**Quantifying histopathological alterations in the hepatopancreas of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a biomarker of cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.56:2: 319-325pp.
- **OFSP. 2009.** Office fédéral de la santé publique. Les huiles essentielles. Ed. OFSP, Avril 2009. Suisse. 5 pp
- **Olle M., Bender I. 2010.**The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*.8: 687-696pp.
- **Ouelbani R., Bensari S., Mouas T.N., Douadi K.2016.**Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*.194: 196-218pp.
- Oparae S.2002.**Oxidative stress, micronutriments, diabetes mellitus and its complications. *Jof the Royal Soc for the promotion of Health*.122: 28-34pp.

Référence bibliographiques

P

- **Periquet A, 1986.** toxicologies des residus de pesticides. In R deracge(Ed). 1 er edition, technichnique.*toxicologie. et securité .des aliments.* Documentation Paris
- **Pimentel D.1995.** Amounts of pesticides reaching target pest: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics.* 8: 17-29.
- Padmaja J.R., Rao M.B. 1994.**Effect of an organochlorine pesticide on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail, *Bellammyadissimillis* (Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 53: 142-148pp.
- **Padrini F., Lucheroni M.T. 1996.***Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energétiques avec Plus de100 Photographies.* Ed. De Vecchi, Paris.11: 15- 61pp.
- **Polese J. M. 2008.** la culture des agrumes .édition artémis. 8 :1-94 pp.
- Pastre J. 2005.** Intérêt de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat, Ecolenationalevétérinaire, Toulouse. 42-55pp.

Q

- **Quibik C. 2007.** Schéma en coupe de l'anatomie d'un escargot. Dans Wikipédia. 16 :12-90pp.

R

- **Regoli F., Pricipato G. 1995.**Glutathione.glutathione-dependant and antioxidantenzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology .* 31: 143-164pp.

Référence bibliographiques

- **Radwan M.A., Salama A.K. 2008.** Thiodicarb biotransformation to methyl, toxicities and acetylcholinesterase inhibition in the land snail, *Helix aspersa* (Muller). *The Journal of Pest Control and Environmental Science*. 7: 59-70pp.
- **Rakhi A., Sudhir K., Goelb J., Raj B. 2010.** Detoxification and antioxidant effects of citrus in rats experimentally exposed to mercury. *Journal of Applied Toxicology*. 30: 457-468pp.
- **Robert A., Lobstein A. 2005.** *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 30 : 212-522pp.
- **Roux D. 2008.** *Conseil en aromathérapie*. 2ème Ed. Pro-Officina. 16: 122-187 pp.
- **Ribeiro M.A., Bernardo –Gil M.G., Esquivel M.M. 2001.** *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, *Journal of Supercritical Fluids*. 21 : 51 – 60 pp.



- **Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyneck C., Newhall A., Freidman L. 1966.** A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt. Biochem.* 19: 415-428pp.
- **Sakho N. 2013.** Coquilles de Petits-gris. Dans *Miss Achatine et ses coquilles*. 8 : 12-45pp.
- **Sandrine et al, 2003.** contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit gris (*Helix aspersa*) reproduction Expérimentale, thèse de doctorat, université Paul-Sabatier de Toulouse. 10 : 104-166pp.
- **Sivajothi V., Dey A., Jayakar B., Raj Kapoor B. 2008.** Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effect of *Phyllanthus rheedii* on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 7: 1: 53 - 59pp.
- **Sies H. 1991.** Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69: 8-10pp.

Référence bibliographiques

T

- **Tahar W., Bordjiba O., Mezedjri L. 2017.** Impact of two Pesticides on soil Physicochemical Characteristics and the Biological Activity. *JCPS* .10: 2:803-808 pp.
- **Tripoli E., Guardia M., Gimmanco S., DiMajo D., Giammanco M. 2007.** Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties *Food .Chemistry*. 104: 466-479pp.
- Tessier F., Marconnet P. 1995.** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice .*Science et Sports* .10.1-13pp.

U

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

V

- **Van Der Werf H., 1996.** Assessing the impact on the environment. Agriculture, Ecosystems and Environment. 60: 81-96pp.

W

- **Weckberker G., Cory G. 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells in vitro. *Cancer letters* 40: 257-264pp.
- **Wolfe N., Mingelgrin U., Miller G., 1990.** Abiotic transformations in : Water, sediments and soils. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA. 433 pp.
- **Wallace C. 2008.** Mitochondria as Chi. *Genetics*. 179: 727-735pp.

Référence bibliographiques

- Wu J., Liu W., Xue C., Zhou S., Lan F., Bi L., Xu H., Yang X., Zeng F. D.

2009. Toxicity and penetration of pesticides in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. Toxicol Lett. 191: 1-8.pp.



Y

- Ypema H. 2003. Fongicides, hymexazol, Encyclopedia of agrochemical John Wiley & Sons, Inc, Publication. V.S.A. 572-537 pp.



Z

- Zaldibar B., Cancio I., Soto M., Marigomez I. 2008. Changes in cell-type composition in digestive gland of slugs and its influence in biomarkers following transplantation. 122:19-80pp.

- Zhou H., Beevers C.S, Huang S. 2011. Targets of citrus. Current drug targets. 12:3: 332-347pp.

Webographie

IPCS INCHEM (1990) Deltamethrin. Environmental health criteria EHC 97. WHO.
Consultable sur le site www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc97.htm/

Les Annexes



Les Annexes

Annexe 01 : Dosage des protéines.

Tableau 09 : La réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines au niveaux de l'hépatopancreas.

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA(μl)	00	20	40	60	80	100
Eau distillée (μl)	100	80	60	40	20	00
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

Tableau 10 : Dosage des protéines : résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

Concentration de BSA	20	40	60	80	100
Absorbance(DO)	0,868	1,243	1,553	1,871	1,954

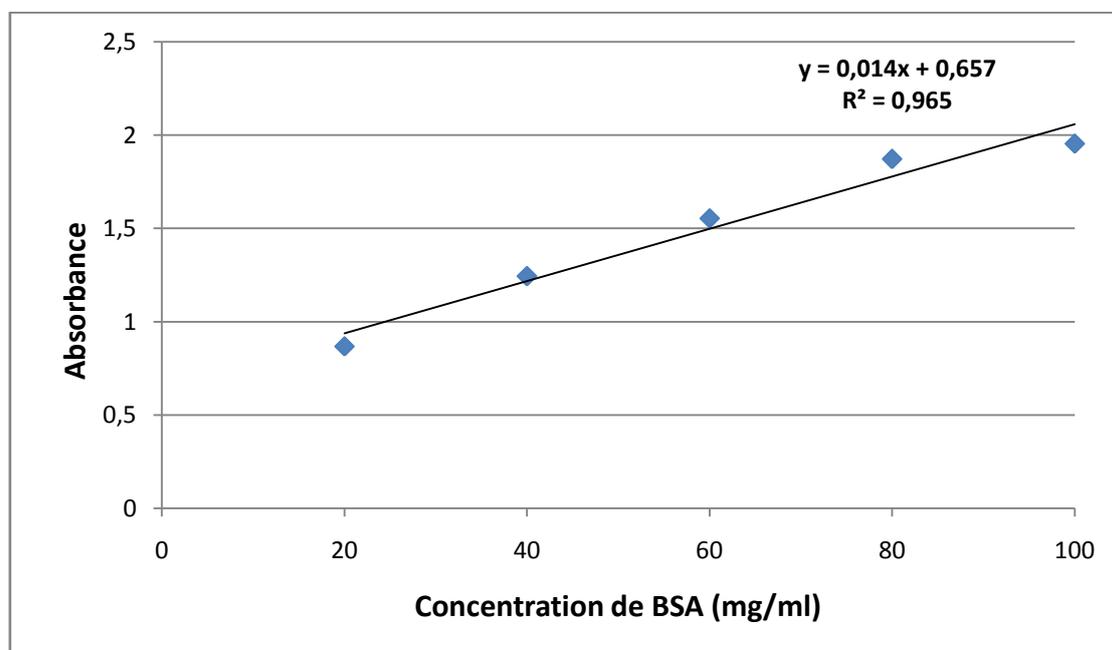


Figure 31. Droite de régression expérimentant les absorbances à 595 nm en fonction de concentration BSA (mg/l) (R^2 : coefficient de détermination).

Les Annexes

Annexe 02: Dosage des lipides.

Tableau 11 : La réalisation de la gamme d'étalonnage pour les lipides aux niveaux de l'hépatopancréas.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipide (µl)	00	20	40	60	80	100
Solvant (éther /chloroforme) (1V/1V) ml	100	80	60	40	20	00
Vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Tableau 12 : Dosage des lipides : résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

Concentration de solution de lipides (mg/ml)	20	40	60	80	100
Absorbance (DO)	0,016	0,026	0,08	0,098	0,12

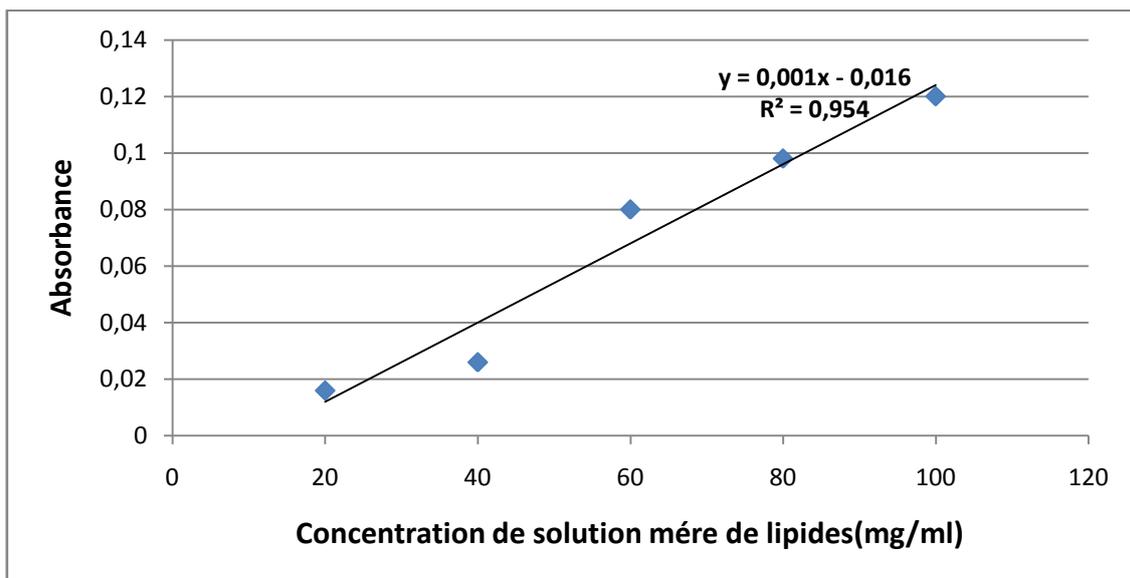


Figure 32. Droite de régression exprimant les absorbances à 530 nm en fonction de concentration de solution mère de lipides (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination).

Les Annexes

Annexe 03: Dosage des glucides.

Tableau 13 : La réalisation de la gamme d'étalonnage pour les glucides aux niveaux de l'hépatopancréas.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose (μl)	00	20	40	60	80	100
Eau distillée (μl)	100	80	60	40	20	00
Réactif d'Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

Tableau 14: Dosage des glucides: résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

Concentration de solution glucose (mg/ml)		20	40	60	80	100
Absorbance (DO)		0,344	0,505	0,873	1,136	1,434

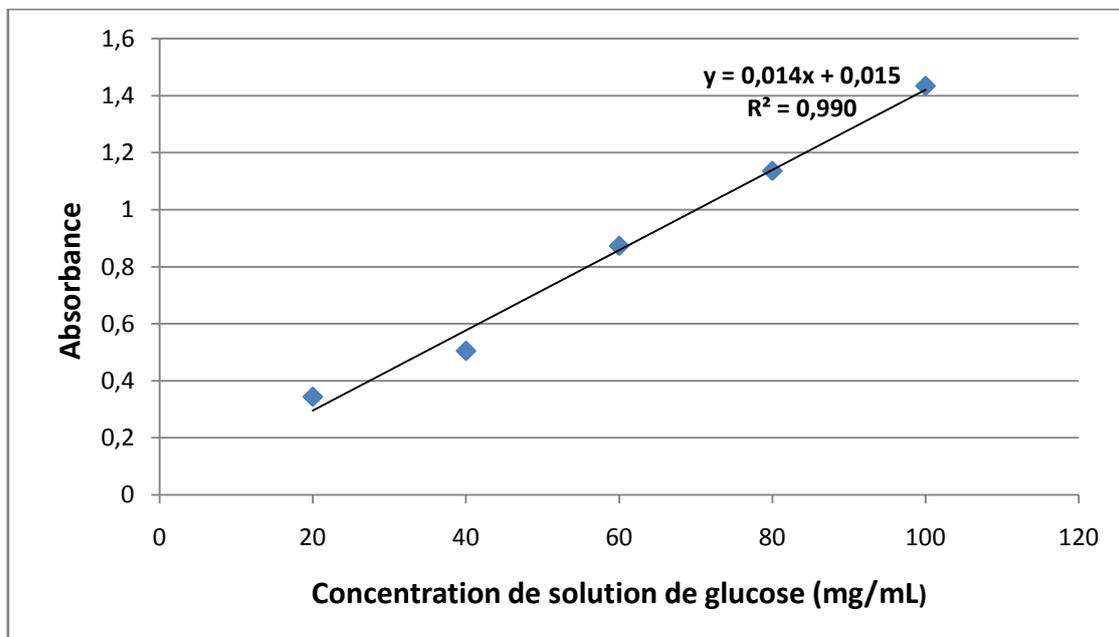


Figure 33. Droite de régression exprimant les absorbances à 620 nm en fonction de concentration de solution de glucose (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination)

Les Annexes

Annexe 04 : Variation du taux moyen (mg/L) des paramètres biochimiques (Protéines, lipides et glucides) au niveau de l'hépatopancréaschez les escargots témoins et les escargots traités.

Paramètre	Lots expérimentaux			
	Témoin	HEO	Hymexazol	HEO+ Hymexazol
Taux des protéines	47,87 ^a ± 11,24	45,10 ^a ± 4,13	45,45 ^a ± 4,23	45,67 ^a ± 8,96
Taux des lipides	104,68 ^a ±39,51	112,33 ^a ±104,07	56,02 ^a ±31,85	100,64 ^a ±63,46
Taux des glucides	84,39 ^b ±21,22	70,02 ^b ±24,39	133,19 ^a ±54,62	137,44 ^a ±22,16

^{a,b} : les moyenne affectées de lettres différentes dans la même ligne sont statistiquement différente (p<0,05).

Annexe05. Variation du taux moyen (mg/L) des paramètres du stress oxydant au niveau au niveau de l'hépatopancréaschez les escargots témoins et traités.

Paramètre (unité)	Lots expérimentaux			
	Témoin	HEO	Hymexazol	HEO+ Hymexazol
Taux du MDA (10 ⁻⁷ μM/mg de prot.)	3,82 ^a ± 1,12	3,82 ^a ±2,00	4,84 ^a ± 1,91	3,75 ^a ± 1,92
Taux de GSH (10 ⁻⁸ μM/mg de prot.)	1,25 ^a ±6,22	1,40 ^a ±8,11	5,78 ^a ±1,53	1,21 ^a ±5,28
Taux GPx (μM/mg de prot.)	0,0034 ^b ± 0,00025	0,0043 ^a ±0,00044	0,0045 ^a ±0,000042	0,0035 ^b ±0,00012
Taux de GST (μM/mg de prot.)	0,067 ^a ±0,038	0,055 ^a ±0,030	0,123 ^a ± 0,0545	0,092 ^a ±0,082
Taux de Catalase (μM/mg de prot.)	1,924 ^b ±1,009	1,852 ^b ±0,922	4,794 ^a ± 2,272	2,408 ^b ±1,087

^{a,b} : les moyenne affectées de lettres différentes dans la même ligne sont statistiquement différente (p<0,05).

