



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi -Tébessa-

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

Département : Biologie des Êtres Vivants

Laboratoire Eau et Environnement



THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT LMD

Spécialité : BIOLOGIE ANIMALE

Option : Physiologie Animale Appliquée à la Santé et l'Environnement

Thème

Impact des pratiques agricoles sur les organismes non visés, cas d'un gastéropode bioindicateur de pollution, *Helix vermiculata* (Müller, 1774).

Présentée par : M^{elle} Laila ATTIA

Membres de Jury :

| | | |
|-------------------------|--------------------------|--------------------|
| Pr. TINE-DJEBBAR Fouzia | U. Larbi Tébessi-Tébessa | Présidente |
| Pr. TINE Samir | U. Larbi Tébessi-Tébessa | Directeur de Thèse |
| Pr. SOLTANI Noureddine | U. Badji Mokhtar-Annaba | Examineur |
| Pr. LOUCIF Wahida | U. Badji Mokhtar-Annaba | Examinatrice |
| Dr. DJELLAB Sihem | U. Larbi Tébessi-Tébessa | Examinatrice |
| Pr. MEKAHLIA Med Nacer | U. Larbi Tébessi-Tébessa | Examineur |

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier le tout puissant, notre **DIEU**, le clément et le miséricordieux, de nous avoir donné la clair voyance et la persévérance, pour mener

En premier lieu, J'adresse aussi tous mes remerciements à **Monsieur Nouredine SOLTANI** (Professeur au Département de Biologie et Directeur du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Université d'Annaba) pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de me faire l'honneur de juger ce travail. Je lui adresse mes sincères remerciements ainsi que ma profonde gratitude.

C'est un devoir d'exprimer toute ma gratitude et une infinie reconnaissance à mon encadrant **Monsieur Samir TINE** (Professeur au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa). Il a su guider et diriger avec clairvoyance et autorité scientifique, la réalisation de cette thèse. Merci pour ses encouragements, ses conseils et sa patience.

J'adresse aussi tous mes remerciements à **Madame Fouzia TINE** (Professeur au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa). Je lui suis également reconnaissante pour le temps qu'elle m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Mes plus vifs remerciements et toute ma considération à **Madame Wahida AYAD-LOUCIF** (Professeur à l'Université d'Annaba) qui a bien voulu accepter d'être membre de ce même jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Toute ma considération à l'égard de **Madame DJELLAB Sihem** (Maître de Conférences au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa) qui m'a fait l'honneur de juger le présent travail.

Mes plus vifs remerciements vont à **Monsieur MEKAHLIA Med Nacer** (Professeur au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa) qui a bien voulu accepter d'être membre du jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Enfin, je tiens à témoigner mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette étude et à l'élaboration de ce modeste travail.

Dédicace

Je remercie le Dieu pour la force et la patience qui m'a donné

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents

*Dont le mérite, les sacrifices et les qualités humaines m'ont permis de vivre ce
jour.*

A mes Frères et mes sœurs

A mes grands-parents

A mes oncles et mes tantes

Mes amies : Yasmine, Ouafa, Fatima et Belkisse

A mes chers enseignants et enseignantes....

A mes étudiants...

Laila

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE

| Titre | Page |
|---|-----------|
| I. INTRODUCTION | 01 |
| II. MATERIEL ET METHODES | 06 |
| 2.1. Présentation de l'espèce <i>Helix vermiculata</i> | 06 |
| 2.2. Méthode d'échantillonnage | 07 |
| 2.3. Méthode d'élevage | 08 |
| 2.4. Présentation des traitements | 09 |
| 2.4.1. Decis | 09 |
| 2.4.2. Zoom | 10 |
| 2.4.3. Weafert | 10 |
| 2.5. Traitement | 10 |
| 2.6. Dissection de l'escargot et prélèvement des organes | 11 |
| 2.7. Biométrie | 11 |
| 2.8. Extraction et dosage des métabolites | 12 |
| 2.8.1. Dosage des glucides totaux | 13 |
| 2.8.2. Dosage des protéines totales | 13 |
| 2.8.3. Dosage des lipides totaux | 13 |
| 2.9. Extraction et dosage des biomarqueurs du stress oxydatif ¹⁴ | 14 |
| 2.9.1. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) | 14 |
| 2.9.2. Dosage de la glutathion-peroxydase (GPx) | 14 |
| 2.9.3. Dosage des glutathion S-transférases (GSTs) | 15 |
| 2.9.4. Extraction et dosage de la catalase | 15 |
| 2.10. Extraction et dosage de la vitellogénine | 15 |
| 2.11. Histopathologie | 16 |
| 2.11.1. Fixation | 16 |
| 2.11.2. Inclusion | 17 |
| 2.11.3. Coupe | 17 |
| 2.11.4. Coloration | 18 |
| 2.11.5. Montage | 18 |
| 2.11.6. Observation | 19 |
| 2.12. Analyse des résidus des pesticides par HPLC | 19 |
| 2.12.1. Extraction de la phase liquide | 19 |
| 2.12.2. Conditions d'analyse | 19 |
| 2.13. Analyse des résidus de l'engrais par le FRx | 21 |
| 2.13.1. Préparation de l'échantillon | 21 |
| 2.13.2. Conditions d'analyse | 23 |
| 2.14. Analyses statistiques | 23 |
| III. RESULTATS | 24 |
| 3.1. Effets sur le comportement | 24 |
| 3.2. Mortalité des escargots | 24 |
| 3.3. Effet sur la croissance pondérale et le diamètre de la coquille | 25 |
| 3.4. Effet sur la composition biochimique | 26 |
| 3.4.1. Effet du Decis | 27 |
| 3.4.2. Effet du Zoom | 27 |
| 3.4.3. Effet du Weafert | 28 |
| 3.4.4. Efficacité comparée des traitements sur la composition biochimique | 29 |
| 3.4.4.1. Taux de protéines | 29 |
| 3.4.4.2. Taux de glucides | 30 |
| 3.4.4.3. Taux de lipides | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5. Effet sur les biomarqueurs | 32 |
| 3.5.1. Effet sur l'activité de la lactate déshydrogénase | 32 |
| 3.5.2. Effet sur l'activité de la glutathion peroxydase | 34 |
| 3.5.3. Effet sur l'activité de la catalase | 36 |
| 3.5.4. Effet sur l'activité des glutathion-S-transférases | 38 |
| 3.6. Effet sur la vitellogénine | 40 |
| 3.7. Effet sur la structure histopathologique de l'hépatopancréas | 42 |
| 3.7.1. Effet du Decis | 42 |
| 3.7.2. Effet du Zoom | 43 |
| 3.7.3. Effet du Weatfert | 44 |
| 3.8. Bioaccumulation des résidus dans les tissus d'escargot | 45 |
| 3.8.1. Bioaccumulation du Decis | 46 |
| 3.8.2. Bioaccumulation du Zoom | 46 |
| 3.8.3. Bioaccumulation du Weatfert | 49 |
| IV. DISCUSSION | 50 |
| 4.1. Toxicité des traitements à l'égard des escargots | 50 |
| 4.2. Réponses comportementales des escargots | 51 |
| 4.3. Effet des traitements sur la croissance des escargots | 51 |
| 4.4. Effet des traitements sur la composition biochimique | 53 |
| 4.5. Effet des traitements sur la vitellogénine | 56 |
| 4.6. Effet des traitements sur les biomarqueurs du stress oxydatif | 57 |
| 4.6.1. Effet sur l'activité de la lactate déshydrogénase | 58 |
| 4.6.2. Effet sur l'activité de la glutathion peroxydase | 60 |
| 4.6.3. Effet sur l'activité des glutathion-S-transférases | 60 |
| 4.6.4. Effet sur l'activité de la catalase | 62 |
| 4.7. Histopathologie de l'hépatopancréas | 63 |
| 4.8. Bioaccumulation des traitements dans les tissus des escargots | 64 |
| V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 66 |
| VI. RESUME | 68 |
| Abstract | 69 |
| ملخص | 70 |
| VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 71 |
| ANNEXE | |
| PRODUCTION SCIENTIFIQUE | |

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

| N° | Titres | Pages |
|-------------------|---|-----------|
| Tableau 1 | Caractéristiques physico-chimiques du sol utilisé au cours de l'expérience. | 09 |
| Tableau 2 | Composants de l'engrais Weatfert et leurs concentrations. | 10 |
| Tableau 3 | Doses appliquées au cours de nos expérimentations. | 11 |
| Tableau 4 | Dosage des glucides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage. | 13 |
| Tableau 5 | Dosage des protéines totales dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage. | 13 |
| Tableau 6 | Dosage des lipides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage. | 14 |
| Tableau 7 | Conditions d'analyse des échantillons par HPLC. | 20 |
| Tableau 8 | Conditions d'analyse des échantillons par le FRx. | 23 |
| Tableau 9 | Mortalité des escargots juvéniles durant les trois mois de traitement par le Decis, le Zoom et le Weatfert avec les deux doses (Dose 1 et Dose 2). | 25 |
| Tableau 10 | Effets des traitements sur le taux d'inhibition de la masse moyenne et du diamètre moyen de la coquille des escargots juvéniles d' <i>H. vermiculata</i> . | 26 |
| Tableau 11 | Effet de l'insecticide, Decis sur le taux de protéines, de glucides et de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> au cours de différentes périodes de traitement ($m \pm \text{SEM}$; $n=3$ répétitions). | 27 |
| Tableau 12 | Effet de l'herbicide, Zoom sur le taux de protéines, de glucides et de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> au cours de différentes périodes de traitement ($m \pm \text{SEM}$; $n=3$ répétitions). | 28 |
| Tableau 13 | Effet de l'engrais, Weatfert sur le taux de protéines, de glucides et de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> au cours de différentes périodes de traitement ($m \pm \text{SEM}$; $n=3$ répétitions). | 29 |
| Tableau 14 | Effet du Decis, du Zoom et du Weatfert sur l'activité de la LDH ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) dans l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> ($m \pm \text{SEM}$; $n=3$). | 33 |
| Tableau 15 | Effet du Decis, du Zoom et du Weatfert sur l'activité de la glutathion peroxydase de l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$). | 35 |
| Tableau 16 | Effet du Decis, du Zoom et du Weatfert sur l'activité de la catalase dans l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$). | 37 |
| Tableau 17 | Effet du Decis, du Zoom et du Weatfert sur l'activité des glutathion-S-transférases dans l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$). | 39 |
| Tableau 18 | Effet du Decis, du Zoom et du Weatfert sur le taux de la vitellogénine chez <i>H. vermiculata</i> ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$). | 41 |
| Tableau 19 | Pourcentages massiques des éléments et de leurs oxydes dans le tissu d' <i>H. vermiculata</i> , témoin et traité après 3 mois de traitement avec l'engrais, le Weatfert. | 49 |

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

| N° | Titres | Pages |
|------------------|--|-----------|
| Figure 1 | Objectifs de la thèse. | 05 |
| Figure 2 | Aspect général de la coquille d' <i>H. vermiculata</i> (Photo personnelle). | 07 |
| Figure 3 | Photo satellitaire de la région de Bekkaria (www.earth.google.com). | 08 |
| Figure 4 | Présentation du site d'étude, cimetière de Bekkaria-Tébessa (Photo personnelle). | 08 |
| Figure 5 | Elevage d' <i>H. vermiculata</i> au laboratoire (Photos personnelles). | 09 |
| Figure 6 | Dissection des escargots et prélèvement des organes (Photo personnelle). | 11 |
| Figure 7 | Fixation de l'hépatopancréas dans le formol (30%) (Photo personnelle). | 16 |
| Figure 8 | Déshydratation et inclusion des échantillons de l'hépatopancréas (Photos personnelles). | 17 |
| Figure 9 | Coupe des blocs des échantillons à l'aide d'un microtome Leica (Photo personnelle). | 17 |
| Figure 10 | Coloration des lames préparées (Photo personnelle). | 18 |
| Figure 11 | Montage des lames préparées (Photo personnelle). | 18 |
| Figure 12 | Observation microscopique des coupes histologiques (Photo personnelle). | 19 |
| Figure 13 | Pesée et broyage du tissu dans l'acétonitrile (Photos personnelles). | 20 |
| Figure 14 | Séparation des deux phases : l'acétonitrile et le n-hexane (Photos personnelles). | 20 |
| Figure 15 | Evaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif (Photos personnelles). | 21 |
| Figure 16 | Analyse des échantillons par HPLC (Photos personnelles). | 21 |
| Figure 17 | Lyophilisation pendant 50 heures (Lyophilisateur CHRIST Alpha 2-4 plus) (Photos personnelles). | 22 |
| Figure 18 | Broyage des escargots lyophilisés à l'aide d'un mortier et un broyeur mécanique (FRITSCH Pulverisette 2), (Photo personnelle). | 22 |
| Figure 19 | Formation d'une pastille de 32 mm à l'aide d'une pastilleuse « Specac » (Photos personnelles). | 22 |
| Figure 20 | Analyse des pastilles par la Spectrométrie de Fluorescence X (Rigaku, ZSX Primus II) (Photos personnelles). | 23 |
| Figure 21 | Comportements des escargots suite aux traitements (Photos personnelles). | 24 |
| Figure 22 | Efficacité comparée des traitements (Dose 1 et Dose 2) sur la croissance pondérale (A) et le diamètre de la coquille (B) des escargots pendant la période de traitement ($m \pm SEM$). | 26 |
| Figure 23 | Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur le taux de protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas ($m \pm SEM$, $n=3$). | 30 |
| Figure 24 | Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur le taux de glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas ($m \pm SEM$, $n=3$). | 31 |
| Figure 25 | Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur le taux de lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas ($m \pm SEM$, $n=3$). | 31 |
| Figure 26 | Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur l'activité spécifique de la LDH ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots témoins et traités ($m \pm SEM$, $n=3$). | 34 |
| Figure 27 | Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur l'activité spécifique de la GPx ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots témoins et traités ($m \pm SEM$, $n=3$). | 36 |
| Figure 28 | Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur l'activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots témoins et traités ($m \pm SEM$, $n=3$). | 38 |

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figure 29 | Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur l'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots témoins et traités ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$). | 40 |
| Figure 30 | Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur le taux de la vitellogénine ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) chez les escargots témoins et traités ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$). | 42 |
| Figure 31 | Observations au microscope optique des coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> : témoin (A) et (B) et traités par le Decis avec la Dose 1 (C) et la Dose 2 (D) après 3 mois de traitement ($\times 40$). | 43 |
| Figure 32 | Observations au microscope optique des coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> : témoin (A) et (B) et traités par le Zoom avec la Dose 1 (C) et la Dose 2 (D) après 3 mois de traitement ($\times 40$). | 44 |
| Figure 33 | Observations au microscope optique des coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> : témoin (A) et (B) et traités par le Weatfert à la Dose 1 (C) et la Dose 2 (D) après 3 mois de traitement ($\times 40$). | 45 |
| Figure 34 | Chromatogrammes d'escargot témoin (A), insecticide Decis (B) et escargot traité (C). | 47 |
| Figure 35 | Chromatogrammes d'escargot témoin (A), herbicide Zoom (B) et escargot traité (C). | 48 |

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

L'augmentation de la production alimentaire est la principale préoccupation de tous les pays, car la population mondiale devrait atteindre près de 10 milliards d'ici 2050 (Gill & Garg, 1998). Cela a conduit à l'utilisation d'une grande variété de produits chimiques, de pesticides et d'engrais inorganiques sur les terres agricoles (Yahiaabadi *et al.*, 2018), pour augmenter le rendement des cultures et pour répondre à la demande croissante de la nourriture (Larsen *et al.*, 2020). En Algérie et dans diverses parties du monde, l'usage des pesticides, des engrais et d'autres produits phytosanitaires se répand de plus en plus avec le développement de l'agriculture (Lalthanzara & Ramanujam, 2010), mais aussi dans le cadre des actions de lutte contre les vecteurs nuisibles. L'impact de leur utilisation intensive est perçu non seulement en termes de qualité du sol, mais aussi sur la survie des organismes du sol qui y vivent (Rai *et al.*, 2014).

La biosurveillance environnementale est généralement définie comme « l'utilisation systématique d'organismes vivants ou leurs réponses pour déterminer l'état ou les changements dans l'environnement » (Yang *et al.*, 2010). Elle peut être utilisée comme une méthode alternative pour l'évaluation de la pollution et la mise en œuvre de stratégies à court et à long terme pour la protection des ressources environnementales. Cela dépend généralement de l'utilisation d'organismes vivants, connus sous le nom de « bioindicateurs » ou leurs réponses appelées « biomarqueurs » pour indiquer les changements environnementaux (Li *et al.*, 2010). Les biomarqueurs peuvent être définis comme indicateurs ou signaux de changements mesurables dans les systèmes biologiques au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, pathologique ou comportemental en réponse aux contaminants (Sogorb *et al.*, 2014). Les systèmes biologiques sont détoxifiés par des mécanismes de défense antioxydants non enzymatiques et enzymatiques qui sont omniprésents dans les tissus de la plupart des espèces animales. Les antioxydants enzymatiques comprennent une série d'enzymes telles que la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et la glutathion-S-transférase tandis que les antioxydants non enzymatiques contiennent de petites substances telles que le glutathion réduit (GSH) et l'acide ascorbique (Di Giulio & Meyer, 2008). Les altérations biochimiques en tant que biomarqueurs sont des outils de diagnostic importants dans l'évaluation des risques et des dangers potentiels d'exposition animale ou humaine (Galloway *et al.*, 2002). La mesure des réponses antioxydantes et de la peroxydation lipidique (LPO) chez les mollusques peut être utilisée comme biomarqueur sensible pour la

biosurveillance de la pollution environnementale (Bahgat *et al.*, 2016). La glutathion peroxydase et la catalase sont des enzymes antioxydantes clés qui atténuent les espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres, et protègent les lipides, l'ADN et les protéines de la modification oxydative (Ceballos-Picot *et al.*, 1992). La catalase est la première ligne de défense contre les blessures oxydatives qui récupère le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à haute concentration. La GST, l'une des enzymes de la phase II, peut catalyser la réaction de conjugaison du GSH et ainsi contribuer à l'élimination des réactifs hydrophiles (Maity *et al.*, 2008).

Le sol abrite différentes formes de vie et un réservoir de tous les produits agrochimiques (Yahiaabadi *et al.*, 2018). Pour tester les effets des produits chimiques sur les organismes du sol, plusieurs méthodes biologiques ont été appliquées aux nématodes, aux vers de terre, aux collemboles et aux escargots (Druart *et al.*, 2011). A cet effet, l'utilisation de ces produits phytosanitaires cause une contamination terrestre et aquatique entraînant une influence négative sur la biodiversité et ils s'intègrent facilement aux chaînes trophiques où ils subissent une éventuelle bioamplification.

Les Mollusques sont l'un des groupes les plus importants qui contribuent à la biodiversité terrestre. Il existe dans le monde entre 30.000 à 35.000 espèces de mollusques terrestres (Tsai, 2004). Ces espèces sont souvent utilisées pour contrôler la pollution de l'air, du sol et de l'eau (Astani *et al.*, 2012). Les mollusques gastéropodes terrestres présentent des caractéristiques physiologiques, biologiques et écologiques variées, permettant ainsi de comparer l'influence de ces différents paramètres sur leurs réponses à la contamination de l'environnement (De Vaufleury & Pihan, 2000). Ces gastéropodes en particulier les escargots, sont l'un des nombreux outils biologiques utilisés par les scientifiques en tant que bioindicateurs pour caractériser la qualité du sol, déterminer ou prédire les dommages causés aux écosystèmes et assurer la surveillance de la pollution (De Vaufleury *et al.*, 2006 ; Parmar *et al.*, 2016). L'utilisation des escargots comme espèces indicatrices est efficace en raison de leur large distribution, leur échantillonnage facile, leur capacité à accumuler divers types de polluants et leur rôle important dans les chaînes trophiques terrestres (Berlioz-Barbier *et al.*, 2015 ; de Vaufleury, 2015 ; Baroudi *et al.*, 2020 ; Cofone *et al.*, 2020). Ces animaux qui vivent en contact étroit avec les couches supérieures du sol, peuvent être exposés à une gamme importante de xénobiotiques car ils ont été largement utilisés comme espèce sentinelle pour l'évaluation de la pollution dans les écosystèmes terrestres (Douafer *et al.*, 2020). Ils accumulent divers

contaminants dans leurs tissus mous, en particulier la glande digestive, et sont des espèces utiles pour surveiller l'exposition aux métaux, aux produits agrochimiques et à la pollution urbaine (Regoli *et al.*, 2006). L'impact sur les altérations cellulaires et biochimiques des glandes digestives en tant que biomarqueurs de substances toxiques a été étudié (Snyman *et al.*, 2005).

Pour cette raison, au cours des deux dernières décennies, de nombreux chercheurs dans le monde entier ont focalisé leurs travaux sur la bioaccumulation des xénobiotiques (Berandah *et al.*, 2010) et sur la surveillance du transfert de ces contaminants provenant de diverses sources, chez des espèces d'escargots terrestres (Dallinger *et al.*, 2004 ; Habib *et al.*, 2016), qui agissent comme bioindicateurs (Yap *et al.*, 2013 ; Samsi *et al.*, 2017).

Les escargots sont des modèles biologiques sensibles qui montrent des changements physiques et biologiques en présence des polluants agissant donc comme une alarme pour la dégradation de l'environnement (Gnatyshyna *et al.*, 2020). Ils ont été largement utilisés pour évaluer les effets directs et indirects des polluants, en raison de leur taille, leur faible mobilité, et leur élevage facile dans les conditions de laboratoire en tant qu'animaux d'essais (Crémazy *et al.*, 2020).

L'escargot terrestre *Eobania vermiculata* (Müller, 1774), un organisme sentinelle, appartient à la famille des Helicidae et est distribué dans le monde entier en particulier dans la région méditerranéenne.

Pour répondre aux besoins identifiés dans la thèse, l'objectif général de ces travaux est d'évaluer les effets des produits phytosanitaires, insecticide, engrais et herbicide sur un gastéropode terrestre, *E. vermiculata*, l'une des espèces d'escargots la plus abondante dans la région de Tébessa et un modèle bioindicateur présent dans les agrosystèmes. Pour y répondre, ce manuscrit est organisé en quatre grandes parties (Fig. 1) :

- (1) La première partie est consacrée à l'examen des aspects toxicologiques, comportementaux et morphométriques (poids frais moyen des escargots et diamètre de la coquille).
- (2) La deuxième partie est consacrée à la détermination de la composition biochimique de l'hépatopancréas (protéines, glucides et lipides), aux dosages des biomarqueurs enzymatiques via la détermination de l'activité spécifique des glutathion S-transférases, lactate déshydrogénase, catalase et glutathion peroxydase ;

- (3) La troisième partie est destinée à l'exploration histopathologique de l'hépatopancréas des escargots ;
- (4) La quatrième partie vise à déterminer la bioaccumulation de ces xénobiotiques dans le tissu de l'escargot par HPLC et FRx.

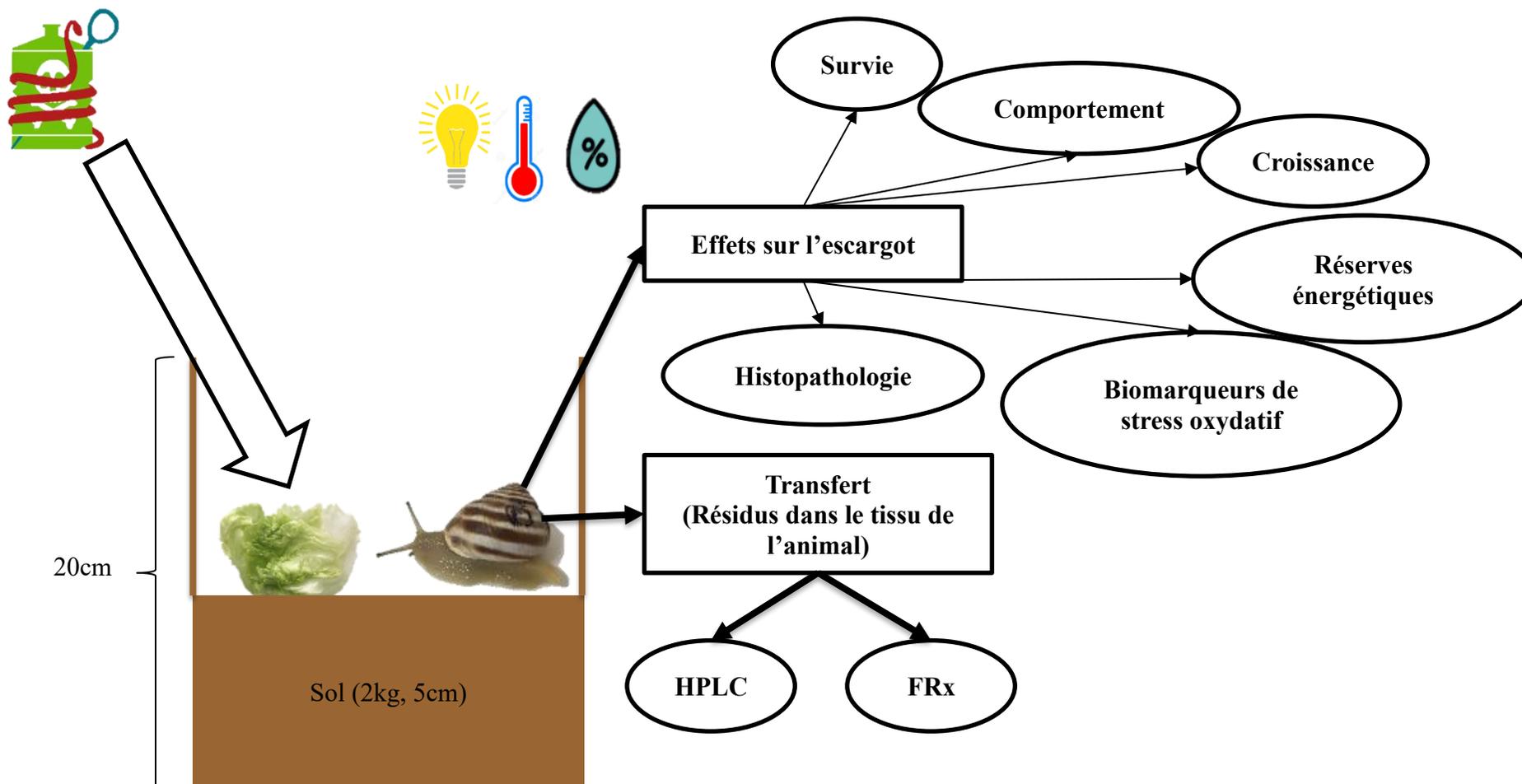


Figure 1. Objectifs de la thèse.

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation de l'espèce *Helix vermiculata*

Eobania vermiculata ou *Helix vermiculata* (Müller, 1774), escargot vermiculate, escargot en bande de chocolat est originaire de la Méditerranée, de l'Afrique du Nord à l'Espagne et au-delà au Moyen-Orient et en Asie du Sud-Ouest (Medynskaya & Popov, 1998). L'espèce est trouvée dans une variété d'habitats, généralement dans la végétation sèche, dans les haies, les jardins, les vignobles et souvent dans les zones côtières. La reproduction a lieu en automne. Environ 60 à 80 œufs sont pondus dans le sol. Les escargots atteignent leur maturité deux ans après l'éclosion. Les escargots adultes hibernent dans un trou dans le sol et développent un épiphragme. Les juvéniles hibernent habituellement sous des pierres ou des feuilles (Welter-Schultes, 2012).

Cette espèce se caractérise par une coquille très solide, aplatie, globuleuse, présentant des dessins variés, avec ou sans bandes spirales, une ouverture "tombante" aux bords nettement évasés, sans ombilic (Fig. 2). Sa couleur est généralement pâle (Herbert, 2010).

La position systématique de cette espèce est la suivante :

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



Figure 2. Aspect général de la coquille d'*H. vermiculata* (Photo personnelle).

2.2. Méthode d'échantillonnage

L'échantillonnage a été effectué au niveau du cimetière situé à Bekkaria (35° 22' 20" Nord, 8° 14' 32" Est) à 12 km de la ville de Tébessa (Fig. 3). Ce site est caractérisé par un couvert végétal herbacé varié (Fig. 4), qui devient dense au printemps. La température moyenne est de 16,3°C. Des précipitations moyennes de 16,5 mm sont enregistrées au mois de juillet car c'est le mois le plus sec et une pluviométrie importante au mois de septembre avec une moyenne de 45,2mm.

La collecte des escargots est réalisée de manière aléatoire et manuelle, durant la période étalée du mois de décembre jusqu'au mois de février durant l'année 2017/2018. Les escargots sont ensuite transférés au laboratoire, où ils seront triés selon les différentes phases de développement : jeunes éclos, juvéniles et subadultes puis ils seront adaptés aux conditions du Laboratoire pendant deux semaines.

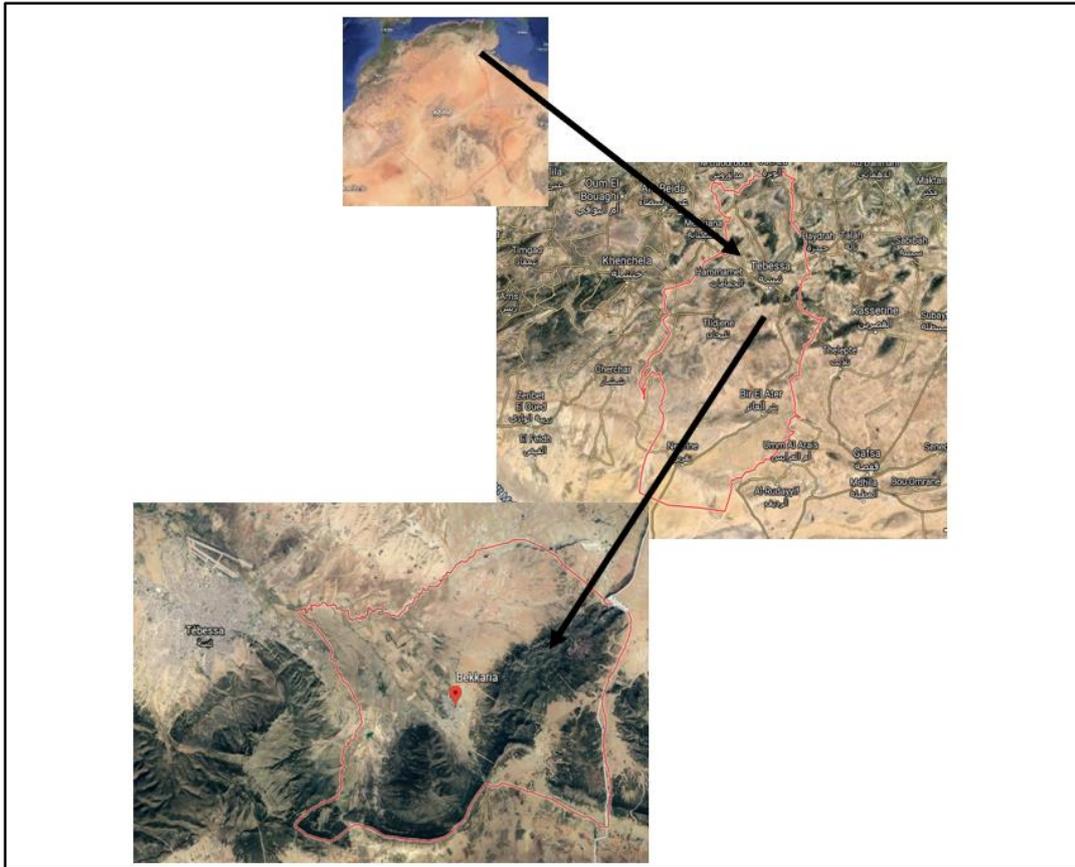


Figure 3. Photo satellitaire de la région de Bekkaria (www.earth.google.com).



Figure 4. Présentation du site d'étude, cimetière de Bekkaria-Tébessa (Photo personnelle).

2.3. Méthode d'élevage

L'élevage des escargots a été effectué au laboratoire de Biologie Animale à l'Université de Tébessa, dans des terrariums en verre (Longueur : 20 cm, largeur : 20 cm, hauteur : 20 cm) remplis de 2 kg de sol non traité, et recouverts d'une tulle afin d'assurer une bonne aération (Fig. 5). Il est maintenu à une température de $16,23 \pm 1,35^{\circ}\text{C}$ et une humidité de 31,14% et un

cycle lumière-obscurité 18 h : 6 h. Pour maintenir une humidité adéquate, une éponge humide a été déposée au fond des terrariums. Le nettoyage est effectué chaque trois jours (Daumer *et al.*, 2007). Les caractéristiques physico-chimiques du sol utilisé au cours de nos expérimentations sont mentionnées dans le tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques du sol utilisé au cours de l'expérience.

| Granulométrie | Pourcentage |
|----------------------|-----------------|
| Sable grossier | 1,40% |
| Sable fin | 1,96 % |
| Sable très fin | 17,80% |
| Limon | 5,33% |
| Argile | 73,50% |
| Conductivité à 24 °C | 635 μ sm/cm |
| pH | 7,96 |
| CaCO ₃ | 12,66% |
| Matière organique | 3,87% |



Figure 5. Elevage d'*H. vermiculata* au laboratoire (Photos personnelles).

2.4. Présentation des traitements

A cours de cette étude, on a appliqué deux types de pesticides et un engrais : le Decis (insecticide), le Zoom (herbicide) et le Weatfert (engrais).

2.4.1. Decis

Decis® 25 EC est un insecticide à base de la deltaméthrine (25g/l), substance active de la famille des pyréthrinoïdes de synthèse. Il est caractérisé par une action très rapide (remarquable effet de choc) et un effet répulsif sur les insectes ravageurs volants. Il possède un large spectre d'action et agit par contact et par ingestion sur un grand nombre d'insectes suceurs et broyeur.

2.4.2. Zoom

Le Zoom est un herbicide sélectif et actif contre les adventices dicotylédones annuels et quelques pérennes sensibles dans la culture du blé. Il est absorbé par les racines et par les feuilles des adventices déjà levées. Il agit principalement par inhibition de la croissance des adventices qui deviennent nécrotiques et meurent en quelques semaines (Ouazar, 2012). Granulés dispersibles dans l'eau, le Zoom est composé de 65,9% de Dicamba et de 4,1% de Triasulfuron.

2.4.3. Weatfert

Le Weatfert[®] est un engrais ternaire conçu pour combler les exigences nutritionnelles dès le démarrage de la culture. Il contient de l'azote, du phosphore, du potassium ainsi que du soufre, dans un équilibre adapté aux exigences phénologiques de cette partie du cycle végétatif des cultures. C'est une formulation granulée, sa composition est mentionnée dans le Tableau 2.

Tableau 2. Composants de l'engrais Weatfert et leurs concentrations.

| Nom chimique | Formule chimique | Pourcentage (%) |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Azote total | N | 8 |
| Azote ammoniacal | NH ₄ | 8 |
| Anhydride phosphorique | P ₂ O ₅ | 36 |
| Potasse sous forme sulfate | K ₂ O | 15 |
| Soufre sous forme sulfate | SO ₃ | 13 |

2.5. Traitement

Les escargots utilisés dans cette étude sont les juvéniles et les subadultes d'*H. vermiculata*. Une fois, les escargots sont pesés à l'aide d'une balance de précision (OUHAUS, 0,000mg), ils sont répartis en 3 lots comme suit :

- **Lot 1 :** Lot témoin
- **Lot 2 :** Lot traité avec la Dose 1 (Dose recommandée).
- **Lot 3 :** Lot traité avec la Dose 2 (Dose recommandée x2).

Chaque lot à son tour, est réparti en 21 groupes (7 groupes pour chaque molécule étudiée) de 16 individus chacun et maintenus dans un terrarium (20 × 20 × 20 cm). Les groupes d'escargots sont nourris de laitue fraîche (escargots témoins), ou de laitue imbibée (durant 30s) de solution des deux pesticides. L'engrais est appliqué sous forme d'une poudre. Toutes les dilutions d'insecticides ont été préparées avec de l'eau distillée. La nourriture est fournie chaque trois jours lors du nettoyage des terrariums et du renouvellement des solutions pesticides. Pour

déterminer l'effet de ces traitements sur le comportement, la croissance, les métabolites, les biomarqueurs, l'histologie de l'hépatopancréas et la bioaccumulation dans les tissus de l'escargot, l'expérience est menée durant 3 mois sous les conditions contrôlées de laboratoire citées auparavant.

Tableau 3. Doses appliquées au cours de nos expérimentations.

| Traitement | Dose 1 | Dose 2 |
|------------|------------|-------------|
| Decis | 25µl/100ml | 50 µl/100ml |
| Zoom | 30mg/200ml | 60mg/200ml |
| Weatfert | 500mg | 1000mg |

2.6. Dissection de l'escargot et prélèvement des organes

Chaque semaine de traitement, les escargots sont pesés puis décoquillés et leurs hépatopancréas et glande albumen rapidement excisés et pesés (Fig. 6).



Figure 6. Dissection des escargots et prélèvement des organes (Photo personnelle).

2.7. Biométrie

Deux paramètres biométriques ont été pris en considération : le poids corporel (coquille et viscères) et le diamètre de la coquille des individus témoins et traités par les trois traitements, Decis et Zoom et Weatfert.

La croissance pondérale est évaluée chaque semaine en pesant les escargots avec une balance analytique (Ohaus® Analytical, Suisse). Le pourcentage d'inhibition du poids moyen (**Ppi**) (ISO 15952, 2006) est calculé pour comparer le poids moyen des groupes traités avec celui des groupes témoins.

$$P_{pi} \text{ du groupe } G_X = \frac{(m_{Tn} - m_{T0}) - (m_{Gn} - m_{G0})}{(m_{Tn} - m_{T0})} \times 100$$

Où :

Le groupe G_X représente les groupes d'escargots G1 et G2 ;

m_{Tn} est la masse des escargots du groupe témoin à l'instant $t = n$ semaines ;

m_{T0} est la masse des escargots du groupe témoin au début de l'expérience ;

m_{Gn} est la masse des escargots du groupe G_X à l'instant $t = n$ semaines ;

m_{G0} est la masse des escargots du groupe G_X au début de l'expérience.

Le diamètre de la coquille a été mesuré avec un pied à coulisse chaque semaine pendant 3 mois.

Le pourcentage d'inhibition du diamètre moyen (P_{di}) (ISO 15952, 2006) est calculé pour comparer le diamètre des groupes traités avec celui des groupes témoins.

$$P_{di} \text{ du groupe } G_X = \frac{(d_{Tn} - d_{T0}) - (d_{Gn} - d_{G0})}{(d_{Tn} - d_{T0})} \times 100$$

où

d_{Tn} est le diamètre de la coquille des escargots du groupe témoin à l'instant $t = n$ semaines

d_{T0} est le diamètre des escargots du groupe témoin au début de l'expérience ;

d_{Gn} est le diamètre des escargots du groupe G_X à l'instant $t = n$ semaines ;

d_{G0} est le diamètre des escargots du groupe G_X au début de l'expérience.

2.8. Extraction et dosage des métabolites

L'extraction des différents métabolites a été réalisée selon le procédé de Shibko *et al.* (1966). Les portions de l'hépatopancréas (100mg) d'*H. vermiculata* sont placées dans des tubes Eppendorf contenant 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 % et broyées. Après une première centrifugation (5000 trs / min, 10 mn), le surnageant I obtenu est utilisé pour le dosage des glucides totaux selon la méthode de Duchateau & Florkin, (1959). Au culot I, on ajoute 1 ml de mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 trs/min, 10 mn), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides

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

2.8.1. Dosage des glucides totaux

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

Tableau 1. Dosage des glucides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage.

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

2.8.2. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976), dans une fraction aliquote de 100 µl à laquelle on ajoute 4 ml de réactif du bleu brillant de comassie (BBC) G 250 (Merck). Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumen de sérum de bœuf (BSA) titrant 1mg/ml (Tableau 5).

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

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

2.8.3. Dosage des lipides totaux

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972), en utilisant le réactif sulfophosphanillinique. Le dosage des lipides se fait sur des prises aliquotes de 100 µl des extraits lipidiques ou de gamme étalon auxquelles on évapore totalement le solvant puis on ajoute 1ml d'acide sulfurique concentré, les tubes sont agités et mis pendant 10 mn dans un bain de sable à 25 °C. Après refroidissement, on prend 200 µl de ce mélange auquel on ajoute 2,5 ml de réactif sulfophosphanillinique (Tableau 6). Après 30 mn à

l'obscurité, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide orthophosphorique, des complexes roses. La solution mère des lipides est préparée comme suit : on prend 2,5 mg d'huile de table, tournesol (99% triglycérides) dans un tube Eppendorf et on ajoute 1 ml d'éther chloroforme (1V/1V).

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

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

2.9. Extraction et dosage des biomarqueurs du stress oxydatif

Les portions de l'hépatopancréas des séries témoins et traitées avec le Decis, le Zoom et le Weatfert ont fait l'objet d'un dosage de la lactate déshydrogénase (LDH), de la Glutathion peroxydase (GPx), des glutathion S-transférases (GSTs) et de la catalase (Cat). Par ailleurs, le contenu en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminé, afin de pouvoir calculer l'activité spécifique des biomarqueurs.

2.9.1. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)

L'activité de la LDH a été mesurée selon la méthode de Hill & Levi (1954). Elle utilise le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) comme substrat. Des fragments de la glande digestive (100-200mg) ont été homogénéisés dans 1 ml de Tris/HCl (0,1 M ; pH 7,2). L'homogénat a été centrifugé (3000 trs/min, pendant 5 min) puis le surnageant récupéré sera utilisé comme source d'enzymes. L'essai a été effectué avec 50 µl de surnageant ajouté à 675 µl de tampon de substrat (0,2 M ; pH 10) et 50 µl de la solution NAD. La lecture des absorbances a été faite chaque minute pendant 5 min à 340 nm. L'activité a été exprimée en µM/min/mg de protéines.

2.9.2. Dosage de la glutathion-peroxydase (GPx)

L'activité de la GPx a été déterminée selon la méthode de Flohé & Gunzler (1984). Des fragments de la glande digestive (100 mg) ont été homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (pH 7,8). L'homogénat a été centrifugé (3000 trs/min, pendant 10 minutes) puis le surnageant récupéré peut être utilisé comme source d'enzymes. L'essai a été effectué avec 200 µl de surnageant ajouté à 400 µl de la solution GSH (0,2 mM ; pH 10). La lecture des absorbances a été faite après 5 minutes à 412 nm.

2.9.3. Dosage des glutathion S-transférases (GSTs)

Les portions de l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* témoins et traités (100-200 mg), sont broyées dans 1 ml de tampon phosphate de sodium (0,1 M ; pH 6). L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé (14000 trs/min à 4°C pendant 30 min), le surnageant récupéré servira au dosage des GSTs.

Le dosage est réalisé selon la méthode de Habig *et al.* (1974), il consiste à faire réagir 200 µl de surnageant, avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM) /GSH (5mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 100 ml tampon phosphate (0,1 M, pH 6)]. La lecture des absorbances est effectuée toutes les 1 mn pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

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

X : millimoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (mM/min/mg de protéines).

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

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB (mM⁻¹ cm⁻¹).

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

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

2.9.4. Extraction et dosage de la catalase

L'activité de la catalase (CAT) a été mesurée selon la méthode de Claiborne (1985). Chaque échantillon (100-200 mg) de tissu frais de l'hépatopancréas des séries témoins et traitées a été conservé dans le tampon phosphate (100 mM ; pH 7,4). Après le broyage et la centrifugation (15000 trs/min pendant 10 min), le surnageant a été recueilli et utilisé pour la détermination de l'activité de la catalase. Les absorbances ont été lues à 240 nm. L'analyse a été menée avec 3 répétitions pour chaque série et les données sont exprimées en µM/min/mg de protéines.

2.10. Extraction et dosage de la vitellogénine

L'extraction de la vitellogénine est réalisée selon la méthode de Postlethwait *et al.* (1980) et Fabre *et al.* (1990). Les glandes albumen, conservés dans 500µl de tampon d'extraction (Tris-HCL-NaCl), sont broyés aux ultrasons. L'homogénat obtenu est centrifugé à 5000 trs/min

pendant 10 minutes. Il en résulte 3 couches distinctes : une couche surnageante qui représente les lipides, un culot contenant des glycoprotéines et une couche intermédiaire renfermant les vitellogénines et les vitellines. La fraction soluble obtenue est récupérée puis déposée dans un tube Eppendorf. Les échantillons sont ensuite conservés au froid (-20°C) jusqu'au dosage. Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie G 250 (BBC) comme réactif et l'albumen de sérum de bœuf (1mg/ml) comme standard, dans une fraction aliquote de 100µl. La lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 595nm contre un blanc de gamme.

2.11. Histopathologie

L'objectif de cette partie est la réalisation d'une étude histologique de l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* afin de compléter la panoplie des paramètres morphométriques et biochimiques sous l'effet des différents traitements. Pour rendre visible les atteintes du tissu hépatopancréatique, nous avons utilisé la microscopie optique. A la fin du 3ème mois de traitement et après le sacrifice des escargots, 16 individus choisis au hasard au niveau des lots (témoins et traités) sont destinés aux études histologiques. L'hépatopancréas des individus témoins et traités subit une préparation selon les étapes suivantes : fixation, inclusion, coupe, coloration et montage. Toutes ces étapes ont été réalisées au Laboratoire de Biologie Cellulaire -Cytologie- du Centre Hospitalo-Universitaire d'Hussein Dey-Hôpital Nefissa HAMOUD (ex Parnet-Alger).

2.11.1. Fixation

La fixation permet la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit impérativement être réalisée après la dissection de l'escargot (séparation du pied et des viscères quand les escargots sont encore vivants), par immersion de l'échantillon dans un grand volume de liquide fixateur (Formol 30%), compte tenu de leur taille (Fig. 7).



Figure 7. Fixation de l'hépatopancréas dans le formol (30%) (Photo personnelle).

2.11.2. Inclusion

Cette étape a pour but de réaliser des coupes fines et régulières. Les échantillons sortis du formol sont rincés plusieurs fois à l'eau du robinet. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine : de par son caractère hydrophobe, les échantillons doivent donc subir, dans un premier temps, une déshydratation par immersion successive dans des bains d'alcool à degré croissant à l'aide d'un automate. Ensuite, l'alcool est remplacé par du xylène (trois bains de deux heures chacun). Dans un deuxième temps, les échantillons sont placés sur une plaque chauffante dans un bain de paraffine liquide (56-58°C) afin qu'elle imprègne totalement l'échantillon. Après une nuit, les échantillons sont inclus dans la paraffine à l'aide de moules (barres de Leuckart) : après refroidissement, les blocs de paraffine deviennent durs, et les échantillons sont orientés selon le plan de coupe choisi (longitudinal ou transversal) (Fig. 8).



Figure 8. Déshydratation et inclusion des échantillons de l'hépatopancréas
(Photos personnelles).

2.11.3. Coupe

Les coupes des blocs de paraffine, de 4µm d'épaisseur, sont réalisées par un microtome de type Leica et sont collées sur des lames (Fig. 9).



Figure 9. Coupe des blocs des échantillons à l'aide d'un microtome Leica (Photo personnelle).

2.11.4. Coloration

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



Figure 10. Coloration des lames préparées (Photo personnelle).

2.11.5. Montage

Les coupes colorées sont montées entre lames et lamelles avec une résine synthétique, le baume de Canada. Les lames sont alors prêtes pour être observées au microscope optique (Fig. 11).



Figure 11. Montage des lames préparées (Photo personnelle).

2.11.6. Observation

L'observation des coupes histologiques de l'hépatopancréas est réalisée avec un microscope optique (Leica) et la prise d'images est effectuée avec un téléphone portable (iPhone 6s+) (Fig. 12).



Figure 12. Observation microscopique des coupes histologiques (Photo personnelle).

2.12. Analyse des résidus des pesticides par HPLC

2.12.1. Extraction de la phase liquide

Le tissu (1g) des escargots témoins et traités avec les deux pesticides (Decis et Zoom) prélevés après 3 mois de traitement, ont été broyés, puis homogénéisés à l'aide d'un broyeur à ultrasons, pendant 4 minutes dans de l'acétonitrile (5 ml). L'homogénat a été filtré à l'aide du papier filtre (Whatman n°1) et le reste des tissus ont été réhomogénéisés et réextraits deux fois avec de l'acétonitrile. Les filtrats d'acétonitrile ont été transférés dans un entonnoir et le n-hexane y a été ajouté (1:1). Le mélange a été secoué vigoureusement pendant 2 min jusqu'à ce que les deux phases soient distinctement séparées. La phase inférieure de l'acétonitrile a été recueillie dans un autre entonnoir séparatoire et repartitionné deux fois avec le n-hexane. La phase supérieure d'acétonitrile a été ensuite recueillie dans une autre fiole conique et évaporée en utilisant un évaporateur rotatif à vide. Elle a été récupérée dans 1 ml d'acétonitrile (grade HPLC). L'échantillon a été filtré à travers une membrane de 0,20 μ m avant l'injection en HPLC (Figs. 13, 14, 15 et 16).

2.12.2. Conditions d'analyse

Des fractions aliquotes (20 μ l) sont injectées dans un chromatographe (Agilent 1100) équipé d'un détecteur UV+ visible. La colonne utilisée est une colonne C18 (300 mm ; diamètre 4 mm). L'élution est assurée par un gradient croissant linéaire d'acétonitrile-eau (90/10 ; V/V).

La quantification du produit est effectuée par intégration et comparaison avec les pics obtenus par l'injection des standards (Zoom et Decis). Les conditions d'analyse des résidus ont été mentionnées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Conditions d'analyse des échantillons par HPLC.

| | |
|------------------------------|---|
| Equipements | HPLC Agilent 1100 |
| Détecteur | UV + Visible |
| λ | 270 nm |
| Phase mobile | 90% Acétonitrile (10% H ₂ O) |
| Débit | 1ml/Min |
| Colonne | C18 (300mm, 4.0mm) |
| Taille des particules | 5 μ m |
| Porosité | 100 Å° |
| Température | Ambiante |
| Boucle d'injection | 20 μ l |



Figure 13. Pesée et broyage du tissu dans l'acétonitrile (Photos personnelles).



Figure 14. Séparation des deux phases : l'acétonitrile et le n-hexane (Photos personnelles).

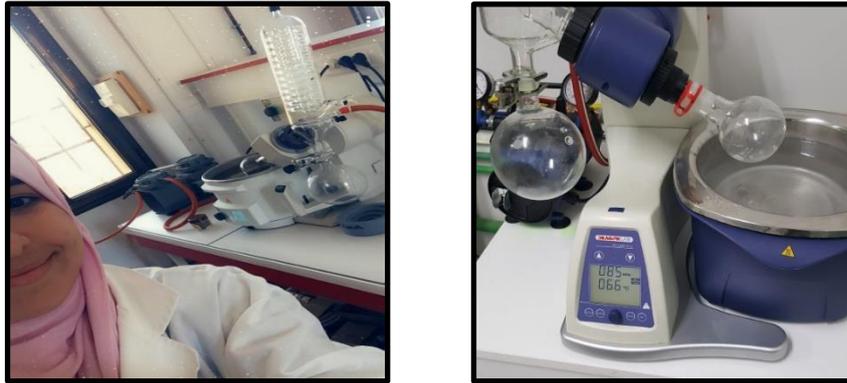


Figure 15. Evaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif (Photos personnelles).



Figure 16. Analyse des échantillons par HPLC (Photos personnelles).

2.13. Analyse des résidus de l'engrais par le FRx

La Spectrométrie de Fluorescence des Rayons X (FRx) est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour la détermination qualitative et quantitative de la composition élémentaire d'un échantillon car c'est une technique non destructive. Elle permet une rapide détermination et identification quantitative et qualitative des éléments atomiques majeurs et mineurs de Béryllium (Be) à l'Uranium (U) dans une grande variété d'échantillon.

L'analyse a été effectuée au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-Chimique (CRAPC) à Bou-Ismaïl, Tipaza.

2.13.1. Préparation de l'échantillon

Les escargots témoins et traités ont été sélectionnés et lyophilisés par un Lyophilisateur (Lyophilisateur CHRIST Alpha 2-4 plus) pendant 50 heures. Une fois ces échantillons sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique (FRITSCH Pulverisette 2), on procède à la formation de pastilles de 32 mm avec une pastilleuse de type "SPECAC". Ensuite, les pastilles obtenues ont été analysées par Spectrométrie de Fluorescence X.

Les étapes de préparation des échantillons pour les analyser par la technique FRx sont présentées dans les photos suivantes (Figs. 17-20):



Figure 1. Lyophilisation pendant 50 heures (Lyophilisateur CHRIST Alpha 2-4 plus) (Photos personnelles).



Figure 18. Broyage des escargots lyophilisés à l'aide d'un mortier et un broyeur mécanique (FRITSCH Pulverisette 2) (Photos personnelles).



Figure 2. Formation d'une pastille de 32 mm à l'aide d'une pastilleuse « Specac » (Photos personnelles).

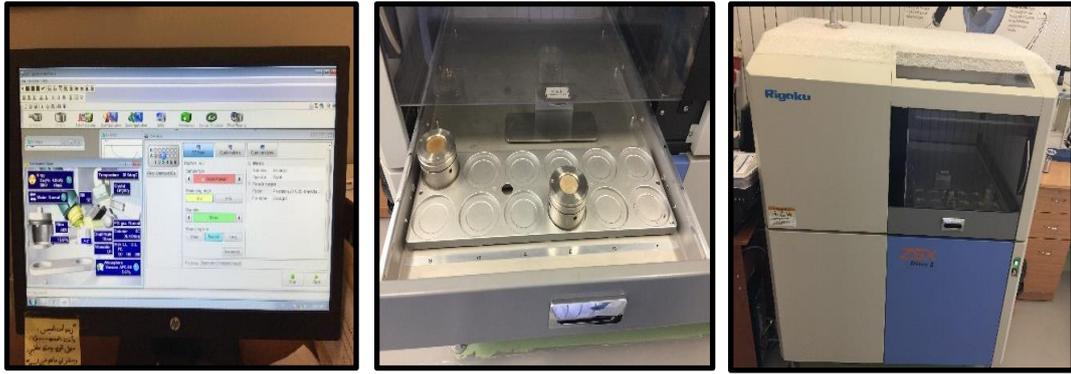


Figure 3. Analyse des pastilles par la Spectrométrie de Fluorescence X (Rigaku, ZSX Primus II) (Photos personnelles).

2.13.2. Conditions d'analyse

L'analyse des pastilles par le Spectromètre de Fluorescence des Rayons X (ZSX Primus II de Rigaku) s'effectue selon les conditions mentionnées dans le tableau 8.

Tableau 8. Conditions d'analyse des échantillons par le FRx.

| Type d'échantillon | Oxyde/Poudre |
|--------------------|---|
| Marge d'analyse | Béryllium-Uranium |
| Diamètre | 30 mm |
| Temps de mesure | Normal (un quart d'heure) |
| Equipement | Spectromètre de Fluorescence des Rayons X « ZSX Primus II de Rigaku » |

2.14. Analyses statistiques

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

RESULTATS

III. RESULTATS

3.1. Effets sur le comportement

Pendant la durée de l'expérience, les escargots traités par les deux pesticides et l'engrais ont montré une série de symptômes. Le premier symptôme est la perte de la chimioréception, de sorte que les escargots ne sont plus attirés par la nourriture de façon dose-dépendante comparé aux escargots témoins. Dans les lots traités à la dose 1, les escargots ont montré une activité relativement similaire à celle des escargots témoins. Tandis que, dans les lots traités à la dose 2 et à partir de la deuxième semaine, l'activité locomotrice et nutritionnelle des escargots a diminué, ils se positionnent au sommet des lots, et ils fuient généralement la nourriture (Fig. 21).



Figure 21. Comportements des escargots suite aux traitements (Photos personnelles).

3.2. Mortalité des escargots

Au cours des essais toxicologiques, le suivi de la viabilité des individus d'*E. vermiculata* est effectué chaque mois. Durant l'expérience, la mortalité était faible, avec seulement 26 individus sur 336 escargots juvéniles, ce qui représente 7,73 %. Nous avons constaté que le nombre total de mortalités des escargots est de 6 individus durant les 3 mois de traitement avec la dose 1 du Decis et qui augmente chez les séries traitées avec la dose 2 avec 7 individus. Par ailleurs, la mortalité chez les traités à la Dose 1 du Zoom était nulle, et a augmenté avec la dose 2, où on a enregistré 4 individus. De plus, le traitement par le Weatfert a induit une mortalité de 4 individus à la Dose 1 jusqu'à 5 individus chez les traités avec la Dose 2. Les fortes valeurs sont observées chez les traités avec le Decis (Tableau 9).

Tableau 9. Mortalité des escargots juvéniles durant les trois mois de traitement par le Decis, le Zoom et le Weatfert avec les deux doses (Dose 1 et Dose 2).

| Temps (mois) | Decis | | Zoom | | Weatfert | |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Dose 1 | Dose 2 | Dose 1 | Dose 2 | Dose 1 | Dose 2 |
| 1 | 04 | 03 | 00 | 01 | 01 | 02 |
| 2 | 00 | 01 | 00 | 02 | 02 | 02 |
| 3 | 02 | 03 | 00 | 01 | 01 | 01 |
| Mortalité totale | 06 | 07 | 00 | 04 | 04 | 05 |

3.3. Effet sur la croissance pondérale et le diamètre de la coquille

L'effet des trois traitements (Dose 1 et Dose 2) a été testé sur la croissance pondérale et le diamètre de la coquille des escargots juvéniles d'*Helix vermiculata*.

Concernant le poids frais moyen des escargots, les résultats révèlent une diminution significative chez les séries traitées au cours du premier mois ($F_{6,21} = 7,224 : p < 0,05$), deuxième mois ($F_{6,21} = 48,32 : p < 0,0001$) et troisième mois de traitement ($F_{6,21} = 95,36 : p < 0,0001$) par rapport aux séries témoins.

Le classement des moyennes par le test HSD de Tukey met en évidence la présence de deux groupes à deux et à trois mois de traitement, un groupe témoins et un second groupe renfermant toutes les séries traitées. A un mois de traitement, deux groupes de moyennes ont été constatés, un premier groupe constitué des témoins et des traités avec le Zoom et le Decis à la dose 1 et un deuxième groupe formé des autres séries traitées (Fig. 22A).

Par ailleurs, l'application des traitements a induit une diminution du diamètre de la coquille au cours du deuxième mois ($F_{6,21} = 54,33 : p < 0,0001$) et troisième mois de traitement ($F_{6,21} = 6,471 : p = 0,0006$). Aucun effet n'a été signalé au cours du premier mois ($p > 0,05$).

Le classement des moyennes montre un seul groupe de moyenne renfermant toutes les séries témoins et traitées à un mois. A deux mois, deux groupes sont observés, un groupe formé de témoins et de traités à la dose 1 du Zoom et du Weatfert et la dose 2 du Decis et un deuxième groupe composé des traités à la dose 2 de ces traitements. Par contre, à trois mois de traitement, deux groupes sont constatés, un groupe composé des témoins et des traités au Decis (Dose 1 et Dose 2) et un autre groupe constitué des traités avec le Zoom et le Weatfert avec les deux doses appliquées (Dose 1 et Dose 2) (Fig. 22B).

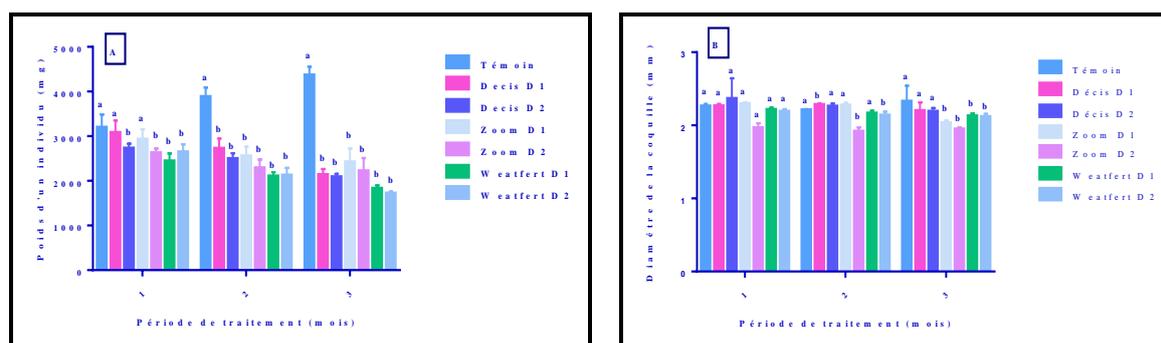


Figure 22. Efficacité comparée des traitements (Dose 1 et Dose 2) sur la croissance pondérale (A) et le diamètre de la coquille (B) des escargots pendant la période de traitement (m ± SEM).

Au bout du premier mois de traitement, le pourcentage d’inhibition de la masse moyenne des groupes DD1, DD2, ZD1, ZD2, WD1 et WD2 calculé est de 77,37 ; 81,26 ; 80,49 ; 82,71 ; 69,15 et 78,24% respectivement. Le pourcentage d’inhibition du diamètre coquillère moyen est de 36,11 ; 36,11 ; 41,66 ; 52,77 ; 47,22 et 58,33% respectivement. A la fin de l’expérience, le pourcentage d’inhibition de la masse moyenne des mêmes groupes est de 56,55 ; 61,55 ; 56,45 ; 63,94 ; 49,98 et 54,62% respectivement. Le pourcentage d’inhibition du diamètre coquillère moyen était de 31,66 ; 43,33 ; 45,55 ; 64,16 ; 40 et 64,16 respectivement (Tableau 10). Par ailleurs, on note que le Zoom est le traitement qui a plus d’effet sur ces paramètres par rapport au Decis et au Weatfert.

Tableau 10. Effets des traitements sur le taux d’inhibition de la masse moyenne et du diamètre moyen de la coquille des escargots juvéniles d’*H. vermiculata*.

| Traitement | Début de l’expérience | | 1 ^{er} mois | | 2 ^{ème} mois | | 3 ^{ème} mois | |
|------------|-----------------------|-------------|----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|
| | Pm (gr) | Dm (cm) | %Ipm | %IDm | %IPm | %IDm | %IPm | %IDm |
| Témoins | 2,51 ± 0,34 | 2,26 ± 0,13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DD1 | 2,55 ± 0,19 | 2,30 ± 0,10 | 77,37 a | 36,11 a | 62,85 a | 38,88 a | 56,55 a | 31,66 a |
| DD2 | 2,39 ± 0,26 | 2,28 ± 0,12 | 81,26 a | 36,11 a | 75,93 a | 61,11 b | 61,55 a | 43,33 a |
| ZD1 | 2,43 ± 0,19 | 2,35 ± 0,17 | 80,49 a | 41,66 a | 64,07 a | 40,27 a | 56,45 a | 45,55 a |
| ZD2 | 2,34 ± 0,30 | 1,98 ± 0,07 | 82,71 a | 52,77 a | 76,99 a | 50,00 a | 63,94 a | 64,16 b |
| WD1 | 2,49 ± 0,29 | 2,16 ± 0,08 | 69,15 a | 47,22 a | 55,95 a | 40,27 a | 49,98 a | 40,00 a |
| WD2 | 2,68 ± 0,21 | 2,17 ± 0,07 | 78,24 a | 58,33 a | 61,28 a | 59,72 a | 54,62 a | 64,16 b |

3.4. Effet sur la composition biochimique

Le Decis, le Zoom et le Weatfert ont été appliqués à deux doses (Dose 1 et Dose 2) sur les juvéniles d’*H. vermiculata*, leurs effets ont été évalués sur la composition biochimique de l’hépatopancréas (protéines, glucides et lipides) à 3 mois de traitement.

3.4.1. Effet du Decis

Le taux de protéines, de lipides et de glucides totaux dans l'hépatopancréas a été déterminé chez les juvéniles témoins et traités d'*H. vermiculata* à différentes périodes d'exposition (0, 1, 2 et 3 mois de traitement).

Une augmentation significative du taux de protéines a été observée au 1^{er} mois de traitement et avec la dose la plus forte ($F_{2,6}=6,391$: $p=0,0326$) et à 3 mois avec les deux doses testées ($F_{2,6}=21,7$: $p=0,0018$). Aucun effet n'a été signalé au cours du 2^{ème} mois de traitement ($p>0,05$) (Tableau 11).

Concernant le taux de glucides, les résultats présentent une diminution significative (Tableau 23) à tous les temps testés : 1mois ($F_{2,6}=96,8$: $p<0,0001$), 2mois ($F_{2,6}=75,56$: $p<0,0001$) et 3mois de traitement ($F_{2,6}=49,16$: $p=0,0002$). Aucun effet dose n'a été signalé (D1 vs D2 : $p>0,05$).

Les résultats du taux de lipides révèlent une diminution significative à 3 mois de traitement avec les deux doses appliquées ($F_{2,6}= 31,16$: $p=0,0007$) et à 1 mois de traitement avec la dose la plus forte ($F_{2,6}=8,22$: $p=0,019$). Aucun effet n'a été enregistré à 2 mois de traitement (Tableau 11).

Tableau 11. Effet de l'insecticide, Decis sur le taux de protéines, de glucides et de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* au cours de différentes périodes de traitement ($m \pm \text{SEM}$; $n=3$ répétitions).

| Composés | Temps (mois) | Témoins | Decis D1 | Decis D2 |
|-----------|--------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Protéines | 0 | 57,73 \pm 3,27 a | 57,73 \pm 3,27 a | 57,73 \pm 3,27 a |
| | 1 | 59,25 \pm 3,55 a | 68,47 \pm 3,35 a | 69,44 \pm 0,57 b |
| | 2 | 69,25 \pm 2,48 a | 69,86 \pm 3,87 a | 70,55 \pm 0,31 a |
| | 3 | 89,96 \pm 0,30 a | 101,99 \pm 3,17 b | 102,07 \pm 1,14 b |
| Glucides | 0 | 61,28 \pm 1,49 a | 61,28 \pm 1,49 a | 61,28 \pm 1,49 a |
| | 1 | 61,74 \pm 1,88 a | 37,07 \pm 2,13 b | 30,76 \pm 2,42 b |
| | 2 | 64,02 \pm 1,79 a | 34,02 \pm 2,02 b | 28,74 \pm 4,15 b |
| | 3 | 74,28 \pm 0,60 a | 30,03 \pm 6,80 b | 27,25 \pm 4,94 b |
| Lipides | 0 | 36,69 \pm 3,31 a | 36,69 \pm 3,31 a | 36,69 \pm 3,31 a |
| | 1 | 38,28 \pm 1,77 a | 34,04 \pm 2,38 a | 27,34 \pm 2,93 b |
| | 2 | 39,95 \pm 4,60 a | 33,73 \pm 2,32 a | 26,92 \pm 4,97 a |
| | 3 | 57,73 \pm 1,78 a | 32,53 \pm 6,75 b | 24,38 \pm 1,26 b |

3.4.2. Effet du Zoom

Le taux de protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) augmente d'une façon significative après 1 mois ($F_{2,6}= 8,026$: $p=0,0201$) et 3 mois ($F_{2,6}= 8,17$: $p=0,0194$) de traitement avec la dose 2 de l'herbicide Zoom. Aucun effet n'a été signalé à 2 mois de traitement (Tableau 12).

Les résultats de glucides montrent une diminution significative au cours de toutes les périodes de traitement avec l'herbicide : à 1 mois de traitement ($F_{2,6}= 44,48 : p=0,0003$), à 2 mois de traitement ($F_{2,6}= 35,14 : p=0,0005$) et à 3 mois de traitement ($F_{2,6}= 491,5 : p<0,0001$) (Tableau 24). Un effet dose a été signalé seulement à 3 mois de traitement (D1 vs D2 : $p=0,0005$).

En ce qui concerne le taux de lipides, les résultats révèlent une diminution significative à tous les temps testés : 1 mois ($F_{2,6}= 93,02 : p<0,0001$), 2 mois ($F_{2,6}= 22,23 : p=0,00017$) et 3 mois de traitement ($F_{2,6}= 1074 : p<0,0001$), sans aucun effet dose (D1 vs D2 : $p>0,05$).

Tableau 12. Effet de l'herbicide, Zoom sur le taux de protéines, de glucides et de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* au cours de différentes périodes de traitement ($m \pm \text{SEM}$; $n=3$ répétitions).

| Composés | Temps (mois) | Témoins | Zoom D1 | Zoom D2 |
|-----------|--------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Protéines | 0 | 57,73 \pm 3,27 a | 57,73 \pm 3,27 a | 57,73 \pm 3,27 a |
| | 1 | 59,25 \pm 3,55 a | 67,82 \pm 1,13 a | 69,94 \pm 2,36 b |
| | 2 | 69,25 \pm 2,48 a | 73,56 \pm 1,60 a | 73,65 \pm 1,99 a |
| | 3 | 89,96 \pm 11,31a | 90,12 \pm 7,07 a | 120,64 \pm 4,68 b |
| Glucides | 0 | 61,28 \pm 1,49 a | 61,28 \pm 1,49 a | 61,28 \pm 1,49 a |
| | 1 | 61,74 \pm 1,88 a | 31,02 \pm 4,36 b | 30,85 \pm 2,90 b |
| | 2 | 64,02 \pm 1,79 a | 30,05 \pm 4,00 b | 27,69 \pm 6,30 b |
| | 3 | 74,28 \pm 0,60 a | 29,59 \pm 2,93 b | 13,36 \pm 1,12 c |
| Lipides | 0 | 36,69 \pm 3,31 a | 36,69 \pm 3,31 a | 36,69 \pm 3,31 a |
| | 1 | 38,28 \pm 1,77 a | 24,23 \pm 0,92 b | 20,26 \pm 0,83 b |
| | 2 | 39,95 \pm 4,60 a | 23,11 \pm 1,05 b | 19,12 \pm 1,98 b |
| | 3 | 57,73 \pm 1,78 a | 6,76 \pm 1,01 b | 6,44 \pm 0,05 b |

3.4.3. Effet du Weatfert

Les résultats du dosage des protéines totales révèlent une augmentation significative chez les séries traitées avec la dose la plus élevée, au cours du 1^{er} mois (Témoin vs D2 : $p=0,0070$), et 3^{ème} mois (Témoin vs D2 : $p=0,008$) et avec les deux doses appliquées au 2^{ème} mois de traitement, (Témoin vs D1 : $p=0,0320$; Témoin vs D2 : $p=0,0132$). Aucun effet dose n'a été signalé au cours de tous les temps testés (Tableau 13).

Les résultats du taux de glucides révèlent une diminution significative chez les séries traitées par l'engrais Weatfert à la dose 2 par rapport aux témoins au 2^{ème} mois (Témoin vs D2 : $p=0,0002$), et avec les deux doses au 3^{ème} mois (Témoin vs D1 : $p=0,0003$, Témoin vs D2 : $p<0,0001$). L'effet dose a été signalé seulement après 3 mois de traitement (D1 vs D2 : $p=0,0003$) (Tableau 13).

Concernant le taux de lipides, les résultats obtenus indiquent une diminution significative chez les traités avec le Weatfert à tous les temps testés : 1^{er} mois (Témoin vs D1 : $p=0,005$; Témoins

vs Dose 2 : $p < 0,001$), 2^{ème} mois (Témoin vs D1 : $p=0,0019$; Témoins vs Dose 2 : $p < 0,001$) et 3^{ème} mois (Témoin vs D1 : $p=0,0098$, Témoin vs D2 : $p=0,0009$). L'effet dose a été signalé au cours du 1^{er} (D1 vs D2 : $p = 0,0184$) et 2^{ème} mois de traitement (D1 vs D2 : $p=0,0218$) (Tableau 13).

Tableau 4. Effet de l'engrais, Weatfert sur le taux de protéines, de glucides et de lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hétopancréas d'*H. vermiculata* au cours de différentes périodes de traitement ($m \pm \text{SEM}$; $n=3$ répétitions).

| Composés | Temps (mois) | Témoins | Weatfert D1 | Weatfert D2 |
|-----------|--------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Protéines | 0 | 57,73 \pm 3,27 a | 57,73 \pm 3,27 a | 57,73 \pm 3,27 a |
| | 1 | 59,25 \pm 3,55 a | 72,91 \pm 5,00 a | 88,64 \pm 7,12 b |
| | 2 | 69,25 \pm 2,48 a | 87,46 \pm 5,61 b | 91,57 \pm 5,84 b |
| | 3 | 89,96 \pm 11,31 a | 97,25 \pm 8,20 a | 130,66 \pm 1,85 b |
| Glucides | 0 | 61,28 \pm 1,49 a | 61,28 \pm 1,49 a | 61,28 \pm 1,49 a |
| | 1 | 61,74 \pm 1,88 a | 59,31 \pm 2,29 a | 52,61 \pm 3,57 a |
| | 2 | 64,02 \pm 1,79 a | 57,92 \pm 0,89 a | 40,81 \pm 3,41 b |
| | 3 | 74,28 \pm 0,60 a | 48,94 \pm 4,49 b | 22,92 \pm 1,18 c |
| Lipides | 0 | 36,69 \pm 3,31 a | 36,69 \pm 3,31 a | 36,69 \pm 3,31 a |
| | 1 | 38,28 \pm 1,77 a | 27,88 \pm 1,24 b | 19,84 \pm 2,46 c |
| | 2 | 39,61 \pm 1,49 a | 27,00 \pm 2,57 b | 19,39 \pm 1,32 c |
| | 3 | 57,73 \pm 1,78 a | 18,57 \pm 2,28 b | 14,65 \pm 0,70 b |

3.4.4. Efficacité comparée des traitements sur la composition biochimique

3.4.4.1. Taux de protéines

Le classement des taux de protéines dans l'hétopancréas des individus témoins et traités à la première dose (D1) des trois molécules, réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier deux groupes de moyennes au premier mois ($F_{3,8}=4,28$: $p=0,0444$) et au deuxième mois de traitement ($F_{3,8}=9,067$: $p=0,059$), le premier est constitué des témoins et des traités par le Decis et le Zoom et le second formé des traités par l'engrais, weatfert. A trois mois de traitement, un seul groupe a été identifié qui englobe toutes les séries ($p>0,05$).

Concernant les séries traitées à la Dose 2, la comparaison des valeurs moyennes révèle deux groupes de moyennes à un mois ($F_{3,8}=13,46$: $p=0,0017$) et à deux mois de traitement ($F_{3,8}=16,14$: $p=0,0009$), un groupe composé des témoins et des traités au Decis et au Zoom et un deuxième groupe constitué des traités au Weatfert. A trois mois de traitement ($F_{3,8}=15,16$: $p=0,0012$), deux groupes ont été également constatés, le premier groupe renferme les témoins et les traités au Decis et le second groupe englobe les traités au Zoom et au weatfert (Fig. 23).

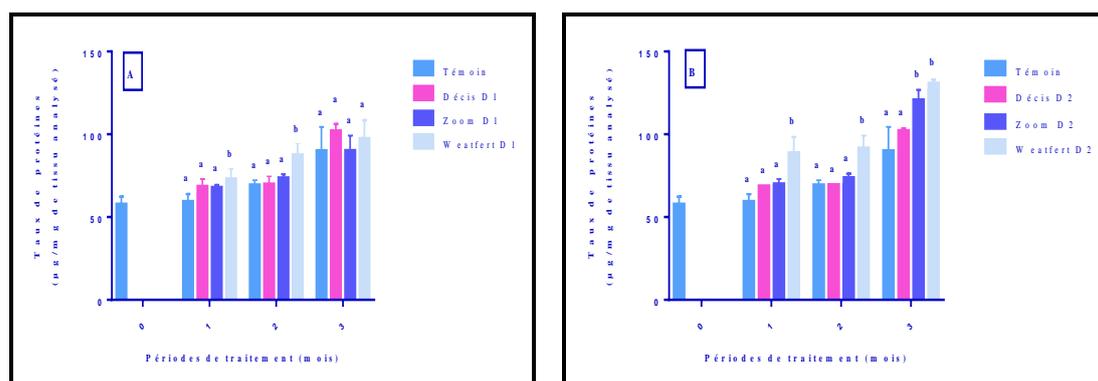


Figure 4. Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur le taux de protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

3.4.4.2. Taux de glucides

Le classement des taux de glucides dans l'hépatopancréas des individus témoins et traités à la première dose (D1) des trois molécules, réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier deux groupes de moyennes au premier mois ($F_{3,8}=45,05$: $p<0,0001$), un groupe constitué des témoins et des traités par le Weatfert et un second groupe formé des traités par le Decis et le Zoom. A deux mois de traitement, trois groupes ont été identifiés, le premier groupe englobe les témoins et le deuxième groupe renferme les traités par le Decis et le Zoom et un dernier groupe formé des traités par le Weatfert ($p>0,05$). Par ailleurs, à trois mois de traitement, deux groupes ont été également constatés (Fig. 24A)

Concernant les séries traitées à la Dose 2, la comparaison des valeurs moyennes révèle deux groupes de moyennes à un mois ($F_{3,8}=13,46$: $p=0,0017$) et à deux mois de traitement ($F_{3,8}=16,14$: $p=0,0009$), un groupe composé des témoins et des traités au Decis et au Zoom et un deuxième groupe constitué des traités au Weatfert. A trois mois de traitement ($F_{3,8}=15,16$: $p=0,0012$), deux groupes ont été également constatés, le premier groupe renferme les témoins et les traités au Decis et le second groupe englobe les traités au Zoom et au Weatfert (Fig. 24B).

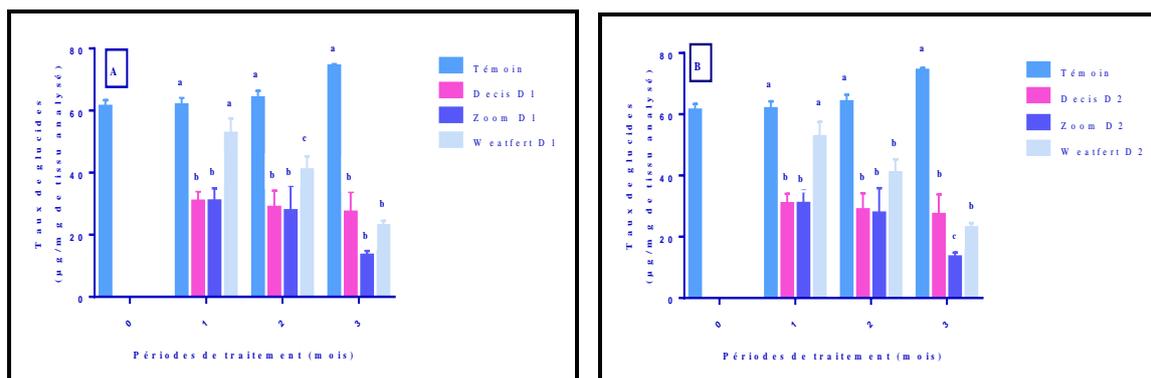


Figure 5. Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur le taux de glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

3.4.4.3. Taux de lipides

Le classement des taux de glucides dans l'hépatopancréas des individus témoins et traités à la première dose (D1) des trois molécules, réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier deux groupes de moyennes au premier mois ($F_{3,8}=21,07 : p=0,0004$) et au deuxième mois de traitement ($F_{3,8}=10,55 : p=0,0037$), un premier groupe constitué des témoins et des traités par le Decis et un second groupe formé des traités par le Zoom et le Weatfert. A trois mois de traitement ($F_{3,8}=60,06 : p<0,0001$), trois groupes ont été identifiés, le premier groupe englobe les témoins, le deuxième groupe renferme les traités par le Decis et un dernier groupe formé des traités par le Zoom et le Weatfert (Fig. 25A).

Concernant les séries traitées à la Dose 2, la comparaison des valeurs moyennes révèle deux groupes de moyennes à un mois ($F_{3,8}=26,98 : p=0,0002$) et à deux mois de traitement ($F_{3,8}=12,19 : p=0,0024$), un groupe composé des témoins et un second groupe renferme toutes les séries traitées. Par ailleurs à trois mois de traitement ($F_{3,8}=611,1 : p<0,0001$), quatre groupes ont été constatés, chacun étant constitué d'une série (Fig. 25B).

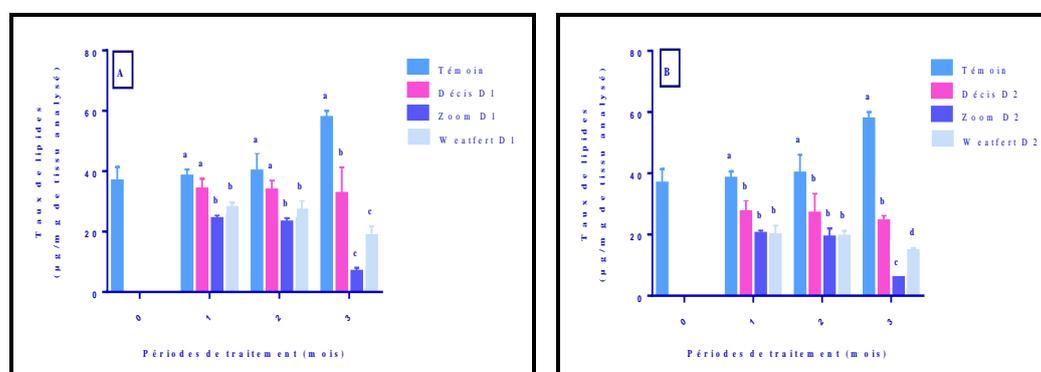


Figure 25. Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur le taux de lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

3.5. Impact des traitements sur les biomarqueurs

Le Decis, le Zoom et le Weatfert ont été appliqués sur les juvéniles d'*H. vermiculata* avec deux doses et leurs effets ont été évalués à différentes périodes (1, 2 et 3 mois de traitement). Ils ont été testés sur un biomarqueur de détoxification, les glutathion S-transférases (GSTs), et trois biomarqueurs du stress oxydatif : lactate déshydrogénase (LDH), catalase et glutathion peroxydase (GPx).

3.5.1. Effet sur l'activité de la lactate déshydrogénase

Les résultats de l'effet de l'insecticide, Decis sur l'activité spécifique de la LDH chez les juvéniles *H. vermiculata* à différentes périodes de traitement sont présentés dans le tableau 14. Ces derniers montrent une augmentation significative de ce biomarqueur chez les traités avec les deux doses appliquées au cours du premier mois (Témoin vs Decis D1 : $p=0,0010$; Témoin vs Decis D2 : $p=0,0003$), deuxième mois (Témoin vs Decis D1 : $p=0,0262$; Témoin vs Decis D2 : $p=0,0413$) et troisième mois de traitement (Témoin vs Decis D1 : $p=0,0016$; Témoin vs Decis D2 : $p=0,0011$). Aucun effet dose n'a été enregistré au cours des périodes testées (D1 vs D2 : $p>0,05$).

Par ailleurs, l'activité de ce biomarqueur après traitement au Zoom avec les deux doses (Dose 1 et Dose 2) marque une augmentation significative chez les séries traitées comparativement aux témoins, à 1 mois (Témoin vs Zoom D1 : $p=0,0360$; Témoin vs Zoom D2 : $p=0,0106$), à 2 mois (Témoin vs Zoom D1 : $p=0,0034$; Témoin vs Zoom D2 : $p=0,0013$) et à 3 mois du traitement (Témoin vs Zoom D1 : $p=0,0021$; Témoin vs Zoom D2 : $p=0,0004$). Aucun effet dose n'a été enregistré durant toutes les périodes de traitement.

Les résultats de l'activité spécifique de la LDH révèlent une augmentation significative chez les traités par le Weatfert avec les deux doses testées (Dose 1 et Dose 2) et cela à toutes les périodes de traitement : 1 mois (Témoin vs Weatfert D1 : $p=0,0031$; Témoin vs Weatfert D2 : $p=0,0003$) à 2 mois (Témoin vs Weatfert D1 : $p=0,0015$; Témoin vs Weatfert D2 : $p=0,0002$) et à 3 mois de traitement (Témoin vs Weatfert D1 : $p=0,0003$; Témoin vs Weatfert D2 : $p=0,0002$). L'effet dose a été enregistré au cours du premier mois seulement (Weatfert D1 vs Weatfert D2 : $p=0,0361$).

Tableau 14. Effet du Decis, du Zoom et du Weatfert sur l'activité de la LDH ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) dans l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* ($m \pm \text{SEM}$; $n=3$).

| Traitements | Temps (mois) | Témoin | Dose 1 | Dose 2 |
|-------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Decis | 0 | 12,53 \pm 0,06 a | 12,53 \pm 0,06 a | 12,53 \pm 0,06 a |
| | 1 | 11,30 \pm 0,02 a | 12,80 \pm 0,32 b | 13,23 \pm 0,12 b |
| | 2 | 11,45 \pm 0,56 a | 13,89 \pm 0,05 b | 13,63 \pm 0,79 b |
| | 3 | 11,25 \pm 0,31 a | 14,18 \pm 0,44 b | 14,38 \pm 0,46 b |
| Zoom | 0 | 12,05 \pm 0,28 a | 12,05 \pm 0,28 a | 12,05 \pm 0,28 a |
| | 1 | 11,30 \pm 0,02 a | 13,21 \pm 0,80 b | 13,83 \pm 0,35 b |
| | 2 | 11,45 \pm 0,56 a | 13,85 \pm 0,40 b | 14,35 \pm 0,05 b |
| | 3 | 11,25 \pm 0,31 a | 14,01 \pm 0,20 b | 15,03 \pm 0,55 b |
| Weatfert | 0 | 12,05 \pm 0,28 a | 12,05 \pm 0,28 a | 12,05 \pm 0,28 a |
| | 1 | 11,30 \pm 0,02 a | 13,14 \pm 0,44 b | 14,22 \pm 0,21 c |
| | 2 | 11,45 \pm 0,56 a | 13,80 \pm 0,12 b | 14,84 \pm 0,06 b |
| | 3 | 11,25 \pm 0,31 a | 15,21 \pm 0,02 b | 15,56 \pm 0,66 b |

Le classement de l'activité de la LDH dans l'hépatopancréas des individus témoins et traités à la première dose (D1) des trois molécules, réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier deux groupes de moyennes au premier mois ($F_{3,8}=5,25$: $p=0,0271$), un groupe constitué des témoins et des traités par le Decis et un second groupe formé des traités par le Zoom et le Weatfert. Au deuxième mois de traitement ($F_{3,8}=13,35$: $p=0,0018$), deux groupes ont été également constatés, le premier composé des témoins et un groupe qui renferme toutes les séries traitées. Par contre à trois mois ($F_{3,8}=53,16$: $p<0,0001$), trois groupes ont été identifiés, le premier groupe englobe les témoins, le deuxième groupe renferme les traités par le Decis et le Zoom et un dernier groupe formé des traités par le Weatfert (Fig. 26A).

Concernant les traités à la Dose 2, la comparaison des valeurs moyennes révèle trois groupes de moyennes à un mois ($F_{3,8}=61,04$: $p<0,0001$), un groupe composé des témoins, un second renferme les traités avec le Decis et le Zoom et un dernier constitué des traités avec le Weatfert. Par ailleurs à deux mois ($F_{3,8}=16,46$: $p=0,0009$) et à trois mois de traitement ($F_{3,8}=23,1$: $p=0,0003$), deux groupes ont été constatés, un groupe témoin et un groupe renfermant tous les traités (Fig. 26B).

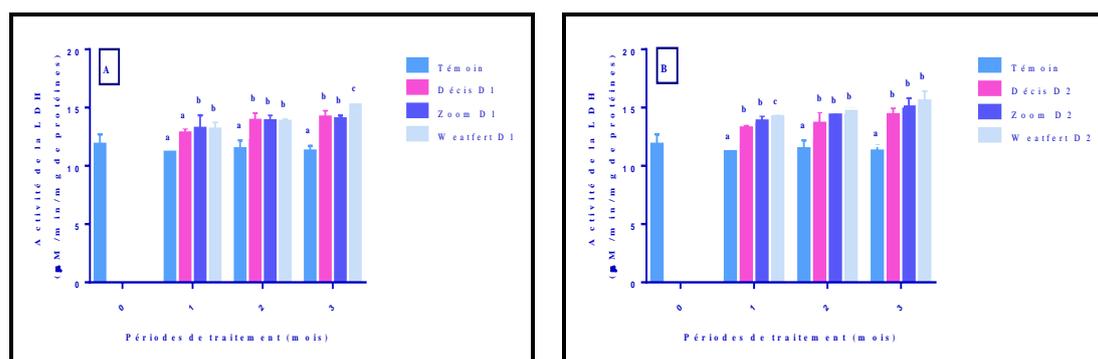


Figure 26. Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur l'activité spécifique de la LDH ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots témoins et traités ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

3.5.2. Effet sur l'activité de la glutathion peroxydase

Les résultats mentionnés dans le tableau 15, indique une augmentation significative de l'activité spécifique de la GPx dans l'hépatopancréas des escargots traités avec l'insecticide Decis à 1 mois (Témoin vs Decis D1 : $p=0,0023$; Témoin vs Decis D2 : $p<0,0001$) et à 3 mois (Témoin vs Decis D1 : $p=0,0234$; Témoin vs Decis D2 : $p=0,0013$) de traitement avec les deux doses appliquées et à 2 mois avec la plus forte dose (Dose 2) (Témoin vs Decis D2 : $p=0,0047$). Un effet dose a été signalé au cours du premier mois (Decis D1 vs Decis D2 : $p=0,0001$) et deuxième mois de traitement (Decis D1 vs Decis D2 : $p=0,0414$).

Par ailleurs, le traitement par le Zoom a induit une augmentation significative de l'activité de la GPx au cours de toutes les périodes de traitement avec un effet dose : 1 mois (Témoin vs Zoom D1 : $p=0,0018$; Témoin vs Zoom D2 : $p=0,0001$; Zoom D1 vs Zoom D2 : $p=0,0133$), 2 mois (Témoin vs Zoom D1 : $p=0,0130$; Témoin vs Zoom D2 : $p=0,0002$; Zoom D1 vs Zoom D2 : $p=0,0055$) et 3 mois de traitement (Témoin vs Zoom D1 : $p=0,0004$; Témoin vs Zoom D2 : $p<0,0001$; Zoom D1 vs Zoom D2 : $p<0,0001$).

Finalement, les résultats du dosage de ce biomarqueur montrent une augmentation significative après traitement par l'engrais, Weatfert à un mois (Témoin vs Weatfert D1 : $p=0,0023$; Témoin vs Weatfert D2 : $p<0,0001$), à deux mois (Témoin vs Weatfert D1 : $p=0,0047$; Témoin vs Weatfert D2 : $p=0,0414$) et à trois mois de traitement (Témoin vs Weatfert D1 : $p=0,0234$; Témoin vs Weatfert D2 : $p=0,0013$). Un effet dose a été enregistré au cours du premier (Weatfert D1 vs Weatfert D2 : $p=0,0001$) et du troisième mois de traitement (Weatfert D1 vs Weatfert D2 : $p=0,0039$).

Tableau 15. Effet du Decis, du Zoom et du Weatfert sur l'activité de la glutathion peroxydase de l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

| Traitements | Temps (mois) | Témoin | Dose 1 | Dose 2 |
|-------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Decis | 0 | 25,24 \pm 0,12 a | 25,51 \pm 0,40 a | 25,56 \pm 0,80 a |
| | 1 | 25,34 \pm 0,78 a | 30,97 \pm 0,56 b | 40,78 \pm 1,04 c |
| | 2 | 25,42 \pm 2,74 a | 32,29 \pm 3,80 a | 43,24 \pm 2,07 b |
| | 3 | 26,84 \pm 1,06 a | 35,27 \pm 1,49 b | 42,09 \pm 3,21 c |
| Zoom | 0 | 25,24 \pm 0,12 a | 25,51 \pm 0,40 a | 25,56 \pm 0,80 a |
| | 1 | 25,34 \pm 0,79 a | 35,41 \pm 1,19 b | 42,60 \pm 2,12 c |
| | 2 | 25,42 \pm 2,74 a | 34,15 \pm 1,73 b | 44,61 \pm 0,81 c |
| | 3 | 26,84 \pm 1,06 a | 35,26 \pm 0,81 b | 46,55 \pm 0,85 c |
| Weatfert | 0 | 25,24 \pm 0,12 a | 25,51 \pm 0,40 a | 25,56 \pm 0,80 a |
| | 1 | 25,34 \pm 0,79 a | 42,09 \pm 1,54 b | 47,55 \pm 1,19 c |
| | 2 | 25,42 \pm 2,74 a | 45,82 \pm 0,98 b | 49,90 \pm 1,13 b |
| | 3 | 26,84 \pm 1,06 a | 46,33 \pm 0,18 b | 50,61 \pm 0,85 c |

Le classement de l'activité de la GPx dans l'hépatopancréas des individus témoins et traités à la première dose (D1) des trois molécules, réalisé grâce au test HSD de Tukey a permis d'identifier quatre groupes de moyennes au premier mois ($F_{3,8}=146,3 : p<0,0001$), chacun étant constitué d'une série. Au deuxième mois de traitement ($F_{3,8}=24,58 : p=0,0002$), deux groupes ont été constatés, le premier composé des témoins, et des traités au Decis et au Zoom et un second groupe renfermant les traités au Waetfert. Par contre au troisième mois ($F_{3,8}=139 : p<0,0001$), trois groupes ont été identifiés, le premier groupe englobe les témoins, le deuxième groupe renferme les traités par le Decis et le Zoom et un dernier groupe formé des traités par le Weatfert (Fig. 27 A).

Concernant les traités à la Dose 2, la comparaison des valeurs moyennes révèle trois groupes de moyennes à un mois ($F_{3,8}=79,35 : p<0,0001$), un groupe composé des témoins, un second renferme les traités avec le Decis et le Zoom et un dernier constitué des traités par le Weatfert. Par ailleurs à deux mois ($F_{3,8}=56,51 : p<0,0001$) et à trois mois de traitement ($F_{3,8}=57,64 : p<0,0001$), deux groupes ont été constatés, un groupe témoin et un groupe renfermant tous les traités (Fig. 27B).

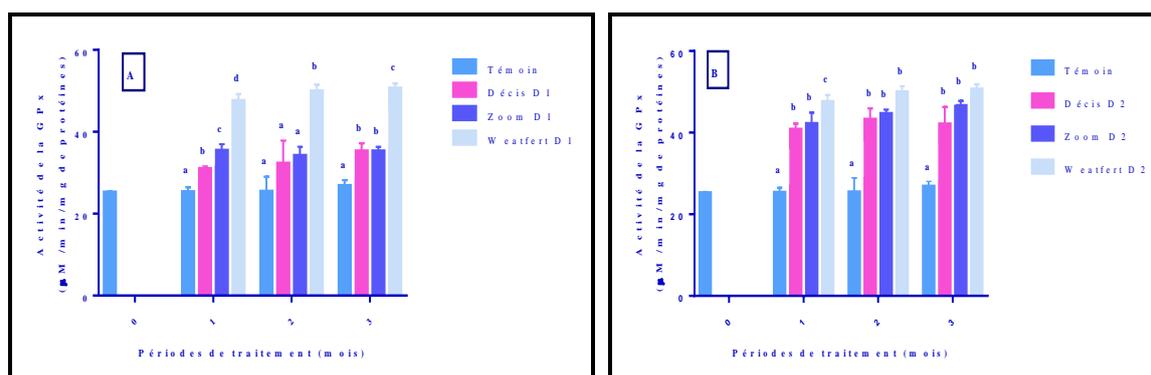


Figure 27. Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur l'activité spécifique de la GPx ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots témoins et traités ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

3.5.3. Effet sur l'activité de la catalase

Les résultats obtenus mentionnés dans le tableau 16, indiquent une augmentation significative de l'activité spécifique de la catalase de l'hétopancreas à 3 mois de traitement avec l'insecticide Decis chez les juvéniles d'*H. vermiculata* et cela au cours du 1^{er} mois (Témoïn vs Decis D2 : $p=0,0179$), 2^{ème} mois (Témoïn vs Decis D1 : $p=0,0006$; Témoïn vs Decis D2 : $p=0,0006$), et 3^{ème} mois de traitement (Témoïn vs Decis D1 : $p=0,0005$; Témoïn vs Decis D2 : $p=0,0002$).

Par ailleurs, le traitement par le Zoom induit une augmentation significative de ce biomarqueur au cours des différentes périodes de traitement : 1^{er} mois (Témoïn vs Zoom D1 : $p=0,0022$; Témoïn vs Zoom D2 : $p=0,0007$), 2^{ème} mois (Témoïn vs Zoom D1 : $p=0,0026$; Témoïn vs Zoom D2 ; $p=0,0013$) et 3^{ème} mois (Témoïn vs Zoom D1 : $p<0,0001$; Témoïn vs Zoom D2 : $p<0,0001$). Aucun effet dose n'a été enregistré au cours de toutes les périodes tétées.

Les résultats de l'activité de la catalase révèlent une augmentation significative chez les traités par le Weatfert avec la dose la plus forte (Dose 2) au 1^{er} mois (Témoïn vs Weatfert D2 : $p=0,0180$) et au 2^{ème} mois de traitement (Témoïn vs Weatfert D2 : $p=0,0225$) et avec les deux doses appliquées à 3 mois (Témoïn vs Weatfert D1 : $p=0,0012$; Témoïn vs Weatfert D2 : $p=0,0005$).

Tableau 5. Effet du Decis, du Zoom et du Weatfert sur l'activité de la catalase dans l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

| Traitements | Temps (mois) | Témoin | Dose 1 | Dose 2 |
|-------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Decis | 0 | 23,25 \pm 1,72 a | 23,25 \pm 1,72 a | 23,25 \pm 1,72 a |
| | 1 | 23,28 \pm 0,93 a | 28,14 \pm 1,77 a | 30,52 \pm 1,94 b |
| | 2 | 22,17 \pm 0,30 a | 35,65 \pm 1,80 b | 35,63 \pm 2,15 b |
| | 3 | 22,36 \pm 2,04 a | 36,75 \pm 0,78 b | 39,39 \pm 1,79 b |
| Zoom | 0 | 23,25 \pm 1,72 a | 23,25 \pm 1,72 a | 23,25 \pm 1,72 a |
| | 1 | 23,28 \pm 0,93 a | 34,49 \pm 2,36 b | 37,29 \pm 1,34 b |
| | 2 | 22,17 \pm 0,30 a | 37,10 \pm 3,26 b | 39,32 \pm 2,48 b |
| | 3 | 22,36 \pm 2,04 a | 39,50 \pm 0,23 b | 41,01 \pm 0,57 b |
| Weatfert | 0 | 23,25 \pm 1,72 a | 23,25 \pm 1,72 a | 23,25 \pm 1,72 a |
| | 1 | 23,28 \pm 0,93 a | 28,42 \pm 0,43 a | 35,28 \pm 4,79 b |
| | 2 | 22,17 \pm 0,30 a | 31,33 \pm 1,73 a | 36,45 \pm 5,85 b |
| | 3 | 22,36 \pm 2,04 a | 35,28 \pm 1,85 b | 37,55 \pm 0,87 b |

Le classement de l'activité de la catalase dans l'hépatopancréas des individus témoins et traités à la première dose (D1) des trois molécules, réalisé grâce au test HSD de Tukey a révélé deux groupes de moyennes au premier mois ($F_{3,8}=14,79$: $p=0,013$), un groupe constitué des témoins et des traités avec le Weatfert et un second groupe formé par les traités au Decis et au Zoom. A deux mois ($F_{3,8}=18,75$: $p=0,0006$), et à trois mois de traitement ($F_{3,8}=42,44$: $p<0,0001$), deux groupes ont été également constatés, le premier composé des témoins et un deuxième groupe renferme toutes les séries traitées (Fig. 28A).

Concernant les traités à la Dose 2, la comparaison des valeurs moyennes révèle deux groupes de moyennes à un mois ($F_{3,8}=8,65$: $p=0,0068$), un groupe composé des témoins et des traités au Decis et un second renferme les traités avec le Zoom et le Weatfert. Par ailleurs à deux mois ($F_{3,8}=8,86$: $p=0,0064$) et à trois mois de traitement ($F_{3,8}=56,61$: $p<0,0001$), deux groupes ont été également signalés, un groupe témoin et un groupe renfermant tous les traités (Fig. 28B).

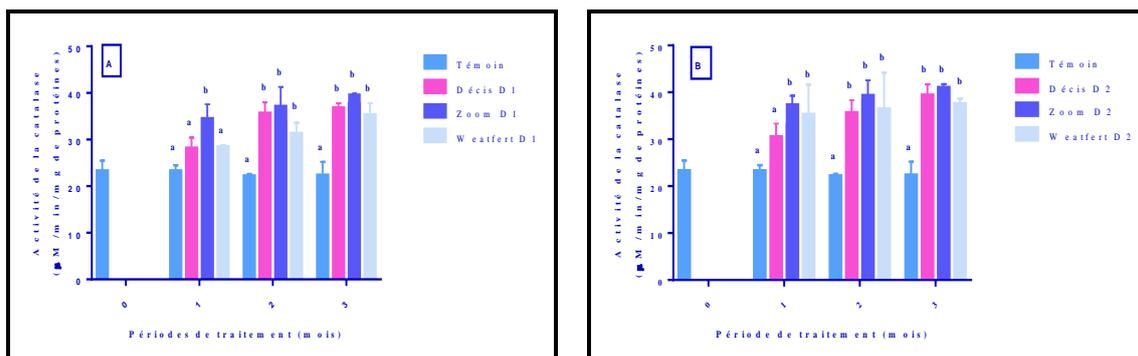


Figure 6. Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur l'activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots témoins et traités ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

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

Les résultats de l'activité spécifique des glutathion-S-transférases présentés dans le tableau 17, révèlent une augmentation significative chez les juvéniles d'*H. vermiculata* traités avec les deux doses du Decis à 1 mois (Témoin vs Decis D1 : $p=0,0023$; Témoin vs Decis D2 : $p=0,0015$), à 2 mois (Témoin vs Decis D1 : $p<0,0001$; Témoin vs Decis D2 : $p<0,0001$) et à 3 mois de traitement (Témoin vs Decis D1 : $p<0,0001$; Témoin vs Decis D2 : $p<0,0001$), avec un effet dose (Decis D1 vs Decis D2 : $p=0,0218$).

Par ailleurs, l'application du Zoom induit une augmentation significative de l'activité des GSTs au cours du 1^{er} mois avec la dose la plus forte (Témoin vs Zoom D2 : $p=0,0238$), et avec les deux doses à deux mois (Témoin vs Zoom D1 : $p=0,0148$, Témoin vs Zoom D2 : $p=0,0036$) et à trois mois de traitement (Témoin vs Zoom D1 : $p=0,0072$, Témoin vs Zoom D2 : $p=0,0013$). Aucun effet dose n'a été signalé (Zoom D1 vs Zoom D2 : $p>0,05$).

L'activité spécifique des GSTs dans l'hépatopancréas des escargots traités avec le Weatfert marque une augmentation significative à 1 mois (Témoin vs Weatfert D2 : $p=0,0082$) et à 3 mois de traitement avec la dose la plus élevée (Témoin vs Weatfert D2 : $p=0,0007$, Weatfert D1 vs Weatfert D2 : $p=0,0049$). Aucun effet n'a été signalé à 2 mois de traitement ($p>0,05$).

Tableau 6. Effet du Decis, du Zoom et du Weatfert sur l'activité des glutathion-S-transférases dans l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

| Traitements | Temps (mois) | Témoin | Dose 1 | Dose 2 |
|-------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Decis | 0 | 31,72 \pm 0,10 a | 31,72 \pm 0,10 a | 31,72 \pm 0,10 a |
| | 1 | 31,36 \pm 0,61 a | 41,92 \pm 2,29 b | 42,85 \pm 1,55 b |
| | 2 | 31,53 \pm 1,24 a | 46,09 \pm 0,68 b | 45,33 \pm 0,47 b |
| | 3 | 31,92 \pm 0,55 a | 49,56 \pm 0,35 b | 47,60 \pm 0,49 c |
| Zoom | 0 | 31,31 \pm 0,30 a | 31,31 \pm 0,30 a | 31,31 \pm 0,30 a |
| | 1 | 31,36 \pm 0,61 a | 32,48 \pm 0,15 a | 33,32 \pm 0,50 b |
| | 2 | 31,53 \pm 1,24 a | 35,17 \pm 0,48 b | 36,42 \pm 0,51 b |
| | 3 | 31,92 \pm 0,55 a | 36,42 \pm 1,11 b | 38,17 \pm 0,76 b |
| Weatfert | 0 | 31,74 \pm 0,07 a | 31,74 \pm 0,07 a | 31,74 \pm 0,07 a |
| | 1 | 31,36 \pm 0,61 a | 32,94 \pm 0,43 a | 33,85 \pm 0,39 b |
| | 2 | 31,53 \pm 1,24 a | 33,10 \pm 0,02 a | 34,60 \pm 2,54 a |
| | 3 | 31,92 \pm 0,55 a | 33,24 \pm 0,07 a | 36,18 \pm 0,71 b |

Le classement de l'activité de la catalase dans l'hépatopancréas des individus témoins et traités à la première dose (D1) des trois molécules, réalisé grâce au test HSD de Tukey a révélé deux groupes de moyennes au premier mois ($F_{3,8}=14,79$: $p=0,013$), un groupe constitué des témoins et des traités avec le Zoom et le Weatfert et un second groupe formé par les traités au Decis. A deux mois ($F_{3,8}=18,75$: $p=0,0006$), et à trois mois de traitement ($F_{3,8}=42,44$: $p<0,0001$), trois groupes ont été également constatés, le premier composé des témoins et des traités par le Weatfert, un deuxième groupe renferme les traités par le Decis et un troisième groupe composé des traités par le Zoom (Fig. 29A).

Concernant les traités à la Dose 2, la comparaison des valeurs moyennes révèle deux groupes de moyennes à un mois ($F_{3,8}=8,65$: $p=0,0068$), et à deux mois de traitement ($F_{3,8}=8,86$: $p=0,0064$), un groupe composé des témoins et des traités avec le Zoom et le Weatfert et un second renferme les traités avec le Decis. Par ailleurs à trois mois de traitement ($F_{3,8}=56,61$: $p<0,0001$), trois groupes ont été signalés, un groupe témoin, un groupe renfermant les traités avec le Decis et un dernier groupe formé des traités avec le Zoom et le Weatfert (Fig. 29B).

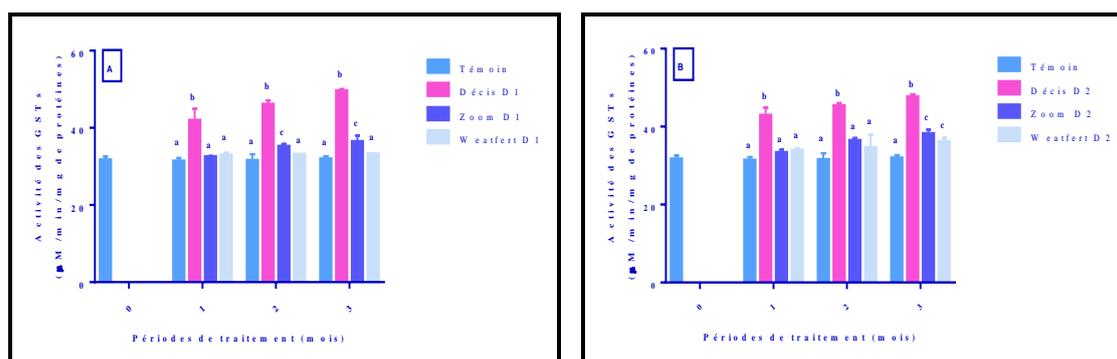


Figure 29. Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur l'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots témoins et traités ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

3.6. Effet sur la vitellogénine

Les résultats du dosage de la vitellogénine chez les séries témoins et traitées sont mentionnés dans le tableau 18. Ils révèlent une diminution significative du taux de la vitellogénine chez *H. vermiculata* traité par le Decis avec les deux doses (Dose 1 et Dose 2) et au cours de tous les temps testés : 1 mois ($F_{3,8}=130,6$: $p<0,0001$), 2 mois ($F_{3,8}=1670$: $p<0,0001$) et 3 mois de traitement ($F_{3,8}=182$: $p<0,0001$). Aucun effet dose n'a été enregistré (Dose 1 vs Dose 2 : $p>0,05$).

Le traitement par le Zoom induit également une diminution significative du taux de la vitellogénine chez *H. vermiculata* avec les deux doses à 1 mois de traitement ($F_{3,8}=202,6$: $p<0,0001$), à deux mois ($F_{3,8}=718,7$: $p<0,0001$) et à trois mois de traitement ($F_{3,8}=337$: $p<0,0001$). Un effet dose a été signalé au cours du 1^{er} et 2^{ème} mois de traitement (Zoom D1 vs Zoom D2 : $p=0,0126$ et $p=0,0491$) respectivement.

Les résultats du taux de la vitellogénine chez *H. vermiculata* traité par le Weatfert avec les deux doses (Dose 1 et Dose 2) révèlent une diminution significative au cours de tous les temps testés : 1 mois ($F_{3,8}=129,2$: $p<0,0001$), 2 mois ($F_{3,8}=18,94$: $p=0,0026$) et 3 mois de traitement ($F_{3,8}=150,4$: $p<0,0001$). Aucun effet dose n'a été enregistré (Dose 1 vs Dose 2 : $p>0,05$) au cours des périodes testées.

Tableau 18. Effet du Decis, du Zoom et du Weatfert sur le taux de la vitellogénine chez *H. vermiculata* ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

| Traitements | Temps (mois) | Témoin | Dose 1 | Dose 2 |
|-------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Decis | 0 | 255,18 \pm 2,85 a | 255,18 \pm 2,85 a | 255,18 \pm 2,85 a |
| | 1 | 301,61 \pm 11,71 a | 171,18 \pm 8,38 b | 169,56 \pm 2,82 b |
| | 2 | 326,66 \pm 4,63 a | 173,61 \pm 1,42 b | 176,37 \pm 0,79 b |
| | 3 | 358,23 \pm 16,15 a | 168,94 \pm 5,39 b | 164,99 \pm 6,92 b |
| Zoom | 0 | 255,18 \pm 2,85 a | 255,18 \pm 2,85 a | 255,18 \pm 2,85 a |
| | 1 | 301,61 \pm 11,71 a | 177,66 \pm 3,46 b | 142,28 \pm 5,20 c |
| | 2 | 326,66 \pm 4,63 a | 158,04 \pm 5,90 b | 141,37 \pm 3,46 c |
| | 3 | 358,23 \pm 16,15 a | 135,30 \pm 1,88 b | 124,28 \pm 2,34 b |
| Weatfert | 0 | 255,18 \pm 2,85 a | 255,18 \pm 2,85 a | 255,18 \pm 2,85 a |
| | 1 | 301,61 \pm 11,71 a | 184,13 \pm 4,98 b | 183,90 \pm 4,00 b |
| | 2 | 326,66 \pm 4,63 a | 243,13 \pm 20,50 b | 221,61 \pm 17,80 b |
| | 3 | 358,23 \pm 16,15 a | 174,66 \pm 9,68 b | 173,13 \pm 6,22 b |

Le classement de l'activité de la catalase dans l'hépatopancréas des individus témoins et traités à la première dose (D1) des trois molécules, réalisé grâce au test HSD de Tukey a révélé deux groupes de moyennes au premier mois ($F_{3,8}=104,7 : p<0,0001$), un groupe constitué des témoins et un second groupe formé des traités au Decis au Zoom et au Weatfert. A deux mois ($F_{3,8}=77,69 : p<0,0001$), et à trois mois de traitement ($F_{3,8}=178,8 : p<0,0001$), trois groupes ont été également constatés, le premier composé des témoins, un deuxième groupe renferme les traités par le Decis et le Zoom et un troisième groupe composé des traités par le Weatfert (Fig. 30A).

Concernant les traités à la Dose 2, la comparaison des valeurs moyennes révèle trois groupes de moyennes à un mois ($F_{3,8}=174,4 : p<0,0001$), et à trois mois de traitement ($F_{3,8}=211,4 : p<0,0001$), un groupe composé des témoins, un second groupe constitué des traités avec le Decis et le Weatfert et un troisième groupe renfermant les traités avec le Zoom. Par ailleurs à deux mois de traitement ($F_{3,8}=113,5 : p<0,0001$), quatre groupes ont été signalés, chacun étant constitué d'une série (Fig. 30B).

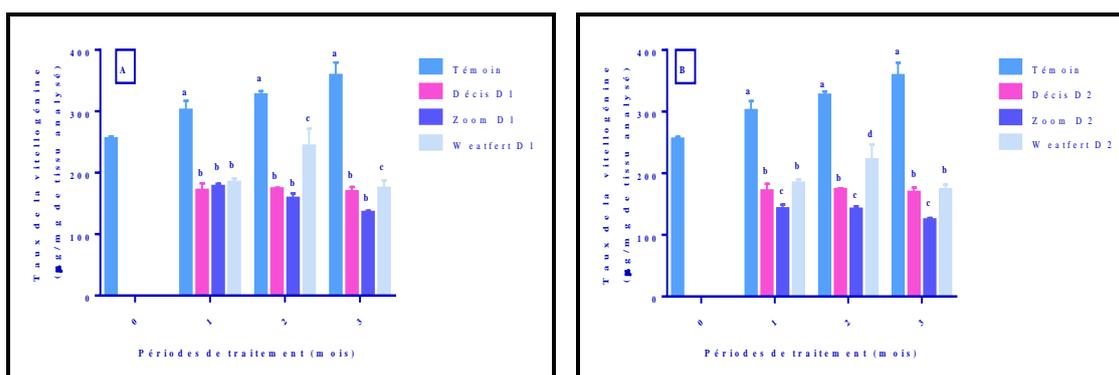


Figure 30. Efficacité comparée des traitements avec la Dose 1 (A) et la Dose 2 (B) sur le taux de la vitellogénine ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) chez les escargots témoins et traités ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$).

3.7. Effet sur la structure histopathologique de l'hépatopancréas

Des sections histologiques de l'hépatopancréas des témoins à 0 jour et à 3 mois sont illustrées dans les figures (31, 32 et 33 A et B). Ces coupes montrent la structure histologique de la glande digestive d'*H. vermiculata* qui est constituée essentiellement de la juxtaposition de nombreux tubules digestifs de différentes tailles et formes, connectés par l'espace intertubulaire, constitué de vaisseaux hémolymphatiques et d'hématocytes. Un épithélium simple associant plusieurs types cellulaires bordé la lumière de ces tubules. Ces cellules présentent des morphologies diverses mais révèlent trois types principales : les cellules digestives, les cellules à calcium et les cellules excrétrices. Les tubules sont maintenus cohérents par le tissu intertubulaire connectif. Les cellules digestives sont relativement polymorphes selon le stade de la digestion, et elles constituent la principale composante cellulaire de l'épithélium des tubules de la glande digestive.

3.7.1. Effet du Decis

Après trois mois de traitement avec le Decis, l'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots traités a montré des altérations. A la dose 1, un début d'inflammation des membranes des tubules digestifs et une dégénérescence partielle de certaines cellules digestives sont observées. De plus, quelques tubules ont montré une lumière partiellement rétrécie (Fig. 31C). A la 2^{ème} dose, on remarque une intensification de l'inflammation et du rétrécissement de la lumière des tubules digestifs par rapport aux témoins (Fig. 31D).

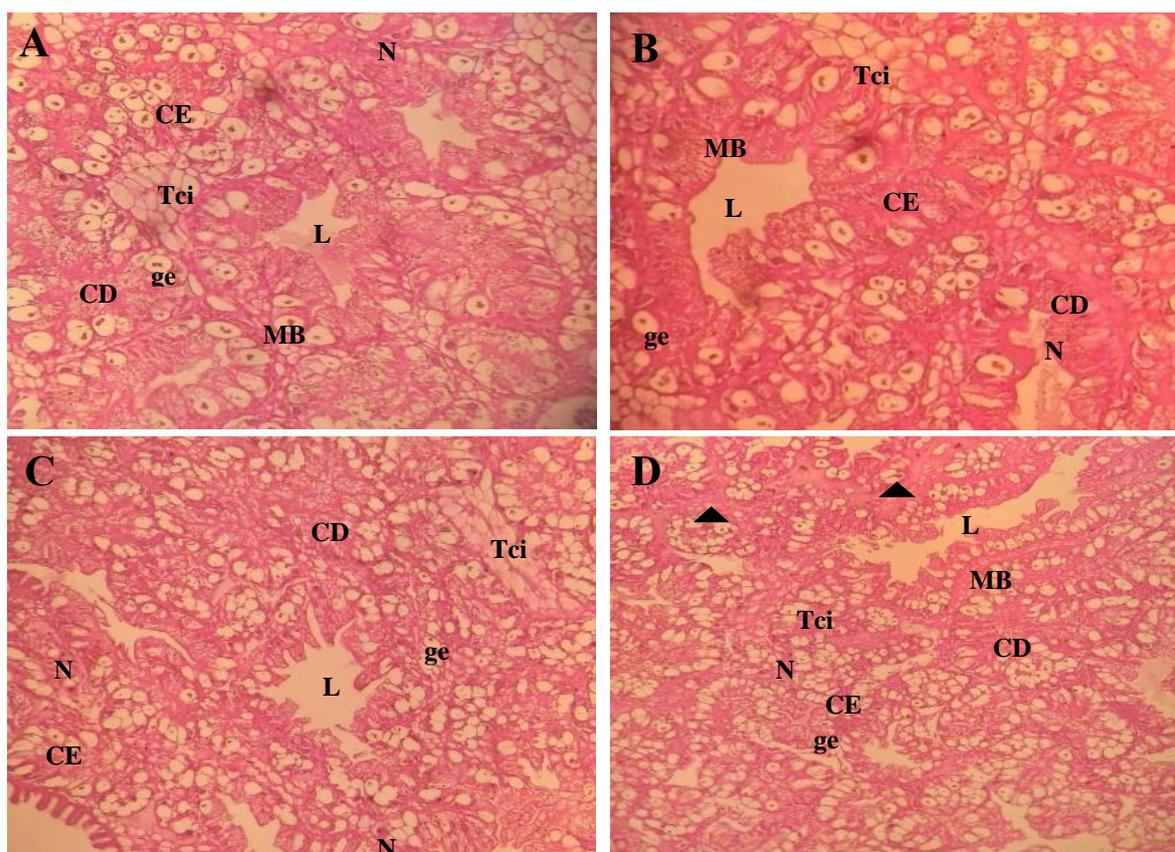


Figure 31. Observations au microscope optique des coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* : témoin (A) et (B) et traités par le Decis avec la Dose 1 (C) et la Dose 2 (D) après 3 mois de traitement (×40).

Tissu connectif intertubulaire : Tci ; Lumière du tubule digestif : L ; Cellules digestives : CD ; Cellules excrétoires : CE ; Granules excrétoires : ge ; Noyau : N. Inflammation tissulaire : ▲ , dégénérescence cellulaire : ➡.

3.7.2. Effet du Zoom

Le traitement par le Zoom avec les deux doses affecte le tissu de l'hépatopancréas. Un début d'inflammation au niveau des membranes basales des tubules et un rétrécissement de la lumière ont été constatés chez les escargots traités par la dose 1 (Fig. 32C). A la dose 2, l'examen histologique a montré une dégradation avancée des espaces intertubulaires connectifs avec une altération partielle des cellules (Fig. 32D).

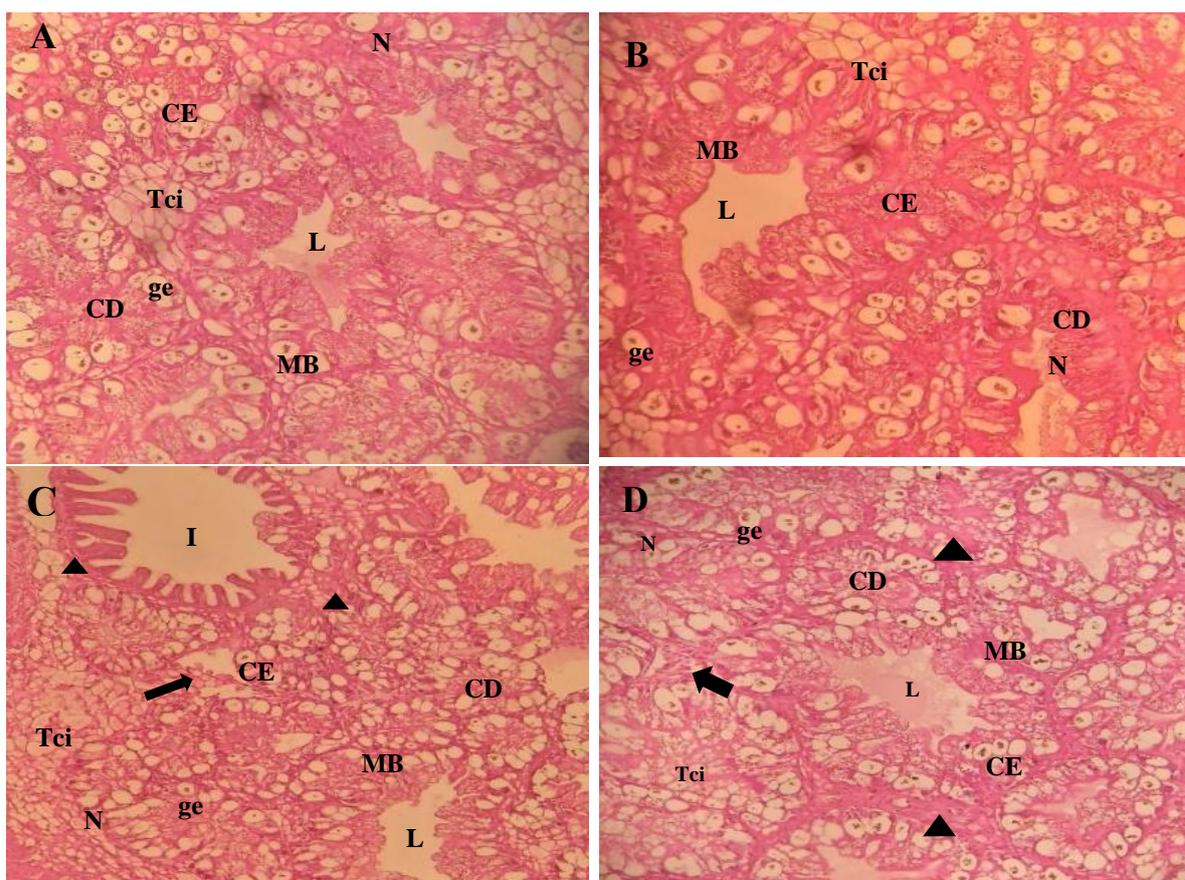


Figure 72. Observations au microscope optique des coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* : témoin (A) et (B) et traités par le Zoom avec la Dose 1(C) et la Dose 2 (D) après 3 mois de traitement (×40).

Tissu connectif intertubulaire : **Tci** ; Lumière du tubule digestif : **L** ; Cellules digestives : **CD** ; Cellules excrétoires : **CE** ; Granules excrétoires : **ge** ; Noyau : **N**. Inflammation tissulaire : **▲**, dégénérescence cellulaire : **➡**.

3.7.3. Effet du Weatfert

L'examen histologique de l'hépatopancréas des individus traités par l'engrais (Weatfert) à la dose 1 a montré une dégénérescence de la membrane cellulaire apicale, une libération des fragments dans la lumière du tubule, et des lésions au niveau de la membrane basale des tubules digestifs (Fig. 33C). De plus, on a noté une dégradation avancée des cellules digestives, une diminution du nombre des cellules et l'élargissement de l'espace intertubulaire connectif. Les tubules ont montré une lumière complètement rétrécie et remplie de débris tissulaires. Ces derniers apparaissaient entremêlés, à cause de la dégénérescence très importante de la

membrane basale délimitant les tubules. A la dose 2, les tissus connectifs sont plus élargis et les tubules digestifs et leurs membranes sévèrement endommagés (Fig. 33D).

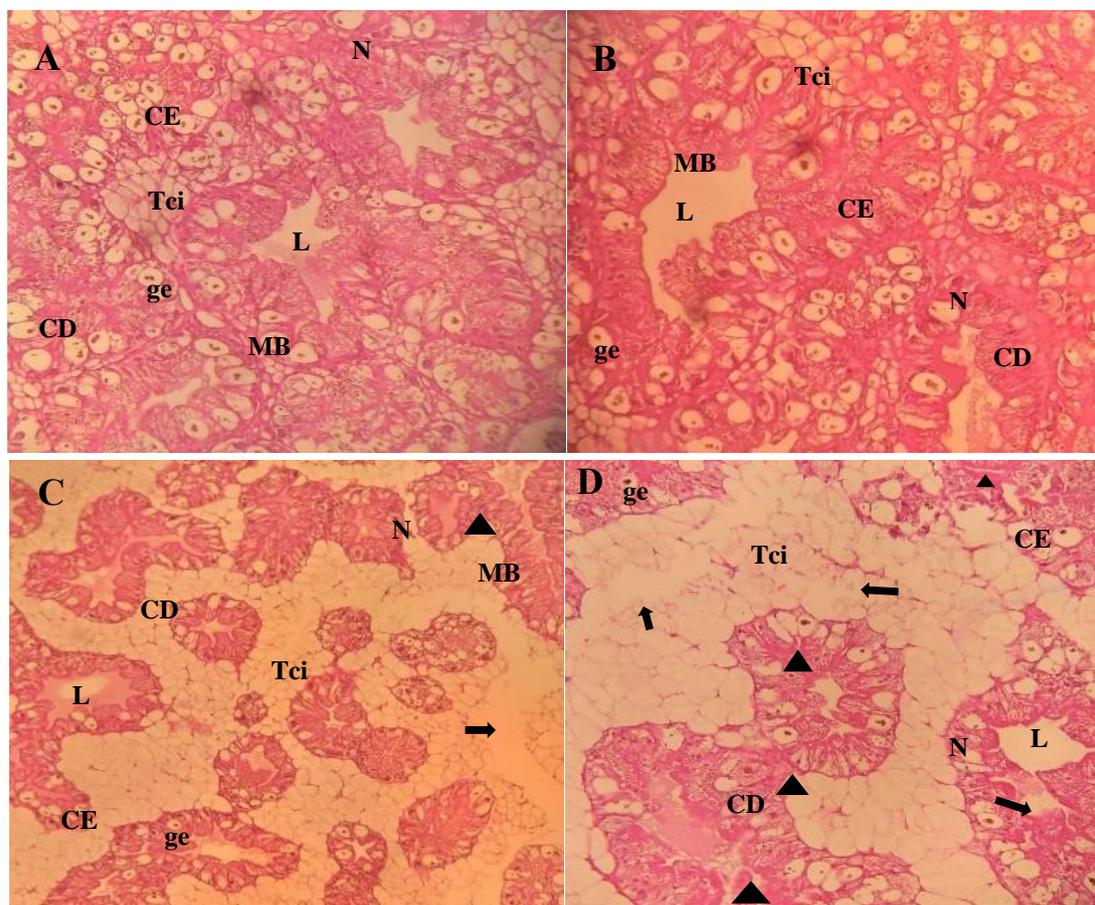


Figure 8. Observations au microscope optique des coupes transversales d'une partie de l'hétopancreas d'*H. vermiculata* : témoin (A) et (B) et traités par le Weatfert à la Dose 1 (C) et la Dose 2 (D) après 3 mois de traitement ($\times 40$).

Tissu connectif intertubulaire : Tci ; Lumière du tubule digestif : L ; Cellules digestives : CD ; Cellules excrétoires : CE ; Granules excrétoires : ge ; Noyau : N. Inflammation tissulaire : ▲ ; dégénérescence cellulaire : ➡.

3.8. Bioaccumulation des résidus dans les tissus de l'escargot

L'analyse des pesticides (Decis et Zoom) dans le tissu de l'escargot a été réalisée par la technique de la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) après 3 mois de traitement. Alors que la bioaccumulation de l'engrais, Weatfert a été analysée par le FRx.

3.8.1. Bioaccumulation du Decis

La comparaison (présence ou absence des mêmes pics) des pics obtenus via un détecteur UV dans les trois chromatogrammes, nous donne une information qualitative de la bioaccumulation de ces traitements dans le tissu de l'animal. Les Figures 34A, B et C présentent le chromatogramme de l'escargot témoin, de l'insecticide Decis et de l'escargot traité. On observe des pics similaires ou à peu près similaires dans les chromatogrammes B et C, ces pics ont le même temps de rétention : 3,942 min, et d'autres pics un peu similaires : 3,706 avec 3,710 ; 3,531 avec 3,532 ; 4,370 avec 4,371 ; 4,531 avec 4,532 et en fin 6,296 avec 6,293 min.

3.8.2. Bioaccumulation du Zoom

Les pics obtenus via un détecteur UV dans les trois chromatogrammes, et la comparaison (présence ou absence des mêmes pics) nous donnons une information qualitative de la bioaccumulation du Zoom dans le tissu de l'animal. Les Figures 35A, B et C présentent le chromatogramme de l'escargot témoin, de l'herbicide Zoom et de l'escargot traité respectivement. On observe des pics similaires ou un peu similaires dans les chromatogrammes B et C, ces pics ont le même temps de rétention : 2,498 avec 2,415 ; 3,693 avec 3,165 ; 4,527 avec 4,425 ; 4,760 avec 4,793 ; 4,922 avec 942 et en fin 7,335 avec 7,336.

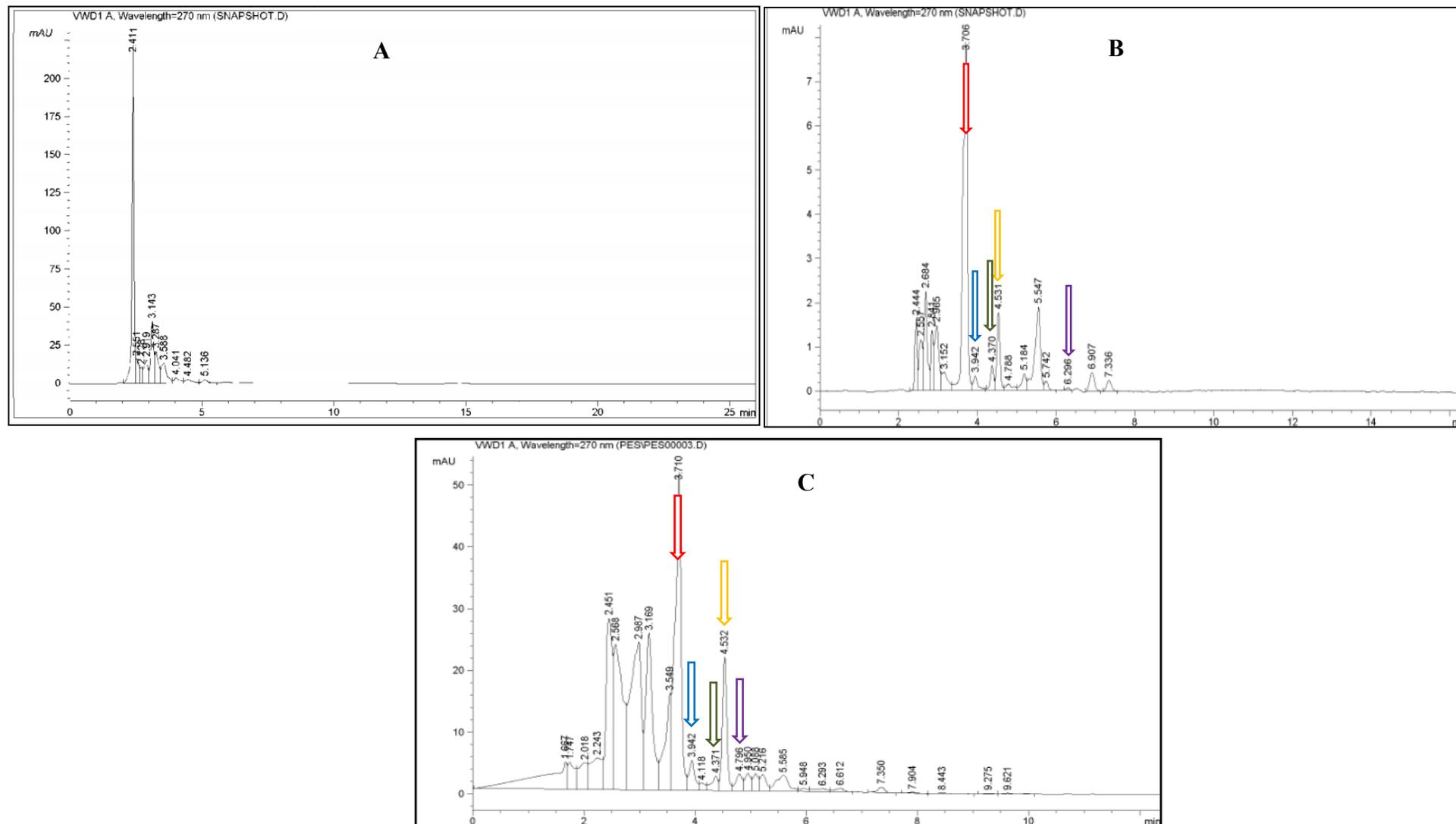


Figure 9. Chromatogrammes d'escargot témoin (A), insecticide Decis (B) et escargot traité (C).

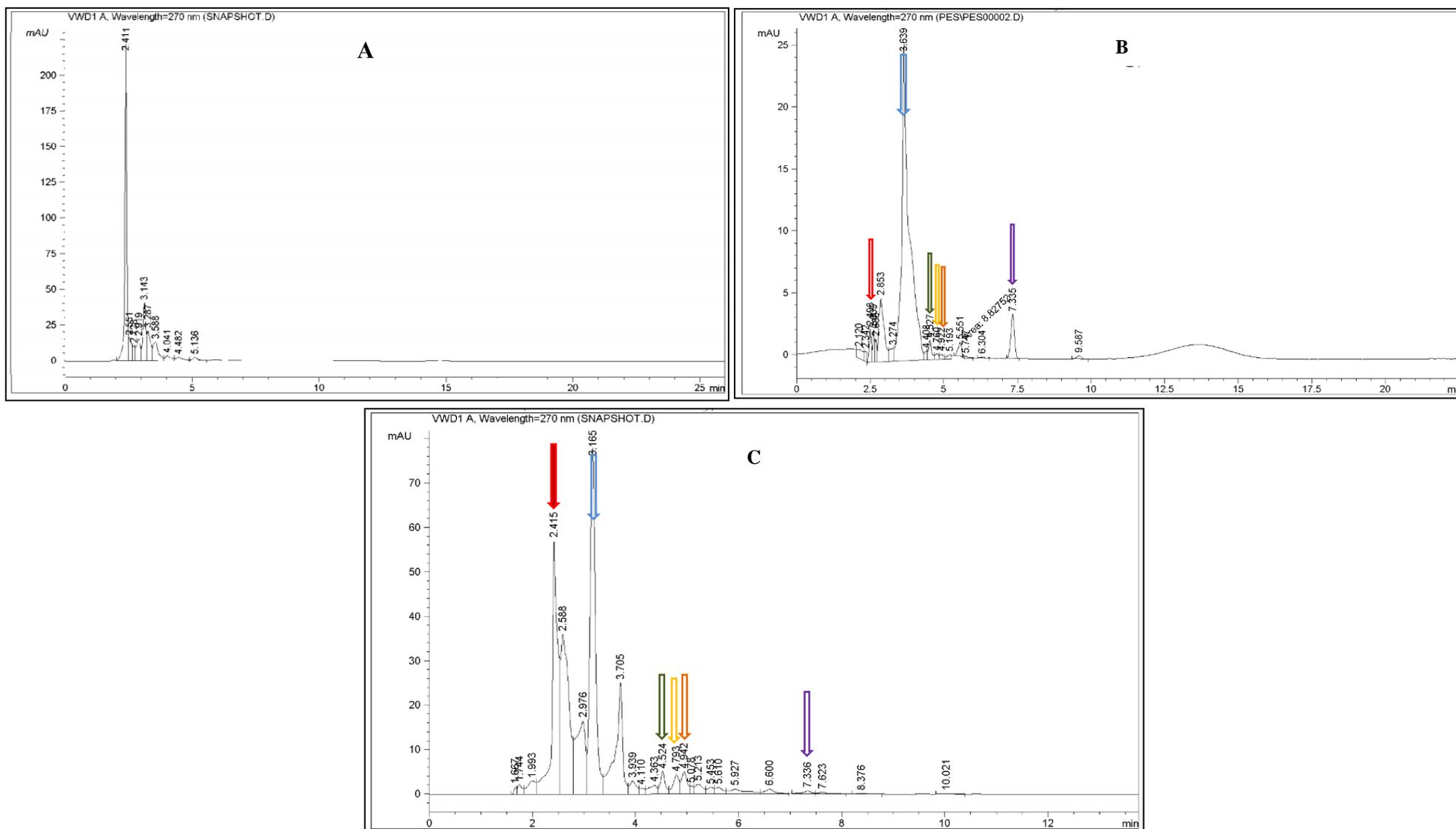


Figure 10. Chromatogrammes d'escargot témoin (A), herbicide Zoom (B) et escargot traité (C).

3.8.3. Bioaccumulation du Weatfert

Les éléments présents dans le Weatfert sont : azote (N), phosphore (P), potassium (K), SO₃ et P₂O₅ avec les pourcentages suivants : 8% pour l'azote (N) et l'ammonium NH₄, 36% pour l'anhydride phosphorique (P₂O₅), 15% pour le potasse sous forme de (K₂O) et 13% pour le soufre sous forme de sulfate (SO₃). Les résultats des analyses par la Spectrométrie de Fluorescence des Rayons X (FRx) sont présentés dans le tableau 19. Ils montrent une augmentation du pourcentage massique de certains éléments chez les escargots traités avec les deux doses après trois mois de traitement par rapport aux témoins (Tableau 39). Une augmentation du pourcentage massique de l'azote N avec un taux de 0,2573%, du soufre S et de son oxyde (SO₃) avec des taux de 0,1314% et 1,2662% respectivement. Le pourcentage du potassium (K) et de son oxyde (K₂O) a augmenté avec des taux de 0,176% et 0,2116 respectivement. Par contre, on note une diminution du phosphore (P) avec un taux de 0,0973% et une augmentation de son oxyde (P₂O₅) (1,2662%) chez les traités par rapport aux témoins. Des résultats comparables ont été signalés pour le C, CO₂, Na, Mg, Al, Si, Cl, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Sr et Ba.

Tableau 19. Pourcentages massiques des éléments et de leurs oxydes dans le tissu d'*H. vermiculata*, témoin et traité après 3 mois de traitement avec l'engrais, le Weatfert.

| Eléments | % massique | | Oxydes | % massique | |
|----------|---------------|--------------|--------------------------------|---------------|---------------|
| | Témoins | Traités | | Témoin | Traité |
| C | 25,4206 | 24,8 | CO ₂ | 93,1435 | 90,8395 |
| N | 1,7127 | 1,97 | / | / | / |
| Na | 0,3267 | 0,0209 | Na ₂ O | 0,4404 | 0,5321 |
| Mg | 0,1619 | 0,0209 | MgO | 0,2684 | 0,4174 |
| Al | 0,0046 | 0,0874 | Al ₂ O ₃ | 0,0088 | 0,0396 |
| Si | 0,0166 | 0,996 | SiO ₂ | 0,0356 | 0,1871 |
| P | 0,4433 | 0,346 | P ₂ O ₅ | 1,0157 | 2,2819 |
| S | 0,3016 | 0,443 | SO ₃ | 0,753 | 0,865 |
| Cl | 0,3559 | 0,443 | / | / | / |
| K | 0,335 | 0,511 | K ₂ O | 0,4035 | 0,6151 |
| Ca | 1,3047 | 1,25 | CaO | 1,8255 | 1,7525 |
| Mn | 0,0019 | 0,0034 | MnO | 0,0024 | 0,0044 |
| Fe | 0,0055 | 0,014 | Fe ₂ O ₃ | 0,0079 | 0,02 |
| Cu | 0,0019 | 0,0021 | CuO | 0,0023 | 0,0026 |
| Zn | 0,0034 | 0,0053 | ZnO | 0,0042 | 0,0066 |
| Br | 0,0004 | 0,0005 | / | / | / |
| Sr | 0,0046 | 0,0042 | SrO | 0,0055 | 0,0049 |
| Ba | 0,0133 | 0,00154 | BaO | 0,0149 | 0,0172 |

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

4.1. Toxicité des traitements à l'égard des escargots

Les essais toxicologiques au laboratoire sont des outils importants pour prédire les effets des substances toxiques dans les écosystèmes terrestres. Utiliser les escargots dans ces tests est une technique attrayante puisque ces derniers présentent beaucoup d'avantages ; leur collecte facile, leur alimentation simple et leur réactions rapides aux contaminants présents dans l'environnement (Gomot-de Vaufleury & Bispo, 2000 ; Radwan *et al.*, 2010). En effet, certaines espèces d'invertébrés deviennent plus sensibles aux effets des pesticides en cas d'une exposition prolongée (Ralston-Hooper *et al.*, 2009). De même, les escargots exposés aux xénobiotiques subissent des altérations du système immunitaire (Russo *et al.*, 2007), du système endocrinien (Druart *et al.*, 2017) et du système nerveux (Martinez-Tabche *et al.*, 2002), qui peuvent mettre la vie de ces organismes en danger. La toxicité des pesticides dépend généralement de la durée d'exposition à ces derniers, du taux de leur dégradation et de la physiologie des organismes exposés (Loureiro *et al.*, 2018).

Les mortalités observées chez *H. vermiculata* au cours de notre étude affichent des taux de 11,6 % ; 3,57% et 8,03% pour le Decis, le Zoom et le Weatfert respectivement. Un taux de mortalité de 13% a été observé chez *Helix aspersa* traité avec le carbaryl (5mg/kg) pendant 14 jours (Schuytéma *et al.*, 1994). Cependant, les mêmes auteurs n'ont signalé aucun effet léthal chez la même espèce d'escargots exposée à une concentration de 5000 mg kg⁻¹ de glyphosate par ingestion. En effet, la mortalité des escargots dépend de l'espèce testée et de sa sensibilité vis-à-vis des substances testées. Le thiaméthoxame, la téfluthrine et leurs mixtures ont montré une toxicité à l'égard des adultes d'*Helix aspersa* (Aït Hamlet *et al.*, 2012). Les résultats de Ibrahim & Sayed (2019) ont montré que le taux de survie des escargots adultes de *B. alexandrina* était clairement réduit après exposition à une concentration de 24% EC de l'herbicide, oxyfluorène. Par ailleurs, des taux de mortalité de 100, 73,3 et 60% ont été enregistrés après application d'une faible concentration d'indoxacarbe, d'abamectine et de spiromésifène, respectivement, sur les adultes d'*E. vermiculata* (Mona & El Kazafy, 2019). Les travaux de Abdel-Halim *et al.* (2021b), ont révélé une toxicité aiguë avec des DL₅₀ de 6,45 et 45,95 µg/escargot après exposition d'*H. aspersa* à l'abamectine et le Vertimec respectivement pendant 48 h. Par contre, Bhattacharya & Sahu (2016) ont clairement montré que la dose recommandée de l'engrais NPK n'a pas induit une mortalité chez les vers de terre.

Cependant, la formulation nano-dérivée de l'abamectine (1%) a montré des effets très toxiques comparativement à la formulation conventionnelle du composé (Vertimec®) contre *H. aspersa* (Abdel-Halim *et al.*, 2021b).

Par ailleurs, les travaux d'Alexander *et al.* (2014) ont révélé les effets toxiques des engrais azotés chez les escargots. De plus, De La Cruz *et al.* (2001) ont montré que l'ajout de l'azote dans l'écosystème provoque une diminution de la survie de l'escargot-pomme, *Pomacea canaliculata*. En outre, Sadany *et al.* (2009) ont constaté que l'urée en tant qu'engrais chimique était un agent très efficace lorsque ce dernier est pulvérisé directement sur les escargots terrestres. Cet engrais, pouvait également être pulvérisé sur les mauvaises herbes autour des arbres pour lutter contre les escargots.

4.2. Réponses comportementales des escargots

Certains comportements dus à l'exposition des escargots aux traitements ont pu être observés au cours de cette étude, ce sont : l'incapacité des escargots à se nourrir normalement et l'évitement de la nourriture, l'activité des animaux et leur position spatiale dans la chambre d'essai : par exemple, actifs ou inactifs en position haute ou sur les supports, ou actifs ou inactifs sur l'aliment (Bourbia-Ait Hamlet, 2013).

Les travaux de Bourbia-Ait Hamlet (2013) ont montré que tous les escargots fuient la nourriture, se positionnent au sommet des boîtes, et n'ont pratiquement pas d'activité locomotrice, dès la première semaine de traitement par le téfluthrine et le thiaméthoxam. De plus, la consommation de la laitue contaminée diminuait d'une façon dose-dépendante. Les travaux de Coeurdassier *et al.* (2001), ont montré une diminution de la consommation alimentaire ce qui a provoqué une inhibition de la croissance et de la survie des escargots traités par le diméthoate.

4.3. Effet des traitements sur la croissance des escargots

Les modifications de la masse corporelle sont utilisées comme biomarqueurs écologiques pertinents, car on croit que les pertes élevées de cette masse ont des effets négatifs sur la survie et la reproduction (Dittbrenner *et al.*, 2010). Schuytema *et al.* (1994) ont signalé une réduction significative du poids corporel et du diamètre de la coquille d'*Helix aspersa* traité à l'aminocarbe, au méthyle parathion et au paraquat ; ces réponses observées variaient selon le type de pesticides et la dose administrée. De plus, les résultats obtenus au cours de différentes

études indiquent que la réduction de la croissance est liée au mode d'application (Salama *et al.*, 2005 ; Radwan *et al.*, 2008) et à la durée du traitement (Coeurdassier *et al.*, 2001). Au cours de notre étude, la croissance des escargots juvéniles a été suivie mensuellement pendant la période de traitement (3 mois). Les résultats obtenus ont montré que l'application de l'insecticide, le Zoom, de l'herbicide, le Decis et de l'engrais, le Weatfert a induit une inhibition de la croissance des juvéniles et des adultes d'*H. vermiculata*. De plus, le traitement des escargots avec trois types d'engrais NPK (haute teneur en azote, haute teneur en azote-phosphore et équilibré) (El-Deeb *et al.*, 2017) ou avec l'urée (Ragab & Shoukry, 2006) a induit une perturbation de la croissance des escargots. Abdel-Hamid *et al.* (1998) ont rapporté une réduction de la croissance des juvéniles de *B. alexandrina* après traitement à l'urée et au nitrate d'ammonium. En outre, la croissance d'*H. aspersa* a été affectée par le traitement avec deux pesticides, le thiaméthoxame et le téfluthrine (Aït Hamlet *et al.*, 2012). Afomezie *et al.* (2011) ont constaté que le traitement du sol par le NPK perturbe la performance des escargots en réduisant leur poids et leur gain de poids.

Concernant l'évolution du diamètre de la coquille, on remarque une diminution de ce paramètre chez les escargots traités par les trois molécules avec une relation dose-dépendante. Nos résultats sont en accord avec ceux de Aït Hamlet *et al.* (2019), qui ont montré une perturbation du diamètre de la coquille des escargots après exposition au thiaméthoxame (insecticide néonicotinoïde) et téfluthrine (insecticide pyréthroïde). Grara *et al.* (2016) ont montré une diminution du diamètre de la coquille en présence de poussière métallique.

Ces données reflètent le déclin de la croissance des escargots (masse et diamètre coquillère) sous l'effet de tous les traitements. La réduction significative de la croissance des juvéniles exposés aux traitements peut s'expliquer par une réduction des réserves énergétiques, allouées à la croissance (Taux de lipides et en glucides) dans les cellules de stockage des tissus des escargots, cette réduction est probablement provoquée par la mobilisation de ces ressources pour l'initiation des processus de détoxification (Aït Hamlet *et al.*, 2019).

De plus, l'ensemble des résultats semble indiquer que la réduction de la croissance est liée au mode (Salama *et al.*, 2005 ; Radwan *et al.*, 2008) et à la durée d'exposition (Seuge & Buzat, 1980 ; Coeurdassier *et al.*, 2001) à un pesticide testé. D'autre part, Bluzat & Seuge (1979) ont montré que le traitement des mollusques, *Lymnea stagnalis* par le carbaryl et le lindane provoque une diminution de la croissance des coquilles.

4.4. Effet des traitements sur la composition biochimique

Les paramètres biochimiques et enzymatiques des organismes exposés à des contaminants toxiques ont été utilisés comme biomarqueurs et peuvent être considérés comme un outil de diagnostic important pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (McCloughlin *et al.*, 2000). La glande digestive a été choisie pour effectuer les analyses biochimiques indépendants de sa capacité d'absorber et d'accumuler les polluants avec 5 à 10 fois plus grand que les autres sites (De Vaufleury & Pihan, 2000 ; Beeby & Richmond, 2003).

Pendant les périodes de stress chronique, les escargots ont besoin de plus d'énergie pour détoxifier les substances toxiques et surmonter le stress induit (El-Shenawy *et al.*, 2012). Lorsque les escargots ont une quantité limitée de glucides et de lipides, la source d'énergie alternative pour répondre à la demande accrue d'énergie est les protéines (Radwan *et al.*, 2008).

Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme biologique. Elles peuvent assurer la catalyse biochimique, la régulation hormonale et s'intégrer dans la cellule en tant que constituants structuraux en même temps que les lipides et les glucides (Jacob & Monod, 1961). La concentration d'acides aminés libres dans le mollusque varie selon les niveaux de pollution (Bishop, 1983). Notre travail a montré une augmentation significative du taux de protéines dans l'hépatopancréas d'*E. vermiculata* traité avec l'engrais, l'herbicide et l'insecticide. Cette augmentation pourrait être une contribution au mécanisme de défense contre le stress chimique. En revanche, la teneur en protéines a augmenté de façon significative après exposition d'un ver de terre, *L. terrestris* au TSP et aucun effet n'a été rapporté par le sékator (Mekahlia *et al.*, 2016). Cette augmentation pourrait indiquer une adaptabilité physiologique de ces vers pour compenser le stress et le développement de défenses cellulaires en réponse à l'impact des pesticides et des engrais. De plus, l'accumulation de ces protéines pourrait être nécessaire pour restaurer les enzymes et compenser les pertes tissulaires suite à la nécrose induite par l'exposition aux traitements (Mosleh *et al.*, 2006). Cependant, les résultats de Gao *et al.* (2013) ont montré que la teneur en protéines a augmenté lorsque les vers de terre, *E. foetida* ont été exposés au propiconazole et au difénoconazole. Les résultats de Khalil (2016) suggèrent que l'exposition à des doses sublétales de pesticide, le méthomyl-lannate, peut influencer le métabolisme des protéines totales. Par contre, une diminution dose-dépendante des protéines totales a été notée chez les escargots traités par les deux insecticides, le thiaméthoxam et la téfluthrine par rapport aux escargots témoins (Bourbia-Aï Hamlet, 2013). Bakry *et al.* (2011) ont signalé que les deux pesticides, la deltaméthrine et le malathion, avaient un effet qualitatif

et quantitatif sur les protéines chez les escargots, *Helisoma duryi*. En outre, le profil électrophorétique des protéines totales des escargots *Biomphalaria alexandrina* traités au diazinon et au profenfos présentait moins de bandes protéiques, ce qui indique que ces pesticides ont induit des dommages chez cette espèce (Bakry *et al.*, 2013). Padmaja & Rao (1994) ont suggéré que la diminution des protéines chez les escargots traités par les pesticides pourrait être due à plusieurs mécanismes, à savoir la formation de lipoprotéines qui sont utilisées pour la réparation des cellules et des organites tissulaires endommagés, et leur utilisation directe par les cellules pour des besoins énergétiques (Radwan *et al.*, 2008). Les travaux de Radwan *et al.* (2008) ont montré une diminution significative des protéines totales et des lipides totaux chez les escargots exposés aux carbamates. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Bhide *et al.* (2006). Ils ont montré que les concentrations sublétales des insecticides : Baygon et Nuvan induisent un épuisement des fractions protéiques de l'escargot d'eau douce, *Lymnaea stagnalis*. L'effet significatif de ces deux carbamates testés sur les protéines et les lipides implique leurs effets cytotoxiques qui dépendent fortement des interférences avec les niveaux de lipoprotéines et leur taux de biosynthèse.

Les glucides sont des composés dont la fonction principale est de stocker et fournir de l'énergie (Brooker, 2000). Sous les conditions de stress, les niveaux de glucose sont considérablement réduits pour assurer un apport énergétique adéquat (Carefoot *et al.*, 1993). La demande croissante d'énergie par les organismes pendant le stress se traduit par leurs besoins pour détoxifier, biotransformer et excréter les substances toxiques (Umminger, 1977).

Les résultats obtenus au cours de notre étude ont révélé une diminution significative du taux de glucides suite à l'exposition des juvéniles d'*E. vermiculata* au Decis, au Zoom et au Weatfert. Nos résultats sont conformes avec ceux d'Aït Hamlet *et al.* (2012) qui ont montré que le thiaméthoxame provoque une perturbation des réserves énergétiques de la glande digestive des escargots traités par rapport aux témoins. Une diminution du taux de glucides a été également signalée dans l'hépatopancréas et les reins d'*H. aspersa* exposé à un mélange d'insecticides, imidaclopride et acétamipride (Zouaghi *et al.*, 2020). La dégradation du glycogène fait partie des mécanismes bien connus pour fournir de l'énergie aux mollusques dans un environnement stressant (Tunholi *et al.*, 2017). L'énergie est utilisée pour faire face à la cytotoxicité induite par les pesticides. Les travaux de Barky *et al.* (2012), ont signalé une diminution des concentrations de glycogène dans les tissus et une augmentation de la concentration de glucose hémolympatique chez les escargots d'eau douce (*Bulinus truncates*) exposés au glyphosate (herbicide). De même, la réduction du glycogène tissulaire a été signalée chez les escargots de

boue (*Amphibola crenata*) exposés au cadmium d'origine hydrique (De Silva *et al.*, 2018). Les résultats de Mohammadein *et al.* (2013) et de Radwan *et al.* (2008) ont révélé une diminution significative de la teneur en glycogène au niveau de la glande digestive chez les escargots terrestres traités avec des métaux lourds et des produits chimiques (méthomyl et méthiocarbe). Cela peut résulter d'une augmentation du taux de dégradation du glycogène (glycogénolyse). La diminution de la teneur en glycogène peut avoir un effet indirect sur les réserves de protéines et de lipides. Les résultats de Banaee & Taheri (2019) ont révélé des niveaux plus faibles de glycogène chez l'escargot d'eau douce, *Galba truncatula* exposé aux eaux usées par rapport aux témoins. De plus, *H. aspersa* exposée aux hydrocarbures, marque une diminution du taux de glucides, pour assurer un approvisionnement suffisant en énergie (Zouaghi *et al.*, 2015). Nos résultats sont en accord avec ceux d'El-Wakil & Radwan (1991). Padmaja & Rao (1994) ont signalé un épuisement de la teneur en glycogène dans les tissus d'un Escargot d'eau douce, *Bellamya dissimilis*, exposé à certains pesticides : Endosulfan, Méthylparathion, Quinalphos et Nuvan et qui peut être dû à l'utilisation directe du glycogène pour la production d'énergie, une demande causée par l'hypoxie induite par les pesticides. Cependant, d'autres mécanismes tels que la diminution de la glycogénèse et la mobilisation vers d'autres tissus ne peuvent être exclus (Radwan *et al.*, 2008).

Les lipides jouent un rôle extrêmement important dans le fonctionnement normal d'une cellule. Ils servent non seulement comme forme de stockage d'énergie, mais ils jouent également un rôle majeur dans la structure des membranes cellulaires et des organites (Kandil *et al.*, 2009). En effet, les lipides sont le carburant énergétique préféré offert aux tissus en cas de besoin après les glucides. Pendant les périodes de stress chronique, ils constituent également une autre source d'énergie (Moussard, 1999). Une diminution des lipides totaux a été notée chez les escargots, *E. vermiculata* traités avec le Weatfert, le Decis et le Zoom par rapport aux escargots témoins. Ces résultats sont similaires à ceux d'Aït Hamlet *et al.* (2012) qui ont montré que le thiaméthoxame provoque une perturbation de la teneur en lipides de la glande digestive des escargots traités. Les mêmes observations ont été signalées chez un ver de terre, *Apporectodea caliginosa* traité par un engrais inorganique, le NPK (Halaimia *et al.*, 2021). Sharaf *et al.* (2015) ont enregistré une perturbation du taux de lipides et de protéines dans la glande digestive de l'escargot terrestre après une exposition au méthiocarbe et au chlorpyrifos. Une diminution des taux de lipides hépatopancréatiques a été enregistrée chez *Gambusia affinis* traité par le DFB (Beldi, 2007). L'épuisement des acides gras à longue chaîne et à chaîne courte peut être expliqué par la réduction du taux de métabolisme du glucose chez les escargots et qui

est compensé par la stimulation de l'hydrolyse des triglycérides et de l'oxydation des acides gras (Ait Hamlet *et al.*, 2012).

4.5. Effet des traitements sur la vitellogénine

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

Au cours de notre étude, le taux de la vitellogénine chez les escargots traités par le Decis, le Zoom et le Weatfert, a diminué par rapport aux témoins. Nos résultats peuvent s'expliquer par une interaction avec les hormones endogènes dues à la régulation endocrinienne ou par un dysfonctionnement au niveau de l'interaction entre ces hormones.

Une réduction de la vitellogénine a été signalée chez *Drosophila melanogaster* exposée à l'azadirachtine (Boulehbal *et al.*, 2015) et chez *Neobellieria bullata* traitée avec le captopril (Vandingenen *et al.*, 2001). Cependant, l'effet sur la vitellogénine varie en fonction des doses et le moment de l'application du traitement (Boulahbel *et al.*, 2015). Les résultats obtenus par El-Bolkiny *et al.* (2000) ont montré que le carbamate affectait la fécondité des escargots exposés à des concentrations sublétales. Ces concentrations réduisaient la production d'œufs d'escargots et leur éclosion. L'ovulation et la ponte sont déclenchées par la libération de plusieurs hormones par les cellules caudo-dorsales des ganglions cérébraux. Ces neuropeptides peuvent être affectés par le carbamate. De plus, l'exposition des escargots au carbamate a provoqué des changements dégénératifs marqués dans l'architecture histologique des tubules glandulaires de la glande albumen. Les membranes apicales des cellules sécrétoires épithéliales ont été rompues, entraînant la disparition des granules sécrétoires et des lumières beaucoup plus larges par rapport aux témoins (El-Bolkiny *et al.*, 2000). Cette même étude a également révélé que la teneur en glycogène des escargots traités était fortement réduite, ce qui peut expliquer la diminution de la capacité de ponte des escargots exposés. Cela a également entraîné une diminution du volume cellulaire de la glande albumen et des glandes hermaphrodites. Par

ailleurs, des malformations induites par le chlorfluazuron sur les organes du système reproducteur des escargots par rapport aux animaux témoins ont été observées au cours des travaux de Soha Mobarak (2016). Ce traitement a provoqué un gonflement important de la taille du pénis, du vagin, de l'oviducte et de la glande à albumen. Ces résultats peuvent être dus à la perturbation des hormones du système reproducteur causée par le traitement au chlorfluazuron. De plus, le même auteur a signalé l'absence des œufs dans l'ovotestis des escargots traités. Cette action peut être causée par la réduction du taux de protéines au niveau de l'ovotestis ou à un retard de croissance dans la glande albumen responsable de la formation des œufs. Soha Mobarak *et al.* (2015) ont étudié l'effet de la CL₅₀ de l'extrait du clou de girofle contre un limace, *Limacus flavus*, et ils ont indiqué que ce dernier causait de graves gonflements de la taille des organes du système reproducteur. Srivastava & Singh (2015) ont également constaté que la CL₅₀ de *Syzygium aromaticum* a entraîné une réduction significative des acides aminés libres, des protéines, de l'ADN et de l'ARN dans l'ovotestis de l'escargot *Lymnaea acuminata* après 24 h de traitement. Preveen & Miyata (2000) ont indiqué que le Chlorfluazuron réduisait la quantité de protéines dans les ovaires du ver-gris *Spodoptera litura*. Soltani & Soltani-Mazouni (1992) mentionne qu'il existe une réduction de la fécondité et de la viabilité des œufs de *Cydia pomonella*, traitée avec le diflubenzuron à la suite d'interférence avec la vitellogénèse et la maturation des œufs chez les femelles traitées.

Par contre, une augmentation de la vitellogénine a été constatée chez les espèces de gastéropodes : *Valvata piscinalis*, et *Lithoglyphus naticoides* (Gagnaire *et al.*, 2009) et chez une crevette, *Macrobrachium* exposées aux xénobiotiques (Fernando *et al.*, 2012). Les organismes d'eau douce dont les paramètres de reproduction sont affectés par les pesticides comprennent une variété d'espèces, y compris les crustacés, les amphibiens et les poissons. Les moules d'eau douce et les gastéropodes font partie des organismes dont les populations ont connu un déclin rapide (Lopes-Lima *et al.*, 2017).

4.6. Effet des traitements sur les biomarqueurs du stress oxydatif

Le terme biomarqueur est généralement utilisé dans un sens large pour inclure presque toutes les mesures qui reflètent une interaction entre un système biologique et un risque potentiel, qu'il soit chimique, physique ou biologique (OMS, 1993). Les biomarqueurs sont essentiels à l'évaluation et à la gestion de la santé des écosystèmes (Boyd, 2010). L'étude du système de défense antioxydant est augmentée en raison de son utilité potentielle pour fournir des biomarqueurs biochimiques qui peuvent être utilisés dans les systèmes de surveillance environnementales (Ballesteros, 2009). Les pesticides sont considérés comme l'une des

principales causes du stress oxydant. Les mesures de l'activité des enzymes antioxydantes constitue donc un marqueur de l'état désordonné du système biologique (Borkovic *et al.*, 2005).

A l'état naturel, il existe un équilibre dynamique entre la production et l'élimination des ROS (Dérivé réactif de l'oxygène) via la régulation des systèmes antioxydants (Lushchak, 2011). Lorsqu'il y a un déséquilibre dans la production de ROS et leur désintoxication dans les cellules vivantes par le biais d'antioxydants, le stress oxydatif peut avoir lieu (Espín *et al.*, 2016). L'exposition à des polluants augmente la production de ROS dans les cellules de l'organisme ce qui déclenche une défense antioxydante pour protéger les organismes exposés contre l'apparition des dommages oxydatifs (Maity *et al.*, 2018). Une accumulation excessive de ces ROS peut causer des dommages oxydatifs dans les cellules, tels que l'oxydation des acides aminés (dénaturation des protéines), des dommages au niveau de la membrane cellulaire (peroxydation lipidique), des dommages de l'ADN et éventuellement la mort cellulaire (Davies & Shringarpure, 2006).

Les escargots représentent une proportion majeure de la biomasse d'invertébrés et sont utilisés comme organismes appropriés pour l'évaluation de la biosurveillance environnementale. La plupart des pistes de recherche ont démontré l'utilisation des glutathion-S-transférases (GSTs), de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion peroxydase (GPx) et du malondialdéhyde (biomarqueur de la peroxydation lipidique) chez les escargots exposés à divers toxiques et leur implication dans le programme de surveillance de l'environnement (Bahgat *et al.*, 2016). Parmi les paramètres antioxydants, par ex. SOD, CAT, GST, GPx et MDA sont largement étudiés (Radwan *et al.*, 2010 ; El-Shenawy *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2014).

4.6.1. Effet sur l'activité de la lactate déshydrogénase

Le lactate déshydrogénase (LDH) est impliqué dans la respiration cellulaire et la production de l'adénosine triphosphate (ATP) par la glycolyse (Stryer, 1988). La mesure de l'activité de la LDH a été largement utilisée en biologie clinique comme diagnostic des lésions cellulaires et tissulaires (Asztalos *et al.*, 1990). La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme métabolique importante qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate dans la glycolyse anaérobie. C'est une enzyme cytoplasmique impliquée dans la production d'énergie. L'évolution de l'activité de la LDH a été étudiée chez certains invertébrés du sol en réponse à des modifications environnementales (Augenfeld, 1966 ; Tripathi *et al.*, 2009 ; Rico *et al.*, 2016). LDH est une enzyme impliquée dans l'activation du métabolisme, et sa mesure peut être utilisée pour comprendre la production d'énergie par les mollusques, ce qui peut se produire soit par aérobie,

soit par anaérobie. Selon les auteurs, l'accélération du métabolisme par anaérobie est une conséquence possible d'intoxication (Silva *et al.*, 2013).

Les résultats ont montré que l'activité de la LDH augmentait en réponse au traitement par le Decis, le Zoom et le Weatfert appliqués sur les juvéniles d'*E. vermiculata* à différentes périodes. Les mêmes observations ont été signalées chez *Lymnaea natalensis* exposée au Niclosamide (Farid *et al.*, 2009), et chez *E. vermiculata* soumise à des doses sublétales de Lannate (Khalil, 2016) et chez *G. truncatula* exposée au Cadmium et au Diméthoate (Banae *et al.*, 2019). Abdel-Halim *et al.* (2021b) ont montré que l'augmentation de l'activité de la LDH dans la glande digestive de l'escargot, *H. aspersa* est considérée comme un bon biomarqueur de l'effet cytotoxique des pesticides. Par contre une réduction de l'activité de la LDH a été constatée chez *B. alexandrina* traitée avec de l'Atrazine et du Roundup (Barky *et al.*, 2012). Les travaux de Banae & Taheri (2019) ont mis en évidence une augmentation significative de la LDH chez *G. truncatula* exposée aux eaux usées, qui pourrait être une réponse physiologique à un environnement stressant. L'augmentation de la LDH dans les tissus mous des escargots pourrait être attribuée à l'hypoxie et à l'augmentation de la glycolyse anaérobie. Cette enzyme joue un rôle clé dans le maintien de l'équilibre entre le catabolisme et l'anabolisme des glucides chez les mollusques (Chen *et al.*, 2011). Au cours d'un stress environnemental, la LDH convertit le pyruvate en lactate, qui à son tour conduit à la modification de la concentration d'acide carboxylique (acide lactique) dans les tissus et l'hémolymphe. Donc le pH des tissus et de l'hémolymphe diminue et provoque des changements physiologiques spécifiques (Tunholi *et al.*, 2017). Les travaux d'Abdel-Halim *et al.* (2013) ont signalé une augmentation de l'activité de la LDH chez *H. aspersa* exposé aux métaux lourds, ce qui indique une réponse physiologique à l'hypoxie induite par un stress métallique. De plus, une augmentation significative de l'activité de la LDH a été constatée chez *Deroceras reticulatum* exposé à l'engrais, Caselio (Abd-El Azeem & Sheir, 2018). Salama *et al.* (2005) ont enregistré également une augmentation du niveau de la LDH chez *H. aspersa* après exposition à plusieurs produits chimiques tels que le Méthomyl, le Carbofuran et le Chlorpyrifos. La libération accrue de la LDH dans le tissu du manteau est un indicateur de dommages cellulaires ou membranaires (Abd-El Azeem & Sheir, 2018). L'élévation de l'activité de la LDH pourrait être le résultat de la synthèse accrue d'enzymes pour se défendre contre le stress et augmenter les sources de production d'énergie par la dégradation des nucléotides et des acides aminés riches en énergie (Mosleh *et al.*, 2003). Une augmentation de l'activité de la LDH a été observée également chez les escargots traités par le Benzoate d'émamectine après 7 jours d'exposition (Gad, 2022). Une

augmentation significative de l'activité de la LDH a été remarquée, après une exposition au Thiobencarbe des escargots terrestres : *Theba pisana* et *Eobania vermiculata* (Abdel-Halim *et al.*, 2021a). Par contre, les travaux de Patrício *et al.* (2019) ont montré que l'escargot, *B. tenuissimus* exposé aux différentes concentrations du molluscicide, le Latex, n'a présenté aucune modification de l'activité de la LDH, de sorte que son métabolisme aérobie a été maintenu.

4.6.2. Effet sur l'activité de la glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GPx) connue sous le nom de peroxydase assure la désintoxication du peroxyde et des hydroperoxydes en eau et composés hydroxyles, respectivement (Pinto *et al.*, 2003), de sorte qu'elle joue un rôle protecteur contre le stress oxydatif (Van Der Oost *et al.*, 1998 ; Van Der Oost *et al.*, 2003). GPx est une enzyme omniprésente dans le cytoplasme des cellules qui aide à protéger les cellules des effets oxydatifs en décomposant l'eau oxygénée (H_2O_2) en O_2 et en eau. De plus, elle stimule la transformation des radicaux peroxydes en alcool en oxydant le GSH réduit en disulfure de glutathion oxydé (GSSG) (Regoli & Giuliani, 2014).

Nos résultats révèlent une augmentation significative de l'activité de la GPx chez *E. vermiculata* exposé au Weatfert, au Decis et au Zoom. Ces résultats sont en accord avec ceux de Farid *et al.* (2009) chez *Lymnaea natalensis* après traitement au Niclosamide. Des observations similaires ont été rapportées par El-Shenawy *et al.* (2012) qui ont signalé des concentrations élevées de GPx chez les escargots exposés au Cadmium, au Plomb et au Cuivre. Cette augmentation peut être attribuée à la production de radicaux libres (Hermes *et al.*, 2020) comme le montrent Orbea *et al.* (2000) et Radwan *et al.* (2010) sur d'autres espèces d'escargots exposées à certains polluants. En revanche, une légère inhibition de l'activité de la GPx a été observée chez *Biomphalaria alexandrina* après traitement avec un engrais à haute teneur en phosphore (El-Deeb, 2017). L'activité de GPx était accrue chez *Theba pisana* exposé à la DL_{50} de pesticide contenant du cuivre (El-Gendy *et al.*, 2009). Une augmentation de GPx a été rapportée également chez *Cantareus apertus* exposé au Carbaryl (Leomanni *et al.*, 2015).

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

Les GSTs consistent à catalyser la conjugaison d'une variété de substrats électrophiles pour réduire le glutathion et protéger la cellule contre les effets des xénobiotiques (Ferrari *et al.*, 2007). Les GSTs sont des enzymes de phase II qui remplissent plusieurs fonctions dans la biotransformation et la désintoxication des xénobiotiques toxiques. Il a en effet une activité cruciale en tant que biomarqueur de contamination (Narbonne *et al.*, 1991), en augmentant la

solubilité de plusieurs composés toxiques endogènes et exogènes, ce qui les rend plus faciles pour les organismes à éliminer (Jokanović, 2001). L'augmentation de l'activité des GSTs semble être une réponse aux polluants, ce qui entraîne l'induction du système de protection antioxydant ainsi que l'élimination des polluants par la formation de conjugués de glutathion (Bhavan & Geraldine, 2000). L'effet de l'exposition aux pesticides sur l'altération de l'activité de la GSTs s'est manifesté chez diverses espèces d'escargots.

La présente étude a montré une augmentation importante de l'activité des GSTs au niveau de l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* traité aux pesticides et à l'engrais. Les travaux de Ma *et al.* (2014) ont signalé une augmentation de l'activité des GSTs chez l'escargot d'eau douce, *Physa acuta* après une exposition de 96 h à certains pesticides. Par contre, Abdel-Halim *et al.* (2021b) marquent une diminution de l'activité des GSTs chez *H. aspersa* traité par les pesticides (Vertimec® 1,8% EC et Fast Max Super® 8,4% SC). Les résultats de Farombi *et al.* (2007) ont mis en évidence une réduction du taux du GSH et une augmentation de l'activité des GSTs, cette augmentation est une réponse au stress oxydatif causé par l'exposition de *Clarias gariepinus* au spinosad. Les mêmes observations ont été signalées par plusieurs auteurs (Belhaouchet *et al.*, 2012 ; Canesi *et al.*, 1999 ; Regoli *et al.*, 1998). Cette augmentation des GSTs a été enregistrée chez *T. pisana* traité par le Carbamate (Radwan *et al.*, 1992), chez *C. penctatus* traité par le Malathion (Pandey *et al.*, 2005), chez *C. aspersum* traité par l'Imidaclopride (Radwan & Mohamed, 2013), chez *H. aspersa* traité par le Thiaméthoxame (Aït Hamlet *et al.*, 2016), chez *C. apertus* exposé au Carbaryl (Leomanni *et al.*, 2015), et chez *T. pisana* exposé à l'Abamectine et le Thiaméthoxame (EL-Gendy *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'exposition de *T. pisana* à l'Oxamyl et au Thiofanox a entraîné une augmentation significative de l'activité des GSTs, tandis que l'Aldoxycarbe et le Méthomyle n'ont provoqué aucun changement, par contre, l'Aldicarbe a causé une diminution de l'activité de ce biomarqueur (Radwan *et al.*, 1992). Ainsi, les travaux de Fadhlouï & Lavoie (2021) ont montré que l'exposition des escargots, *Lymnaea sp* au glyphosate provoque une altération de l'activité des GSTs suggérant une augmentation des ROS. Larguinho *et al.* (2014) ont noté une augmentation de ce biomarqueur suite à l'exposition des bivalves marins, *Mytilus galloprovincialis* à l'acrylamide. L'exposition des juvéniles d'*A. calliginosa* (ver de terre) à un engrais, le NPK a induit une activation du système de détoxification traduite par une élévation de l'activité des GSTs (Halaimia *et al.*, 2021).

Par contre, une réduction de l'activité des GSTs a été révélée chez les vers de terre, *Lumbricus terresteris* traités par des neurotoxines (Subaraja & Vanisree, 2015) et chez *Lymnaea luteola* exposée aux nanoparticules d'oxyde de zinc (Ali *et al.*, 2015).

4.6.4. Effet sur l'activité de la catalase

La catalase joue un rôle clé dans le mécanisme antioxydant (Regoli *et al.*, 2011 ; Niyogi *et al.*, 2001). La CAT est une enzyme antioxydante présente dans presque tous les tissus vivants qui utilisent l'oxygène. L'enzyme utilise le fer ou le manganèse comme cofacteur et catalyse la dégradation ou la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire, complétant ainsi le processus de désintoxication initié par le SOD (Marklund, 1984 ; Chelikani *et al.*, 2004).

Une augmentation significative de l'activité de la catalase a été observée chez les escargots, *H. vermiculata* exposés à l'herbicide Zoom. L'induction de l'activité CAT a été abordée dans de nombreuses études sur des gastéropodes terrestres exposés à un ensemble de contaminants. Cette augmentation a été rapportée chez *E. vermiculata* exposé au Méthomyle, au Thiodicarbe et au Métaldéhyde (El-Wakil & Radwan, 1991) ; chez *Helix aspersa* traité avec l'Imidaclopride (Radwan & Mohamed, 2013) ou le Thiaméthoxame (Ait Hamlet *et al.*, 2016). El-Gendy *et al.* (2009) ont signalé une induction de l'activité de la Catalase hépatopancréatique chez *Theba pisana*, après traitement avec des pesticides contenant du cuivre. Ces résultats concordent avec ceux de Parolini *et al.* (2010), qui ont constaté une augmentation significative de l'activité de CAT après exposition du mollusque, *Dreissena polymorpha* à l'acétaminophène. D'autre part, *C. aspersum* collecté dans différentes zones contaminées, y compris ; des sites à forte intensité de trafic (Regoli *et al.*, 2006) et des zones contaminées par des métaux (Abdel-Halim *et al.*, 2013) ont montré une augmentation de l'activité de la Catalase dans divers organes. Le *T. pisana* collecté à partir de différents sites pollués en métaux (Radwan *et al.*, 2010) et *A. achatina* collecté dans des sites miniers (Nmaduka *et al.*, 2018) ont montré une augmentation de l'activité de la CAT. L'induction de la Catalase est traduite par la capacité de cette enzyme à améliorer et à éliminer les ROS et prévenir des organismes des effets oxydatifs (Wang *et al.*, 2018). Zouaghi *et al.* (2020) a montré une augmentation de l'activité de la catalase au niveau de l'hépatopancréas et des reins chez *Helix aspersa* traité aux pesticides avec une relation dose-réponse. Les mêmes observations ont été signalées chez les moules exposées au plomb (Pb) (De Almeida *et al.*, 2004), chez *E. vermiculata* exposé au méthomyl (El-Wakil & Radwan, 1991), chez *Theba pisana* exposé à des doses sublétales de pesticides à base de cuivre (El-

Gendy *et al.*, 2009) et chez *Lanistes carinatus* exposé au Chlorpyrifos (Khalil, 2015). Aucun effet n'a été signalé chez *L. terresteris* traité par l'Acrylamide (Subaraja & Vanisree, 2015), chez *Biomphalaria glabrata* exposé au Paraquat (Cochon *et al.*, 2007) et chez *Gibbula umbilicalis* exposé au mercure (Cabecinhas *et al.*, 2014). Par contre, une diminution de ce biomarqueur a été enregistrée chez *C. aspersum* exposé au Diazinon, au Nickel et à leur combinaison (Zawisza-Raszka *et al.*, 2010), et chez *B. alexandrina* exposée à l'Atrazine et au Glyphosate (Barky *et al.*, 2012).

4.7. Histopathologie de l'hépatopancréas

Les altérations cellulaires observées au niveau de l'hépatopancréas des gastéropodes ont été largement étudiées comme biomarqueurs de l'exposition aux xénobiotiques (Marigomez *et al.*, 1998 ; Snyman *et al.*, 2005 ; Radwan *et al.*, 2008). Cependant, peu d'informations sont disponibles dans la littérature concernant les marqueurs biochimiques et histologiques des mollusques exposés aux insecticides (Radwan *et al.*, 2008). Plusieurs altérations histologiques ont été signalées dans les muscles, le foie et les reins des escargots en réponse aux polluants industriels et agricoles et aux eaux usées. Des changements histopathologiques ont été induits par des concentrations sublétales d'Oxyfluorène (herbicide) dans la glande digestive des escargots, *Biomphalaria alexandrina* (Ibrahim & Sayed, 2019). L'examen histologique de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* traité par le Thiametoxam a révélé la dégénérescence des tubules digestifs et la dégradation de la membrane basale d'une manière dose-dépendante, entraînant une détérioration grave des tissus (Ait-Hamlet *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'application d'une mixture de Pirimicarbe et d'Acétate de plomb induit une nécrose hépatocytaire, une nécrose des cellules rénales, et une dystrophie musculaire chez les escargots traités (Chen *et al.*, 2011). Sharaf *et al.* (2015) ont enregistré une altération histologique de la glande digestive de l'escargot terrestre exposé au Méthiocarbe et au Chlorpyrifos. Sheir (2015) a signalé des lésions tissulaires dans les tubules digestifs sous forme de nécrose, et une augmentation du pigment chez l'escargot d'eau douce, *Lanistes carinatus*. El-Deeb *et al.* (2015) ont exposé *B. alexandrina* aux engrais inorganiques (teneur élevée en phosphore et en azote) et ils ont enregistré des altérations histologiques des glandes digestives. De plus, l'exposition de *Deroceras reticulatum* à un engrais, le Caselio a induit certains signes pathologiques tels que la dégénérescence cellulaire, la nécrose, les réponses inflammatoires et les fuites intestinales (lacunes) (Abd-El Azeem & Sheir, 2018). De même, Hamed *et al.* (2007) ont constaté une vacuolisation des cellules digestives chez *E. vermiculata* traité par le Carbamate, le Méthiocarbe et le Méthomyl. L'exposition aux insecticides peut également entraîner des

altérations morphologiques et histologiques des invertébrés terrestres. Saxena *et al.* (2014) ont rapporté des lésions de la membrane cuticulaire et une désintégration des muscles circulaires et longitudinaux chez les vers de terre, *E. andrei* et *Metaphire posthuma* traités par le Carbamide et les insecticides pyréthroides synthétiques. Les néonicotinoïdes peuvent induire également une perturbation de l'épiderme et du tissu de l'intestin moyen d'*E. fetida* (Wang *et al.*, 2015). L'insecticide organophosphoré monocrotophos peut induire des changements morphologiques et histologiques chez *E. eugeniae* tels que l'atération des cellules épithéliales (Samal *et al.*, 2019). L'étude histologique de Zouaghi *et al.* (2020) ont montré des altérations cytologiques et ultra-structurales de l'hépatopancréas après exposition d'*H. aspersa* à un mélange de pesticides (Imidaclopride et Acétamipride), vu que cet organe joue un rôle crucial dans la détoxification des polluants (Frias-Espericueta *et al.*, 2008). Des observations similaires ont été enregistrées dans les travaux de Chabicoovsky *et al.* (2004), de Russell *et al.* (1981), et de Tadjine (2007). Ils ont constaté une déformation des acinis et une destruction des cellules digestives en fonction de la dose, conduisant à une nécrose très importante de ces cellules avec les concentrations les plus élevées. Des réponses histopathologiques ont été constatées au niveau de plusieurs organes (glande digestive, rein, ovaires, etc.) chez *H. aspersa* exposé à un mélange de pesticides, représentées par une hyperplasie des épithéliums et une nécrose cellulaire importante qui s'accompagne d'une prolifération de tissus connectifs (Chabicoovsky *et al.*, 2004 ; Radwan *et al.*, 2008). Une nécrose des cellules digestives et une détérioration du processus digestif ont été signalées après exposition des gastéropodes terrestres à des mélanges de pesticides à des particules métalliques (Zaldibar *et al.*, 2008).

Les résultats de l'évaluation histologique de l'intestin et des tissus reproducteurs de l'escargot, *Archachatina marginata*, révèlent des dommages tissulaires plus sévères après traitement à l'engrais (NPK 20:20:20) par rapport au pesticide (Cypercot®). Cela peut être lié à la persistance relativement faible des pyréthroides et à l'accumulation de l'engrais dans les tissus du mollusque où il exerce des dommages tissulaires au fil du temps (Amaeze *et al.*, 2019).

4.8. Bioaccumulation des traitements dans les tissus des escargots

Le concept de bioaccumulation est primordial pour comprendre la toxicité, en examinant la quantité absorbée par l'organisme, la perte par plusieurs procédés, le transfert à la progéniture, la croissance et les voies d'entrée des produits chimiques dans l'organisme. D'autres facteurs tels que l'alimentation, le type d'habitat, la reproduction, l'âge, la capacité de biotransformation ou la demande d'énergie sont également cruciaux pour déterminer le profil de bioaccumulation

(Borgå, 2013). Par conséquent, le concept de bioaccumulation et de toxicité est utilisé pour l'évaluation des risques liés aux produits chimiques.

Les gastéropodes et les mollusques bivalves sont des excellents bioaccumulateurs d'un large éventail de polluants (Livingstone, 1991). Il s'agit soit de filtreurs, soit d'herbivores, soit de carnivores, et ils ont le potentiel de bioconcentrateur de contaminants présents dans l'eau ou dans les sédiments à des concentrations trop faibles pour être détectés par des techniques de surveillance (Walsh *et al.*, 1994). Les escargots fortement contaminés pourraient donc fournir une source d'accumulation de métaux de haut niveau (Lan *et al.*, 1992).

Les résultats de la bioaccumulation ont révélé que ces xénobiotiques peuvent s'accumuler au fil du temps dans les tissus de l'animal. Par conséquent, ceux-ci peuvent se produire dans la chaîne alimentaire et causer plusieurs problèmes environnementaux. La bioaccumulation de ces éléments potentiellement toxiques dans un organisme provoque des effets chroniques sur le métabolisme animal et de son insertion dans la chaîne alimentaire, qui peut causer des effets néfastes sur d'autres organismes (Luo *et al.*, 2018 ; Geng *et al.*, 2019). Les résidus des pesticides peuvent pénétrer dans la chaîne alimentaire, ce qui peut causer de graves dangers pour la vie humaine et animale (Khan *et al.*, 2007). La bioaccumulation des pyréthroides par les invertébrés a été démontrée chez plusieurs espèces telles que *Lumbriculus variegatus* (You *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2018), *Helisoma trivovis* (Spehar *et al.*, 1983) et *Chironomus tentans* (Muir *et al.*, 1985). Peu d'études ont été consacrées à l'analyse des résidus de pesticides dans les tissus d'escargots. Le transfert de ces contaminants agricoles se fait par diffusion cutanée, à travers l'épithélium et par ingestion des particules du sol (Gomot *et al.*, 1989). Une plus grande bioaccumulation de l'Atrazine a été signalée chez *Metaphire guillelmi* et chez *Eisenia fetida* (Wang *et al.*, 2014). Tejada *et al.* (2016) ont signalé également une très forte bioaccumulation d'Oxyfluorène dans les tissus d'*Allolobophora molleri*.

**CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En Algérie, l'usage des insecticides, des fertilisants, des engrais et autres produits phytosanitaires se répand de plus en plus avec le développement de l'agriculture, mais aussi dans le cadre des actions de lutte contre les vecteurs nuisibles. Cependant, ces substances chimiques ne sont pas anodines. Elles ont des conséquences environnementales directes et un impact sanitaire à long terme lié aux infiltrations de ces molécules non dégradables dans les sols, dans les nappes, puis vers les écosystèmes, les végétaux, les animaux et nécessairement l'homme. Donc il est nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement à travers des organismes que l'on utilise comme sentinelles en étudiant la modification physiologique, biochimique et écologique qui les affecte. Ces êtres vivants très sensibles aux contaminants présentent l'intérêt de se prêter plus facilement que l'homme aux études des effets des polluants et permettent de mettre en évidence des pollutions chroniques ou brutales. Dans cette optique, les mollusques gastéropodes terrestres pulmonés, sont considérés comme les indicateurs les plus privilégiés dans ce domaine, en raison de leur sédentarité dans le sol et de leur régime herbivore, ainsi, ils sont aisément contaminés par les divers polluants présents dans leur milieu et leur alimentation ; d'autre part, ils présentent des caractéristiques physiologiques, biologiques et écologiques variées, permettant de comparer l'influence de ces différents paramètres sur leurs réponses à la contamination de l'environnement d'où l'intérêt de leurs utilisations comme organismes test pour refléter l'état du milieu dans lequel ils vivent.

Ainsi, le principal objectif de notre travail de thèse était d'étudier les effets d'un insecticide (Decis), d'un herbicide (Zoom) et d'un engrais (Weatfert) appliqués par ingestion, à des concentrations supérieures ou égales de celles recommandées pour l'épandage en champ, sur l'escargot terrestre *Helix vermiculata*, utilisé comme espèce bioindicatrice de la contamination des sols. Les expérimentations ont été menées sur le comportement, la croissance, la composition biochimique de l'hépatopancréas, le taux de la vitéllogénine, et sur l'activité des biomarqueurs du stress oxydant tels que les glutathion S-transférases (GSTs), la lactate déshydrogénase (LDH), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase. L'analyse des résidus des produits testés et la structure histologique de l'hépatopancréas ont été également étudiées.

Les essais toxicologiques ont permis de déterminer la mortalité des escargots au cours de trois mois de traitement avec les trois molécules appliquées par ingestion sur les juvéniles d'*H. vermiculata*. Les traitements révèlent une activité molluscicide avec une relation dose-réponse.

Les molécules testées entraînent des altérations comportementales, telles que la diminution de l'activité et de la prise alimentaire. Ainsi, ces trois traitements ont induit une perturbation de la croissance des juvéniles, traduite par une diminution des paramètres physiologiques tels que le poids frais moyen des escargots, et le diamètre de la coquille. L'inhibition de la croissance des juvéniles de *Helix vermiculata* induite par les effets des trois molécules peut résulter de troubles métaboliques, comportementaux ou de perturbations du contrôle neuroendocrine.

De plus, l'évaluation de l'effet de ces traitements (Dose 1 et Dose 2) sur les biomarqueurs du stress oxydatif, indique que ces derniers induisent l'activation du système de détoxification par le biais d'une augmentation de l'activité des GSTs, de la GPx, de la LDH et de la Catalase au cours de la période testée : 1, 2 et 3 mois de traitement. Ces modifications sont probablement liées à une augmentation de la libération d'espèces réactives de l'oxygène en présence des traitements.

La composition biochimique de l'hépatopancréas est également affectée par les molécules testées, avec un épuisement des réserves énergétiques (glucides et lipides) et une augmentation du taux de protéines chez les juvéniles d'*H. vermiculata*.

Chez les subadultes d'*H. vermiculata*, le taux de la vitellogénine marque une diminution significative après traitement avec le Decis, le Zoom et le Weatfert au cours de différentes périodes : 1, 2 et 3 mois.

Les altérations structurales du tissu hépatopancréatique témoignent d'une altération du processus digestif, et induisent ainsi, une réduction des capacités de digestion et d'assimilation des aliments par les escargots exposés aux différents traitements.

Enfin, les résultats de la bioaccumulation ont révélé que ces xénobiotiques peuvent s'accumuler avec le temps dans les tissus de l'animal. Donc, ces derniers peuvent passer dans la chaîne trophique et causer plusieurs problèmes pour la santé de la biocénose.

A l'avenir, il serait intéressant de compléter le présent travail en évaluant la génotoxicité de ces produits, pour la recherche d'un dommage à l'ADN, et l'embryotoxicité vis à vis des œufs d'*H. vermiculata*. Enfin la réalisation des tests *in situ*, serait souhaitable pour déterminer les conséquences d'une exposition cumulée à l'ensemble des formulations appliquées en conditions réelles dans le cadre d'une démarche d'évaluation du risque pour compléter la démarche effectuée au laboratoire.

RESUMES

VI. RESUME

Cette étude vise à tester l'effet d'un insecticide (Decis), d'un herbicide (Zoom) et d'un engrais (Weatfert), très utilisés en agriculture dans la région de Tébessa, sur un gastéropode terrestre et bioindicateur de la pollution, *Helix vermiculata* (Müller, 1774) (Mollusca, Gasteropoda).

Les effets de ces trois produits chimiques ont été examinés sur la mortalité, la croissance, les biomarqueurs enzymatiques (GSTs, GPx, LDH et Catalase) et la composition biochimique (protéines, glucides, lipides) des juvéniles d'*H. vermiculata*. La bioaccumulation et l'étude histologique ont été également déterminées.

L'application de ces produits a induit une mortalité des escargots avec une relation dose-réponse et une perturbation de la croissance des juvéniles et une induction des biomarqueurs du stress oxydatif, par le biais d'une augmentation de l'activité des GSTs, de la GPx, de la LDH et de la catalase au cours des périodes testées : 1, 2 et 3 mois de traitement. On a noté l'effet marqué de l'engrais, Weatfert par rapport à l'insecticide et l'herbicide.

De plus, le Decis, le Zoom et le Weatfert ont induit un épuisement des réserves énergétiques (glucides et lipides), une augmentation du taux de protéines chez les juvéniles d'*H. vermiculata* et une diminution du taux de la vitellogénine.

Une altération de la structure histologique de l'hépatopancréas a été également enregistrée suite au traitement par les trois composés. Ces altérations touchent beaucoup plus les escargots traités par l'engrais.

Enfin, ces traitements peuvent s'accumuler avec le temps dans les tissus de l'animal après une exposition chronique.

Mots clés : Bioindicateur, *Helix vermiculata*, Engrais, Produits phytosanitaires, Composition biochimique, Biomarqueurs, Histopathologie, Bioaccumulation.

Abstract

This study aims to evaluate the response of *Helix vermiculata* (Bioindicator of pollution) (Müller, 1774) (Mollusca, Gasteropoda) to an insecticide (Decis), an herbicide (Zoom) and a fertilizer (Weatfert) widely used in agriculture in the region of Tebessa.

The effects of these three chemical products were examined on mortality, growth, enzymatic biomarkers (GSTs, GPx, LDH and Catalase) and biochemical composition (proteins, carbohydrates, lipids) of *H. vermiculata* juvenile. Bioaccumulation and histological study were also determined.

The application of these products induced a mortality of snails with a dose-response relationship, a disruption of juvenile growth and an induction of biomarkers of oxidative stress, through an increase in the activity of GSTs, GPx, LDH and Catalase during tested periods: 1, 2 and 3 months of treatment. The marked effect of Weatfert fertilizer was noted compared to the insecticide and the herbicide.

In addition, Decis, Zoom and Weatfert induced a depletion of energy reserves (carbohydrates and fats), an increase in protein rate in juveniles of *H. vermiculata* and a decrease in the level of vitellogenin.

An alteration in the histological structure of hepatopancreas was also recorded following treatment with the three compounds. These alterations affect much more the snails treated by the fertilizer.

Finally, these treatments can accumulate over time in the animal's tissues after chronic exposure.

Keywords: Bioindicator, *Helix vermiculata*, Fertilizer, Pesticides, Biochemical composition, Biomarkers, Histopathology, Bioaccumulation.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم إستجابة *Helix vermiculata* (مؤشر حيوي للتلوث) لمبيد حشري Decis ومبيد عشبي Zoom وسماد Weatfert التي تستخدم على نطاق واسع في الزراعة في منطقة تبسة.

وقد تم دراسة آثار هذه المركبات الكيميائية على الوفيات، النمو والمؤشرات الحيوية الإنزيمية (GSTs, Catalase, GPx و LDH) و التركيبية الكيميائية الحيوية (البروتينات، الكربوهيدرات و الدهون) للحلازون، كما تم تحديد التراكم البيولوجي لهذه المركبات و دراسة نسيجية للبالغين الشواهد والمعالجين.

تطبيق هذه المنتجات تسبب في سمية الحلازون على مدى ثلاثة أشهر مع علاقة الجرعة والاستجابة وتعطيل نمو الأحداث وتحريض المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي، من خلال زيادة في نشاط GSTs، GPx، LDH و Catalase خلال الفترات التي تم اختبارها: 1 و 2 و 3 أشهر من العلاج. كما لاحظنا أن السماد Weatfert له تأثير ملحوظ.

بالإضافة إلى ذلك، تسبب Decis، Zoom و Weatfert في استنفاد الاحتياطات الطاقوية (الكربوهيدرات والدهون)، زيادة في مستويات البروتين في الأحداث من *H. vermiculata* وانخفاض في مستوى vitellogénine.

كما تم تسجيل تغيير في التركيبية النسيجية للغدة الهضمية بعد العلاج بالمبيدين والسماد الكيميائي. هذه التشوهات تكون أكثر في نسيج الحلازون المعالج بالسماد.

وأخيرا، يمكن أن تتراكم هذه المواد مع مرور الوقت في أنسجة الحيوان بعد التعرض المزمن لها.

الكلمات المفتاحية: المؤشرات الحيوية ، *Helix vermiculata* ، الأسمدة ، المبيدات الحشرية ، التركيب الكيميائي الحيوي ، المؤشرات الحيوية ، علم أمراض الأنسجة ، التراكم الحيوي.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abd-El Azeem, H. H., & Sheir, S. K. (2018).** Impacts of the plant fertilizer, Caselio on the slug, *Deroceras reticulatum* (Gastropoda, Stylommatophora): laboratory studies. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. Zoology Department, Faculty of Science, Menoufia University, Egypt. Page No. 396.
- Abdel-Hamid, A. Z., Farrag, E., Rizk, M., Omar, M. T., & Mantawy, M. M. E. (1998).** Effect of Nitrogen; sulphur & phosphorus containing fertilizers and organophosphorous insecticide on reproduction of *Biomphalaria alexandrina* Snails. Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences, 38, 147-158.
- Abdel-Halim, K. Y., Aly, G. F., Oriby, A. S., & Abdou, G. Y. (2021a).** Potential toxic effects of nano-derived form of thiobencarb on two land snails, *Theba pisana* and *Eobania vermiculata*. Egyptian Journal of Chemistry, 64(12), 7439-7449.
- Abdel-Halim, K. Y., El-Saad, A. A., Talha, M. M., Hussein, A. A., & Bakry, N. M. (2013).** Oxidative stress on land snail *Helix aspersa* as a sentinel organism for ecotoxicological effects of urban pollution with heavy metals. Chemosphere, 93(6), 1131-1138.
- Abdel-Halim, K. Y., Osman, S. R., El-Danasoury, H. M., & Aly, G. F. (2021b).** Comparative toxicity of abamectin and nano-derived form on land snail, *Helix aspersa* in attributing to cytotoxicity and biochemical alterations. World Journal of Advanced Research and Reviews, 10(1), 296-311.
- Afomezie, P. I., Ebenebe, C. I., Njoku, O. O., Ufele, A. N., & Okonkwo, J. C. (2011).** Effects of different soil treatments on weight gain, shell length and shell aperture of snails (*Archachatina marginata*). Pakistan Journal of Nutrition, 10(2), 151-154.
- Aït Hamlet, S., Bensoltane, S., Djekoun, M., Yassi, F., & Berrebbah, H. (2012).** Histological changes and biochemical parameters in the hepatopancreas of terrestrial gastropod *Helix aspersa* as biomarkers of neonicotinoid insecticide exposure. African Journal of Biotechnology, 11(96), 16277-16283.
- Aït Hamlet, S., Bensoltane, S., Djekoun, M., & Berrebbah, H. (2016).** Evaluation of acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and catalase activities in the land snail *Helix aspersa* exposed to thiamethoxam. Journal of Entomology and Zoology Studies, 4, 369-374.
- Aït Hamlet, S., Bensoltane, S., Djekoun, M., & Berrebbah, H. (2019).** Effets du thiamethoxame et de la tefluthrine sur les biomarqueurs physiologiques de l'escargot terrestre *Helix aspersa*, Revue Agrobiologia, 9(2), 1491-1498.
- Alexander, M., Stuart, A., Palenzuela, N., Carmencita, C., Bernal, A. F. R., & Finbarr, G. H. (2014).** Effects of fertilizer applications on survival and recruitment of the apple snail, *Pomacea canaliculata* (Lamarck), Crop Protection, 64, 78-87.
- Ali, D., Ali, H., Alarifi, S., Kumar, S., Serajuddin, M., Mashih, A. P., & Ansari, A. A. (2015).** Impairment of DNA in a freshwater gastropod (*Lymnea luteola* L.) after exposure to titanium dioxide nanoparticles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 68(3), 543-552.

- Amazeze, N. H., Ugwoje, D., & Egonmwan, R. I. (2019).** Histopathological and physiological effects of selected agrochemicals on non-target *Archachтина marginata*. Nigerian Society for Experimental Biology Journal, 11(4).
- Astani, M., Vosoughi, A. R., Salimi, L., & Ebrahimi, M. (2012).** Comparative study of heavy metal (Cd, Fe, Mn, and Ni) concentrations in soft tissue of gastropod *Thais mutabilis* and sediments from intertidal zone of Bandar Abbas. Advances in Environmental Biology, 6, 319-326.
- Asztalos, B., Nemcsók, J. G., Benedeczy, I., Gabriel, R., Szabo, A., & Refaie, O. J. (1990).** The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 19(2), 275-282.
- Augenfeld, J. M. (1966).** Lactic dehydrogenase activities in invertebrates in relation to environment and mode of gas exchange. Comparative Biochemical Physiology, 18, 983-985.

B

- Bahgat, J., Ingole, B. S., & Singh, N. (2016).** Glutathion-S-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipid peroxidation as biomarker of oxidative stress in snails: A review. Invertebrates Survives Journal, 13, 336-349.
- Bakry, F. A., Hasheesh, W. S., & Hamdi, S. A. (2011).** Biological, biochemical, and molecular parameters of *Helisoma duryi* snails exposed to the pesticides Malathion and Deltamethrin. Pesticide Biochemistry and Physiology, 101(2), 86-92.
- Bakry, F. A., El-Hommosany, K., Abd El-Atti, M. S., & Ismail, S. M. (2013).** Alterations in the fatty acid profile, antioxidant enzymes and protein pattern of *Biomphalaria alexandrina* snails exposed to the pesticides diazinon and profenofos. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 7(37), 2603-2612.
- Ballesteros, M. L., Wunderlin, D. A., & Bistoni, M. A. (2009).** Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(1), 199-205.
- Banaee, M., & Taheri, S. (2019).** Metal bioaccumulation, oxidative stress, and biochemical alterations in the freshwater snail (*Galba truncatula*) exposed to municipal sewage. Journal of Advances in Environmental Health Research, 7(1), 8-17.
- Banaee, M., Sureda, A., Taheri, S., & Hedayatzadeh, F. (2019).** Sub-lethal effects of dimethoate alone and in combination with cadmium on biochemical parameters in freshwater snail, *Galba truncatula*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 220, 62-70.
- Barky, F. A., Abdelsalam, H. A., Mahmoud, M. B., & Hamdi, S. A. (2012).** Influence of Atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. Pesticide Biochemistry and Physiology, 104(1), 9-18.
- Baroudi, F., Al Alam, J., Fajloun, Z., & Millet, M. (2020).** Snail as sentinel organism for monitoring the environmental pollution; a review. Ecological Indicators, 113, 106240.
- Beeby, A., & Richmond, L. (2003).** Do the soft tissues of *Helix aspersa* serve as a quantitative sentinel of predicted free lead concentrations in soils?. Applied Soil Ecology, 22(2), 159-165.

- Beldi H. (2007).** Etude de *Gambusia affinis* (Poisson, Téléostéen) et *Donax trunculus* (Mollusque, Pélécy-pode) : écologie, physiologie et impacts de quelques alteragènes, Thèse de Doctorat d'État en Sciences de la Mer, Option : Biologie et écologie marines, Université Badji Mokhtar, Annaba, 110p.
- Belhaouchet, N., Djebbar Mohamed, R., Meksem, L., Grara, N., Zeriri, I., & Berrebbah, H. (2012).** Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide: The Spinosad on an alternate model: *Helix aspersa*. Journal of Applied Science and Research, 8(8), 4199-4206.
- Berandah, F. E., Kong, Y. C., & Ismail, A. (2010).** Bioaccumulation and distribution of heavy metals (Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn) in the different tissues of *Chicoreus capucinus* Lamarck (Mollusca: Muricidae) collected from Sungai Janggut, Kuala Langat, Malaysia. Environment Asia, 3(1), 65-71.
- Berlioz-Barbier, A., Baudot, R., Wiest, L., Gust, M., Garric, J., Cren-Olivé, C., & Buleté, A. (2015).** MicroQuEChERS–nanoliquid chromatography–nanospray–tandem mass spectrometry for the detection and quantification of trace pharmaceuticals in benthic invertebrates. Talanta, 132, 796-802.
- Bhattacharya, A., & Sahu, S. K. (2016).** Acute toxicity of NPK fertilizer on soil ecosystem using earthworm, *Drawida willsi* as a test specimen. International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry, 5(3), 233-238.
- Bhavan, P. S., & Geraldine, P. (2000).** Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. Aquatic Toxicology, 50(4), 331-339.
- Bhide, M., Gupta, P., Khan, A., Dubey, U., Thakur, P., Nema, P., & Jain, S. (2006).** Morphological and biochemical studies on the different developmental stages of a fresh water snail, *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae) after treatment with some pesticides. Journal of Environmental Biology, 27, 359-366.
- Bishop, J. M. (1983).** Cellular oncogenes and retroviruses. Annual Review of Biochemistry, 52(1), 301-354.
- Bluzat R., Seuge J. (1979).** Etude de la toxicité chronique de deux insecticides (Carbaryl et Lindane) à la génération F1 de *Lymnaea stagnalis* L. (Mollusque Gastéropode pulmoné). 1. Croissance des coquilles. Hydrobiology, 65 (3), 245-255.
- Borgå, K. (2013).** Ecotoxicology: bioaccumulation BT – reference module in earth systems and environmental sciences. In: Reference module in earth systems and environmental sciences. Elsevier, Amsterdam.
- Borkovic, S. S., Saponjic, J. S., Pavlovic, S. Z., Blagojlevic, D. P., Milosevic S.M., Kovacevic T. B., et al. (2005).** The activity of antioxidant defense enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. Comparative Biochemistry & Physiology, 141C, 366-374.
- Boulahbel, B., Aribi, N., Kilani-Morakchi, S., & Soltani, N. (2015).** Insecticidal activity of azadirachtin on *Drosophila melanogaster* and recovery of normal status by exogenous 20-hydroxyecdysone. African Entomology, 23(1), 224-233.

- Bourbia-Ait Hamlet, S. (2013).** Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 177p.
- Boyd, R. S. (2010).** Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology*, 36(1), 46-58.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brooker, C. (2000).** Le corps humain : Étude, structure et fonction. De Boeck Supérieur.

C

- Cabecinhas, A. S., Novais, S. C., Santos, S. C., Rodrigues, A. C., Pestana, J. L., Soares, A. M., et al. (2014).** Sensitivity of the sea snail *Gibbula umbilicalis* to mercury exposure-Linking endpoints from different biological organization levels. *Chemosphere*, 119: 490-497.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., & Gallo, G. (1999).** Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, 46(1), 67-76.
- Carefoot, T. H., Qian, P. Y., Taylor, B. E., West, T., & Osborne, J. (1993).** Effect of starvation on energy reserves and metabolism in the Northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*. *Aquaculture*, 118(3-4), 315-325.
- Ceballos-Picot, I., Nicole, A., Clément, M., Bourre, J. M., & Sinet, P. M. (1992).** Age-related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 281-293.
- Chabicovsky, M., Klepal, W., & Dallinger, R. (2004).** Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates: programmed cell death and metallothionein overload. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(3), 648-655.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004).** Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.
- Chen, D. W., Su, J., Liu, X. L., Yan, D. M., Lin, Y., Jiang, W. M., & Chen, X. H. (2011).** Amino acid profiles of bivalve mollusks from Beibu Gulf, China. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(4), 369-379.
- Claiborne, A. (1985).** Handbook of methods for oxygen radical research. Florida: CRC Press, Boca Raton, 283-284.
- Cochon, A. C., Della Penna, A. B., Kristoff, G., Piol, M. N., De Viale, L. S. M., & Guerrero, N. V. (2007).** Differential effects of paraquat on oxidative stress parameters and polyamine levels in two freshwater invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(2), 286-292.
- Coeurdassier, M., Saint-Denis, M., Vaufleury, A. G. D., Ribera, D., & Badot, P. M. (2001).** The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase

activity. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(9), 1951-1957.

Cofone, R., Carraturo, F., Capriello, T., Libralato, G., Siciliano, A., Del Giudice, C., & Ferrandino, I. (2020). *Eobania vermiculata* as a potential indicator of nitrate contamination in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204, 111082.

Crémazy, A., Brix, K. V., Smith, D. S., Chen, W., Grosell, M., Schlekot, C. E., & Wood, C. M. (2020). A Mystery Tale: Nickel Is Fickle When Snails Fail-Investigating the Variability in Ni Toxicity to the Great Pond Snail. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(6), 983-997.

D

Dallinger, R., Lagg, B., Egg, M., Schipflinger, R., & Chabicozsky, M. (2004). Cd accumulation and Cd-metallothionein as a biomarker in *Cepaea hortensis* (Helicidae, Pulmonata) from laboratory exposure and metal-polluted habitats. *Ecotoxicology*, 13(8), 757-772.

Daumer, M., Thaler, K., Kruis, E., Feneberg, W., Staude, G., & Scholz, M. (2007). Steps towards a miniaturized, robust and autonomous measurement device for the long-term monitoring of patient activity: ActiBelt. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*, 52(1), 149-155.

Davies, K. J., & Shringarpure, R. (2006). Preferential degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome may be inhibited in aging and in inflammatory neuromuscular diseases. *Neurology*, 66(1 suppl 1), S93-S96.

De Almeida, E. A., Miyamoto, S., Bainy, A. C. D., de Medeiros, M. H. G., & Di Mascio, P. (2004). Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Marine Pollution Bulletin*, 49(5-6), 386-392.

De la Cruz, M. S., Martin, A. R., & Joshi, R. C. (2001). Basal application of fertilizer reduces golden apple snail population. *International Rice Research Notes*, 26(1), 1-1.

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

De Vaufléury, A. G., & Pihan, F. (2000). Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere*, 40(3), 275-284.

De Vaufléury, A., Cœurdassier, M., Pandard, P., Scheifler, R., Lovy, C., Crini, N., & Badot, P. M. (2006). How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(3), 797-806.

De Vaufléury, A. D. (2015). Land snail for ecotoxicological assessment of chemicals and soil contamination using the terrestrial snail, *Helix aspersa*, at various stage of its life cycle: a review. *Environmental Indicators*, 365-391.

Di Giulio, R. T., & Meyer, J. N., (2008). Reactive oxygen species and oxidative stress. In: Di Giulio RT, Hinton DE (eds), *The toxicology of fishes*, CRC Press, Taylor & Francis group, pp. 273-324.

- Dittbrenner, N., Triebkorn, R., Moser, I., & Capowiez, Y. (2010).** Physiological and behavioural effects of imidacloprid on two ecologically relevant earthworm species (*Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*). *Ecotoxicology*, 19(8), 1567-1573.
- Douafer, L., Zaidi, N., & Soltani, N. (2020).** Seasonal variation of biomarker responses in *Cantareus aspersus* and physico-chemical properties of soils from Northeast Algeria. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(19), 24145-24161.
- Druart, C., Delhomme, O., De Vaufleury, A., Ntcho, E., & Millet, M. (2011).** Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(4), 1725-1732.
- Druart, C., Gimbert, F., Scheifler, R., & De Vaufleury, A. (2017).** A full life-cycle bioassay with *Cantareus aspersus* shows reproductive effects of a glyphosate-based herbicide suggesting potential endocrine disruption. *Environmental Pollution*, 226, 240-249.
- Duchateau, G. H., & Florkin, M. (1959).** Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archive de Physiologie et de Biochimie*, 67 (2), 306-314.

E

- El-Bolkiny, Y. E., El-Sayed T. R., & El-Ansary, A. A. (2000).** Effect of diethylthiocarbamate on some biological and physiological parameters of *Biomphalaria alexandrina* snails, *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 4 (2), 157.
- El-Deeb, F., Marie, M. A., Hasheesh, W., Atef, R., Tantawy, A., & Sayed, S. (2015).** Biological studies on the effect of certain inorganic fertilizers with observations on protein electrophoretic pattern of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Advances in Environmental Biology*, 9, 21-30.
- El-Deeb, F. A., Marie, M. A. S., Hasheesh, W. S., Hussein, R. M., & Sayed, S. S. (2017).** Biomarkers of oxidative stress in *Biomphalaria alexandrina* snails for assessing the effects of certain inorganic fertilisers. *Molluscan Research*, 37(4), 289-294.
- El-Gendy, K., Radwan, M., & Gad, A. (2009).** In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. *Chemosphere*, 77, 339-344.
- El-Shenawy, M. Z., Khalifa, E. Z., Ammar, M. M., Mousa, E. M., & Hafez, S. L. (2012).** Biological control of the disease complex on potato caused by root-knot nematode and Fusarium wilt fungus. *Nematologia Mediterranea*, 40(2), 169-172.
- El-Wakil, H. B., & Radwan, M. A. (1991).** Biochemical studies on the terrestrial snail, *Eobania vermiculata* (Müller) treated with some pesticides. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 26(5-6), 479-489.
- Espín, S., Martínez-López, E., Jiménez, P., María-Mojica, P., & García-Fernández, A. J. (2016).** Interspecific differences in the antioxidant capacity of two Laridae species exposed to metals. *Environmental Research*, 147, 115-124.

F

- Fabre, M. C., Descamps, M., & Baert, J. L. (1990).** Identification and partial characterization of vitellin and vitellogenin from *Scolopendra cingulate* Latreille (*Myriapoda Chilopoda*). In proceedings of the 8th international Conference on Myriapodology, Innsbruck, Austria. Ber. Nat.-ined. Verein Innsbruck, 117- 121.
- Fadhlaoui, M., & Lavoie, I. (2021).** Effects of temperature and glyphosate on fatty acid composition, antioxidant capacity, and lipid peroxidation in the Gastropod *Lymnaea* sp. *Water*, 13(8), 1039.
- Farid, N. M., Hamed, R. R., & Shokeer, A. G. (2009).** Glutathione and its related enzymes in fasciola snails (*Lymnaea natalensis*): purification and characterization of glutathione transferase. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(4), 317-325.
- Farombi, E., Adelowo, O. A., & Ajimoko, Y. R. (2007).** Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African catfish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun river. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4(2), 158-165.
- Fernando, G.C., & Horacio, H. (2012).** Vitellogenin and Lipovitellin from the prawn *Macrobrachium borellii* as hydrocarbon pollution biomarker. *Marine Pollution Bulletin*. 64, 1631-1636.
- Ferrari, A., Venturino, A., & Pechén de D'Angelo, A. M. (2007).** Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146, (3), 308-313.
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984).** Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114-120.
- Frias-Espericueta, M. G., Abad-Rosales, S., Nevárez-Velázquez, A. C., Osuna-López, I., Páez-Osuna, F., Lozano-Olvera, R., & Voltolina, D. (2008).** Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquatic Toxicology*, 89(3), 152-157.

G

- Gad, A. F. (2022).** Emmactin benzoate as a potential molluscicide against white garden snail, *Theba pisana* in association with biochemical defects. *Pest Management Science*, 78(4),1657-1664
- Gagnaire, B., Gagné, F., André, C., Blaise, C., Abbaci, K., Budzinski, H., & Garric, J. (2009).** Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. *Aquatic Toxicology*, 92(3), 155-167.
- Galloway, T. S., Sanger, R. C., Smith, K. L., Fillmann, G., Readman, J. W., Ford, T. E., & Depledge, M. H. (2002).** Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environmental Science & Technology*, 36(10), 2219-2226.

- Gao, M., Song, W., Zhang, J., & Guo, J. (2013).** Effect on enzymes and histopathology in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by triazole fungicides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 427-433.
- Geng, N., Wu, Y., Zhang, M., Tsang, D. C., Rinklebe, J., Xia, Y., & Ok, Y. S. (2019).** Bioaccumulation of potentially toxic elements by submerged plants and biofilms: a critical review. *Environment International*, 131, 105015.
- Gill, H. K., & Garg, H. (1998).** Pesticide: environmental impacts and management strategies. *Pesticides-Toxic Aspects*, 8, 187.
- Gnatyshyna, L., Falfushynska, H., Stoliar, O., & Dallinger, R. (2020).** Preliminary study of multiple stress response reactions in the pond snail *Lymnaea stagnalis* exposed to trace metals and a thiocarbamate fungicide at environmentally relevant concentrations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(1), 89-100.
- Goldsworthy, G. J., Mordue, W., & Guthkelch, J. (1972).** Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*, 18(3), 545-551.
- Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., & Bruckert, S. (1989).** Influence of Soil on the Growth of the Land Snail *Helix aspersa*. An Experimental Study of the Route for the Stimulating Factors. *Journal of Molluscan Studies*, 55, 1-7.
- Gomot-de Vaufleury, A., & Bispo, A. (2000).** Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. Sublethal effects on growth. *Environmental Science & Technology*, 34(9), 1865-1870.
- Goudsmit, E. M. (1975).** Neurosecretory stimulation of galactogen synthesis within the *Helix pomatia* albumen gland during organ culture. *Journal of Experimental Zoology*, 191(2), 193-198.
- Grara, N., Atailia, A., Boucenna, M., Berrebbah, H., & Djebbar, M. R. (2016).** Biochemical and histopathological study of the toxicity of metal dusts of the Annaba steel complex (North-East Algeria) at *Helix aspersa*. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7 (12), 4733-4741.

| |
|----------|
| H |
|----------|

- Habib, M. R., Mohamed, A. H., Osman, G. Y., Mossalem, H. S., El-Din, A. T. S., & Croll, R. P. (2016).** *Biomphalaria alexandrina* as a bioindicator of metal toxicity. *Chemosphere*, 157, 97-106.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974).** Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Halaimia, S., Tine, S., Tine-Djebbar, F., & Soltani, N. (2021).** Potential side-effects of a fertilizer on growth, biochemical composition and biomarker responses of the grey worm (*Aporrectodea caliginosa* Savigny, 1826). *Applied Ecology and Environmental Research*, 19(2), 1247-1266.
- Hamed, S. S., Abdelmeguid, N. E., Essawy, A. E., Radwan, M. A., & Hegazy, A. E. (2007).** Histological and ultrastructural changes induced by two carbamate molluscicides on the

digestive gland of *Eobania vermiculata*. Journal of Biological Sciences, 7(6), 1017-1037.

Herbert, D.G. (2010). The introduced terrestrial Mollusca of South Africa. Biodiversity Series 15. South African National Biodiversity Institute, Pretoria.

Hermes, C. C., Benvegnú, E., Costa, M. M., Rodriguez, R., & Vieira, M. I. B. (2020). Shedding of *Angiostrongylus costaricensis* larvae in the faeces of Swiss mice experimentally infected with different infective doses. Journal of Helminthology, 94.

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

I

Ibrahim, A. M., Sayed, D. A. (2019). Toxicological impact of oxyfluorfen 24% herbicide on the reproductive system, antioxidant enzymes, and endocrine disruption of *Biomphalaria alexandrina* (Ehrenberg, 1831) snails. Environmental Science and Pollution Research, 26, 7960-7968.

ISO 15952. (2006). Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae), Determination of the effects on growth by soil contamination, International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.

J

Jokanovi'c, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicology, 166, 139-160.

Jacob, F., & Monod, J. (1961). On the regulation of gene activity. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 26, pp. 193-211). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

K

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

Khalil, A. M. (2015). Toxicological effects and oxidative stress responses in freshwater snail, *Lanistes carinatus*, following exposure to chlorpyrifos. Ecotoxicology and Environmental safety, 116, 137-142.

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

Khan, I. A. T., Parveen, Z., & Ahmed, M. (2007). Multi-residue determination of organophosphorus pesticides and synthetic pyrethroids in wheat. *International Journal of Agriculture and Biology (Pakistan)*, 9(6), 905-908.

L

Lalthanzara, H., & Ramanujam, S. N. (2010). Effect of fertilizer (NPK) on earthworm population in the Agro-forestry system of Mizoram India. *Science Vision*, 10(4), 159-167.

Lan, C., Chen, G., Li, L., & Wong, M. H. (1992). Use of cattails in treating wastewater from a Pb/Zn mine. *Environmental Management*, 16(1), 75-80.

Larguinho, M., Cordeiro, A., Diniz, M. S., Costa, P. M., & Baptista, P. V. (2014). Metabolic and histopathological alterations in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* induced by chronic exposure to acrylamide. *Environmental Research*, 135, 55-62.

Larsen, A. E., Farrant, D. N., & MacDonald, A. J. (2020). Spatiotemporal overlap of pesticide use and species richness hotspots in California. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 289, 106741.

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

Li, L., Zheng, B., & Liu, L. (2010). Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Procedia Environmental Sciences*, 2, 1510-1524.

Livingstone, D. R. (1991). Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom. *American Zoologist*, 31(3), 522-534.

Lopes-Lima, M., Sousa, R., Geist, J., Aldridge, D. C., Araujo, R., Bergengren, J., & Zogaris, S. (2017). Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. *Biological Reviews*, 92(1), 572-607.

Loureiro, S., Tourinho, P. S., Cornelis, G., et al. (2018). Nanomaterials as soil pollutants BT - soil pollution: from monitoring to remediation. In: *Soil pollution: from monitoring to remediation*. Academic Press, Cambridge, pp 161-190.

Luo, J. S., Huang, J., Zeng, D. L., Peng, J. S., Zhang, G. B., Ma, H. L., & Gong, J. M. (2018). A defensin-like protein drives cadmium efflux and allocation in rice. *Nature Communications*, 9(1), 1-9.

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30.

M

- Ma, J., Zhou, C., Li, Y., & Li, X. (2014).** Biochemical responses to the toxicity of the biocide abamectin on the freshwater snail *Physa acuta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 101, 31-35.
- Maity, S., Roy, S., Chaudhury, S., & Bhattacharya, S. (2008).** Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. *Environmental Pollution*, 151(1), 1-7.
- Maity, M., Perveen, H., Dash, M., Jana, S., Khatun, S., Dey, A., & Chattopadhyay, S. (2018).** Arjunolic acid improves the serum level of vitamin B12 and folate in the process of the attenuation of arsenic induced uterine oxidative stress. *Biological Trace Element Research*, 182(1), 78-90.
- Marigomez, I., Kortabitarte, M., & Dussart, G. B. J. (1998).** Tissue-level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34(2), 167-176.
- Marklund, S. L. (1984).** Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochemical Journal*, 222(3), 649-655.
- Martinez-Tabche, L., Galar, M. M., Olvera, H. E., Chehue, R. A., López, E. L., Gómez-Olivá, L., & Sierra, O. T. (2002).** Toxic effect and bioavailability of malathion spiked in natural sediments from the Ignacio Ramirez dam on the snail *Stagnicola* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52(3), 232-237.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R. M., & Yu, H. (2000).** Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(8), 2085-2092.
- Medynskaya, O., & Popov, V. (1998).** Some aspects of the reproductive strategy of the land snail *Eobania vermiculata* (Müller) in the Crimea. In R. Bieler & P. Mikkelsen, *Unitas Malacologica. Abstracts, World Congress of Malacology*, Washington, D.C.
- Mekahlia, M. N., Tine, S., Menasria, T., Amieur, H., & Salhi, H. (2016).** In vitro biomarker responses of earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to herbicide sekator and phosphate fertilizer. *Water, Air & Soil Pollution*, 227(1), 1-8.
- Mohammadein, A., El-Shenawy, N. S., & Al-Fahmie, Z. H. H. (2013).** Bioaccumulation and histopathological changes of the digestive gland of the land snail *Eobania vermiculata* (Mollusca: Gastropoda), as biomarkers of terrestrial heavy metal pollution in Taif city. *Italian Journal of Zoology*, 80(3), 345-357.
- Mona, A. H., & Al-Kazafy, H., S. (2019).** Assessment of some new pesticides as molluscicides against the adult and eggs of chocolate-banded snail, *Eobania vermiculata*. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, 75.
- Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., & Vernet, G. (2003).** Acute and sublethal effects of two insecticides on earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) under laboratory conditions. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 18(1), 1-8.

- Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., & Biagianti-Risbourg, S. (2006).** Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere*, 64(1), 121-128.
- Moussard, C. (1999).** Biochimie structurale et métabolique, Médecine, Pharmacie. Sciences. De Boek & Larciers, Bruxelles.
- Muir, D. C. G., Rawn, G. P., Townsend, B. E., Lockhart, W. L., & Greenhalgh, R. (1985).** Bioconcentration of cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate and permethrin by *Chironomus tentans* larvae in sediment and water. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 4(1), 51-61.
- Müller, O. F. (1774).** Vermium terrestrium et fluviatilium, sen animalium infusoriorum, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succincta historia. 1774, Testacea. Havnie et Lipsiae, 2, 214.

N

- Narbonne, J. F., Garrigues, P., Ribera, D., Raoux, C., Mathieu, A., Lemaire, P., et al. (1991).** Mixed function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry & Physiology C*, 100, 37-42.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., & Datta, A. G. (2001).** Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *Science of the Total Environment*, 281(1-3), 237-246.
- Nmaduka, N. J., Samuel, U. C., & Akudo, O. C. (2018).** Biomarkers in *Achatina achatina* as ecological risk assessment models of mining activities, *Research Journal of Environmental Toxicology*, 12 (2), 63-72.

O

- OMS : (1993).** Programme international sur la sécurité chimique (PISSC). Biomarkers and Risk Assessment : Concepts and Principles. Environnement, Santé. Critères. 155, Organisation Mondiale de la Santé, Genève.
- Orbea, A., Dariush Fahimi, H., & Cajaraville, M. P. (2000).** Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of Mollusks and Crustaceans and Fish liver. *Histochemistry and Cell Biology*, 114(5), 393-404.
- Ouanzar, S. (2012).** Etude comparative de l'effet du semis direct et du labour conventionnel sur le comportement du blé dur (*Triticum durum* Desf.). Mémoire de Magister. Université Ferhat Abbas. Sétif, 70p.

P

- Padmaja R. J., & Rao, B. M. (1994).** Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(1), 142-148.
- Pandey, S., Kumar, R., Sharma, S., Nagpure, N. S., Sirivastava, S. K., & Verma, M. S. (2005).** Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 61, 114-120.
- Parmar, T. K., Rawtani, D., & Agrawal, Y. K. (2016).** Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 110-118.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., & Provini, A. (2010).** Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*, 79(5), 489-498.
- Patrício, I., Martins, F. G., dos Santos, T. C., Bonfim, M. C. D. V., Pinheiro, J., Julia, M., & Faro, C. C. M. S. (2019).** The Influence of Pesticides on the Biology and Physiology of the Land Snail *Bulimulus tenuissimus* (Orbigny, 1935). *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 4(5), 1433-1439.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T. C., Leitao, M. A., Okamoto, O. K., Morse, D., & Colepicolo, P. (2003).** Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 39(6), 1008-1018.
- Postlethwait, J. H., Bownes, M., & Jowett, T. (1980).** Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 79(2), 379-387.
- Preveen, F., & Miyata, T. (2000).** Effects of sublethal dose of chlorfluazuron on ovarian development and oogenesis in the common cutworm *Spodoptera litura* (Lipdoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*, 93, 1131-1137.

R

- Radwan, M. A., El-Wakil, H. B., & Osman, K. A. (1992).** Toxicity and biochemical impact of certain oxime carbamate pesticides against terrestrial snail, *Theba pisana* (Müller). *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 27(6), 759-773.
- Radwan, M. A., Essawy, A. E., Abdelmeguid, N. E., Hamed, S. S., & Ahmed, A. E. (2008).** Biochemical and histochemical studies on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90(3), 154-167.
- Radwan, M. A., El-Gendy, K. S., & Gad, A. F. (2010).** Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*, 79(1), 40-46.
- Radwan, M. A., & Mohamed, M. S. (2013).** Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 91-97.
- Ragab, F., & Shoukry, N. M. (2006).** Influence of certain fertilizers on the activity of some molluscicides against *Biomphalaria alexandrina* and *Lymnaea natalensis* snails. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 36(3), 959-977.

- Rai, N., Ashiya, P., & Rathore, D. S. (2014).** Comparative study of the effect of chemical fertilizers and organic fertilizers on *Eisenia foetida*. *International Journal of Innovative Research in Science*, 3(5), 12991-12998.
- Ralston-Hooper, K., Hardy, J., Hahn, L., Ochoa-Acuña, H., Lee, L. S., Mollenhauer, R., & Sepúlveda, M. S. (2009).** Acute and chronic toxicity of atrazine and its metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine on aquatic organisms. *Ecotoxicology*, 18(7), 899-905.
- Regoli, F., Nigro, M., & Orlando, E. (1998).** Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic Toxicology*, 40(4), 375-392.
- Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., & Piva, F. (2006).** Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 63-69.
- Regoli, F., Giuliani, M. E., Benedetti, M., & Arukwe, A. (2011).** Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4), 56-66.
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014).** Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93, 106-117.
- Rico, A., Sabater, C., & Castillo, M. Á. (2016).** Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127, 222-229.
- Russell, L. D., Malone, J. P., & Mac Curdy, D. (1981).** Effect of the microtubule disrupting agents, colchicine and vinblastine, on seminiferous tubule structure in the rat. *Tissue and Cell*, 13(2), 349-367.
- Russo, J., Lefeuvre-Orfila, L., & Lagadic, L. (2007).** Hemocyte-specific responses to the peroxidizing herbicide fomesafen in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environmental pollution*, 146(2), 420-427.

S

- Sadany, E. L., Aly, N. A., Eshra, E. H., Mesbah, H. A., & Ghoneim, E. I. (2009).** Toxicity of certain copper fungicides and other pesticides to terrestrial snails. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 34(5), 5243-5249.
- Salama, A. K., Osman, K. A., Saber, N. A., & Soliman, S. A. (2005).** Oxidative stress induced by different pesticides in the land snails, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(1), 92-96.
- Samal, S., Mishra, C. S. K., & Sahoo, S. (2019).** Setal-epidermal, muscular and enzymatic anomalies induced by certain agrochemicals in the earthworm *Eudrilus eugeniae* (Kinberg). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(8), 8039-8049.
- Samsi, A. N., Asaf, R., Santi, A., & Wannebo, M. I. (2017).** Gastropods as a bioindicator and biomonitoring metal pollution. *Aquacultura Indonesiana*, 18, 54.

- Saxena, P. N., Gupta, S. K., & Murthy, R. C. (2014).** Comparative toxicity of carbaryl, carbofuran, cypermethrin and fenvalerate in *Metaphire posthuma* and *Eisenia fetida*, a possible mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 218-225.
- Schuytema, G. S., Nebeker, A. V., & Griffis, W. L. (1994).** Effects of dietary exposure to forest pesticides on the brown garden snail *Helix aspersa* Müller. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(1), 23-28.
- Seuge J., Buzat R. (1980).** Toxicité à long terme d'un insecticide organophosphoré (Fenthion) chez le mollusque *Lymnea stagnalis* L. *Hydrobiology*, 26, 241-248.
- Sharaf, H. M., Salama, M. A., & Abd El-Atti, M. S. (2015).** Biochemical and histological alterations in the digestive gland of the land snail *Helicella vestalis* (Locard, 1882) exposed to methiocarb and chlorpyrifos in the laboratory. *International Journal of Science and Research*, 4, 334-343.
- Sheir, S. K. (2015).** The role of Caselio (plant fertilizer) exposure on digestive gland histology and heavy metals accumulation in the freshwater snail, *Lanistes carinatus*. *Journal of Bioscience and Applied Research*, 1(5), 223-233.
- Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyek, C. A., Newhall, A. R., & Friedman, L. (1966).** A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid, and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytical Biochemistry*, 19(3), 514-528.
- Silva, L., Durço, E., Pinheiro, J., & Bessa, E. C. A. (2013).** Effect of *Solanum paniculatum* leaf extract on food consumption, fertility and carbohydrate metabolism of *Bradybaena similaris* snail. *Journal of Natural Products*, 6, 168-176.
- Snyman, R. G., Reinecke, A. J., & Reinecke, S. A. (2005).** Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(1), 47-52.
- Sogorb, M. A., Pamies, D., de Lapuente, J., Estevan, C., Estévez, J., & Vilanova, E. (2014).** An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. *Toxicology Letters*, 230(2), 356-367.
- Soha Mobarak, A., Randa Kandil, A., & Samah Abd El-Kader, M. (2015).** Effect of clove plant extract on land slug and their reproductive system under laboratory and field conditions. *Journal of American Science*, 11 (12), 250-255.
- Soha Mobarak, A. (2016).** The malformation effect of chlorfluazuron on the reproductive system of land snail *Eobania vermiculata*. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 74, 51-55.
- Soltani, N., Soltani-Mazouni, N. (1992).** Diflubenzuron and oogenesis in the codling moth *Cydia pomonella* (L). In : *Pesticide Science*, 34, 257-261.
- Srivastava, A.K., & Singh, V.K. (2015).** Action of bait containing Eugenol (*Syzygium aromaticum*) on biochemical changes in fresh water snail *Lymnaea acuminata*. *Biochemistry and Molecular Biology*, 3 (1), 1-6.
- Spehar, R. L., Tanner, D. K., & Nordling, B. R. (1983).** Toxicity of the synthetic pyrethroids, permethrin and AC 222, 705 and their accumulation in early life stages of fathead minnows and snails. *Aquatic Toxicology*, 3(2), 171-182.

Stryer, L., 1988. Biochemistry, 3rd Edition. W. H. Freeman, New York.

Subaraja, M., & Vanisree, A. J. (2015). Cerebral ganglionic variations and movement behaviors of *Lumbricus terrestris* on exposure to neurotoxin. *Annals of Neurosciences*, 22(4), 199.

T

Tadjine, A. (2007). Impact de la pollution atmosphérique d'origine particulaire sur deux modèles (le rat et le lapin). Approche histologique, biochimique, hématologique et toxicologique, Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba, pp 104.

Tejada, M., Gómez, I., Franco-Andreu, L., & Benitez, C. (2016). Role of different earthworms in a soil polluted with oxyfluorfen herbicide. Short-time response on soil biochemical properties. *Ecological Engineering*, 86, 39-44.

Tripathi, G., Kachhwaha, N., & Dabi, I. (2009). Impact of phorate on malate dehydrogenases, lactate dehydrogenase and proteins of epigeic, anecic and endogeic earthworms. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95(2), 100-105.

Tsai, C. L. (2004). Introduction of slugs in plant quarantine. *Council of Agriculture Plant Protection Series*, 5, 113-119.

Tunholi, V. M., Tunholi-Alves, V. M., Monteiro, C. O., da Silva, L. C., de Melo Dolinski, C., Castro, R. N., & Martins, I. V. F. (2017). Biological, biochemical and histological features of *Bradybaena similaris* (Gastropoda: Pulmonata) infected by *Heterorabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1. *Experimental Parasitology*, 179, 28-35.

U

Umminger, B. L. (1977). Relation of whole blood sugar concentrations in vertebrates to standard metabolic rate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 56(4), 457-460.

V

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.

Van der Oost, R., Lopes, S. C. C., Komen, H., Satumalay, K., Van den Bos, R., Heida, H., & Vermeulen, N. P. E. (1998). Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*): use of a bioactivation: detoxication ratio as a biotransformation index (BTI). *Marine Environmental Research*, 46(1-5), 315-319.

Vandingenen, A., Hens, K., Macours, N., Zhu, W., Janssen, I., Breuer, M., ... & Huybrechts, R. (2001). Captopril, a specific inhibitor of angiotensin converting enzyme, enhances both trypsin and vitellogenin titers in the grey fleshfly *Neobellieria*

bullata. Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, 47(3), 161-167.

W

- Walsh, K., Dunstan, R. H., Murdoch, R. N., Conroy, B. A., Roberts, T. K., & Lake, P. (1994).** Bioaccumulation of pollutants and changes in population parameters in the gastropod mollusc *Austrocochlea constricta*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 26(3), 367-373.
- Wang, F., Ji, R., Jiang, Z., & Chen, W. (2014).** Species-dependent effects of biochar amendment on bioaccumulation of atrazine in earthworms. Environmental Pollution, 186, 241-247.
- Wang, K., Pang, S., Mu, X., Qi, S., Li, D., Cui, F., & Wang, C. (2015).** Biological response of earthworm, *Eisenia fetida*, to five neonicotinoid insecticides. Chemosphere, 132, 120-126.
- Wang, N., Zhang, J., Qin, M., Yi, W., Yu, S., Chen, Y., & Zhang, R. (2018).** Amelioration of streptozotocin-induced pancreatic β cell damage by morin: Involvement of the AMPK-FOXO3-catalase signaling pathway. International Journal of Molecular Medicine, 41(3), 1409-1418.
- Welter-Schultes, F. (2012).** European non-marine molluscs, a guide for species identification. Planet Poster Editions, Göttingen. 679 pp.

Y

- Yahiaabadi, M., Hamidian, A. H., & Ashrafi, S. (2018).** Dynamics of earthworm species at different depths of orchard soil receiving organic or chemical fertilizer amendments. Eurasian Journal of Soil Science, 7(4), 318-325.
- Yang, Z., Chen, B., Li, L., Zheng, B., & Liu, L. (2010).** International conference on ecological informatics and ecosystem conservation (ISEIS 2010) biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends, Procedia Environmental Sciences, 2, 1510-1524.
- Yap, C. K., & Cheng, W. H. (2013).** Distributions of heavy metal concentrations in different tissues of the mangrove snail *Nerita lineata*. Sains Malays, 42, 597-603.
- You, J., Brennan, A., & Lydy, M. J. (2009).** Bioavailability and biotransformation of sediment-associated pyrethroid insecticides in *Lumbriculus variegatus*. Chemosphere, 75(11), 1477-1482.

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

- between a relatively unpolluted and a chronically metal-polluted site. *Environmental Pollution*, 156(2), 367-379.
- Zawisza-Raszka, A., Dolezych, B., Dolezych, S., Migula, P., & Ligaszewski, M. (2010).** Effects of nickel exposure and acute pesticide intoxication on acetylcholinesterase, catalase and glutathione S-transferase activity and glucose absorption in the digestive tract of *Helix aspersa* (Pulmonata, Helicidae). *International Journal of Environment and Pollution*, 40(4), 380-390.
- Zhang, J., You, J., Li, H., Mehler, W. T., & Zeng, E. Y. (2018).** Particle-scale understanding of cypermethrin in sediment: Desorption, bioavailability, and bioaccumulation in benthic invertebrate *Lumbriculus variegatus*. *Science of the Total Environment*, 642, 638-645.
- Zouaghi, M. F., Berrebbah, H., Djebbar, M. R., & Amamra, R. (2015).** Study of the behavior/adaptation of non-target biological models exposed to multiple pollution. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 7(2), 207-215.
- Zouaghi, M. F., Berrebbah, H., Boudoucha, I., Rekaik, I. (2020).** Evaluation of the toxicity of a mixture insecticide used on a biological model: the snail *Helix aspersa*. *Studia Universitatis Vasile Goldiș, Seria Științele Vieții*, 30(2), 69-75.

ANNEXE

ANNEXE**PRODUCTION SCIENTIFIQUE****I. PUBLICATIONS INTERNATIONALES**

1. **ATTIA L., TINE S., TINE-DJEBBAR F & SOLTANI N.** (2021). Potential hazards of an inorganic fertilizer (Weatfert) for the brown garden snail (*Eobania vermiculata* Müller, 1774): growth, histological and biochemical changes and biomarkers. Applied Ecology and Environmental Research. 19(3): 1719-1734.
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1903_17191734.

II. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

1. **ATTIA L., TINE S., TINE-DJEBBAR F.** (2019). Effet d'un herbicide sur un bioindicateur de la pollution des sols, *Helix vermiculata*. Constantine- Algérie. Séminaire international Environnement et Toxicologie (SENTOX). Constantine- Algérie (Communication affichée).
2. **ATTIA L., TINE S., TINE-DJEBBAR F.** (2018). Dose-Dependant growth inhibition, physiological parameters disruption and bioaccumulation of some phytosanitary products in land snails, *Helix vermiculata* (Müller, 1774). International Science and Engineering Congress (SR) 21-23 septembre 2018. Alanya-Turkey (Communication orale).
3. **ATTIA L., TINE S., TINE-DJEBBAR F.** (2017). Toxicity of two pesticides and a fertiliser on a bioindicator of soil pollution, *Helix aperta*. The 16th International Days of Biotechnology. Hammamet-Tunisie (Communication affichée).
4. **ATTIA L., TINE S., TINE-DJEBBAR F.** (2017). Evaluation of the toxicity of two pesticides and a fertilizer on a bioindicator of soil pollution, *Helix aperta*. 6th International Conference on Chemical, Agricultural, Environmental and Biological Sciences (CAEBS-2017). Paris- France (Communication affichée).
5. **ATTIA L., TINE S., TINE-DJEBBAR F.** (2018). Biochemical composition and bioaccumulation (XFR technique) of a fertilizer on the land snails *Helix vermiculata* (Müller, 1774). 49th International Conference on Agricultural and Biological Science (ICABS). Caire, Egypte (Communication orale).
6. **ATTIA L., TINE S., TINE-DJEBBAR F., SOLTANI N.** (2021). Influence of the insecticide, Decis on non-target organisms, *Helix vermiculata* (Müller, 1774) as a bioindicator of soil pollution. 3rd Euro-mediterranean Conference for Environment Integration. Sousse-Tunisie (Communication orale).

III. COMMUNICATION NATIONALES

1. **ATTIA L., TINE S., TINE-DJEBBAR F.** (2018). Impact d'un insecticide, le Decis sur un bioindicateur de pollution, *Helix vermiculata*: Croissance, composition biochimique et biomarqueurs du stress oxydatif. Séminaire National sur la production Agricole et Agro Environnement. El Oued, Algérie (Communication orale).

2. **ATTIA L., TINE S., TINE-DJEBBAR F.** (2019). Effects of fertilizer on a bioindicator of pollution *Helix vermiculata* (Gastropoda: Helicidae) (Müller, 1774). Séminaire National sur l'état de la biodiversité dans les parcours steppiques: Inventaire et Valorisation. Tébessa, Algérie (Communication orale).

IV. FORMATIONS

- Formation en Analyse Physico Chimique et Biologique « CRAPC-SFAPCB 8-Mars 2018 » : Chromatographie en phase gazeuse (GC-FID) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).
- Formation en Analyse Physico Chimique et Biologique « CRAPC-SFAPCB 8-Juillet 2017 » : Chromatographie en phase liquide (HPLC) et couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS).
- Formation en Analyse Physico Chimique et Biologique « CRAPC-SFAPCB 8-Avril 2018 » : Spectrométrie d'absorption atomique (SAA).
- Formation : Maîtrise des outils de recherche et d'accès à la documentation scientifique.
- Formation : Article scientifique : Comment réussir sa publication ?
- Formation : Création d'un document scientifique avec Latex.
- Formation: Workshop (Université larbi Tebessi): Scientific paper: How to succès its rédaction and publication?

V. STAGES

- Stage au Laboratoire de Biologie cellulaire (Service d'Anatomie pathologique, Hôpital Professeur Nefissa Hamoud-ex Parnet) (Juillet 2018).
- Stage de perfectionnement à la Finlande (Novembre 2019).

VI. PROJET DE RECHERCHE

- Membre dans un projet de recherche PRFU, intitulé " **Etude de l'impact des pratiques agricoles « Engrais et Pesticides » sur les organismes non visés et la recherche de nouvelles alternatives pour la protection des produits agricoles**"

Code : "D01N01UN120120180005" Sous la direction du Pr. Tine Samir.

- Membre dans un projet de recherche PRFU, intitulé " **Valorisation des Huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales locales dans le domaine agronomique et médical** "

Code : "D01N01UN120120220001" Sous la direction du Pr. Tine-Djebbar Fouzia.