



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



Université Larbi Tébessi -Tébessa-

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

Département : Biologie des Êtres Vivants

MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

SPECIALITE: BIOLOGIE ANIMALE

OPTION : ECOPHYSIOLOGIE ANIMALE

## Thème

Les réponses biochimiques et physiologiques d'un mollusque gastéropode, *Eobania vermiculata* suite à un traitement par un pesticide

Présenté par :

M<sup>elle</sup> LADJAL Samra

M<sup>elle</sup> BOUKHECHEM Rahma

Devant le jury

Pr. TINE Samir	Président	U. Larbi Tébessi, Tébessa
Pr. TINE-DJEBBAR Fouzia	Promoteur	U. Larbi Tébessi, Tébessa
Dr. MESSAADIA Amira	Examineur	U. Larbi Tébessi, Tébessa

Date de soutenance : Le 13 Juin 2022

Année Universitaire : 2021/2022



# Remerciements

*Au terme de ce travail, qui est le fruit de toutes ces années d'études universitaires, nous remercions le dieu le tout puissant pour son aide et le courage qu'il nous a donné, pour surmonter les difficultés durant notre étude.*

*Toute notre gratitude au **Professeur TINE-DJEBBAR Fouzia**, le directeur de ce travail pour avoir toujours été prête à partager ses connaissances. Outre sa compétence, elle représentera toujours pour nous un exemple de dynamisme et de sagesse. Nous la remercions, également, pour son écoute et sa compréhension. Son exigence scientifique ainsi que sa confiance ont été précieux et m'ont permis de mener à terme cette recherche, dans les meilleures conditions.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à notre **Professeur TINE Samir** pour avoir accepté de présider le jury*

*J'exprime mes vifs remerciements à Notre chère enseignante **Dr. MESSAADIA Amira** qui a bien voulu évaluer ce travail et faire partie de cet honorable jury.*



# Sommaire

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>II. MATERIEL ET METHODES</b> .....	3
2.1. Présentation de l'espèce <i>Helix vermiculata</i> .....	3
2.2. Présentation du traitement .....	4
2.3. Collecte et élevage des escargots .....	4
2.4. Traitement .....	5
2.5. Dissection de l'escargot et prélèvement de l'hépatopancréas .....	6
2.6. Biométrie.....	7
2.7. Extraction et dosage des métabolites.....	7
2.7.1. Dosage des glucides totaux .....	8
2.7.2. Dosage des protéines totales.....	8
2.7.3. Dosage des lipides totaux .....	8
2.8. Extraction et dosage des biomarqueurs du stress oxydatif .....	11
2.8.1. Dosage de la glutathion-peroxydase (GPx).....	11
2.8.2. Dosage des glutathion S-transférases (GSTs) .....	11
2.8.3. Dosage du lactate déshydrogénase (LDH) .....	12
2.9. Dosage des biomarqueurs enzymatiques.....	12
2.9.1. Dosage de la phosphatase alcaline.....	12
2.9.2. Dosage de l'alanine amino transférase ALT (TGP) .....	12
2.9.3. Dosage de l'aspartate amino transférase AST (TGO) .....	13
2.10. Analyses statistiques.....	13
<b>III. RESULTATS</b> .....	14
3.1. Effet sur le comportement .....	14
3.2. Effet sur les paramètres physiologiques .....	14
3.2.1. Effet sur la mortalité.....	14
3.2.2. Effet sur la croissance des escargots.....	14
3.2.2.1. Effet sur le poids.....	14
3.2.2.2. Effet sur le diamètre de la coquille.....	14
3.3. Effet du traitement sur la composition biochimique .....	15
3.4. Effet du traitement sur les biomarqueurs enzymatiques.....	16

3.5. Effet du traitement sur les biomarqueurs du stress oxydatif .....	17
<b>IV. DISCUSSION</b> .....	19
4.1. Toxicité du traitement à l'égard des escargots .....	19
4.2. Réponses comportementales des escargots .....	19
4.3. Effet des traitements sur la croissance des escargots .....	20
4.4. Effet du traitement sur la composition biochimique .....	20
4.5. Effet du traitement sur les biomarqueurs du stress oxydatif .....	22
4.6. Effet du traitement sur les biomarqueurs enzymatiques.....	24
<b>V.CONCLUSION</b> .....	27
<b>VI. RESUME</b> .....	29
<b>VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	32

## *Liste des figures*

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1</b>	Morphologie externe d'un gastéropode (photo personnelle)	<b>3</b>
<b>Figure 2</b>	ACEPLAN 20 SP (photo personnelle).	<b>4</b>
<b>Figure 3</b>	Présentation du site d'étude, cimetière de Bekkaria-Tébessa (Photo personnelle).	<b>5</b>
<b>Figure 4</b>	Méthode d'élevage d' <i>Helix vermiculata</i> au laboratoire (Photos personnelles).	<b>6</b>
<b>Figure 5</b>	Protocole de dissection et de prélèvement de l'hépatopancréas d' <i>H. vermiculata</i> (Photos personnelles).	<b>6</b>
<b>Figure 6</b>	Biométrie des escargots (photos personnelles).	<b>7</b>
<b>Figure 7</b>	Extraction des protéines, glucides et lipides totaux (Shibko <i>et al.</i> , 1967).	<b>10</b>
<b>Figure 8</b>	Effet de l'insecticide sur le poids (g) (A) et le diamètre de la coquille (cm) (B) des escargots d' <i>H. vermiculata</i> ( $m \pm SEM$ , $n=16$ ) : test t de Student.	<b>15</b>
<b>Figure 9</b>	Effet de l'insecticide sur le taux de protéines totales (A), des lipides totaux (B) et des glucides totaux (C) ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) chez <i>H. vermiculata</i> au cours de deux périodes ( $m \pm SEM$ , $n=3$ répétitions) : test HSD de Tukey	<b>16</b>
<b>Figure 10</b>	Effet de l'insecticide sur l'activité des biomarqueurs enzymatiques : phosphatase alcaline (PAL) (A), aspartate amino transférase AST (TGO) (B) et alanine amino transférase ALT (TGP) (C) (U/mg de protéines) chez <i>H. vermiculata</i> au cours de deux périodes ( $m \pm SEM$ , $n=3$ répétitions) : test HSD de Tukey.	<b>17</b>
<b>Figure 11</b>	Effet de l'insecticide sur l'activité de la LDH (A), de la GPx (B) et des GSTs (C) chez <i>H. vermiculata</i> au cours de deux semaines du traitement ( $m \pm SEM$ , $n=3$ répétitions) : test HSD de Tukey.	<b>18</b>

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b>	Dosage des glucides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage.	<b>8</b>
<b>Tableau 2</b>	Dosage des protéines totales dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage	<b>8</b>
<b>Tableau 3</b>	Dosage des lipides totaux dans l'hépatopancréas : réalisation de la gamme d'étalonnage	<b>9</b>

## Liste des abréviations

**%** : Pourcentage.

**°C** : Degré Celsius.

**1V/1V** : deux solutions avec le même volume

**BBC** : Bleu brillant de coomasie.

**CDNB** : 1-Chloro, 2,4-Dinitrobenzène.

**CL<sub>50</sub>** : Concentration létale 50

**cm** : centimètre

**g** : Gramme.

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GSH** : Glutathion réduit

**GST** : Glutathion-S-transférase

**H** : heure

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.

**M** : Mole.

**m** : moyenne

**mg** : Milligramme.

**min** : Minute.

**ml** : Millilitre.

**Mm**: Millimolaire.

**n** : nombre de répétitions

**NaCl** : chlorure de sodium.

**nm** : Nanomètre.

**NPK** : Azote, phosphate, potassium.

**p**: coefficient de signification

**pH** : Potentiel hydrogène.

**t/mn** : Tours/minute.

**TCA** : Acide Trichloracétique.

**Trs** : tours

**µg** : Microgramme.

**µl**: Microlitre

# Introduction

## I. INTRODUCTION

Pour répondre aux besoins alimentaires qui prennent de plus en plus de l'ampleur, en raison de l'explosion démographique, l'homme fait appel à l'utilisation des produits chimiques dans la lutte contre les ravageurs des cultures (**Ouarda *et al.*, 2016**).

L'Algérie par sa position géographique, présente une grande diversité de biotope occupée par une importante richesse floristique et faunistique (**Morel, 1997**) et l'utilisation des insecticides, des fertilisants, des engrais, et autres produits phytosanitaires s'accroît avec le développement de l'agriculture (**Bouziati, 2007**). Cependant, les pesticides sont signalés comme produits à haut risque pour la santé de l'homme et de son environnement. Ils sont en effet fréquemment mis en cause dans la réduction de la biodiversité terrestre constatée dans les zones agricoles (**Ouarda *et al.*, 2016**). Le sol constitue l'habitat permanent d'une multitude d'être vivant (**Davet, 1996**). Il joue un rôle essentiel comme interface de l'environnement vis-à-vis des principales pollutions provoquées par l'Homme (**Calvet, 2003**), c'est un support d'une activité biologique intense ; ainsi, il est l'habitat d'une grande variété d'organismes (**Jeffery *et al.*, 2010**) tels que les mollusques.

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. Les gastéropodes comptent parmi les nombreux outils biologiques utilisés par les chercheurs afin d'évaluer la pollution du sol, d'identifier ou de prévoir les atteintes aux écosystèmes et de suivre leur évolution dans le temps et l'espace (**Kenza & Guedrez, 2019**).

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 (**Baroudi *et al.*, 2020 ; Cofone *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**).

Notre étude entre dans cette thématique et vise à évaluer les réponses physiologiques et biochimiques d'un gastéropode terrestre, *Helix vermiculata* après un traitement subaigu par un insecticide systémique "ACEPLAN". Le manuscrit est organisé en quatre grandes parties :

- (1) La première partie est consacrée à l'examen des aspects 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 de l'aspartate amino transférase AST (TGO), l'alanine amino transférase ALT (TGP) et Phosphatase alcaline.
- (3) La troisième partie est destinée à la détermination des biomarqueurs du stress oxydatif tels que les glutathion S-transférases, le lactate déshydrogénase et la glutathion peroxydase.

# Matériel et Méthodes

## II. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Présentation de l'espèce *Helix vermiculata*

Le choix de cette espèce est basé sur une longue enquête réalisée sur ses caractéristiques de bioindicateur de pollution. Ce gastéropode a la particularité de concentrer dans ses tissus des substances polluantes, tel que les insecticides.

Le modèle biologique utilisé dans notre travail est *Helix vermiculata*, escargot en bande de chocolat (Fig.1). Il est comestible, connu aussi sous le nom d'*Eobania vermiculata* (Muller, 1774). C'est un Mollusque pulmoné, terrestre, hermaphrodite et herbivore vivant dans la région méditerranéenne. La classification systématique de cette espèce est la suivante :

**Règne** : Animal

**Embranchement** : Mollusques

**Classe** : Gastéropodes

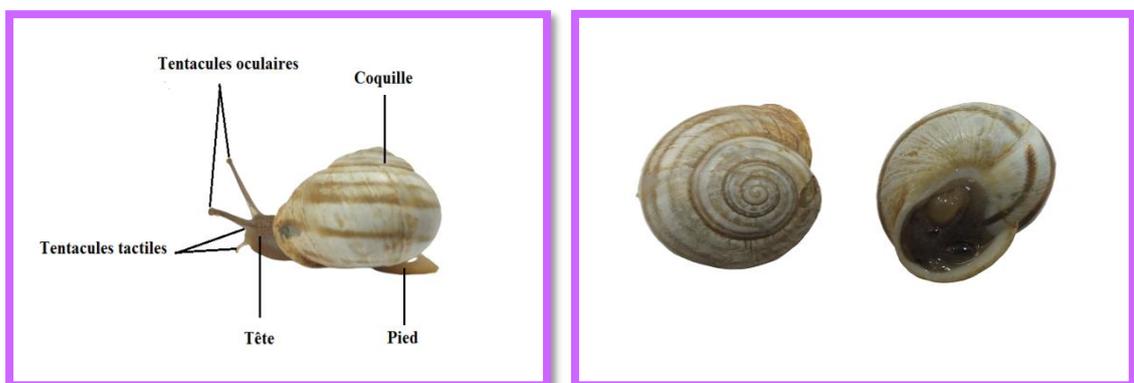
**Sous classe** : Pulmonés

**Ordre** : Stylommatophores

**Famille** : Helicidae

**Genre** : *Helix* ou *Eobania*

**Espèce** : *Helix vermiculata*



**Figure 1.** Morphologie externe d'un gastéropode (photos personnelles).

## 2.2. Présentation du traitement

ACEPLAN 20 SP est un insecticide systémique à action ovicide, larvicide et adulticide persistante appartient à la famille chimique des Chloronicotiniles assurant une protection contre un grand nombre d'insectes nuisible qui attaque les arbres fruitiers, les agrumes et les cultures maraichères ; il est compatible avec la plupart des produits phytosanitaires et engrais foliaires.



Figure 2. ACEPLAN 20 SP (photo personnelle).

## 2.3. Collecte et élevage des escargots

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. Ce site est caractérisé par un couvert végétal herbacé varié (Fig. 3), qui devient dense au printemps. La collecte des escargots est réalisée de manière aléatoire et manuelle, durant la période étalée du mois de Novembre 2021. 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.** Présentation du site d'étude, cimetière de Bekkaria-Tébessa (Photo personnelle).

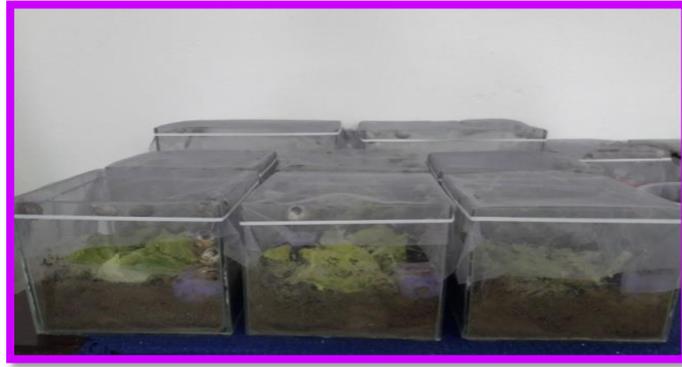
### 2.4. Traitement

Les escargots utilisés dans cette étude sont 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 2 lots (Fig. 4) comme suit :

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

Chaque lot à son tour, est réparti en 8 groupes de 16 individus chacun et maintenus dans un terrarium (20 × 20 × 20 cm). Les groupes d'escargots sont nourris de 35gr de laitue fraîche (escargots témoins), ou de laitue pulvérisée (10 pulvérisations) de solution de pesticide. La dilution d'insecticide a été préparée avec de l'eau distillée selon la dose recommandée (10g pour 100L).

La nourriture est fournie chaque trois jours lors du nettoyage des terrariums et le renouvellement de la solution pesticide chaque semaine. Pour déterminer l'effet de ces traitements sur le comportement, la croissance, la biochimie et les biomarqueurs, l'expérience est menée durant 2 semaines sous les conditions du laboratoire.



**Figure 4.** Méthode d'élevage d'*Helix vermiculata* au laboratoire (Photos personnelles).

### 2.5. Dissection de l'escargot et prélèvement de l'hépatopancréas

Chaque semaine de traitement, les escargots sont pesés puis décoquillés et leurs hépatopancréas rapidement excisés et pesés (Fig. 5).



**Figure 5.** Protocole de dissection et de prélèvement de l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* (Photos personnelles).

## 2.6. 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 le pesticide.

La croissance pondérale est évaluée chaque semaine en pesant les escargots avec une balance analytique. Le diamètre de la coquille a été mesuré avec un pied à coulisse chaque semaine pendant 2 semaines (Fig. 6).



**Figure 6.** Biométrie des escargots (photos personnelles).

## 2.7. 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 (100-200mg) 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)**.

### 2.7.1. 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 1).

**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

### 2.7.2. 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 2).

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

Tubes	0	2	3	4	5	6
Solution standard d'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

### 2.7.3. 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 3). Après 30 mn à l'obscurité, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530

nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide orthophosphorique, des complexes roses. La solution mère 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 ( $\mu$ l)	0	20	40	60	80	100
Solvant (éther /chloroforme) (1V/1V)	100	80	60	40	20	0

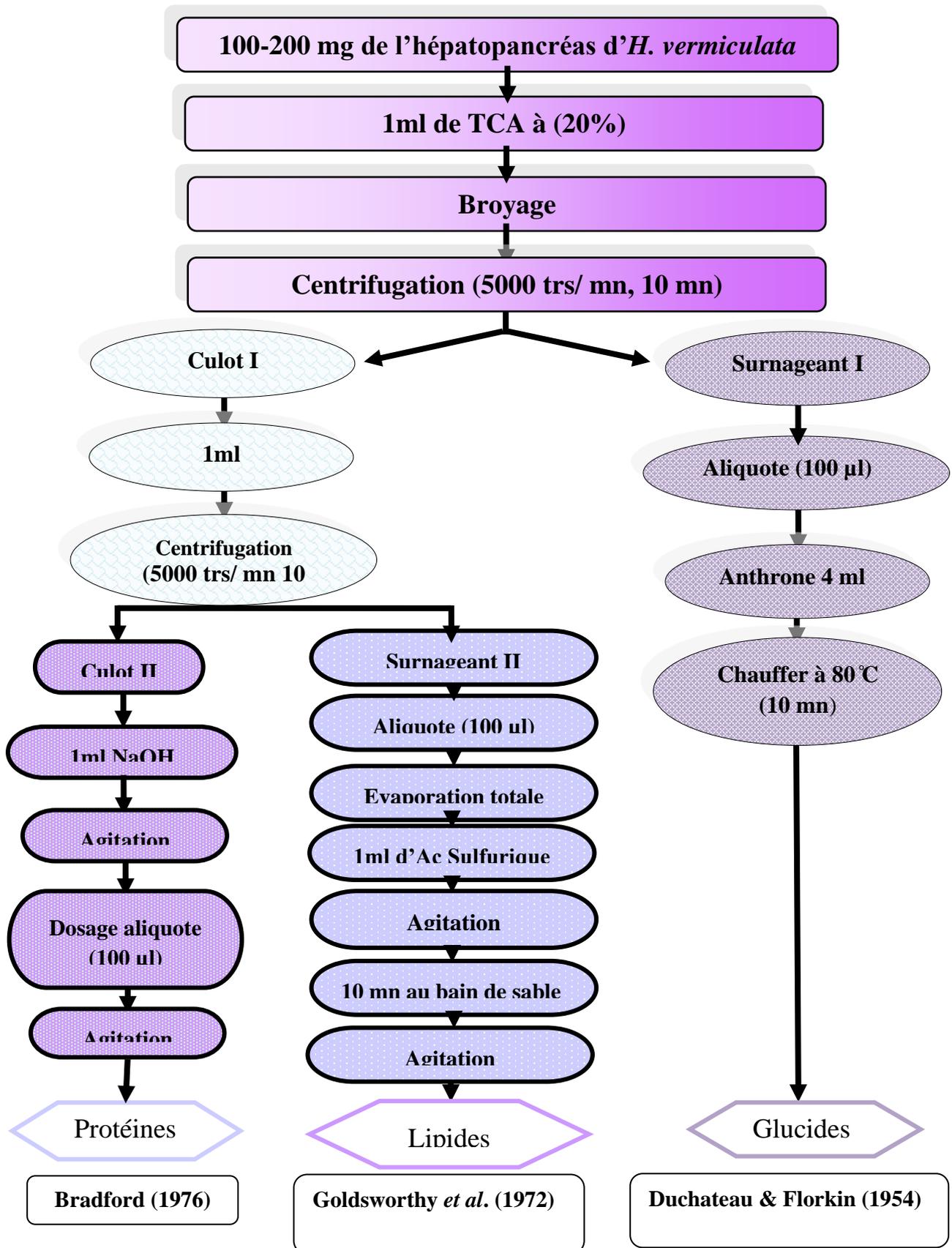


Figure 7. Extraction des protéines, glucides et lipides totaux (Shibko *et al.*, 1967).

## 2.8. Extraction et dosage des biomarqueurs du stress oxydatif

Des fragments de 100-200mg de la glande digestive des individus d'*H. vermiculata* traités et témoins ont fait l'objet d'un dosage des biomarqueurs du stress oxydatif tels que la glutathion-peroxydase (GPx), les glutathion-S-transférases (GSTs) et le lactate déshydrogénase (LDH) à une semaine et deux semaines de traitement.

### 2.8.1. 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 (100-200 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.

### 2.8.2. 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.

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

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

**Δ D<sub>o</sub>** : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

**9,6** : coefficient d'extinction molaire du CDNB (mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

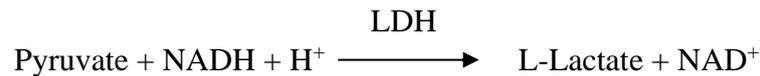
**Vt** : volume total dans la cuve : 1,4 ml [0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

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

**mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg.

### 2.8.3. Dosage du lactate déshydrogénase (LDH)

Le lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction du pyruvate par le NADH (Tietz, 1999), selon la réaction suivante :



La lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 340 nm chaque minute pendant 3 minutes. L'activité de la LDH est calculée selon la formule suivante :

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

## 2.9. Dosage des biomarqueurs enzymatiques

### 2.9.1. Dosage de la phosphatase alcaline

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

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

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

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

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

### **2.9.3. Dosage de l'aspartate amino transférase AST (TGO)**

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

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

### **2.10. Analyses statistiques**

Les résultats obtenus sont représentés sous la forme (moyenne  $\pm$  écart type moyen), et pour mieux visualiser les résultats obtenus la représentation graphique choisie est celle des histogrammes, Ces moyennes sont comparées par des tests statistiques (ANOVA et test HSD de Tukey) qui servent à comparer entre les échantillons (Témoins et traités) grâce au logiciel GRAPH PAD PRISM 7.

# Résultats

### III. RESULTATS

#### 3.1. Effet sur le comportement

Plusieurs symptômes sont apparus pendant les deux semaines de traitement par une dose unique de l'ACEPLAN, car on observe que :

- Les individus traités ne sont pas attirés par la nourriture comparativement aux individus témoins, cela est dû à une perte de chimio-réception.
- L'activité locomotrice et nutritionnelle des escargots a diminué, ils se positionnent au sommet des lots, et ils fuient généralement la nourriture.

#### 3.2. Effet sur les paramètres physiologiques

##### 3.2.1. Effet sur la mortalité

La viabilité des individus d'*H. vermiculata* est suivie chaque 3 jours lors de nettoyage des terrariums, nous avons constaté que le nombre total de mortalités des escargots témoins et traités était nulle durant les deux semaines de traitement avec la dose recommandée d'ACEPLAN.

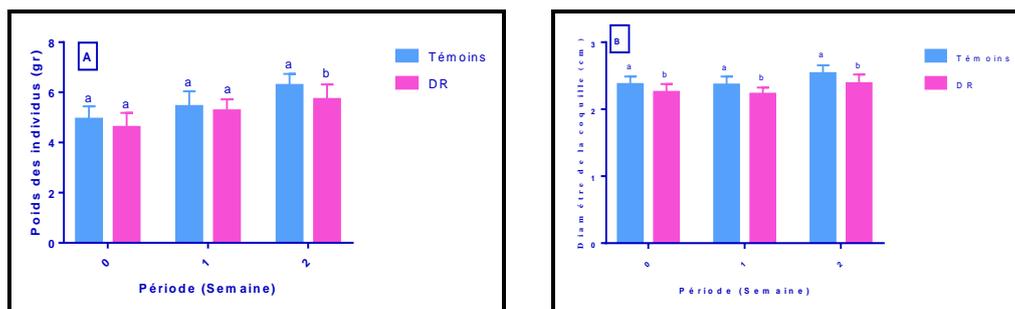
##### 3.2.2. Effet sur la croissance des escargots

###### 3.2.2.1. Effet sur le poids

L'effet du traitement a été évalué sur la croissance pondérale des escargots, la comparaison des moyennes par le test « t » de Student indique que l'ACEPLAN provoque une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du poids frais des individus après 15 jours de traitement ( $t = 2,967$  ;  $dt = 30$  ;  $p = 0,0059$ ). En revanche, aucun effet n'a été constaté au cours de la première semaine de traitement ( $t = 1,662$  ;  $dt = 30$  ;  $p > 0,05$ ).

###### 3.2.2.2. Effet sur le diamètre de la coquille

D'après les résultats représentés dans la Figure 8, on note une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du diamètre de la coquille des individus traités au cours de la semaine 1 ( $t = 3,422$  ;  $dt = 30$  ;  $p = 0,0018$ ) et la semaine 2 ( $t = 3,226$  ;  $dt = 30$  ;  $p = 0,0030$ ).



**Figure 8.** Effet de l'insecticide sur le poids (g) (A) et le diamètre de la coquille (cm) (B) des escargots d'*H. vermiculata* ( $m \pm SEM$ ,  $n=16$ ) : test t de Student.

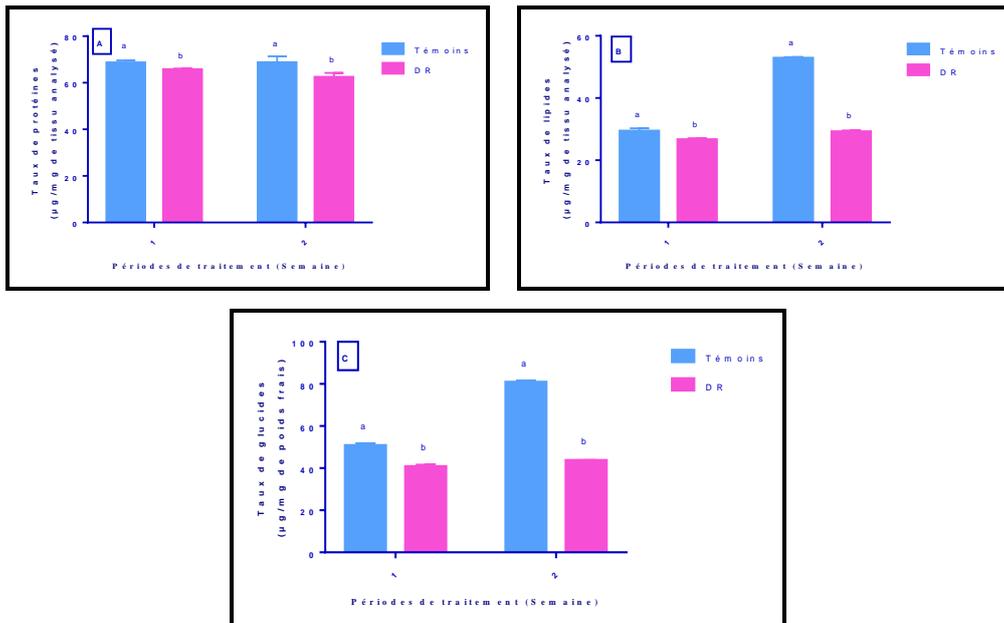
### 3.3. Effet du traitement sur la composition biochimique

Le traitement été appliqué à une dose recommandée sur *H. vermiculata*, ses effets ont été évalués sur la composition biochimique de l'hépatopancréas (protéines, glucides et lipides) à 2 semaines de traitement.

L'application de l'insecticide a induit une diminution significative du taux de protéines au cours de la première semaine ( $t = 4,359$  ;  $df=4$  ;  $p=0,0121$ ) et la deuxième semaine du traitement ( $t = 3,296$  ;  $df=4$  ;  $p=0,03$ ).

Les résultats du dosage des lipides mettent en évidence une diminution significative au cours de la première semaine ( $t = 4,64$  ;  $df=4$  ;  $p=0,0097$ ) et la deuxième semaine du traitement ( $t = 80,82$  ;  $df=4$  ;  $p<0,0001$ ).

L'analyse des résultats après 2 semaines de traitement révèle une diminution significative des glucides chez les traités au cours de la semaine 1 ( $t = 12,14$  ;  $df=4$  ;  $p=0,0003$ ) et la semaine 2 ( $t = 73,39$  ;  $df=4$  ;  $p<0,0001$ ).



**Figure 9.** Effet de l'insecticide sur le taux de protéines totales (A), des lipides totaux (B) et des glucides totaux (C) ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) chez *H. vermiculata* au cours de deux périodes ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$  répétitions) :test HSD de Tukey.

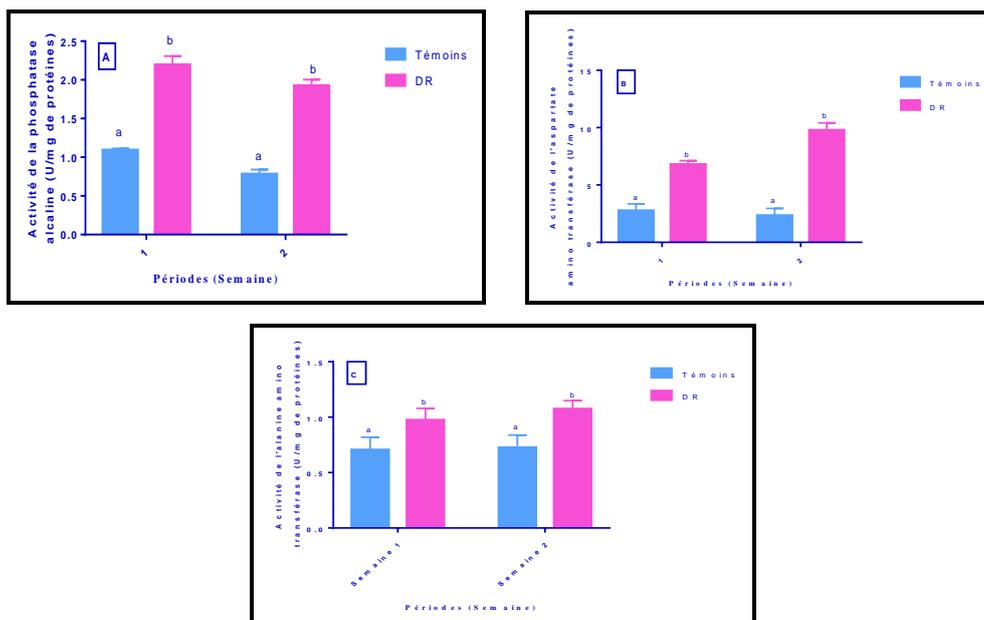
### 3.4. Effet du traitement sur les biomarqueurs enzymatiques

Les effets de l'insecticide ACEPLAN ont été évalués sur l'activité spécifique de trois biomarqueurs enzymatiques: Phosphatase alcaline, Aspartate amino transférase ASAT (TGO) et Alanine amino transférase ALAT (TGP).

Les résultats du dosage de la phosphatase alcaline représentés dans la figure révèlent une augmentation significative de l'activité de cette enzyme au cours de deux semaines de traitement comparativement aux témoins (S1 : Témoins vs DR :  $p<0,0001$  ; S2 : Témoins vs DR :  $p<0,0001$ ).

L'application de l'insecticide a induit une augmentation significative de la TGO au cours de la semaine 1 (Témoins vs DR :  $p<0,0001$ ) et la semaine 2 de traitement (Témoins vs DR S1 :  $P<0,0001$ ) (Fig.10).

L'effet de cet insecticide a été évalué également sur l'activité spécifique de la TGP. Il ressort de nos résultats une augmentation significative de cette enzyme au cours des périodes testées (S1 : Témoins vs DR :  $p=0.0484$  et S2 : Témoins vs DR:  $p= 0.0133$ ).



**Figure 10.** Effet de l'insecticide sur l'activité des biomarqueurs enzymatiques : phosphatase alcaline (PAL) (A) aspartate amino transférase AST (TGO) (B) et alanine amino transférase ALT (TGP) (C) (U/mg de protéines) chez *E. vermiculata* au cours de deux périodes ( $m \pm SEM$ ,  $n=3$  répétitions) : test HSD de Tukey.

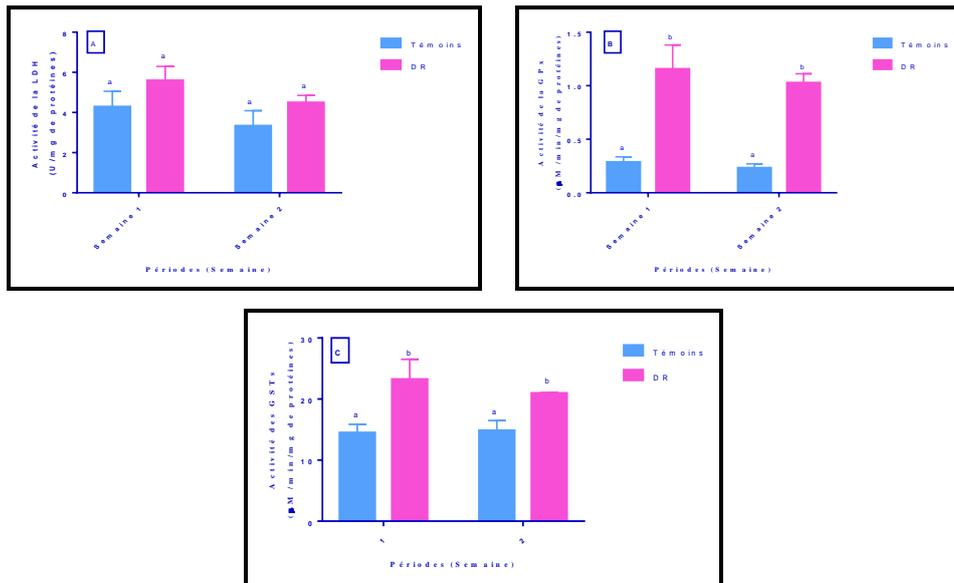
### 3.5. Effet du traitement sur les biomarqueurs du stress oxydatif

Une dose recommandée de l'insecticide a été testée sur trois biomarqueurs du stress oxydatif à savoir : le lactate déshydrogénase (LDH), et la glutathion peroxydase (GPx) et les glutathion S-transférases (GSTs).

Les résultats de l'activité spécifique du lactate déshydrogénase chez *H. vermiculata* ne montrent aucun effet du traitement sur ce biomarqueur au cours des de la période testée ( $p > 0,05$ ).

L'activité spécifique de la glutathion peroxydase chez les individus traités avec l'insecticide indique une augmentation au cours de la période testée (S1 :  $t = 6,558$  ;  $df=4$  :  $p=0,0028$  et S2 :  $t = 14,59$  ;  $df=4$  :  $p=0,0001$ ).

Finalement l'application de l'insecticide induit une augmentation significative de l'activité des GSTs chez les traités par rapport aux témoins au cours de la première (S1 :  $t = 4,236$  ;  $df=4$  :  $p=0,0133$ ) et la deuxième semaine (S1 :  $t = 6,297$  ;  $df=4$  :  $p=0,0033$ ).



**Figure 11.** Effet de l'insecticide sur l'activité de la LDH (A), de la GPx (B) et des GSTs (C) chez *H. vermiculata* au cours de deux semaines du traitement ( $m \pm SEM$ ,  $n=3$  répétitions) : test HSD de Tukey.

# Discussion

## IV. DISCUSSION

### 4.1. Toxicité du traitement à l'égard des escargots

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.*, 2009).

Le traitement d'*H. vermiculata* avec l'insecticide ACEPLAN, n'a induit aucune mortalité au cours de la période de traitement. Des résultats similaires ont été observés chez les gastéropodes traités par de faibles doses de cuivre et de plomb (Amusan *et al.*, 2002) et chez *Helix aspersa* exposé à un Nanoparticule (Rahal, 2020). 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. L'application de la thiaméthoxame, la téfluthrine et leurs mixtures a montré une toxicité à l'égard des adultes d'*Helix aspersa* (Aït Hamlet *et al.*, 2012).

Des travaux réalisés par un certain nombre de chercheurs sur d'autres espèces tels que les vers de terre (Zang *et al.*, 2000) ont signalé une augmentation du taux de mortalité des individus en fonction des concentrations appliquées (Mostert *et al.*, 2002 ; Capowiez *et al.*, 2005 ; Sardo & Soares, 2010).

### 4.2. Réponses comportementales des escargots

Plusieurs observations ont été faites au cours de l'exposition des escargots aux traitements telles que la diminution de l'activité locomotrice, l'évitement de la nourriture et le positionnement des individus au sommet des terrariums. Les mêmes comportements ont été signalés chez la même espèce après traitement avec l'insecticide, l'herbicide et l'engrais (Attia *et al.*, 2022). En outre, 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, l'application des néonicotinoïdes et des pyréthrinoïdes qui sont des substances neurotoxiques, induit une diminution de l'activité locomotrice des escargots et leur positionnement sous le toit des terrariums (Palermo-Neto *et al.*, 2003 ; Datta & Kaviraj,

2003). Les travaux de **Coeurdassier *et al.* (2001)**, ont montré une diminution de la consommation alimentaire des escargots traités par le diméthoate ce qui a provoqué une inhibition de leur croissance et de leur survie.

#### 4.3. Effet des traitements sur la croissance des escargots

Les modifications de la biométrie du corps des escargots sont souvent utilisées comme biomarqueurs pertinents, car les pertes élevées de ces paramètres ont des effets négatifs sur leur survie et leur 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 car les réponses observées variaient selon le type de pesticides et la dose administrée. De plus, plusieurs travaux ont montré que cette réduction est liée au mode d'application (**Salama *et al.*, 2005 ; Radwan *et al.*, 2008**) et à la durée du traitement (**Coeurdassier *et al.*, 2001**).

Nos résultats révèlent une réduction du poids et du diamètre de la coquille des escargots traités par l'insecticide. Cette perturbation de la croissance est due à l'inhibition de la synthèse d'une hormone de croissance essentielle chez les escargots (**Bourbia *et al.*, 2013**) et au phénomène d'évitement de se nourrir (**Swaileh & Ezzughayyar, 2000 ; Gimbert *et al.*, 2008 ; Hispard, 2008**). 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.

La réduction significative de la croissance des individus exposés au traitement peut s'expliquer par une réduction des réserves énergétiques, allouées à la croissance (Taux de lipides et de 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 (**Ait Hamlet *et al.*, 2019**).

#### 4.4. Effet du traitement sur la composition biochimique

Les paramètres biochimiques (métabolite et enzymes) chez les organismes exposés aux contaminants toxiques ont été utilisés comme biomarqueurs et peuvent constituer un important outil de diagnostic pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (**Agrahari *et al.*, 2007 ; Forbes *et al.*, 1997 ; McLaughlin *et al.*, 2000**).

Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes connues (**Mahler et al., 1968**). Elles sont principalement impliquées dans l'architecture de la cellule, et pendant les périodes de stress chronique, elles constituent aussi une autre source d'énergie (**Padmaja & Rao, 1994 ; Moussard, 1999**) grâce au catabolisme.

Au cours de notre expérimentation les résultats obtenus montrent que le traitement par l'Aceplan provoque une diminution significative du taux de protéines chez *H. vermiculata*. Nos résultats sont en accord avec ceux d'**El Wakil & Radwan (1991)** et **Radwan et al. (2008)** qui ont montré que l'application de deux types de carbamates (Méthomyl et Méthiocarbe) a induit une diminution du taux de protéines. Par contre, une augmentation significative du taux de protéines a été constatée dans l'hépatopancréas d'*E. vermiculata* traité avec l'engrais, l'herbicide et l'insecticide (**Attia et al., 2022**).

**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.

Les glucides sont des composés dont la fonction principale est de stocker et fournir de l'énergie (**Brooker, 2000**). 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 escargots à l'insecticide. Des résultats similaires ont été constatés chez *H. vermiculata* traité au Decis, au Zoom et au Weatfert (**Attia et al., 2022**), chez *H. aspersa* traité au thiaméthoxame (**Aït Hamlet et al., 2012**) et à mélange d'insecticides, imidaclopride et acétamipride (**Zouaghi et al., 2020**). Nos résultats sont conformes avec ceux de **Mohammadein et al. (2013)** et de **Radwan et al. (2008)** qui 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. Par contre, les travaux de **Gueddouche (2017)** ont montré une augmentation de ce métabolite chez *E. vermiculata* après traitement par deux types d'engrais : le NPK et l'Urée.

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 d'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 de **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, *Apporectode acaliginosa* traité par un engrais inorganique, le NPK (**Halaimia et al., 2021**). 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 du traitement sur les biomarqueurs du stress oxydatif**

L'étude du système de défense antioxydant est augmentée en raison de son potentiel utilité de fournir des biomarqueurs biochimiques qui peuvent être utilisés dans la surveillance environnementale (**Ballesteros, 2009**). En effet l'inhibition ou l'induction in vivo des biomarqueurs est un bon outil environnemental pour évaluer l'exposition et les effets potentiels des xénobiotiques sur les organismes (**Sturn et al., 2000**).

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit de manière continue et à des niveaux physiologiques dans la cellule, elle agit plus lentement que la catalase mais elle possède une meilleure affinité pour le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que cette dernière (**Zhao et al., 2006**). Elle catalyse la réduction de peroxydes organiques avec oxydation concomitante du glutathion réduit (GSH) (**Paglia & Valentine, 1967**).

Au cours de notre étude, nous avons obtenu une augmentation de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) hépatopancréatique chez les escargots traités par l'insecticide par rapport aux témoins.

Les résultats de **Attia et al. (2022)** révèlent une augmentation significative de l'activité de la GPx chez *E. vermiculata* exposé au Weatfert, au Decis et au Zoom. Des observations similaires ont été rapportées par **El-Shenawy et al. (2012)** après traitement des escargots par le Cadmium, le Plomb et le Cuivre, chez *Lymnaea natalensis* exposée au Niclosamide (**Farid et al., 2009**) et chez *Scylla olivacea* traitée au cadmium (**Kavithal et al., 2013**). Cette augmentation peut être attribuée à la production de radicaux libres (**Hermes et al., 2004**) 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**).

Les GSTs ont un rôle important dans la détoxification des substances xénobiotiques et interviennent en catalysant la conjugaison de ces substances avec le groupement thiol du glutathion endogène (**Jakoby & Habig, 1980**).

La présente étude a montré une augmentation de l'activité des GSTs au niveau de l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* traité avec l'insecticide. Des résultats similaires ont été constatés chez la même espèce exposée aux pesticides et à l'engrais (**Attia et al., 2022**), chez *Physaacuta* exposée à certains pesticides (**Ma et al., 2014**) et chez *Clarias gariepinus* traitée au spinosad (**Farombi et al., 2007**).

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. Par contre, **Abdel-Halim et al. (2021b)** marquent une diminution de l'activité des GSTs chez *H. aspersa* traité par les pesticides (Vertimec et Fast Max Super).

LDH est impliquée dans le métabolisme des glucides des cellules et joue un rôle clé dans le maintien de l'équilibre entre le catabolisme et anabolisme des glucides chez les mollusques (**Chen et al., 2011**). 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., 1999 ; Gupta et al., 1991**). C'est une enzyme métabolique importante qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate dans la glycolyse anaérobie. Elle est 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**).

Nos résultats ont révélé une augmentation non significative de l'activité spécifique de la LDH dans l'hépatopancréas d'*H. vermiculata* comparativement aux témoins, les mêmes résultats ont été trouvés chez la même espèce (*E. vermiculata*) soumise à des doses sublétales de lannate (**Khalil, 2016**). **Salama et al. (2005)** ont enregistré une augmentation significative du niveau de la LDH chez *Helix aspersa* exposé à plusieurs produits chimiques tels que le méthomyl, le carbofuran et le chlorpyrifos. Une augmentation de la LDH a été également constatée chez *H. vermiculata* traité avec deux pesticides et un engrais (**Attia, 2022**).

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.

#### **4.6. Effet du traitement sur les biomarqueurs enzymatiques**

Les toxiques sont transportés par les hémocytes vers l'hépatopancréas par différentes voies. L'atteinte de la glande digestive, le centre métabolique de détoxification des substances synthétiques est l'équivalent du foie chez les vertébrés, est confirmée par des modifications de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT), de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de la phosphatase alcaline (PAL). Les changements dans l'activité de ces enzymes sont vraiment le signal le plus important de la toxicité du foie (**Abdelmonem, 2016**).

Les enzymes amino transférases (ASAT, ALAT) et la phosphatase alcaline (PAL) les plus fréquemment mesurées pour les atteintes hépatiques, sont des enzymes qui peuvent être libérées par les hépatocytes au cours de la nécrose ou par les modifications de la perméabilité de la membrane cellulaire qui permettent aux enzymes de s'échapper des cellules (**Fregia & Jenes, 1994**).

**Asada & Galambos (1963)** ont suggéré que l'évaluation des activités transaminases donnait une bonne indication sur les dommages aux cellules parenchymateuses et les effets biochimiques toxiques.

Dans notre recherche, l'insecticide testé, l'Aceplan, a causé une augmentation significative des activités enzymatiques des amino transférases (ASAT et ALAT), et de la phosphatase alcaline (PAL).

De même, les travaux de **Bakry (2011)** ont montré une augmentation des concentrations de ces enzymes (ASAT et ALAT) dans l'hémolymphe et les tissus des escargots *Bulinus truncatus* traités avec les concentrations létales de l'extrait végétal de *Adenium obesum*. De plus, l'application de la lannate, comme certains autres pesticides, peut altérer les activités d'ASAT, ALAT et PAL (**Celik et al., 2009**).

Aussi, une transamination induite a été mise en évidence par **Tiwari & Singh (2005)** dans les différents tissus de l'escargot d'eau douce *Lymnaea acuminata* après une exposition sublétales à l'extrait de latex d'*Euphorbia tirucalli*. Des résultats similaires ont été obtenus par **Radwan et al. (1993)** en utilisant le Chlorfluazuron contre les escargots terrestres *Helix aspersa*.

Les résultats obtenus par **Sharaf (2015)** ont montré que l'application de deux pesticides (chlorpyrifos, méthiocarbe) a induit l'augmentation des niveaux de l'ASAT et l'ALAT. Chez *Eobania vermiculata*, l'activité ALAT a augmenté de manière significative avec l'augmentation de la dose d'abamectine (**Hamza, 2020**). Chez la même espèce, on note un changement des activités enzymatiques (ASAT, ALAT, PAL) en réponse aux doses sublétales de Thymol et Nicotine. L'augmentation de l'activité des enzymes, ASAT et ALAT se traduit par une désamination accrue pour le processus de gluconéogenèse, en particulier dans des conditions d'altération du métabolisme de glucides et/ou de diffusion de ces enzymes de leurs sites intracellulaires vers l'hémolymphe qui implique des lésions tissulaires induites par les molluscicides végétaux appliqués (Thymol and Nicotine).

**Conclusion**

## V. CONCLUSION

Les interrogations sur les conséquences environnementales des pesticides nécessitent le développement de méthodes adaptées pour l'analyse de leurs effets sur les invertébrés terrestres, notamment sur l'escargot *Helix vermiculata*. Cette espèce est un excellent bioindicateur de la dégradation du milieu, elle est particulièrement sensible à une pollution par les insecticides.

Le travail réalisé, nous a permis d'étudier chez un gastéropode pulmoné, *Helix vermiculata*, l'effet d'un insecticide systémique, l'ACEPLAN, sur le comportement, sur certains paramètres morphométriques (poids de l'escargot et le diamètre de la coquille), sur les paramètres biochimiques (glucides, protéines, lipides), sur quelques biomarqueurs enzymatiques (ASAT, ALAT, PAL) et sur les biomarqueurs du stress oxydatif (GPx, GST, LDH).

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

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

A l'avenir, il serait intéressant de :

- Mesurer la bioaccumulation des résidus de l'insecticide dans les tissus mous de l'escargot.
- Evaluer l'effet de cet insecticide sur l'embryotoxicité.
- Déterminer l'effet de cet insecticide sur la reproduction des escargots.

# Résumé

## VI. RESUME

Cette étude concerne l'évaluation de l'effet potentiel d'un insecticide systémique l'ACEPLAN sur un mollusque gastéropode, *Helix vermiculata*. Le traitement a été appliqué à la dose recommandée par ingestion pendant 15 jours.

Les effets de cet insecticide ont été examinés sur la croissance, la composition biochimique et les biomarqueurs du stress oxydatif chez *H. vermiculata*. Les biomarqueurs physiologiques ont été également déterminés.

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

L'application de ce pesticide a provoqué également une augmentation des biomarqueurs du stress oxydatif, tels que la LDH, la GPx, et les GSTs. En outre, ce traitement provoque une augmentation des biomarqueurs physiologiques tels que la PAL, TGP, et TGO.

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

## Abstract

This study concerns the evaluation of the potential effect of a systemic insecticide ACEPLAN on the gastropod mollusc, *Helix vermiculata*. The snails were exposed to a recommended dose of ACEPLAN by ingestion for 15 days.

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

The results obtained show that ACEPLAN has an effect on the growth of *H. vermiculata* (weight and shell diameter). However, the biochemical study shows that the insecticide induces a depletion of energy reserves (carbohydrates and lipids) and a decrease in protein rate in *H. vermiculata*.

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

Also, this treatment revealed an increase in the physiological biomarkers such as PAL, TGP and TGO activity.

**Key words:** *Helix vermiculata*, Insecticide, Growth, Biochemical composition, Biomarkers of Oxidative stress, Enzymatic biomarkers.

## ملخص

تتعلق هذه الدراسة بتقييم التأثير المحتمل لمبيد حشري جهازى Aceplan على رخويات بطنّيات الأرجل من نوع *Helix vermiculata* تم تعريض القواقع لتركيز واحد من مبيد Aceplan عن طريق الابتلاع لمدة 15 يومًا.

حاولنا تقييم آثار الإجهاد التأكسدي المحتمل على مستوى الغدة الهضمية من خلال مراقبة نشاط بعض المؤشرات الحيوية الأنزيمية؛ GST و LDH و GPx و بعض الإنزيمات مثل AST و ALT و PAL. قمنا أيضًا بقياس مستوى البروتينات الكلية و مصادر الطاقة مثل الكربوهيدرات والدهون الكلية وبعض التغيرات الشكلية والسلوكية.

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

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

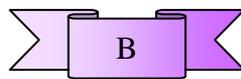
# Références bibliographiques

## VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Abdel-Halim, K. Y., Osman, S. R., El-Danasoury, H. M., & Aly, G. F. (2021). 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(01): 296-311.
- Abdelmonem, M.K. (2016). Impact of methomyl lannate on physiological parameters of the land snail *Eobania vermiculata*. *The journal of Basic & Applied Zoology*. 74:1-7.
- Agarwal S.K., 2002. Pollution management: Heavy metal pollution. (Ashish Publishing House) Publishing Corporation, New Delhi, 4: 7-190.
- Agrahari, S., Pandey, K. C., & Gopal, K. (2007). Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 88(3) : 268-272.
- Ait Hamlet, S., Djekoun, M., Bensoltane, S., & Berrebbah, H. (2019). Effets du thiaméthoxame et de la téfluthrine sur les biomarqueurs physiologiques de l'escargot terrestre *Helix Aspersa*. *Agrobiologia*. 9(2) : 1491-1498.
- Ait Hamlet, S., Bensoltane, S., & Berrebbah, H. (2020). Effets aigus de l'exposition à la tartrazine (E102) sur le comportement et l'histologie d'un modèle biologique l'escargot terrestre *Helix aspersa*. *Nutrition & Santé*. 9(1) : 18-27.
- Ait 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.

- Amusan, A. A. S., Anyaele, O. O ., & Lasisi, A. A. (2002). Effects of copper and lead on growth, feeding and mortality of terrestrial gastropod *Limicolaria flammea* (Muller, 1774). African Journal of Biomedical Research. 5(1-2).
- Asada, M., & Galambos, J. T. (1963). Sorbitol dehydrogenase and hepatocellular injury: an experimental and clinical study. Gastroenterology. 44(5) : 578-587.
- Asztalos, B., Nemcsók, J. G., Benedeczky, 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.
- Attia, L. (2022) Impact des pratiques agricoles sur les organismes non visés, cas d'un gastéropode bioindicateur de pollution, *Helix vermiculata* (Müller, 1774). Thèse de Doctorat en Physiologie Animale, Université de Tébessa, 100 p.
- Augenfeld, J. M. (1966). Lactic dehydrogenase activities in invertebrates in relation to environment and mode of gas exchange. Comparative Biochemistry and Physiology. 18(4): 983-985.



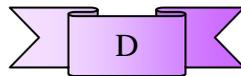
- Bakry, F. A., Mohamed, R. T., & Hasheesh, W. S. (2011). Impact of methanol extract of *Adenium obesum* plant on some biochemical and biological parameters of *Bulinus truncatus* snails. Journal of Evolutionary Biology Research. 3(6) : 87-94.
- Ballesteros, M. L., Wunderlin, D. A., & Bistoni, M. A. (2009). Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety. 72(1) : 199-205.
- Bhavan, P. S., & Geraldine, P. (1997). Alterations in concentrations of protein, carbohydrate, glycogen, free sugar, and lipid in the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposure to sublethal concentrations of endosulfan. Pesticide Biochemistry and Physiology. 58(2): 89-101.

- Bourbia Ait hamlet, S. (2013). Évaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa* , Mémoire de Magistère en biologie, Université de Annaba - Badji Mokhtar, 177 p.
- Bouziani M. (2007). L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de médecine et de la santé. Santé Maghreb. [consulté le, 12-05-2022]. <http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm>
- Bradford, M. M. A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytique Biochemistry*. 72: 248-254.
- Brooker, D., & Duce, L. (2000). Wellbeing and activity in *dementia*: A comparison of group reminiscence therapy, structured goal-directed group activity and unstructured time. *Aging & Mental Health*. 4(4) : 354-358.



- Calvet, R. (2003). Le sol: propriétés et fonctions. Tome 1: Constitution et structure, phénomènes aux interfaces.
- Capowiez Y., Rault M., Costagliolia G., & Mazzia C. (2005). Lethal and sublethal effects of imidacloprid on two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophera icterica*). *Biology and Fertility of Soils*. 41(3) :135-143
- Celik, I., Yilmaz, Z., & Turkoglu, V. (2009). Hematotoxic and hepatotoxic effects of dichlorvos at sublethal dosages in rats. *Environmental Toxicology: An International Journal*. 24(2): 128-132.
- Chen, D. W., Su, J., Liu, X. L., Yan, D. M., Lin, Y., Jiang, W. M., & Chen, X. H. (2012). Amino acid profiles of bivalve mollusks from Beibu Gulf, China. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 21(4) : 369-379.

- 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., Federica, C., Tersi, C., Giovanni, L., Antonetta, S., Carmela, G., Nieola, M., Macro, G., & Ida, F. (2020). *Massylaea vermiculata* as a potential indicator of nitrite contamination in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 204: 1–8.



- Datta, M., & Kaviraj, A. (2003). Ascorbic acid supplementation of diet for reduction of deltamethrin induced stress in freshwater catfish *Clarias gariepinus*. *Chemosphere*. 53(8): 883-888.
- Davet P., 1996. Vie microbienne et production végétale, Ed/ INRA. France. pp. 34-97.
- Dittbrenner, N., Triebkorn, R., Moser, I., & Capowicz, Y. (2010). Physiological and behavioural effects of imidacloprid on two ecologically relevant earthworm species (*Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*). *Ecotoxicology*. 19(8): 1567-1573.
- 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., & Florkin, M. (1959). Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. 67(2) : 306-314.



- 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-Shenawy, N. S., Mohammadden, A., & Al-Fahmie, Z. H.(2012). Using the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system of the land snail *Eobania vermiculata* as biomarkers of terrestrial heavy metal pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 84: 347-354.
- El-Wakil, H. B., & Radwan, M. A. (1991). Biochemical studies on the terrestrial snail, *Eubania vermiculata* (Müller) treated with some pesticides. *Journal of Environmental Science & Health Part B*. 26(5-6) : 479-489.



- 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.
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in enzymology*, Academic Press. 105: 114-120).
- Forbes, D. A, Brodie, J. P., & Grillmair, C. J. (1997). International Astronomical Union book series (IAUS, volume 186). 113: 1652.

Fregia, A., & Jensen, D. M. (1994). Evaluation of abnormal liver tests. *Comprehensive therapy*. 20(1): 50-54.

- Farombi, E. O., Adelowo, O. A., & Ajimoko, Y. R. (2007). Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 4(2) : 158-165.



- Gimbert, F., De Vaufleury, A., Douay, F., Coeurdassier, M., Scheifler, R., & Badot, P. M. (2008). Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a

partial life-cycle experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70(1): 138-146.

- Goldsworthy, G. J., Mordue, W., & Guthkelch, J. (1972). Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*. 18(3) : 545-551.
- Grara, N. (2011). Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*), Thèse de Doctorat en biologie, Université Université Badji Mokhtar, Annaba, 120 p.
- Gueddouch, M. (2017). Effet de certains engrais sur une espèce de gastéropode, *Helix vermiculata*: Biochimie et biomarqueurs, Thèse de Doctorat en santé et environnement, Université Larbi Tébessi, Tébessa, 111 p.
- Gupta, R. C., Goad, J. T., & Kadel, W. L. (1991). In vivo alterations in lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes patterns by acute carbofuran intoxication. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 21(2) : 263-269.



- Habig, W. H. (1974). The first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry*. 249: 7130-7139.
- Halaimia, S., Tine, S., Tine-Djebbar, F., & Soltani, N. (2021). Potential side-effects of a growth, biochemical composition and biomarkers responses of the grey worm *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826). *Applied Ecology and Environmental Research*. 19(2): 1247-1266.
- Hamza, S. A., Abdelgalil, G. M., Abdallah, E. A. M., Kassem, F. A., & Asran, A. A. (2020). Effects of abamectin on glutamate decarboxylase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase of land snails. *International Journal Zoology Investigation*. 6(2): 311-320.

- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and Adaptation*. 319-368.
- Hispard, F., De Vaufleury, A., Martin, H., Devaux, S., Cosson, R. P., Scheifler, R., & Badot, P. M. (2008). Effects of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70(3) : 490-498.



- 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(8) : 7960-7968.



- Jakoby W. B & Habig W.H. (1980). Glutathiontransferase. In Jakoby, W. B *Enzymatic basis of detoxification*. Academic press. New York. 2: 6394.
- Jeffery, S., Gardi, C., Jones, A., Montanarella, L., Marmo, L., Miko, L., & Zanella, A. (2013). Atlas européen de la biodiversité des sols (pp. 128-p). Office des Publications Officielles des Communautés Européennes.



- 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*. *Z. Gesamte Journal of Experimental Medicine*. 135: 545-561.

- Kavitha, R., Deepa Rani, S., Sivagnanam, S., & Padmaja, M. (2013). Cadmium nanoparticle induced histological and biochemical changes in hepatopancreas of mud crab *Scylla olivacea* (Herbst, 1796). *Journal of Academia and Industrial Research*. 2(3) : 205-209.
- Kenza, S., & Guedrez, H. (2019). Inventaire des gastéropodes terrestres dans deux sites de la région de Mila (Rouached et Oued-endja), Thèse de Doctorat en protection des écosystèmes, Université de Mila, 102 p.
- 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



- Loureiro, S., Amorim, M. J., Campos, B., Rodrigues, S. M., & Soares, A. M. (2009). Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (*Enchytraeidae*) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. *Environmental Pollution*. 157(2) : 625-636.



- 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.
- Mahler, K. (1968). Perfect systems, *Compositio mathematica*. 19(2): 95-166.
- Martínez-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.
- 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.
- Morel, J. L. (1996). Bioavailability of Trace Elements. *Soil ecotoxicology*, 141.
- Mostert, M. A., Schoeman, A. S., & Merwe, M. V. D. (2002). The relative toxicities of insecticides to earthworms of the *Pheretima* group (Oligochaeta). *Pest Management Science*. 58(5) : 446-450.
- Moussard, C. (1999). La biochimie, Biochimie structurale et métabolique, Médecine, Pharmacie. Sciences. De Boek &Larciers. a. Bruxelles.
- Müller, O. F. (1774). *Vermium terrestrium etfluviatilium, sen animalium infusoriorum, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succincta historia*. 1774. Vol. 2, Testacea. Havnie et Lipsiae. 214 pp.



- Orbea, A., Dariush Fahimi, H., & Cajaraville, M. P. (2000). Immuno localization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochemistry and Cell Biology*. 114(5): 393-404.
- Djatita, O. (2016). Évaluation des effets de l'herbicide Cossack sur les paramètres physiologiques de l'escargot «*Helix aspersa*», Thèse de Doctorat en Toxicologie, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy - B.B.A., 53 p.



- Padmaja Rambabu, J., & Balaparameswara Rao, 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.
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory And Clinical Medicine*. 70(1) :158-169.
- Palermo-Neto, J., d'Oliveira Massoco, C., & de Souza, W. R. (2003). Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain, behavior, and immunity*. 17(1) : 43-54.



- Radwan, M. A., Osman, K. A., & Salama, A. K. (1993). Biochemical response of the brown garden snails, *Helix aspersa* to chlorfluazuron and flufenoxuron. *Journal of Environmental Science & Health Part B*. 28(3): 291-303.
- 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.
  - Rahal, H., & Messoud, S. (2020). l'Effet d'une Nanoparticule Sur des paramètres de toxicité Chez un indicateur de pollution *Helix aspersa*, Mémoire de Master en Pharmacotoxicologie, Université Larbi Tébessi, Tébessa, 80 p.

- 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.
- 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.
- Russo, J., & Madec, L. (2007). Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. *Cell and Tissue Research*. 328(2) : 431-441.



- 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.
- Sardo, A. M., & Soares, A. M. V. M. (2010). Assessment of the effects of the pesticide imidacloprid on the behaviour of the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58(3): 648-656.
- 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.
- 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.

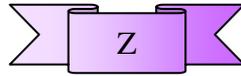
- Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratyneek, C. A., Newhall, A. R., Freidman, L. (1966). A method forsequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, Lipid and Glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytique Biochemistry*. 19: 415-429.
- 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.
- Sturn, R., & Dujmovits, R. (2000). Basic Income in Complex Worlds. *Analyse & Kritik*. 22(2) : 198-222.
- Swaileh, K. M., & Ezzughayyar, A. (2000). Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the land snail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 47(3): 253-260.



- Tietz NW., 1999. In: *Text Book of Clinical Chemistry*, (3<sup>rd</sup> edn), Burtis CA and Ashwood ER editors, WP Saunders Co, Philadelphia: 686-89.
- Tiwari, S., & Singh, A.(2005). Alterations in carbohydrates and the protein metabolism of the harmful freshwater vector snail *Lymnaea acuminata* induced by the *Euphorbia tirucalli* latex extract. *Environmental Research*. 99(3): 378-386.
- Tripathi, G., Kachhwaha, N., & Dabi, I. (2009). Impact of phorate on malate dehydrogenases, lactate dehydrogenase and proteins of epigeic, anecic and endogeic earth worms. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 95(2): 100-105.



- 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.



- Zang, Y., Zhong, Y., Luo, Y., & Kong, Z. M. (2000). Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*. 108(2): 271-278.
- Zhao, X., Flynn, B. B., & Roth, A. V. (2006). Decision sciences research in China: a critical review and research agenda-foundations and overview. *Decision Sciences*. 37(4) : 451-496.
- Zouaghi, M. F., Berrebbah, H., Djrbar, 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.



1. <https://www.aci-algerie.com/produit/aceplan-20-sp/https://www.algeriansources.com/agriculture-and-food-fr/agriculture-fr/aceplan-20-sp-fr/>
2. <https://www.climatsetvoyages.com/climat/algerie/t%C3%A9bessa>
3. <https://www.aci-algerie.com/wp-content/uploads/2020/04/FICHE-TECHNIQUE-ACEPLAN-20-SP-copie.pdf>