



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT LMD
(3^{EME} CYCLE)

Spécialité: TOXICOLOGIE

Intitulé

**Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide
nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle
expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix
aspersa* »**

Presentée par: M^{lle} BELHAOUCHET Nawel

Membre de Jury:

DJEBAR Mohammed-Réda	Prof.	Université d'Annaba	Directeur
BERREBBAH Houria	Prof.	Université d'Annaba	Président
KHEBBEB Med El Hadi	Prof.	Université d'Annaba	Examineur
TADJINE Aicha	Prof	Université EL- Taref	Examineur
MEZDJERI Lyamine	M.C.A.	Université de Skikda	Examineur

Année universitaire: 2013/2014

Remerciement

*Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université d'Annaba dirigé par le Professeur **DJEBAR Med-Réda**. Je tiens à le remercier pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé et de l'intérêt qu'il a témoigné à mon égard.*

*Ma reconnaissance va tout particulièrement à Mme le Professeur **BERREBBAH Houria** de l'Université de Annaba pour son aide précieuse et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury.*

*De simples remerciements ne sont pas suffisants pour exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de thèse : **DJEBAR Med-Réda** (Professeur). A la, fierté et à la chance d'avoir été votre thésard. merci*

*Je tiens à remercier **Mr MEZDJERI Lyamine**, Maître de Conférences à l'Université de Skikda pour avoir accepté de juger ce travail et participer à ce jury en qualité d'examineur.*

*Ces mêmes remerciements s'adressent à **Mme TADJINE Aicha**, Professeur à l'Université De Taref, et **M. KHEBBEB Med El Hadi**, Professeur à L'Université d'Annaba, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.*

Merci à l'ensemble de ce jury pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail mais aussi pour avoir fait le déplacement pour m'encourager à le soutenir et faire partager vos conseils et vos réflexions sur ce travail.

*Je tiens également à remercier **Mme MEKSEM Leila**, Professeur au Département de Biologie, pour son soutien, ses orientations au cours de ma formation.*

Merci à toutes mes amies du laboratoire LTC !

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes Parent sans qui rien n'aurait pu être fait

A mon mari, pour sa compréhension, son soutien et ses encouragements

A mon adorable fille Ines

A mes frères ALI et KHALIL

A ma belle famille

Résumé

Ce travail concerne l'évaluation de la toxicité potentielle d'un biopesticide le Spinosad (nouvellement homologué en Algérie) sur un gastéropode *Helix aspersa*

Les escargots ont été exposés à des concentrations croissantes de Spinosad par application topique pendant 28 jours. Nous avons cherché à évaluer les effets d'un éventuel stress oxydatif au niveau de la glande digestive et du rein et ce par le suivi de l'activité de certains biomarqueurs enzymatiques : la GST et la Catalase. Nous avons également mesuré le taux de Glutathion réduit ainsi que les protéines totales. Le Malondialdéhyde (MDA) considéré comme un bio marqueur de la peroxydation lipidique a également été mesuré.

D'un autre côté la neurotoxicité de Spinosad a été confirmée à travers la mesure de l'activité Acétylcholine estérase (AChE).

Nos résultats montrent une induction de l'activité des enzymes antioxydantes telles que la GST et la Catalase, parallèlement à une augmentation du taux de MDA et à une diminution du taux de GSH. Ceci a été observé aussi bien au niveau de la glande digestive que du rein.

D'un autre côté nous avons également mis en évidence aussi un effet neurotoxique de Spinosad traduit par une diminution progressive de l'activité Acétylcholine Estérase (AChE) chez les organismes traités par rapport aux témoins.

L'examen histopathologique a révélé des altérations tissulaires observées au niveau de l'hépatopancréas et du rein.

L'hémolymphe étant le principal vecteur des xénobiotiques chez les gastéropodes, nous nous sommes intéressés au suivi de taux des protéines totales et du GSH au niveau de ce tissu. Nos résultats ont révélé une augmentation significative de deux paramètres mesurés.

Mots clés: Spinosad, Biomarqueurs, Stress oxydant, hémolymphe, *Helix aspersa*.

Abstract

This work concerns the evaluation of the potential toxicity of a biopesticide Spinosad recently approved in Algeria on a gastropod *Helix aspersa*. Snails are exposed to increasing concentrations of Spinosad by topical application during 28 days. We tried to estimate the oxidative stress at the level of the digestive gland and kidney in *Helix aspersa*, by the follow-up of the activity GST, as well as the activity catalase, and the rate of Glutathion reduces and proteinate total. Of more Malondialdehyde (MDA) considered as a marker of the cellular damage was also measured. The neurotoxicity of Spinosad was determined by measuring the activity of the acetylcholine esterase (AChE).

The obtained results show that the rate of Glutathion reduced (GSH) decreases in a dose dependent manner accompanied with an induction of the activity Glutathion S transférase (GST) in organisms treated compared to controls. parallel we attend an induction of the activity catalase in the presence of Spinosad in both organs.. Concerning the contents of Malonedialdéhyde (MDA), we find a stimulation in snails treated with the biopesticide compared to controls, we were able to highlight a neurotoxic effect of Spinosad translated by a progressive decrease of the activity Acétylcholine Estérase (AChE) in organisms treated versus control. The examination histopathologique confirmed the toxicity of Spinosad to snails, and it through the irreversible changes observed in the hepatopancreas and kidney. To complete our study we followed the rate of total protein and GSH at the hemolymph of snails, and our results are shown induction of the latter two

Key words: Spinosad, Biomarkers, Oxydatif stress, Histopathology, hemolymph, *Helix aspersa*.

ملخص

هذا العمل يتناول تقييم السمية المحتملة لمبيد أفات حيوي Spinosad تمت الموافقة عليه حديثا في الجزائر على حلزون *Helix aspersa*.

عرضت الحلزونات إلى تركيزات متصاعدة من spinosad بواسطة التطبيق خلال 28 يوما. سعينا لتقييم إجهاد الاكسدة في الغدة الهضمية والكلية عند *Helix aspersa* ، من خلال من متابعة النشاط الانزيمي GST و كذلك النشاط الانزيمي CAT ، و كمية GSH والبروتين الكلي.

وعلاوة على ذلك (MDA) يعتبر مثل مؤشر حيوي على الأضرار الخلوية تم قياسه. السمية العصبية ل spinosad تم تحديدها من خلال قياس النشاط للأستيل كولين استريز (AChE)

النتائج المتحصل عليها تبين أن معدل (GSH) انخفض بطريقة تعتمد على الجرعة. تعتمد ، يرافقه تحريض النشاط الانزيمي Glutathion S transférase في الكائنات المعالجة مقارنة مع الشاهد . بالتوازي نشهد تحريض النشاط الانزيمي CAT ، بحضور Spinosad في كلا الجهازين.

فيما يتعلق محتويات (MDA) ، نلاحظ تحفيز الحلزونات المعالجة بالمبيد أفات حيوي Spinosad مقارنة بالشواهد ، استطعنا اظهرَ بوضوح تأثير السمي العصبي ل Spinosad يترجم بواسطة انخفاض تدريجي للنشاط للأستيل كولين استريز (AChE) عند الكائنات المعالجة مقارنة مع الشاهد .

أكد الفحص النسيجي سمية spinosad على الحلزونات، و من خلال تغييرات الملحوظة لا رجعة فيه على مستوى البنكرياس الكبدي، الكلية

لإكمال دراستنا تابعنا معدل البروتين الكلي و GSH علي مستوى الدملف الحلزونات ، وتظهر نتائجنا تحريض الأخيرين.

الكلمات المفتاحية : Spinosad، المؤشرات الحيوية، إجهاد الاكسدة ، علم الأنسجة، الدملف، *Helix aspersa*

Chapitre 1 : Introduction Générale.....	1
Généralités	1
1- Rappel sur les Biomarqueurs	3
2- Rappel sur les polluants	4
3- Caractéristiques des pesticides	5
4- Les pesticides dans l'environnement	7
4-1 Impact des pesticides sur les organismes du sol.....	8
4-2 Utilisation des escargots dans l'étude de la contamination par les pesticides.....	9
4-3 Biologie et Physiologie <i>d'Helix aspersa</i>	11
4-3-1 Morphologie	11
4-3-2 Anatomie	12
4-3-3 Activité saisonnière	13
4-3-4 Activité journalière	14
4-3-5 Hibernation	14
4-3-6 Reproduction	14
4-3-7 Croissance.....	15
5 Objectif de l'étude.....	15
 Chapitre 2 : Partie Physiologique.....	 18
Introduction	18
2 Matériel et méthodes	18
2-1 Matériel biologique	18
2-2 Matériel chimique	18
2-3 Méthodes	19
2-3-1 Méthode de traitement.....	19
2-3-2 mesures des paramètres physiologiques.....	19
3 Résultats	21
3-1 Effets du Spinosad sur le poids moyen des escargots	21
3-2 Effets du Spinosad sur le poids moyen de la coquille des escargots	22

3-3 Effets du Spinosad sur le poids moyen de la glande digestive des escargots.....	23
3-4 Effets du Spinosad sur le poids moyen du rein des escargots	24
4 Discussion	25
Chapitre 3 : Biochimie et Enzymologie.....	27
Introduction	27
2 Matériel et méthodes	30
2-1 Matériel biologique	30
2-2 Méthodes de dosage	32
2-2-1 Dosage des protéines	32
2-2-2 Dosage du glutathion (GSH)	32
2-2-3 Dosage du malondialdéhyde (MDA)	32
2-2-4 Dosage de l'activité Catalase (CAT)	33
2-2-5 Dosage de l'activité GST (glutathion S-transférase)	34
2-2-6 Dosage de l'activité Acétylcholine Estérase (ACHe)	34
3 Analyse statistique des résultats	35
4 Résultats	36
4-1 Effet du traitement par des concentrations croissantes de Spinosad sur le taux de protéines totales au niveau de la glande digestive et du rein	36
4-2 Effet du traitement par le Spinosad sur le taux de GSH et sur l'activité GST au niveau de la glande digestive	37
4-3 Effet des concentrations croissantes de Spinosad sur le taux GSH et l'activité GST au niveau du rein	38
4-4 Effet de Spinosad sur l'activité Catalase a4 niveau de la glande digestive et du rein	38
4-5 Effet de Spinosad sur le taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau de la glande digestive et du rein	40
4-6 Effet de Spinosad sur l'activité Acétylcholine Estérase	41
5 Discussion	42
Chapitre 4 : Etude Histopathologique	47
Introduction	47

2 Matériel et méthodes	47
2-1 Matériel biologique.....	47
2-2 Méthode	48
3 Résultats	49
3-1 Aspect de l'hépatopancréas après 7 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad	49
3-2 Aspect de l'hépatopancréas après 14 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad	51
3-3 Aspect de l'hépatopancréas après 28 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad	53
3-4 Aspect du tissu rénal après 7 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad.....	55
3-5 Aspect du tissu rénal après 14 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad	57
3-6 Aspect du tissu rénal après 28 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad	58
4 Discussion	59
Chapitre 5 : Hémolymphes et toxicité du Spinosad	61
Introduction	61
2 Matériel et méthodes	63
2-1 Matériel biologique.....	63
2-2 Méthodes	64
2-2-1 Dosage des protéines au niveau de l'hémolymphes.....	64
2-2-2 Dosage de la GSH au niveau de l'hémolymphes	64
3 Résultats	64
3-1 Effet du Spinosad sur le taux des protéines hémolymphatiques totales.....	64
3-2 Effet du traitement par le Spinosad sur le taux GSH au niveau de l'hémolymphes	65
4 Discussion	66
Conclusion générale.....	68

Table des matières

Perspectives.....	69
Références bibliographiques	70

Figure (01) : Représentation des différents facteurs de stress pouvant être subis par les organismes vivants dans les estuaires.....	2
Figure (02) : Voies de dispersion et de transfert des pesticides dans l'environnement.....	8
Figure (03): L'escargot <i>Helix aspersa</i>	11
Figure (04) : Morphologie externe de l'escargot.....	12
Figure (05) : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	20
Figure (06): Evolution du poids moyen des escargots traités pendant quatre semaines par des concentrations croissantes de Spinosad.....	21
Figure (07): Evolution du poids moyen de la coquille des escargots traités pendant quatre semaines par des concentrations croissantes de Spinosad.....	22
Figure (08): Evolution du poids moyen de la glande digestive des escargots traités pendant quatre semaines par des concentrations croissantes de Spinosad.....	23
Figure (09): Evolution du poids moyen du rein des escargots traités pendant quatre semaines par des concentrations croissantes de Spinosad.....	24
Figure (10) : Schéma des défenses antioxydantes impliquant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), les glutathion S-transferases (GST) et la glutathion réductase.....	28
Figure (11) : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	31
Figure (12) : Variation de l'activité acétylcholinestérase des escargots après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.....	41
Figure (13) : Une lignée hypothétique des hémocytes (Cheng, 1981).....	62
Figure (14) : Variation du taux des protéines totales au niveau de l'hémolymph des escargots après 28 d'exposition à des concentrations croissantes de Spinosad.....	64
Figure (15) : Variation du taux de GSH au niveau de l'hémolymph des escargots après 28 jours d'exposition à des concentrations croissantes de Spinosad.....	65

Tableau (01) : Propriétés de la préparation commerciale Spinosad (Dow AgroSciences, 2003a et b).....	06
Tableau (02) : Variations du taux des protéines totales au niveau de la glande digestive et du rein chez <i>Helix aspersa</i> après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.....	36
Tableau (03) : Variations du taux de GSH et de l'activité GST au niveau de la glande digestive chez <i>Helix aspersa</i> après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.....	37
Tableau (04) : Variations du taux de GSH et de l'activité GST au niveau du rein chez <i>Helix aspersa</i> après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.....	38
Tableau (05) : Variations de l'activité CAT au niveau de la glande digestive et du rein chez <i>Helix aspersa</i> après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.....	39
Tableau (06) : Variations de taux MDA au niveau de la glande digestive et du rein chez <i>Helix aspersa</i> après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.....	40

Planche (01): Aspect de l'hépatopancréas après 7 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad	49
Planche (02): Aspect de l'hépatopancréas après 14 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad	51
Planche (03): Aspect de l'hépatopancréas après 28 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad	53
Planche (04): Aspect du tissu rénal après 7 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad	55
Planche (05): Aspect du tissu rénal après 14 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad le Spinosad	57
Planche (06): Aspect du tissu rénal après 28 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad	58

AChE : Acetylcholinestérase.

ASCH: Substrat acetylcholinestérase.

ASS: Acide Sulfosalicylique.

CAT: Catalase.

CDNB: 1-Chloro, 2,4-Dinitrobenzène.

CL: Concentration létale.

CYP: Cytochrome P.

DTNB: Acide 5,5'-Dithiodis-2-Nitrobenzoïque.

EA: Espèces Actives de l'Oxygène.

EDTA: Ethylène diamine tétra-acétique.

GPX: Glutathion peroxydases.

GSH: Glutathion-S-transférases.

GSSG: Glutathion disulfure.

GST: Glutathion-S-transférases.

MDA: Malondialdéhyde.

ROS: Reactifs oxygen species.

SOD: Superoxide dismutase.

TBA: Acide thiobarbiturique.

TBARS: Substances réagissant avec l'acide thio-barbiturique.

Généralités

La plupart des ressources vivantes de la Terre se situent dans des zones géographiques spécifiques telles que l'environnement côtier et les systèmes fluviaux (Moore et *al.*, 2004). Ces écosystèmes et les organismes qui y vivent sont de plus en plus soumis à de nombreux facteurs de stress. Les conditions stressantes sont définies comme un état dans lequel l'équilibre dynamique des organismes animaux, appelé homéostasie, est menacé ou perturbé par les actions de stimuli intrinsèques et extrinsèques, communément définis comme des facteurs stressants (Gagnaire, 2005). En plus de la perturbation de l'équilibre homéostatique, ces facteurs stressants provoquent un ensemble coordonné de réponses génétiques, métaboliques, physiologiques et comportementales devant être compensatoires et/ou adaptatives, permettant à l'animal de surmonter la menace et de maintenir son intégrité. Si un animal subit un facteur de stress intense, la réponse peut perdre sa valeur adaptative et devenir dysfonctionnelle, ce qui peut résulter en l'inhibition de la croissance, un échec reproductif, et une résistance réduite aux agents pathogènes (Wendelaar Bonga, 1997). Les réponses aux facteurs de stress peuvent être observées à différents niveaux d'organisation : cellule, organe, organisme, population et écosystème, l'ensemble étant appelé la réponse intégrée aux facteurs de stress (Wendelaar Bonga, 1997).

Les facteurs stressants à l'origine du risque sont de natures multiples: facteurs naturels (radiations UV, augmentation du niveau de la mer, changements climatiques, érosion du sol, variations de la température, de la salinité, de la quantité d'O₂ dissous, de la turbidité); industrialisation et déforestation; diminution des ressources (surpêche); interactions entre animaux (prédation, parasites, compétition pour l'espace, la nourriture ou les partenaires sexuels) ; pratiques aquaculturelles (transport, manutention); perturbations de l'habitat; pollution ; maladies induites par les pathogènes (Figure 1). Parmi ces facteurs de stress, les contaminations d'origine anthropique, telles que les métaux lourds et les hydrocarbures issus des rejets régulés et non régulés des activités industrielles ou des rejets urbains, apparaissent importantes. De plus, les pollutions agricoles peuvent poser des problèmes majeurs en affectant l'écologie des rivières et des estuaires, en réduisant la qualité des eaux de boisson et la santé des écosystèmes côtiers. (Moore, 2002). Aujourd'hui, la pollution est devenue une préoccupation majeure de la communauté internationale car elle est à l'origine de la raréfaction de tout ce qui est vital pour les organismes vivants y compris l'Homme.

C'est dans ce contexte là que les pesticides peuvent être très nocifs, dans la mesure où ils peuvent s'accumuler dans les écosystèmes et peuvent être à l'origine de toute une gamme d'effets toxiques chez l'Homme par exemple à travers des atteintes multiples parmi lesquels le cancer, les dysfonctions des systèmes reproductifs, endocriniens et immunitaires, les malformations congénitales, l'atteinte aiguë et chronique du système nerveux etc... (Veillerette, 2005, Jawich, 2010).

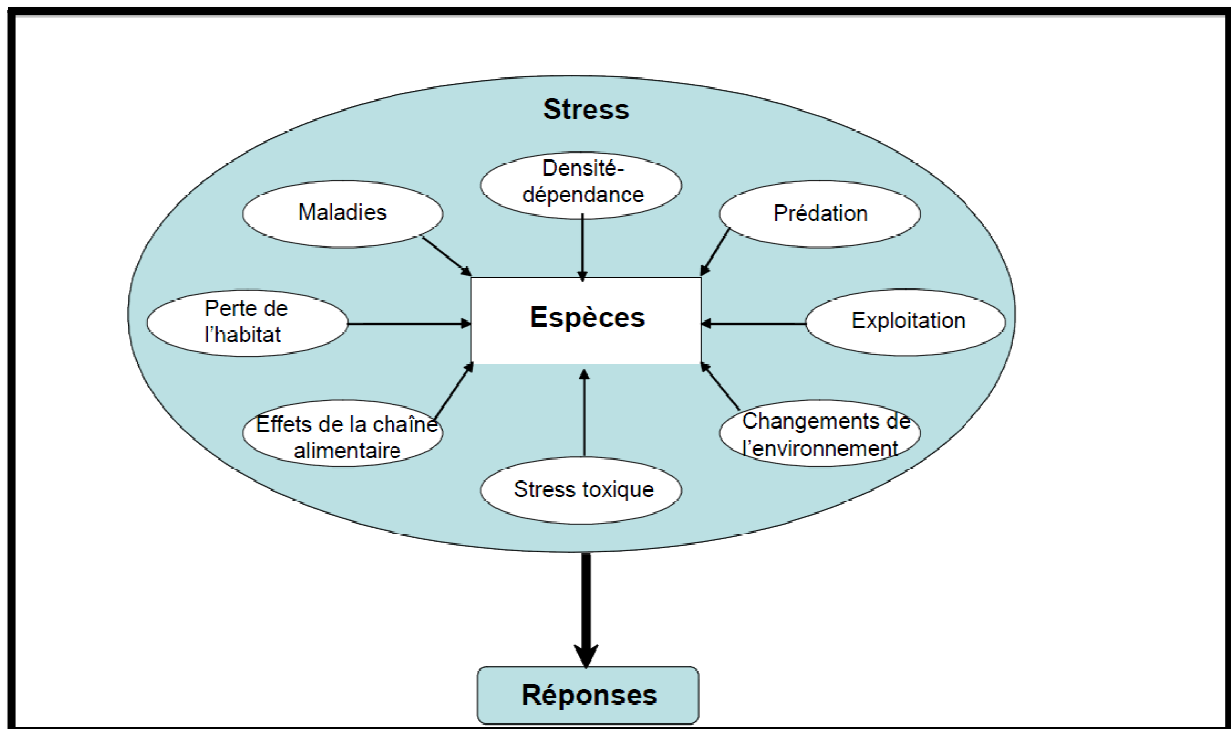


Figure 01 : Représentation des différents facteurs de stress pouvant être subis par les organismes vivants dans les estuaires (van der Oost *et al.*, 2003).

Il est de plus en plus reconnu que l'évaluation des impacts des polluants sur les organismes requiert la compréhension des effets au travers de la hiérarchie de l'organisation biologique, depuis les niveaux moléculaire et cellulaire jusqu'à ceux de l'organisme et de la population, de la communauté et de l'écosystème (Moore *et al.*, 2004). Cependant, bien que les changements induits par les polluants aux niveaux de la population/communauté/écosystème/santé humaine soient les plus importants à étudier, ces niveaux sont généralement trop complexes pour servir au développement d'outils pour la détection précoce et la prédiction des conséquences du risque environnemental (Moore *et al.*, 2004). Il faut donc tenter de détecter des signaux de détresse aux niveaux moléculaire et

cellulaire et les lier aux conséquences possibles aux niveaux d'organisations plus élevés (Moore, 2002).

1- Rappel sur les Biomarqueurs :

L'évaluation du risque environnemental et l'écotoxicologie font intervenir l'utilisation de biomarqueurs ayant pour but de mettre en évidence de façon précoce une pollution (van der Oost *et al.*, 2003). En effet, la présence d'un xénobiotique dans une partie d'un écosystème aquatique ne signifie pas automatiquement l'apparition d'effets nuisibles. Des relations doivent être établies entre les niveaux externes d'exposition, les niveaux internes de contamination des tissus et les effets défavorables précoces (van der Oost *et al.*, 2003). Un biomarqueur se définit comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, cellulaire, de l'organisme (physiologie, comportement), de la population et de l'écosystème qui peut être relié à une exposition ou à des effets toxiques de polluants chimiques environnementaux (Lagadic *et al.*, 1997; Galloway et Depledge, 2001; van der Oost *et al.*, 2003). Les effets à des niveaux hiérarchiques élevés sont toujours précédés de changements précoces dans les processus biologiques, permettant le développement de biomarqueurs d'alerte précoce. Les toxiques présents dans l'environnement sont absorbés par les organismes vivants et se répartissent dans les tissus où ils interagissent avec différentes molécules biologiques. Les changements biochimiques induits par la présence du toxique peuvent avoir des effets physiologiques sur les individus, ces effets toxiques peuvent être mesurés aussi bien à l'échelle d'une population (cinétique de croissance, expansion, efficacité d'utilisation des ressources, adaptabilité, etc...), qu'à l'échelle de l'individu à travers notamment des modifications biochimiques, physiologiques etc.... A terme, les déséquilibres provoqués par la disparition ou, au contraire, l'expansion excessive de populations de certaines espèces (espèces bioindicatrices) peuvent se répercuter au niveau des communautés, modifiant ainsi la structure et le fonctionnement de l'écosystème dans son ensemble. (Gagnaire, 2005)

Selon Champeau, (2005) les biomarqueurs peuvent être regroupés en trois catégories :

- **Biomarqueurs d'exposition** : ils indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Ils sont le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et/ou dans les liquides biologiques (exemple : adduits à l'ADN).

- **Biomarqueurs d'effet** : ils permettent de montrer qu'une fois entré dans l'organisme et après avoir été distribué entre les différents tissus, le xénobiotique exerce un effet, toxique ou non, sur une cible critique. Les biomarqueurs d'effet non spécifiques (changement de poids de l'organisme) décrivent les effets provoqués par un grand nombre de facteurs de stress (polluants, facteurs physico-chimiques). Les biomarqueurs d'effet spécifiques sont les réponses de l'organisme entier ou de tissus qui peuvent être associées à une classe particulière de xénobiotiques ; ce sont des paramètres biochimiques, des altérations histopathologiques et cellulaires, des réponses immunologiques.

- **Biomarqueurs de sensibilité** : ils indiquent la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à l'exposition à une substance xénobiotique spécifique, incluant les facteurs génétiques et les changements des récepteurs qui altèrent la susceptibilité d'un organisme à cette exposition.

De bons biomarqueurs sont des indices sensibles à la fois de la biodisponibilité d'un polluant et des réponses biologiques précoces. L'utilisation simultanée de plusieurs biomarqueurs pris à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, tissulaire, physiologique) chez diverses espèces apparaît comme l'approche la plus satisfaisante pour le diagnostic des effets des polluants sur les individus (Lagadic *et al.*, 1997).

2 Rappel sur les polluants

Toute substance chimique ou non rejetée dans l'environnement est considérée comme polluant. Si elle pénètre dans un organisme vivant, elle est alors appelée Xénobiotique. Un polluant est donc un élément exogène qui se retrouve dans le milieu sous forme de matière organique ou minérale, soit dissoute, soit en suspension, soit plus rarement en émulsion. C'est un élément qui présente une concentration supérieure à la concentration naturelle dans un système non pollué, qu'il soit étranger au système (radio-éléments artificiels, détergents, pesticides, bactéries fécales, etc) ou au contraire, familier au système (éléments minéraux ou organiques). Un polluant se caractérise par sa toxicité, sa persistance dans le milieu, sa biodégradabilité et son action eutrophisante (Marteil, 1974).

Les polluants sont classés en deux types principaux :

- **Les polluants conservatifs** qui ne sont pas éliminés du milieu, qu'ils soient dissous dans l'eau ou fixes sur le matériel particulaire; ce sont les métaux et les polluants organiques non biodégradables. La classification de Polluants Organiques Persistants (POPs) regroupe tous ces polluants conservatifs (HAPs, PCBs, dioxines, furans, dieldrine, chlordane, DDT, HCH, HCB, lindane, endrine, aldrine, Mirex, toxaphene, chlordeone, heptachlore) (Ademe, 2004)
- **Les polluants non conservatifs** qui, à terme, disparaissent : ce sont la matière organique, les sels nutritifs, les bactéries, les virus, les polluants organiques biodégradables (certains hydrocarbures, détergents et produits phytosanitaires).

3 -Caractéristiques des pesticides

Un pesticide (ou biocide) est un produit chimique organique ou minéral destiné à lutter contre les organismes « indésirables », tels que bactéries, les mauvaises herbes, les champignons, les insectes ou les rongeurs. Plus de 350 composés actifs qui entrent dans la composition de 4000 produits environ sont recensés. Ces produits regroupent des composés organiques et inorganiques à action plus ou moins spécifiques, tels que les herbicides, les insecticides et les fongicides, qui sont les trois types de pesticides utilisés.

Les préoccupations concernant les effets de pesticides ne sont apparues que récemment, avec l'augmentation du nombre de molécules synthétisées et l'extension de leur action à de nombreux organismes. (Marteil, 1974 ; Rostagno *et al.*, 1999 ; EPA, 2005 ; INRA, 2005; PAN, 2005).

Comparée à la toxicité chez l'homme, la toxicité pour d'autres espèces passe souvent au second plan. Pourtant, il a été mis en évidence, par exemple, une corrélation entre l'activité acétylcholinestérase des poissons et l'épandage de pesticides organophosphorés en zones côtières (PAN, 2005).

La recherche se penche, depuis plusieurs années, sur les moyens de lutte biologique qui visent à contrôler les agents pathogènes par des biopesticides dont un grand nombre de molécules a été développé dans différents laboratoires.

Les bioinsecticides peuvent se définir au sens large comme des pesticides d'origine biologique, c'est-à-dire, organismes vivants ou substances d'origine naturelle synthétisée par ces derniers, et plus généralement tout produit de protection des plantes qui n'est pas issu de la chimie. Sous ce vocable, les biopesticides comprennent les agents de contrôle des insectes (auxiliaires) comme les arthropodes entomophages (ex trichogrammes), les champignons

hyphomycètes pathogènes pour les lépidoptères ou coléoptères (exp Beauvaria), les baculovirus responsables des polyédroses nucléaires (NPV) ou des granuloses (GV) chez les lépidoptères, les bactéries (Bacillus), etc... , les insecticides d'origine végétale et les molécules de synthèse biologique (phéromones, molécules allélochimiques). (Thompson., et al 2002)

- **Cas du Spinosad :**

Le Spinosad est un bioinsecticide, la compagnie Dow Agro Sciences le commercialise sous l'appellation de Tracer 480 SC, et il est recommandé dans un programme de lutte intégrée. Le tableau 7 présente les propriétés de la préparation commerciale.

Tableau 01 : Propriétés de la préparation commerciale Spinosad (Dow AgroSciences, 2003a et b)

Propriétés	TRACER
Couleur	Blanc cassé à ocre
Odeur	Odeur faible de peinture au latex
Suspension liquide	480 g / litre de matière active
pH	7,69
Point d'ébullition	100°C
Densité	1,09 g/ml à 20°C
Solubilité	Spinosyn A soluble (pH 9) à très soluble (pH 5 à 7) Spinosyn D insoluble (pH 9) à soluble (pH 5)

- **Mode d'action de Spinosad**

Spinosad provient de la fermentation de l'actinomycète *Saccharopolyspora spinosa*, une nouvelle espèce découverte dans un échantillon de sol des Caraïbes en 1982. Deux molécules sont ainsi obtenues : spinosyn A et spinosyn D. Le Spinosad est composé du mélange des deux. Il agit soit par contact ou par ingestion, ce dernier mode d'action s'avère être 5 à 10 fois plus efficace que par simple contact. Le Spinosad cause chez l'insecte une excitation du système nerveux, mène à un arrêt de l'alimentation, une contraction musculaire involontaire puis à une paralysie. Ces effets sont une conséquence de l'activation des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine. En effet, les cellules nerveuses émettent des signaux

chimiques pour communiquer entre elles et avec les autres cellules. Pour ce faire, les cellules utilisent des neurotransmetteurs, dont l'acétylcholine qui ne peut remplir son rôle lorsque le Spinosad excite son récepteur nicotinique. Spinosad peut également agir sur les récepteurs amino butyriques, ce qui pourrait augmenter son rendement, mais cet effet n'a pas été évalué. Spinosad est efficace dans le contrôle des lépidoptères, diptères, thysanoptères et quelques espèces d'orthoptères et de coléoptères (Salgado, 1998 ;ARLA, 2003 ; Salgado *et al.*, 2005). La dégradation du Spinosad dans l'environnement se fait via différents procédés dont l'hydrolyse, la phototransformation, photolyse et biotransformation aérobie (ARLA, 2003).

4- Les pesticides dans l'environnement

Bien que les principales cibles des pesticides soient les végétaux, il est estimé que seulement 0,1% des quantités appliquées atteignent ceux-ci (Arias- Estévez *et al.* 2008). Les voies de dispersion et de transfert sont nombreuses (Figure 2). Les gouttelettes de pesticides peuvent atteindre directement le sol sans être stoppées par le feuillage, ou alors indirectement, lorsque la pluie va lessiver les gouttelettes, non encore absorbées par les feuilles. Lors de l'application, les pesticides peuvent être entraînés par dérive loin des zones de culture visées ou être directement volatilisés vers l'atmosphère. La revolatilisation à partir du sol et des végétaux joue également un rôle important dans la contamination de l'air. Enfin, le lessivage et le ruissellement, lors des précipitations, vont entraîner la contamination des eaux de surface et souterraines. (Druart, 2011).

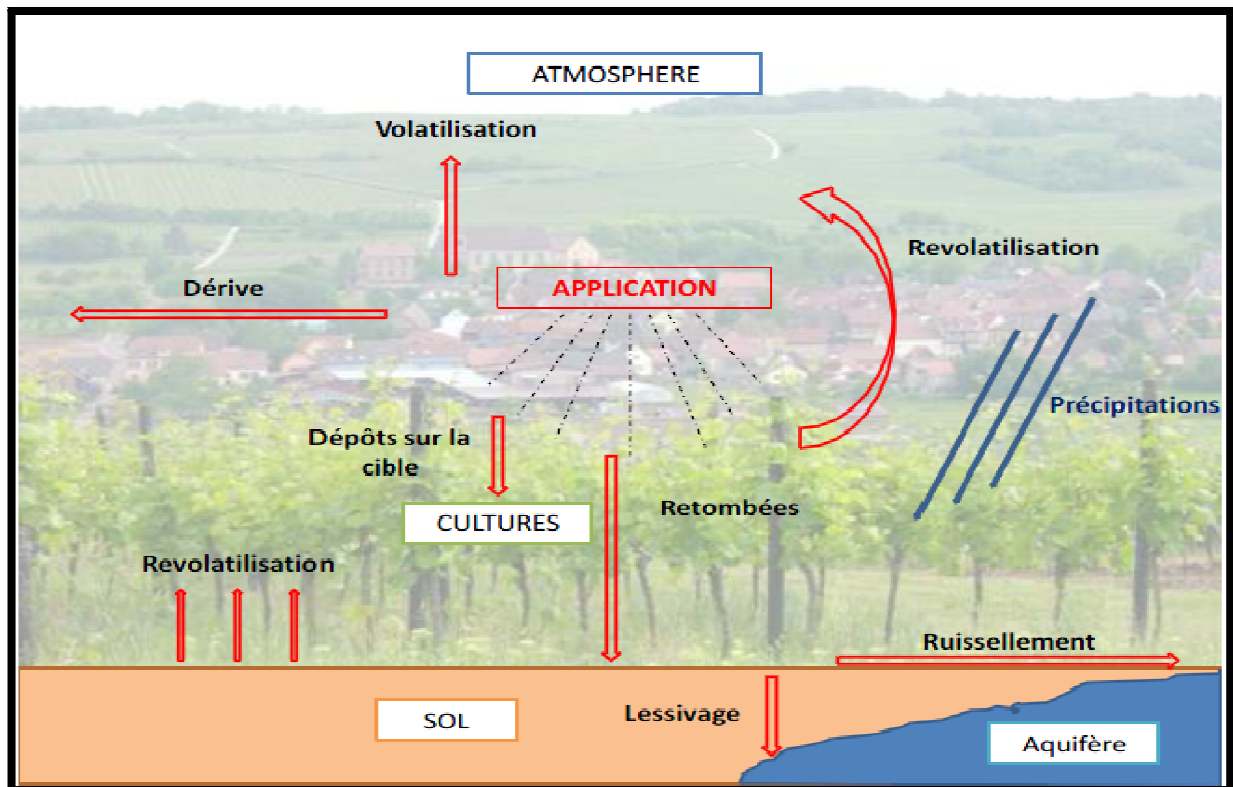


Figure 02. Voies de dispersion et de transfert des pesticides dans l'environnement. (Druart, 2011)

La présence de polluants dans l'organisme constitue un stress qui induit des modifications au niveau physiologique et métabolique (Timbrell, 1995); la réponse est constituée d'une part de mécanismes limitant les effets toxiques des contaminants en protégeant les cellules et en facilitant leur excrétion, d'autre part de modifications des métabolismes et physiologie normaux, induites directement par les toxiques, ou collatéralement par les mécanismes de prise en charge. Bien que les mécanismes de défense cellulaire soient actuellement connus, il est cependant nécessaire de les approfondir en raison notamment des interactions de xénobiotiques présents simultanément dans le milieu.

4-1 Impact des pesticides sur les organismes du sol

L'exposition des organismes du sol concerne les produits appliqués en traitement du sol (incorporés), mais aussi les produits appliqués en pré-émergence (pulvérisés vers un sol nu), en postémergence ou en traitement foliaire (pulvérisés directement sur la végétation). Les

produits appliqués en granules et en traitement de semences peuvent aussi être à l'origine d'effets non-intentionnels, des impacts sur des invertébrés du sol ayant par exemple été mis en évidence avec des semences traitées (Larink et Sommer, 2002 ,Viard *et al.*, 2004).

L'épandage, sur sol nu ou à divers stades de développement des cultures, conduit inévitablement à une exposition des organismes du sol, ces derniers recevant soit la pleine dose, soit la fraction de la dose non interceptée par la végétation.

Le transfert des produits en dehors des parcelles traitées peut se faire via le sol (drainage, ruissellement), mais aussi via l'air (brumes de pulvérisation, poussières de traitement de semences ou de granules, volatilisation), et contribue à l'exposition des organismes du sol en dehors du champ.

Que ce soit dans le champ ou en dehors du champ, il est difficile de faire la distinction entre les différentes voies d'absorption (ingestion, inhalation, contact) et plusieurs voies sont souvent impliquées dans l'absorption d'une substance par un organisme donné.

L'impact potentiel des pesticides sur les organismes du sol dépend de divers paramètres environnementaux tels que le type de sol et la température, qui influent sur la persistance, la disponibilité et la toxicité des pesticides ainsi que sur le métabolisme microbien (Beulke et Malkomes, 2001). En raison de l'intégration complexe de ces facteurs, des relations claires entre l'effet observé d'une substance et les facteurs environnementaux sont rarement établies.

4-2 Utilisation des escargots dans l'étude de la contamination par les pesticides

Pour déterminer les effets des contaminants sur un compartiment, il est nécessaire de disposer de modèles biologiques représentatifs du milieu étudié. Au sens écologique général, un bioindicateur peut être défini comme un organisme ou un groupe d'organismes pertinents pour déterminer qualitativement et quantitativement l'état de l'environnement (Fränzle 2006).

Les critères qualifiant une espèce de bioindicateur sont parmi les suivants :

- Elle doit être suffisamment répandue et abondante sur le territoire concerné, si possible facilement détectable,
- Elle doit être le plus sédentaire possible pour refléter les conditions locales,
- Elle doit avoir une taille rendant possible l'étude de ses différents tissus et de leurs composantes (muscles, os, organes dans le cas d'un animal...).

Les organismes bioindicateurs d'effets doivent être sensibles à de faibles perturbations de l'environnement tandis que les organismes indicateurs de bioaccumulation doivent tolérer les contaminants à de fortes concentrations et présenter des propriétés bioaccumulatrices. (Fränzle 2006).

Les mollusques gastéropodes comme les escargots terrestres sont utilisés dans les études écotoxicologiques et sont considérés comme de bons bioindicateurs de pollution notamment par les métaux (Boucenna, 2010) et les HAPs (Barker, 2001; Dallinger *et al.*, 2001; Beeby et Richmond, 2002 ; Regoli *et al.*, 2006). Ces consommateurs primaires occupent une place particulière dans l'écosystème à l'interface sol-air-végétation.

De ce fait, ils intègrent plusieurs sources de contamination (sol, atmosphère, végétaux) par voies digestive, respiratoire et/ou cutanée. Ils participent à la décomposition et à la fragmentation de la matière organique et sont impliqués dans de nombreuses chaînes alimentaires, y compris celle menant à l'homme (Barker, 2004). Ils sont notamment indispensables à l'alimentation des oiseaux car ils leurs apportent une source de calcium nécessaire pour la construction de la coquille des œufs et la pollution par des métaux entraîne une diminution significative de la densité et de l'abondance des escargots induit alors indirectement un effet sur les oiseaux (Eeva *et al.*, 2010). Parmi les espèces les plus ubiquistes, *Helix aspersa* (escargot petit gris, syn. *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* . Müller, 1774) et *Helix pomatia* Linnaeus, 1758 (escargot de Bourgogne) colonisent de nombreux milieux. S'ils sont assez rares au milieu des champs et des prairies, ils fréquentent la périphérie des zones cultivées, les lisières de forêts, voire les milieux forestiers (Kerney *et al.*, 2006). Leurs capacités de résistance et d'accumulation des métaux ont été démontrées chez de nombreuses espèces (*Helix aspersa*, Scheiffler *et al.*, 2002a ; *Cepaea nemoralis*, Notten *et al.*, 2006 ; *Theba pisana*, Radwan *et al.*, 2010 ; Grara, 2011

4-3 Biologie et Physiologie d'*Helix aspersa*

Cet escargot appartient à l'embranchement des Mollusques, animaux à corps mou et dépourvus de squelette. Sa masse viscérale présente une torsion de 180° par rapport au pied d'où une asymétrie de certains de ses organes : il fait partie de la classe des Gastéropodes. Il possède un poumon (ou cavité palléale) ce qui le situe dans la sous classe des Pulmonés. Il appartient au sous-ordre des Stylommatophores caractérisés par le port des yeux à l'extrémité

des tentacules oculaires. La forme de sa coquille enroulée caractérise la super famille des Helicacea .Il appartient à la famille des Hélicidés.

4-3-1 Morphologie :

L'escargot *Helix aspersa* possède une coquille spiralée pouvant contenir tout son corps. Lorsqu'il est en extension, seul le pied apparaît, la masse viscérale étant retenue dans la coquille par le muscle columellaire.

- **La coquille :**

Elle s'enroule autour d'un axe central appelé columelle, dans le sens des aiguilles d'une montre : enroulement dextre. Elle est composée :

- d'une partie organique : trame protéique, représentant 1 à 2% de la coquille.
- d'une partie minérale : carbonate de calcium sous forme de calcite et d'aragonite, représentant 98% de la coquille.

La coquille est sécrétée par le bord du manteau. A la fin de la croissance, le bord de la coquille se retourne et se durcit, l'escargot est dit bordé.



Figure 03 : L'escargot *Helix aspersa*

- **Le corps :**

Il comprend une partie renfermée dans la coquille et une partie visible chez l'animal en extension (figure 06). Cette dernière est une masse musculaire dont la fonction est essentiellement locomotrice : le pied.

La partie antérieure du pied, appelée tête comprend une bouche, deux tentacules oculaires (postérieures, les plus grandes), deux tentacules tactiles (antérieures, les plus petites), un orifice génital sur le côté droit.

La bouche est entourée de quatre lèvres et est pourvue d'une « mâchoire » supérieure cornée.

La partie contenue dans la coquille s'appelle le tortillon. Il s'agit d'une masse viscérale. En région antérieure se trouve le manteau, fin et transparent, il constitue la cavité palléale, dont le plafond richement vascularisé correspond au poumon. La partie du manteau en contact avec le péristome forme un renflement : le bourrelet palléal. Sur le bord inférieur droit de ce bourrelet, s'ouvrent l'anus, l'orifice excréteur et le pneumostome (orifice respiratoire). En arrière se trouve un rein jaunâtre (organe de Bojanus) et un cœur. Sur la partie postérieure du tortillon se trouve un organe plus sombre brun verdâtre ayant un rôle comparable à celui du foie des Vertébrés : l'hépatopancréas. Sur ce dernier, se trouve une zone blanchâtre : la glande de l'albumen.

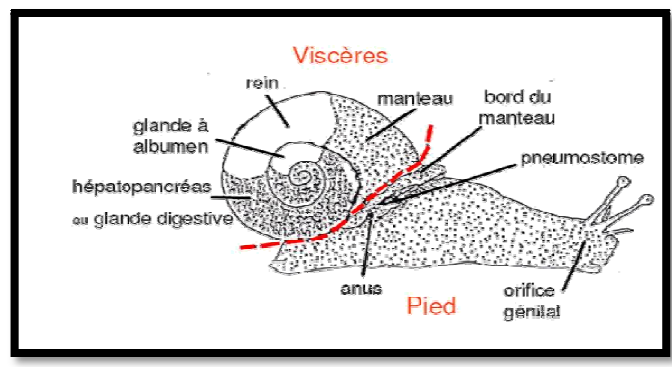


Figure 04 : Morphologie externe de l'escargot.

4-3-2 Anatomie :

- **Appareil digestif :**

En raison de la torsion à 180° du corps de l'escargot, le tube digestif forme une boucle ramenant l'anus vers l'avant. La bouche se prolonge par un bulbe buccal à l'intérieur duquel se trouve une langue musculaire recouverte d'une lame cornée : la radula, son rôle est de broyer les aliments. Dans la partie postérieure du bulbe buccal on trouve deux glandes salivaires. Ce bulbe se prolonge par un œsophage qui se renfle en un estomac, lui-même prolongé par un intestin formant une double circonvolution autour de l'hépatopancréas et aboutissant à l'anus.

- **Système nerveux :**

Le système nerveux sympathique est constitué par une paire de ganglions buccaux situés sous le bulbe buccal. Ils sont reliés par deux cordons nerveux aux ganglions cérébroïdes et innervent la plus grande partie du tube digestif. Le système nerveux central est situé dans la

région céphalique. Il est formé d'une chaîne de ganglions formant un double collier péri oesophagien complexe.

- **Appareil circulatoire et respiratoire :**

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

- **Appareil génital :**

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

4-3-3 Activité saisonnière :

L'escargot est un poïkilotherme : il ne peut réguler sa température corporelle. Il s'est donc adapté, en climat tempéré aux variations thermiques saisonnières selon trois rythmes d'activités annuels marqués par trois états physiologiques :

- l'un se caractérise par un ralentissement du métabolisme et intervient lors des basses températures hivernales : l'hibernation.
- l'autre s'étend entre le printemps et l'automne. Il se caractérise par une reprise de l'activité locomotrice, le déclenchement de la croissance des jeunes et la reproduction des adultes.
- durant les périodes sèches et chaudes, l'escargot présentera également une période de vie ralentie, appelée estivation. Contrairement à l'hibernation, l'estivation est un état de résistance ponctuel qui disparaît lorsque les conditions climatiques redeviennent favorables.

4-3-4 Activité journalière :

Il a été établi un modèle théorique du rythme d'activité nycthéméral de l'escargot en condition de photopériode «jour long » :

- La première phase d'activité débute à la tombée de la nuit et a une durée supérieure à 6 heures

- La phase dite d'inactivité relative a une durée inférieure à 18 heures
- Une autre phase d'activité, ne concernant pas tous les individus, se produit avant le lever du jour.

L'activité des escargots est étroitement liée à l'hygrométrie ; un taux de 100% d'actifs est rare et ne s'observe que pendant des nycthémères pluvieux.

4-3-5 Hibernation :

Elle se caractérise par un état de vie ralentie durant lequel le métabolisme de l'animal est diminué. En début d'hibernation, l'escargot sécrète un voile muqueux appelé épiphragme qui vient obturer l'ouverture de sa coquille. Celui-ci limite les pertes en eau qui atteignent cependant 30% du poids frais de l'animal.

4-3-6 Reproduction :

-L'accouplement : les escargots matures sont généralement bordés. Dans la nature, ils sont alors âgés de 2 à 3 ans. En ce qui concerne *Helix aspersa*, deux escargots s'accouplent tête-bêche, le pénis de chacun pénétrant dans le vagin de l'autre. Les spermatozoïdes sont alors émis sous forme d'un long filament : le spermatophore. L'accouplement dure de 10 à 12h. Suivant les régions, les escargots s'accouplent durant toute la période d'activité avec une périodicité bien définie ; ce qui synchronise les individus.

-La ponte : l'intervalle entre l'accouplement et la ponte est variable. En conditions constantes de température et d'hygrométrie (20° C et 85%) les durées moyennes sont de 10 à 15 jours.

Pour pondre, l'escargot creuse dans la terre ou le sable un «nid de ponte », la ponte dure 12 à 48 heures. Généralement, chez un animal en ponte, seule la coquille est visible, le reste du corps (le pied) est à l'intérieur du nid. Les œufs, petites sphères blanches de 4 mm de diamètre et pesant 30 à 40 mg, sont émis un à un par l'orifice génital. Un escargot pond en moyenne 120 œufs par ponte.

-Incubation-éclosion : après la ponte, dès les premiers jours d'incubation, l'embryon élabore une coquille protéique qui se calcifie au cours de son développement. En conditions naturelles, la durée d'incubation varie de 15 à 30 jours. Il se libère par rupture de la membrane externe de l'œuf qu'il consomme. Le nouveau-né va séjourner dans le «nid de ponte » de 6 à 10 jours ; puis il remonte jusqu'à la surface du sol. Il pèse alors de 10 à 40 mg, mesure 2 à 4 mm de diamètre, il est apte à se nourrir.

On peut souligner l'importance de la lumière, l'hygrométrie et la température dans le déterminisme de la reproduction ainsi que la nécessité d'une hibernation suffisante préalable.

4-3-7 Croissance

La croissance de l'escargot correspond à une prise de poids pouvant atteindre jusqu'à 14 g en conditions contrôlées favorables (photopériode 18 h de lumière par 24 h, 20°C et 80-90% d'humidité) et à un accroissement de la coquille en longueur, mais également en épaisseur (Gomot de Vaufleury et Bispo, 2000). La croissance des escargots est caractérisée par 4 phases. Ils sont appelés « jeunes éclos » jusqu'à environ 1 g (correspondant à 1 mois), puis sont qualifiés de juvéniles jusqu'à environ 5 g et de subadultes jusqu'à 8-9 g. Lorsque les escargots atteignent la taille adulte après environ 4 mois de croissance en conditions contrôlées favorables, ils se bordent (phénomène caractérisé par le bord de la coquille qui s'incurve et par un épaississement du bord du manteau). La croissance de la coquille s'arrête alors, du moins en longueur, et les escargots, devenus adultes, terminent leur maturation sexuelle et deviennent aptes à se reproduire.

En milieu naturel, la croissance est beaucoup plus longue et dure de 1 à 2 ans selon les conditions climatiques. La durée de vie en milieu naturel est en moyenne de 3-4 ans.

5 Objectif de l'étude

Dans notre étude nous avons choisi un matériel biologique connu comme un indicateur écologique efficace et sûr. Il est suffisamment répandu et représentatif au sein de la communauté des invertébrés des sols.

Ils possèdent des capacités de bioaccumulation importantes pour de nombreux polluants métalliques et organiques. Leurs réponses physiologiques (inhibition de croissance et de reproduction, mortalité) et biochimiques quand ils sont exposés aux contaminants peuvent renseigner sur le degré de pollution des milieux dans lesquels ils évoluent.

L'objectif principal de notre étude consiste à suivre certains marqueurs biologiques susceptibles de fournir une réponse précoce sur la toxicité et/ou l'adaptation des escargots *Helix aspersa* après exposition à des conditions contrôlées au Spinosad.

Notre travail de recherche se structure en cinq chapitres :

- Un premier chapitre relatif à une introduction générale dans laquelle nous nous sommes penchés sur l'état de l'art en matière de pollution et des différents

déterminants qui entrent en jeu dans l'amplification ou l'atténuation de ce phénomène. Nous avons ainsi abordé des généralités sur le processus de bioindication ainsi qu'un aperçu sur les différents types de polluants et leur effet sur l'Homme et son environnement ; nous nous sommes penchés particulièrement sur le Spinosad-objet de notre étude-

- Dans le deuxième chapitre nous nous sommes intéressés à l'évolution des paramètres morpho-physiologiques en l'occurrence la masse corporelle des escargots entiers et leurs organes à savoir l'hépatopancréas (glande digestive) et le rein, ainsi que le poids de la coquille des escargots traités par différentes concentrations du pesticide. Cette première étude préliminaire pouvant nous renseigner sur le degré de toxicité du Spinosad. En effet l'utilisation concomitante de biomarqueurs pris à différentes échelles de l'organisme (moléculaire, cellulaire, tissulaire, physiologique) chez notre modèle biologique nous apparaît comme une approche indispensable pour l'évaluation des effets du Spinosad.
- Le troisième chapitre est consacré à l'étude des mécanismes biochimiques de défenses notamment le système antioxydant chez l'escargot *Helix aspersa* au niveau des organes clés dans la biotransformation en l'occurrence l'hépatopancréas et le rein. Ainsi nous avons commencé par une description des différentes méthodes utilisées pour le dosage et le suivi des paramètres biochimiques particulièrement enzymatiques (GST, CAT) de même que le GSH, connus pour leur rôle dans le piégeage des métabolites toxiques et des ROS ainsi que le MDA biomarqueur de la peroxydation lipidique. Nous nous sommes également intéressés à l'étude de la neurotoxicité du Spinosad à travers l'évaluation de l'activité AchE.
- Le quatrième chapitre est consacré à une étude histopathologique au niveau de l'hépatopancréas et du rein de l'escargot *Helix aspersa*. Cette étude est indispensable puisqu'elle rend compte des altérations éventuelles induites par le toxique à l'échelle cellulaire et tissulaire et peut donc expliquer les perturbations métaboliques et physiologiques pouvant découler d'une toxicité par le Spinosad.

- Enfin, le cinquième chapitre qui fait l'originalité de notre travail concerne le suivi du taux de protéines totales et de GSH au niveau de l'Hémolymph en raison de l'implication direct de cette dernière dans la distribution des xénobiotiques dans l'organisme. Ceux-ci se retrouveront sous forme liée aux protéines hémolympatiques ou sous forme libres pouvant ainsi se fixer sur des tissus cibles ou non cibles et entraîner ainsi une toxicité chez l'escargot *Helix aspersa*. D'un autre côté le taux de GSH est un excellent indicateur d'une toxicité au niveau des hémocytes.

Introduction

La problématique des produits phytosanitaires à travers leur rémanence dans le milieu naturel et leurs impacts potentiels est aujourd'hui une des préoccupations les plus importantes en matière d'environnement. Aussi a-t-on recours aux organismes bioindicateurs de pollution car 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 (Hellawell, 1986 ;Echaubard, 1995) et cela par de simples modifications soit de leur mode de vie(déplacement, alimentation, comportement etc...) ou encore par des modifications physiologiques (poids de la masse corporelle, poids et qualité cde la coquille etc...)(Notten et *al.*,2006). C'est dans ce cadre là que se situe cette première partie de notre étude.

2 Matériel et méthodes

Notre travail a été effectué au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Annaba

2-1 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est un gastéropode pulmoné - l'escargot petit gris : *Helix aspersa*.

Les escargots *Helix aspersa*, pesant $6 \pm 0,05$ g (juvéniles), sont collectés au niveau d'une zone peu polluée « Seraidi » située au Nord Est algérien à plus de 600 m d'altitude. Ils sont élevés dans les conditions de laboratoire contrôlées avec une photopériode de 18h de lumière /24h, une température de 20°C, une humidité de 80 à 95% et nourris à la farine de blé dans des boîtes de polystyrène transparentes et perforées, avec une éponge humide pour maintenir l'humidité.

2-2 Matériel chimique

Notre matériel chimique correspond à un insecticide naturel à base de deux matières actives : spinosyne A (85%) et spinosyne D (15%) issus de la fermentation de l'actinomycète *Saccharopolyspora spinosa* (Kirst et *al.*, 1992)

2-3 Méthodes

2-3-1 Méthode de traitement :

La toxicité par voie topique du Spinosad sur les escargots *Helix aspersa* est évaluée en utilisant la méthode de (Radwan *et al.*, 2008) qui consiste à appliquer 60µl de solutions préalablement préparées à partir de respectivement(25, 50,100 et150)µg de matière active de Spinosad diluées dans 1 ml d'eau déminéralisée .Pour chaque traitement nous avons choisi 5 animaux, les essais sont répétés 3 fois, les solutions préparées sont délicatement appliquées une fois par jour sur la surface du corps de l'escargot à l'intérieur de la coquille en utilisant une micropipette. Les animaux témoins reçoivent 60 µl d'eau distillée. (Figure 05)

Nous avons retenu trois temps de traitement : 7 ,14 et 28 jours. (Grara, 2011)

2-3-2 mesures des paramètres physiologiques :

Le poids frais de l'escargot (tissus mous + coquille) est pesé chaque semaine (pendant 4 semaines) afin d'évaluer de façon hebdomadaire les effets de biopesticide sur les escargots *Helix aspersa*. (Grara, 2011).

Le poids frais de la coquille, le poids frais des deux organes vitaux (glande digestive et rein) sont pesés uniquement après sacrifice des animaux à la fin de chaque période de traitement (Coeurdassier, 2001).(Figure 05)

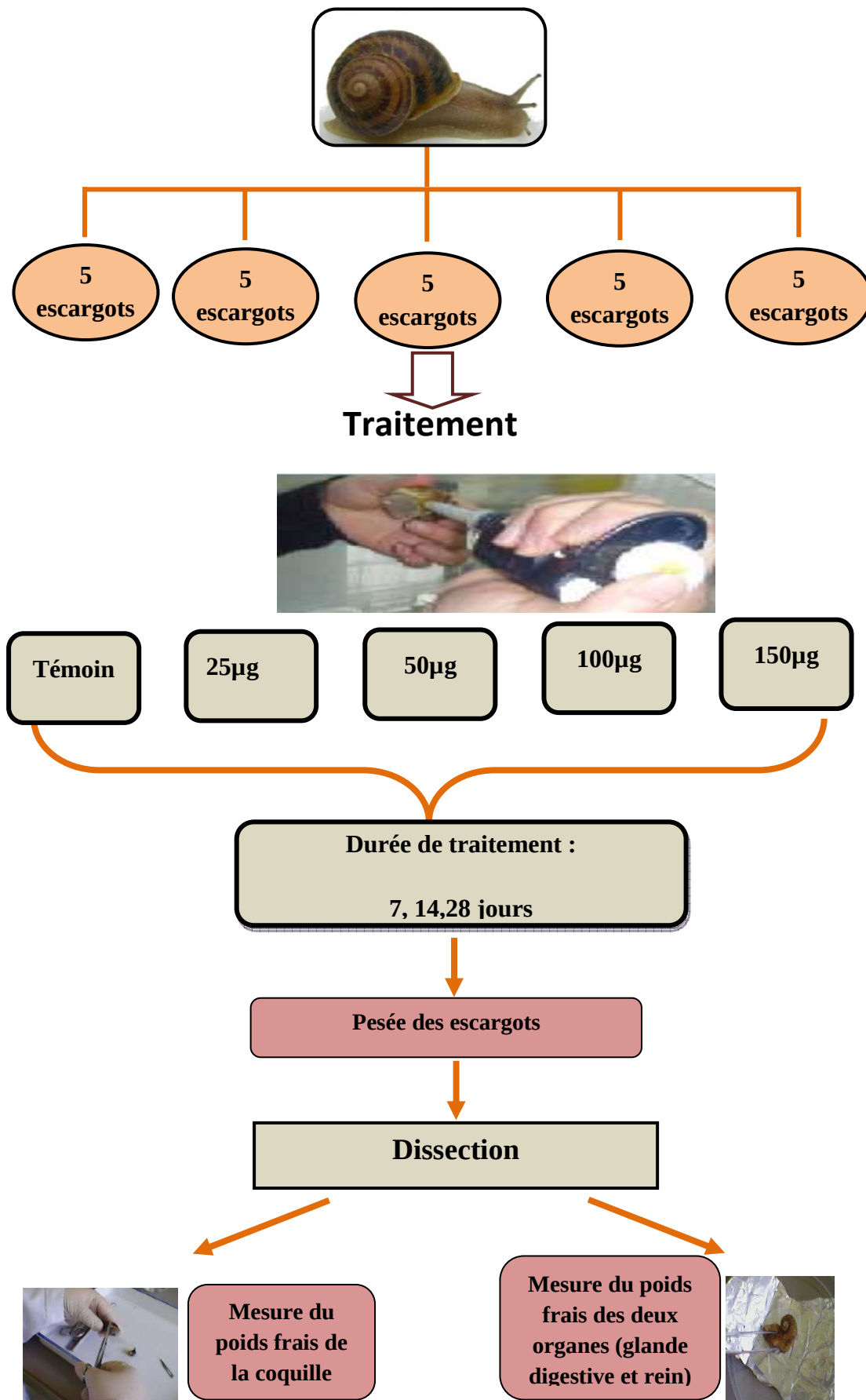


Figure 05 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

3 Résultats :

3-1 Effets du Spinosad sur le poids moyen des escargots :

La Figure (06) met en évidence l'évolution du poids moyen des escargots en fonction du temps.

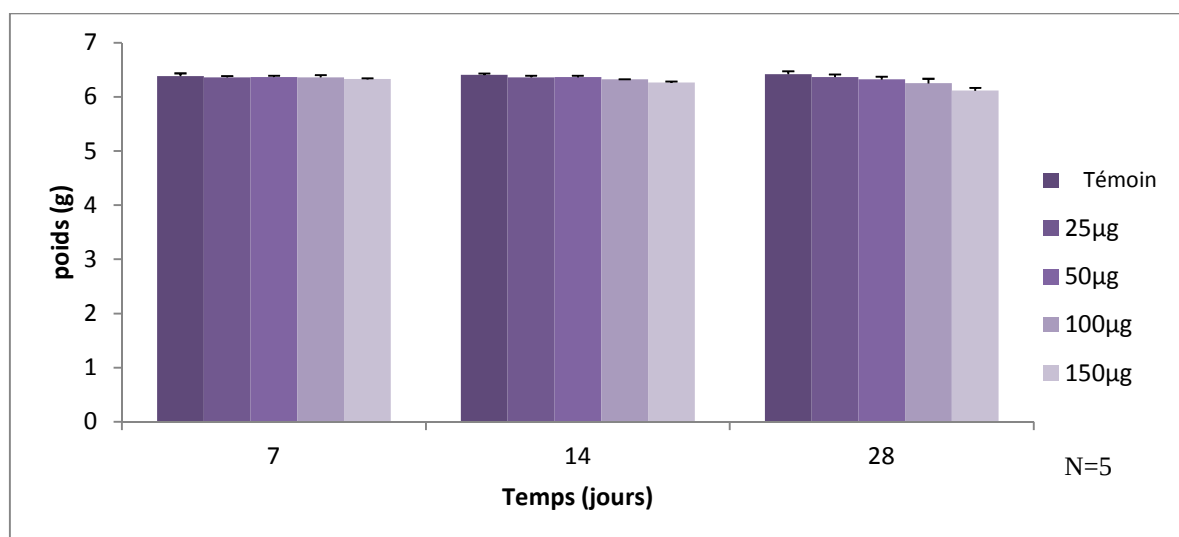


Figure 06: Evolution du poids moyen des escargots traités pendant quatre semaines par des concentrations croissantes de Spinosad.

Nous constatons que le poids moyen des escargots ne semble pas affecté par le traitement par le Spinosad particulièrement pendant la première semaine. A partir du quatorzième jour de traitement, nous constatons une légère diminution du poids des escargots et ce pour la plus forte concentration à savoir 150 µg de Spinosad. Après 4 semaines de traitement nous avons mis en évidence une diminution significative du poids moyen des escargots traités par 50 µg de Spinosad par rapport aux témoins, ($P \leq 0,05$). Il en est de même pour la concentration 100 µg qui a induit une diminution significative ($P \leq 0,05$) du poids moyen des escargots traités par rapport aux témoins, après 14 jours de traitement, cette diminution est hautement significative après 28 jours de traitement. Le même effet est observé pour la plus forte concentration de Spinosad.

3-2 Effets du Spinosad sur l'évolution du poids moyen de la coquille des escargots :

La Figure (07) met en évidence l'évolution du poids moyen de la coquille en fonction du temps en présence de concentrations croissantes de Spinosad

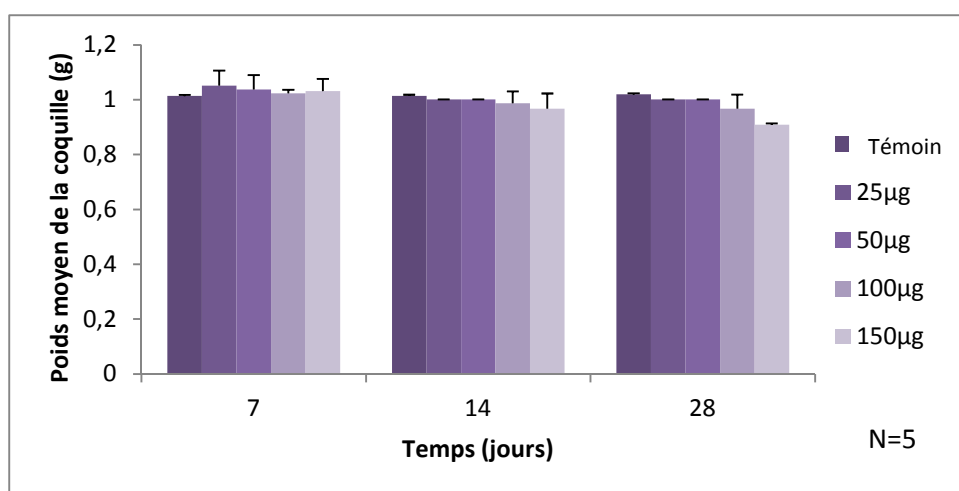


Figure 07: Evolution du poids moyen de la coquille des escargots traités pendant quatre semaines par des concentrations croissantes de Spinosad.

Ainsi, nous remarquons que les concentrations de 100 et 150 µg de Spinosad ont entraîné une diminution significative ($p < 0.05$) du poids moyen de la coquille des juvéniles de *Helix aspersa* et ce comparé aux escargots du groupe témoin après 14 jours de traitement. Une diminution hautement significative ($p < 0.001$) est survenue à la quatrième semaine de traitement particulièrement pour la plus forte concentration (150µg) du xénobiotique où le poids des coquilles des témoins qui était d'environ 1,05g passe à environ 0,9g .

3-3 Effets du Spinosad sur le poids moyen de l'hépatopancréas des escargots :

La Figure (08) illustre les variations du poids de l'hépatopancréas en présence de concentrations croissantes de Spinosad.

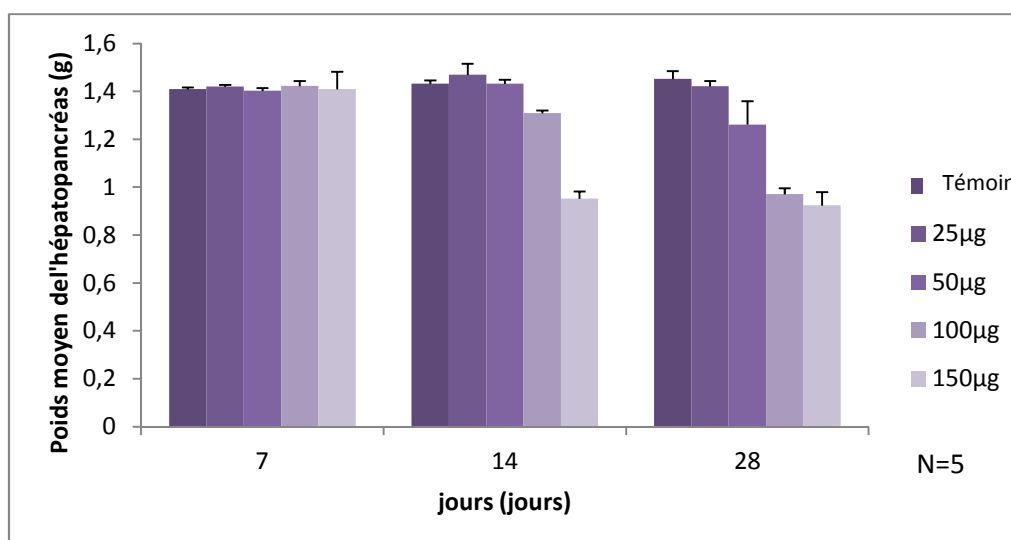


Figure 08: évolution du poids moyen de l'hépatopancréas des escargots traités pendant quatre semaines par des concentrations croissantes de Spinosad

Nous constatons que durant les 7 premiers jours de traitement, le poids moyen de l'hépatopancréas reste stable et évolue de manière similaire à celle des témoins. Cependant, après 14 jours de traitement, nous constatons une diminution très hautement significative du poids moyen de l'hépatopancréas ($P \leq 0,001$) chez les escargots traités aux plus fortes concentrations (100, 150 µg). En effet, le poids de l'hépatopancréas passe d'environ 1,42g chez les témoins à environ 0,96g chez les traités avec 150 µg de Spinosad. Il en est de même pour les traités pendant 28 jours où la diminution du poids moyen de l'hépatopancréas est dose-dépendante et hautement significative ($P \leq 0,001$) particulièrement pour les plus fortes concentrations à savoir 100 µg et 150 µg.

3-4 Effets du Spinosad sur l'évolution du poids moyen du rein des escargots :

La Figure (09) illustre les variations du poids moyen du rein des escargots en présence de concentrations croissantes de Spinosad

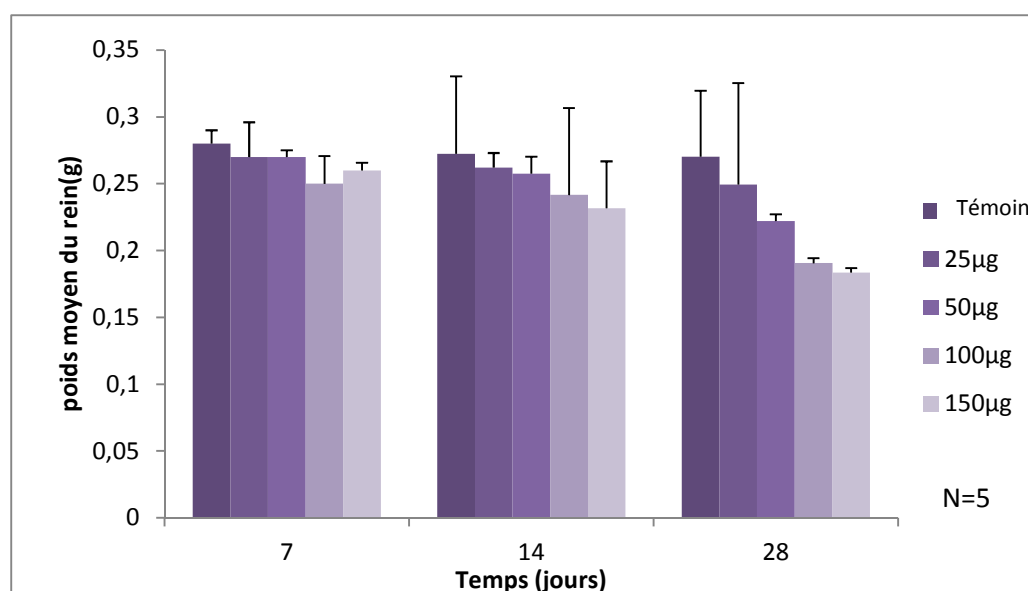


Figure 09: Evolution du poids moyen du rein des escargots traités pendant quatre semaines avec des concentrations croissantes de Spinosad.

Nous constatons que pour les escargots traités pendant 14 jours avec des concentrations croissantes de Spinosad, le poids moyen du rein diminue de manière dose dépendante et hautement significative ($P \leq 0,01$) en présence de fortes concentrations du xénobiotique. En effet, le poids moyen du rein passe de 0,27g chez les témoins à environ 0,23g chez les traités par la plus forte concentration du xénobiotique (150 µg). Il en est de même après 28 jours de traitement où la diminution du poids du rein est hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les escargots traités aux plus fortes concentrations (100,150 µg) par rapport aux témoins. En effet le poids du rein des témoins est d'environ 0,27g et passe à environ 0,19 g chez les traités par la plus forte concentration de Spinosad.

4 Discussion

Dans notre travail nous avons choisi comme modèle biologique *Helix aspersa* qui joue un rôle majeur dans de nombreux écosystèmes. C'est pourquoi, il est de plus en plus utilisé pour évaluer l'impact de contamination sur sa croissance et sa physiologie (Gomot et Kerhoas 2000).

En premier lieu nous avons mis en évidence une diminution du poids frais de l'escargot accompagnée d'une diminution du poids de la coquille chez les animaux traités particulièrement aux plus fortes concentrations de Spinosad ce qui constitue un premier indice de toxicité potentiel. L'inhibition de la prise du poids est probablement due à la répulsion de la nourriture, et donc un jeûn prolongé des escargots, Bibic et *al.*, (1997) stipulent que dans un environnement pollué, **l'animal se met dans un état de jeûn prolongé**. Dans le même ordre d'idées ces résultats sont en accord avec les travaux de Laskowski et Hopkin., (1995 a) et Grara, (2011) qui ont travaillé sur la toxicité des métaux lourds sur *Helix aspersa* et ceux de Coeurdassier et *al.*, (2001) qui ont étudié l'effet du Chrome sur *Helix aspersa*. Dans le même ordre d'idées Bouaricha, (2013) a étudié la toxicité du biopesticide l'Emamectine benzoate sur les escargots *Helix aspersa*, et a également mis en évidence une diminution du poids frais des escargots.

Il en est de même concernant les travaux de Gomot-de Vaufleury et Bispo, (2000) se sont intéressés aux effets du pentachlorophénol, du trichlorophénol et du naphthalène sur la croissance d'*Helix aspersa aspersa* et *Helix maxima* et ont mis en évidence une inhibition de la croissance chez *Helix aspersa* dès la plus faible concentration, ou encore El-Wakil et Attia.,(1999) qui ont montré que l'ingestion de Dimiline (diflubenzuron, benzoyl uréase) n'a pas d'effet létal sur des adultes de l'escargot *Theba pisana*. Alors que l'exposition des juvéniles à la même concentration de Dimiline provoque une inhibition de croissance significative suggérant ainsi une sensibilité particulière des juvéniles. Nos résultats sont en accord avec ceux cités précédemment et confirme ainsi une diminution du poids des escargots exposés à un toxique.

Schuytema et *al.*, (1994) qui ont testé la toxicité de l'aminocarbe, du métyl parathion et du paraquat rapportent que la réduction significative du poids total des escargots traités qu'ils ont mis en évidence, est liée à la nature et à la dose du pesticide administré ce qui abonde dans le même sens que nos travaux.

La diminution du poids moyen de la coquille des escargots traités par le Spinosad que nous avons constaté dans notre travail pourrait s'expliquer par l'inhibition de la synthèse d'une hormone de croissance, comme le suggère Gimbert *et al.*, (2006) qui ont mis en évidence une diminution de 30 % de la masse de la coquille des escargots exposés à un sol artificiel contaminé par le Cadmium. Nos résultats sont également en accord avec ceux de Grara, (2011) qui a mis en évidence une diminution dose- dépendante du poids moyen de la coquille des escargots traités par des métaux lourds. Ces résultats confirment l'importance du suivi des paramètres physiologiques dans l'évaluation de la contamination d'un milieu.

Les autres paramètres suivis dans cette étude sont l'évolution du poids de deux principaux organes, à savoir l'hépatopancréas (principale organe de la digestion) et le rein (élimination), nos résultats ont mis en évidence une diminution du poids de ces organes après traitement par de fortes concentrations de Spinosad ,ces résultats sont en accord avec ceux de Bouaricha, (2013) qui a montré une réduction du poids de la glande digestive et du rein des escargots traités par un biopesticide, ou encore ceux de Grara, (2011) qui a mis en évidence une diminution du poids du rein et de l'hepatopancréase chez les escargots *Helix aspersa* contaminés par des métaux lourds.

Introduction

L'exposition aux pesticides et les autres polluants a relancé l'intérêt de la toxicologie environnementale envers les problèmes sanitaires liés aux pesticides, et leurs capacités à provoquer des intoxications importantes qui peuvent par la suite aboutir à un certain nombre de pathologies. Ces pathologies sont le résultat d'un jeu complexe de mécanismes parmi les quelles on trouve le « stress oxydant » c'est-à-dire d'une situation de déséquilibre entre la production des espèces réactives (radicaux libres) et les mécanismes de défense et de détoxification de ces derniers. (Bigot, 2009)

Une fois entrés dans l'organisme, les xénobiotiques sont susceptibles d'interagir avec toutes les molécules qu'ils rencontrent. La toxicité de la plupart des contaminants est relativement peu élevée dans leur état natif mais les interactions chimiques avec les biomolécules entraînent généralement la formation de composés plus réactifs et nocifs pour l'organisme ; c'est le phénomène de bioactivation. Les propriétés des xénobiotiques bioactifs et donc les réactions spécifiques qu'ils peuvent avoir avec différents composés cellulaires font que les dommages exercés par un contaminant auront lieu préférentiellement sur certains types de biomolécules, appelées molécules-cibles. Cela dépend de l'accessibilité de la biomolécule, de sa réactivité mais également de son rôle dans la cellule, dont l'altération sera fortement dommageable s'il est critique pour le fonctionnement. (Storey, 1996),

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), produits normaux du métabolisme aérobie, sont à l'origine de dommages cellulaires lorsqu'elles sont produites en quantité excessive et qu'elles provoquent un stress oxydant. Selon Storey.,(1996), face à la cytotoxicité des espèces réactives de l'oxygène, trois niveaux de protection sont envisageables : la prévention de la formation d'ERO, la neutralisation des ERO par production de défenses antioxydantes et la réparation des dommages cellulaires engendrés après le stress oxydant, cette dernière éventualité n'ayant encore jamais été mise en évidence. (Letellier, 2010)

Pour lutter contre le stress oxydant, les organismes ont donc développé des défenses antioxydantes. Ces défenses peuvent être enzymatiques, ce sont les enzymes antioxydantes telles que **la superoxyde dismutase, la catalase et les glutathion peroxydases** qui ont pour rôle d'interrompre les réactions en chaîne produites par les espèces réactives de l'oxygène. Elles peuvent également être non enzymatiques, ce sont alors des piègeurs de radicaux qui agissent comme réducteurs ou qui viennent renforcer l'action des enzymes antioxydantes.

Ces molécules sont les vitamines A, C et E, de loin l'antioxydant le plus largement distribué dans la nature ; un autre piègeur de radicaux est le glutathion qui est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules mais dont la forme oxydée (GSSG) est indicative d'un stress oxydant. (Bigot, 2009)

Les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées, par le biais de la respiration dans toutes les fonctions physiologiques chez les organismes aérobies. En effet, malgré leurs effets délétères sur l'organisme, les ERO peuvent être utilisées par les animaux comme défenses immunitaires et agissent notamment lors de la phagocytose des pathogènes (Adema *et al.*, 1992). (Fig 10)

L'évaluation du stress oxydant peut être réalisée à différents niveaux. D'une part, le dosage des molécules biologiques modifiées. D'autre part le potentiel antioxydant peut également être estimé par la détermination des activités enzymatiques; des superoxydes dismutases (SOD), de la glutathion peroxydases (GPx), la catalase (Cat),... etc. Ces enzymes représentent une des premières lignes de défense au même titre que les éléments non protéiques comme le glutathion réduit et les micronutriments antioxydants (vitamines et Sélénium).

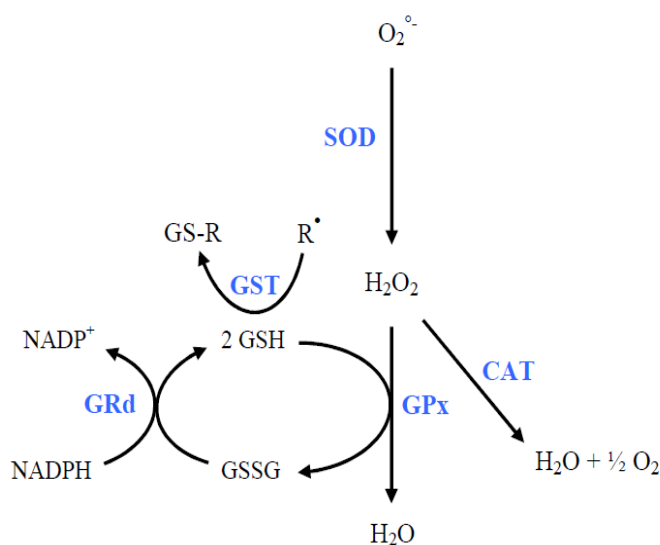


Figure10 : Schéma des défenses antioxydantes impliquant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), les glutathion S-transférases (GST) et la glutathion réductase. (Bigot, 2009)

Les pesticides ont aussi un effet neurotoxique qui se traduit par l'inhibition de l'activité acétylcholinestérase, cette enzyme ne joue aucun rôle dans la détoxification chez les vertébrés mais est impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme.

L'inhibition de l'enzyme par de nombreux neurotoxiques entraîne une accumulation du médiateur chimique, l'acétylcholine (ACh), dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux, conduisant à la mort de l'individu (Bocquené, 1997). Parmi les composés neurotoxiques, les insecticides organophosphorés et les carbamates sont considérés comme les plus puissants inhibiteurs spécifiques de cholinestérase. Cependant des mélanges complexes d'hydrocarbures ont été aussi cités dans la mesure de dépressions de l'AChE (Payne *et al.*, 1996). De plus, des études *in vitro* et *in vivo* menées sur des mammifères, des poissons ou des invertébrés ont relevé un effet inhibiteur de l'AChE par des métaux, incluant le Cadmium (Schmidt et Ibrahim, 1994; Labrot *et al.*, 1996 ; Grara, 2011).

Chez les invertébrés, le rôle des cholinestérases est moins clairement défini, bien que l'existence de motoneurones cholinergiques ainsi que celle de récepteurs spécifiques à l'acétylcholine ait été mis en évidence chez les mollusques et les gastéropodes (Carpenter *et al.*, 1977; Weiss *et al.*, 1993). L'activité AChE est utilisée comme marqueur d'exposition aux pesticides inhibiteurs chez les mollusques. Néanmoins, dans une étude de surveillance biologique menée dans l'estuaire de la Gironde (France), aucune pollution de ce type n'a été mise en évidence (RNO, 1995) et une inhibition significative de l'AChE a pourtant été observée chez *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas* (Amiard-Triquet *et al.*, 1998).

L'objectif de cette partie est d'une part mettre en évidence l'induction d'un stress oxydant et d'autre part d'étudier les effets du stress oxydant induit par le Spinosad et les mécanismes enzymatiques impliqués.

2-Matériel et méthodes : (figure 11)

2-1- Matériel biologique :

- Après dissection des escargots, l'hépatopancréas et le rein ont été retirés et divisés en cinq fragments, respectivement, pour l'évaluation biomarqueurs biochimiques (GSH, GST, CAT, et MDA) ainsi que le dosage des et
- D'un autre côté nous avons prélevé la tête des animaux pour le dosage de l'acétylcholinestérase (AChE).

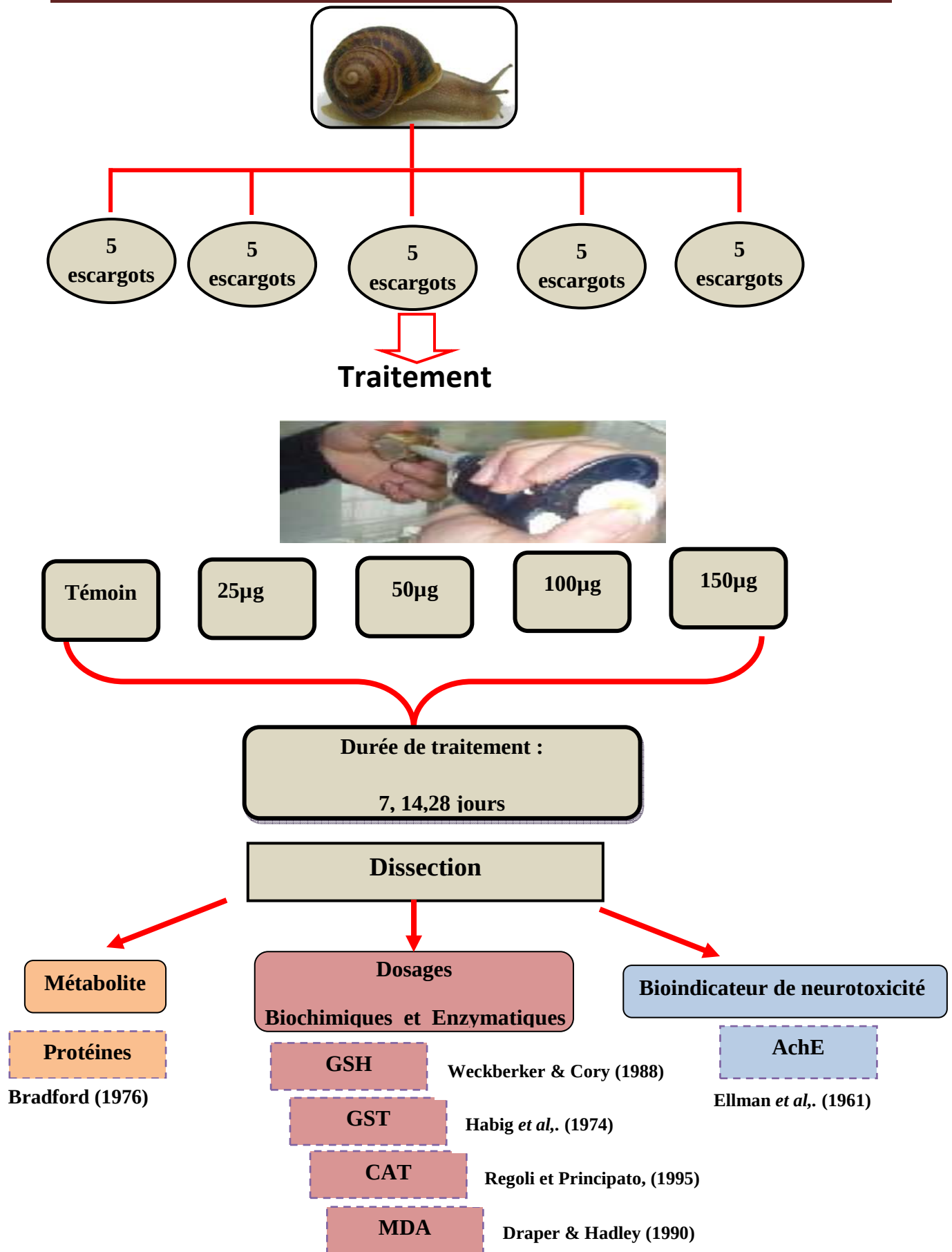


Figure 11 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

2-2 Méthodes:**2-2-1 Dosage des protéines :**

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de Bradford (1976).

2-2-2 Dosage du glutathion (GSH)

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de Weckberker et Cory (1988), dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5-mercaptopurique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm.

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

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

X : Micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines).

ΔDo : Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

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

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

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

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

Vs : Volume du surnageant dans la cuve : 0,5 ml.

2-2-3 Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le taux de malondialdéhyde (MDA) est quantifié selon la méthode de Draper et Hadley (1990) basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA)

et le malondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm.

Le taux du MDA est déterminé selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta D_{532}}{156} \times \frac{V_t}{V_s} \quad \text{mg de protéines}$$

X : Micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines).

ΔD_{532} : Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

156 : Coefficient d'extinction molaire du TBA.

V_t : Volume total dans la cuve : 1 ml [volume total du butanol récupéré renfermant les complexes TBA/MDA].

V_s : Volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0,5 ml.

2-2-4 Dosage de l'activité Catalase (CAT)

La mesure de l'activité Catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de (Regoli et Principato, 1995) dont le principe repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une longueur d'onde de 240nm.

La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée et La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant une minutes (spectrophotomètre Jenway 6300) pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 240nm à une température d'incubation de 25 °C.

L'activité Catalase (CAT) est exprimée en μmol d' H_2O_2 par minute et par mg de protéines selon la formule suivante :

$$\text{Activité } (\mu\text{mol}/\text{min}/ \text{mg de prot}) = \frac{\Delta D_{240} \times 10}{\epsilon \times l \times X \times Fd}$$

X : μmoles de H_2O_2 consommées par minute et par mg de protéines

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

ϵ : Le coefficient d'extinction est de 0,0040 m M⁻¹. Cm⁻¹

L : Longueur de la cuve utilisée (1cm).

2-2-5 Dosage de l'activité GST (glutathion S-transférase)

La mesure de l'activité glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de Habig *et al.* (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH).

Le dosage consiste à faire réagir 200 μ l du surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB. La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm dans un spectrophotomètre Uv/visible contre un blanc contenant 200 μ l d'eau distillée remplaçant la quantité du surnageant.

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

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

X : Micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (μ M/mn/mg de protéines).

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

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

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

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

2-2-6 Dosage de l'activité Acétylcholine Estérase (ACHE)

Le dosage de l'acétylcholinestérase (ACHE) est réalisé selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) qui consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'acétylthiocholine (ASCh) dont

l'hydrolyse libre de la thiocholine (SCh) et de l'acide acétique. La thiocholine en présence de DTNB (acide 5, 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) forme un complexe de couleur jaune dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 412 nm.

L'activité Acétylcholine Estérase est calculée selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do / mn}{1,36 \times 10^4} \times \frac{Vt}{Vs} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

X : Nanomole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (nM/mn/mg de protéines).

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

$1,36 \times 10^4$: Coefficient d'extinction molaire du DTNB.

Vt : Volume total dans la cuve.

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

3 Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique des données est effectuée par le test T de student : Minitab (Version 14.0) (Dagnelie, 1999).

4 Résultats :

4-1 Effet du traitement par des concentrations croissantes de Spinosad sur le taux de protéines totales au niveau de la glande digestive et du rein :

Le tableau (2) représente les variations du taux des protéines totales au niveau de la glande digestive et du rein chez les escargots témoins et traités aux concentrations croissantes de Spinosad.

Tableau (2) : Variations du taux des protéines totales au niveau de la glande digestive et du rein chez *Helix aspersa* après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.

Paramètres		Protéines totales (μM/mg de tissus)								
Tissus		Glande digestive				Rein				
Traités (μg)	Témoins	25	50	100	150	Témoins	25	50	100	150
Temps										
7 jours	0,035±	0,033±	0,0350±	0,040±	0,042±	0,0344±	0,0355±	0,0365±	0,038±	0,042±
	0,001	0,005	0,002	0,006	0,003	0,002	0,004	0,004	0,003	0,003
14 jours	0,034±	0,035±	0,0376±	0,045±	0,048±	0,0342±	0,0367±	0,0367±	0,042±	0,053±
	0,001	0,004	0,0008	0,003	0,002	0,001	0,006	0,001	0,003	0,003
28 jours	0,035±	0,041±	0,0406±	0,051±	0,055±	0,0355±	0,0381±	0,0409±	0,049±	0,056±
	0,004	0,002	0,009	0,001	0,003	0,004	0,005	0,008	0,003	0,003

Au niveau de la glande digestive, nous constatons que chez les traités le taux des protéines totales tend à augmenter de manière dose- dépendante et très hautement significative ($P \leq 0,001$) par rapport aux témoins particulièrement pour les plus fortes concentrations et ce à partir de 14 jours de mise en contact avec le Spinosad. Ainsi, après 28 jours de traitement et à la concentration 150 μg de Spinosad, nous constatons que le taux de protéines totales passe de 0 ,035 ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de tissus) chez les témoins à 0 ,055 ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de tissus).

Au niveau du rein, nos résultats ont mis en évidence également une augmentation dose dépendante et très hautement significative ($P \leq 0,001$) du taux des protéines totales pour la

plus forte concentration et après 14 jours d'exposition. Ainsi, nous notons qu'à la plus forte concentration de Spinosad et après 28 jours d'exposition, le taux de protéines totales est de 0,056(μ M/mg de tissus) alors que chez les témoins il n'est que de 0,035(μ M/mg de tissus).

4-2 Effet du traitement par le Spinosad sur le taux de GSH et sur l'activité GST au niveau de la glande digestive :

Le tableau (3) illustre les variations du taux de GSH et de l'activité GST au niveau de la glande digestive chez les escargots témoins et traités par des concentrations croissantes Spinosad.

Tableau (3) : Variations du taux de GSH et de l'activité GST au niveau de la glande digestive chez *Helix aspersa* après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.

Tissus		Glande digestive								
Paramètres		GSH (μM/mg protéines)				GST (μM/min/mg protéines)				
Traités (μg)	Témoins	25	50	100	150	Témoins	25	50	100	150
Temps										
7 jours	4,220± 0,07	4,036± 0,08	3,947± 0,10	3,912± 0,42	3,550± 0,20	0,113± 0,003	0,114± 0,03	0,126± 0,03	0,124± 0,03	0,133± 0,01
14 jours	4,403± 0,22	4,008± 0,10	3,797± 0,004	3,57± 0,30	3,849± 0,16	0,120± 0,03	0,128± 0,02	0,134± 0,02	0,185± 0,03	0,222± 0,03
28 jours	4,447± 0,10	3,817± 0,03	2,983± 1,19	1,906± 0,43	1,805± 0,16	0,105± 0,06	0,146± 0,06	0,139± 0,02	0,196± 0,02	0,203± 0,01

Ainsi au niveau de l'hépatopancréas et en présence du xénobiotique, nous constatons que le taux de GSH diminue d'une manière dose dépendante et très hautement significative ($P \leq 0,001$) particulièrement pour les fortes concentrations (100,150) μ g après 28 jours de mise en contact avec le pesticide, parallèlement nous notons que l'activité GST tend à augmenter avec là aussi un effet dose-réponse particulièrement pour les fortes concentrations (100,150) μ g à partir de 14 jours de traitement

4-3 Effet des concentrations croissantes de Spinosad sur le taux GSH et l'activité GST au niveau du rein :

Le tableau (4) illustre les variations du taux de GSH et de l'activité GST au niveau du rein chez les escargots témoins et traités par des concentrations croissantes de Spinosad.

Tableau (4) : Variations du taux de GSH et de l'activité GST au niveau du rein chez *Helix aspersa* après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad

Tissus						Rein				
Paramètres		GSH (μM/mg protéines)				GST (μM/min/mg protéines)				
Traités (μg)	Témoins	25	50	100	150	Témoins	25	50	100	150
Temps										
7 jours	10,020± 0,06	12,37± 0,8	13,206± 0,6	14,44 ±0,6	15,02 ±0,8	3,246± 0,01	3,203± 0,3	2,897± 0,6	3,044± 0,7	2,727± 0,3
14 jours	10,055± 0,008	9,364± 0,2	8,08± 0,4	1,317 ±0,3	1,28 ±0,3	3,236± 0,01	3,427± 0,4	4,626± 0,6	4,874± 0,06	4,537± 0,05
28 jours	10,018± 0,90	8,452± 0,6	3,950± 0,4	1,727 ±0,4	0,508 ±0,3	3,233± 0,03	3,965± 0,03	4,863± 0,04	5,102± 0,1	5,803± 0,09

Ainsi, nos résultats ont mis en évidence une augmentation dose-dépendante et très hautement significative, ($P \leq 0,001$) de l'activité GST chez les traités par la plus forte concentration (150) μg après 28 jours d'exposition au Spinosad, parallèlement à une diminution dose-dépendante très hautement significatives ($P \leq 0,001$) du taux de GSH chez les traités par les concentrations (100,150) μg après 14 jours d'exposition au Spinosad

4-4 Effet de Spinosad sur l'activité Catalase a4 niveau de la glande digestive et du rein

Les variations de l'activité Catalase au niveau de l'hépatopancréas et du rein chez les escargots témoins et traités par des concentrations croissantes de Spinosad sont illustrées dans le tableau (5)

Tableau (5) : Variations de l'activité CAT au niveau de la glande digestive et du rein chez *Helix aspersa* après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.

Paramètres		CAT (μM/min/mg protéines)								
Tissus		Glande digestive				Rein				
Traités (μg)	Témoins	25	50	100	150	Témoins	25	50	100	150
Temps										
7 jours	10,14± 0,05	10,53± 0,02	12,38± 0,02	14,38± 0,04	15,39± 0,01	1,529± 0,01	0,563± 0,3	0,21± 0,6	0,21± 0,7	0,144± 0,3
14 jours	8,75± 0,02	11,18± 0,03	13,46± 0,02	13,10± 0,003	16,16± 0,02	1,522± 0,01	1,667± 0,4	3,736± 0,6	4,38± 0,06	6,917± 0,05
28 jours	8,61± 0,05	10,95± 0,05	16,48± 0,04	16,49± 0,08	17,08± 0,05	1,5139± 0,03	2,561± 0,03	3,953± 0,04	5,64± 0,1	6,161± 0,09

Nos résultats montrent une augmentation dose- dépendante et hautement significative ($P \leq 0,005$) particulièrement pour les traités avec la concentration de 150 μg après 14 jours de mise en contact avec le Spinosad au niveau des deux organes. Ainsi, au niveau de la glande digestive, l'activité catalase passe de 8,6 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines chez les témoins à 17,08 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines chez les traités à la plus forte concentration de Spinosad.

4-5 Effet de Spinosad sur le taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau de la glande digestive et du rein :

Le tableau (6) représente les variations du taux de MDA au niveau de la glande digestive et du rein chez les escargots témoins et traités par des concentrations croissantes de Spinosad.

Tableau (6) : Variations de taux MDA au niveau de la glande digestive et du rein chez *Helix aspersa* après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.

Paramètres		MDA (μM/min/mg protéines)								
Tissus		Glande digestive				Rein				
Traités (μg)	Témoins	25	50	100	150	Témoins	25	50	100	150
Temps										
7 jours	133,04± 1,71	133,93 ± 9,60	120,60± 1,30	171,2± 28,71	212,16± 32,51	115,28± 1,01	132,93± 2,3	129,21± 2,6	160,2± 5,7	197,1± 3,3
14 jours	133,52± 0,60	137,48 ± 11,81	150,59± 26,57	176,5± 23,77	231,56± 26,24	120,52± 2,01	203,87± 1,4	229,46± 5,6	237,3± 5,06	256,9± 5,05
28 jours	132,59± 2,93	121,9± 2,63	122,62± 1,44	201,0± 1,82	245,45± 2,19	117,51± 3,03	247,06± 2,03	446,93± 7,04	611,6± 1,1	651,1± 3,09

Nous constatons au niveau des deux organes ce taux tend à augmenter d'une manière dose-dépendante et très hautement significatifs ($P \leq 0,001$) particulièrement pour les fortes concentrations (100,150) μg et ce à partir du 7^{ème} jour de mise en contact avec le Spinosad.

4-6 Effet de Spinosad sur l'activité Acétylcholine Estérase :

Figure (12) représente les variations de l'activité AchE mesurée au niveau de la tête des escargots témoins et traités par des concentrations croissantes de Spinosad à divers temps d'exposition au Spinosad.

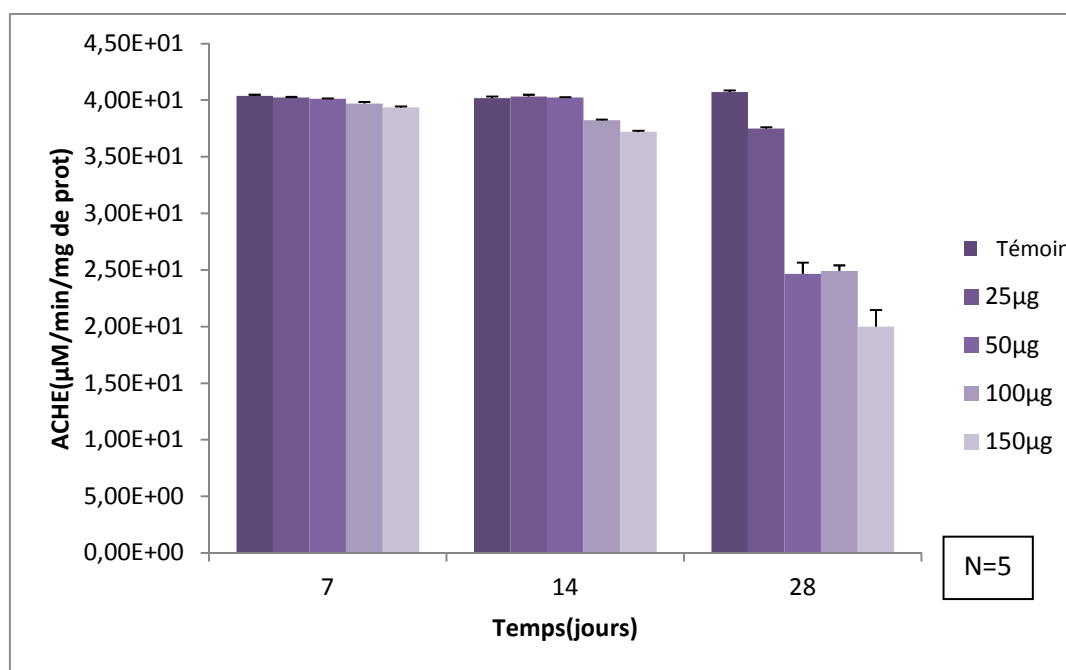


Figure 12 : Variation de l'activité acétylcholinestérase des escargots après 7, 14 et 28 jours d'exposition au Spinosad.

Nous constatons qu'en présence du xénobiotiques, le taux d'acétylcholine estérase tend à diminuer d'une manière dose – dépendante et très hautement significatifs ($P \leq 0,001$) chez les escargots traités particulièrement par les plus fortes concentrations (50, 100, 150) µg et après 28 jours de traitement et pour les fortes concentrations.

6 Discussion

Les teneurs en protéines totales est un test souvent utilisé pour mettre en évidence un stress chez un organisme bioindicateur (Benbouzib, 2012). En effet, lorsque les contraintes environnementales (stress hydrique, thermique, oxydant, exposition à une pollution, infection par des agents pathogènes...) sont fortes, la plupart des protéines subissent une dénaturation (Mohammadkhani et Heidari, 2008). La structure des protéines ainsi que leur fonction peut être altérée par les ROS produites soit par le métabolisme cellulaire ou par des oxydants exogènes. Néanmoins, les Catalases, Superoxyde Dismutase en plus des Peroxydases, contribuent au maintien de niveaux non toxiques des ROS, afin d'éviter toute modification des chaînes latérales d'Aminoacides. En effet, la modification oxydative des groupements sulf-hydryles des protéines peut être un processus à deux facettes: elle pourrait conduire à une altération de la fonction des protéines ou, selon l'état redox des résidus cystéine, comme elle pourrait activer des voies spécifiques impliquées dans la régulation des fonctions clés cellulaires. (Ait Hamlet, 2012)

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation du taux de protéines au niveau des deux organes étudiés. Cette augmentation est dose –dépendante de la concentration en Spinosad. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Masaya *et al.* (2002) ; Peccini *et al.* (1994) qui mettent en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins). Dans le même ordre d'idées Bouaricha., (2013), a montré que les manifestations toxiques de l'Emamectine Benzoate (biopesticide), sur l'escargots *Helix aspersa* et les paramécies, ont été accompagnées par une induction dose dépendante de la synthèse protéique, le même effet a été constaté après le traitement du verre de terre par un insecticide le Métomyl (Zeriri *et al.*, 2012). De plus les travaux de Grara., (2011) mettent en évidence aussi une augmentation du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par des métaux lourds.

D'autre part Köhler *et al.* (2009) suggèrent une induction précoce de la synthèse des structures de stockage (MTs et granules) liée à la toxicocinétique après exposition de la limace *D. reticulatum* à des concentrations élevées de Cd, Pb et Zn simultanément à l'induction des protéines de stress HSP 70. Nos résultats confirment ces travaux, puisque nous

avons également mis en évidence une augmentation du taux de protéines en présence du pesticide. Ce phénomène pourrait être considéré comme un biomarqueur précoce de l'exposition aux polluants chimiques. Cette augmentation du pool protéique suggère une induction de la synthèse d'enzymes de détoxification / métabolisation, cette hypothèse est confirmée par l'évolution des activités enzymatiques que nous avons suivi dans cette partie de notre travail. Cependant, l'identification de ces protéines s'avère nécessaire pour comprendre les mécanismes moléculaires de toxicité des polluants et mettre en place des nouveaux marqueurs spécifiques de toxicité.

Lorsque les capacités des protéines de stress permettant la détoxification cellulaire sont dépassées, les xénobiotiques vont s'accumuler dans les cellules et leurs effets toxiques deviennent alors apparents. Les mécanismes cellulaires qui entrent alors en jeu permettent de limiter ces effets en facilitant l'excrétion des contaminants et en prenant en charge les produits réactifs qu'ils génèrent.

Pour limiter les attaques oxydatives sur les biomolécules, liées à la génération de ROS inhérente à la vie aérobie, une batterie d'acteurs antioxydants permet de dégrader ou prendre en charge les radicaux (SOD) qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde, la catalase qui réduit le peroxyde d'hydrogène, les glutathion peroxydases qui réduisent les peroxydes grâce à l'oxydation du GSH. La glutathion réductase qui régénère le glutathion oxydé grâce au NADPH et participe donc indirectement aux défenses anti-oxydantes.

Nos résultats mettent en évidence une diminution du taux de la GSH parallèlement à une augmentation de l'activité GST et ce au niveau des deux organes (hépatopancréas et rein) cette augmentation est une réponse au stress oxydatif provoqué par la présence de Spinosad (Farombi *et al.*, 2007).

La forte diminution du taux de la GSH pourrait s'expliquer par une réaction/liaison directe du biopesticide avec le glutathion, en effet les groupements carboxyles du glutathion (groupe amine, groupe sulfhydryle (-GH) ainsi que deux peptides) se conjuguent avec le xénobiotique (Galaris *et al.*, 2002). Cette interaction glutathion-Spinosad a lieu grâce à l'intervention de la GST qui permet la conjugaison du xénobiotique ou ses métabolites avec le GSH durant la phase II de la métabolisation.

D'un autre côté la réduction du taux de GSH peut être expliquée également par l'augmentation de l'utilisation de ce dernier par la GST dans la réaction de conjugaison, ceci est confirmé par nos résultats qui indiquent une induction de la GST en présence du Spinosad, ces résultats sont en accord avec les travaux de (Canesi *et al.*, 1999 ; Regoli *et al.*, 2006) ou ceux de Radwan *et al.*, (2008), qui ont mis en évidence une induction de l'activité GST après exposition du gastéropode terrestre (*Theba pisana*) aux carbamates ; ou encore ceux de Pandey *et al.*, (2005) chez le gastéropode *C. penctatus* . Selon Grara. (2011) l'augmentation du taux de GSH chez l'escargot *Hélix aspersa* soumis à un stress par les ETM serait du à l'enclenchement du processus de défense de l'organisme. La Catalase est une enzyme de la phase II qui joue un rôle important dans les mécanismes de détoxification. Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

Le changement de l'activité CAT est expliqué par des lésions cellulaires causées par l'exposition à des contaminants. (Shijin *et al.*, 2011). L'induction ou l'inhibition de cette Enzyme témoigne de l'état du stress oxydant par excellence.

Dans notre étude nous avons mis en évidence une augmentation dose dépendante de l'activité Catalase chez les lots traités par le Spinosad, cette augmentation serait due à l'intensification de l'activité antioxydante (Grara *et al.*, 2009). En effet, la Catalase est sensible à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif comme les HAP, les PCB, certains pesticides (Livingston, 1991), l'augmentation de l'activité Catalase contribue à la prévention contre l'accumulation des ROS résultant de la présence du biopesticide. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux de Bouaricha, (2013) qui a mis en évidence une augmentation de l'activité Catalase suite au traitement du gastéropode *H aspersa* par un biopesticide, ou encore ceux d'El -Gendy *et al.*, (2009) qui ont démontré qu'en présence d'un pesticide à base de Cuivre, l'activité Catalase augmente chez l'escargot *Theba pisana*. Des résultats similaires ont été observés par Slama *et al.*, (2005), chez la même espèce de gastéropode après exposition au métomyl et au chlorpyrifos.

Le malonedialdéhyde (MDA) est un produit de dégradation des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générés par des contaminants. Le MDA est un agent alkylant puissant capable de réagir avec les macromolécules biologiques. Il est utilisé comme indicateur de stress oxydatif induit par des contaminants (Pellerin-Massicote, 2009). Quand le stress oxydatif submerge les forces protectrices comme l'activité Catalase, un effet délétère sur les membranes peut être

observé via une augmentation des teneurs en MDA, puisque celui-ci est un produit de la peroxydation lipidique.

Nos résultats ont mis en évidence, des teneurs très hautement significatives de MDA au niveau de la glande digestive et du rein chez *Helix aspersa* traités par le Spinosad. Ces résultats sont en accord avec ceux d'El -Gendy *et al.* (2009) qui ont étudié les effets d'un pesticide à base de Cuivre sur l'escargot *Theba pisana*, et ont mis en évidence un niveau significatif de MDA après traitement des animaux. De plus Siwela *et al.*, (2010) ont mis en évidence une augmentation significative du taux du MDA chez l'escargot marin *Lymnaea natalensis* exposé à des polluants environnementaux il en est de même pour les travaux de Salama *et al.*, (2005) qui ont mis en évidence une induction de MDA chez les rats après exposition à certains pesticides. Récemment, Zeriri *et al.* (2012) ont mis en évidence une induction du taux de MDA chez les verres de terre exposés à un pesticide (le Métomyl). Ainsi et au vu des résultats obtenus, le pesticide que nous avons testé est toxique et cette toxicité a été mise en évidence à travers l'induction de certains biomarqueurs de stress que nous avons pu quantifier.

D'un autre côté il nous a semblé judicieux de suivre l'activité Acétylcholinestérase en raison de la neurotoxicité du Spinosad en effet le mode d'action du Spinosad se caractérise par une excitation du système nerveux avec l'activation des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR), accompagnés d'effets sur l'acide butyrique γ -amino (GABA) la fonction des récepteurs et canaux chlorure GABA-dépendants (Salgado, 1998). . Des travaux appuient nos résultats, notamment ceux de Sameeh, (2008) qui ont mis en évidence une inhibition de l'acétylcholine estérase chez des rats traités avec du Spinosad, de Bouaricha, (2013) ; Radwan *et al.*, (2008) ; Coeurdassier *et al.*, (2005) ; Salama *et al.*, (2005) qui ont mis en évidence une inhibition de l'activité AchE après exposition du gastéropode terrestre aux pesticides. Certains pesticides tels que les insecticides organophosphorés, exercent une toxicité importante chez des espèces non ciblées par l'inhibition de l'acétylcholinestérase (Bouaricha, 2013). Nos résultats semblent être en adéquation avec ceux cités dans la littérature, en effet, l'activité de l'AchE diminue progressivement suite à l'exposition des escargots aux différentes concentrations du Spinosad. Cette inhibition se poursuit jusqu'à la fin du temps d'exposition. Nous avons pu montrer que le traitement par des concentrations croissantes de Spinosad inhibe d'une manière dose-dépendante l'activité Acétylcholinestérase. L'inhibition de l'acétylcholinestérase conduit à l'accumulation d'acétylcholine (ACh) au niveau des synapses cholinergiques à des niveaux toxiques conduisant à une sur-stimulation des récepteurs

muscariniques et nicotiques. Ce "syndrome cholinergique» comprend les signes et symptômes tels que des troubles du comportement chez les escargots accompagné d'une inhibition de leurs croissance. (Bouaricha., 2013)

Introduction :

Les dommages ultrastructuraux sont considérés comme des biomarqueurs sensibles, peu variables dans le temps et intégrateurs d'effets liés à différents stress environnementaux incluant la contamination chimique (Braunbeck et Volk, 1993). Triebkorn *et al.* (2002) considèrent ce type de réponse comme un bon marqueur de pollution ponctuelle.

L'étude des réponses ultrastructurales présente l'intérêt de pouvoir caractériser l'intégrité de divers organes provenant d'un seul individu et d'évaluer ainsi l'impact des polluants environnementaux sur l'état de santé globale des organismes exposés (Gernhofer *et al.*, 2001).

L'exposition à des molécules chimiques, ainsi que leur accumulation dans les organismes peuvent produire plusieurs lésions histopathologiques, induire un dysfonctionnement des organes et affecter l'intégrité des fonctions physiologiques et donc la capacité de l'organisme à produire des enzymes pour éliminer les xénobiotiques.

Les effets des contaminants sur l'intégrité des tissus de divers organes ont été mis en évidence chez plusieurs espèces de gastéropodes en plus de *Helix aspersa* (Viard, 2004 ; Snyman *et al.*, 2005) (Grara, 2011) d'autres espèces comme *Eobania vermiculata* (Hamed *et al.*, 2007), *Arion ater* (Zaldibar *et al.*, 2008) ont été étudiées. La glande digestive et le rein sont les principaux organes chez les gastéropodes, considérés comme sites importants du métabolisme, de l'accumulation, de la biotransformation et l'excrétion de nombreux xénobiotiques.

Dans ce dernier chapitre, nous proposons de mettre en évidence d'éventuelles atteintes histopathologiques au niveau de l'hépatopancréas et du rein d' *Helix aspersa* exposés à des concentrations croissantes de Spinosad.

2 Matériel et méthodes**2.1 Matériel biologique**

Nous avons travaillé sur des fragments de l'hépatopancréas et du rein, conservé préalablement dans du formol à 10%.

2.2 Méthode

Sur des échantillons de la glande digestive et du rein, nous avons réalisé des coupes histologiques (laboratoire d'Anatomo-Pathologie de l'hôpital Ibn Rochd, Annaba), selon la technique décrite par Martoja et Martoja (1967). L'observation des coupes est effectuée grâce un microscope photonique de type: LEICA DM 1000 (Gx40).

3 Résultats :

3-1 Aspect de l'hépatopancréas après 7 jours de traitement par des concentrations croissantes de le Spinosad :

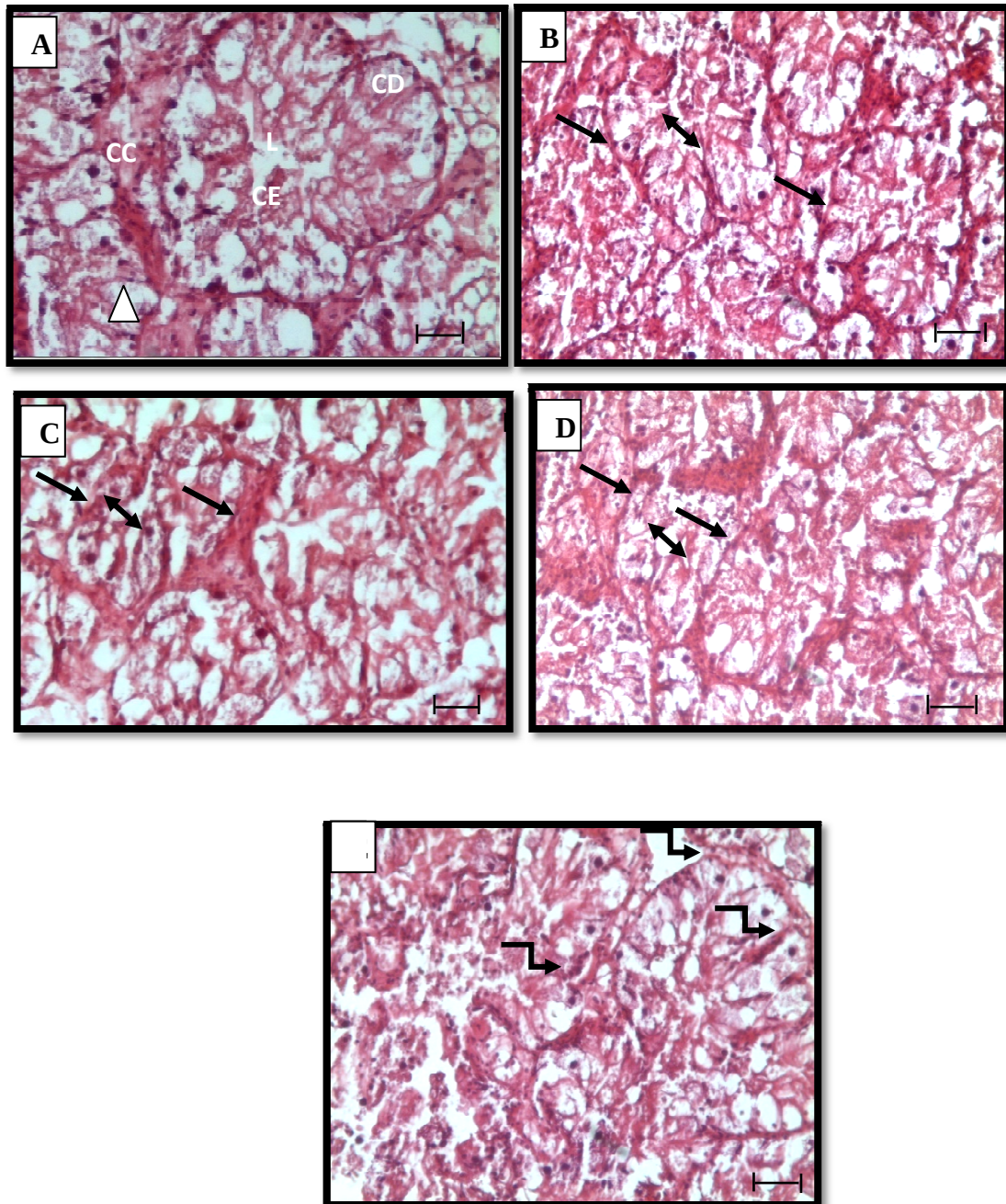


Planche (01) : Coupes histologiques au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et traités par le Spinosad [25µg (B), 50µg (C), 100µg (D) et 150µg(E)], après 7 jours de traitement (Gx40).

L : Lumière de l'acini, CC : Cellule à Calcium, CD : Cellule Digestive CE : Cellule Excrétrice, $\triangle$: Tissus Conjonctif
 $\nwarrow$: Contour irrégulier de l'acini $\longleftrightarrow$: Rétrécissement de la lumière $\rightarrow$: Augmentation du nombre des CE

Les planches **(01)**, **(02)** et **(03)** illustrent les coupes histologiques de l'hépatopancréas chez les escargots traités et témoins.

La planche **(01)** met en évidence l'aspect des coupes histologiques au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins et après 7 jours de traitement. Ainsi, nous remarquons que l'hépatopancréas des témoins, est constitué de lobules formés d'un ensemble d'acini maintenus cohérents par un tissu conjonctif **(A)**. Le tissu de la glande digestive est essentiellement constitué de nombreux tubules digestifs qui ont des formes et des tailles différentes et qui sont séparées par un espace inter tubulaire, occupé par un tissu conjonctif au sein duquel circule l'hémolymphe $\triangle$. Les tubules hépatopacreatiques sont constitués d'un épithélium simple et de cellules qui présentent des morphologies différentes : les cellules digestives **(CD)**, cellule d'excrétion **(CE)** et de cellules à Calcium **(CC)**.

Après 7 jours de traitement, et à la concentration de 25 μ g de Spinosad **(B)**, nous observons des acini avec un contour irrégulier , un rétrécissement de la lumière tubulaire . Ces altérations sont également observées chez les traités aux concentrations 50 et 100 μ g **(C)**, **(D)**, pour la plus forte concentration (150 μ g) les altérations semblent plus importantes, avec l'augmentation du nombre de cellules excrétoires .

3-2 Aspect de l'hépatopancreas après 14 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad :

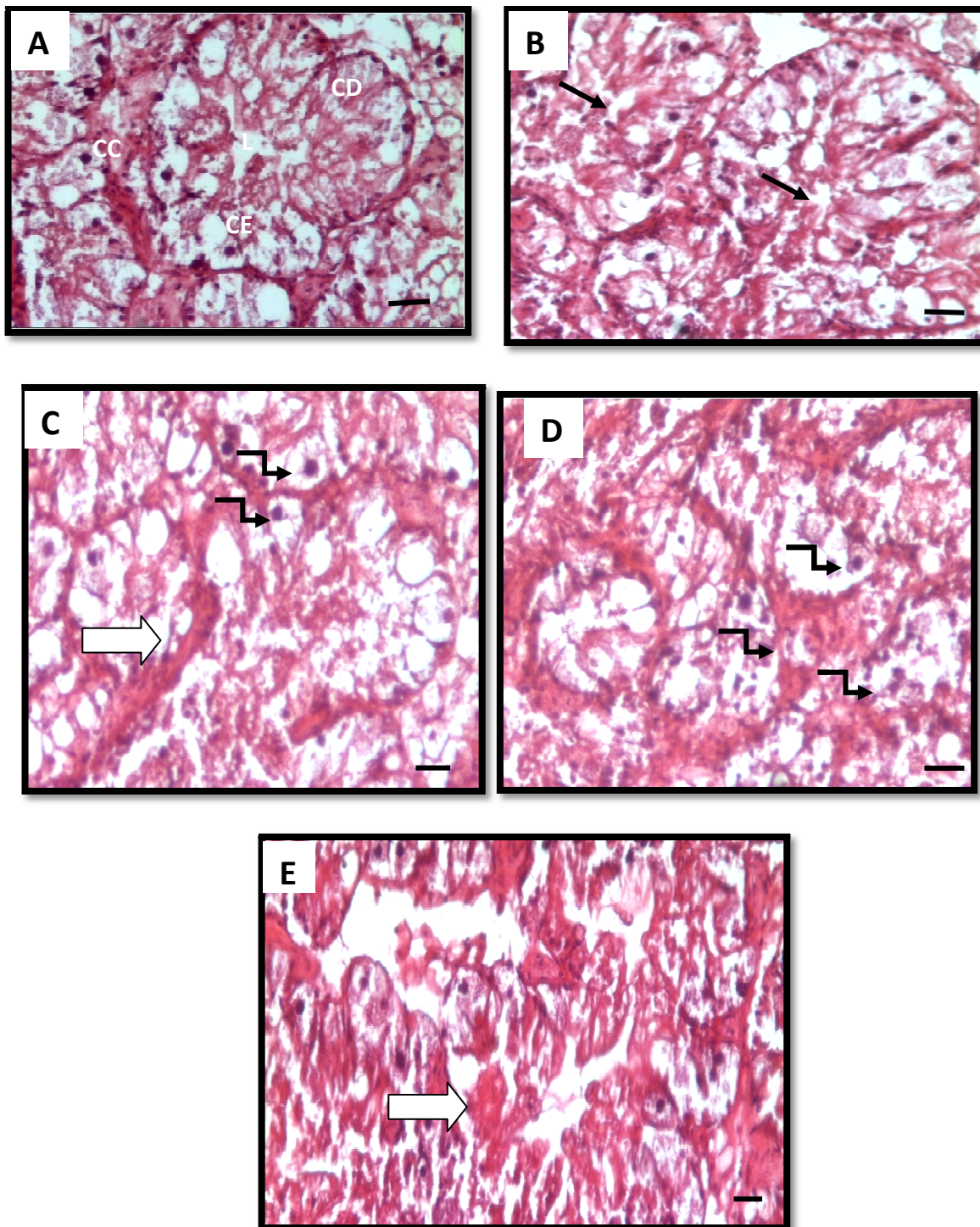


Planche (02) : Coupes histologiques de l'hépatopancreas des escargots témoins (A) et traités par des concentrations croissantes de Spinosad : [25µg (B) ,50µg(C), 100µg (D) et 150µg (E)] après 14 jours de traitement (G×40).

L : Lumière de l'acini, CC : Cellule a Calcium, CD : Cellule Digestive, CE : Cellule Excrétrice

➡ : Aspect inflammatoire

↖ : Rétrécissement de la lumière

↗ : Augmentation du nombre des CE

Après 14 jours de traitement (**Planche 02**), l'examen histologique de l'hépatopanréas des escargots traités met en évidence des altérations qui se manifestent par, pour les concentrations 25 et 50µg (**B**), (**C**) on observe un rétrécissement important de la lumière tubulaire avec apparition d'un nombre plus important des cellules excrétrices . Concernant les plus fortes concentrations, à savoir 100 et 150µg (**D**) (**E**). L'examen histologique montre une dégénérescence très avancée des cellules digestives et à calcium avec un aspect inflammatoire .

3-3 Aspect de l'hépatopancreas après 28 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad :

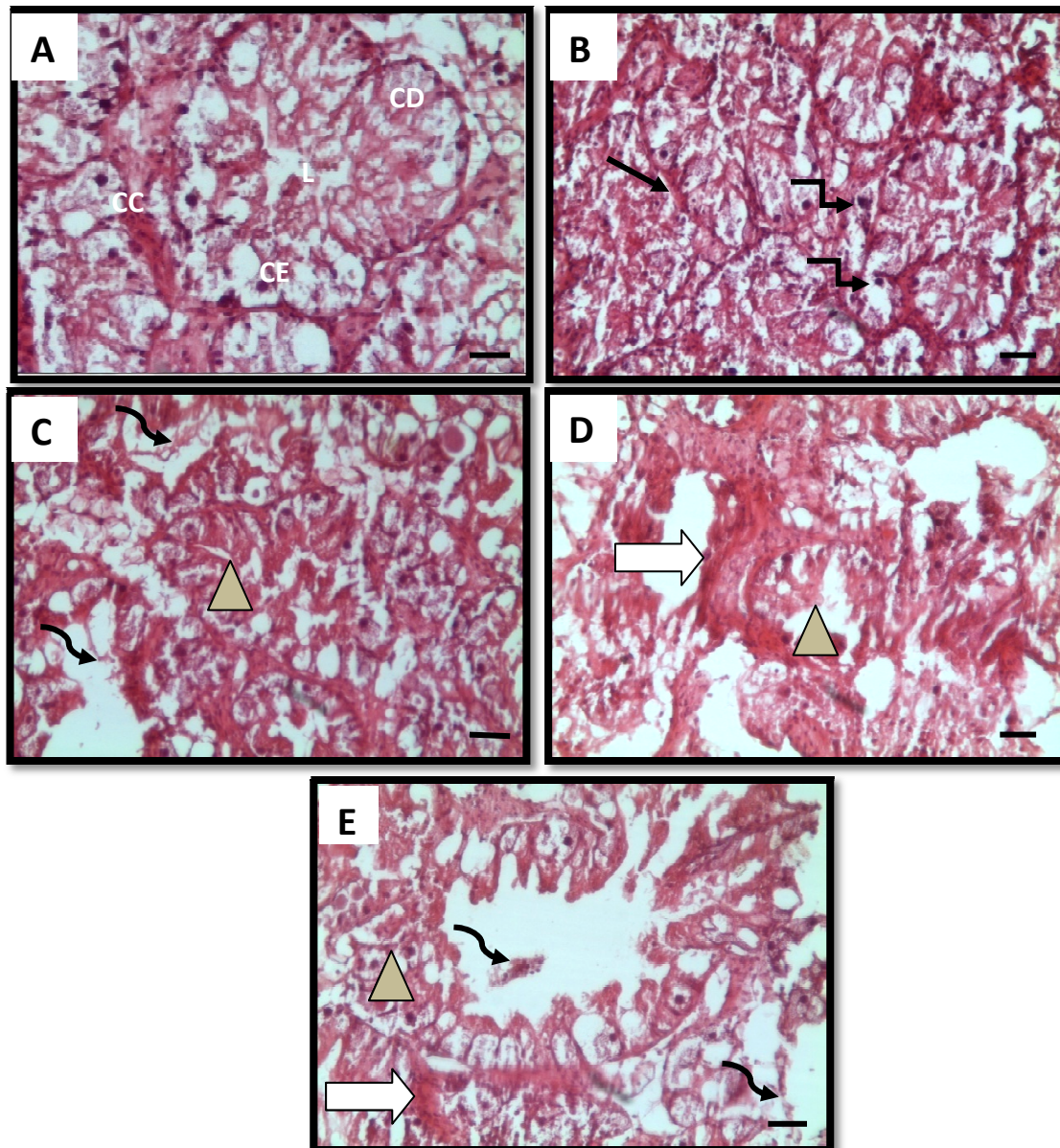


Planche (03) : Coupes histologiques au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et traités par des concentrations croissantes de Spinosad :[25µg (B), 50µg (C), 100µg (D) et 150µg (E)] après 28 jours de traitement (G×40).

L : Lumière de l'acini, CC : Cellule à Calcium, CD : Cellule digestive CE : Cellule Excrétrice

 : Aspect inflammatoire
 : Contour irrégulier de l'acini
 : Rétrécissement de la lumière
 : Libération de fragment
 : Augmentation du nombre des CE
 : Dégénérescence des cellules

La planche **(03)** montre l'aspect de l'hépatopancréas des escargots témoins et après quatre semaines de traitement. Ainsi, à la plus faible concentration de Spinosad **(B)**, à savoir 25 µg le contour des acini paraît irrégulier . Le nombre de cellules excrétrices est plus important par rapport aux témoins . De plus, nous remarquons une dégénérescence partielle de certaines cellules digestives . Des altérations similaires sont observées pour les escargots traités à la concentration 50 µg de Spinosad où nous remarquons également la présence de fragments dans la lumière .

A la concentration, 100 µg de Spinosad (D), l'examen histologique montre une dégénérescence des cellules digestives , des cellules à calcium  et de la membrane basale des tubules digestifs  avec en plus une réduction de la lumière et la présence des fragments tissulaire .

Enfin, le traitement par la plus forte concentration, 150 µg de Spinosad (E), semble provoquer une dégénérescence des tissus conjonctifs et des tubules digestifs .

3-4 Aspect du tissu rénal après 7 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad :

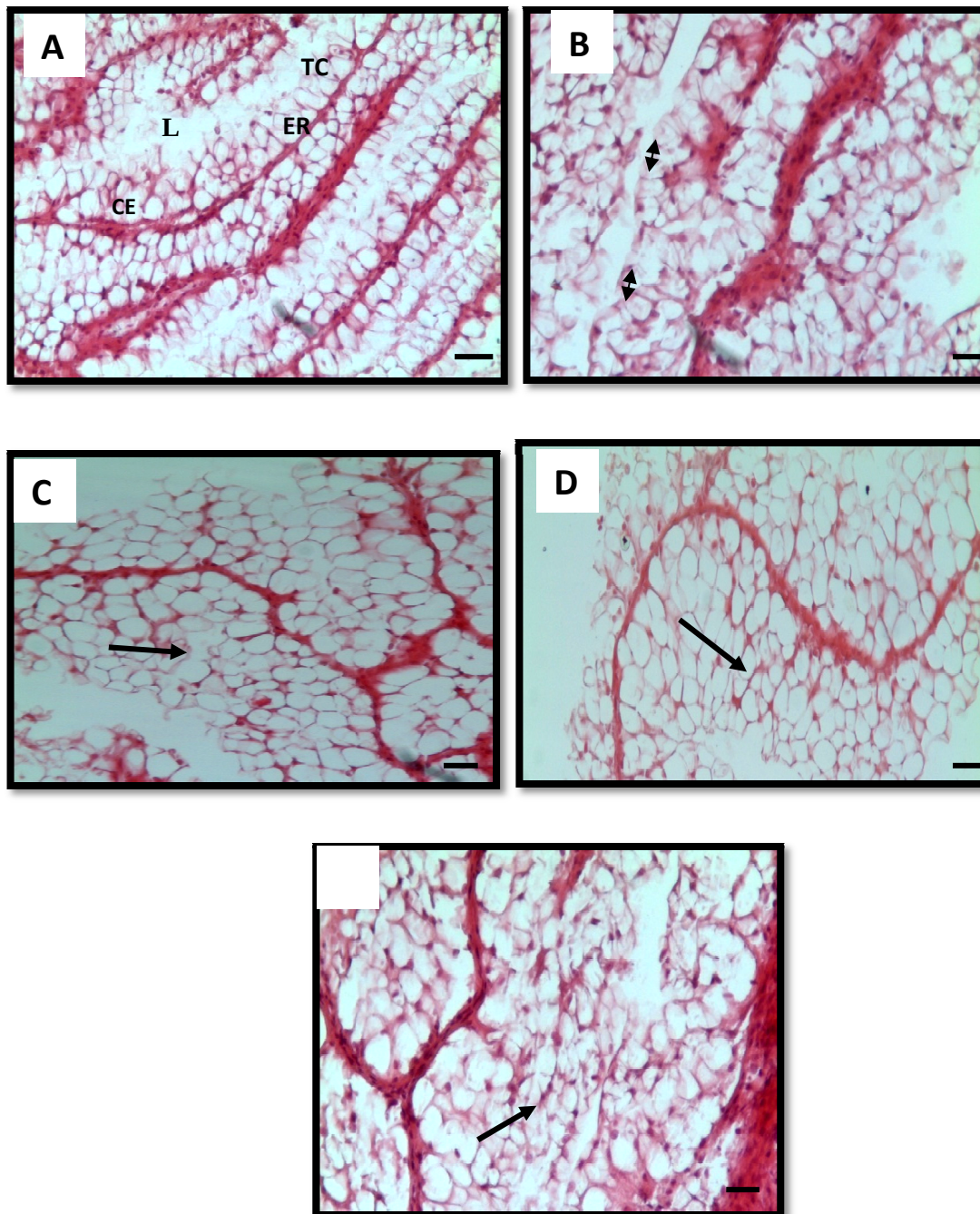


Planche (04): Coupes histologiques du rénal des escargots témoins (A) et traités par des concentrations croissantes de Spinosad : [25µg (B), 50µg(C), 100µg (D) et 150µg(E)] après 7 jours de traitement (G×40).

L : Lumière, ER : Epithélium rénale, TC : Tissu conjonctif, ↗ : Acini irrégulier

↕ : Hyperplasie du TC, CE : Cellules Excrétrice

Les planches **(04), (05) et (06)** illustrent l'aspect du tissu rénal chez les escargots témoins et traités par des concentrations croissantes de Spinosad.

La planche**(04)** illustre l'aspect du tissu rénal des escargots témoins **(A)** et après 7 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad **(B, C, D, E)**

Chez les témoins l'épithélium rénal est uniformément composé de néphrocytes, il s'agit de cellules hautes, qui présentent une polarité nette avec un noyau basal associé à un cytoplasme chromophile, alors que leur région apicale est occupée par une volumineuse vacuole. La membrane porte une bordure en brosse peu épaisse.

L'examen histologique du rein des escargots traités par toutes les concentrations 25µg **(B)**, 50µg **(C)**, 100 µg **(D)** et 150µg **(E)** de Spinosad met en évidence une hyperplasie du tissu conjonctif .

3-5 Aspect du tissu rénal après 14 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad :

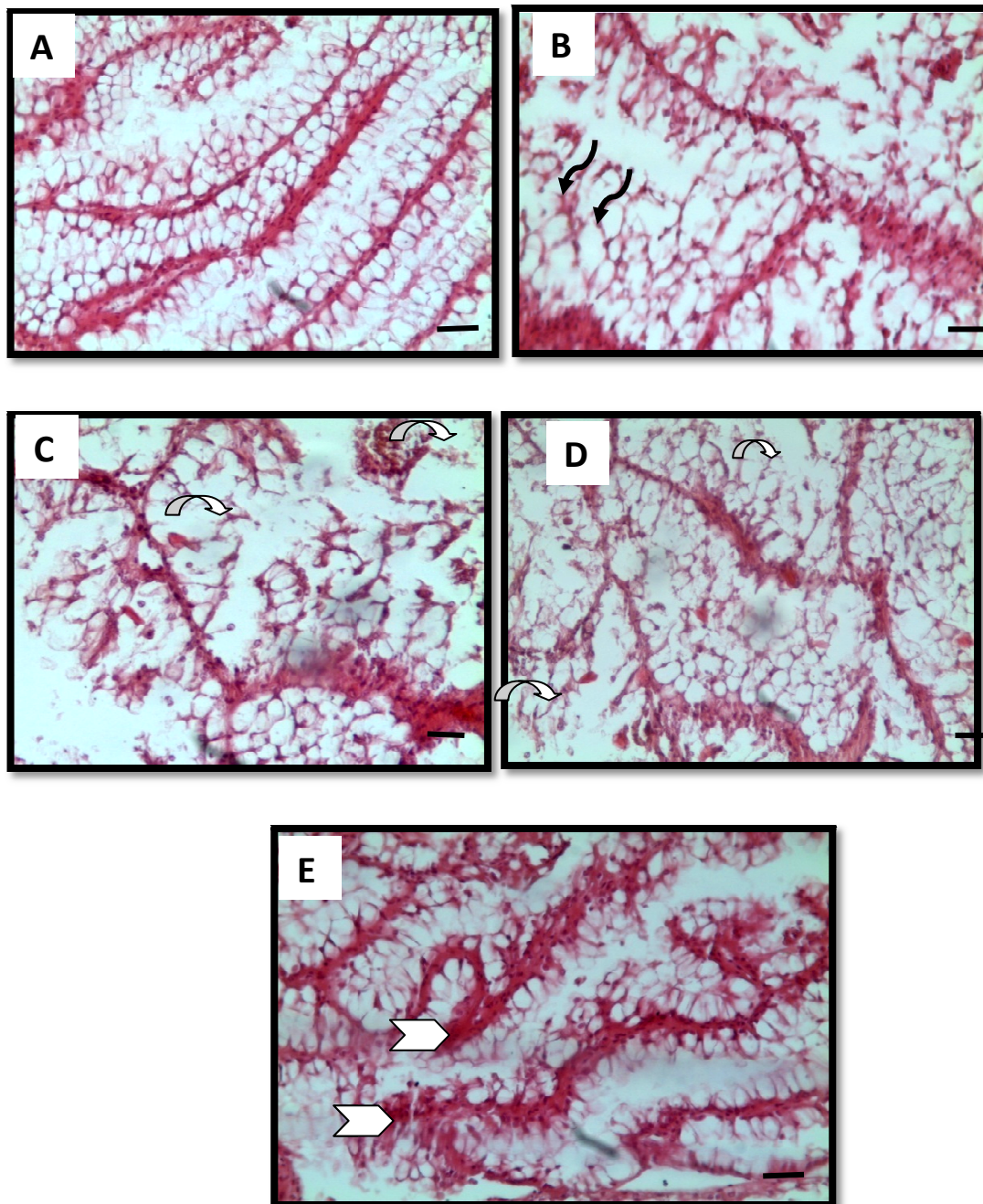


Planche (05): Coupes histologiques au niveau du rein des escargots témoins (A) et traités par des concentrations croissantes de Spinosad : [25µg (B), 50µg(C), 100µg (D) et 150µg(E)] après 14 jours de traitement (G×40).

↘ : Hypertrophie des cellules excrétrices ↪ : Débris cellulaire ≧ : Nécrose cellulaire

3-6 Aspect du tissu rénal après 28 jours de traitement par des concentrations croissantes de Spinosad

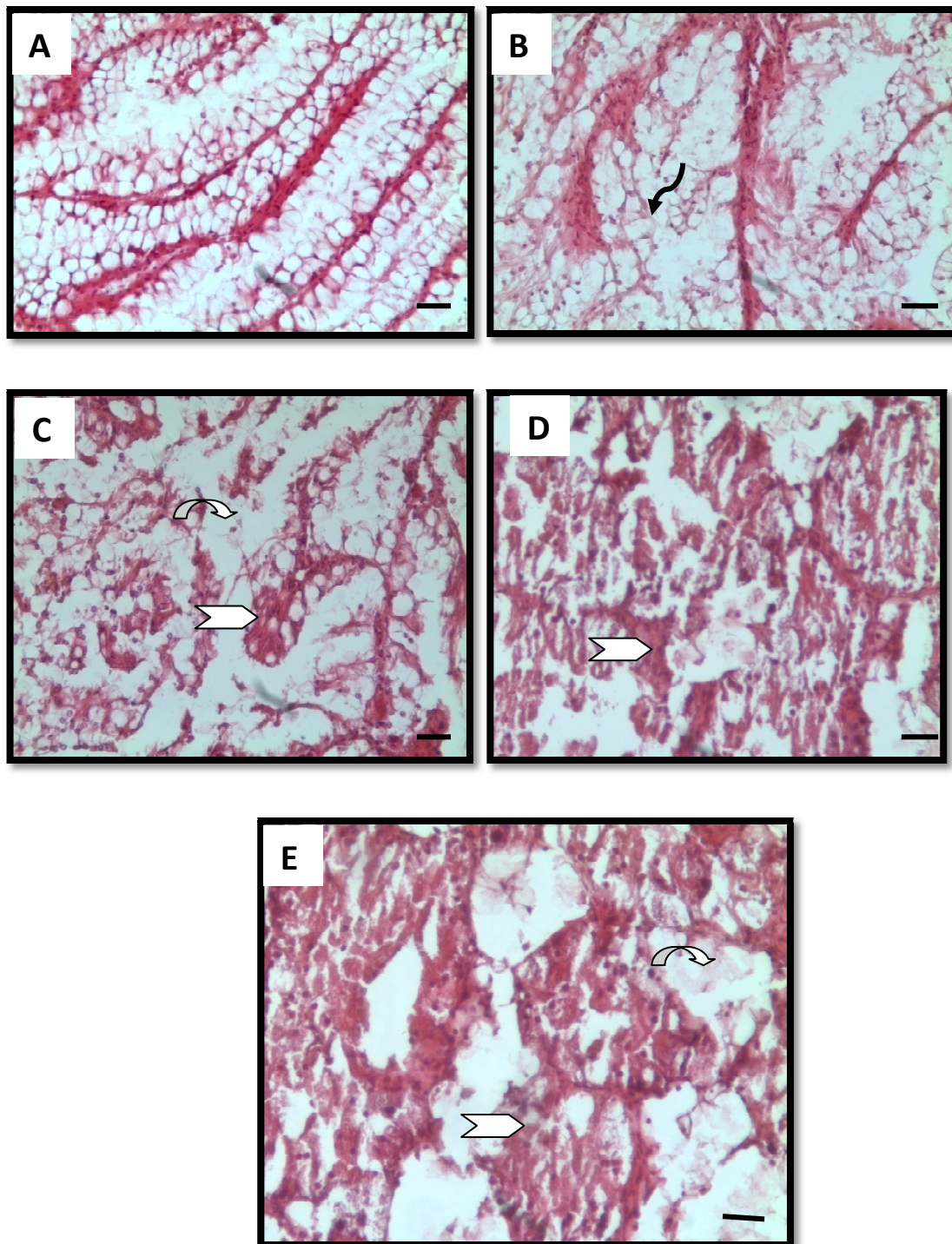


Planche (06) : Coupes histologiques du tissu rénal des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de Spinosad : [25µg (B), 50µg(C), 100µg (D) et 150µg(E)] après 28 jours de traitement (G×40).

↙ : Hypertrophie des cellules excrétrices ↪ : Débris cellulaire ≧ : Nécrose cellulaire

Les planches (05) et (06) mettent en évidence l'aspect du tissu rénal chez les escargots témoins et traités pendant 14 et 28 jours par des concentrations croissantes de Spinosad. Nous constatons une atteinte globale des tissus qui s'est manifestée par une hypertrophie des cellules excrétrices (néphrocyte) , une prolifération du tissu conjonctif et la disparition des membranes cellulaires avec présence des débris  nécroses cellulaires 

4 Discussion

L'examen des effets néfastes ou de leurs conséquences en termes anatomopathologiques peuvent également constituer des outils d'évaluation biologiques très intéressants. Ainsi, l'examen histopathologique de lésions ou d'altérations chez les escargots peut conduire à l'établissement d'un diagnostic environnemental particulièrement pour l'évaluation du risque. Contrairement aux paramètres biochimiques, les paramètres physiologiques et morphologiques constituent des éléments dont l'examen permet de rendre compte de réponses à un niveau d'organisation biologique supérieur. Ces réponses sont en effet consécutives à celles observées aux niveaux d'organisation inférieurs (interactions chimiques et cellulaires) et sont généralement indicatrices de dommages irréversibles (Hinton *et al.*, 1992).

Les insecticides pénètrent dans l'organisme de l'escargot par diverses voies et franchissent plusieurs barrières avant d'atteindre l'hépatopancréas organe de métabolisation des xénobiotiques (Hamed *et al.*, 2007 ;FriasEspericueta *et al.*, 2008) il peuvent être absorbés au niveau de l'hépatopancréas, puis détoxifiés et finalement éliminés par le rein principal organe d'excrétion .

L'hépatopancréas ou glande digestive sécrète des diastases, en particulier une *cytase* capable de digérer la cellulose. Il fonctionne également comme un organe de réserve glycogénique. Certaines cellules contiennent du phosphate de calcium : c'est une réserve de calcaire utilisée pour la croissance de la coquille et la formation de l'épiphragme. La glande accumule également du fer et a aussi une fonction excrétrice.

L'examen histologique de l'hépatopancréas montre que le Spinosad provoque des perturbations structurelles à la plus faible concentration testée, on constate l'apparition d'infiltrats inflammatoires lymphoplasmocytaires dès la plus faible concentration, ceci pourrait être une première réponse biologique à la présence du xénobiotique, comme le stipulent Bouaricha, (2013) qui a travaillé sur le même modèle biologique (*Helix aspersa*) , de

Russell *et al.* (1981) et de Chabicoovsky *et al.* (2004) ; Tadjine, (2007). Nous avons également mis en évidence une déformation des acini et une destruction des cellules digestives, conduisant à une très importante dégénérescence de ces cellules aux plus fortes concentrations en parfait accord avec les travaux de Grara, (2011). En effet, l'exposition aux pesticides peut causer d'importants changements cytologiques au niveau de l'hépatopancréas qui joue un rôle crucial dans la détoxification des polluants (Chabicoovsky *et al.*, 2004, Frias-Espicueta *et al.*, 2008). L'étude histologique a aussi révélé une dégénérescence des tubules digestifs, la fragmentation des cellules digestives et une dégradation de la membrane basale, provoquant une grave détérioration des tissus particulièrement pour les fortes concentrations ce qui explique probablement la diminution du poids de la glande digestive. Ces résultats corroborent ceux de Ait Hamlet *et al.*, (2012) . Selon Hamed *et al.*, (2007) et Radwan *et al.*, (2008) les changements structurels et la perte de cellules digestives essentiellement et d'autres types cellulaires semblent être une réponse générale après une exposition aux pesticides, en particulier aux carbamates pour l'escargot terrestre *E. vermiculata*. La détérioration des cellules digestives incite par conséquent le changement du processus digestif global, provoqué par l'ingestion des différentes classes de polluants chimiques (Valavanidis *et al.*, 2006).

Le rein est situé en position dorsale postérieur, à la surface de la masse viscérale. Il est en relation d'une part avec la cavité péricardique par un orifice réno- péricardique réduit, et d'autre part avec un uretère qui prend en charge l'urine produite.

Notre étude histologique montre que le Spinosad provoque au niveau des reins une hypertrophie des cellules excrétoires et une déformation des acini suivi de nécroses cellulaires, en accord avec les travaux de (Russell *et al.*, 1981 ; Chabicoovsky *et al.*, 2004).

Introduction

Les polluants, après avoir été absorbés, circulent dans le sang (et dans une moindre mesure dans la lymphe) chez les vertébrés et dans l'hémolymph chez les invertébrés.

La majorité des invertébrés terrestres, dont les gastéropodes, absorbent les xénobiotiques par la nourriture (voie digestive), ou par la peau (Marigomez *et al.*, 2002 ; Scheifler *et al.*, 2003). Une fois les différentes barrières biologiques passées (épithélium cutané et digestif), les xénobiotiques circulent dans l'organisme grâce à l'hémolymph et sont distribués entre les différents organes où ils peuvent être stockés. Les hémocytes jouent un rôle important dans le métabolisme des xénobiotiques et leur distribution dans les différents tissus (Cheng et Sullivan., 1984), grâce à leur faculté de phagocytose des corps étrangers (Bulla and Cheng, 1997 ; Marigomez *et al.*, 2002).

Chez les mollusques, le système de défense est assuré essentiellement par les cellules et les molécules véhiculées par l'hémolymph (Allam et Paillard, 1998; Paillard *et al.*, 2004a). Ces fluides contiennent des cellules, les hémocytes et une panoplie de facteurs humoraux (Roch, 1999 ; Chu, 2000 ; Bachère *et al.*, 2004). L'immunité des mollusques est une immunité innée, sans phénomène de mémoire.

Les hémocytes sont les cellules actives du système immunitaire. Cellules circulantes, elles peuvent s'infiltrer dans les tissus pour rejoindre le site d'infection, mais sont également impliquées, chez les mollusques, dans de nombreuses fonctions comme la digestion, le transport de nutriments, la réparation tissulaire et coquillière, et les réactions de défense, (Cheng, 1996 ; Auffret, 2003).

Contrairement aux vertébrés qui possèdent un système circulatoire fermé, les mollusques possèdent un système circulatoire semi-ouvert, comprenant un cœur et des vaisseaux. Les hémocytes sont localisés, dans le compartiment circulatoire (vaisseaux et grands sinus des muscles), mais également dans les tissus. Chez les invertébrés, les hémocytes proviennent, comme chez les vertébrés, de cellules souches. Leur maturation fait apparaître deux types cellulaires : les hyalinocytes et les granulocytes (Balouet et Poder, 1979). Cependant, lors de cette étape, des colorations intermédiaires ont fait apparaître des types cellulaires morphologiques intermédiaires. Figure (13) (Cheng, 1981)

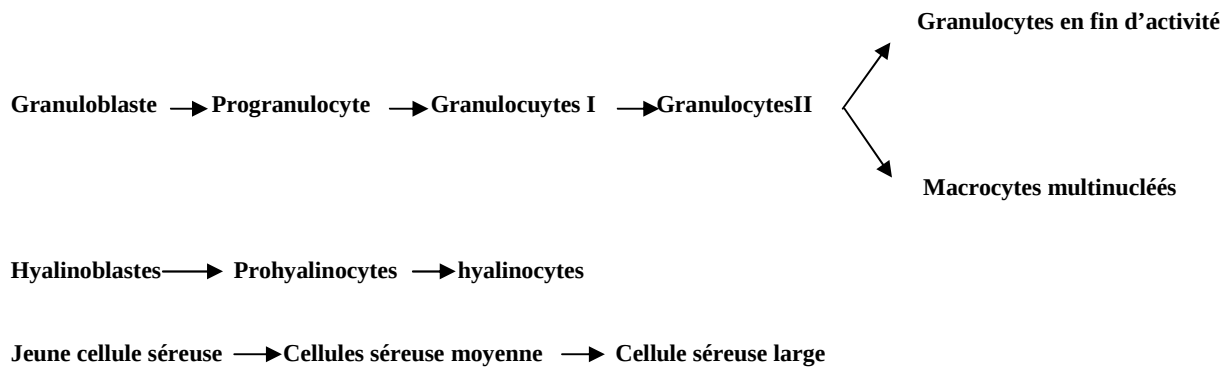


Figure (13) : Une lignée hypothétique des hémocytes (Cheng, 1981).

Ces types cellulaires, regroupés sous le terme d'hémocytes, jouent des rôles différents dans l'organisme.

- Cicatrisation

Les cellules établissent un contact entre elles grâce à leur filopodes. Ces interconnexions vont alors se raccourcir et s'épaissir et entraîner le regroupement des cellules. L'agrégation des hémocytes est intimement impliquée dans les processus de cicatrisation. Les agrégats d'hémocytes vont délimiter et boucher les blessures pour arrêter l'hémorragie. (Champeau, 2005)

Les hémocytes agrégés vont former un clou hémostatique pour délimiter la surface atteinte : la cicatrisation commence à l'intérieur de la lésion pour remonter à la surface avec un remplacement des cellules, qui sont fusiformes et différenciées par rapport aux hémocytes agrégés. Les hémocytes qui ont une activité de phagocytose peuvent s'infiltrer et phagocyter les débris de cellules nécrotiques.

- Réparation de la coquille

La régénération de la coquille des mollusques implique :

- l'initiation d'une stimulation ou de stimuli résultant d'une blessure (ablation expérimentale d'une portion de la coquille),
- la mobilisation de calcium et d'autres substances depuis différentes régions de l'organisme,
- le transport du calcium et d'autres matériaux dans la zone de réparation,

- le dépôt localisé de la matrice organique et du carbonate de calcium.

Le rôle des hémocytes dans cette série d'événements est le transport de calcium et des protéines. (Champeau, 2005)

- Transport et digestion des nutriments

Le rôle des hémocytes dans le transport et la digestion des nutriments est intimement associée à la défense interne. Les hémocytes participent à la défense de l'organisme par phagocytose et lyse bactérienne mais aussi à la régulation métabolique par stockage et dégradation du glycogène, aux processus de détoxification par accumulation d'éléments minéraux dans leurs lysosomes. L'immobilisation des molécules xénobiotiques se fait aussi dans la fraction lysosomale des hémocytes. Aussi l'étude de l'haemocoel est-elle importante dans la mesure où il peut montrer une réponse cellulaire aux polluants, laquelle se présente comme un signal d'alerte précoce, indiquant que l'environnement est en train de subir une détérioration Champeau, (2005)

2 Matériel et méthodes :

2-1 matériel biologique :

- prélèvement de l'hémolymph :

Après la fin du traitement par le Spinosad, la technique de prélèvement de l'hémolymph est celle de Letellier, (2010) qui consiste à pratiquer une fenêtre dans la coquille des escargots, préalablement nettoyée à l'eau distillée, au niveau de l'emplacement du cœur, L'hémolymph est ensuite prélevée à l'aide d'une pipette pasteur.

2-2 Méthodes

2-2-1 Dosage des protéines au niveau de l'hémolymph :

Le volume prélevé de l'hémolymph est centrifugé à (15000 rpm/10 min), Liberato, *et al.*, (2003). Après récupération du culot il est soniqué, les protéines sont quantifiées selon la méthode de Bradford (1976).

2-2-2 Dosage du glutathion (GSH) au niveau de l'hémolymph :

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié sur un volume d'hémolymph centrifugé à 15000 rpm/10 min puis soniqué. La méthode de dosage est celle de Weckberker et Cory (1988).

-La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos.

3 Résultats

3-1 Effet du Spinosad sur le taux des protéines hémolymphatiques totales :

La figure (14) représente les variations du taux de protéines totales au niveau de l'hémolymph des escargots témoins et traités aux concentrations croissantes de Spinosad.

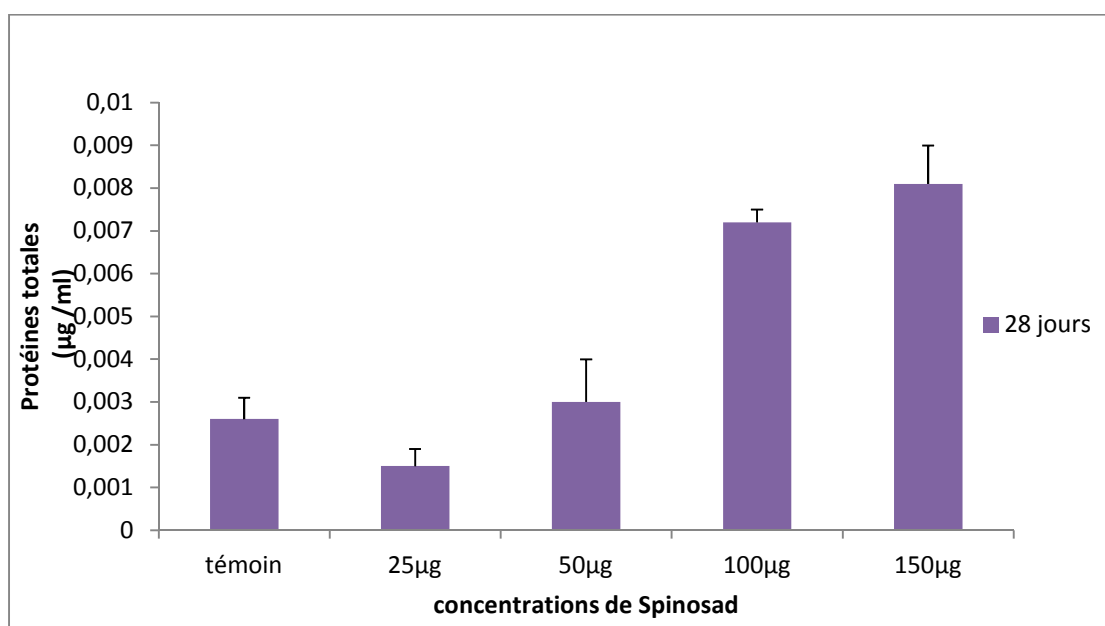
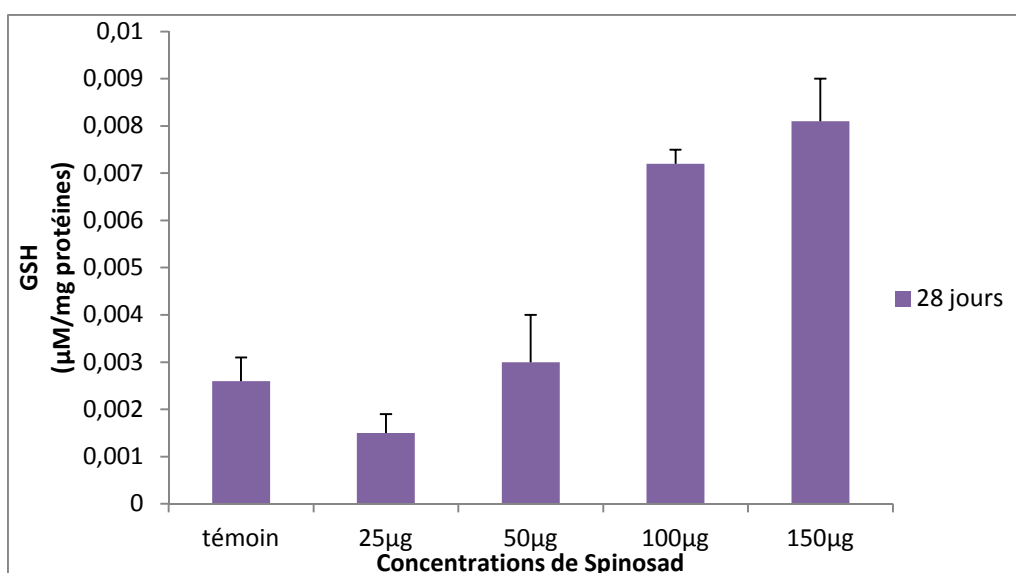


Figure (14) : Variation du taux des protéines totales au niveau de l'hémolymph des escargots après 28 d'exposition à des concentrations croissantes de Spinosad

Ainsi, nous constatons que les taux de protéines totales augmente d'une manière dose dépendante et hautement significative après 28 jours de mise en contact avec le Spinosad. En effet le pool protéique est trois fois plus élevé à la plus forte concentration 150 μ g de Spinosad (0,045 μ g/ml) par rapport aux témoins dont le taux ne dépasse pas 0,015 μ g/ml.

3-2 Effet du Spinosad sur l'évolution du taux de GSH au niveau de l'hémolymph:

La figure (15) représente les variations du taux de GSH au niveau de l'hémolymph des escargots témoins et traités aux concentrations croissantes de Spinosad.



Figure(15) : Variation du taux de GSH au niveau de l'hémolymph des escargots après 28 jours d'exposition à des concentrations croissantes de Spinosad

Nous constatons une augmentation dose- dépendante et très significative du taux de GSH particulièrement aux plus fortes concentrations de Spinosad autrement dit à partir de 50 μ g, en effet à la concentration de 150 μ g de Spinosad, les teneurs en GSH sont de 0,0081 (μ M/mg protéines) environ trois fois plus élevé par rapport aux témoins.

4 Discussion :

Le but de cette partie est de comprendre comment des organismes comme les escargots répondent à une contamination chimique de leur environnement et qu'elle est le rôle de l'hémolymph dans leur mécanisme de défense. La production d'espèces réactives de l'oxygène étant considérée comme un facteur clé de la réponse adaptative ou de la réaction à un événement toxique, il s'agit de savoir si celle-ci est caractérisée par une augmentation des défenses antioxydantes chez les escargots et quel est le rôle des protéines hémolymphatiques . Nos résultats mettent en évidence une augmentation du taux de protéines hémolymphatiques totales chez les escargots traités par rapport aux témoins, or il est connu que l'hémolymph, grâce aux hémocytes, est responsable du transport des xénobiotiques depuis l'organe d'entrée vers la glande digestive , le rein ou les autres tissus où auront lieu la détoxification ou l'accumulation. Le transfert des xénobiotiques, au travers des membranes plasmiques cellulaires, s'effectue majoritairement par diffusion passive ou par des mécanismes nécessitant de l'énergie comme le transport par des protéines membranaires, spécifiques ou non, ou par endocytose des molécules (Marigomez *et al.*, 2002). D'un autre côté, il est connu que chez les mammifères, les protéines plasmatiques ont pour rôle principal de fixer les xénobiotiques présents dans le sang, ainsi la fraction liée étant considérée comme une forme de stockage. Lorsque la concentration de xénobiotiques est élevée, la forme libre devient importante et devient ainsi toxique. Par souci de simplification, la fraction non liée des substances actives et produits de dégradation est associée à la fraction "biodisponible" pour les organismes du sol à l'inverse des résidus liés qui sont considérés comme "immobilisés" aux sens physico-chimique et biologique du terme (Lanno *et al.*, 2004). En réalité, certaines substances peuvent être remobilisées chez des organismes tels que les vers de terre, lors de leur passage dans le tractus digestif (Knacker *et al.*, 2003), ce qui réintègre de fait ces résidus liés dans la fraction potentiellement biodisponible. **Ainsi nos résultats corroborent ces données et confirment l'augmentation des protéines par l'augmentation de la fraction toxicodisponible du Spinosad.**

Le suivi des activités enzymatiques antioxydantes est une étape supplémentaire pour étudier le statut antioxydant d'une espèce, même si la capacité antioxydante non enzymatique représente 70% de la capacité antioxydante totale (Regoli et Winston, 1999). De même, le glutathion étant au cœur des défenses antioxydantes, il représente un biomarqueur de choix dans l'analyse du stress oxydant (Doyotte *et al.*, 1997).

Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales, c'est le thiol cellulaire le plus abondant, impliqué dans le métabolisme et les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, y compris les espèces réactives de l'oxygène et des métaux lourds. Dans notre travail nous avons mis en évidence une augmentation du taux de GSH au niveau de l'hémolymphe des escargots traités par rapport au témoin. Le métabolisme oxydatif constitue le second mécanisme mis en évidence dans le processus de phagocytose par les hémocytes. Chez les mammifères les hématies sont pourvues d'un système de défense cellulaire et qui n'est rien d'autre que le GSH. Nos résultats nous ont permis de confirmer à la fois deux phénomènes :

-Dans un premier temps nous avons mis en évidence la présence de GSH au niveau de l'Hémolymphe des escargots.

-Dans un second lieu nous avons prouvé le rôle protecteur de ce tripeptide à travers la mise en évidence d'une augmentation dose-dépendante du taux de GSH en présence du Spinosad.

En présence d'un xénobiotique, ces cellules produisent une série de réactions qui vont libérer des espèces réactives de l'azote (Tafalla *et al.*, 2003) et de l'oxygène (Gómez-Mendikute *et al.*, 2002). Lors d'une stimulation membranaire, il y a une augmentation de la consommation d'oxygène (flambée respiratoire). L'oxygène va être réduit en anion superoxyde par l'activité de la NADPH-oxydase membranaire. Il en résulte une production de métabolites actifs de l'oxygène tels que le radical hydroxyle, l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène, lorsque ces radicaux toxiques atteignent un certain seuil, ils sont à l'origine, de l'induction des systèmes de défenses antioxydantes dont le GSH est partie intégrante. (Tadjine, 2007)

Cette étude vise à évaluer la toxicité d'un biopesticide nouvellement introduit en Algérie, le Spinosad, chez une espèce bioindicatrice majeure de la pollution environnementale l'escargot *Helix aspersa*

Dans un premier temps il apparaît clairement que l'espèce *Helix aspersa* est un excellent bio-indicateur de la dégradation du milieu, elle est particulièrement sensible à une pollution par les pesticides, cette sensibilité se manifeste par une perturbation dans le développement des paramètres physiologiques (diminution du poids des escargots, diminution du poids des organes, diminution du poids des coquille). D'un autre côté, nous avons mis en évidence la perturbation du métabolisme globale à travers l'augmentation significative du taux de protéines totales

En ce qui concerne l'étude des biomarqueurs d'exposition nous avons mis en évidence une diminution significative du taux du glutathion parallèlement à une induction de la GST, et de l'activité Catalase, de même qu'une augmentation significative du taux de MDA confirmant d'un côté la toxicité du biopesticide et de l'autre le déclenchement des systèmes de défense de l'organisme.

De plus, nous avons mis en évidence une activité neurotoxique du pesticide à travers l'inhibition de l'activité AChE.

L'étude histopathologique a confirmé cette sensibilité de l'espèce vis-à-vis de l'insecticide à travers des atteintes tissulaires observées particulièrement au niveau de l'hépatopancréas et du rein.

La dernière partie de notre travail concerne le rôle de l'hémolymphe dans la distribution du xénobiotique et la répercussion de cette activité sur les hémocytes. Nos résultats ont mis en évidence une augmentation du taux de GSH et des protéines totales au niveau de ces derniers.

Ainsi, le Spinosad est toxique pour les escargots et cette toxicité induit des perturbations physiologiques et métaboliques. Il apparaît donc que même les pesticides d'origine biologique semblent être aussi néfastes pour l'écosystème que les pesticides de synthèse.

Perspectives

En vue de compléter notre travail il serait intéressant :

- De développer les dosages des biomarqueurs (GPX, LDH, SOD).
- D'étudier la toxicité de Spinosad sur les œufs des escargots et des juvéniles.
- D'approfondir les essais au niveau de l'hémolymph des escargots.
- De réaliser une étude sur les mitochondries de la glande digestive.
- De caractériser quantitativement et qualitativement le stress oxydatif induit par le xénobiotique.

Adema, C. M., Harris, R. A., Van deutekom-mulder, E. C., 1992. A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59:24-32.

Ademe., 2004. Polluants Organiques Persistants.
<http://www.ademe.fr/entreprises/polluants/polluants/polluant.asp?ID=49>.

Ait Hamlet, S., Bensoltane, S., Djekoun, M., Yassi, F., et Berrebbah H., 2012. Histological changes and biochemical parameters in the hepatopancreas of terrestrial gastropod *Helix aspersa* as biomarker of neonicotinoid insecticide exposure. *African Journal of Biotechnology*, 11 (96):16277-16283.

Allam, B., Paillard, C., 1998. "Defense factors in clam extrapallial fluids." *Diseases of Aquatic Organisms* 33: 123-128.

Amiard, J. C., Métayer, C., Baud, J. P., Ribeyre, F., 1994. Influence of some ecological and biological factors on metal bio-accumulation in young oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg) during their spat rearing. *Water Res*, 28, 219-231.

Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J-C., García-Río, L., 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources." *Agriculture Ecosystems & Environment* 123(4): 247-260.

ARLA., 2003. Registered Microbials and Pheromones in Canada.0-6.

Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research*, 54 (3-5): 585-589.

Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. "Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*." *Immunological Reviews* 198: 149-68.

Balouet, G., Poder, M., 1979. A proposal for classification of normal and neoplastic types of blood cells in molluscs. in "*Advances in comparative leukemia research*". Yohn, D.S., Lapin, B. Blakeslee, J. (Eds.). Amsterdam, Elsevier. 568 pages.

Barker, G. M., 2004. Natural enemies of terrestrial mollusks. Wallingford, UK, CABI Publishing 644 pages.

Barker, G. M., 2001. The Biology of terrestrial molluscs. Wallingford U.K, C.A.B. International.

Beeby, A., Richmond, L., 2002. "Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution." *Ecological Indicators* 1(4): 261-270.

Benbouzib, H., 2012 : Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliés. Thèse de doctorat de l'université d'Annaba. p 87.

Beulke, S., Malkomes, H. M., 2001. Effects of the herbicides metazachlor and dinoterb on the soil microflora and the degradation and sorption of metazachlor under different environmental conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 33:467–471.

Bibic, A., Drobne, D., Strus, J., and Byrne, A. R., 1997. "Assimilation of zinc by *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) exposed to zinc", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 814- 821.

Bigot, A., 2009. Identification et étude de l'expression de gènes de détoxification chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea* : Approches en laboratoire et en milieu naturel. Thèse de Doctorat de l'université Paul Verlaine (METZ). 138 pages.

Bocquené, G., Roig, A., Fournier, D., 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase.

Boucenna, M., 2010. Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les aciéries 1 et 2 du complexe sidérurgique d'EL-Hadjar sur un modèle bioaccumulateur *Helix aspersa*. Mémoire de magister, Université Badji Mokhtar, Annaba. 74 p.

Bouaricha, H. Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium sp.*). Thèse de doctorat de l'université de Annaba 131 pages.

Bradford, M. M. A., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

Braunbeck, T., Volkl, A., 1993. Toxicant-induced cytological alterations in fish liver as biomarkers of environmental pollution, A case study on hepatocellular effects of dinitro cresol in golden ide (*Leuciscus idus melanotus*) . in: Braunbeck T, Hanke W, Segner H *Fish ecotoxicology and ecophysiology* VCH Weinheim pages, 55-80.

Bulla, L. A., Cheng, T. C., 1997. Biochemical and ultrastructural evidence for the double role of phagocytosis in molluscs: defense and nutrition. *Comparative pathobiology*, 3: 21-30.

Canesi, L. A., Viarengo, C., Leonzio, M., Filippelli, G., Gallo., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, 46: 67-76

Carpenter, D. O., Swann, J. W., Yarowsky, P. J., 1977. Effect of curare on responses to different putative transmitters in *Aplysia* neurons. *J. Neurobiol.*, 8, (2), 119-132.

Chabicoovsky, M., Klepal, W., Dallinger, R., 2004. Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates programmed cell death and metallothionein overload. *Environ.Toxicol.and Chem.* 23: 648-655.

Champeau, O., 2005 . biomarqueurs d'effets chez c. fluminea : du développement en laboratoire à l'application en mesocosme. Thèse de doctorat. L'université bordeaux 1. 288 pages.

Cheng, T. C., Sullivan, J. T., 1984. Effets of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research*, **14**: 305-315.

Cheng, T. C., 1996. Bivalves. in "*Invertebrates blood cells - 1 - General aspects, animals without true circulatory systems to cephalopods*". Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. (Eds.). London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, Academic Press. **1**: 233-300.

Chu, F. L. E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. Recent Advances in Marine bivalves. *American Fish Society Special Publication*, **18**: 178-188.

Coeurdassier, M., 2001. Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnia stagnalis* et *Lymnia palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques .Thèse de doctorat, Université de Franche Comté, France.281 pages.

Coeurdassier, M., M. Saint-Denis, A. Gomot-de Vaufleury, D. Ribera, P. M. Badot, 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, .1951-1957.

Dagnelie, P., 1999. Statistiques théoriques et appliquées.Tome2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles.Univ De Boeck et Larcier, 659 pages.

Dallinger, R., Berger, B., Triebkorn-Köhler, R., Köhler, H., 2001. Soil biology and ecotoxicology. The biology of terrestrial molluscs. Barker GM. Oxon, CABI: 489- 525.

Doyotte, A., C. Cossu, M. C. Jacquin, M. Babut, P. Vasseur., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gill and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic toxicology*, **39**: 93-110.

Dow AgroSciences., 2003a. Success 480 SC Naturalyte.
http://www.dowagro.com/ca/labels/product_results.asp

Dow AgroSciences. 2003b. Conserve 480 SC Naturalyte.
<http://www.dowagro.com/turf/prod/spinb.htm>

- Draper, H. H., Hadley, M., 199** .Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Meth. Enzymol, 186, 241-431.
- Druart, C., 2011.** Effets des pesticides de la vigne sur le cycle biologique de l'escargot dans divers contextes d'exposition .Thèse de doctorat l'Université de Franche-Comté.24, 25 pages.
- Echaubard, M., 1995.** Les animaux comme indicateurs biologique de pollution .ANPP.Colloque international marqueurs biologique de pollution/biological Markers of pollution .PSV Imprimerie, Cretiel, France, 335 -338.
- Eeva, T., Rainio, K ., Suominen, O ., 2010.** "Effects of pollution on land snail abundance, size and diversity as resources for pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*." Science of the Total Environment 408(19): 4165-4169.
- El-Gendy, K. S., Radwan, M. A., Gad, A. F., 2009.** In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. Chemosphere, 77: 339-344.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Featherstone, R. M., 1961.** A new and rapid colorimetricdetermination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol, 7, 88.
- El-Wakil, H. B., Attia, A. M., 1999.** Effect of selected insecticides on terrestrial snails *Eobania vermiculata* (Müller) and *Theba pisana* (Müller) with respect to some morphological changes in Egypt. J. Environ. Sci. Health, B 34, 47-60.
- EPA ., 2005 .** Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/>.
- Farombi, E., 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, Int. J. Environ. Res. Public Health, 4(2): 158-165.
- Fränzle, O ., 2006.** "Complex bioindication and environmental stress assessment." Ecological Indicators 6(1): 114-136.
- Frias-Espericueta, M. G., Abad-Rosales, S., Aidée, C.N.V., Isidro-Osuna, L., Pàez-Osuna, F., Olvera, R. L., Voltolina, D., 2008.** Histological effects of a combination of heavy metals on pacific white shrimp *Litopenaeusvannamei* juveniles. Aquat. Toxicol. 89:152-157.
- Gagnaire, B., 2005.** Etude des effets de polluants sur les parameters hemocytaires de l'huitre creuse, *Crassostrea gigas* – Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Thèse de doctorat. L'université de la rochelle.412 pages.
- Galloway, T. S., Depledge, M. H., 2001.** Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. Ecotoxicology 10: 5 23

- Gernhofer, M., Pawet, M., Schramm, M., Müller, E. and Triebkorn, R., 2001.** Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *J. Aquatic Ecosystem, Stress and Recovery*. 8: 241-260.
- Gimbert, F., de Vaufléury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Badot, P. M., 2006.** Modelling chronic exposure to contaminated soil : a toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environnement International* 32,866-875.
- Gómez-Mendikute, A., Etxeberria, A., Olabarrieta, I., Cajaraville, M. P., 2002.** Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. *Marine Environmental Research*, 54(3-5): 431-436.
- Gomot-de Vaufléury, A., Bispo, A., 2000.** Method for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. 1. Sublethal effects on growth. *Environ. Sci. Technol*, 34, 1865-1870.
- Gomot-de Vaufléury, A., Kerhoas, I., 2000.** Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* ,64,434-442.
- Grara , N., Berrebbah, H., Rouabhi, R., Atilia, A et Djebbar, M .R., 2009.** Impact of pollution by industrial metallic Dust on Bio-Accumulator Organism *Helix aspersa*. *Global Veterinaria*, 3(4) ,276-280.
- Grara, N., 2011.** Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur(gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux .Thèse de doctorat de l'université de Annaba.120 ,91 pages.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., 1974.** Glutathion-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249 (22), 7130-7139.
- Hamed, S. S., Abdelmeguid, N. E., Essawy, A. E., Radwan, M. A., Hegazy, A. E., 2007.** Histological and Ultrastructural Changes Induced by Two Carbamate Molluscides on the digestive Gland of *Eobania vermiculata*. *J. Biol. Sci.* 7(6):1017-1037.
- Hellawell, J. M., 1986.** Biological indicators of freshwater pollution and environmental management .Elsevier Applied publishers, London and New –York, 530 pages.
- Hinton, D. E., Bauman, P. C., Gardner, G. R., Hawkins, W. E., Hendricks, J. D., Murchelano, R. A., Okihira, M. S; 1992.** Histopathologic biomarkers. In: Huggett, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M. Jr, Bergman, H. L. (eds.) *Biomarkers: bio-chemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publ., Boca Raton, 155-209
- INRA., 2005.** AGRITOX - Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques. <http://www.inra.fr/agritox>.

Jawich, D., 2006. Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire. Thèse de doctorat, INP Toulouse.

Kerney, M., Cameron, R., Bertrand, A., 2006. A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, Delachaux et Niestlé SA.

Kirst, H. A., Michel, K. H., Mynderse, J. S., Chio, E. H Yao, R. C., Nakasukasa, W. M., Boeck, L. D., Occolowitz, J. L., Paschal, J. W., 1992. Discovery isolation and structure elucidation of a family of structurally unique, fermentation-derived tetracyclic macrolides. Synth. Chem. Agrochem.III,504: 214–225.

Knacker, T., B. Förster, J. Römbke, and G. K. Frampton. 2003. Assessing the effects of plant protection products on organic matter breakdown in arable fields–litter decomposition test systems. Soil Biology and Biochemistry 35:1269-1287.

Köhler, H. R., Lazzara, R., Dittbrenner, N., Capowiez, Y., Mazzia, C., & Triebkorn, R., 2009. Snail phenotypic variation and stress proteins: do different heat response strategies contribute to Waddington's widget in field populations? Journal of Experimental Zoology B Molecular and Developmental Evolution, 312, 136-147.

Labrot, F., Ribera, D., Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. Biomarkers, 1, 21-28.

Lagadic, L., Amiard, J. C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In "Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects Fondamentaux". Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.- C.Ramade, F. (Eds.). Paris, Masson: 1-9.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C. et Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie – aspects fondamentaux, Masson, Paris, 419 pages.

Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. Ecotoxicol Environ Saf 57:39–47

Larink, O., Sommer, R. 2002. Influence of coated seeds on soil organisms tested with bait lamina. European Journal of Soil Biology, 38, 287-290.

Laskowski, R., Hopkin, P., 1995 . Accumulation of Zn, Cu, Pb, and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*) : Implication for Predators . Environmental Pollution, 91, 289-297.

Letellier, C., 2010. Capacité antioxydant variations intraspécifiques antioxydante chez les hélicidés et interspécifiques, rapport de stage, université de Rennes.

- Liberato, C., Di cristo, C., De luise, G., Di cosmo, A., Paolucci, M. 2003.** Preliminary evidence of an oxidative stress system in freshwater crayfish *austropotamobius pallipes italicus*. *Bull. Fr. Pêche Piscic*, 370-371: 151-156.
- Livingston, D. R., 1991.** Towards a specific index of impact by organic pollution for marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C : 151-155
- Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E. et Giamberini, L., 2002.** Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*, 56(5): 358-392.
- Marteil, L., 1974.** La conchyliculture française. Première partie : Le milieu naturel et ses variations. *Revue de Travail de l'Institut des Pêches Maritimes* 38: 217-337.
- Martoja, R., Martoja, M., 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, 347.
- Masaya, M., Yoshinobu, H., Ai, Y., Maki, K. and Yasuo, O., 2002.** Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury. *Journal of Phycology*, 38(5) : 983.
- Mohammadkhani, N., Heidari, R., 2008.** Water stress induced by polyethylene glycol 6000 and sodium chloride in two corn cultivars. *Pak. J. Biol. Sci.* 11(1): 92-97
- Moore, M. N., 2002.** Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 59: 1-15.
- Moore, M.N., Depledge, M. H., Readman, J. W. & Paul Leonard, D. R., 2004.** An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552: 247-268
- Notten., M. J. M., Oosthoek, A. J. P., Rozema, J., Aerts, R., 2006.** Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the landsnail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. *Ecotoxicology*, 15, 295-3
- Paillard, C., F. Leroux and J. J. Borrego., 2004b.** "Bacterial Disease in marine Bivalves : Review of recent studies. Trends and evolution." *Aquatic Living Ressources*. 17: 477- 498.
- PAN., 2005.** Pesticides Database. http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp:
- Pandey, S., R. Kumar, S. Sharma, N. S. Nagpure, S. K. Sirivastava, M. S. Verma, 2005.** Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 61 : 114-120

- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L. L., 1996.** Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull*, 32, 225-231.
- Peccinni, E., Staudenmann, W., Albergoni, V., Gabrieli, R. D. and James, P., 1994.** Purification and primary structure of metallothionins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. *European Journal of Biochemistry*, 226, 853-859.
- Pellerin-Massicote, J., 1994.** Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J Aquat Ecosyst Health*, 3:101-111.
- R.N.O., 1995.** Surveillance du milieu marin. Ministère de l'Environnement, 32 pages.
- 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, 154-167.
- Radwan, M. A., H. B. EL-wakil, K. A. Osman, 1992.** Toxicity and biochemical impact of certain oxime carbamate pesticides against terrestrial snail, *Theba pisana* (Muller). *J. Environ. Sci. Health*, B27(6): 759-773.
- 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, 40-46.
- Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M. et Piva, F., 2006.** "Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicological effects of urban pollution: an integrated approach." *Environmental Health Perspectives* 114(1): 63-69.
- Regoli, F. and Winston, G.W., 1999.** Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicology and applied pharmacology*, 156: 96-105.
- Regoli, F., G. Principato, 1995.** Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31: 143-164.
- Roch, P., 1999.** "Defense mechanism and disease prevention in farmed marine invertebrates." *Aquaculture* 172: 125-145.
- Rostagno, B., Violleau, A., Brun, C., Dietrich, P., Fillon, A., Goulletquer, P., Guichet, R., Kantin, R., Legay, D., Loubersac, L., Masson, D., Rocher, G., Ryckaert, M., Thomas, G., Fichet, D., Guyot, D., Miramand, P., Pigeot, J., Seguignes, M. & Taillade, S. 1999.** Qualité des eaux littorales des Pertuis Charentais - Bilan et diagnostic, 130 pages.

- Russel, L. K., de Haven, J. I., Botts, R. P .,1981.** Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 634-640.
- Salama, A. K., K. A. Osman, N. A. Saber, S. A. Soliman, 2005.** Oxidative stress induced by different pesticides in the land snails , *Helix aspersa* .*Pakistan journal of biological Sciences*, 8(1): 92-96.
- Salgado, V. L., Sparks, T. C., 2005.** The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance. *in: L.I. Gilbert K. Iatrou, S.S. Gill (eds.), Comp. Insect Mol. Sci. Cont.*, 6:137-173.
- Salgado, V. L., 1998.** Studies on the mode of action of Spinosad: Insect symptoms and physiological correlates. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 60: 91-102.
- Sameeh., A. H., 2008.** Biochemical and histopathological effects of formulations containing Malathion and Spinosad in rats. *Toxicology Research Unit (ETRU)*,15 (2): 71-78
- Scheifler, R., Gomot de Vaufléury, A., Badot, P. M ., 2002.** "Transfer of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: bioaccumulation and effects." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53(1): 148-153.
- Schmidt, G. H., Ibrahim, N. M. M., 1994.** Heavy metal content (Hg^{2+} , Pb^{2+}) in various body parts : its impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adults. *Ecotoxicol Environ Saf*, 29, 148-164.
- Schuytema, G.S., Nebeker, A.V., Griffis, W. L., 1994.**Toxicity of Guthion and Guthion 2S to *Xenopus laevis* embryos. *Arch Environ Contam Toxicol* 27 (2):
- Shijin, W., Ermiao, W., Lequan, Q., Weihong, Z., Jianmeng, C., 2011.** Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. *Chemosphere*, 83: 429-434
- Siwela, A. H., Nyathi, C. B., Naik, Y. S., 2010.** A comparison of metal levels and antioxidant enzymes in freshwater snails, *Lymnaea natalensis*, exposed to sediment and water collected from Wright Dam and Lower Mguza Dam, Bulawayo, Zimbabwe. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 73(7): 1728-32.
- 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60:47-52.
- Storey, K. B., 1996.** Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 1715-1733.

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 de Annaba .104 pages.

Tafalla, C., Gomez-Leon, J., Novoa, B., Figueras, A., 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(3): 197-205.

Thompson, G. D., Sparks, T. C., 2002. Spinosad: a green natural product for insect control, 823 (advancing sustainability through green chemistry and engineering), ACS Symp. Series 61-73.

Timbrell, J. A., Draper, R., Waterfield, C. J., 1994. Biomarkers in toxicology: new uses for some old molecules? *Toxicology and Ecotoxicology News*, 1(1), p.4-14.

Triebkorn, R., Florschütz, A., 1993. Transport of uncontaminated and molluscicide containing food in the digestive tract of the slug *Deroceras reticulatum* (Müller). *J. Moll. Stud.* 59:35-42.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64:178-189.

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

Veillerette, F., 2005. « Le piège se referme ». *Terre et vie* : 94, p.113-0237.

Viard, B., Maul, A., Pihan, J. C., 2004. Standard use conditions of terrestrial gastropods in active bio monitoring of soil contamination. *Journal of Environmental Monitoring*, 6, 103-107.

Weckberker, G., Cory, G., 1988. Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40, 257-264.

Weiss, K. R., Brezina, V., Cropper, E. C., Heierhorst, J., Hooper, S. L., Probst, W. C., Rosen, S. C., Vilim, F. S., Kupfermann, I., 1993. Physiology and biochemistry of peptidergic cotransmission in *Aplysia*. *J. Physiol*, 87, 141-151.

Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77: 591-625.

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 chronically metal-polluted site. *Environ. Pol.* 156: 367-379.

Zeriri, I., Tadjine, A., Belhaouchet, N., Grara, N., Djebbar, M. R., Brebbah, H. ., 2012. Potential toxicity of an insecticide of the family of carbamate on a bioindicator model of the pollution the earthworm *Octadrilus complanatus* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Annals of biological research*, 3(11):5367-5373.