



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار- عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE CELLULAIRE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité: TOXICOLOGIE

Intitulé

Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai
comparatif sur deux modèles biologiques
(*Helix aspersa* et *Paramecium* sp.)

Presentée par : M^{lle} BOUARICHA Houda

Soutenue le 29 octobre 2013

Membres du Jury:

DJEBAR Mohamed Réda	Pr	Président	Université d'Annaba.
BERREBBAH Houria	Pr	Directeur de thèse	Université d'Annaba.
KIMOUR Mohamed Tahar	Pr	Examineur	Université d'Annaba.
TCHOUAR Nouredine	M.C.A	Examineur	Université d'Oran.
TADJINE Aïcha	Pr	Examineur	Université d'El-Tarf.
GRARA Nadjoud	M.C.A	Examineur	Université de Guelma.

Année universitaire: 2012/2013.

Remerciements

*Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) de l'Université d'Annaba. Je profite de l'occasion qui m'est offerte pour adresser mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Mohamed Réda DJEBAR** pour sa disponibilité et son souci constant de manière à ce que cette thèse se passe dans les meilleures conditions possibles.*

*C'est aussi avec une profonde sincérité, que j'adresse toute ma reconnaissance au Professeur **Houria BERREBAH-DJEBAR**, pour m'avoir confié cette étude. Ses qualités humaines, sa disponibilité à toute épreuve et ses remarquables compétences en la matière ont été le garant de ce travail particulièrement enrichissant. Je voudrais aussi la remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ces années et pour m'avoir communiqué la passion pour la recherche, que ce soit en termes de résultats théoriques ou de leur mise en œuvre concrète.*

*Je remercie encore une fois le Professeur **Mohamed Réda DJEBAR**, non seulement pour avoir accepté de présider ce jury, mais aussi, pour s'être pleinement investi à la réalisation de ce travail et sacrifié de son temps pour répondre à mes nombreuses questions, et surtout pour la qualité de la formation qui nous a donné.*

*J'exprime aussi toute ma gratitude à Monsieur **TCHOUAR Noureddine**, Maître de conférences et Doyen de l'université d'Oran et Monsieur **KIMOUR Mouhamed-Tahar**, Professeur de l'Université d'Annaba pour l'intérêt et l'attention qu'ils ont accordés à ce travail de thèse et d'avoir accepté d'en être les examinateurs.*

*Ces mêmes remerciements s'adressent à M^{me} **TADJINE Aicha**, Maître de conférence de l'université d'EL-Tarf, et M^{elle} **GRARA Nedjoud**, Maître de conférence de l'université de Guelma, pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.*

*Je tiens à remercier Mme **MEKSEM -AMARA Leila**, pour ses encouragements et ses nombreux conseils.*

*Toute ma sympathie et mon meilleur souvenir à la famille **LTC**, mes collègues et amies du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université d'Annaba, pour l'ambiance chaleureuse et conviviale qui règne au sein de ce laboratoire, pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans le cadre de*

cette thèse, pour tous les bons moments que nous avons pu partager ensemble. Au regard de cette équipe dont je suis membre, j'en tire une réelle fierté.

Dedicases

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents à qui je dois tout.

A mes beaux parents pour leur soutien et encouragements.

*A Mehdi, Sans ton aide, ta grande patience, ta compréhension et ton soutien,
je n'aurais pu mener ce travail à bien.*

A ma sœur Amina, et mes frères Midou et Hichem

A Mes adorables petits neveux : Lyne, Sofia et Amir.

Résumé

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la toxicité du biopesticide à base d'Emamectine benzoate un insecticide nouvellement homologué en Algérie, sur un modèle cellulaire *paramecium sp.* et un modèle pluricellulaire *Helix aspersa*.

Les premiers résultats montrent que l'EMB provoque une diminution dose-dépendante du poids moyens des escargots et de certains de ses organes (hépatopancréas, rein et coquille). Par contre chez la paramécie, ce xenobiotique inhibe la croissance.

Concernant les biomarqueurs de la toxicité, nous avons mis en évidence une diminution dose dépendante du taux de GSH, parallèlement à l'induction des activités GST et CAT, ainsi qu'une inhibition de l'activité AChE. D'une autre part l'exposition des deux espèces à l'EMB a mis en évidence une libération de MDA témoignant d'une peroxydation lipidique. De plus, chez la paramécie, nous avons mis en évidence une perturbation du métabolisme respiratoire

L'examen histopathologique a confirmé la toxicité de l'EMB chez les escargots, et ce à travers les altérations irréversibles observées au niveau de l'hépatopancréas, du rein et du poumon.

L'un des aspects les plus originaux de ce travail est l'identification *in silico* d'un pesticide moins toxique qui été réalisé à travers l'adaptation de l'outil « **Sys PL** » basé sur une amélioration de l'approche ligne de produits par un modèle générique qui est un produit moins toxique pour l'homme et son environnement. Cela a été réalisé à partir de nos résultats et d'autres disponibles dans les banques de données, en utilisant une approche multi biomarqueurs.

Mots clés : Emamectine Benzoate, Biomarqueurs, Stress oxydant, Métabolisme respiratoire, Histopathologie, Bioinformatiques, *In silico*, *Helix aspersa*., *Paramecium sp.*

Abstract

In this study we were interested, to the evaluation of the toxicity of the biopesticide based benzoat emamectin, a newly registered insecticide in Algeria, on a cellular model *paramecium sp.* and a multicellular model *Helix aspersa*.

The first results show that benzoate emamectin causes a dose-dependent decrease in the weight of snails and some of its organs (hepatopancreas, kidney and schell), by cons this xenobiotic inhibit growth in *paramecium sp.*

Concerning biomarkers of toxicity, we demonstrated a dose-dependent decrease in GSH parallel to the induction of GST and CAT activities and an inhibition of the activity AChE. On the other hand, the exposure of both species at the EMB showed a release of MDA indicating lipid peroxidation; In addition, in *paramecium* we demonstrated a disturbance of the respiratory metabolism.

Histopathological examination confirmed the toxicity of EMB in snails, through the irreversible changes observed in the hepatopancreas, kidney and lung.

One of the most original aspects of this work is the identification *in silico* of a less toxic pesticide, which was achieved through the adaptation of the "Sys PL" tool, based on an improvement in the product line approach with a generic model that is less toxic to humans and their environment. This was realised from our results and other available databases, using a multi biomarker approach.

Key words: Benzoat Emamectin, Biomarkers, Oxydatif stress, Respiratory metabolism, Histopathology, Bioinformatics, *In silico*, *Helix aspersa*, *Paramecium sp.*

ملخص

الدراسة التالية تهتم بتقييم درجة تسمم مبيد الحشرات الحيوي المتكون من الإيمامكتين بنزوات على خلايا البرامسيوم و الحلزون ، مع مقارنة النتائج المتحصل عليها .

مبيد الحشرات أثر سلبا على الحلزون و البرامسيوم و ذلك من خلال النقص الملحوظ في أوزان الحلزونات المعالجة (الوزن الكلي ، قواقع و الأنسجة) ، و ضعف نمو خلايا البرامسيوم .

أما فيما يخص المؤشرات الحيوية عند هذين الكائنين ، وجدنا زيادة في كمية البروتينات و نقصان في معدل GSH مع نظام إزالة التسمم من خلال الزيادة في النشاط الإنزيمي GST و CAT ، و تثبيط النشاط الإنزيمي كما أنه و تأكيدا لما سبق فإن معالجة الحلزون و البرامسيوم بالإيمامكتين بنزوات تؤدي إلى اضطرابات و الذي يؤدي بدوره إلى زيادة عمليات تأكسد الدهون مما ينتج زيادة في كميات MDA .

عند خلايا البرامسيوم ، هذا المبيد أدى إلى تدهور في عملية التنفس الخلوي ، أما فيما يخص الإختبار على الأنسجة ، تبين أنه هناك تأثيرات خطيرة بعد المعالجة بالمبيد و التي تجلت من خلال إتلاف الأنسجة الشكلي منها و الداخلي على مكونات الخلية و الذي يؤكد الضرر المضاعف عليها .

في الأخير و لإتمام دراستنا قمنا بإستخراج مبيد حشرات ذو نسبة تسمم ضئيلة من بين مجموعة مبيدات موجودة في المراجع مع ، و ذلك بإستعمال أداة « Sys PL » .

الكلمات الدلالية : الحلزون ، المؤشرات الحيوية ، برامسيوم ، الإيمامكتين بنزوات ، التنفس الخلوي ، إختبار الأنسجة، الأكسدة الخلوية .

Table des matières

Introduction Générale

Généralités	1
1 Classifications des produits phytosanitaires	2
2 Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement.....	4
3 Résidus et indices toxicologiques	4
4 Toxicité et génotoxicité des pesticides.....	5
5 Caractéristiques du Proclaim.....	5
6 Caractéristiques chimiques de l'Emamectine benzoate (Proclaim)	6
6.1 Mode d'action de l'Emamectine benzoate (Proclaim)	7
6.2 Pharmacocinétique de l'Emamectine benzoate (Proclaim)	8
6.3 Toxicologie de l'Emamectine benzoate	8
6.4 Comportement dans l'environnement	8
7 Objectifs de l'étude.....	9

Chapitre 1 : Physiologie et Biométrie

Introduction	11
2 Objectif du travail	12
2.1 Choix de <i>Paramecium</i> sp. comme modèle biologique	13
2.2 Choix d' <i>Helix aspersa</i> . comme modèle biologique	13
3 Matériel et Méthodes	14
3.1 Matériel biologique	14
3.1.1 Apports de l'approche multi-espèces	14
3.1.2 Morphologie d' <i>Helix aspersa</i>	15
3.1.3 Anatomie d' <i>Helix aspersa</i>	15
3.1.4 L'espèce en milieu naturel	16
3.1.5 Rythme d'activité.....	16
3.1.6 Estivation et hibernation.....	17
3.1.7 Croissance	17
3.1.8 Reproduction	18

3.1.9 La biodiversité microbienne	19
3.1.10 Les protistes (protozoaires)	19
3.1.11 Taxinomie.....	20
3.1.12 Rappels sur la Paramécie (<i>Paramecium sp.</i>)	20
3.1.13 Déplacement de la paramécie	22
3.1.14 Reproduction	22
3.1.15 Alimentation.....	23
3.1.16 Respiration	23
3.2 Matériel chimique.....	23
4 Méthodes	24
4.1 Conditions d'élevage des escargots avant traitement à l'EMB	24
4.2 Traitement des animaux	24
4.3 Sacrifice des animaux.....	25
4.4 Préparation de culture de paramécies	26
4.5 Traitement des paramécies	27
4.6 Cinétique de croissance cellulaire	27
4.7 Calcul du pourcentage de réponse	28
5 Résultats	29
5.1 Effets de l'Emamectine benzoate sur l'évolution de certains paramètres physiologiques	29
5.1.1 Poids de l'escargot.....	29
5.1.2. Le poids de la coquille.....	30
5.1.3 Effets de l'Emamectine benzoate sur le poids de l'hépatopancréas	30
5.1.4 Effets de l'Emamectine benzoate sur le poids de l'organe de Bojanus (Rein)	31
5.1.6 Effets de l'Emamectine benzoate sur le pourcentage de réponse des paramécies	33
6 Discussion	34

Chapitre 2 : Enzymologie et Polarographie

Introduction	37
1 Les biomarqueurs d'exposition.....	37
2 Les biomarqueurs d'effet	37
3 Les biomarqueurs de susceptibilité	37
4 Choix du biomarqueur	38
5 Les indicateurs de stress oxydatif	40

6 Les indicateurs de stress oxydatif chez les mollusques et leur utilisation comme biomarqueurs de pollution	41
7 Objectif du travail	42
8 Matériel et méthodes	44
8.1 <i>Helix aspersa</i>	44
8.2 <i>Paramecium sp.</i>	45
9 Méthodes	45
9.1 Dosage des Protéines	45
9.2 Dosage du glutathion (GSH)	45
9.3 Dosage du malondialdéhyde (MDA)	46
9.4 Mesure de l'activité Catalase (CAT)	47
9.5 Mesure de l'activité GST (glutathion S-transférase)	47
9.6 Etude polarographique	48
9.7 Analyse statistiques des résultats	48
10 Résultats	49
• Cas des paramécies	49
10.1 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le taux des protéines totales	49
10.2 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de GSH et l'activité GST	51
10.3 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le MDA	52
10.4 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Catalase	53
10.5 Effets de l'Emamectine benzoate sur le métabolisme respiratoire des paramécies	55
• Cas des escargots	56
10.6 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de protéines	56
10.7 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Catalase	56
10.8 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le taux du glutathion et sur l'activité GST	57
10.9 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de MDA	58
11 Discussion	59

Chapitre 3 : Neurotoxicité

Introduction	65
1 Les cholinestérases	65
1.1 Les cholinestérases chez les mollusques	65
2.2 Les Cholinestérases chez les protistes	66

2 Objectif	66
3 Matériel et Méthodes	67
3.1 Matériel biologique	67
3.1.1 <i>Helix aspersa</i>	67
3.1.2 <i>Paramecium sp.</i>	67
3.2 Méthodes	67
3.2.1 Mesure de l'activité Acétylcholine Estérase (AChE) chez les deux espèces étudiées.....	67
4 Résultats	68
4.1 Effets de l'Emamectine benzoate sur l'activité acétylcholinestérase chez <i>Helix aspersa</i>	68
4.2 Effets de l'Emamectine benzoate sur l'activité acétylcholinestérase chez <i>paramecium sp.</i>	68
5 Discussion	71

Chapitre 4 : Etude Histopathologique

Introduction	74
2 Objectif du travail	74
3 Materiel et méthodes	74
3.1 Materiel biologique	74
Nous avons travaillé sur des fragements de l'hépatopancréas, du rein et du poumon, conservé préalablement dans du formol à 10%.	74
3.2 Methode.....	74
4 Résultats	75
4.1 Aspect de l'hépatopancréas après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate.....	75
4.2 Aspect de l'hépatopancréas après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate.....	77
4.3 Aspect du rein après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate	78
4.4 Aspect du rein après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate	80
4.5 Aspect du poumon après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate	82
4.6 Aspect du poumon après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate ..	84
5 Discussion	86

Chapitre 5 : L'identification *in silico* d'un nouveau pesticide moins toxique

Introduction	89
Qu'est ce que la toxicologie <i>in silico</i> ?.....	89

2 Objectif du travail	89
3 Matériel et méthodes	90
3.1 Matériel biologique	90
3.2 Matériel chimique.....	90
- Le matériel chimique utilisé dans notre étude est un insecticide à base d'Emamectine Benzoate.....	90
3.3 Méthodes	90
4 Résultats	91
4.1 Effets des xenobiotiques sur les paramètres biochimiques et physiologiques	91
4.2 Apport de l'informatique	91
4.3 Définitions	92
4.4 Aperçu sur notre Modèle de variabilité	92
4.5 L'outil Support 'SysPL'	93
4.6 Application de l'approche à notre étude	94
Conclusion.....	100
Conclusion Générale	102
Perspectives.....	105
Références Bibliographiques.....	106

Table des figures

Figure 01 : Structure chimique de l'Emamectine benzoate	7
Figure 02 : Mode d'action de l'Emamectine benzoate (Beugnet, 1997)	7
Figure 03 : Le petit gris (<i>Helix aspersa</i>).....	15
Figure 04 : Anatomie de l'escargot.....	16
Figure 05 : Position du genre <i>Paramecium</i> dans le système « Trois domaines »	19
Figure 06 : Structure d'une paramécie sous microscope.....	22
Figure 07 : Cycle sexuel et réorganisation macronucléaire : Événements cellulaires	23
Figure 08 : Exposition d' <i>Helix aspersa</i> . à la nourriture au laboratoire.....	25
Figure 09 : Traitement de l'escargot par voie atopique.	25
Figure 10 : Sacrifice et dissection des animaux	26
Figure 11 : Protocole expérimental du traitement de la paramécie.....	27
Figure 12 : Evolution du poids moyen des escargots traités à l'EMB en fonction du temps.	29
Figure 13 : Evolution du poids de la coquille des escargots traités à l'EMB en fonction du temps.	30
Figure 14 : Effets de l'EMB sur le poids de l'hépatopancréas des escargots.	31
Figure 15 : Effets de l'EMB sur le poids du rein des escargots.	31
Figure 16 : Cinétique de croissance des paramécies traitées aux concentrations croissantes d'EMB.	32
Figure 17 : Pourcentage de réponse des paramécies traitées aux concentrations croissantes d'EMB.	33
Figure 18 : Relations entre les principaux contaminants et les marqueurs biologiques	39
Figure 19 : Evaluation de la qualité d'environnement par une approche globale –chimique et biologique.....	40
Figure 20 : Effets à court terme des concentrations croissantes d'EMB sur le taux des protéines totales.	49
Figure 21 : Effets à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur le taux des protéines totales.	50
Figure 22 : Effets à court terme des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Catalase...54	
Figure 23 : Effets à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Catalase...54	

Figure 24 : Effets à court et à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur le métabolisme respiratoires des paramécies	55
Figure 25 : Variations de la teneur en protéines au niveau de l'hépatopancréas des escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB.....	56
Figure 26 : Variations de l'activité Catalase au niveau de l'hépatopancréas des escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB.	57
Figure 27 : Variations de l'activité Acétylcholinestérases des escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB.	68
Figure 28 : Effets à court terme des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Acétylcholinestérase chez les paramécies.....	69
Figure 29 : Effets à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Acétylcholinestérase chez les paramécies.....	70
Figure 30 : Hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase	71
Figure 31 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Emamectine Benzoate ».....	94
Figure 32 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Chlorpyrifos ».	95
Figure 33: Schéma des caractéristiques de l'assét « Dichloride ».	95
Figure 34 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Spinosad ».	96
Figure 35 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Méthomyl ».	96
Figure 36 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Oxychloride de cuivre ».	97
Figure 37 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Carbofuran ».	97
Figure 38 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Sulfate de cuivre ».	98
Figure 39 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Hydroxide de cuivre ».....	98
Figure 40 : Schéma des caractéristiques correspondant au composé optimal le moins toxique du domaine « SulfOxychlo-dichloride ».	99

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification de la toxicité aigue des pesticides	3
Tableau 02 : Croisements entre classification chimique et classification biologiques des pesticides	3
Tableau 03 : Effets à court terme des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de GSH et l'activité GST	51
Tableau 04 : Effets à long terme des concentrations croissante d'EMB sur le taux de GSH et L'activité GST	52
Tableau 05 : Effets à court terme des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de MDA...	52
Tableau 06 : Effets à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur le MDA.....	53
Tableau 07 : Variations de l'activité GST et du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas des escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB.....	57
Tableau 08 : Variations du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas des escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB.....	58
Tableau 09 : Effets des produits phytosanitaires (insecticides principalement) sur <i>Helix aspersa</i>	91
Tableau 10 : Identification des variabilités selon l'effet.....	93

Liste des planches

Planche 01 : Aspect de l'hépatopancréas après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).....	75
Planche 02 : Aspect de l'hépatopancréas après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).....	77
Planche 03 : Aspect du tissu rénal après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).	78
Planche 04 : Aspect du tissu rénal après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).	80
Planche 05 : Aspect du poumon après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).	82
Planche 06 : Aspect du poumon après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).	84

Liste des abréviations

AChE :	Acetylcholinestérase.
ACTA :	Actualité des instituts Agricole.
ADN :	Acide desoxyribonucléique.
ATP :	Adenosine triphosphate.
ASCH :	Substrat acetylcholinestérase.
ASS :	Acide Sulfosalicylique.
BBC :	Bleu brillant de coomassie.
BSA :	Serum Albumin Bovin.
CAT :	Catalase.
CDNB :	1-Chloro,2,4-Dinitrobenzène.
CL :	Concentration létale.
CYP :	Cytochrome P.
DL :	Dose létale.
DTNB :	Acide 5,5'-Dithiodis-2-Nitrobenzoïque.
EAO :	Espèces Actives de l'Oxygène.
EDTA :	Ethylène diamine tétra-acétique.
EMB :	Emamectine Benzoate.
EMA :	The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.
EPA :	Environmental Protection Agency.
FAO/OMS :	Commission du Codex Alimentarius.
GPX :	Glutathion peroxydases.
GSH :	Glutathion-S-transférases.
GSSG :	Glutathion disulfure.
GST :	Glutathion-S-transférases.
LDP :	Ligne de produits.
MDA :	Malondialdéhyde.
OMS :	Organisation mondiale de la santé.
PChE :	Propionylcholinestérase.
ROS :	Reactifs oxygen species.
SCH :	Cholinestérases.
SOD :	Superoxyde dismutase.
TBA :	Acide thiobarbiturique.
TBARS :	Substances réagissant avec l'acide thio-barbiturique.
TCA :	Acide Trichloroacétique.
UIPP :	Union des Industries de la Protection des Plantes.

Généralités

Depuis le début du siècle, l'environnement a été soumis à la pression croissante des activités industrielles et humaines dont les effets se sont fait rapidement sentir, le recours aux pesticides pour usage agricole en Algérie est devenu indispensable pour atteindre les niveaux de production maximaux et satisfaire une demande de plus en plus accrue des consommateurs en produits alimentaires (zaouani, 2010).

Cependant les pesticides peuvent être très nocifs, ils peuvent endommager l'environnement et s'accumuler dans les écosystèmes ; comme ils possèdent le potentiel de causer toute une gamme d'effets toxiques envers la santé humaine, dépendamment de la dose appliquée, parmi lesquels le cancer, les dysfonctions des systèmes reproductifs, des systèmes endocriniens et immunitaires, les malformations congénitales, l'atteinte aiguë et chronique du système nerveux et l'endommagement des poumons (Jawich, 2010,Veillerette,2005).

L'évaluation du risque des produits phytosanitaire peut adéquatement rendre compte des dangers de ces produits pour l'humain et pour l'environnement .De plus l'arrivé sur le marché des pesticides, les dispositifs actuels d'évaluation de la toxicité de ces produits demeurent parsemés d'incertitudes. L'absence de certitude scientifique absolue ne doit pas servir de prétexte pour remettre à plus tard l'adoption de mesures effectives visant à prévenir la dégradation de l'environnement (Laurin, 2007).

Le toxicologue est de plus en plus impliqué dans la détermination des limites d'exposition ou dans l'évaluation du risque, ces déterminations prennent en compte l'étude rationnelle des effets toxiques, la mise en évidence de doses qui ne produisent pas d'effets, ou des effets sur le minimum d'individus (Zaouani, 2010).

Il est nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement à travers des organismes ou un ensemble d'organisme que l'on utilise comme sentinelles en étudiant les modifications physiologiques , biochimiques et écologiques qui les affectent .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 (Echaubard,1995 ;Hellawell,1986).

1 Classifications des produits phytosanitaires

Les pesticides peuvent être classés en fonction de la nature de l'espèce à combattre mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose (Fournier, 1988).

Le premier système de classification repose sur le type de parasites à contrôler.il existe principalement trois grandes familles de produits phytosanitaires selon la nature des cibles visées : les herbicides, les fongicides et les insecticides,à celles-ci s'ajoutent des produits divers tels que les acaricides (contre les acariens),les nématicides (contre les nématodes),les rodenticides (contre les rongeurs) , les taupicides (contre les taupes),les molluscides(contre les limaces et les escargots),les corvicides et les corvifuges (contre les oiseaux ravageurs de culture et surtout les corbeaux) et enfin les répulsifs (ACTA,2005).

Le deuxième système repose sur la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires (tableau 2), les principaux groupes chimiques comprennent les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoides, les triazines et les urées substituées. (Merhi, 2008 ; UIPP, 2009).

Les systèmes de classifications sont universels, néanmoins l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2005) a classé les produits phytosanitaires en fonction de la toxicité orale et de la toxicité cutanée des matières actives de ces derniers (tableau 1).cette classification comprend cinq niveaux allant d'extrêmement dangereux au sans risque.

Tableau 01 : Classification de la toxicité aiguë des pesticides (OMS, 2005)

Classification		DL50 pour le rat (mg/Kg poids du corps)			
	Désignation	Oral		Cutané	
Classe	Niveau du risque	Solide	Liquide	Solide	Liquide
Ia	Extrêmement dangereux	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Ib	Très dangereux	5 – 50	20 - 200	10 -100	40 -400
II	Modérément dangereux	50 -500	200- 2000	100 -1000	400 -4000
III	Peu dangereux	≥ 500	≥ 2000	≥ 1000	≥ 4000
U	Sans risque dans le cadre d'une utilisation normale	≥ 2000	≥ 4000		

Tableau 02 : Croisements entre classification chimique et classification biologiques des pesticides (Calvet et *al.*, 2005).

Groupe	Classe chimique	Exemples des molécules
Antiparasitaires (insecticide et Anticoccidiens)	Insecticides minéraux	Arséniate de plomb, fluorure d'aluminium, composés soufrés, mercurique, sélénisés.
	Organochlorés	DDT (dichlorodiphényl trichloréthane) HCH (hexachloro-cyclohexane) dont le lindane
	Organophosphorés	Dichlorvos, carbofuran, carbaryl, benfuracarbe
	Carbamates	Aldicarbe, carbofuran, carbaryl, benfuracarbe
	Pyréthroïdes	Permethrine, cyperméthrine, déltaméthrine
	Macrolides endectocides	Ivermectine, dormectine, abamectine, moxidectine, sélénamectine, éprinomectine
Herbicides	Herbicides minéraux	Sulfates, nitrates, chlorures, chlorates, cyanamide
	Phytohormones	Picloranne, trichlopyr, fluroxypyr, glyphosphate
	Carbamates	Asulame, diallate, sulfallate
	Dérivés de l'urée	Mouron, Dinitrophénols, Aminotriazole
	Divers	Triazines, dinitrophénols, aminotriazole
Fongicides	Dithiocarbamates	Mancozèbre, manèbe, zinèbe, propinèbre
	Carbamates benzimidazolés	Bénomyl, carbendazime
	Dérivé de l'imidazole	Kétoconazole, niconazole, imazalil, prochloraz.

2 Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement

L'utilisation importante des produits phytosanitaires en agriculture a engendré la contamination de l'environnement. A la suite de leur application, ces molécules sont susceptibles de quitter leurs sites d'application et sont alors considérées comme micropolluants organiques à l'origine de la pollution de tous les compartiments environnementaux (Shrack et Coquil, 2009). Du fait de leur toxicité et de leur potentiel de bioaccumulation, ces molécules présentent un risque pour l'environnement en général (Wendt-Rasch et *al.*, 2004 ; Capkin et *al.*, 2006).

D'un autre côté de nombreuses études ont montré la présence de produits phytosanitaires ou de leurs résidus dans l'atmosphère aussi bien en milieu rural, qu'en milieu urbain (Terfaya et *al.*, 2009 ; Trevisan 1993 ; Chevreuil et Garmouma, 1993 ; Sanusi, 1996), ces composés peuvent être soumis au transport atmosphérique. La diffusion est possible sur de grandes distances comme en témoigne la détection de pesticides organochlorés dans les précipitations en Antarctique (Bidleman et *al.*, 1993). Le sol et les ressources en eau sont aussi concernés par cette pollution. Les pesticides peuvent aussi être transportés par ruissellement et contaminer ainsi les eaux de surface et les nappes phréatiques, Actuellement la contamination des eaux par les pesticides est préoccupante et généralisée. (Grange et *al.*, 2008).

3 Résidus et indices toxicologiques

Selon le Codex Alimentarius (FAO/OMS, 1994), un résidu de pesticide est toute substance (Dérivé, métabolite, impureté...) présente dans les aliments, les produits agricoles ou les aliments pour animaux par suite de l'utilisation d'un pesticide. Les résidus de pesticides sont le souci permanent de la communauté scientifique et des organisations de santé publique à travers le monde. La surveillance des résidus de pesticide est un outil clé pour assurer la conformité avec la réglementation et contrôler le respect des Bonnes Pratiques Agricoles (Picó et *al.*, 2004).

Résidu toxique signifie évidemment tout résidu pouvant avoir une importance sur le plan toxicologique dans la marge des doses résiduelles ; il n'y a pas de composé toxique mais plutôt des doses toxiques (Abhauer, 1991). Pour cela, nombreuses méthodes hautement sophistiquées ont été mises au point pour détecter, identifier et mesurer les multirésidus contaminant des matrices de différentes natures (Juhász et Naidu, 2001 ; Young et *al.*, 2001 ; Fussel et *al.*, 2002 ; Cliff et *al.*, 2003 ; Baril et *al.*, 2005).

4 Toxicité et génotoxicité des pesticides

En dépit de leur sélectivité et mode d'action spécifique, les pesticides exercent leur nocivité envers les organismes involontairement exposés, suite à la contamination de l'environnement et de la chaîne alimentaire. Ils sont cytotoxiques, neurotoxiques, embryotoxiques, mutagènes, tératogènes ou carcinogènes (Fishbein, 1977). Ils exercent leur action toxique par génotoxicité directe, ils peuvent donc subir une activation métabolique et former des intermédiaires électrophiles capables d'interagir avec les acides nucléiques ; ou par d'autres moyens indirects tel que le stress oxydatif, l'inhibition de la communication intercellulaire, la formation de récepteurs activés ou autres (Rakitsky et *al.*, 2000 ; Suwalsky et *al.*, 2000 ; Lin et *al.*, 2002 ; Hurst et Sheahan, 2003). En plus, les effets produits par la combinaison de plusieurs matières actives sont supérieurs aux effets individuels additionnés à cause de l'interaction entre les molécules simultanément présentes.

Prenant l'exemple du penconazole qui stimule la toxicité des organophosphorés (OP) envers les mammifères, ceci résulterait d'une induction du cytochrome P450 responsable de la réaction d'activation des OPs en leur métabolite toxique l'oxon (Levine et Oris, 1999). Pareillement, le propiconazole augmente l'action toxique du parathion en activant la formation du paraoxon ; la toxicité des pesticides organophosphorés envers des organismes non ciblés serait donc induite par une exposition antérieure au propiconazole (Levine et Oris, 1999). Aussi, le mélange diméthoate, azinphos-méthyle, diazinon, pyrimiphos-méthyle, et bénomyl exerce une toxicité très élevée par rapport aux substances testées individuellement sur des cellules humaines, les concentrations habituellement trouvées sur les fruits (0,4 à 100 ppm) entraînent une inhibition de l'acétylcholine estérase et de la synthèse protéique, et l'effet du mélange ne peut pas être estimé à partir des tests réalisés séparément pour chaque matière active (Marinovich et *al.*, 1996).

5 Caractéristiques du Proclaim

Le Proclaim est un insecticide constitué de 5% d'Emamectine Benzoate. Il s'agit d'un groupe d'insecticides naturels, qui renferme plusieurs produits de structure plus ou moins complexe. La plus importante famille appartenant à cette classe d'insecticide, « les avermectines » (Terry-Robert et *al.*, 1998).

Les avermectines (a : anti ; verm ; ver ; ect : ectoparasite ; in : produit pharmaceutique) sont des lactones macrocycliques naturels issu de la culture de *Streptomyces avermitilis*. Les avermectines peuvent être utilisés en médecine humaine et vétérinaire (Derlon, 2006).Leurs découverte a conduit à un véritable bouleversement dans la lutte contre certaines parasitoses, et notamment les filarioses (Boussineq, 2005).la strongyloidose (anguillulose) ou gastro-intestinale et la gale humaine (Marigny et *al.*, 2001). Elles sont utilisées à grande échelle pour combattre les ectoparasites et les endoparasites, ainsi que les ectoparasites chez les poissons d'aquaculture. (Kovecses et David, 2005 ; Derlon ,2006). Ces antiparasitaires sont mis sur le marché international en 1981(Meissonnier, 1997 ; Boissay, 2007), et leur utilisation en tant que pesticide en agriculture a vu le jour depuis 1985(Boissay, 2007).Plus de cinq milliards de produits commercialisés à base d'ivermectine ont été vendus dans le monde (Shoop et Soll, 2002), dont l'Emamectine benzoate.

Bien que l'abamectine soit un acaricide actif contre une très grande gamme d'insectes, il s'est avéré moins actif sur les lépidoptères, ce spectre d'action déficient a initié des programmes des tests biologiques en 1984 dont le résultat était la découverte de l'ivermectine semi-synthétique de deuxième génération : l'Emamectine benzoate, ce composé présente une haute efficacité conte les larves des lépidoptères et d'autres insectes (Ishaaya et Degheele, 1998).

6 Caractéristiques chimiques de l'Emamectine benzoate (Proclaim)

Proclaim est un insecticide obtenu par synthèse chimique à partir de l'abamectine (un composé qui contient l'ivermectine B1a et l'ivermectine B1b) par substitution d'un aminométhyl (NH-CH₃) par un groupe hydroxyle (-OH) au niveau du carbone C4 (Heasook, 2004). Cet insecticide du nom chimique « 4benzoate d'epi-méthylamino-4'deoxyivermectine B1 » est un mélange d'un maximum de 90% de 4benzoate d'epi-méthylamino-4'deoxyivermectine B1a(MAB1a) et un minimum de 10% de 4 benzoate d'epi-méthylamino-4 deoxyivermectine B1b(MAB 1b), (Purvine,2005), Dodd (2008) a représenté la formule développée de cette molécule voir (Figure 01).

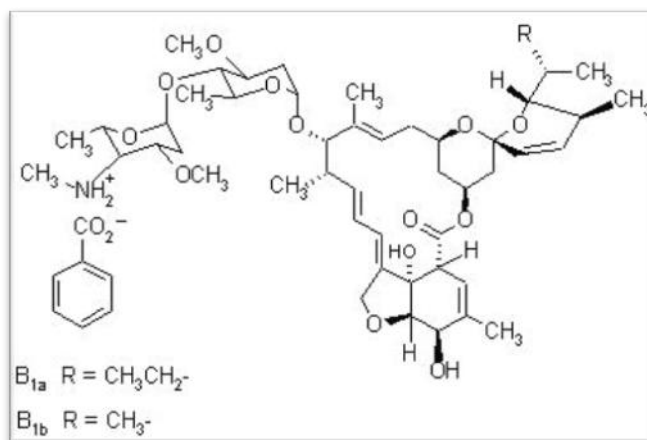


Figure 01 : Structure chimique de l'Emamectine benzoate (Dodd,2008)

6.1 Mode d'action de l'Emamectine benzoate (Proclaim)

L'Emamectine benzoate est classé dans le groupe des activateurs des canaux chlore (figure 2). Il agit au niveau neuromusculaire, en se fixant de manière irréversible au niveau du récepteur GABA (situé au niveau de la synapse inhibitrice de la contraction musculaire) et sur le récepteur glutamate H (situé au niveau de la cellule nerveuse) (Syngenta, 2009). Cette fixation provoque un blocage des canaux chlore en position ouverte et donc un flux entrant d'ions chlore au sein des cellules nerveuses, il s'ensuit une hyperpolarisation cellulaire qui bloque toute activité nerveuse et entraîne une inhibition de la contraction musculaire de l'insecte donc une paralysie (Bloomquist, 2003).

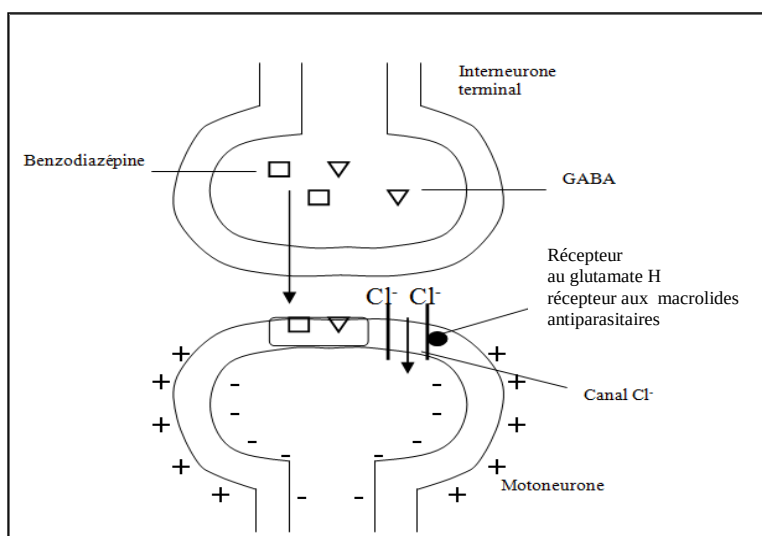


Figure 02 : Mode d'action de l'Emamectine benzoate (Beugnet, 1997)

6.2 Pharmacocinétique de l'Emamectine benzoate (Proclaim)

L'Emamectine benzoate est faiblement métabolisé par l'organisme est donc rapidement éliminée et excrétée en majeure partie dans les excréments (plus de 98% du total des résidus radioactifs est observé chez les rats après une administration unique par voie orale d'une faible ou forte dose d'Emamectine benzoate). Cependant, une faible radioactivité est observée dans les urines ($\leq$ à 0,4%) et au niveau des tissus ($\leq$ à 1,6%) (Mushtaq et Syntasckos, 1996).

6.3 Toxicologie de l'Emamectine benzoate

- **Toxicité aiguë**

Les signes observés de la toxicité aiguë suite à une exposition orale de l'Emamectine benzoate révèle : des tremblements, une ataxie, une activité diminuée, une ptose et une perte de réflexe. En plus il a été observé chez le rat une irritation et hypersalivation ainsi qu'une dégénérescence du cerveau, de la moelle épinière et du nerf sciatique (EMEA, 2003).

- **Toxicité chronique**

Le principal effet chronique est en premier lieu neurotoxique, les principaux symptômes sont des signes cliniques de neurotoxicité, une diminution du poids corporels des animaux, une constipation et des lésions histo-pathologiques au niveau du nerf sciatique (EMEA, 2003). Les cibles de l'emamectine benzoate sont les récepteurs glutamate au niveau des terminaisons nerveuses, leurs effets chroniques sont plus importants sur le système nerveux il se manifeste par une dégénérescence de la moelle épinière, du cerveau et des anomalies neurologique (Federal Register, 2003 ; FINAL REPORT, 2007).

6.4 Comportement dans l'environnement

La principale voie de dégradation de l'Emamectine benzoate dans le sol est l'oxydation. En contact avec le xénon il est rapidement dégradé, le clivage des liaisons osidiques de la molécule donne naissance à des groupements monosacharidiques et des aglycones (Roberts, 1998). Au niveau de la plante, l'Emamectine benzoate est rapidement dégradé en complexes polaires de faible poids moléculaire (Roberts et Huston, 1998).

7 Objectifs de l'étude

Nous avons choisi de travailler sur deux composants majeurs de l'environnement: l'escargot *Helix aspersa*. et la paramécie *paramecium sp.* Ces organismes possèdent de multiples avantages leurs permettant d'être considérés comme des espèces sentinelles potentielle.

- **Les biomarqueurs en toxicologie**

Les biomarqueurs sont mesurés au sein d'individus appartenant à une espèce sentinelle. Cette dernière est la plupart du temps une espèce bioaccumulatrice, c'est à dire capable d'accumuler les contaminants présents dans l'environnement jusqu'à des concentrations supérieures à celles du milieu ambiant. Cette bioaccumulation peut s'effectuer directement (bioconcentration) et/ou indirectement *via* les voies trophiques (bioamplification) (Vidal, 2001).

Les espèces sentinelles sont présentes naturellement dans le milieu étudié ou sont transplantées dans celui-ci par encagement («caging»). Elles doivent posséder des caractéristiques particulières: sensibles, abondantes, présentant une large distribution géographique, adaptées aux variations de divers paramètres environnementaux (température, oxygénation, etc...) et relativement résistantes aux différents contaminants présents dans le milieu. De plus, leur physiologie doit être bien connue (Amiard *et al.*, 1998).

L'escargot *Helix aspersa*. et la paramécie *paramecium sp.* présentent toutes ces caractéristiques. De plus, ces deux modèles biologiques filtrent de grandes quantités d'eau pour satisfaire leurs besoins respiratoires et nutritionnels et de ce fait, peuvent accumuler d'importantes quantités de substances chimiques dissoutes ou en suspension. Elles sont donc largement utilisées comme espèces sentinelles dans de nombreux programmes de biosurveillance (Rouabhi, 2005, Benbouzid *et al.*, 2012 et Viarengo et Canesi, 1994).

L'objectif principal de notre étude est l'évaluation du stress oxydant induit par le Proclaim sur deux modèles biologiques : un modèle cellulaire : *Paramecium sp.* et un modèle pluricellulaire *Helix aspersa*. , et de comparer les réponses des deux espèces.

Dans ce but nous avons étudié au sein de ces organismes les variations de plusieurs paramètres biochimiques considérés comme biomarqueurs potentiels de pollution, après exposition à des conditions contrôlées. Nous avons privilégié une approche multibiomarqueurs en sélectionnant de multiples paramètres biochimiques.

Cette étude nous a permis de suivre l'évolution de certains paramètres physiologiques et biochimiques des deux espèces traités aux concentrations de proclain, en l'occurrence le poids des escargots et de leurs organes ainsi que la croissance des protistes, le suivi des biomarqueurs chimiques, et l'étude polarographique, nous avons aussi réalisé des coupes histologiques au niveau de l'hépatopancréas, du rein et du poumon des escargots. Et enfin nous avons mis en place dispositif informatique qui vise à étudier l'identification *in silico* d'un nouveau produit insecticide moins toxique parmi une gamme d'insecticide disponible sur le marché.

Introduction

Divers impacts létaux et sublétaux ont été observés sur des organismes non cibles exposées aux avermectines. La majeure partie de cette recherche a porté sur l'exposition de la faune aux déjections du bétail dans les pâturages. Cependant, de plus en plus de recherches ont été consacrées aux conséquences néfastes de l'exposition des organismes marins aux avermectines. (Kövecses et David, 2005).

Les essais de Toxicité *in situ* et *in vivo* sur des invertébrés terrestres particulièrement ont révélé des effets toxiques des Avermectines dès les plus faibles concentrations avec une CL 50 de 0,036 ppm pour *Scathophaga stercoraria* avec une mortalité à long terme (Strong et James, 1993). Selon Krüger et Scholtz (1998a, b), l'Ivermectine inhibe le développement des larves et empêche la pupaison.

De plus selon Svendsen et *al.* (2002). L'exposition aux avermectines peut induire une réduction de la croissance (inhibition du développement de quelques espèces larvaires et nymphales, diminution de l'émergence ou de la largeur de la capsule céphalique des larves), une altération de la reproduction (diminution du nombre d'œufs, modification du comportement d'accouplement et anomalies ovariennes), perturbation de l'équilibre hydrique et diminution de la capacité de muer normalement. De plus, certains chercheurs ont remarqué le développement anormal de mouches exposées aux déjections d'animaux traités à l'ivermectine. Ces anomalies incluaient l'induction d'une asymétrie fluctuante de la nervation des ailes. Par contre, les vers de terre auraient une grande tolérance à l'exposition aux avermectines qui n'auraient aucun effet sur leur survie ou sur leur reproduction (Svendsen et *al.*, 2002).

Ainsi, la bioaccumulation /Rémanence des Avermectines dans l'environnement demeure une préoccupation majeure. Actuellement les études sur divers organismes cibles et non cibles laissent présager des résultats probants, notamment à travers la recherche de corrélation entre les concentrations internes et les effets toxiques comme moyen de prédire ces effets en mesurant la quantité de polluant accumulée par un organisme (Davies et Rodgers, 2000 ; Hopkin, 1990 ; McCarty et Mackay, 1993 ; Van Straalen, 1996).

C'est ainsi que Depledge et Rainbow (1990), considèrent que la charge corporelle totale dans un organisme n'est pas une approche suffisante pour localiser et prédire les effets toxiques, car la toxicité peut être influencée par la distribution du contaminant dans les différents tissus. Cette approche a surtout été utilisée pour relier les concentrations corporelles critiques avec des effets biologiques (physiologiques, biochimiques, moléculaires....) chez les invertébrés dans des tests en laboratoire et sur terrain (Van Straalen, 1996 ; Jarvinen et Ankley, 1999).

L'inhibition de la croissance des espèces biologiques induite par les contaminants peut résulter de troubles métaboliques, comportementaux ou de perturbations du contrôle neuroendocrine. Au niveau individuel, une conséquence écophysiologique importante de l'inhibition de croissance peut engendrer un retard de la période de maturité sexuelle (Laskowski et Hopkin, 1995b).

Plusieurs processus physiologiques sont susceptibles d'être impliqués dans les perturbations de la reproduction. Des insecticides et des perturbateurs endocriniens sont responsables de perturbations des processus métaboliques et hormonaux liés à la reproduction de gastéropodes aquatiques (Wilbrink et *al.*, 1992; Jumel et Lagadic, 2000). Les effets délétères sur la reproduction peuvent concerner des perturbations de la gamétogenèse, du développement des organes reproducteurs (Gomot-de Vaufleury et Keroas, 2000) ou encore du développement embryonnaire. Les mécanismes biochimiques et physiologiques responsables de tels effets restent à identifier (Ravera, 1991).

2 Objectif du travail

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les effets morphophysiologiques d'un insecticide à base d'Emamectine Benzoate sur deux modèles bioindicateur/bioaccumulateur de la pollution, *Paramecium sp.* et *Helix aspersa*. à travers le suivis du poids corporel, de la coquille et des organes mous d'*Helix aspersa*. ainsi que la cinétique de croissance des paramécies.

2.1 Choix de *Paramecium sp.* comme modèle biologique

Les espèces utilisées lors de ces tests sont choisies afin de répondre au mieux à ces critères, qui se traduisent par les contraintes suivantes :

- Le taxon est présent, abondant et facilement identifiable (Marchese et Brinkhurst., 1996).
- Sa distribution géographique est large (Bennett et Cubbage, 1992).
- Il joue un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème (Kosmala et *al.*, 1999).
- Son élevage et sa manipulation sont simples (Taylor et *al.*, 1991).
- Son habitat naturel correspond au compartiment aquatique testé (Taylor et *al.*, 1991).
- Il est sensible au produit testé (Mc Pherson et Chapman, 2000).
- Il est possible d'étudier les effets aigus et chroniques du produit et éventuellement sa bioaccumulation (Chapman, 2001).

Paramecium sp. est l'une parmi de nombreuses espèces qui soit susceptible de satisfaire au moins partiellement ces critères. En effet, cette espèce eucaryote unicellulaire est facile à cultiver, sa taille permet de suivre à faible grossissement le cycle cellulaire, la conjugaison, le comportement, la sécrétion, la morphogenèse, et les mutations touchant une gamme de fonctions cellulaires. Plusieurs particularités biologiques en facilitent l'étude biochimique. et d'autre part, le processus d'autogamie, qui produit des clones 100% homozygotes, simplifie l'analyse toxicologique.

L'ensemble de ces données expérimentales nous ont donc conduits à choisir *Paramecium sp.* comme modèle d'étude.

2.2 Choix d'*Helix aspersa* . comme modèle biologique

Plus récemment on s'est intéressé en milieu terrestre à la faune du sol et notamment aux escargots (mollusques, Gastéropodes, Pulmonés), ils remplissent les critères précédemment développés et sont reconnus comme les indicateurs écologiques pertinents (Berger et Dallinger 1993, Cortet et *al.*, 1999), car ils représentent une bio masse significative au sein de la communauté des invertébrées des sols (Dallinger et *al.*, 2001).

Ils occupent une situation privilégiée à l'interface sol-plante-atmosphère, et ils intègrent des sources et voies de contaminations multiples (Barker, 2001).

Ils possèdent des capacités de bioaccumulation importantes pour de nombreux polluants métalliques (Viard *et al.*, 2004), et organiques (Sverdrup *et al.*, 2006).

Ils présentent des réponses physiologiques (inhibition de croissance et de reproduction, mortalité) (Notten *et al.*, 2006) et biochimiques (Regoli *et al.*, 2006) quand ils sont exposés aux contaminants.

Ils constituent un élément de réseaux trophique qui contribue au transfert des polluants du sol et /ou des plants aux prédateurs (Beeby 1985, Laskowski et Hopkin 1995, Scheifler *et al.*, 2002).

Le choix préférentiel de cette espèce est principalement lié à sa distribution mondiale, traduisant ses capacités d'adaptation à des biotopes des sols et des climats variés et à sa facilité d'élevage (Gomot et Deray 1987).

3 Matériel et Méthodes

Notre travail a été effectué au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) du département de biologie de l'université Badji Mokhtar –Annaba.

3.1 Matériel biologique

3.1.1 Apports de l'approche multi-espèces

Afin de permettre l'application d'une suite biomarqueurs dans un grand nombre de situations, il semble également intéressant de valider l'utilisation de ces outils de biosurveillance chez différents taxa (Brown *et al.*, 2004 ; Cheung *et al.*, 2006). En effet, une approche plurispécifique efficace fournit des indicateurs de stress chez des espèces qui diffèrent à la fois par leur sensibilité au stress et/ou à la pollution, par leur physiologie, le groupe fonctionnel auquel elles appartiennent au sein d'une communauté, ainsi que par le compartiment de l'écosystème auquel elles sont principalement exposées, à savoir la colonne d'eau, le sédiment ou leur interface (Sanchez et Tarazona, 2002 ; Brown *et al.*, 2004 ; Cheung *et al.*, 2006). Pour des raisons pratiques, et afin de préserver un certain réalisme écologique, le développement et la validation d'une suite de biomarqueurs chez différentes espèces permet son application à plus grande échelle, en tenant compte à la fois de la présence des différents taxa sur le terrain, de leur type d'habitat (Brown *et al.*, 2004), ainsi que de leur accessibilité.

- ***Helix aspersa*.**

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

Selon Bonnet et Vrillo, (1990), Ce sont des mollusques gastéropodes de la sous-classe des pulmonés. Ces animaux sont dotés d'un "poumon" constitué par un épithélium vascularisé tapissant la cavité palléale dans laquelle l'air atmosphérique pénètre par un orifice appelé pneumostome (Ceourdassier, 2001).

3.1.2 Morphologie d'*Helix aspesa*.

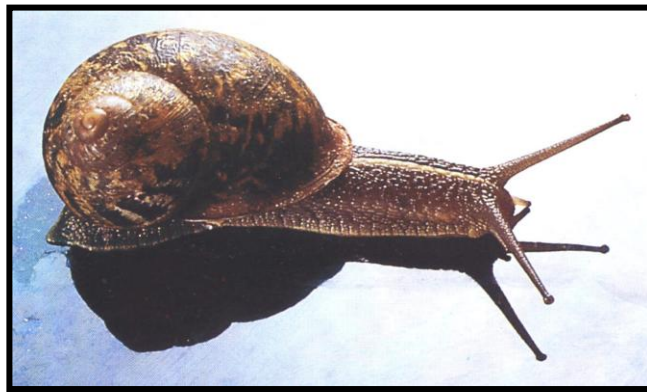


Figure 03 : Le petit gris (*Helix aspersa*) (Daguzan, 1981)

3.1.3 Anatomie d'*Helix aspersa*.

Le corps d'un escargot consiste en un pied unique, une tête et une masse viscérale enroulée placée dans la coquille, la figure (04) montre l'anatomie d'*Helix aspersa*.

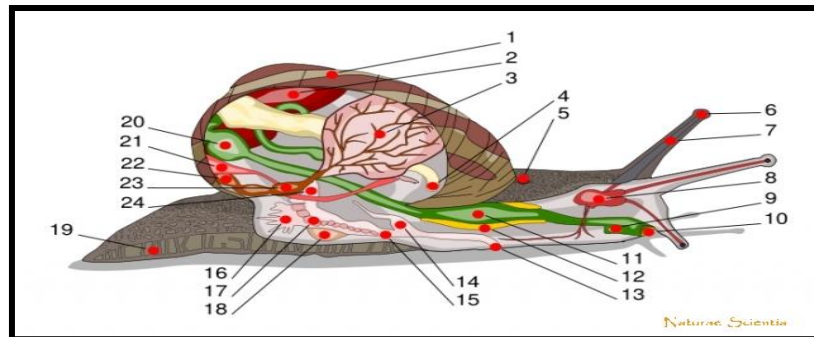


Figure 04 : Anatomie de l'escargot (www.naturae-scientia.com)

Légende : (1.coquille - 2. foie - 3. poumon - 4. anus - 5. pore respiratoire - 6. oeil - 7. tentacule - 8. cerveau - 9. conduit salivaire - 10. bouche - 11. panse -14. pénis - 15. vagin - 16. glande muqueuse - 17. ovaire - 18. sac de dards - 19. pied - 20. estomac - 21. rein - 22. manteau - 23. cœur - 24. canal déférent)

3.1.4 L'espèce en milieu naturel

Cette espèce ubiquiste peut s'adapter à des biotopes, des sols et des climats variés. Elle a besoin d'abris pour son repos diurne mais semble préférer les milieux ouverts. Elle se nourrit principalement de plantes vivantes ou mortes (Iglesias et Castillejo, 1999) aux quelles s'ajoutent des quantités plus ou moins importantes de sol (Gomot et *al.*, 1989).

3.1.5 Rythme d'activité

L'activité des escargots petit-gris est préférentiellement nocturne. Elle se synchronise avec la photopériode naturelle et débute au coucher du soleil avec un maximum six heures après celui-ci (Chevallier, 1992). Les trois facteurs qui influencent cette activité sont l'hygrométrie du milieu (air et sol), la température et l'intensité lumineuse (Chevallier, 1982). Les escargots sont actifs si l'humidité relative de l'air est supérieure à 80% et si la température minimale nocturne n'est pas inférieure à 9° C.

3.1.6 Estivation et hibernation

Une absence prolongée d'humidité provoque l'estivation de *H. aspersa* (Chevallier, 1992). L'animal se fixe alors sur un support en fermant l'ouverture de sa coquille par un voile de mucus solidifié : l'épiphragme. Il reprend son activité lorsque les conditions environnementales sont plus favorables. Lorsque la température moyenne devient inférieure à 15° C, les escargots se mettent en hibernation en se "collant" sur un support ou en s'enfouissant dans le sol ou la litière et secrètent un épiphragme d'hiver. Dans une atmosphère humide, le processus d'hibernation s'effectue en-dessous de 5° C. Le raccourcissement de la durée de jour semble avoir également une action sur la mise en hibernation (Bailey, 1981).

3.1.7 Croissance

Quatre phases de croissance ont été définies en fonction de la taille et de la masse des animaux mais aussi de leur différenciation sexuelle (Gomot, 1997 b) :

- ✓ Phase infantile durant laquelle le tractus génital est non-différencié chez des animaux de 0,02 à 0,6 g,
- ✓ Phase juvénile relative à un tractus génital qui s'organise et à une gamétogenèse active. La masse est comprise entre 0,6 et 6,0 g.
- ✓ Phase de maturation sexuelle ou phase préadulte durant laquelle les glandes annexes femelles se développent. Elle concerne des escargots non bordés (absence d'épaississement du péristome) de plus de 6 g.
- ✓ La phase adulte à croissance nulle durant laquelle les animaux sont aptes à se reproduire. Ils sont alors bordés et pèsent entre 6 et 14 g.

En général, la croissance naturelle jusqu'au stade adulte s'étale sur deux ans si bien que les individus sont le plus souvent considérés comme sexuellement matures à partir du deuxième ou troisième été suivant leur naissance (Chevallier, 1992). Cette croissance se fait par palier, au rythme des estivations et hibernations. Les facteurs qui influencent la croissance sont la température, l'humidité ambiante, l'éclairement (longueur d'onde, intensité et photopériode) ainsi que la nature du sol et de la nourriture (Gomot, 1997). La durée de vie moyenne d'un escargot en milieu naturel est de 6 à 7 ans (Gomot et Gomot, 1995).

3.1.8 Reproduction

La période de reproduction commence au début du mois de mai et dure jusqu'à la mi-septembre. L'accouplement implique une fécondation réciproque par échange de spermatophores entre les deux partenaires. Cette règle n'est cependant pas absolue et certains individus se comportent soit comme mâle soit comme femelle. L'autofécondation n'a été que très rarement constatée chez les escargots du genre *Helix* et jamais pour *H. aspersa aspersa*. La durée entre l'accouplement et la ponte varie en fonction des conditions du milieu. En conditions optimales, elle est d'une dizaine de jours mais ce délai peut atteindre un voire deux mois suivant les conditions d'environnement. (Daguzan, 1981; Chevallier, 1982). Pour pondre, l'escargot creuse une cavité de quelques centimètres de profondeur dans le sol, y dépose ses œufs puis rebouche le "nid de ponte". Le nombre moyen d'œufs par ponte varie de 80 à 130 pour des individus de différentes origines (Madec, 1983).

- *Paramecium sp.*

Le deuxième matériel biologique est un modèle **unicellulaire**, un microorganisme de la classe des protistes ciliés, représenté par : *Paramecium sp.* ou **paramécie**.

3.1.9 La biodiversité microbienne

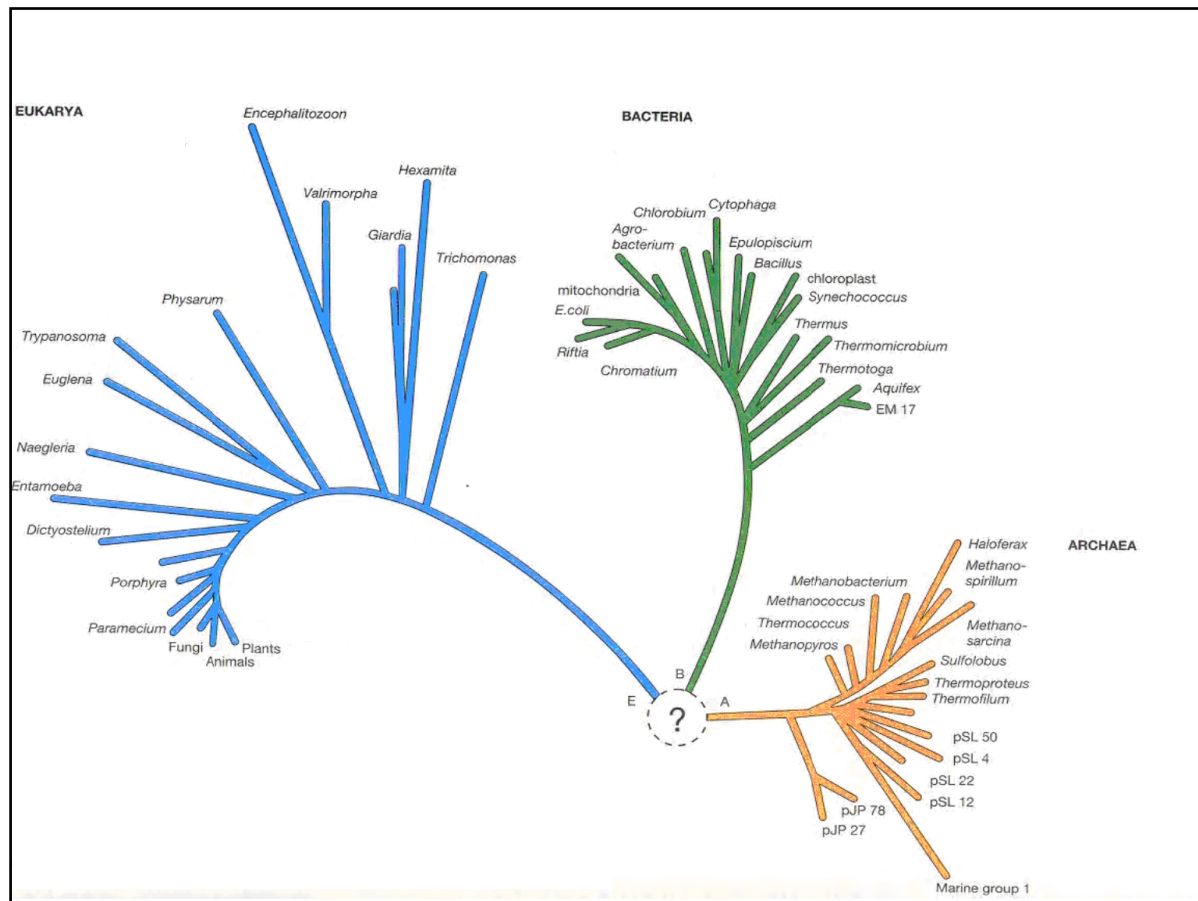


Figure 05 : Position du genre *Paramecium* dans le système « Trois domaines » (Woese et al., 2000).

3.1.10 Les protistes (protozoaires)

Le terme protistes, créé par Ernst Haeckel désigne les eucaryotes comme les animaux (Métazoaires), champignons (Eumycètes), et plantes (des Embryophytes aux Archaeplastida selon les définitions).

Ce groupe est très hétérogène, tant du point de vue anatomique que physiologique. Il réunit des organismes à organisation cellulaire dite simple, unicellulaires le plus souvent, multicellulaires parfois mais sans tissus spécialisés. Certains sont autotrophes (p. ex. : microalgues), d'autres sont hétérotrophes (p. ex. : protozoaires se nourrissant de microalgues).

3.1.11 Taxinomie

Les différentes espèces de paramécie ont été connues depuis plusieurs années, mais c'est en 1950 et grâce aux contributions de Fauré-Fremiet (1924) que le genre *Paramecium* doit sa position systématique en tant que cilié. Ses observations ont été confirmées par Corliss (1961).

La systématique actuelle du genre *Paramecium*, après Corliss (1961) et Honigberg (1964), peut être établie comme suit :

Phylum	: <i>Protozoa</i>
Subphylum	: <i>Ciliophora</i>
Classe	: <i>Ciliatea</i>
Sous-classe	: <i>Holotrichia</i>
Ordre	: <i>Hymenostomatida</i>
Sous-ordre	: <i>Peniculina</i>
Famille	: <i>Parameciidae</i>

Paramecium caudatum, l'espèce la plus courante et la mieux connue, de plus elle est largement utilisée comme matériel de recherche (Beaumont et Cassier, 1998).

3.1.12 Rappels sur la Paramécie (*Paramecium sp.*)

C'est un genre bien connu de protozoaire cilié, et couramment étudié comme représentant type de ce groupe (en particulier *P. caudatum*). La taille de la cellule varie de 50 à 300 µm de long suivant les espèces. La paramécie utilise des cils pour se déplacer et se nourrir. La ciliature somatique, qui recouvre la cellule et bat de façon synchronisée, lui permet de se déplacer. Une ciliature orale distincte couvre la grande invagination ventrale en forme d'entonnoir, le péristome, qui mène jusqu'au cytostome (la bouche). Elle se nourrit essentiellement de bactéries par phagocytose. La paramécie vit isolée en eau douce. Elle fait partie des « infusoires » des anciens auteurs : elle apparaît en grand nombre dans les infusions de végétaux, rendant sa culture et son étude aisée. Vivant dans un milieu hypotonique par rapport à son cytoplasme, la cellule

absorbe constamment l'eau de son environnement par osmose. L'excès d'eau dans le cytoplasme est alors évacué grâce à des vacuoles pulsatiles, où le cytoplasme se contracte périodiquement pour expulser l'eau à travers la membrane plasmique (Beaumont et Cassier, 1998).

Quelques espèces ont été ajoutées au genre *Paramecium* et sont : *P. silesiacum*, *P. jenningsi*, *P. porculus*, *P. arcticum*, *P. africanum* et *P. pseudotrichium*. Ces espèces ont été établies sur la base des critères morphologiques qui sont les seuls qui peuvent être employés efficacement et facilement.

Par leur grande taille et l'extrême facilité de leur culture, les paramécies constituent un matériel de choix pour l'étude morphologique, cytologique et cytochimique des Protozoaires Ciliés.

Leur cytoplasme limité par une mince cuticule présente une zone périphérique hyaline et visqueuse, cette cuticule est résistante, souple, et élastique, limite l'amplitude des déformations du corps de la paramécie, elle s'oppose à l'émission de pseudopodes. Après toute déformation, grâce à la présence de cette différenciation superficielle le corps de la paramécie reprend sa forme initiale (Beaumont et Cassier, 1998).

La paramécie possède deux noyaux contenant le matériel génétique à fonctions complémentaires :

- Le macronucléus : volumineux, polyploïde, ovoïde dont la fonction est indispensable à la survie de la cellule car il assure toutes les fonctions végétatives.

Il se forme à chaque génération sexuelle par des réarrangements programmés de tout le génome germinal, qui aboutissent à des chromosomes redessinés pour l'expression des gènes.

- Le micronucleus : sphérique, de taille réduite, diploïde et souvent difficile à observer. Il subit la méiose et transmet l'information génétique à la génération sexuelle suivante (Cohen, 2007).

S'il existe un seul micronucleus chez *Paramecium caudatum*, *Paramecium aurelia* en possède deux.

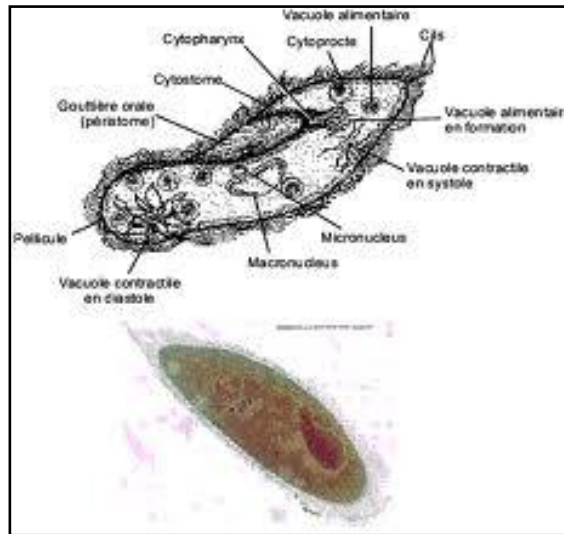


Figure 06 : Structure d'une paramécie sous microscope.
(<http://assouguem.com/cour-fau/>)

3.1.13 Déplacement de la paramécie

Les cils sont le mode de locomotion des paramécies. Ces dernières peuvent diriger les battements de leurs cils pour se déplacer en avant ou en arrière dans un mouvement spiralé, une paramécie peut effectuer un brusque retrait au contact d'un obstacle. (Cohen, 2007)

3.1.14 Reproduction

Les paramécies se reproduisent par :

- Division cellulaire : les micronucleus se divisant par mitose, le macronucléus se divisant simplement en deux micronucleus fils.

- Conjugaison : la conjugaison des paramécies est un processus sexuel de recombinaison génétique (des paramécies individuelles échangent un micronucleus pendant la recombinaison), mais ce n'est pas un processus de reproduction. Les deux mêmes cellules débutent et achèvent le processus et aucune nouvelle cellule n'est créée (Purves et *al.*, 2000).

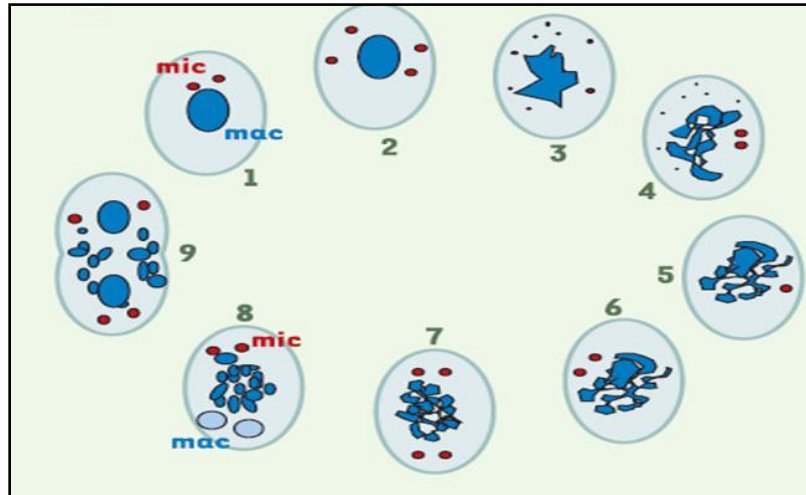


Figure 07 : Cycle sexuel et réorganisation macronucléaire : Événements cellulaires (Meyer et *al.*, 2005)

3.1.15 Alimentation

La paramécie possède un mécanisme d'alimentation permanent constitué par une cavité buccale (péristome) prolongée vers l'arrière : le vestibule; c'est une cavité tubulaire invaginée dans l'endoplasme (l'endoplasme contient les organites de la nutrition: le péristome et les vacuoles digestives) dont les aliments sont collectés par la combinaison de l'action des cils couvrant le corps et les autres cils couvrant le vestibule, les paramécies se nourrissent des organismes comme les bactéries et les autres protozoaires (Samworth et Morgan, 2000).

3.1.16 Respiration

Les paramécies sont avides d'oxygène, leur respiration se fait par des échanges gazeux avec l'environnement exclusivement par la surface corporelle car présentant un rapport surface / volume donc surface / masse corporelle élevé (Wehner et Gehring, 1995).

3.2 Matériel chimique

Notre matériel chimique correspond à un insecticide à base d'Emamectine benzoate (EMB), insecticide hautement puissant utilisé dans la lutte contre les larves des lépidoptères des cultures légumières, il contient 5% d'**Emamectin Benzoate** et appartient à la famille chimique des avermectines, son nom scientifique est : **4''-epi-methylamino-4''deoxyavermectin B1**. Le produit nous a été procuré par Syngenta.

4 Méthodes

4.1 Conditions d'élevage des escargots avant traitement à l'EMB

Les escargots utilisés dans notre expérimentation sont des adultes, leurs poids moyen est de $(10 \pm 0,35\text{g})$, collecté dans une région considéré comme peu/pas polluée (Séraïdi).

Dix jours avant le début du traitement, les escargots en estivation sont remis en activité par pulvérisation d'eau distillée dans une boîte en plastique, L'humidité est maintenue à un niveau élevé à l'aide d'une éponge mouillée, Une boîte de Pétri contenant de la nourriture (farine de blé) est placée au fond de la boîte en plastique (Coeurdassier, 2001).

Tous les essais sur *Helix aspersa* adultes, sont réalisés dans les mêmes conditions environnementales que celle décrites pour l'élevage :

- ❖ Photopériodes de 18h de lumière/24 h, Eclairage assuré par des tubes de néon de type «lumière du jour ».
- ❖ Température $20 \pm 2^\circ \text{C}$.
- ❖ Hygrométrie : 80 % à 95%.

Les escargots sont répartis dans des boîtes en plastique transparentes à raison de trois lots de cinq escargots pour chaque traitement, la boîte mesure 23,5 X 16,5 X 10,5 cm avec un couvercle perforé, les boîtes sont nettoyées régulièrement (tous les 2 jours) (Gomot, 1997 ; Coeurdassier et al., 2001).

4.2 Traitement des animaux

Le traitement des escargots a été réalisé par voie atopique (dermique) (El-Gendy et al., 2009), nous avons retenu quatres concentrations croissantes de l'insecticide:(0,08, 0,2, 0,8, 1,6) mM /l.

Le groupe témoin est traité à l'eau distillé.



Figure 08 : Exposition d'*Helix aspersa*. à la nourriture au laboratoire.



Figure 09 : Traitement de l'escargot par voie atopique.

Nous avons retenu deux temps de traitement : 7 et 15 jours. (Grara et *al.*, 2009, Radwan et *al.*, 2008).

4.3 Sacrifice des animaux

Après chaque période de traitement les escargots sont pesés puis décapités radicalement sans jeûn préalable, puis disséqués, Les coquilles, et les organes mous sont excisés ,lavés à l'eau physiologique (0,9%) et pesés .(Grara, 2011).



Figure 10 : Sacrifice et dissection des animaux

4.4 Préparation de culture de paramécies

La méthode utilisée est celle de Beaumont et cassier (1998) et comprend :

Une culture mixte :

Du foin est coupé en petits morceaux et infusé dans un récipient contenant de l'eau de robinet. La préparation est laissée dans un lieu tiède, sombre et aéré. Quelques jours plus tard (3 à 4 jours) apparaît un voile bactérien sur la solution. On filtre l'infusion et on observe, sous microscope optique et sans coloration, les premiers ciliés. Ces organismes se nourrissent au dépend du voile bactérien.

Une culture pure :

Pour suivre pendant plusieurs semaines la descendance d'une paramécie ou pour obtenir un grand nombre de ces Protozoaires il est nécessaire de réaliser des cultures pures (Wichterman, 1953). Le milieu de culture est préparé selon la méthode de Beisson et *al.* (2010).

Pour l'obtention des cultures pures de *Paramecium*, il est recommandé d'utiliser des infusions de graminées (en particulier de Phleum) ou de laitue, dans notre cas nous avons utilisé la laitue.

La méthode consiste à sécher quelques feuilles de laitue dans une étuve (Th° 100) jusqu'à ce qu'elles soient brunes et fripées. Les réduire en poudre dans un mortier. Cette poudre peut être conservée indéfiniment dans un récipient hermétiquement clos.

- Ajouter 1,5 gr de cette poudre à un litre d'eau distillée et porter à ébullition pendant 5 minutes.

- Filtrer le liquide chaud et procéder à une répartition du milieu de culture dans des flacons de 250 ml avant de les faire passer à l'autoclave.

-Laisser reposer au moins une nuit, on ensemence de *Klebsiella pneumoniae* et au fur et à mesure des besoins, le milieu est dilué. (Beaumont et Cassier, 1998).

4.5 Traitement des paramécies

Les tests sont réalisés sur des aliquotes de 100 ml de culture de paramécie (les tests sont répétés trois fois), nous avons retenu quatre concentrations croissantes de l'insécticide :

0,5. 1,5. 3 et 4,5 μM /l.

- **Protocole expérimental**

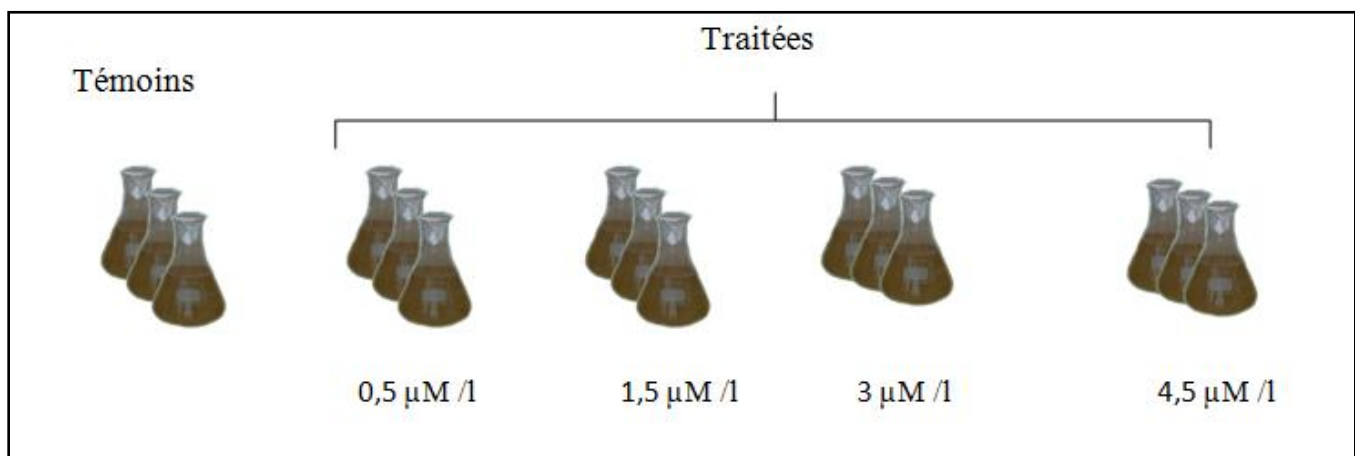


Figure 11 : Protocole expérimental du traitement de la paramécie.

4.6 Cinétique de croissance cellulaire

La cinétique de croissance des paramécies a été effectuée par le comptage cellulaire manuel (compteur manuel) sous microscope optique en fonction du temps (Sauvant et *al.*, 1999). Le comptage est facilité par la fixation des cellules avec du lugol.

Dès la mise en contact du xénobiotique avec le milieu de culture, une cinétique de croissance est suivie en fonction du temps.

T_{0h} : Observation microscopique

$T_{30\text{ mn}}$: Observation microscopique

...

T_{6h} : Observation microscopique

...

T_{72h} : Observation microscopique

L'observation microscopique est réalisée sous microscope photonique (Leica DL 1000) au grossissement 10.

4.7 Calcul du pourcentage de réponse

C'est un calcul qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis de l'insecticide, il est basé sur l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de réponse} = [(N_c - N_E)/N_c] \times 100$$

Où : N_c : Nombre des cellules témoins

N_E : Nombre final des cellules traitées

Les valeurs positives de pourcentage de réponse indiquent une inhibition de la croissance tandis que les valeurs négatives indiquent une stimulation de la croissance (Wong et *al.*, 1999) .

5 Résultats

5.1 Effets de l'Emamectine benzoate sur l'évolution de certains paramètres physiologiques

- Cas d'*Helix aspersa*.

5.1.1 Poids de l'escargot

La figure (12) met en évidence l'évolution du poids moyen des escargots en fonction du temps en présence des concentrations croissantes d'EMB. Nous constatons qu'après 7 jours de traitement le poids moyen des escargots tend à diminuer d'une manière hautement significative particulièrement pour les concentrations 0,2, 0, 8, 1,6 mM/l ($p \leq 0,001$). Il en est de même après 15 jours de traitement.

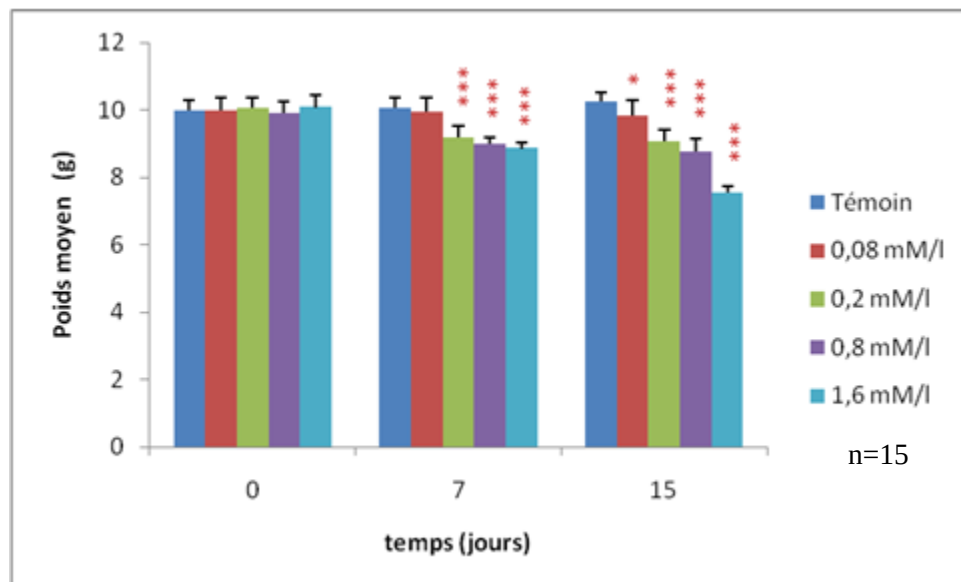


Figure 12 : Evolution du poids moyen des escargots traités à l'EMB en fonction du temps.

5.1.2. Le poids de la coquille

La figure (13) relative à l'évolution du poids de la coquille en présence de concentrations croissantes d'EMB, met en évidence une diminution très significative de ce paramètre particulièrement à la plus forte concentration d'EMB pour les traités après 7 jours. Au delà (15 jours) le poids de la coquille tend à diminuer d'une manière hautement significative et dose-dépendante. ($p \leq 0,001$).

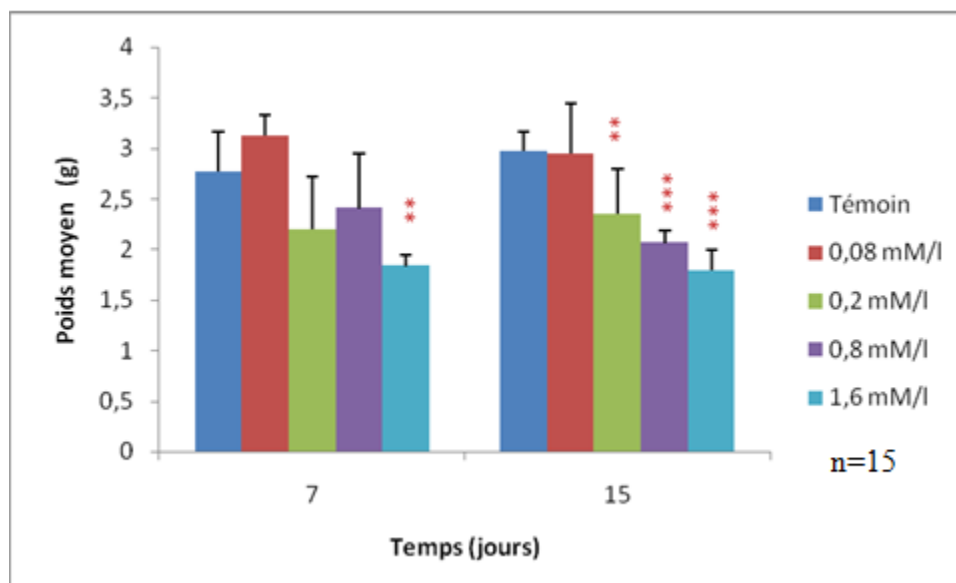


Figure 13: Evolution du poids de la coquille des escargots traités à l'EMB en fonction du temps.

5.1.3 Effets de l'Emamectine benzoate sur le poids de l'hépatopancréas

La figure (14) représente l'évolution du poids de l'Hépatopancréas en fonction du temps et en présence de concentrations croissantes d'EMB. Il apparaît ainsi qu'en présence du xénobiotique, le poids de l'hépatopancréas tend à diminuer particulièrement à la plus forte concentration (diminution significative) pour les escargots traités pendant 7 jours. Après 15 jours de traitement, cette diminution est confirmée, elle est hautement significative et dose dépendante ($p \leq 0,001$).

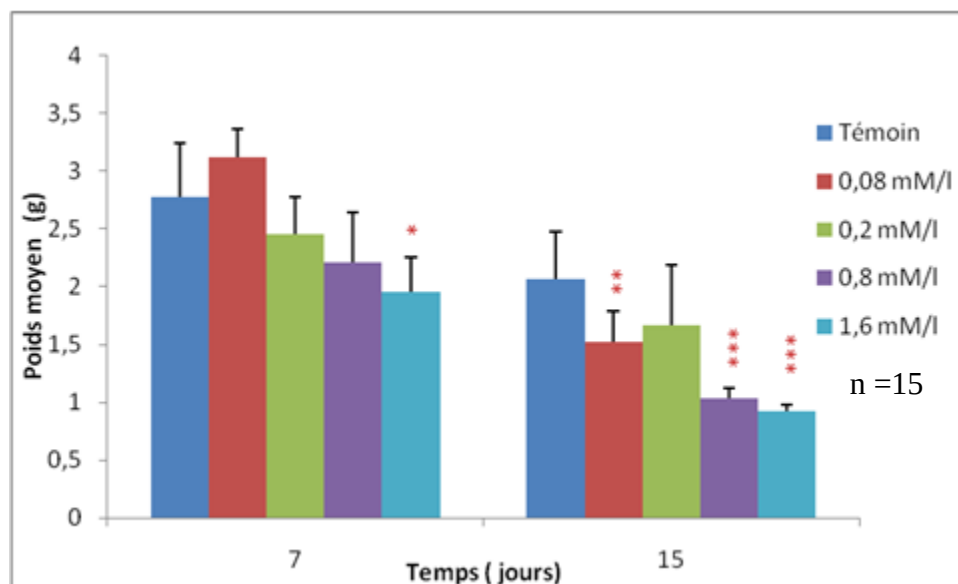


Figure 14 : Effets de l'EMB sur le poids de l'hépatopancréas des escargots.

5.1.4 Effets de l'Emamectine benzoate sur le poids de l'organe de Bojanus (Rein)

La figure (15) illustre les variations du poids du rein en présence du xénobiotique. Nous notons une perturbation du poids de ce dernier après 7 jours de traitement, après 15 jours de traitement le poids du rein tend à diminution de manière très significative ($p \leq 0,001$) chez les escargots traités aux plus fortes concentrations.

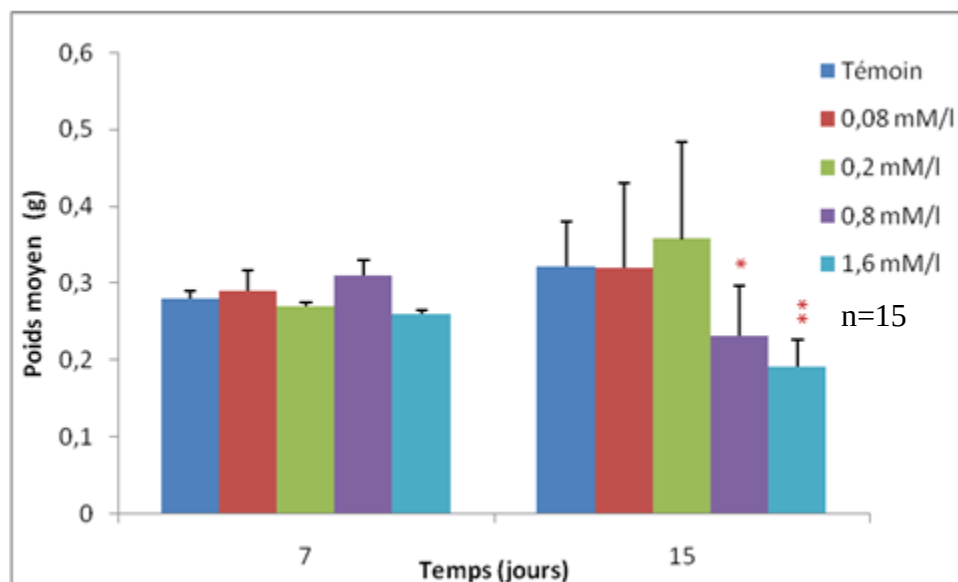


Figure 15 : Effets de l'EMB sur le poids du rein des escargots.

- Cas des paramécies

5.1.5 Effets de l'Emamectine benzoate sur la croissance des paramécies

Les courbes de croissances offrent des données quantitatives permettant une analyse fiable de l'effet toxique d'une substance donnée.

La figure (16) représente les variations du nombre de paramécies en fonction du temps, nous constatons une diminution progressive et très significative de la croissance des cellules traitées par rapport aux témoins, dès les 30 premières minutes ($p \leq 0,01$).

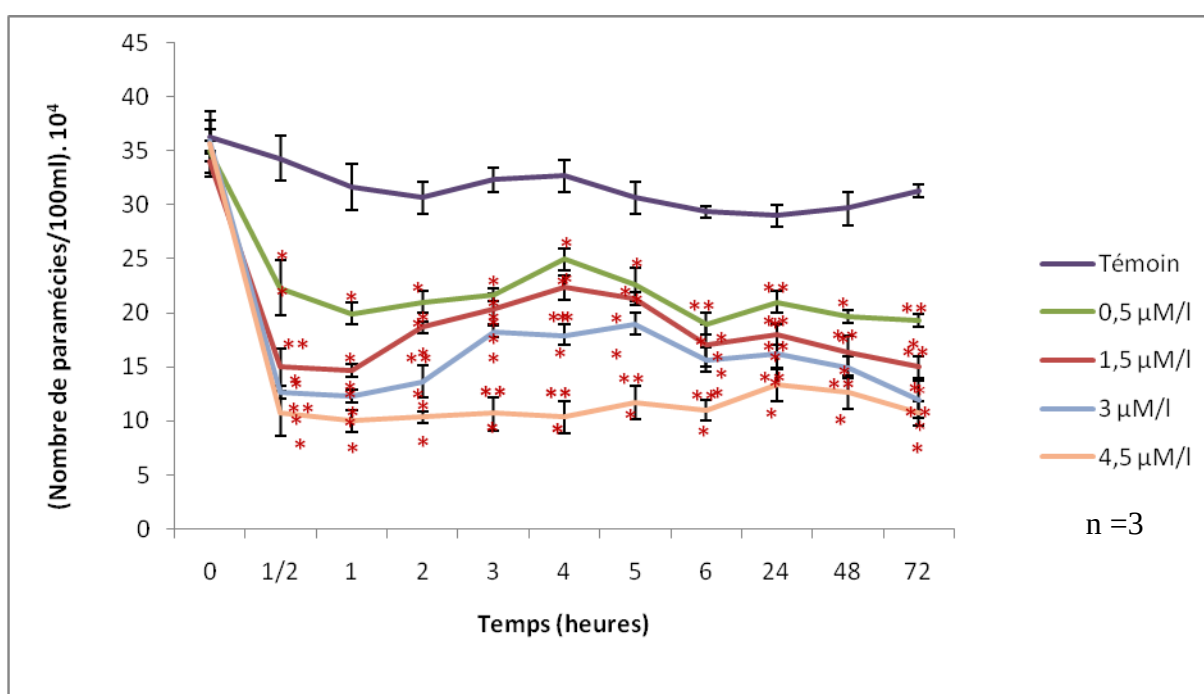


Figure 16 : Cinétique de croissance des paramécies traitées aux concentrations croissantes d'EMB.

5.1.6 Effets de l'Emamectine benzoate sur le pourcentage de réponse des paramécies

Le pourcentage de réponse permet d'évaluer les effets de l'EMB aux différentes concentrations sur la viabilité des paramécies et confirmer ainsi les résultats obtenus concernant la cinétique de croissance du protiste.

La figure (17) montre que le pourcentage de réponse des paramécies évolue d'une manière dose-dépendante et proportionnelle aux concentrations croissantes de l'insecticide. On remarque qu'il est dans l'intervalle de 28 à 38% pour la plus faible concentration qui est de 0,5 $\mu\text{M/l}$ et atteint 54 à 69% pour la plus forte concentration (4,5 $\mu\text{M/l}$).

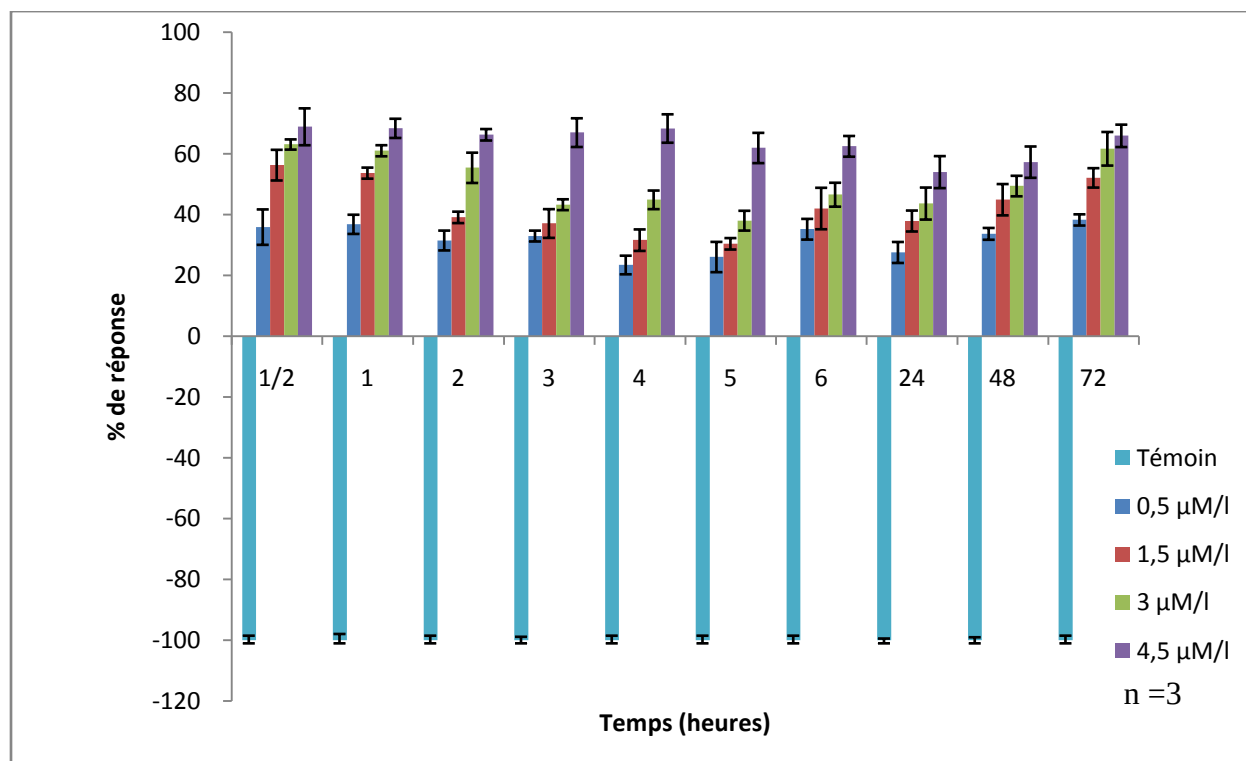


Figure 17 : Pourcentage de réponse des paramécies traitées aux concentrations croissantes d'EMB.

6 Discussion

Les bioindicateurs de la pollution environnementale sont sensibles aux variations physicochimiques de leurs milieux, notamment la température (Bride et *al.*, 1993), les fréquences électromagnétiques (Regoli et *al.*, 2006) et toute forme de pollution urbaine (Terfaya et *al.*, 2006), mais également sensible vis-à-vis des xénobiotiques variés tels que les hydrocarbures (Ismart et *al.*, 2002), les éléments traces métalliques (Gomot, 1997), ou encore les pesticides (Coeurdassier et *al.*, 2002 ; Vidal 2001 et Rouabhi, 2005).

Ainsi, toutes les études sur les bioindicateurs, convergent vers l'idée que les espèces *Helix* et *Paramecium* sont d'excellents modèles biologiques pour toutes les études ecotoxicologiques, toxicologiques et pour la compréhension des mécanismes d'action des xénobiotiques. (Benbouzid et *al.*, 2012, Grara, 2011).

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la toxicité de l'Emamectine benzoate sur les deux modèles biologiques que nous avons choisis et ce à travers le suivi de l'évolution du poids corporel ainsi que celui de certains organes chez l'escargot et sur la cinétique de croissance des paramécies en tant que modèle cellulaire alternatif.

En effet, les modifications du comportement ainsi que la diminution des taux de survie, de croissance et de reproduction peuvent conduire à une modification de la dynamique d'une population, voire à la disparition de l'espèce dans l'habitat pollué (Caswell, 2001).

Ainsi concernant l'effet de l'EMB sur le poids de l'escargot montre une diminution importante de celui-ci particulièrement à la plus forte concentration de l'insecticide, ceci constitue le premier indice d'une toxicité potentielle. Cette diminution est expliquée probablement par la réduction de la consommation alimentaire constatée chez les escargots traités aux fortes concentrations de l'insecticide, comme le stipulent Hames et Hopkin, (1989) qui expliquent cela par les variations des sécrétions d'enzymes digestives. Ainsi, Hopkin, (1990) et Bibic et *al.* (1997) stipulent que dans un environnement pollué, l'animal se met dans un état de jeûne prolongé. Dans le même ordre d'idées, Zaouani (2010), a étudié la toxicité aiguë et subchronique de l'Emamectine benzoate sur le rat Wistar, il a également mis en évidence une diminution du poids corporel, cet effet est fréquemment observé lors d'une exposition subchronique aux avermectines chez le rat par voie orale (Campbell, 1989 ; OMS 1999 ; Environmental Protection Agency EPA, 2006).

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*. Ils ont mis en évidence une inhibition de la croissance chez *Helix aspersa* dès la plus faible concentration, alors qu'elle ne l'est qu'aux plus fortes concentrations chez *Helix aspersa maxima*. Les 2 sous-espèces sont moins sensibles à l'exposition cutanée par rapport au traitement via un sol contaminé qui n'a aucun effet sur la croissance de *Helix maxima*.

Il en est de même pour Lam (1996a) qui a démontré une réduction dose-dépendante des coefficients de consommation et d'absorption de la nourriture chez des adultes de *Radix plicatulus* exposés au Cd.

Où encore El-Wakil et Attia (1999) montrent 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.

L'autre paramètre suivi dans ce travail, concerne le poids de la coquille, nous avons noté une diminution dose –dépendante du poids de la coquille en présence de l'insecticide, nos résultats vont dans le même sens que ceux de Coeurdassier et al. (2001), qui a mis en évidence une inhibition du diamètre de la coquille des escargots après exposition au diméthoate (pesticide à base d'organophosphorés).

Afin de mieux corroborer nos résultats, nous avons suivi l'évolution du poids de deux principaux organes, à savoir l'hépatopancréas et le rein, Nos résultats ont mis en évidence une perturbation du poids de ces organes, en accord avec les traitements de Marigomez et al.(1998) qui ont montré une réduction de 50% du poids de la glande digestive des lingots en présence des xénobiotiques, dans l'étude de Tadjine (2007), la présence de polluants environnementaux serait à l'origine de la diminution du poids des organes mous à savoir le rein et le foie chez le lapin.

L'autre aspect de notre travail, a porté sur l'évolution des paramètres physicochimiques de la paramécie ,les protistes sont des cellules eucaryotes, ubiquitaires dans l'environnement aquatique et terrestre, caractérisées par un court cycle de vie, et une multiplication rapide (Beal et Anderson, 1993) et toute modification de leur milieu pourrait affecter leur comportement, ce qui a conduit à les utiliser comme modèles cellulaires pour l'étude de l'impact des xénobiotiques ainsi que l'évaluation des risques pour la santé (Sauvant et al.,1999). Les contaminations peuvent donner naissance à de nouvelles forces sélectives qui peuvent avoir un indice global sur

la diversité biologique. Ce qui a conduit Cairns en 1978 à suggérer l'utilisation des protozoaires comme bio-indicateurs de la pollution de l'eau.

L'évaluation des effets cytotoxiques d'un xénobiotique peut être réalisée en utilisant différents paramètres, parmi lesquels la croissance cellulaire qui reflète chez les microorganismes l'état du métabolisme de la cellule (Sauvant et *al.*, 1999 ;Perez-Rama et *al.*,2001).

Nos résultats montrent que l'EMB inhibe la croissance des protistes de manière dose-dépendante. Parallèlement, l'observation microscopique des micro-organismes lors de l'étude du paramètre de la croissance cellulaire met en évidence une perte de la mobilité accompagnée des mouvements désordonnés des protistes ciliés, ceci nous amène à confirmer l'influx des xénobiotiques à l'intérieur des cellules, malgré la présence de la membrane cellulaire qui pourrait constituer une barrière contre l'entrée massives des xénobiotiques mais qui reste néanmoins perméable (Beaumont et cassier, 1998). Nos résultats sont en accord avec ceux de Fukushima el *al.* (1979) qui montrent que la paramécie est un micro-organisme très proche des organismes supérieurs, que sa croissance est sensible à divers xenobiotiques dont les métaux lourds ce qui en fait un excellent bioindicateur de la pollution (Fenske et *al.*, 2001). Il en est de même pour les études de Azzouz et *al.* (2011) qui a étudié la toxicité de l'insecticide Amistar Xtra composé de deux molécules l'Azoxystrobin et le Cyproconazole, où encore Sbarati et *al.* (2009) qui ce sont intéressés à l'effet du bifénazate sur *paramecium sp.*où encore Rouabhi (2005) qui a mis en évidence la toxicité de deux pesticides le Diflubenzuron et le Flucycloxuron sur trois modeles cellulaires alternatifs : *Paramecium .sp*, *Tetrahymena pyriformis* et *Tetraselmis suecica*.

Introduction

L'une des nombreuses définitions proposées du biomarqueur est celle d'un «changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997).

Les biomarqueurs ont été classifiés en trois catégories: les biomarqueurs d'exposition, d'effet et de susceptibilité. La frontière entre ces trois catégories étant ténue, certains biomarqueurs peuvent être à la fois des biomarqueurs d'exposition et d'effet, voire de susceptibilité (Timbrell *et al.*, 1994).

1 Les biomarqueurs d'exposition

Ils sont en général impliqués dans les métabolismes de (dé)toxification des xénobiotiques (ex.: cytochromes P450) ou dans les mécanismes de défense cellulaire (ex.: enzymes antioxydantes). Leurs variations peuvent être spécifiques ou non d'une catégorie de contaminants (ex.: induction chez le poisson du cytochrome P450 CYP1A par les HAPs) et n'entraînent pas obligatoirement d'effets délétères. Elles signifient la plupart du temps que l'organisme s'est adapté à une agression extérieure d'ordre chimique (Djekoun, 2012)

2 Les biomarqueurs d'effet

Correspondent à des cibles moléculaires qui, lorsqu'elles sont atteintes, signifient que les mécanismes de défense ou de détoxification de l'organisme n'ont pas été suffisamment efficaces pour contrer l'action néfaste d'un xénobiotique (ex.: indicateurs de stress oxydatif, adduits à l'ADN). Les conséquences peuvent être parfois irréversibles, entraînant à long terme la mort de l'animal ou bien une incapacité à se reproduire. De tels effets peuvent par la suite altérer la structure même des populations et donc des écosystèmes (Vidal, 2001).

3 Les biomarqueurs de susceptibilité

Ils peuvent correspondre à des protéines qui, lorsqu'elles sont surexprimées ou sous exprimées, augmentent la sensibilité d'un organisme à un contaminant. Ces variations d'expression peuvent être dues à des différences génétiques interindividuelles ou résulter d'une

exposition précédente à un xénobiotique, par exemple, un individu présentant une surexpression du cytochrome CYP1A sera plus à même de développer des adduits à l'ADN lorsqu'il sera exposé à des HAPs (synthèse de métabolites hautement réactifs *via* le CYP1A) qu'un individu présentant une expression normale. Par contre, il pourra détoxifier plus efficacement d'autres xénobiotiques (ex.: aflatoxine) et leur sera donc plus résistant (Schlenk, 1999 ; Aarab, 2004).

Seule l'utilisation simultanée de ces trois catégories de biomarqueurs et ce, à plusieurs niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, tissulaire, physiologique) peut apporter des informations pertinentes sur le mode d'action et les effets des xénobiotiques présents dans le milieu (Lagadic et Caquet, 1996).

4 Choix du biomarqueur

Le devenir des xénobiotiques dans les organismes dépend de diverses voies métaboliques mises en jeu face à l'agression de ces agents (Vidal, 2001). En général les changements engendrés par la présence d'un xénobiotique dans l'organisme sont de deux types : la mobilisation au niveau moléculaire, permettant la protection de l'organisme contre les effets néfastes du contaminant, il s'agirait de l'implication des systèmes de défense (détoxification) qui transforment le contaminant en une forme inoffensive et facile à excréter. La deuxième variante est l'induction des effets toxiques qui sont dus, soit au xénobiotique lui-même, par le dépassement des systèmes de défense de l'organisme (conformément à la théorie de *Spill Over*) soit dus aux métabolites, produits de la biotransformation de ce contaminant, qui présentent une toxicité plus élevée que la substance d'origine (Van der Oost *et al.*, 2003). La diversité de la réponse des organismes vis-à-vis des contaminants est à l'origine de la diversité des indicateurs biologiques susceptibles d'être utilisés en tant que biomarqueurs de pollution (Figure 18) (Narbonne et Michel 1993).

De ce fait, la sélection d'un biomarqueur doit se baser sur certains critères pour justifier et rentabiliser l'objectif de son utilisation (Livingstone et Farrar, 1984 ; Moore, 1985 ; Gebel, 2000).

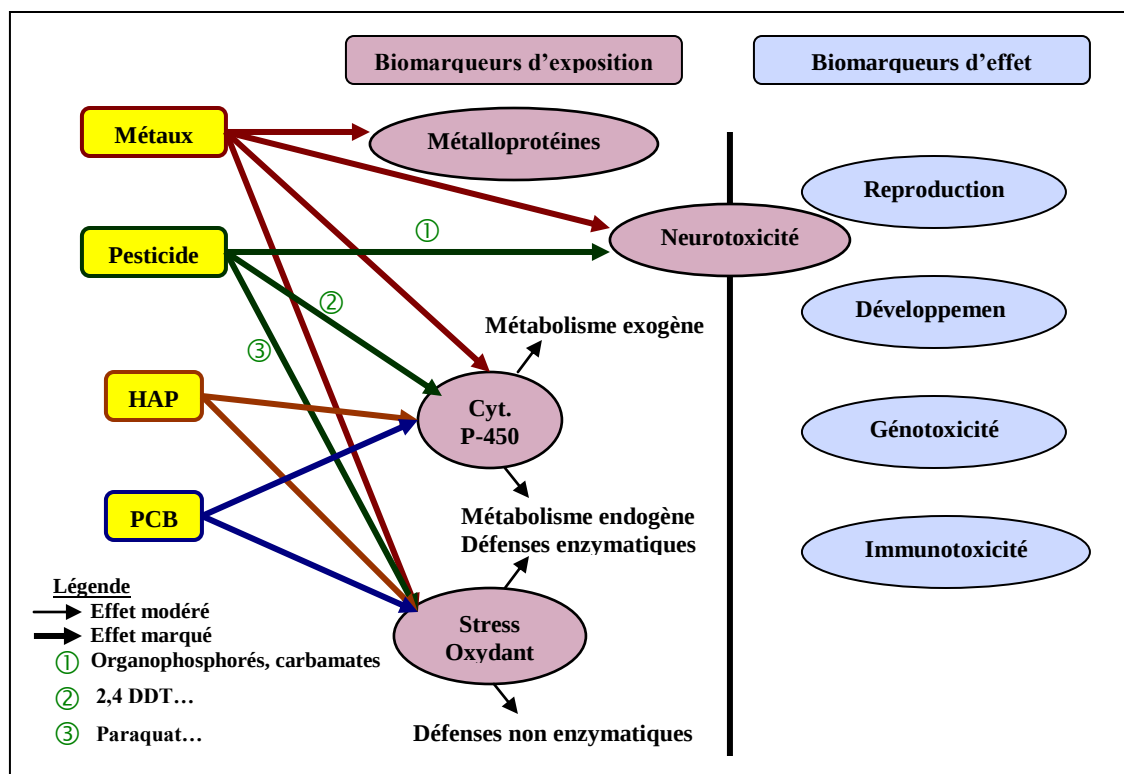


Figure 18 : Relations entre les principaux contaminants et les marqueurs biologiques
(D'après Narbonne et Michel 1993).

L'intérêt des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère aspécifique de leur réponse, ce qui peut être un avantage dans le contexte de l'évaluation d'un stress oxydatif (Vigano *et al.*, 1998), malgré la grande complexité des mécanismes de réponse mis en jeu. Ces mécanismes antioxydants demandent donc à être mieux compris pour définir les paramètres les plus discriminants comme biomarqueurs de choix de l'impact des contaminants sur les organismes (Cossu *et al.*, 1997).

Finalement, seule une approche globale intégrant des analyses chimiques et biologiques (bioindicateurs et biomarqueurs) permet d'évaluer la qualité d'un écosystème et les risques qu'il encourt (figure 19) (Lagadic et Caquet, 1996).

Au cours de ces dernières décennies, le milieu marin et le sol ont fait l'objet d'une multitude d'études environnementales. L'utilisation des biomarqueurs s'est généralisée, essentiellement chez les moules et les poissons (Livingstone, 1993). En comparaison, peu

d'études analogues ont été conduites pour évaluer la qualité des milieux dulçaquicoles (d'eau douce), bien que ces derniers soient largement soumis à diverses pollutions d'origine industrielle, agricole et domestique afin de mettre en place des programmes de surveillance et d'évaluation de la qualité de tels milieux.(Réseau de Bassin Adour-Garonne, 1997).

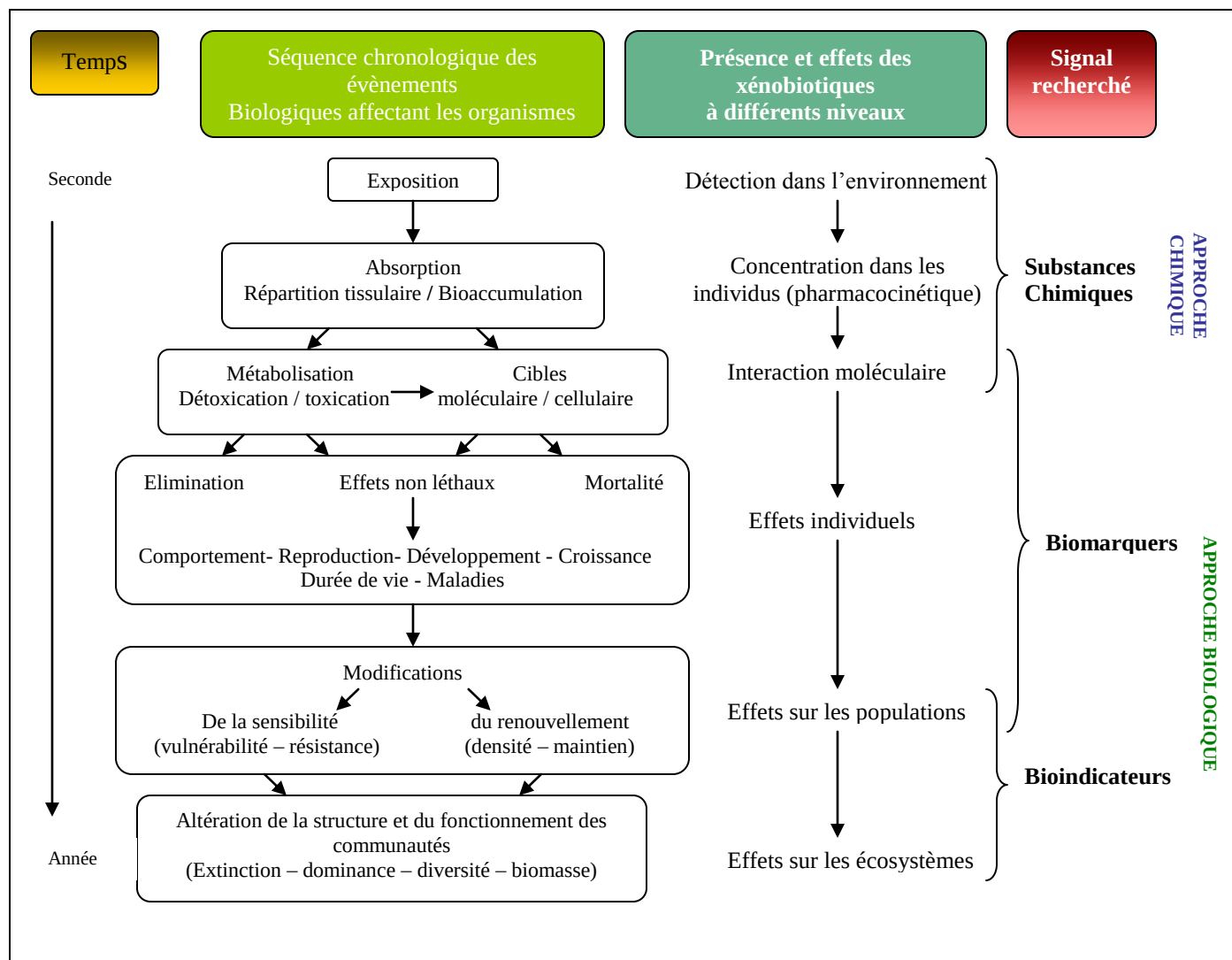


Figure 19 : Evaluation de la qualité d'environnement par une approche globale –chimique et biologique – (d'après Lagadic et Caquet, 1996).

5 Les indicateurs de stress oxydatif

Bien que la consommation d'oxygène soit indispensable à toute forme de vie aérobie, elle entraîne également la formation de composés réactifs - les espèces activées de l'oxygène (EAO) - pouvant exercer de multiples effets délétères sur les composants cellulaires (Aruoma, 1998).

Les EAO sont produites naturellement, soit de manière «accidentelle» par les monooxygénases à cytochrome P450, les chaînes mitochondriales transporteuses d'électrons, via l'autooxydation de certaines molécules (la plupart du temps catalysée par des ions métalliques de transition), soit de manière «délibérée» par des phagocytes activés, des lymphocytes, des fibroblastes, *etc...* (Halliwell et Cross, 1994). Des facteurs exogènes peuvent également initier la synthèse d'EAO: les radiations ionisantes et certains xénobiotiques dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques. L'organisme possède naturellement des systèmes de défense antioxydants lui permettant de piéger ou d'inactiver ces EAO. Cependant, dans certaines conditions ces systèmes ne sont pas suffisants. Ainsi, lorsque l'équilibre entre les forces prooxydantes et les défenses antioxydantes est rompu, les cellules subissent un stress oxydatif. (Lemaire et Livingstone, 1993).

6 Les indicateurs de stress oxydatif chez les mollusques et leur utilisation comme biomarqueurs de pollution

Les principaux systèmes de défense antioxydante ont été mis en évidence chez les invertébrés aquatiques (Winston et Di Giulio, 1991; Lemaire et Livingstone, 1993). En particulier, chez la moule *Mytilus edulis*, l'activité CAT est principalement peroxysomiale, l'activité SOD est cytosolique (SOD à cuivre et zinc) et mitochondriale (SOD à anganèse) et les activités GPXs (Sélénium-dépendante et -indépendante) sont principalement cytosoliques (Livingstone, 1993). Les activités CAT, SOD et GPX Sélénium-dépendante sont plus importantes dans la glande digestive que dans les branchies ou les tissus musculaires (Gamble *et al.*, 1995). Outre les enzymes antioxydantes, les molécules antioxydantes de faible poids moléculaire sont également présentes chez les moules et sont principalement localisées dans la glande digestive et les branchies: vitamines E, C et A, GSH (Ribera *et al.*, 1989). Chez les invertébrés aquatiques, de nombreuses études ont mis en évidence la modulation des activités CAT, SOD et GPX, des concentrations en molécules antioxydantes mais également du niveau de peroxydation lipidique après exposition à certains xénobiotiques dont les métaux lourds et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. D'une manière générale, un indicateur de stress oxydatif peut présenter diverses réponses (parfois même contradictoires) après exposition d'un même organisme à un même xénobiotique. Cela peut être dû à des différences concernant le mode, la dose et/ou la durée d'exposition. Cependant, les indicateurs de stress oxydatif sont également

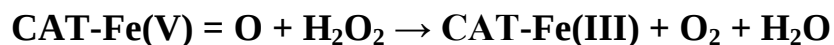
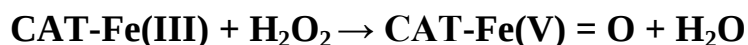
sujets à de fortes variations saisonnières, ce qui peut compliquer l'interprétation des résultats (Viarengo *et al.*, 1991; Power et Sheehan, 1996).

7 Objectif du travail

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence un stress oxydant potentiel induit par l'Emamectine benzoate sur *Helix aspersa*. et *Paramecium sp.* et ce à travers le suivi de certains biomarqueurs du stress au niveau cellulaire.

Pour cela, nous nous sommes intéressés :

- Aux Protéines qui sont les premiers biomarqueurs d'une perturbation du métabolisme.
- Le malonedialdéhyde (MDA) qui est souvent pris en considération pour évaluer le degré de peroxydation lipidique. Il se forme à partir d'acides gras polyinsaturés possédant au moins 43 doubles liaisons successives (Janero, 1990).
- La catalase qui est une enzyme présente chez tous les organismes aérobies. Chez les eucaryotes, elle est principalement située à l'intérieur des peroxysomes (corpuscules cytoplasmiques entourés d'une membrane simple). Ces derniers contiennent également des oxydases, génératrices de peroxyde d'hydrogène. La plupart des CAT sont formées de quatre sous-unités identiques contenant chacune un ion Fe^{3+} situé dans un noyau héminique (Pelmont, 1995). La CAT transforme le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau moléculaires, selon la réaction suivante :



- Le glutathion est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire (Pompella *et al.*, 2003). En interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD, ce qui témoigne, là encore, de l'importance de la coopération entre les différents

systèmes de défense anti-radicalaire (Appel et Hirt, 2004). Outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau dans la défense anti radicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase. L'étude de ce composé semble donc justifiée (Pompella et *al.*, 2003).

- **Les glutathion S-transférases**

- Dans les mécanismes de (dé)toxification, la GST fait partie des enzymes de la phase II, son rôle essentiel est de coupler un groupement hydrosoluble à un xénobiotique préalablement métabolisé ou non par les enzymes de la phase I afin de le rendre lui-même plus hydrosoluble et donc plus facilement excrétable par l'organisme, Les GSTs catalysent la conjugaison d'un tripeptide, le glutathion réduit (α -glutamyl-cystéinyglycine: GSH) à une multitude de substrats hydrophobes présentant un centre électrophile (Beckett et Hayes, 1993). Les GST ont été mises en évidence chez la plupart des êtres vivants tels que la levure (Foley et Sheehan, 1998), les mollusques (Fitzpatrick et Sheehan, 1993; Fitzpatrick et *al.*, 1995a ; Blanchette et Singh, 1999), les vers de terre (Stenersen et *al.*, 1979, Borgeraas et *al.*, 1996), les crustacés (Keeran et Lee, 1987; Leblanc et Cochrane, 1987), les insectes (Stenersen et *al.*, 1987; Prapanthadara et *al.*, 1996), les poissons (George et Young, 1988; Martínez-Lara et *al.*, 1997; Pérez-López et *al.*, 2000), les mammifères (Habig et *al.*, 1974; Kamisaka et *al.*, 1975; Rouimi et *al.*, 1996; Bolton et Ahokas, 1997) et les plantes (Pascal et *al.*, 1998; Hong et *al.*, 1999).
- A l'origine, l'intérêt pour les GSTs provient de leur participation dans la voie de biosynthèse des acides mercapturiques, molécules solubles dans l'eau et facilement excrétées par l'organisme. La réaction de conjugaison entre le GSH et les xénobiotiques représente en effet la première des quatre étapes menant à leur formation, Les GSTs ont été depuis largement étudiées chez les mammifères, plus particulièrement chez le rat et l'humain et de nombreux rôles leur ont été attribués. (Beckett et Hayes, 1993).

- La principale activité catalytique des GSTs est de faciliter la formation ou la stabilisation de l'anion thiolate. Celui-ci peut ensuite attaquer le centre électrophile (atome de carbone, d'oxygène, de soufre ou d'azote) d'un autre substrat. Le composé en résultant est un conjugué thioéther (Beckett et Hayes, 1993). La réaction générale est la suivante (Armstrong, 1991):



E : Enzyme

R-X: substrat possédant un centre électrophile

- Outre leur capacité à former des conjugués thioéthers avec le GSH, les GSTs peuvent également catalyser d'autres réactions telles que la lyse des groupements thiols, la réduction d'hydroperoxydes organiques (réaction de type peroxydase) ou l'isomérisation de certains stéroïdes. (Van Bladeren, 1988).
- Les GSTs peuvent détoxifier un large spectre de xénobiotiques initialement électrophiles ou devenus électrophiles après métabolisation. Ces composés peuvent être des herbicides ou des pesticides (thiocarbamates, organophosphates), des amines aromatiques, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzo[a]pyrène -B[a]P-), des toxines (aflatoxine B1) ou des substances pharmaceutiques (paracétamol, nitroglycérine, bromosulfophthaléine). Parmi ces xénobiotiques, Les GSTs sont capables de conjuguer les époxydes et leurs dérivés et constituent donc un système essentiel de protection (Hinson et Kadlubar, 1988).

8 Matériel et méthodes

8.1 *Helix aspersa*.

Afin de suivre l'évolution des biomarqueurs biochimiques, les escargots sont sacrifiés directement (à la fin de chaque traitement), sans jeûn préalable qui pourrait modifier les niveaux d'expression des molécules recherchées.

Après dissection nous prélevons l'hépatopancréas et nous le subdivisons en 5 fragments respectivement pour le dosage:

- Des Proteines totales.
- Du Glutathion (GSH).
- De l'activité Glutathion-s-transférase (GST).
- De l'activité Catalase.
- Du taux de Malondialdehyde (MDA).

8.2 *Paramecium* sp.

Pour suivre l'évolution des biomarqueurs biochimiques, après chaque temps de traitement, les aliquotes de paramécies ont été centrifugés à (15000 rpm/10 min), puis les culots sont conservées dans les solutions tampon.

9 Méthodes

9.1 Dosage des Protéines

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de Bradford (1976), la lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre visible (JENWAY 6300). La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une protéine standard, l'albumine sérum de bœuf (BSA).

9.2 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-mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion.

La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc, où les 500 µl du surnageant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée.

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

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

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 ($-\text{SH}$).

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.

9.3 Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Les malondialdéhydes (MDA) sont dosé selon la méthode de Draper et Hadley (1990). Cette méthode est 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 :

$$X = \frac{\Delta Do \cdot Vt}{156 \cdot Vs} / \text{mg de protéines}$$

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.

156 : coefficient d'extinction molaire du TBA.

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

Vs : volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0,5 ml.

9.4 Mesure 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.

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

$$X = \frac{\Delta Do \cdot 10}{\epsilon \cdot L \cdot 0,05} / \text{mg de protéines}$$

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 $0,0040 \text{ m M}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$

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

9.5 Mesure 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).

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

$$X = \frac{\Delta Do \cdot V_t}{9,6 \cdot V_s} / \text{mg de protéines}$$

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

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

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

9.6 Etude polarographique

L'activité respiratoire des paramécies est mesurée grâce à une électrode à oxygène de type Hansentech selon la méthode de Djebbar et Djebbar (2000). Cette technique utilisée pour la mesure de l'activité respiratoire des mitochondries, a été adaptée au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire pour le suivi du métabolisme respiratoire des microorganismes (paramécies et levures) ainsi que les racines (Sbartai *et al.*, 2009 ; Rouabhi *et al.*, 2006 et Benbouzid *et al.*, 2012).

9.7 Analyse statistiques des résultats

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

10 Résultats

- Cas des paramécies

10.1 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le taux des protéines totales

- Effets à court terme

Afin de suivre les différentes activités enzymatiques impliquées dans la métabolisation et /ou la détoxification du xénobiotique, nous avons procédé en premier lieu à l'évaluation du taux de protéines totales.

La figure (20) représente l'évolution du taux de protéines en fonction des différentes concentrations de l'EMB à court terme. Nous constatons que ce paramètre tend à augmenter de manière dose dépendante et hautement significative ($p \leq 0,001$).

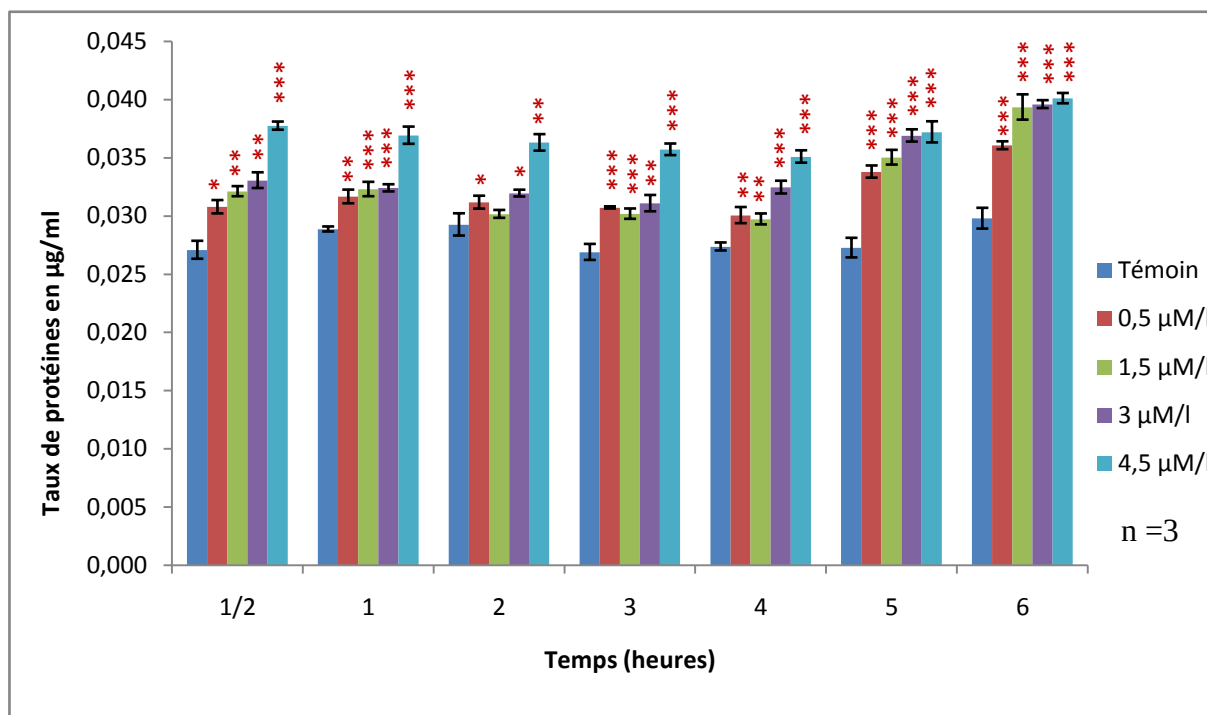


Figure 20 : Effets à court terme des concentrations croissantes d'EMB sur le taux des protéines totales.

- Effets à long terme

La figure (21) illustre les variations du taux de protéines totales en fonction de concentrations croissantes d'EMB aux temps longs, nous constatons que les taux de protéines totales augmente d'une manière significative à hautement significative après 24,48 et 72 H de traitement, nous constatons également que cette augmentation est dose dépendante. ($p \leq 0,001$).

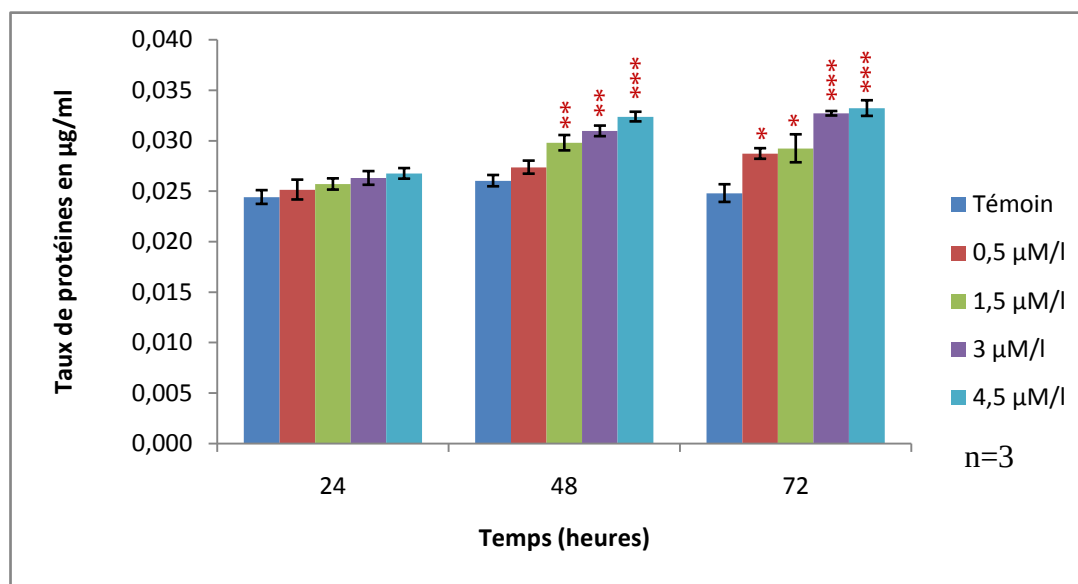


Figure 21 : Effets à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur le taux des protéines totales.

10.2 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de GSH et l'activité GST

Tableau 03 : Effets à court terme des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de GSH et l'activité GST

Paramètres		GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protéines)					GST ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines)				
Traits ($\mu\text{M}/\text{l}$)	Temps	0 m $\pm$ sd	0.5 m $\pm$ sd	1.5 m $\pm$ sd	3 m $\pm$ sd	4.5 m $\pm$ sd	0 m $\pm$ sd	0.5 m $\pm$ sd	1.5 m $\pm$ sd	3 m $\pm$ sd	4.5 m $\pm$ sd
1H		0.0062 $\pm$ 0.0002	0.0058 $\pm$ 0.00037	0.0048 $\pm$ 0.00055	0.0050 $\pm$ 0.00058	0.0029 $\pm$ 0.0003	4.78 $\pm$ 0.398	16.14 $\pm$ 1.966	17.89 $\pm$ 2.665	28.74 $\pm$ 4.859	30.48 $\pm$ 3.859
				**	*	***		***	***	***	***
3H		0.0066 $\pm$ 0.0002	0.0051 $\pm$ 0.0002	0.0044 $\pm$ 0.000115	0.0037 $\pm$ 0.000115	0.0020 $\pm$ 0.000251	5.60 $\pm$ 1.588	16.32 $\pm$ 1.177	18.11 $\pm$ 0.966	29.93 $\pm$ 3.064	32.88 $\pm$ 2.115
			***	***	***	***		***	***	***	***
6H		0.0077 $\pm$ 0.00015	0.0042 $\pm$ 0.000152	0.0035 $\pm$ 0.0001	0.0039 $\pm$ 0.000152	0.0021 $\pm$ 0.000264	6.90 $\pm$ 1.346	18.14 $\pm$ 1.904	20.85 $\pm$ 1.490	33.07 $\pm$ 2.024	36.02 $\pm$ 2.759
			***	***	***	***		***	***	***	***

Le tableau (03) représente les variations du taux de GSH et de l'activité GST chez les paramécies traitées aux concentrations croissantes d'EMB. Nous constatons une diminution dose-dépendante et très significative du taux de GSH parallèlement à une augmentation dose-dépendante et très significative de l'activité GST ($p \leq 0,001$), particulièrement aux plus fortes concentrations d'EMB (3 et 4,5 $\mu\text{M}/\text{l}$), où nous notons une augmentation de l'ordre de 28,74 et 30,48 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines par rapport aux témoins qui est de l'ordre de 4,78 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

Tableau 04 : Effets à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de GSH et l'activité GST.

Paramètres		GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protéines)					GST ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines)				
Traités ($\mu\text{M}/\text{l}$)	Temps	0 m $\pm$ sd	0.5 m $\pm$ sd	1.5 m $\pm$ sd	3 m $\pm$ sd	4.5 m $\pm$ sd	0 m $\pm$ sd	0.5 m $\pm$ sd	1.5 m $\pm$ sd	3 m $\pm$ sd	4.5 m $\pm$ sd
24H		0.0078 $\pm$ 0.00032	0.0032 $\pm$ 0.00030	0.0029 $\pm$ 0.0001	0.0026 $\pm$ 0.00020	0.0019 $\pm$ 0.00050	8.77 $\pm$ 1.492	19.55 $\pm$ 3.210	21.25 $\pm$ 2.588	31.63 $\pm$ 2.403	36.14 $\pm$ 2.343
			***	***	***	***		**	**	***	***
48H		0.0075 $\pm$ 0.00015	0.0058 $\pm$ 0.00015	0.0029 $\pm$ 0.00014	0.0025 $\pm$ 0.00010	0.0020 $\pm$ 0.00030	12.71 $\pm$ 2.020	21.70 $\pm$ 2.116	22.38 $\pm$ 2.644	25.89 $\pm$ 2.317	20.18 $\pm$ 3.183
			***	***	***	***		**	**	**	*
72H		0.0070 $\pm$ 0.00051	0.0059 $\pm$ 0.00015	0.0032 $\pm$ 0.00010	0.0025 $\pm$ 0.00020	0.0015 $\pm$ 0.00034	10.19 $\pm$ 3.160	22.15 $\pm$ 2.475	23.20 $\pm$ 2.838	18.85 $\pm$ 2.102	10.67 $\pm$ 2.037
			*	***	***	***		**	**	**	

Le tableau (04) met en évidence l'effet des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de GSH et l'activité GST des paramécies traitées. Les résultats mettent en évidence une diminution-dose dépendante et très significative du taux de GSH, parallèlement à une augmentation dose-dépendante et très significative de l'activité GST ($p \leq 0,001$). Nous notons également une différence de l'ordre de 36,14 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines par rapport aux témoins qui est de l'ordre de 8,77 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, particulièrement pour les traités à 24H.

10.3 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le MDA

Tableau 05 : Effets à court terme des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de MDA

Paramètre		MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protéines)				
Traités ($\mu\text{M}/\text{l}$)	Temps	0 m $\pm$ sd	0.5 m $\pm$ sd	1.5 m $\pm$ sd	3 m $\pm$ sd	4.5 m $\pm$ sd
1H		0.0118 $\pm$ 0.00065	0.0160 $\pm$ 0.00085	0.0200 $\pm$ 0.00035	0.0227 $\pm$ 0.00385	0.0099 $\pm$ 0.00166
			**	**	**	
3H		0.0108 $\pm$ 0.00068	0.0156 $\pm$ 0.00027	0.0230 $\pm$ 0.00066	0.0110 $\pm$ 0.00039	0.0135 $\pm$ 0.00044
			***	**		**
6H		0.0201 $\pm$ 0.00107	0.0177 $\pm$ 0.00350	0.0207 $\pm$ 0.00051	0.0234 $\pm$ 0.00350	0.0157 $\pm$ 0.00486

Le tableau (05) illustre les variations du taux de MDA chez les paramécies traitées par les concentrations croissantes d'EMB. Les résultats mettent en évidence une augmentation dose-dépendante et très significative du taux de MDA ($p \leq 0,01$), par contre à la plus forte concentration nous remarquons une diminution non significative de ce paramètre ($p \leq 0,05$), cette diminution est de l'ordre de (77%) par rapport aux témoins.

Tableau 06 : Effets à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur le MDA

Paramètre		MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protéines)				
Temps	Traités ($\mu\text{M}/\text{l}$)	0	0.5	1.5	3	4.5
		m $\pm$ sd	m $\pm$ sd	m $\pm$ sd	m $\pm$ sd	m $\pm$ sd
24H		0.0249 $\pm$	0.0264 $\pm$	0.0306 $\pm$	0.0339 $\pm$	0.0497 $\pm$
		0.00015	0.000556	0.0000153	0.0001	0.00001
48H		0.0382 $\pm$	0.0354 $\pm$	0.0378 $\pm$	0.0573 $\pm$	0.0877 $\pm$
		0.00025	0.00001	0.000152	0.000152	0.00001
72H		0.0451 $\pm$	0.0644 $\pm$	0.0507 $\pm$	0.0728 $\pm$	0.0884 $\pm$
		0.0002	0.0002	0.0077	0.0002	0.000152

Le tableau (06) met en évidence les variations du taux de MDA chez les protistes traités à long terme par des concentrations croissantes d'EMB. Nous remarquons une augmentation hautement significative, dose-dépendante et en fonction du temps particulièrement aux plus fortes concentrations d'EMB ($p \leq 0,001$). ainsi pour les traités à la concentration de (4,5 $\mu\text{M}/\text{l}$), le taux de MDA est de l'ordre de 0,0884 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines alors qu'il est chez les témoins de l'ordre de 0,0451 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines.

10.4 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Catalase

- Effet à court terme

La figure (22) met en évidence l'effet des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité catalase des paramécies traitées à court terme, nous remarquons une augmentation non significative et dose dépendante de l'activité catalase ($p > 0,05$).

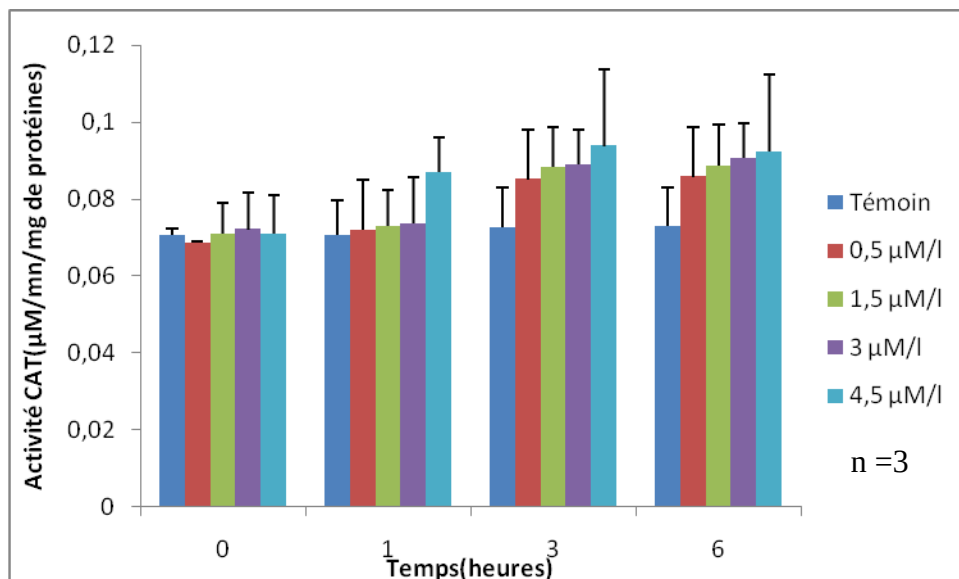


Figure 22 : Effets à court terme des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Catalase.

- **Effets à long terme**

La figure (23) montre que l'activité catalase chez les paramécies traitées à long terme par des concentrations croissantes d'EMB augmente d'une manière très significative et dose dépendante l'activité catalase chez les paramécies traitées ($p \leq 0,01$) et ce par rapport aux témoins.

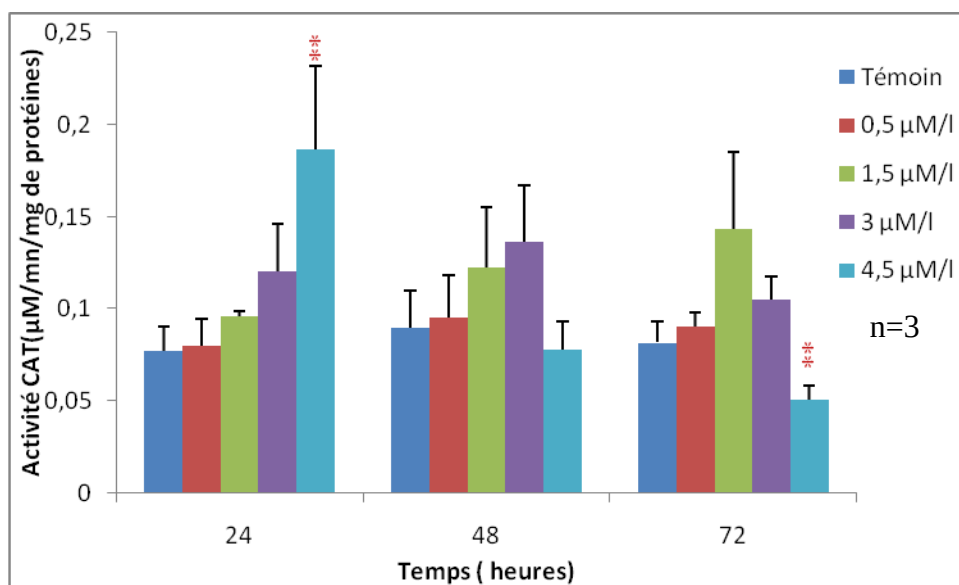


Figure 23 : Effets à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Catalase.

10.5 Effets de l'Emamectine benzoate sur le métabolisme respiratoire des paramécies

La figure (24) illustre les effets des différentes concentrations de l'Emamectine benzoate sur le métabolisme respiratoire des paramécies. Ainsi, il ressort de cette figure, que les cellules traitées consomment plus d'oxygène, cette consommation semble dose dépendante jusqu'à la plus forte concentration d'EMB (4,5 $\mu\text{M/l}$), le taux d'oxygène dans le milieu est de l'ordre de 448 nmol/ml par rapport au témoin qui est de l'ordre de 101 nmol/ml.

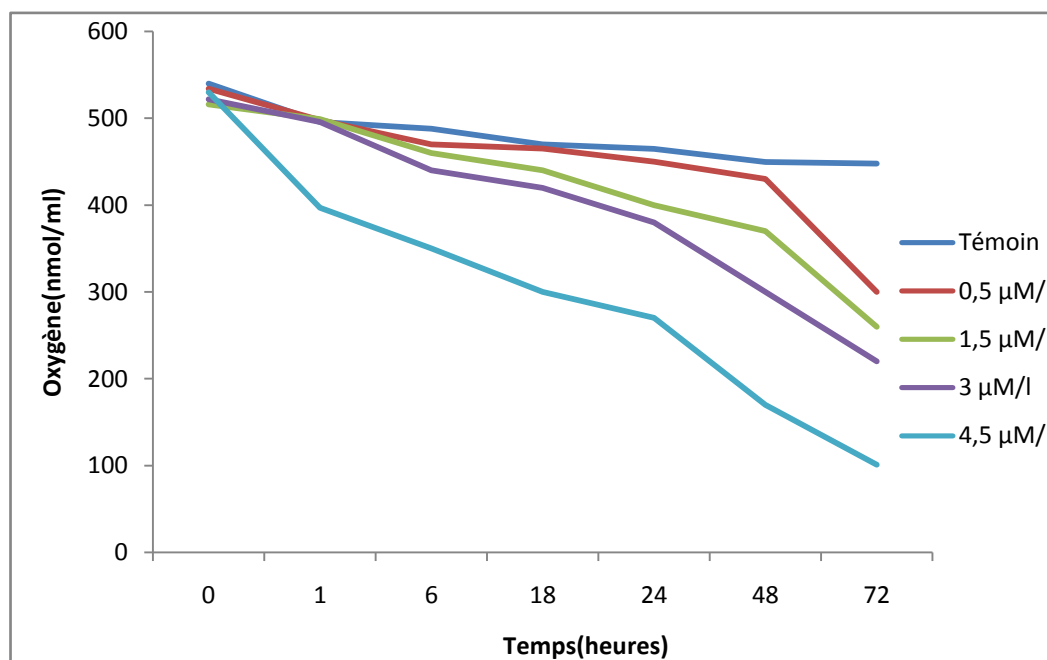


Figure 24 : Effets à court et à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur le métabolisme respiratoire des paramécies

• Cas des escargots

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au comportement d'un bioindicateur, bioaccumulateur en l'occurrence, l'escargot *Helix aspersa* et ce en vue d'entreprendre une étude comparative entre deux organismes appartenant à deux règnes différents et leurs réponses biologiques vis-à-vis du xénobiotique.

10.6 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de protéines

La figure (25) met en évidence une augmentation dose-dépendante du taux de protéines chez les escargots traités avec l'EMB après 7 et 15 jours de traitement, cette augmentation du pool protéique est hautement significative après 15 jours de mise en contact avec le pesticide ($p \leq 0,001$).

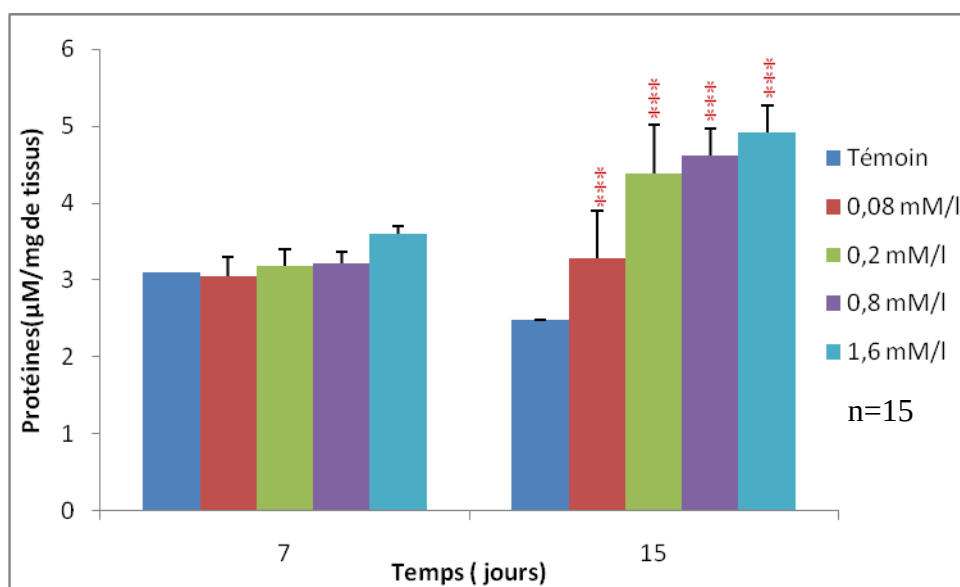


Figure 25 : Variations de la teneur en protéines au niveau de l'hépatopancréas des escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB.

10.7 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Catalase

La figure (26), met en évidence les variations de l'activité catalase au niveau de l'hépatopancréas des escargots, après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB. Nous remarquons que l'activité de cette enzyme tend à augmenter d'une manière très significative ($p \leq 0,01$) et dose dépendante, particulièrement après 15 jours de mise en

contact avec l'EMB où nous remarquons une activité maximum de l'ordre de 6 à 6,5 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines pour les escargots traités avec respectivement 0,08 et 0,2 mM/l d'EMB.

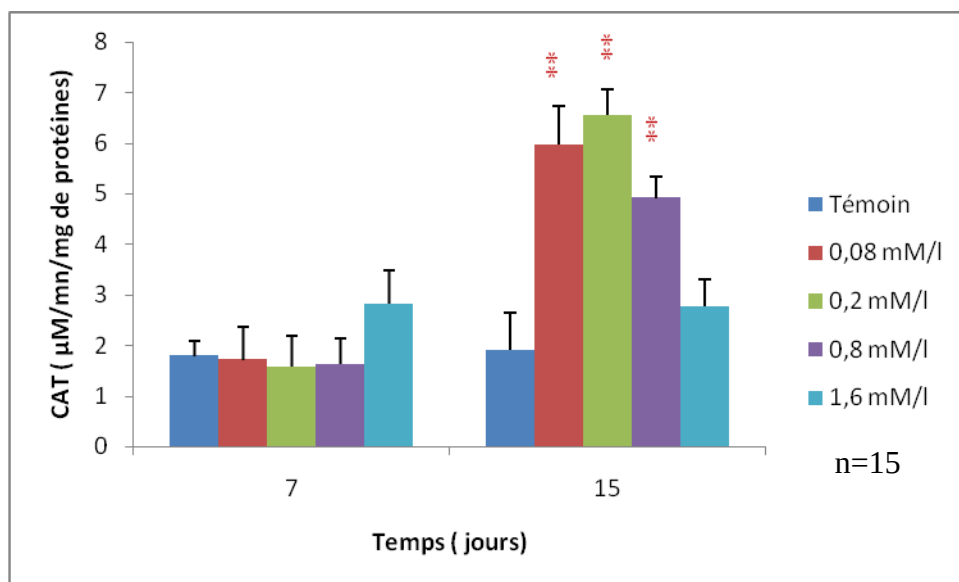


Figure 26 : Variations de l'activité Catalase au niveau de l'hépatopancréas des escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB.

10.8 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le taux du glutathion et sur l'activité GST

Tableau 07 : Variations de l'activité GST et du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas des escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB.

Paramètres		GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protéines)					GST ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines)				
Traités (mM/l)		0	0.08 m± sd	0.02 m± sd	0.8 m± sd	1.6 m± sd	0 m± sd	0.08 m± sd	0.02 m± sd	0.8 m± sd	1.6 m± sd
Temps											
7j		2.124±	1.703±	1.550±	1.336±	1.240±	0.0022±	0.0007±	0.0020±	0.0036±	0.0055±
		0.041	0.105	0.229	0.090	0.108	0.0005	0.0001	0.0001	0.0024	0.0008
			**	**	***	***		**			***
15j		1.976±	1.776±	1.390±	0.722±	0.338±	0.0034±	0.0098±	0.0128±	0.0254±	0.0339±
		0.241	0.068	0.122	0.072	0.058	0.0002	0.0035	0.0046	0.0042	0.0002
				**	***	**		*	**	***	***

Le tableau (07) illustre le taux de GSH et l'activité GST chez les escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB, nous remarquons une diminution dose-dépendante et très significative du taux de GSH ($p \leq 0,001$), parallèlement à une augmentation hautement significative de l'activité GST ($p \leq 0,001$), particulièrement pour la plus forte concentration d'EMB (4,5 $\mu\text{M/l}$), où nous notons une augmentation de l'ordre de 60%.

10.9 Effets des concentrations croissantes d'EMB sur le taux de MDA

Tableau 08 : Variations du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas des escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB.

Paramètre		MDA ($\mu\text{M/mg}$ protéines)				
Temps	Traités (mM/l)	0 m $\pm$ sd	0.08 m $\pm$ sd	0.02 m $\pm$ sd	0.8 m $\pm$ sd	1.6 m $\pm$ sd
7j		163.56 $\pm$ 6.575	171.99 $\pm$ 5.726	180.22 $\pm$ 3.171	222.16 $\pm$ 10.623	245.86 $\pm$ 5.760
					**	***
15j		178.23 $\pm$ 5.314	263.54 $\pm$ 7.720	333.72 $\pm$ 5.200	348.84 $\pm$ 5.931	339.98 $\pm$ 5.987
			***	***	***	***

Le tableau (08) illustre l'évolution du taux de MDA chez les escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB. Nous constatons que ce paramètre tend à augmenter de manière dose-dépendante et hautement significative ($p \leq 0,001$), ainsi pour les traités à la plus forte concentration d'EMB (1,6 mM/l), le taux de MDA est de 339,98 $\mu\text{M/mg}$ de protéines alors que chez les témoins il est de l'ordre de 178,23 $\mu\text{M/mg}$ de protéines.

11 Discussion

Dans quelle mesure les réponses des biomarqueurs cellulaires étudiés dans ces travaux permettent-elles de mettre en évidence la présence ou l'effet d'une toxicité ?

Dans ce chapitre nous avons utilisé l'approche biochimique et enzymatique sur *Helix aspersa* et *Paramecium sp.* pour définir le degré de toxicité induit par le biopesticide à base d'Emamectine benzote.

Dans un premier temps nous avons mis en évidence une augmentation du pool des protéines chez les deux modèles biologiques en présence de l'insecticide. Ce phénomène a été décrit par Massaya et *al.*(2002) qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux des protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapin), Dans le même ordre d'idées Sbartaï et *al.*(2009), ont montré que les manifestations toxiques du bifénazate (acaricide) sur la paramécie, ont été accompagnées par une induction dose dépendante de la synthèse protéique chez les paramécies, le même effet a été constaté après le traitement de protistes cilié avec quatre acaricides Chlorfenapyr, Fenazaquin, Fenbutatin oxyde et Tebufenpyrad (Benbouzid, 2007) .

Soumis à un stress exogène, les microorganismes ont la capacité de développer toute une batterie de réponses capables d'enclencher un processus de détoxification, vis-à-vis des xénobiotiques afin de lutter, et/ou de s'acclimater face au stress chimique (Lagadic et *al.*, 1997 ; Perez-Rama, 2001). Ce processus est d'ordre biochimique et consiste entre autres en la synthèse de protéines.

Cette augmentation du pool protéique suggère une induction de la synthèse d'enzymes de détoxification et de métabolisation, cette hypothèse est confirmée par l'évolution des activités enzymatiques que nous avons suivi dans cette partie de notre travail.

Partant du principe que tout type de stress chimique peut provoquer une libération de radicaux libres dans l'organisme (Aurousseau, 2002), une altération des composants cellulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement. Tous les composants cellulaires peuvent être touchés : lipides, protéines, et donc les membranes dans leur ensemble (Radi et *al.*, 1991 ; Haliwell et Chirico, 1993), glucides et ADN (Jaeschke 1995 ; Meneghini 1997).

Les protistes sont capables de synthétiser une multitude de protéines et d'enzymes spécifiques à la détoxification leur permettant de maintenir à un niveau suffisamment bas les concentrations intracellulaires de polluant. De nombreuses études confirment le rôle des protéines du stress chez les microorganismes (Piccini et *al.*, 1994 ; Massaya et *al.*, 2002 ; Redouane-Salah, 2004). Ainsi de fortes teneurs en protéines totales au niveau de la glande digestive ont été enregistrées à la suite du traitement de l'escargot *Vermiculata eobania* par un carbamate (Radwan et *al.*, 2010). El-Gendy et *al.* (2009), ont évalué le stress oxydant induit par un pesticide à base de cuivre sur l'escargot *thiba pisana*, l'étude a démontré une augmentation du taux de protéines totales chez les animaux traités aux plus fortes concentrations.

Selon Zaouani (2010), une induction des protéines carbonylées chez Le rat Wistar traité par ingestion à l'Emamectine benzoate a été mise en évidence, probablement due à une accumulation d'espèces radicalaires, mais également à une diminution de l'activité du protéasome, système permettant la dégradation des protéines modifiées, en particulier oxydées et l'élimination de molécules dégradées potentiellement impliquées dans le développement de processus cancérogènes (Petropoulos, 2000). Possamai (2006) a montré une augmentation des taux de protéines carbonylées hépatiques chez le rat après une exposition sub-chronique à un insecticide le malathion. Ainsi nos résultats abondent dans le même sens que ceux cités ci-dessus, puisque nous avons mis en évidence une augmentation du taux de protéines totales chez la paramécie et l'escargot soumis à un traitement par l'EMB.

Lorsque des organismes vivants sont soumis à des changements de leur environnement, ils sont soumis à un stress intense, entraînant la mort des organismes sans que ces derniers ne puissent réagir particulièrement lorsque leurs enzymes de détoxifications sont déplétées, ce stress peut être moins intense, permettant alors à l'organisme de déployer une batterie de réponses, à travers l'activation de leurs mécanismes de détoxification, afin de lutter, de survivre et dans certains cas, de s'acclimater à ce nouveau paramètre (Lagadic et *al.*, 1997).

Les biomarqueurs sont des variations biochimiques, physiologiques, histologiques ou morphologiques, mesurées chez des êtres vivants exposés à des conditions de stress liés à la présence de substances chimiques dans l'environnement (Huggett et *al.*, 1992). Il en est ainsi du système GSH/GST intervenant dans les réactions de conjugaison des électrophiles (Huggett et *al.*, 1992 ; Lagadic et *al.*, 1997 ; Kammenga et *al.*, 2000).

Dans notre travail , nous avons mis en évidence une implication de ce système de détoxification à travers une augmentation de l'activité GST et une diminution du taux de GSH chez les deux espèces traitées avec l'EMB, nos résultats sont en accord avec ceux de Azzouz (2012), qui a étudié la toxicité d'un insecticide, à base d'azoxystrobin et de cyproconazole sur *paramecium tetraurelia*, où encore Benbouzid et *al.*(2012), qui ont testé des phosphoramidate sur *paramecium aurelia*. ainsi , l'augmentation de l'activité GST et la diminution du taux de GSH, sont dus au fait que Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales, c'est le thiol cellulaire le plus abondant, impliqué dans le métabolisme, 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 les métaux lourds (Dickinson et Forman 2002 ; Viarengo et Nott, 1993; Viarengo, 1994).

En interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD, outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau dans la défense antiradicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase (Barillet ,2007).

Les glutathion S-transférases (GSTs) sont des enzymes du métabolisme de (dé)toxication de la phase II capables de conjuguer une molécule de glutathion réduit (GSH) au centre électrophile d'un xénobiotique afin de rendre celui-ci plus soluble et donc plus facilement excrétable par l'organisme. Leur expression peut être induite ou inhibée par certains xenobiotiques, ce qui leur confèrent un grand intérêt en tant que biomarqueurs potentiels de la pollution (Vidal, 2001).

Après l'évaluation du stress oxydatif chez l'escargot terrestre *theba pisana* exposé à des pesticides à base de cuivre (oxychlorure de cuivre, hydroxide de cuivre et sulphate de cuivre), El Gendy et *al.* (2009) a mis en évidence une diminution dose dépendante du taux de GSH au niveau de la glande digestive parallèlement à une induction de l'activité GST chez les escargots traités. Il en est de même concernant les travaux de Salama et *al.* (2005), qui a testé trois pesticides, le paraquat dichlorure, le carbofuran et le chlorpyrifos sur l'escargot terrestre *Helix aspersa*. les travaux d'Atailia (2009) et Boucenna (2010) ont mis en évidence l'implication du système GSH/GST chez des escargots *Helix aspersa* traités avec des xénobiotiques terrestres (poussières métallique). Ces résultats ont été confirmés lors de nos expérimentations, puisque nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité GST au niveau de l'hépatopancréas

ainsi qu'une diminution du taux de GSH confirmant ainsi l'implication du système de détoxification.

Le dosage de l'activité Catalase dont l'induction ou l'inhibition témoigne de l'état du stress oxydant par excellence, a permis de montrer qu'après traitement des paramécies et des escargots avec l'Emamectine benzoate, l'activité de cet enzyme a été fortement induite, nos résultats corroborent ceux de Banerjee (1999) et Lopeza (2007) qui ont clairement démontrés que les pesticides induisaient l'activité des enzymes antioxydantes, il en est de même pour l'étude de Mountassif et *al.*(2007) qui ont mis en évidence une augmentation de l'activité CAT chez *Tetrahymena pyriformis* soumis à une pollution métallique, le traitement de *paramecium aurelia*. avec des phényl phosphoramidates a mis en évidence une induction de l'activité CAT (Benbouzid, 2012) , il en est de même pour le travail de Azzouz (2012) qui a mis en évidence une forte induction de l'activité CAT chez *paramecium tetraurelia*. traités avec le pesticide Amistar Xtra et le Glyphosate, l'étude de Grara et *al.*(2009) a révéler une induction de l'activité CAT chez *Helix aspersa* traités avec des polluants métalliques, c'est aussi le cas pour l'étude de Wenwen et *al.*(2011), qui a étudié l'effet du cadmium chez le crab d'eau douce. En revanche le traitement des rats avec du chlorpyrifos (insecticide,OP) a mis en évidence une diminution des activités des enzymes du type catalase dans le foie, le rein et le cerveau, il en est de même pour l'étude Mekail et Zobayada (2009), qui ont mis en évidence une inhibition de l'activité catalase, chez des rats intoxiqués au Diazinon, carbaryl et lambda-cyhalothrin.

Le MDA est l'aldéhyde actif principal de la peroxydation des acides gras poly insaturés des membranes, c'est également un sous produit de la biosynthèse de la prostaglandine (Coeurdassier, 2001), la peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques (Bebiano et *al.*, 2005) ou d'autres éléments contenant des lipides (Al-Mutairi et *al.*, 2007) . Il s'ensuit une perte de la perméabilité et du potentiel de membrane, une inactivation des récepteurs et des enzymes membranaires (Pampanin et *al.*, 2005). Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules, Ainsi, la peroxydation lipidique est une source endogène des dommages de l'ADN (Marnett, 2002).

Djekoun (2012) et Sbartaï (2013) ont mis en évidence une augmentation du taux de MDA respectivement chez *sacharomyces cerevisiae* et *paramecium sp.* l'étude de Mountassif et *al.*(2007) a mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez *tetrahymena pyriformis* traité avec un polluants métallique, comme c'est le cas pour l'étude de Burgeot (2003) qui a mis

en évidence une augmentation des TBARS chez des rats traités au Carbofuran, Il en est de même pour des rats wistar traités par le proclain (Zaouani 2012). Le stress oxydant, et l'effet génotoxique induit par un pesticide chez l'anguille pré exposé au B-naphthoflavone, a montré l'augmentation de lipides peroxydés durant le traitement (Gravato, 2006), La contamination de l'escargot marin *Lymnaea natalensis* par une eau polluée et sédimenté à montrer un taux élevé en MDA (Siwela, 2010), l'étude de Viarengo et *al.*(1990) a mis en évidence un taux élevé en MDA chez *Mytilus galloprovincialis*, traités avec des métaux lourds (cuivre). Chandran et *al.* (2005) ont mis en évidence une augmentation significative du taux du (MDA) chez le gastéropode *Achatina fulica* après exposition au Cd et Zn, il en est de même pour les travaux de Salama et *al.* (2005) qui ont étudié les effets toxiques sur la peroxydation lipidique chez les rats après exposition à certains pesticides. Ainsi, le traitement par les métaux lourds (poussières et Cadmium seul) est à l'origine d'une peroxydation lipidique traduit par une augmentation du taux de MDA.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux des auteurs cités précédemment, puisque le traitement des deux espèces biologiques avec l'insecticide a provoqué une augmentation dose dépendante de ce biomarqueur de stress, le Proclain semble ainsi induire un stress oxydant dont l'effet délétère serait partiellement contrebalancé par l'induction d'enzymes antioxydantes.

La polarographie nous permet de mesurer le taux d'oxygène consommé par les protistes et ce en présence ou en absence des xenobiotiques et nous savons que les systèmes enzymatiques de détoxification utilisent des molécules d'O₂ pour leur activité, il en est ainsi des mono-oxygénases et des oxydases (Lagadic et *al.*, 1997 ; Bounias, 1999 ; Youbi, 2005) ceci nous amène à poser la question suivante :

Quels sont les effets de l'insecticide testé sur le métabolisme respiratoire ?

Les microorganismes sont avide d'oxygène, c'est l'élément indispensable pour leur vie, ainsi au moment de l'élimination des xénobiotiques, les électrons produits lors de la détoxification de l'organisme par les mono-oxygénase à cytochromes P450 (CYP450), vont réagir avec l'oxygène (Guengerich, 1991). L'oxygène peut également réagir avec les électrons qui échappent à la chaîne respiratoire (Cadenas et *al.*, 1977). La combinaison directe de l'oxygène apporté aux cellules avec ces électrons implique la formation d'un anion superoxyde qui est à l'origine des phénomènes radicalaires, ce dernier peut alors dismuter soit spontanément,

soit de façon enzymatique pour donner de l'eau oxygénée (H_2O_2), qui peut à son tour se transformer en radical hydroxyle $^{\circ}OH$, le plus réactif des radicaux oxygénés libres (ROS).

Dans notre travail, les résultats ont indiqué une perturbation du métabolisme respiratoire chez les micro-organismes traités par les différentes concentrations de l'insecticide étudié par rapport aux cellules témoins.

Nos résultats vont dans le sens que ceux Rouabhi et *al.* (2006) qui a étudié l'effet de Diflubenzuron et le Flucycloxyuron sur la morphologie et la physiologie de *paramecium sp.* ainsi que ceux de Sbartaï et *al.* (2012) et Benbouzid et *al.* (2012) qui ont mis en évidence une perturbation du métabolisme respiratoire respectivement chez *paramecium sp.* et *paramecium aurelia*. Soumises à un stress induit par le bifénazate et des phosphoramidates. Il en est de même pour l'étude de Djekoun et *al.* (2012) qui ont mis en évidence une perturbation du métabolisme respiratoire de *saccharomyces cerevisiae* traité par le cadmium.

L'effet du Chrome (Cr) sur le métabolisme énergétique d'un protiste hétérotrophe, *Euglena gracilis* a mis en évidence une forte inhibition de la respiration des mitochondries isolées (Jasso-Chavez et *al.*, 2010), les auteurs suggèrent que la cytotoxicité du Cr (VI) aurait entraîné la diminution de la respiration, de la glycolyse et par conséquent, une baisse de l'ATP cellulaire. Le transfert des électrons entre les complexes I (NADH FMN déshydrogénase, ND) et II (succinate déshydrogénase, SD), d'une part, et les complexes III et IV (cytochromes a, b et c) d'autre, fait appel au coenzyme Q mitochondrial (ubiquinone, UQ), réduit en ubiquinol (UQH_2) au niveau des complexes I et II et oxydé sous sa forme radicalaire ubisemiquinone, UQH° , puis sous forme ubiquinone lors du transfert des électrons au complexe III. Lors de ce cycle, une partie des électrons s'échappe à partir de la forme intermédiaire radicalaire, UQH° , du coenzyme Q, pour réagir directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et former les anions superoxydes radicalaires, $O_2^{\circ-}$ (Cadenas et *al.*, 1977), d'où la perturbation de la consommation d' O_2 observée dans notre travail. Tous ces travaux sont en accord avec nos résultats.

Introduction

L'Emamectine benzoate exerce une neurotoxicité par l'inhibition de la neurotransmission dans le système nerveux périphérique (Mc Kellar et Benachaoui, 1996).

Pour cela, il a été judicieux de faire un test de neurotoxicité du produit en utilisant comme modèle biologique alternatif *Helix aspersa* et *paramecium sp.*

De nombreuses études ont confirmé l'utilisation de l'escargot *Helix aspersa* comme modèle idéal pour les études de neurotoxicité. Comme de nombreux autres mollusques, l'escargot dispose de neurones géants permettant l'implantation d'électrodes intracellulaires largement utilisées en recherches neurologiques pour mieux comprendre le mode de fonctionnement des neurones humains (Castelluci et Trudeau, 1997).

1 Les cholinestérases

Les cholinestérases (ChE) sont des enzymes pouvant hydrolyser les esters de choline plus rapidement que d'autres substrats. Les vertébrés possèdent deux ChE correspondant à deux gènes distincts, l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Ces deux enzymes se distinguent par leur spécificité envers différents esters de choline (l'Acétylcholine -ACh- et la Butyrylcholine -BCh- pour l'AChE et la BChE, respectivement) et leur réactivité envers divers inhibiteurs (Vidal, 2001).

1.1 Les cholinestérases chez les mollusques

La présence de différentes formes de ChE a été mise en évidence chez plusieurs invertébrés aquatiques tels que l'huître *Crassostrea gigas* (Bocquené et al., 1997), les céphalopodes *Octopus vulgaris* (Talesa et al., 1995) et *Eledone moschata* (Mora et al., 1999a ; Talesa et al., 2001) et la palourde d'eau douce *Corbicula fluminea* (Mora et al., 1999a). Concernant les mollusques bivalves Von Wachtendonk et Neef (1979) ont purifié une AChE globulaire non-membranaire dans l'hémolymphe chez *M. edulis*. Mora et al. (1999 a) ont mis en évidence dans les branchies de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* une forme globulaire de Cholinestérases hydrolysant préférentiellement l'acétylthiocholine (substrat utilisé pour doser l'activité AChE *in vitro* selon Ellman et al., 1961). De par son caractère amphiphile et la présence d'un groupement GPI, elle pourrait être similaire aux formes Ga de type I présentes chez les vertébrés. De plus, les auteurs

n'ont pas exclu la présence d'autres ChE solubles similaires aux formes Ga de type II (amphiphiles mais facilement solubilisées) ou Gna (non-amphiphiles, pleinement solubles). Plus récemment, Talesa *et al.*, (2001) ont purifié deux AChE globulaires hydrophiles similaires aux formes G2na et G4na dans l'hémolymphe de *M. galloprovincialis* ainsi qu'une AChE globulaire amphiphile à groupement GPI similaire à la forme G2a de type I dans les tissus. Cette dernière AChE correspond vraisemblablement à celle purifiée par Mora *et al.* (1999a) Une seule forme de ChE a été mise en évidence chez *C. fluminea* à partir d'extraits d'animaux entiers par Mora *et al.* (1999a). Elle hydrolyse préférentiellement la propionylthioline (d'où son nom de propionylcholinestérase-PChE-) et serait similaire aux formes Ga de type I.

2.2 Les Cholinestérases chez les protistes

Il a été démontré que la paramécie synthétise des molécules fonctionnelles reliées au système GABAergique et cholinergique (Delmonte corrado *et al.*, 2002 ;Trielli *et al.*, 2006), Les résultats des expériences pharmacologiques, réalisées à l'aide des médicaments cholinométiques et les inhibiteurs de l'acétylcholine, a indiqué que le signal de la molécule l'acétylcholine pourrait être impliqué dans la modulation des interactions de cellule-cellule conduisant à l'acte la conjugaison sexuée (Delmonte Corrado *et al.*, 1999, 2001, 2005 ;Trielli *et al.*, 1997).

En toxicologie environnementales, l'AChE et la PChE sont essentiellement utilisées comme biomarqueurs d'exposition aux pesticides organophosphorés et carbamates. Cependant, les métaux lourds et plus rarement les hydrocarbures aromatiques polycycliques peuvent également moduler l'activité des cholinestérases (en l'inhibant la plupart du temps) (Barata, 2004).

2 Objectif

Dans ce chapitre nous allons étudier l'effet neurotoxique de l'EMB sur *Helix aspersa* et *paramecium sp.* à travers le suivi de l'activité Acétylcholinestérase chez les deux espèces.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Matériel biologique

3.1.1 *Helix aspersa* : les escargots sont sacrifiés après 7 et 15 jours de mise en contact avec l'EMB, la tête qui contient le système nerveux est conservée dans la solution détergente.

3.1.2 *Paramecium sp.* : Après chaque temps de traitement les cellules sont concentré par centrifugation à 15000 rpm / 10 min, puis conservé dans la solution détergente.

3.2 Méthodes

3.2.1 Mesure de l'activité Acétylcholine Estérase (AChE) chez les deux espèces étudiées

- **Chez *Helix aspersa*.**

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 libère 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.

- **Chez *paramecium sp.***

La méthode de dosage de l'activité enzymatique a été réalisée selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) modifiée par Trielli *et al.* (2006). Après une centrifugation à 3000 rpm /10 min, nous récupérons 400 µl de surnageant dans un tampon phosphate (0,2 M, pH 8).

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

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

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.

4 Résultats

4.1 Effets de l'Emamectine benzoate sur l'activité acétylcholinestérase chez *Helix aspersa*.

La figure (27) illustre les variations de l'activité AChE en présence de l'EMB. Nous constatons que cette activité tend à diminuer d'une manière inversement proportionnelle aux concentrations des xénobiotiques et ce quelque soit le temps de mise en contact.

Pour les escargots traités pendant 15 jours nous notons une diminution hautement significative de l'activité enzymatique particulièrement pour les concentrations de 0,8 et 1,6 mM/l par rapport au témoin, ($p \leq 0,001$).

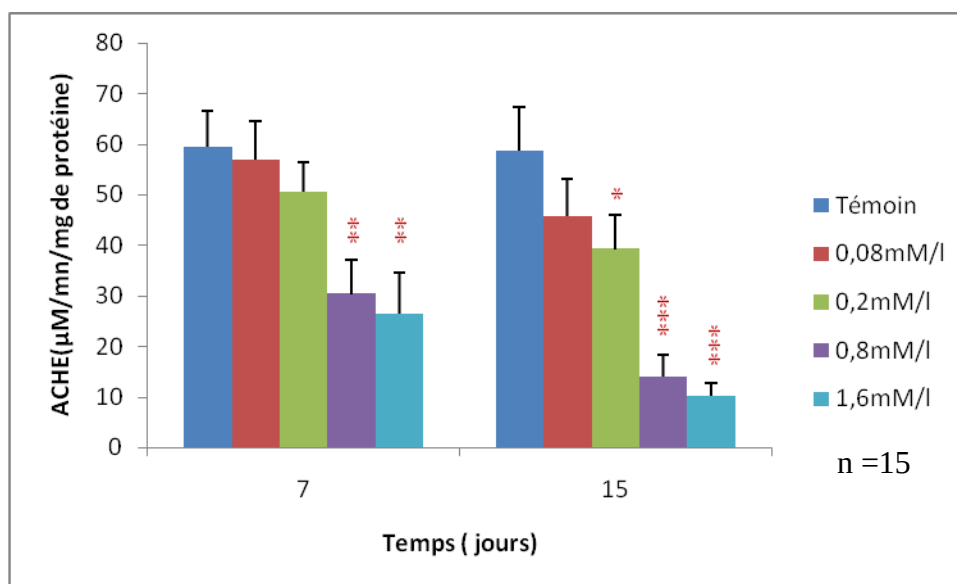


Figure 27 : Variations de l'activité Acétylcholinestérase des escargots après 7 et 15 jours de mise en contact avec des concentrations croissantes d'EMB.

4.2 Effets de l'Emamectine benzoate sur l'activité acétylcholinestérase chez *paramecium sp.*

- Effets à court terme

La figure (28) illustre les variations de l'activité acétylcholinestérase chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes d'Emamectine benzoate, Ainsi nous constatons une perturbation de l'activité enzymatique chez les paramécies traitées au xénobiotique, par rapport aux témoins.

Nos résultats ont mis en évidence une inhibition hautement significative de l'activité acétylcholinestérase particulièrement pour les plus fortes concentrations d'EMB et ce quel que soit le temps de traitement ($p \leq 0,001$).

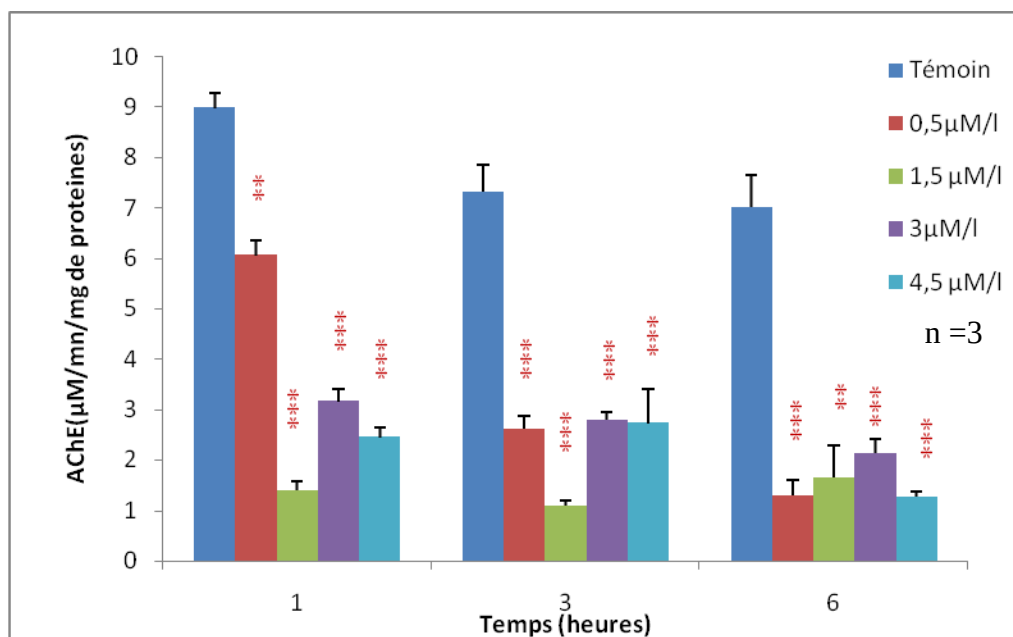


Figure 28 : Effets à court terme des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Acétylcholinestérase chez les paramécies.

- **Effets à long terme**

La figure (29) met en évidence les variations de l'activité acétylcholinestérase chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes d'EMB. Nous remarquons une inhibition hautement significative et dose dépendante de l'activité enzymatique pour tous les temps de traitement et quelle que soit la concentration testée. ($p \leq 0,001$).

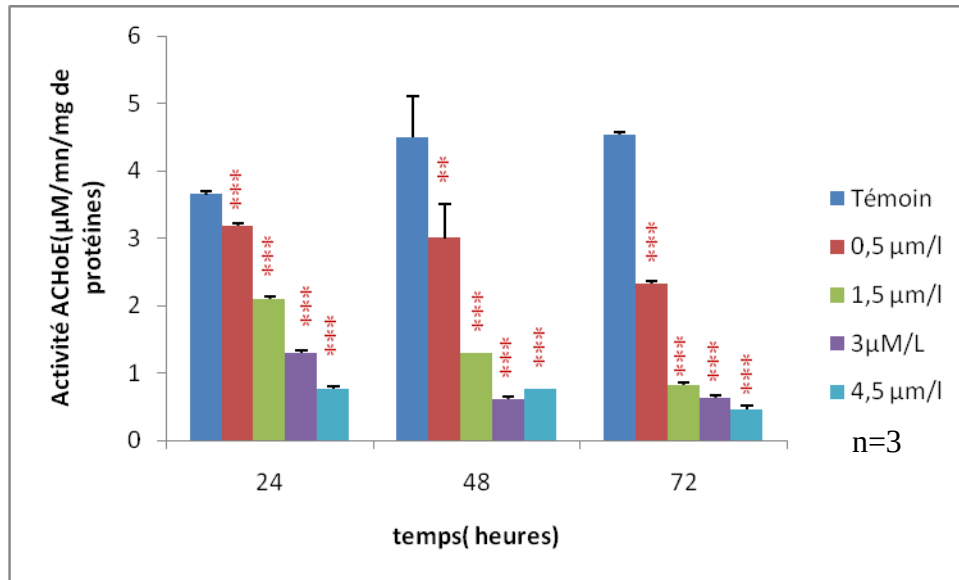


Figure 29 : Effets à long terme des concentrations croissantes d'EMB sur l'activité Acétylcholinestérase chez les paramécies.

5 Discussion

Chez les vertébrés, l'AChE est une enzyme vitale dont le rôle majeur est d'hydrolyser un neuromédiateur, l'ACh, au niveau des synapses cholinergiques (nerveuse et neuromusculaire). A l'arrivée de l'influx nerveux, la terminaison présynaptique libère l'ACh qui diffuse à travers l'espace synaptique et vient activer des récepteurs spécifiques situés dans la membrane postsynaptique. Dans les jonctions neuromusculaires, les fibres musculaires postsynaptiques présentent au contact de la terminaison nerveuse une région membranaire spécialisée riche en récepteurs nicotiniques qui sont également des canaux ioniques (Massoulié et Bon, 1993).

La fixation de l'ACh sur ces derniers en provoque l'ouverture. L'entrée consécutive d'ions sodium entraîne une dépolarisation locale qui déclenche un potentiel d'action propagé dans toute la fibre musculaire, la libération d'ions calcium et finalement la contraction. Pour que la repolarisation soit possible, l'ACh est très rapidement hydrolysée en acétate et choline par l'AChE (figure 30), localisée dans l'espace synaptique. La fixation de l'ACh entraîne un changement conformationnel de l'enzyme de l'histidine, puis une réaction d'échange entre l'ACh et la sérine activée par le groupe imidazole. Au cours de cette réaction, une molécule de choline est libérée et la Sérine acétylée. L'intervention d'une molécule d'eau permet de désacétyler cette dernière en libérant de l'acétate afin de régénérer l'enzyme libre (Massoulié et Bon, 1993).

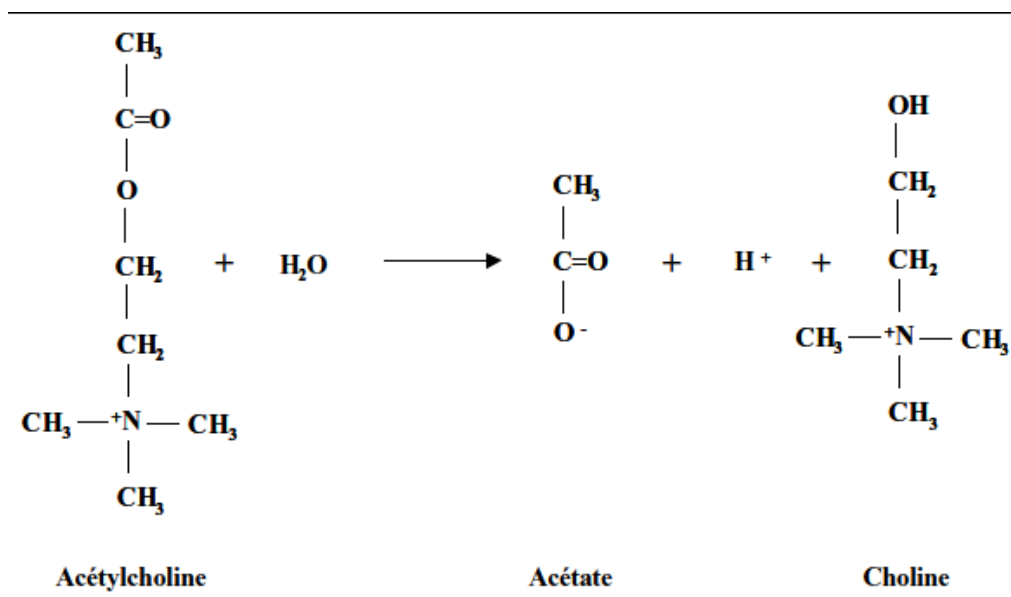


Figure 30 : Hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase (d'après Trundle et Marcial, 1988).

L'inhibition de l'AChE peut avoir des conséquences catastrophiques pouvant entraîner la Mort (Vidal, 2001). Parmi les inhibiteurs de l'AChE, les plus connus sont certains gaz de combat et les Insecticides organophosphorés et carbamates. Le mécanisme d'inhibition par ces derniers est basé sur la formation d'un complexe carbamylé ou phosphorylé qui est plus stable que la forme acétylée. Cependant la forme carbamylée s'hydrolyse rapidement (inhibition réversible) alors que la réactivation de la forme phosphorylée est beaucoup plus lente (inhibition réversible) voire impossible (inhibition irréversible) selon la nature de l'organophosphoré (Lotti, 1995). Le rôle de la BChE est moins connu que celui de l'AChE. Elle est capable d'hydrolyser certaines drogues telle que l'héroïne et pourrait être impliquée dans la détoxification de certains composés naturels. De manière générale, les ChE pourraient également être associées à des fonctions non cholinergiques telles que l'embryogenèse, les mécanismes de reconnaissance, de signalisation, d'adhérence, de prolifération et de différenciation cellulaires (Massoulié et Bon, 1993).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une diminution dose-dépendante de l'activité de cette enzyme chez les escargots et les paramécies traités par les concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate. Il semblerait que l'inhibition de l'AChE est due à l'accumulation de l'insecticide au niveau cellulaire comme le stipule Barillet (2007), c'est le résultat d'un stress oxydant à l'échelle intracellulaire.

Le même mécanisme est rapporté par Trielli et *al.* (2006), concernant l'effet de composés organophosphorés sur des protistes terrestres *Colpoda inflata*, et ont constaté une inhibition progressive de l'activité AChE et la PrChE. Cette inhibition a été attribuée par les auteurs à des phénomènes d'oxydation (notamment les groupements thiols) et à la formation de ponts disulfures en réponse à la libération de radicaux libres au moment de l'irradiation.

Il en est de même concernant les travaux de Mountassif et *al.* (2007), qui ont étudié l'effet physiologique, morphologique et métabolique de polluants métallique chez *Tetraymena pyriformis*, ou encore ceux de Barata et *al.* (2001) et Sturum et Hansen (1999), qui ont étudié la toxicité de pesticides organophosphorés (chlorpyrifos, malathion), un carbamate (carbofuran) et l'éthyl parathion sur des juveniles *Daphnia magna*. Nos résultats abondent dans le même sens que ceux cités ci-dessus et confirmant ainsi l'hypothèse de l'activité AChE chez les paramécies. En effet l'observation microscopique des paramécies traités à l'EMB (résultats non montrés) a

révéler une inhibition du mouvement des protistes et ce quelque soit le temps de traitement et aux plus fortes concentrations d'EMB.

Selon une étude de Bucci, (2005) qui porte sur le rôle du complexe GABA_A dans le contrôle de la nage des protozoaires ciliés, il a été démontré que les complexes GABA_A ont été pharmacologiquement activés par un agoniste sélectif le muscimole, induisant une réponse particulière de *paramecium primaurelia*, caractérisé par des périodes alternées de tourbillons et de nage normale. Ces effets ont été inhibés par un antagoniste de GABA_A le bicculine et la picrotoxine. Nos résultats sont en accord avec ceux de Bucci(2005), puisque le traitement avec l'EMB qui est connu comme étant un antagoniste du récepteur GABA (Syngenta 2005), a provoqué une perturbation du mouvement pouvant aller jusqu'à son inhibition totale et irréversible particulièrement aux plus fortes concentrations.

Les travaux de Coeurdassier et al. (2001), ont mis en évidence une diminution de l'activité AChE chez les escargots en présence d'organophosphorés le Diméthoate, ce même effet est observé chez les moules par Da Silva et al. (2003). récemment, Belhaouchet et al. (2012) a mis en évidence une forte inhibition de l'activité AChE chez l'escargot *Helix aspersa* traité par un biopesticide le Spinosad.

Les pesticides : méthomyle, Carbofuran, Chlorpyrifos et le paraquate dichloride, inhibe l'activité acétylcholinestérase 48 heures après traitement de l'escargot *Helix aspersa*. En comparant entre les quatre pesticides, il a été démontré que le carbofuran été le composé le plus inhibiteur de l'activité acétylcholinestérase chez *Helix aspersa*. suivis par le methomyl, le paraquate dichloride et enfin le Chlorpyrifos (Salama et al., 2005). Il a été démontré par l'étude de (Casida et Quistad, 2004 et Radwan et Salama, 1999) que certains pesticides carbamates tels que le méthomyl et le thiodicarbe été de puissant inhibiteurs de l'activité acétylcholinestérase chez l'escargot. Chez les escargots traités à l'EMB, nous avons mis en évidence une inhibition dose dépendante de l'activité AChE, nos résultats sont accord avec ceux cités ci-dessus.

Introduction

Les polluants comme les métaux lourds, les hydrocarbures, les pesticides (carbamates et organophosphorés) provoquent des dommages tissulaires irréversibles au niveau de la glande digestive et du rein chez des escargots terrestres. (Zaldibar et *al.*, 2007 ; Lowe et *al.*, 2006, Tribskon et Kohler, 1996 ; Tribeskorn et Kohler, 1998).

Selon Radwan et *al.* (2008), le methomyle et le methiocarb sont à l'origine d'altérations se manifestant par une dégénérescence des cellules digestives, un épaississement et irrégularité de la membrane basale au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargot *Vermiculata Eobania*.

Il en est de même, concernant les travaux de Marigomez et *al.* (1996) et (1998), qui ont mis en évidence chez les lingots terrestres soumis à un stress chimique un nombre relativement élevé des cellules à calcium et une hypertrophie des espaces intercellulaires au niveau de la glande digestive. Ainsi les produits phytosanitaires en général, sont à l'origine de graves atteintes de l'écosystème avec comme conséquence des perturbations de certains organismes (escargots, verres de terre ...), utilisés ainsi comme des bioindicateurs de la qualité de l'environnement.

2 Objectif du travail

Dans ce chapitre, nous proposons de mettre en évidence d'éventuelles altérations tissulaires chez *Helix aspersa*. traités par le Proclaim, pour cela, nous avons procédé à un examen histologique sur différents organes.

3 Matériel et méthodes

3.1 Matériel biologique

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

3.2 Methode

Sur des échantillons de la glande digestive, du rein et du poumon, nous avons réalisé des coupes histologiques au laboratoire d'Anatomo-Pathologie de l'hôpital Ibn Rochd (Annaba), selon la technique décrite dans Martoja et Martoja (1967).

4.1 Aspect de l'hépatopancréas après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate

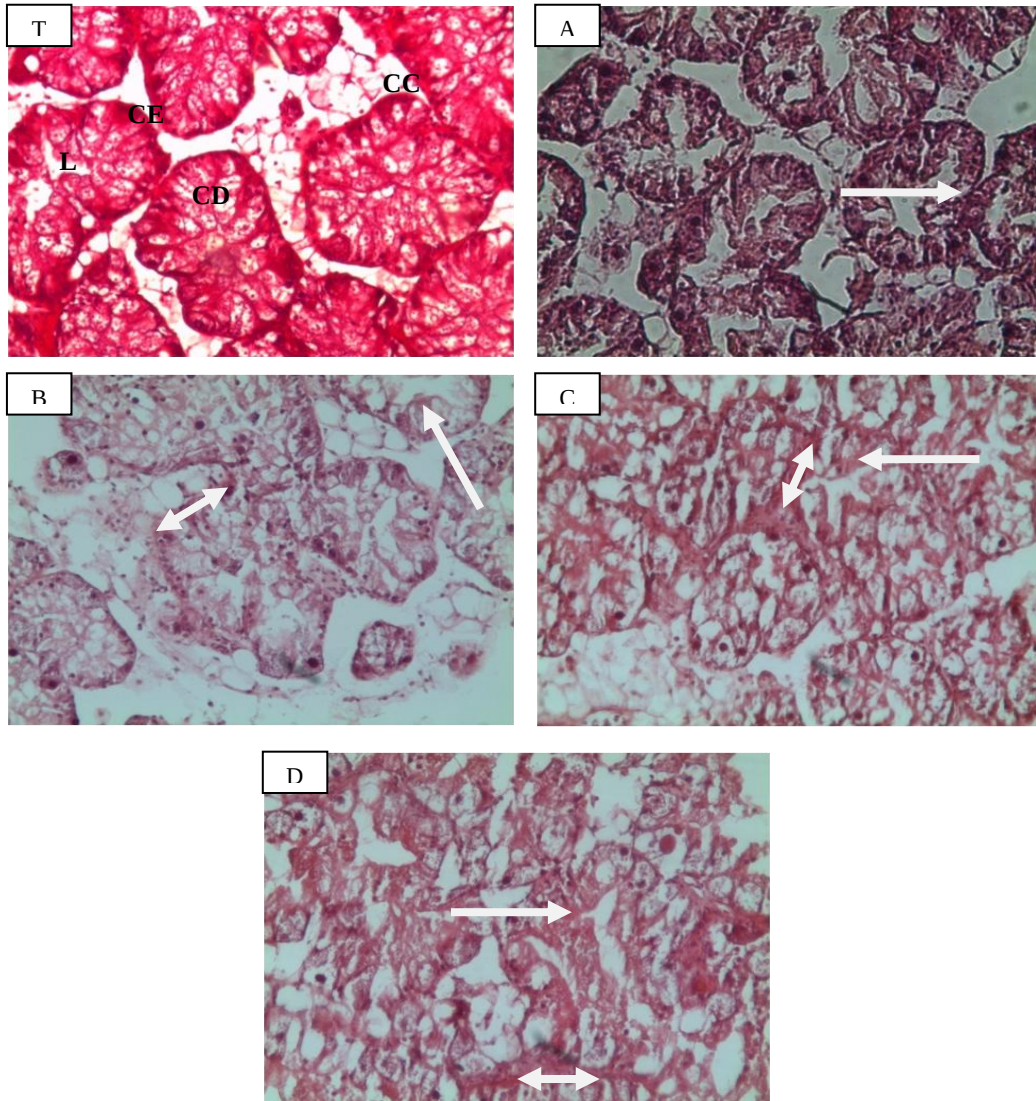


Planche 01 : Aspect de l'hépatopancréas après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).

Légende : **T** : Témoin, **A** : traités à 0,08mM/l, **B** : traités à 0,2mM/l, **C** : traités à 0,8 mM/l, **D**: traités à 1,6 mM/l, **L** : Lumière de l'accini, **CD** : Cellule digestive, **CE** : Cellule excrétoire, **CC** : Cellule à Calcium,  Nécrose,  Infiltrat inflammatoire,  Hypertrophie cellulaire,  Dégénérescence des cellules,  Hypotrophie cellulaire,  Débris cellulaire.

Chez les escargots l'hépatopancréas occupe un volume important de la masse viscérale, il est formé de deux lobes, chacun étant relié au mésentéron par un canal hépatopancréatique.

Les lobes de l'hépatopancréas sont entourés d'un tissu conjonctif associé à quelques fibres musculaires lisses, l'ensemble constituant une enveloppe, ils apparaissent formés par juxtaposition de nombreux tubules, les espaces qui les séparent étant occupés par du tissu conjonctif au sein duquel circule l'hémolymphe. La lumière des tubules hépatopancréatiques est bordée par un épithélium simple associant plusieurs types cellulaires et est en continuité avec celle des canaux de faibles diamètres. Les canaux hépatopancréatiques résultent de la convergence de ces petits canaux (Heusser et Dupuy, 2011).

La paroi des tubules hépatopancréatiques est constituée d'un épithélium simple et haut, les cellules qui le composent présentent des morphologies diverses mais relèvent de trois catégories principales :

Des cellules digestives ou sécrétrices (**CD**), produisant des enzymes digestives déversées dans la lumière des tubules et responsables de la digestion extra-cellulaire des substances nutritives. Des cellules excrétoires (**CE**), réalisant la phagocytose des particules alimentaires de la lumière des tubules et responsables de la digestion intracellulaire et des cellules à calcium (**CC**), basales, permettant le renouvellement des autres types cellulaires (Zaldibar et *al.*, 2008).

Si les cellules sécrétrices sont assez homogènes en termes d'organisation, les cellules absorbantes sont relativement polymorphes selon le stade de digestion des particules phagocytées notamment, Elles peuvent contenir des vacuoles de digestion, des vésicules d'excrétion, voire des réserves énergétiques ou d'éléments comme le calcium (Heusser et Dupuy, 2004).

L'examen histopathologique de l'hépatopancréas des escargots traités à l'Emamectine benzoate aux plus faibles concentrations (0,08 et 0,2 mM/l), met en évidence un élargissement de la lumière basale, accompagnés de quelques foyers de nécrose et d'infiltrats inflammatoires. Aux plus fortes concentrations (0,8 et 1,6 mM/l), nous notons une désorganisation complète des acinis avec l'apparition d'infiltrats inflammatoires, nous remarquons également la présence de cellules nécrosées.

4.2 Aspect de l'hépatopancréas après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate

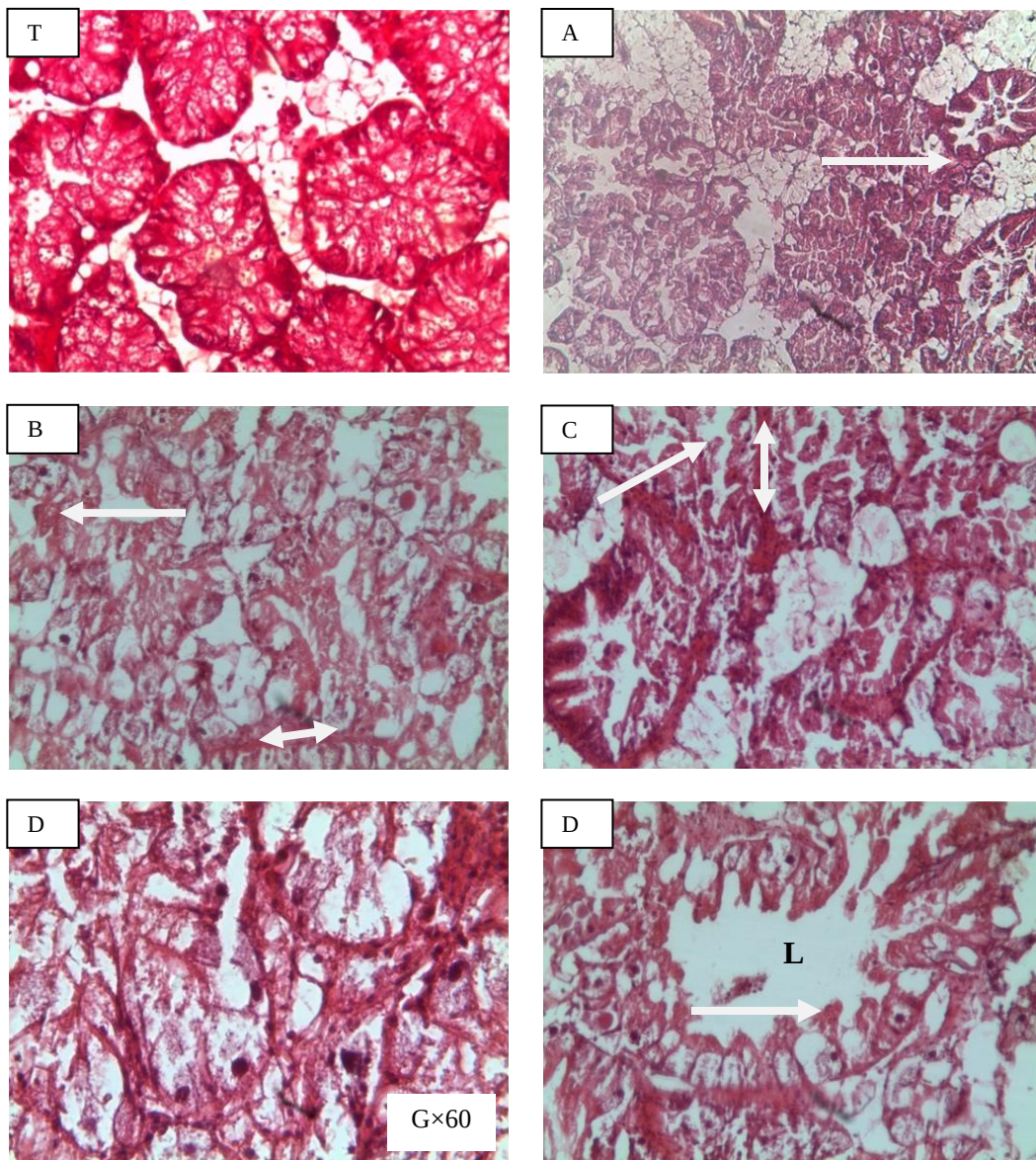


Planche 02 : Aspect de l'hépatopancréas après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).

Légende : **T** : Témoin, **A** : traités à 0,08mM/l, **B** : traités à 0,2mM/l, **C** : traités à 0,8 mM/l, **D**: traités à 1,6 mM/l, **L** : Lumière de l'accini, **CD** : Cellule digestive, **CE** : Cellule excrétoire, **CC** : Cellule à Calcium,  Nécrose,  Infiltrat inflammatoire,  Hypertrophie cellulaire,  Dégénérescence des cellules,  Hypotrophie cellulaire,  Débris cellulaire.

Après 15 jours de traitement à l'EMB, nous constatons une atrophie des accinis chez le groupe traité à la plus faible concentration (0,08 mM/l), à la concentration de 0,2 mM/l nous observons un élargissement de la lumière basale et quelques foyers de nécroses, concernant les traités aux concentrations :0,8 et 1,6 mM/l nous notons l'apparition d'infiltrat-inflammatoires et de nécroses. A la plus forte concentration d'EMB la membrane basale est totalement rompue.

4.3 Aspect du rein après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate

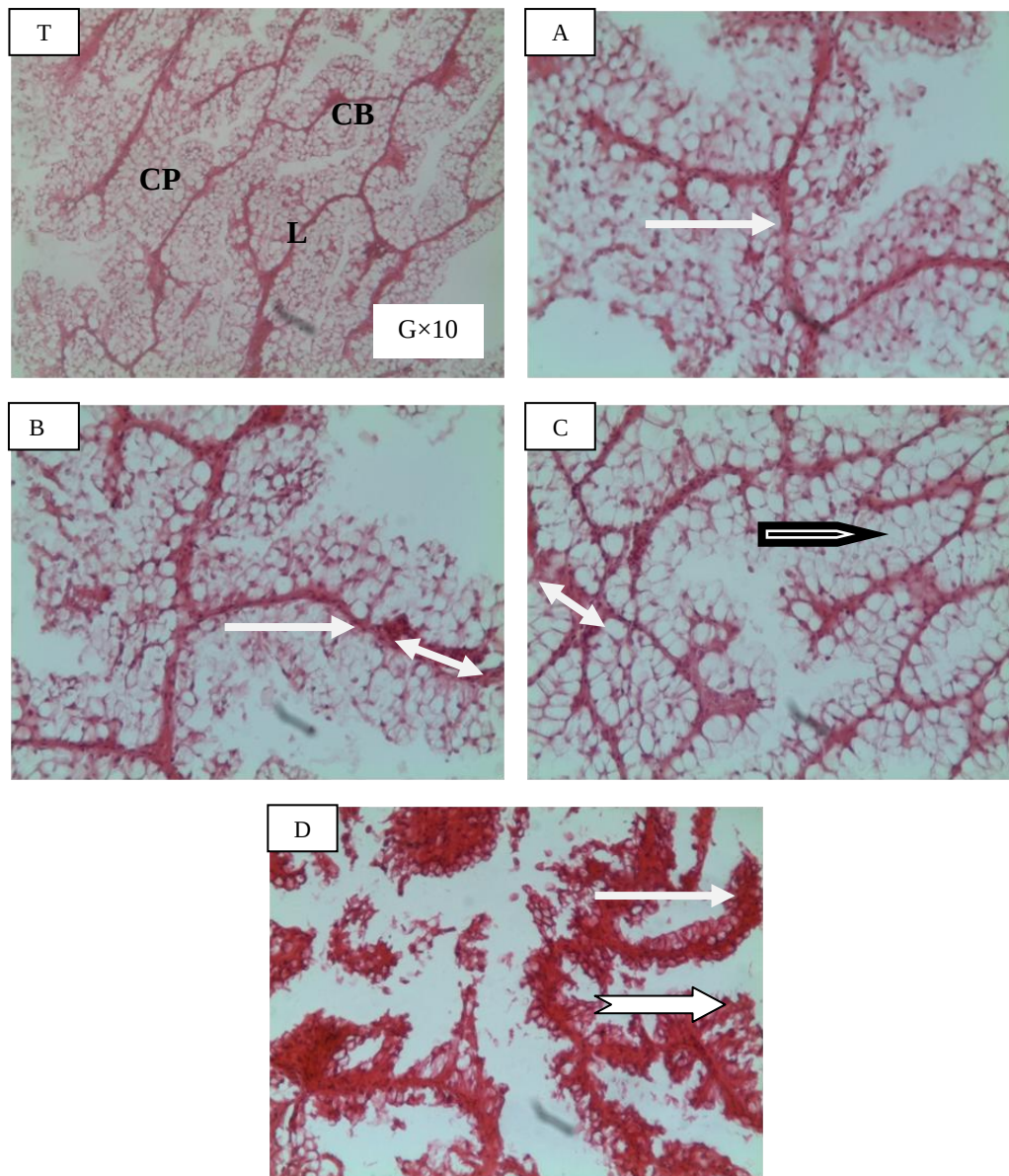


Planche 03 : Aspect du tissu rénal après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).

Légende : T : Témoin, A : traités à 0,08mM/l, B : traités à 0,2mM/l, C : traités à 0,8 mM/l, D: traités à 1,6 mM/l, L :
 Lumière de l'accini, **CB** : Cellule à bâtonnet, **CP** : Cellule prismatique, **CC** : Cellule ciliées,  Nécrose,
 Infiltrat inflammatoire,  Hypertrophie cellulaire,  Dégénérescence des cellules,  Hypotrophie
 cellulaire,  Débris cellulaire.

Le rein est situé en position dorsale et postérieure, 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 urètre qui prend en charge l'urine produite, la paroi rénale forme des replis nombreux et étendus, soutenus par des axes conjonctifs au sein desquels des lacunes hémolympatiques sont présentes. Ces replis sont tapissés d'un épithélium simple prismatique avec une bordure en brosse, formée de cellules semblables les unes aux autres, les néphrocytes. L'urètre est sur une partie de son trajet accolé au rein. Sa lumière est bordée d'une paroi plus ou moins plissée, constituée d'un épithélium simple, cubique à prismatique, surmontant une tunique conjonctive riche en lacunes hémolympatique (Heusser et Dupuy, 2004).

Le rein est constitué d'un épithélium excréteur tapissé de lamelles rénales, lamelles conjonctives creuses, un sinus sanguin et doté de fibres musculaires lisses, constituées en cellules prismatiques avec une bordure en brosse. L'épithélium renferme un seul type de cellules excrétrices avec un noyau et une membrane granulaire, ces cellules excrétrices ont des formes à bâtonnet (les plus nombreux) et ciliées (Chabicovsky et *al.*, 2003).

La production de l'urine primitive est le fait des néphrocytes : ils réalisent l'ultrafiltration de l'hémolymphe circulant dans les lacunes des axes conjonctifs soutenant les replis de la paroi rénale. Ils produisent également des concrétions à partir de molécules prélevées dans l'hémolymphe, Il s'agit de dépôts de couches concentriques d'acide urique et de lipide autour d'un noyau d'urate de calcium, élaborés au sein des vacuoles, Ces concrétions sont expulsées dans la lumière rénale. Ils produisent également des concrétions à partir de molécules prélevées dans l'hémolymphe (Heusser et Dupuy, 2004).

L'examen histologique de fragment de rein d'escargots traités par la plus faible concentration d'EMB (0,08 mM /l), met en évidence des foyers de nécrose, .A la concentration de 0,2 mM /l, nous notons l'apparition d'infiltrat inflammatoire ainsi qu'une nécrose des cellules excrétrices .Mais également à la concentration de 0,8 mM /l nous observons des foyers de

nécrose, une hypertrophie des cellules excrétrice ainsi que la présence d'infiltrat inflammatoire. A la plus forte concentration nous notons une hypotrophie cellulaire accompagnée de nécroses.

4.4 Aspect du rein après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate

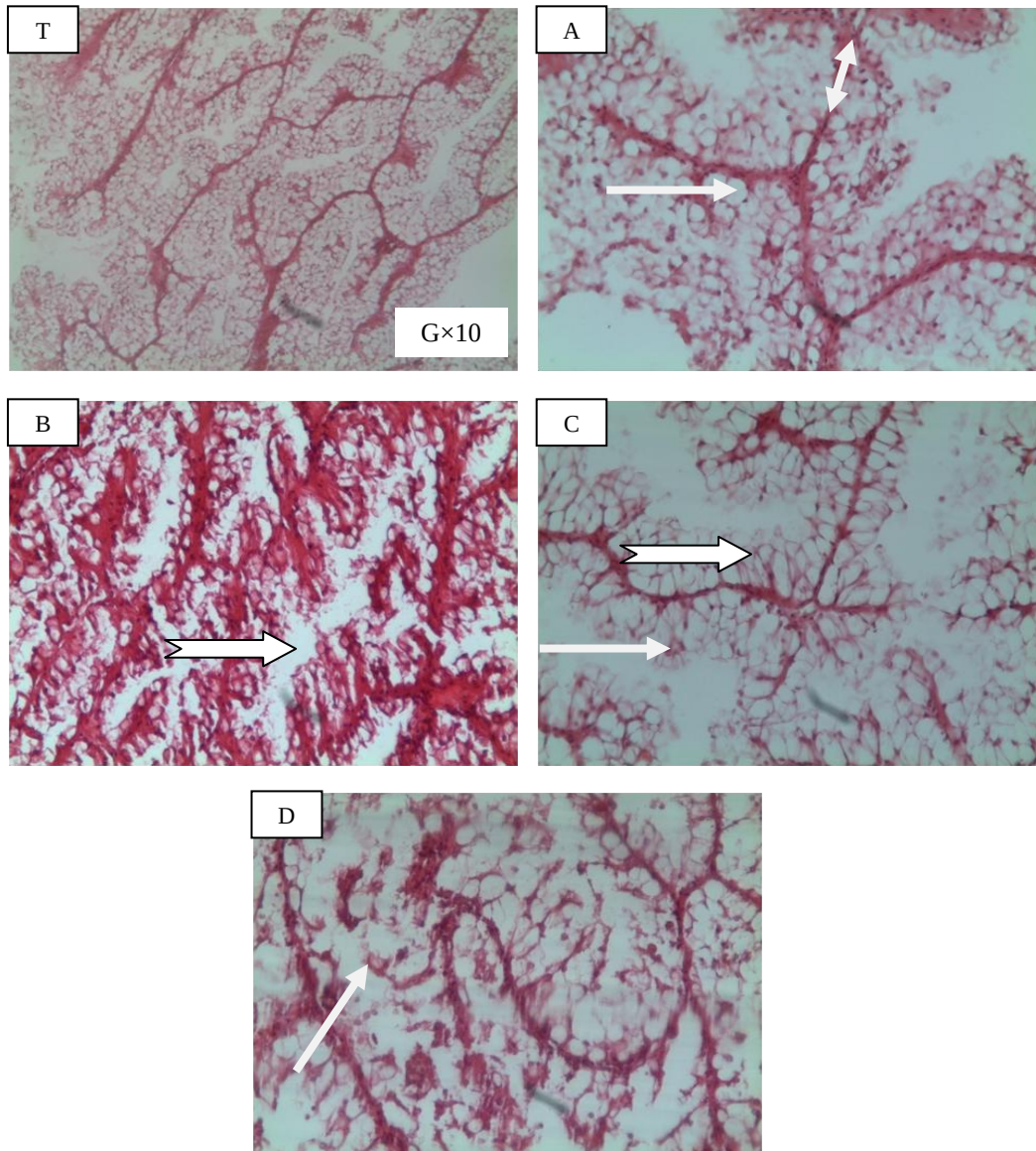


Planche 04 : Aspect du tissu rénal après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).

Légende : T : Témoin, A : traités à 0,08mM/l, B : traités à 0,2mM/l, C : traités à 0,8 mM/l, D: traités à 1,6 mM/l, L : Lumière de l'accini, CB : Cellule à bâtonnet, CP : Cellule prismatique, CC : Cellule ciliées,  Nécrose,  Infiltrat inflammatoire,  Hypertrophie cellulaire,  Dégénérescence des cellules,  Hypotrophie cellulaire,  Débris cellulaire.

La planche (04) représente l'aspect du tissu rénal d'*Helix aspersa*. traités aux concentrations croissantes d'EMB.

Aux plus faibles concentrations d'EMB (0,08 mM /l et 0,2 mM /l), nous remarquons l'apparition de foyers de nécrose accompagnés d'infiltrats inflammatoires et une hypertrophie des cellules excrétrices.

Aux plus fortes concentrations d'EMB (0,8 mM /l et 1,6 mM /l), nous avons mis en évidence une hypotrophie cellulaire, accompagnée d'une dégénérescence des cellules excrétrices, parallèlement à une prolifération du tissu conjonctif engendrant ainsi la disparition de leur membrane d'où la présence des débris et nécroses cellulaires (D).

4.5 Aspect du poumon après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate

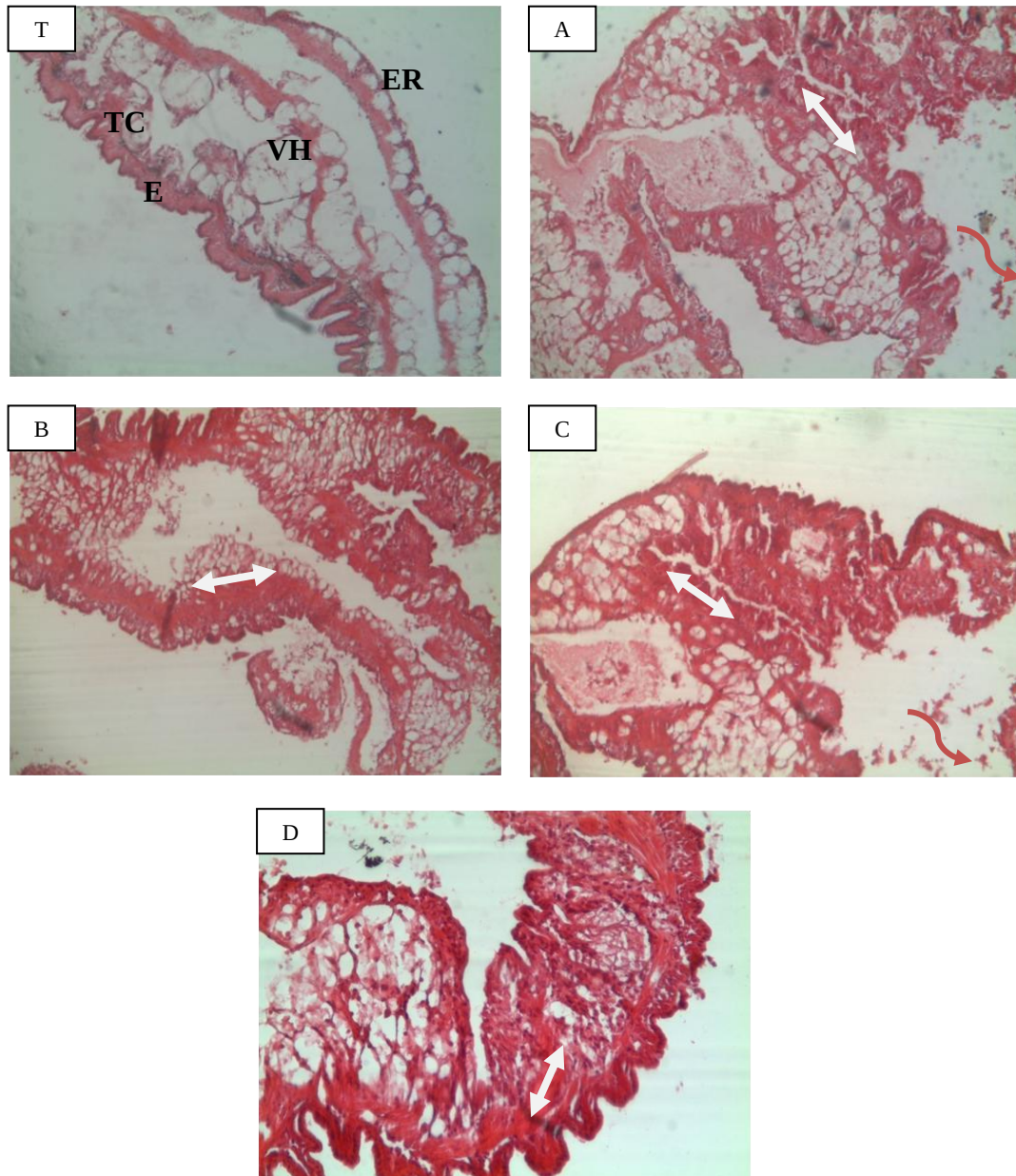


Planche 05 : Aspect du poumon après 7 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).

Légende : T : Témoin, A : traités à 0,08mM/l, B : traités à 0,2mM/l, C : traités à 0,8 mM/l, D: traités à 1,6 mM/l, ER :Epithelium respiratoire, TC :Tissu conjonctif, E : Epiderme,VH :vaisseaux hémolymphatique, Nécrose, Infiltrat inflammatoire, Hypertrophie cellulaire, Dégénérescence des cellules, Hypotrophie cellulaire, Débris cellulaire.

Le poumon est un organe situé en position dorsale et antérieure par rapport à la masse viscérale, la cavité pulmonaire est vaste, et délimitée dorsalement par un plafond composé de l'épiderme (E), du tissu conjonctif (TC) et des fibres musculaires associées ; de l'épithélium respiratoire (ER), également associé à du tissu conjonctif et des fibres musculaires.

La surface respiratoire est formée d'un épithélium simple et pavimenteux, bordant la cavité pulmonaire. Il est soutenu par un tissu conjonctif épais mais peu dense au sein duquel des cellules glandulaires sont observées. De nombreux vaisseaux hémolymphatiques à parois fines, composée de fibres conjonctives et de quelques fibrocytes et fibres musculaires lisses, y sont localisés, juste sous l'épithélium. Des fibres musculaires plus nombreuses sont présentes en profondeur. Les échanges gazeux (diffusion du dioxygène de l'air vers l'hémolymphe et du dioxyde de carbone en sens inverse), sont réalisés à travers l'épithélium respiratoire et la paroi des vaisseaux hémolymphatiques. (Heusser et Dupuy, 2004).

Le poumon des Gastéropodes Pulmonés ainsi décrit est une néoformation, résultant d'une invagination secondaire de l'épiderme, et en conséquence n'est pas homologue de la cavité palléale des autres mollusques, à ce titre, il ne reçoit pas les orifices digestif, excréteur et génitaux (Heusser et Dupuy, 2004).

L'examen histologique du poumon après traitement par la plus faible concentration (0,08 mM /l) d'EMB provoque l'apparition d'infiltrats inflammatoires au niveau du tissu conjonctif. A la concentration 0,2 mM/l, nous avons mis en évidence une vaso-constriction hémolymphatiques associée à un infiltrat inflammatoire, aux plus fortes concentrations (0,8 mM /l et 1,6mM /l), nous remarquons un infiltrat inflammatoire au niveau de l'épithélium respiratoire et du tissu conjonctif, et sur l'ensemble du tissu pulmonaire à la plus forte concentration (1,6 mM /l).

4.6 Aspect du poumon après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes de l'Emamectine benzoate

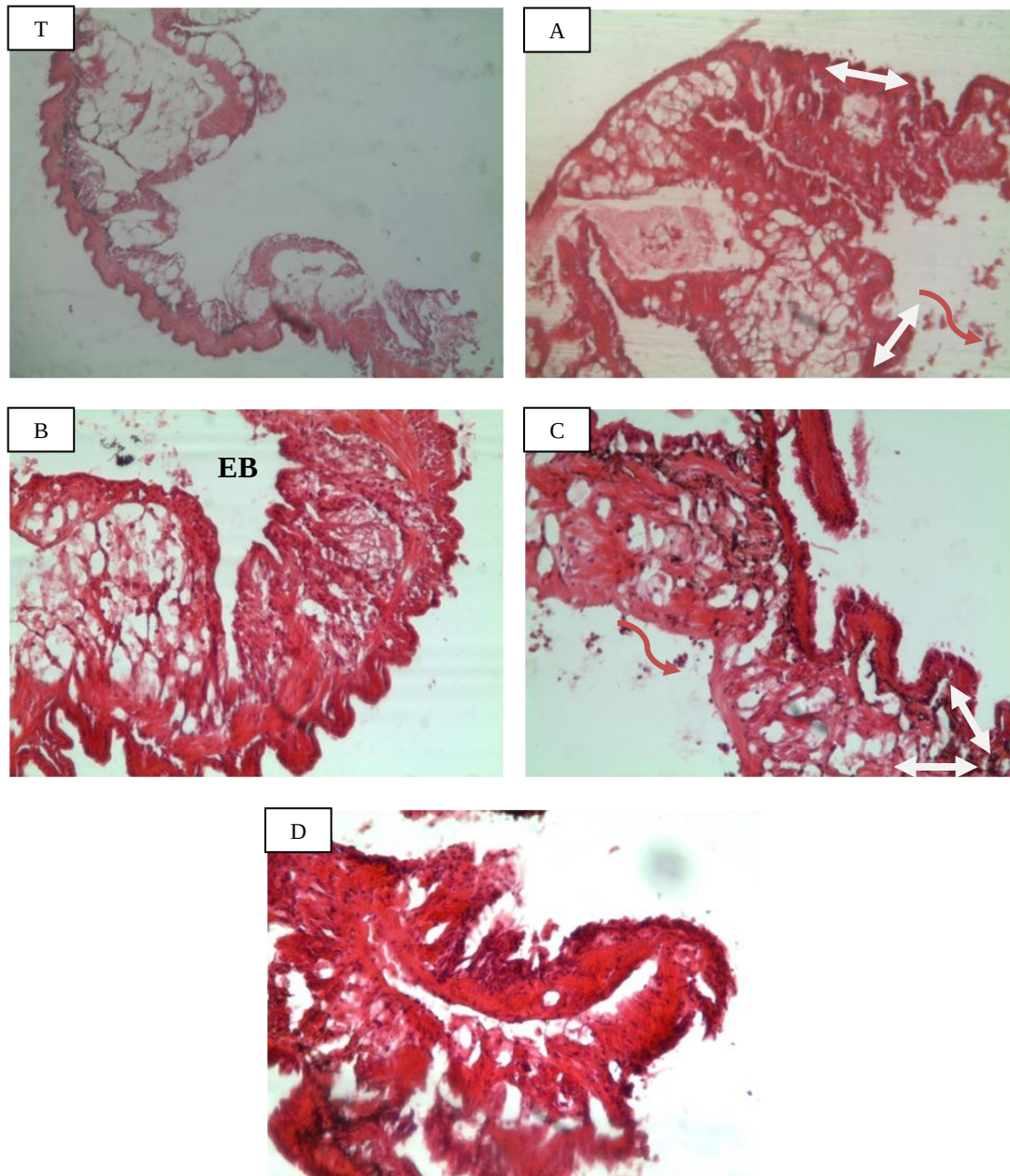


Planche 06 : Aspect du poumon après 15 jours de traitement aux concentrations croissantes d'EMB (G×40).

Légende : T : Témoin, A : traités à 0,08mM/l, B : traités à 0,2mM/l, C : traités à 0,8 mM/l, D: traités à 1,6 mM/l, ER :Epithelium respiratoire, TC :Tissu conjonctif, E : Epiderme, VH :vaisseaux hémolymphatique, EB : épithélium en brosse,  Nécrose,  Infiltrat inflammatoire,  Hypertrophie cellulaire,  Dégénérescence des cellules,  Hypotrophie cellulaire,  Débris cellulaire.

La planche (06) représente l'aspect du poumon d'*Helix aspersa*. traité aux concentrations croissantes d'EMB.

L'examen histologique du poumon après traitement par les plus faibles concentrations d'EMB (0,08 mM /l et 0,2mM /l) met en évidence un infiltrat inflammatoire au niveau du tissu conjonctif et de l'épithélium respiratoire, des débris cellulaires dans la cavité pulmonaire, un épithélium en brosse, ainsi qu'une vaso-constriction hémolympatique et une nécrose des cellules glandulaires, concernant les escargots traités à la concentration 0,8 mM /l d'EMB (C) nous notons la présence d'infiltrats inflammatoires au niveau du tissu conjonctif et des vaisseaux hémolympatiques ainsi que des débris cellulaires, tandis que chez les escargots traités à la concentration de 1,6 mM /l (D) d'EMB nous avons noté une perte de la forme de l'épiderme et une nécrose accompagnée d'une altération tissulaire.

5 Discussion

L'exposition aux polluants terrestres et aquatiques peut entraîner des dommages tissulaires très importants et irréversibles au niveau du rein et de l'hépatopancréas des escargots. Ces organes jouant un rôle majeur dans la métabolisation des toxiques (Fria-Espericueta et *al.*, 2008).

L'étude histologique de certains organes cibles, a montré que l'insecticide a provoqué des altérations importantes au niveau de la glande digestive et de l'épithélium rénale des escargots, avec l'apparition de foyers de nécroses dès la plus faible concentration, en plus d'une déformation de l'acini dès la concentration de 0,2mM /l, au niveau de l'hépatopancréas, ceci est la conséquence de la toxicité du xénobiotique (l'Emamectine Benzoat).

Aux plus fortes concentrations (0,8 et 1,6 Mm /l), l'examen histologique a mis en évidence l'apparition d'infiltrats inflammatoires, une hypertrophie des cellules, des nécroses, un élargissement de la lumière basale ainsi d'une détérioration de la membrane.

Selon Zaouani (2010), le traitement de rats wistar par du Proclaim, a provoqué des lésions tissulaires représentés par des infiltrations des lymphocytes au niveau des différentes couches de la paroi colique, et les mêmes résultats sont rapportés par Koner (1998) et Banerjee(1997), ces auteurs signalent que les pesticides sont capables de moduler des réponses immunitaires en affectant les lymphocytes chez des animaux de laboratoire et l'homme après intoxication.

Il en est de même pour les travaux de Radwan et *al.*(2008), qui a testé un carbamate (methomyle) sur l'escargot *E.Vermiculata muller*, ou de ceux de Otludil et *al.*(2004) qui ont mis en évidence une dilatation hémolympatique des vaisseaux, une dégénérescence des cellules, des nécroses et une atrophie du tissu conjonctif du gastéropode *Planorbarius corneus* traité avec de l'endosulfan. Des altérations histopathologiques telles que la dégénérescence des cellules et l'apparition d'amœbocytes entre les tubules ont également été signalés au niveau de la glande digestive des escargots *Bellamya dissimilis*. exposés à l'Endosulfan, Methylparathion, Quinalphos et Nuvan (Jonnalagadda et Rao, 1996), l'exposition de *P.corneus* au PCP (Klobucar et *al.*, 1997) et *Amphimelania holandri* au phénol (Lajtner et *al.*, 1996), a révélé l'apparition d'infiltrats inflammatoires au niveau de la glande digestive, l'étude de Rondelaud et Dreyfuss (1996), a mis en évidence des nécroses épithéliales au niveau de l'hépatopancréas et des glandes digestives suite au traitement de l'escargot *Lymnaea glabra* par une concentration subléthale de niclosamide, les travaux de Russell et *al.*(1981) et Chabicosky et *al.*(2003) ont mis en évidence des nécroses

et une hypertrophie des cellules excrétoires au niveau du rein des escargots soumis à des polluants métalliques. Nos résultats vont dans le même sens que ceux sus-cités avec une prédominance d'infiltrats inflammatoires et de nécroses.

Il y'a peu d'études concernant les effets histopathologiques sur les organes respiratoires chez les gastéropodes (Otludil et *al.*, 2004).

Au niveau du poumon des escargots traités aux différentes concentrations d'EMB nous avons mis en évidence des infiltrats inflammatoires, des nécroses des cellules glandulaire une vaso-constriction hémolympatique, une déformation de l'épiderme et des débris cellulaires.

Le manteau est un organe important pour la respiration chez le gastéropode *Pulmonata* (Luchtel et Deyrup-Olsen, 2001), une adaptation particulière du manteau leur permet de prendre l'oxygène dans l'air et c'est sans doute avantageux lorsque l'oxygène disponible dans l'eau est faible (Purchon, 1968). L'exposition de *Planorbarius corneus* à l'endosulfan a provoqué des altérations au niveau des cellules du manteau, et une diminution du nombre et de la taille des mucocytes accompagnée d'une diminution de la quantité de mucus. Ce phénomène est la première réaction de stress des gastéropodes vis-à-vis des xénobiotiques (Triebkorn et Kohler, 1998. Gupta et Durve., 1986). Nos résultats abondent dans le même sens particulièrement chez les escargots traités aux plus fortes concentrations pendant 15 jours.

Jonnalagadda et Rao (1996), a montré une déorganisation du manteau spécialement chez la limace *B.dissimilis* exposée à l'Endosulfan, le Methyldparathion, le Quinalphos et le Nuvan, des altérations similaires ont été rapportées par Gupta et Durve (1986), chez l'escargot marin *Viviparus bengalensis*.

Selon Hamed et *al.* (2007), les altérations structurales et la destruction des cellules digestives sont les phénomènes les plus observés après une exposition aux pesticides chez l'escargot terrestre *Eobania vermiculata*, la détérioration des cellules digestives entraînent par conséquent, l'altération du processus digestif global provoquée par l'ingestion des pesticides (Ait Hamlet et *al.*, 2013). En revanche, selon Sharaf (2009), les altérations structurales observées pourraient être dues au jeûne prolongée causé par le traitement, cependant les altérations histopathologiques observées, intègrent les effets de plusieurs facteurs de stress directement ou indirectement liés à la contamination et leur étude permet de détecter des effets secondaires dûs au stress oxydant (Schwaiger et *al.*, 1997). Schwaiger et *al.* (2001) suggèrent qu'en affectant le

système immunitaire, les contaminants affaiblissent les organismes exposés, qui deviennent plus sensibles et moins résistants aux effets des xenobiotiques.

Introduction

Qu'est ce que la toxicologie *in silico* ?

Le terme *in silico* en toxicologie se réfère à une expérience de calcul qui pourrait être un calcul mathématique ou une analyse scientifique de substances et de l'organisation des données sur les substances connexes à travers l'analyse informatisée (Luis et Valerio, 2009), cela signifie l'utilisation d'une variété de l'outil informatique d'analyse des données typiquement en utilisant des algorithmes de calculs (mathématique, chimique et biologique) conçus pour produire soit des prévisions de la toxicité ou de réels expérimentation toxicologiques liées à des données pour une utilisation dans l'hypothèse des essais scientifiques ou des analyses de sécurité, la toxicologie *in silico* est l'application des technologies informatiques pour analyser les données et des modèles existants, ainsi pour prédire des activités toxicologiques d'une substance.

L'outil informatique est devenu un atout majeure en biologie, particulièrement avec le développement du concept de modélisation, qui permet entre-autre d'émettre toutes hypothèses plausibles sur le mécanisme d'action des xenobiotiques à travers des modèles *in silico*. Ainsi les travaux de Djekoun (2012) ont mis en évidence un modèle statistique de prédiction d'un biomarqueur potentiel de choix du stress oxydatif en utilisant la méthode des réseaux de neurones artificiels.

Ceci nous a initié à penser à un modèle *in silico* pour rechercher le xenobiotique ayant le moins d'effets toxiques sur le modèle biologique *Helix aspersa*.

2 Objectif du travail

Notre travail cherche à identifier la structure du produit le moins toxique à partir d'une grande famille de produits phytosanitaires qui existent sur le marché (non à partir de zéro). L'étude de la toxicité des produits existants a été réalisée au laboratoire ou obtenue à partir de données bibliographiques par certains, Nous abordons la construction des structures des produits selon une stratégie de ligne de produits. Un processus de construction d'assets correspondant à chaque produit permet d'en exprimer la variabilité.

Cette dernière est représentée selon un modèle amélioré adapté à notre application biologique qui prend en compte en plus des types déjà existants de variabilité, un nouveau type relatif à l'aspect transitoire de la caractéristique (la feature), dans notre cas l'effet. En effet il y a

des features qui peuvent changer de type de variabilité durant leur existence (à variabilité instable ou temporaire).

Un autre processus permet de construire des assets génériques à partir des assets des produits. Les structures des produits, assets et assets génériques sont sauvegardés dans des bases de données en vue d'une éventuelle réutilisation. A chaque mise à jour de la base des produits, une mise à jour de la base des assets est suivie puis une autre de la base des assets génériques. Parmi les assets génériques construits, deux revêtent un aspect particulier : l'asset générique optimal qui regroupe tous les choix possibles pouvant aboutir à n'importe quel asset et asset générique et également un asset générique le plus proche en structure de l'asset du produit le moins toxique.

3 Matériel et méthodes

3.1 Matériel biologique

Le matériel biologique est l'escargot *Helix aspersa*.

3.2 Matériel chimique

- Le matériel chimique utilisé dans notre étude est un insecticide à base d'Emamectine Benzoate.
- Le reste des molécules insecticides choisis a été fournis par la banque de données bibliographiques.

3.3 Méthodes

Nous avons retenu :

Les variations des protéines totales et les biomarqueurs de la toxicité (CAT, GSH, GST, MDA AChE).

4 Résultats

4.1 Effets des xenobiotiques sur les paramètres biochimiques et physiologiques

Le tableau (09) illustre les différents effets des insecticides sur les escargots, pour l'EMB ce sont les résultats de nos propres expérimentations, pour le reste des molécules, les résultats ont été obtenu à partir de données bibliographiques (Belhaouchet et *al.*, 2012, Salama et *al.*, 2005 et El-Gendy et *al.*, 2009).

Tableau 09 : Effets des produits phytosanitaires (insecticides principalement) sur *Helix aspersa*.

++++ : Témoin (Pas toxique), +++ : Peu toxique, ++ : Toxique, + : Très toxique.

Molécules Mère	Effets physiologiques		Effets Biochimiques					
	Croissance	Protéines	MDA	GSH	GST	CAT	AchoE	GPX
Emamectine Benzaote	+++	++	++	+	+	++	+	/
Spinosad	+++	++	++	+	+	+++	+	/
Chlorpyrifos	/	/	++++	++	/	/	+++	/
Dichloride	/	/	++++	+++	/	/	+++	/
Carbofuran	/	/	++++	+++	/	/	+	/
Methomyle	/	/	+++	+	/	/	+	/
Oxychloride de cuivre	/	/	+++	++	+	++	/	+++
Hydroxide de cuivre	/	/	+	++	+	+	/	+
Sulfate de cuivre	/	/	++	++	++	+	/	+

4.2 Apport de l'informatique

L'approche informatique est basée sur un modèle générique orienté réutilisable d'une ligne de produits 'usine d'insecticides' utilisant un modèle de variabilité amélioré.

Cette approche est supportée par un outil informatique « **SysPL** » que nous avons adapté à notre étude de cas relative à la recherche de la structure du produit le moins toxique du domaine « insecticides ».

4.3 Définitions

Nous allons donner dans cette section quelques définitions utiles dans notre travail relatives à la terminologie informatique. Ces définitions concernent les termes: « Ligne de produits (LdP) », « variabilité » et « Asset ».

Le principe d'une LdP est la prise en compte des aspects communs et variables de toutes sortes de produits pendant toutes les étapes de leur cycle de vie.

Dans la littérature, il y a un consensus sur la définition d'une ligne de produits. Elle est définie comme un ensemble de systèmes partageant un ensemble de propriétés communes et satisfaisant des besoins spécifiques pour un domaine particulier. Ces systèmes sont construits à partir d'éléments de la ligne appelés Assets. L'asset peut être un modèle, un document, un composant, une structure (un schéma) ou une exigence (un besoin, une demande).

L'objectif principal d'une approche LdP est d'augmenter la productivité et diminuer les durées de réalisation.

La notion de variabilité est utilisée pour regrouper les caractéristiques qui différencient les produits de la même famille par contre la communalité est utilisée pour regrouper les caractéristiques partagées par les produits de la même famille.

L'approche LdP peut être abordée selon une double ingénierie : une ingénierie de domaine et une ingénierie d'application. La première consiste à développer et construire des assets réutilisables. La deuxième ingénierie consiste à utiliser ces assets pour la construction d'un produit par l'adoption d'une série de choix à partir d'un système de décision.

4.4 Aperçu sur notre Modèle de variabilité

Les modèles existants utilisent pour représenter la variabilité, 3 types différents, à savoir; le type optionnel, le type obligatoire et le type alternatif.

- Le premier est utilisé lorsqu'une caractéristique peut figurer ou non parmi la liste des caractéristiques du produit. Son existence est optionnelle dans la structure du produit.
- Le deuxième type est utilisé pour représenter une caractéristique qui doit toujours figurer dans la structure de tout produit de la LdP.
- Le dernier type offre une possibilité d'alternatives pour une caractéristique et c'est le choix fixé qui sera pris en compte dans le produit en construction.

Nous avons ajouté un autre type de variabilité à ce modèle et qui prend en compte un autre aspect de la variabilité, il est lié à l'existence transitoire ou temporaire du statut de la caractéristique. Dans certains domaines notamment en biologie, et pour d'autres à cause des exigences de marché, le statut d'une caractéristique variable peut changer. Elle peut être identifiée à un certain type puis ne pas le garder pendant son cycle de vie. Nous avons identifié ce nouveau type par « transitoire ». Appliqué aux caractéristiques variables de type « obligatoire », il permet d'avoir deux nouveaux types : « obligatoire transitoire » et « obligatoire strict » (ou « obligatoire »). Appliqué au type « optionnel », il donnera deux nouveaux types : « optionnel transitoire » et « optionnel strict » (ou « optionnel »). Tableau (10).

Tableau 10 : Identification des variabilités selon l'effet

<i>Effets</i>	<i>Types de variabilité</i>
Effets Physiologiques	
Croissance	Obligatoire stricte
Effets biochimiques	
Protéines	Obligatoire stricte
MDA	Optionnelle stricte
Acho-E	Obligatoire transitoire
GSH	Obligatoire stricte
GST	Optionnelle transitoire
GPX	Optionnelle transitoire
CAT	Optionnelle stricte

4.5 L'outil Support 'SysPL'

« SysPL » est un outil informatique que nous avons développé par nos soins pour supporter notre approche d'optimisation. Dans sa première version, il est capable de supporter uniquement une partie de l'approche.

Cette version permet de mettre en œuvre une ligne de produits classique et de créer la base des Assets et de générer la base des assets génériques à partir de celle des assets et de celle des assets génériques.

Elle permet également d'identifier l'Asset optimal et de classer les Assets génériques selon leurs identifiants de variabilité.

Cette dernière option permet d'obtenir l'identifiant qui correspond à l'Asset minimal du domaine. Les autres fonctions et concepts de notre approche sont en cours de mise au point, dans une première étape pour achever l'optimisation de l'ingénierie des Assets pour et par la

réutilisation et dans une seconde étape pour l'optimisation de l'ingénierie des produits pour et par la réutilisation.

Pour son application à la Toxicologie relative à la recherche du produit le moins toxique parmi des insecticides partant d'une ligne de produits 'usine d'insecticides', nous étions contraint d'apporter quelques modifications concernant l'identifiant de variabilité de chaque asset et l'étape d'optimisation du fait que **SysPL** pouvait exécuter séparément chaque étape de l'approche à la demande de l'utilisateur.

4.6 Application de l'approche à notre étude

a) Définition de la molécule ciblée

Un asset optimal correspondant à une molécule d'un insecticide jugé le moins toxique dans le domaine des insecticides étudiés.

b) Adaptation de l'approche SysPL à l'étude de cas

Les testes de toxicité effectués sur les différentes molécules mères, concernent partiellement ou totalement les deux types d'effets biochimiques et physiologiques.

- **Assetisation des structures des molécules mères**

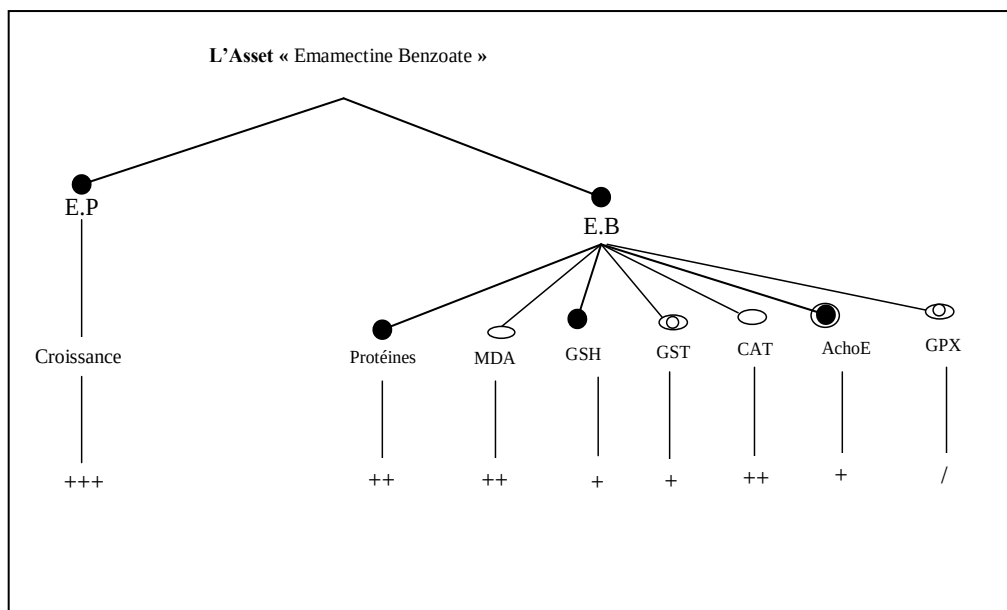


Figure 31 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Emamectine Benzoate ».

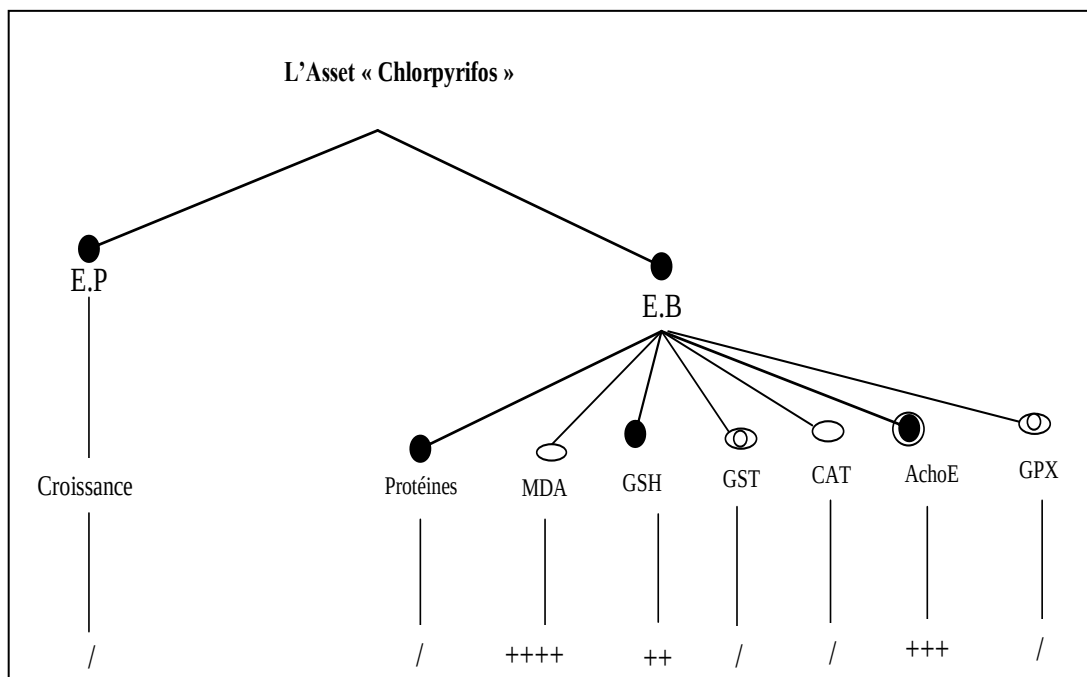


Figure 32 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Chlorpyrifos ».

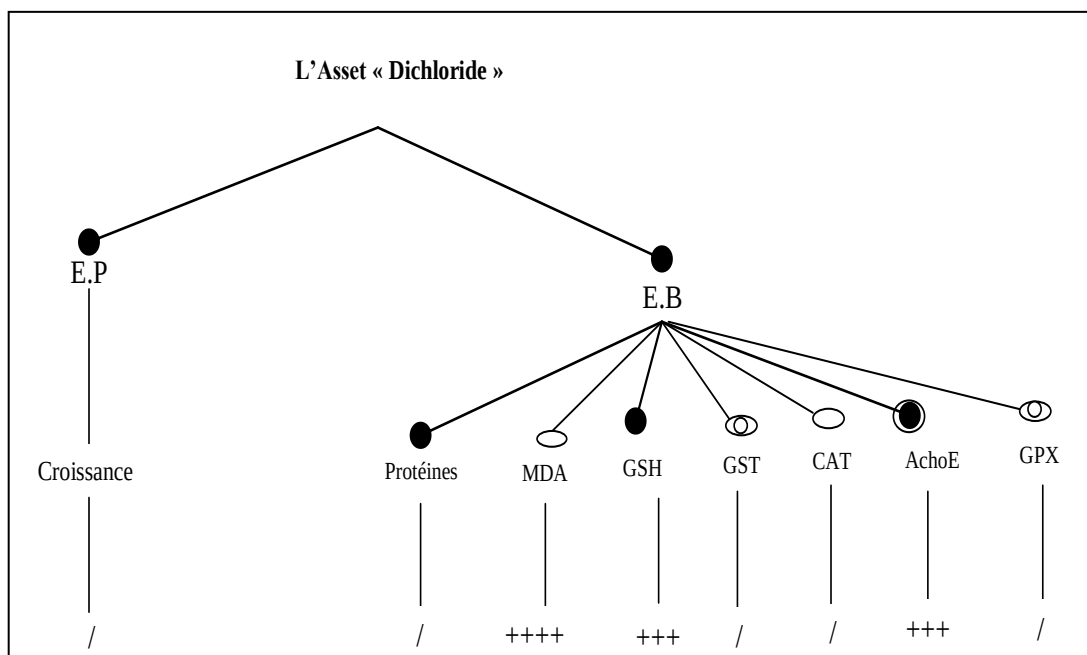


Figure 33: Schéma des caractéristiques de l'assét « Dichloride ».

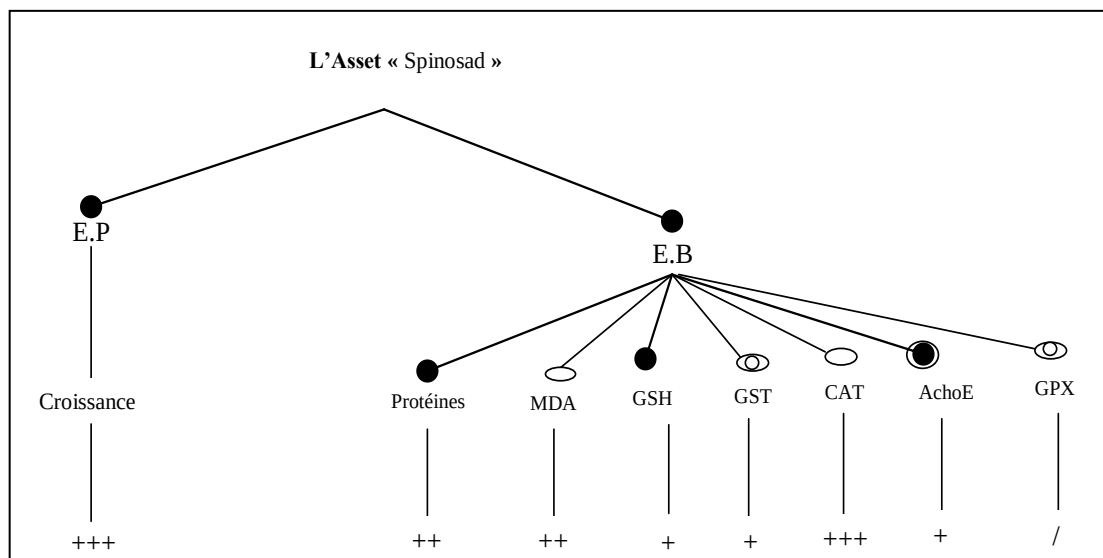


Figure 34 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Spinosad ».

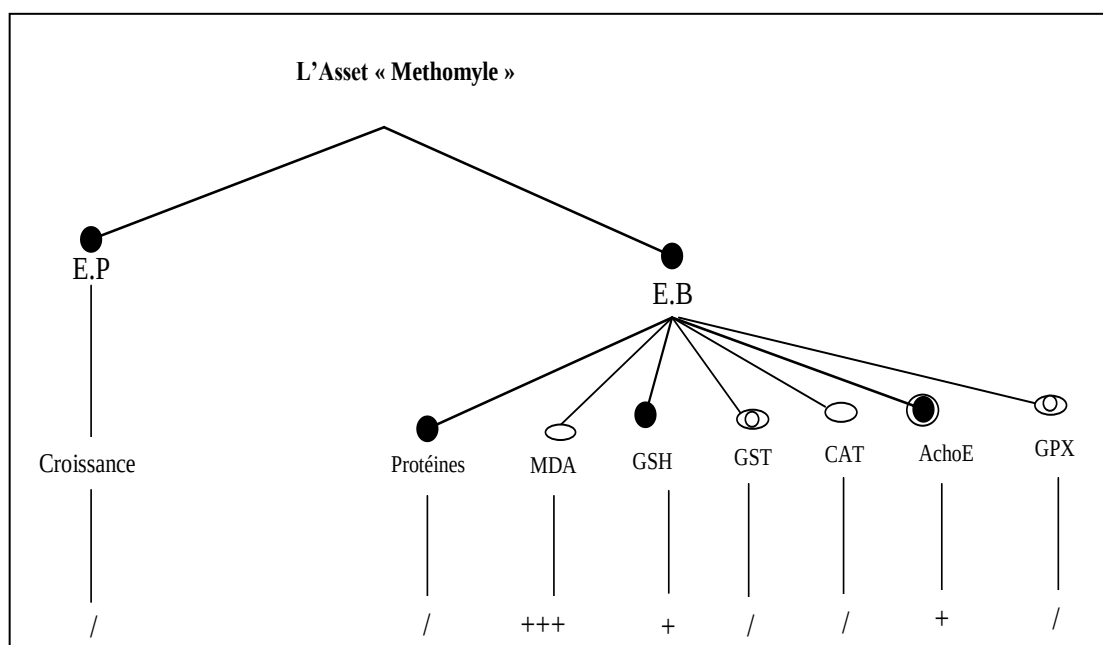


Figure 35 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Méthomyl ».

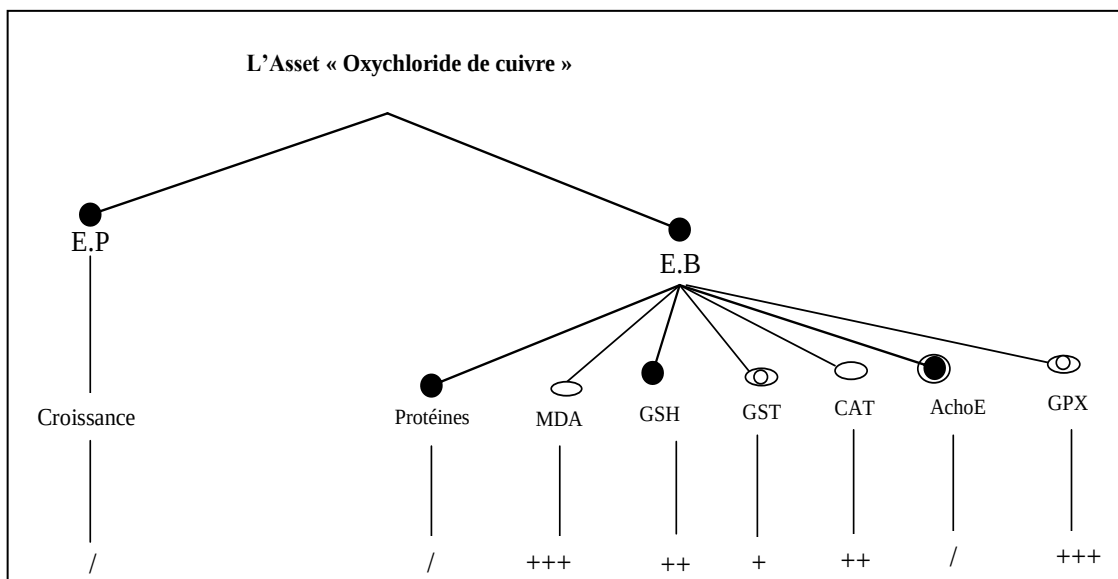


Figure 36 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Oxychloride de cuivre ».

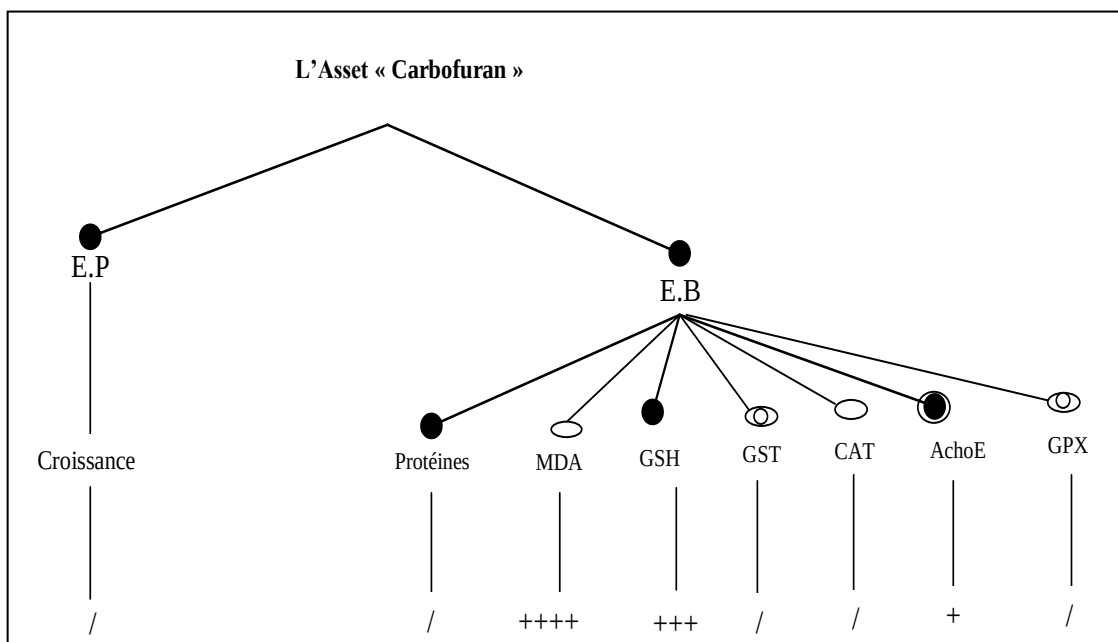


Figure 37 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Carbofuran ».

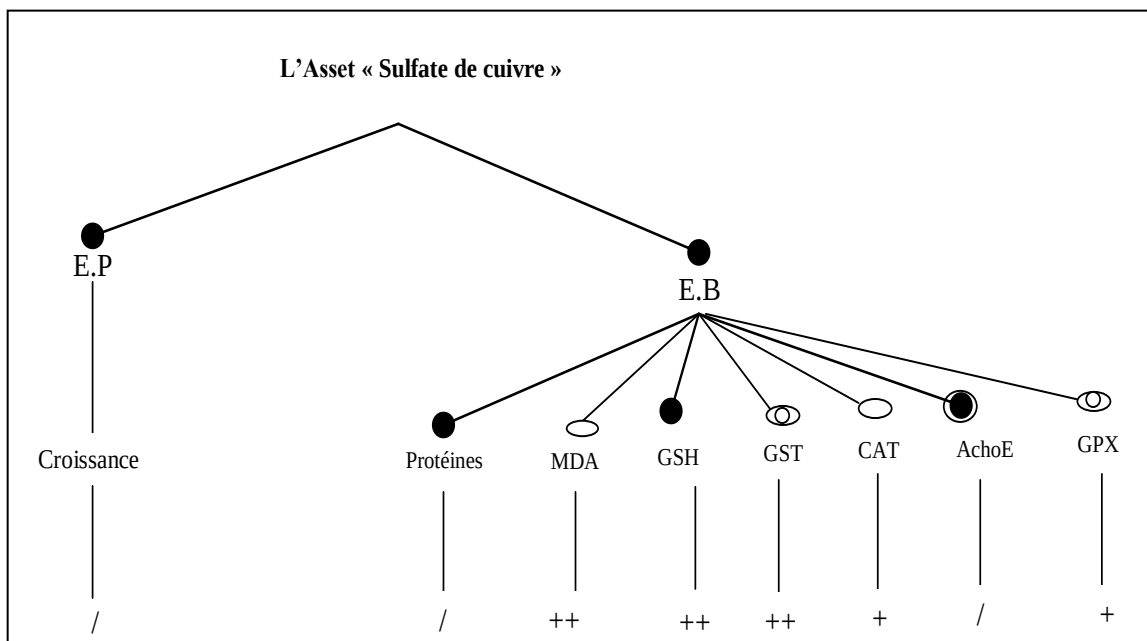


Figure 38 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Sulfate de cuivre ».

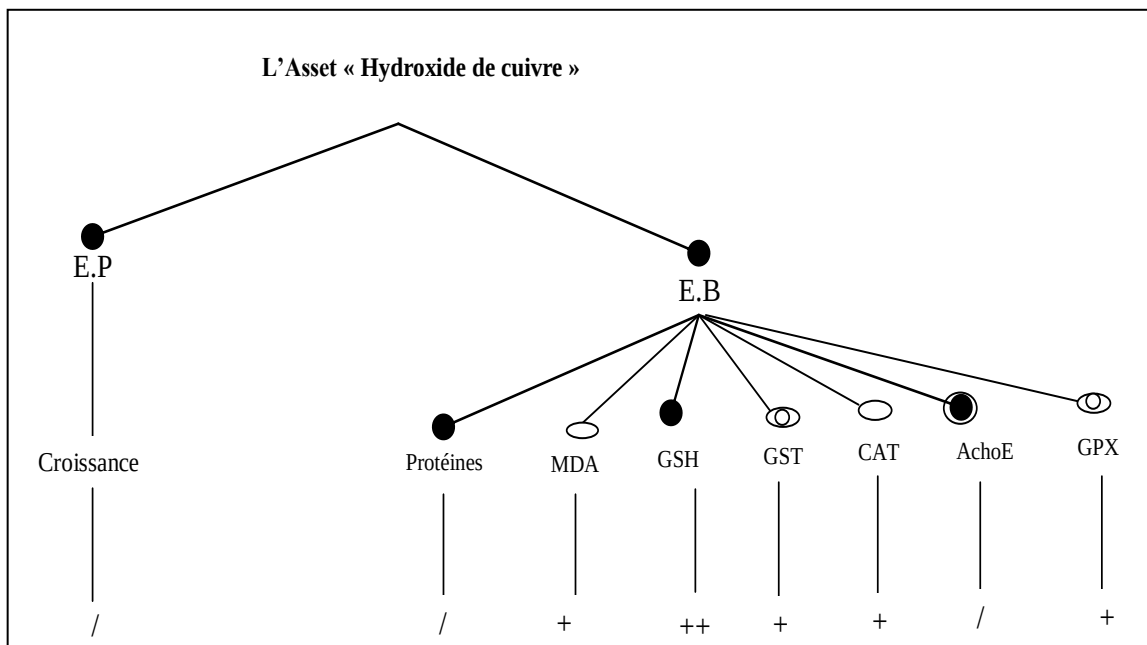


Figure 39 : Schéma des caractéristiques de l'assét « Hydroxide de cuivre ».

c) Structure de l'Asset correspondant au composé le moins toxique

Ainsi l'outil "SysPL" nous a permis d'établir une Asset dont la structure est représentée dans la figure (42).

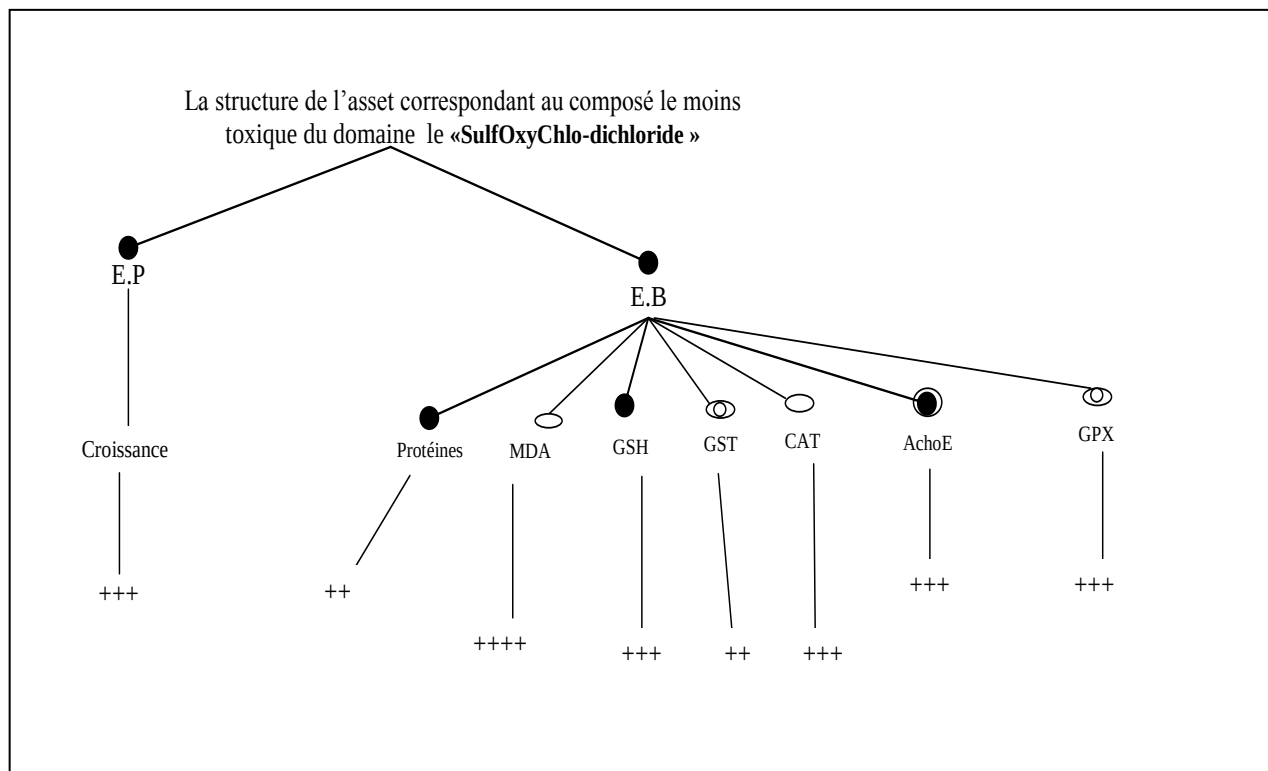


Figure 40 : Schéma des caractéristiques correspondant au composé optimal le moins toxique du domaine « SulfOxyChlo-dichloride ».

Clé

- Obligatoire ✕ Alternative —○ Optionnelle —● Obligatoire transitoire
 —○ Optionnelle transitoire **E.P :** Effets Physiologiques **E.B :** Effets Biochimiques

En utilisant l'approche multibiomarqueur et en tenant compte de nos résultats concernant la cinétique de croissance, l'évolution du taux de protéines, des biomarqueurs de la toxicité tels que le taux de GSH, l'activité GST, AChE, CAT, GPx ainsi que les variations d'un biomarqueur

de la peroxydation lipidique en l'occurrence le MDA , nous avons choisi une version adaptée de l'outil "SysPL" conçue initialement pour améliorer la réutilisabilité dans les lignes de produits logiciels, nous avons pu ajouter une fonctionnalité importante dans le domaine de la biologie qui consiste à rechercher des structures optimales de produits à partir de produits existants.

En effet « **SysPL** » est capable de créer une ligne de produits à partir de produits existants. La structure de l'Asset général de retrouver le diagramme des caractéristiques d'une ingénierie LdP traditionnelle. « **SysPL** » permet également d'optimiser la recherche et le développement d'un produit à partir de la base des Assets et de celle des Assets génériques. L'approche utilisée par « **SysPL** » qui repose sur un modèle amélioré de variabilité, un modèle générique en plus de la prise en compte des produits existants lui confère une prise en charge de l'extensibilité d'une ligne de produits. L'automatisation de l'exécution des étapes d'optimisation de SysPL et son adaptation en vue d'aborder la construction de domaines en cours de recherche sont en cours de développement.

Le produit le moins toxique développé par l'outil Sys PL est constitué de deux à trois molécules insecticides qui sont le sulfate de cuivre, l'oxychlorure de cuivre et le Dichlorure.

Conclusion

Les pesticides possèdent un complexe de particularités spécifiques qui les distinguent des autres agents chimiques utilisés par l'Homme, comprenant principalement leur introduction intentionnelle dans l'environnement, leur inévitable circulation dans la biosphère, la possibilité d'exposition de très larges populations ainsi que leur haute réactivité biologique. Avant leur mise en marché, les pesticides subissent un nombre de tests qui aboutissent à l'élimination des composés jugés toxiques pour l'Homme ; la carcinogénicité et la génotoxicité étant les premières propriétés recherchées (Shrack et Coquil, 2009 ; Lin *et al.*, 2002 ; Hurst et Sheahan, 2003).

De plus, les produits phytosanitaires représentent un risque non seulement pour l'homme et son environnement mais aussi pour les espèces non cibles qui sont nécessaires pour l'écosystème, à défaut et avec le temps ces espèces vont disparaître.

En utilisant l'approche multibiomarqueurs et en tenant compte de nos tests de toxicité notamment le taux de Protéines, de GSH, de MDA, et les activités GST, AChE, CAT, et à l'aide d'une version adaptée de l'outil "SysPL" conçu initialement pour améliorer la réutilisabilité dans les lignes de produits logiciels, nous avons pu ajouter une fonctionnalité importante dans le

domaine de la biologie qui consiste à rechercher des structures optimales de produits à partir de produits existants.

L'identification *in silico* des effets toxiques provoqués par les produits phytosanitaires serait hautement souhaitable, car elle porte non seulement sur la protection de la santé humaine, mais engendre également une variété d'avantages écologiques et la gestion durable des ressources. Les études *in silico* sont généralement moins onéreux que les essais cliniques.

Dans notre travail, nous avons une approche multi biomarqueurs basée sur des tests toxicologiques concernant plusieurs pesticides sur un modèle biologique biomarqueur : l'escargot.

Le recours à des approches informatiques adaptées à ce type de recherche constitue un grand apport dans ce domaine. C'est la solution adoptée dans notre étude à travers une adaptation de l'outil 'SysPL' basé sur une amélioration de l'approche ligne de produits par un modèle générique qui consiste en un produit moins toxique pour l'homme et son environnement. Ainsi, il ressort de notre étude *in silico* que le Proclaim est classé parmi les molécules les plus toxiques, bien qu'il soit classé comme biopesticides (semi-synthétique), son utilisation abusive et son introduction relativement récente en Algérie devrait nous inciter à nous pencher sur la surveillance de l'utilisation des produits phytosanitaires et surtout la réglementation de l'importance et/ou l'utilisation de ces derniers.

Conclusion Générale

Le gastéropode *Helix aspersa*. et le protiste cilié *Paramecium sp.* occupent une position privilégiée dans l'écosystème en tant que bioindicateurs/bioaccumulateurs.

La paramécie étant constamment présente dans les milieux dulçaquicoles est un élément de base des réseaux trophiques mais aussi un modèle alternatif de choix pour les études toxicologiques et écotoxicologiques.

De son côté, l'escargot *Helix aspersa* est largement présent dans les écosystèmes terrestres, c'est un mollusque, qui peut nous renseigner sur la qualité de l'écosystème dans lequel il vit, il est exposé à la pollution par plusieurs voies d'exposition qui impliquent l'ingestion d'aliments souillés ainsi que le contact et l'absorption par l'épithélium du pied depuis des surfaces contaminées.

Nous avons choisi d'évaluer la toxicité potentielle de l'Emamectine benzoate sur les deux espèces *paramecium sp.* et *Helix aspersa*. afin de mieux comprendre le mode d'action du xenobiotique aussi bien à l'échelle d'un organisme unicellulaire que pluricellulaire.

En effet, la paramécie est un organisme Eucaryote possédant des cils dont la structure est comparable à celle de la trachée des mammifères (Berrebbah, 1990), ceci justifie donc l'utilisation de cet organisme comme modèle alternatif.

D'autre part l'escargot étant un bioindicateur /bioaccumulateur majeur de la pollution environnementale, son intoxication peut nous renseigner sur la qualité de l'environnement où il vit.

Ainsi il ressort de nos résultats, que l'escargot *Helix aspersa*. et *paramecium sp.* ont répondu d'une manière quasi similaire au traitement par l'Emamectine benzoate.

Cette sensibilité des deux espèces s'est manifestée en premier lieu par une perturbation dans le développement des paramètres physiologiques (diminution du poids des escargots ainsi que celui de leurs organes et une inhibition de la croissance des paramécies), d'un autre côté, nous avons mis en évidence une perturbation globale du métabolisme des deux espèces à travers l'augmentation des taux de protéines totales chez *paramecium sp.* et chez *Helix aspersa*. or nous savons que la synthèse des protéines totales implique plusieurs événements en particulier celui de l'induction des activités enzymatiques.

Concernant l'étude des biomarqueurs du stress oxydant nous avons mis en évidence une diminution importante du taux de GSH parallèlement à une augmentation des activités GST et de

l'enzyme antioxydante CAT, corrélée à l'augmentation du taux de MDA qui témoigne d'une peroxydation lipidique particulièrement au niveau des membranes sachant que ce paramètre est un indicateur de stress oxydant traduisant une dégradation de la membrane cellulaire. L'activité AChE n'étant pas une enzyme qui intervient dans les systèmes de défense a été inhibée sous l'effet de l'insecticide, or nous savons que l'AChE est inhibée par les molécules neurotoxiques ayant pour cible les canaux chlore de la synapse inhibitrice, confirmant ainsi une neurotoxicité.

A partir de ces résultats, nous nous sommes intéressés au métabolisme respiratoire des paramécies, en tant qu'activité pouvant nous confirmer l'implication des enzymes de la phase I de la détoxification, à savoir les mono-oxygénase à Cyt p 450 dont le rôle est l'introduction d'un atome d'oxygène sur le xénobiotique chose qui signifie une augmentation de la consommation d'oxygène par les paramécies. La polarographie est une technique idéale qui rend compte de l'intensité de l'activité respiratoire à travers la consommation d'O₂, mais également - c'est là où réside l'intérêt de la technique utilisée- nous avons ainsi mis en évidence une forte consommation d'O₂ en présence de l'EMB.

L'étude histopathologique a révélé des altérations irréversibles au niveau de l'hépatopancréas, du rein et du poumon des escargots témoignant ainsi d'une altération du processus digestif du métabolisme des xénobiotiques ainsi que de la respiration.

La dernière partie de notre travail est une étude *in silico* qui nous a permis de classer le proclain dans une échelle de pesticides (insecticides) qui va du plus toxique au moins toxique, par un système informatique (que nous avons mis au point en collaboration avec l'équipe du Pr. Kimour du département d'informatique) le système « **Sys PL** ».

Cette étude *in silico* nous a permis d'identifier un modèle de pesticide par la combinaison de certains produits jugés par le système « **Sys PL** » moins toxiques. Cette méthode de recherche est très rapide, efficace pour la production des pesticides moins toxiques pour l'environnement et l'homme et surtout peu onéreuse. Il ressort de cette étude que le xénobiotique à base d'Emamectine benzoate est classé toxique pour l'environnement.

A travers tous ces résultats, nous pouvons conclure que le biopesticide à base d'Emamectine benzoate semble aussi toxique que les autres pesticides (organochlorés, carbamates, etc...) sur les organismes cellulaires, pluricellulaires et l'environnement en général, et que la paramécie et l'escargot sont d'excellents modèles pour les études en toxicologie et en

écotoxicologie, que ce soit sur le plan physiologique ou métabolique les deux modèles biologiques choisis, semblent répondre d'une manière quasi similaire, d'où le caractère toxique ubiquitaire du Proclaim.

Perspectives

En vue de compléter notre travail il serait judicieux :

- D'effectuer une étude au niveau des mitochondries isolées car c'est l'une des cibles de l'EMB.
- D'effectuer une étude au niveau des lysosomes isolés.
- De développer les dosages des biomarqueurs (GPX, LDH et l'anion super oxyde).
- De réaliser une étude ultrastructurale.
- D'étudier la toxicité de l'Emamectine benzoate sur les œufs des escargots et des juvéniles.
- D'analyser de manière fonctionnelle les entités moléculaires induites par le stress chimique et, identifier et caractériser les gènes impliqués dans les processus mis en jeu dans la signalisation des stress chimiques et/ou dans la régulation de la réponse cellulaire.

Références Bibliographiques

- Aarab, N., 2004. Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves : De l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de BORDEAUX 1, 276 p.
- Abhauer, J., 1990. Pesticide residues-Determination and evaluation in food and environment, in Pesticide chemistry, VCH, New York, p.361-372.
- ACTA., (2005) : « Index phytosanitaire ACTA » .41 ème édition.Paris 821 p.
- Ait Hamlet, S., Bensoltane, S., Djekoun, M., Yassi, F., et Berrebbah H., 2012.Histological changes and biochemicals paramaters in th hepatopancreas of terrestrial gastropod *Helix aspersa* as biomarker of neonicotinoid insecticide exposure.African Journal of Biotechnology,11 (96):16277-16283.
- Albert,B., Bray, D.,Lewis, J.,Raff, M.,Roberts, K., et D.Watson J.,1986:Biologie moléculaire de la cellule .Edition Flammarion, p.256-286.
- Al-Mutairi, D.A.,Craig, I. Batinic-Haberle, L.T. Benov., 2007. Induction of oxidative cell damage by photo- treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. Free radical research, 41: p.89-96.
- Amiard, J-C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, edited by par L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard and F. Ramade (Paris: Lavoisier, Technique et Documentation), p.21-31.
- Apel,K., et Hirt,H.,2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction.Annu Rev Plant Biol, 55:373-399.
- Armstrong, R.N., 1991. Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chemical Research in Toxicology*, 4(2), p.131-140.
- Aruoma, O.I., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *JAOCS*, 75(2), p.199-212.
- Atailia, A., 2009. Effet des poussieres metalliques d'origine industrielles sur un organisme animal bio indicateur / bioaccumulateur de pollution : *Helix aspersa*. Memoire de magister, Universite Badji Mokhtar, Annaba. 45 p.

- Aurousseau, B., 2002. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux : Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. INRA Prod. Anim, 15(1), p. 67-82.
- Azzouz, Z., 2012. Etude des effets toxiques d'un fongicide (Amistar Xtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. doctorat de l'université d'Annaba. 141, p. 114.
- Azzouz, Z., Berrebbah, H., et Djebbar M.R., 2011. Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. African Journal of Microbiology Research, Vol. 5(20), p. 3243-3250.
- Bailey, S.E.R., 1981. Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. J. Comp. Physiol, 142, p. 89-94.
- Banerjee, B.D., Koner, B.C., Ray, A., 1997. "influence of stress on DOT-induced humoral Immune responsiveness in mice". Environ Res, 74, p. 43-7.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K., 1999. "Biochemical effects of some pesticides on lipid-peroxydation and free – radical scavengers". Toxicol. Lett, 107, p. 33-47.
- Barata, C., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* straus exposed to ethyl parathion. Ecotox. Environ. Safe, 49, p. 155–163.
- Barata C., Solayan A., Porte C. 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (Chlorpyrifos, malathion) and Carbamates (Carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, 66, p. 125-139.
- Baril, A., Whiteside, M., Boutin, C., 2005. Analysis of a database of pesticide residues on plants for wildlife risk assessment. Environmental toxicology and chemistry. 24, 2, p. 360-371.
- Barillet, S., 2007. Toxicocinetique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz, France. 476p.
- Barker, G. M., 2001. The Biology of Terrestrial Molluscs. CAB International, Oxon, Wallingford, UK. 567 p.
- Beal, D.L., and Anderson, R.V., 1993: Response of Zooplankton to rotenone in a small pond. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 51 : 551-556.

- Beaumont et Cassier., 1998. Travaux Pratique de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3^{ème} édition DUNOD.
- Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A., 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathy-modiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol*, 75, p.354–373.
- Beckett, G.J., Hayes, J.D., 1993. Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Advances in Clinical Chemistry*, 30, p.281-380.
- Beeby, A., 2001. What do sentinels stand for? *Environ. Pollut*, 112, p.285-298.
- Beisson, J., Be´termier, M., Bre´, M., Cohen, J., Duhaucourt, S., Duret, L., Kung, C., Malinsky, S., Meyer, E., Preer, J.R. et al.; 2010: *Paramecium tetraurelia*: the renaissance of an early unicellular model. Cold Spring Harb. Protoc, pdb.emo140.
- Belhaouchet, N., Djebbar, M.R., Meksem, L., Grara, N., Zeriri, I., Berrebbah, H., 2012. Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide: The Spinosad on an alternate model: *Helix aspersa*. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(8), p.4199-4206.
- Belivisi, M.G., Stretton, D., Barness, P.J., 1999. Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea pig airways. *Eur. J. Pharmacol*, 198, p.219-221.
- Benbouzid, H., 2007 : Stress chimique et comportement microbien : Cas de *Paramecium sp.* mémoire de Magister de l’université d’Annaba .p 71.
- Benbouzib, H., 2012 : Evaluation et etude de la toxicité d’une famille d’acaricide sur des protistes ciliées. these de doctorat de l’université d’Annaba. p 87.
- Benbouzid, H., Berrebbah, H., Berredjem, M., Djebbar, M.R., (2012). Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium sp.* with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicological & Environmental Chemistry*, DOI:10.1080/02772248.p.655-696.
- Bennett, J., and Cubbage, J.; 1992: Evaluation of Bioassay Organisms for Freshwater Sediment Toxicity Testing. Washington Dept. of Ecology, Olympia, WA. 29p.
- Berrebbah, H., 1990 : Etude du contrôle de la mobilité flagellaire et ciliaire par le calcium. Effet du lindane, insecticide organochloré. Thèse de Doctorat de l’Université Pierre et Marie Curie, Paris VII : 144 p.

- Berger ,B., et Dallinger ,R.,1993.**Terrestrial snails as quantitative indicators of enviromental monitoring assessment, 25,p.65-84.
- Bernard S.,(1989):** “ Biochimie Clinique , Instrument et techniques.Diagnostics médico-chirurgicaux », Edition moloine(2^{ème} édition).
- Beugnet F.,Gevrey,J.,etKerboeuf,D.,(1997).**“Les endectocides : mode d’action et d’utilisation »,Point .vet.28, p.1915-1919.
- Bibic,A.,Drobne,D.,Strus,J.,and Byrne,A.R.,1997.** “Assimilation of zinc by Porcellio scaber(Isopoda,Crustacea) exposed ton zinc”,Bull.Environ.Contam.Toxicol,58,814- 821.
- Bidleman,T.,Walla, M.D.,Roura,R.,Carr, E., and Schmidt,S.:(1993).** “ Organochlorines pesticides and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere of the ocean Antartica”,Marine Pollution Bulletin,26,p.258-262.
- Blanchette, B.N., Singh, B.R., 1999.** Purification and characterization of the glutathione-S-transferases from the northern quahog *Mercinaria mercinaria*. *Marine Biotechnology*, 1, p.74-80.
- Bloomquist,J.,(2003) :** « Chloride channels as tools for developing selective insecticides”.Arch.Insect.Biochem,Physiol, 54,p.145-156.
- Bocquené, G., Roig, A., Fournier, D., 1997.** Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase
- Boissay , H., (2007) .** « Les avermectines et leurs utilisation chez les lagomorphes » :p 84.
- Bolton, R.M., Ahokas, J.T., 1997.** Purification and characterization of hepatic glutathione transferases from an insectivorous marsupial, the brown antechinus (*Antechinus stuartii*). *Xenobiotica*, 27(6), p.573-586.
- Bonnet, J.C.,Vrillon, J.L., 1990.** L’escargot *Helix aspersa* biologie – élevage. Edition INRA,p.14-15.
- Borgeraas, J., Nilsen, K., Stenersen, J., 1996.** Methods for purification of glutathione transferases in the earthworm genus *Eisenia*, and their characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114C(2), p.129-140.
- Boucenna, M., 2010.** Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les aciéries 1et 2 du complexe sidérurgique d’EL-Hadjar sur un modèle bioaccumulateur *Helix aspersa*. Memoire de magister, Universite Badji Mokhtar, Annaba. 74 p.

- Bounias M., 1999: Traité de Toxicologie Générale, Edition Springer, p.58-583.
- Boussineq M., 2005 : « IVERMECTINE » Médecine tropicale, 65 ,p.69-79.
- 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,p.248-254.
- Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B. & Depledge, M.H., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 66, p. 267-278.
- Bucci,G.,Ramoino, P.,Diaspro, A.,Usai, C.,2005.A role for GABA A receptors in the modulation of paramecium swimming behavior.*Neuroscience Letters*, (386),p.179-183.
- Burgeot, T., Bocqué'ne', G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R.M., Dimeet, J., Santella, R.M., Garcia de la Parra, L.M., Pftol- Leszkowicz, A., Raoux, C., Galgani, F., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 131,p.125-141.
- Cadenas,E., Boveris, A., Ragan, C.I. and Stoppani, A.O.M., 1977 . Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinolcytochrome c reduction from beef heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 180, p.248-257.
- Calvet , R E.,Barriuso, C., Bedos, P.,Benoit, M P.et Charnay, Y.,(2005). « Les pesticides dans le sol, conséquences agronomiques et environnementales » ,coquet , Edition France agricole.
- Campbell, W C., (1989). "Ivermectin and abamectin.New York": Springer-Verlag, 361p.
- Castelluci,V et Trudeau, L.E.,1997 . « Quelques secrets de la mémoire révélés par un escargot marin.interface(ACFAS).3 :14.
- Caswell,H.,2001.Matrix population Models:contruction,analysis,and interpretation,second edition,Sinauer Associates(Eds.),Sunderland,Massachussets,USA,722p.
- Capkin, E., Altinok I.and Karahan S., 2006. “ Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan , an organochlorine pesticide, to rainbow trout”, *Chemosphere*, 64,p.1793-1800.
- Casida, J.E. and G.B. Quistad, 2004. why insecticide are more toxic to insects than people:the unique toxicology of insects.*J.Pestic Sci*, 29,p. 81-86.131.

- Chabicoovsky, M., Niederstätter, H., Thaler, R., Hödl, E., Parson, W., Rossmanith, W., Dallinger, R., 2003. Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 190, p.25-36.
- Chapman, P.M., 2001. Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. *Hydrobiologia*, 463, p.149–169.
- Cheung, V.V., Depledge, M.H. & Jha, A.N., 2006. An evaluation of the relative sensitivity of two marine bivalve mollusc species using the Comet assay. *Marine Environmental Research*, 62, p.301–305.
- Chevallier, H., 1992. L'élevage des Escargots. Production et Préparation du Petit-Gris. 2ème édition. Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort.
- Chevallier, H., 1982. Facteurs de croissance chez des gastéropodes pulmonés terrestres paléarctiques en élevage. *Haliotis*, 12, p. 29-46.
- Chevreuil, M. and Garmouma, M., 1993. « Occurrence of hepatic glutathione system of enzymes in suckling mouse pups exposed transplacentally to malathion, *J. Appl. Toxicol.* 13, p.411-416.
- Cliff, B., Weibel, D. E., Lockyer, N. P., Jungnickel, H., Stephens, G., Vickerman, J. C., 2003. Detection of chlorinated pesticides on the surface of fungus using ToF-SIMS. *Applied surface science*, 203-204, p.710-713.
- Coeurdassier, M., 2001. Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnaea stagnalis* et *Lymnaea palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques .Thèse de doctorat, université de Franche Comté, France. 281p.
- Coeurdassier, M., M. Saint-Denis, A. Gomot-de Vaufléury, 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, p.1951-1957.
- Cohen, J., 2007. Génétique de la dynamique cellulaire chez la paramécie. Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.). Département de Génétique des Fonctions Cellulaires.
- Corliss, J. O., Lacy, D. And Palay, S.O., 1961: Fixing and staining of Protozoa in the Microtome's Vade-Mecum (Bolles-Lee). London, *XIII* ed.

- Cortet ,J.,Gomot-de Vaufleury A.,Poinsot-Balaguer,N.,Gomot , L.,Texier,C.Cluzeau,D.,1999.The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutants effects.European Journal of Soil biology,35,p.115-134.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38, p.122-131
- Costelloe, M., J. Costelloe, B. O'Connor et P. Smith (1998). « Densities of polychaetes in sediments under a salmon farm using ivermectin ». *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 18, p.22-25.
- Cross, J.V., and Berrie, A.M., 1994. Effects of repeated foliar sprays of insecticides or fungicides on organophosphate-resistant strains of the orchard predatory mite *Typhlodromus pyri* on apple. *Crop protection*, 13, 1, p.39-44.
- Cudmore Larison David & Charles, Newton Abbot; 1977: The Center of Life, A Natural History of the Cell.
- Cuthbertson A. G. S., and Murchie A. K., 2003. The impact of fungicides to control apple scab (*Venturia inaequalis*) on the predatory mite *Anystis baccarum* and its prey *Aculus schlechtendali* (apple rust mite) in northern Ireland Bramley orchards. *Crop protection*, 22, p.1125-1130.
- Da Silva,R.S., Cognato, G.P.,Vuaden, F.C., Rezende, M.F.,Thiesen, F.V.,Fauth, M.G.,Bogo, M.R., Bonan, C.D.,Dias, R.D.,2003.Comp.Biochem.Physiol,C133p.213-220.
- Dagnelie, P., 1999. Statistiques théoriques et appliquées.Tome2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles.Univ De boeck et Larcier, 659p.
- Daguzan, J., 1981. Contribution à l'élevage de l'escargot petit-gris : *Helix aspersa* Müller (mollusque gastéropode pulmoné stylommatophore). I. Reproduction et éclosion des jeunes en bâtiment et en conditions thermohygrométriques contrôlées. *Ann. Zootechn*,30, p.249-272.
- Davies, I.M. et G.K. Rodger (2000). « A review of the use of ivermectin as a treatment for sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) and *Caligus elongatus* Nordmann) infestation in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ». *Aquaculture Research*, 31 p. 869-883.

- Delmonte Corrado, M.U., F. Trielli, A. Amaroli, M. Ognibene, Falugi,C., 2005. Protists as tools for environmental biomonitoring :importance of cholinesterase enzyme activities, Nova Sciences Publishers,p.181-200.
- Delmonte Corrado, M.U., H. Politi, F. Trielli, C. Angelini,Falugi,C.,1999. Evidence for the presence of a mammalian-like cholinesterases in *paramecium primaurelia* (Protista Ciliophora) developmental cycle.J.Exp. Zool, 283,p.102-105.
- Delmonte Corrado, M.U., H. Politi, M. Ognibene *et al.* 2001. Synthesis of the signal molecule acetylcholine in *Paramecium primaurelia* (Protista,Ciliophora) developompemental cycle and possible function in conjugaison.
- Delmonte Corrado, M.U., M. Ognibene, F. Trielli, H. Politi, M. Passalaucqua,Falugi,C., 2002. Detection of molecules related to the GABAergic system in a single-cell eukaryote,*paramecium primaurelia* .Neurosci. Lett, 329,p.65-68.
- Depledge, M.H., Rainbow, P.S., 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol, C 97, p.1-7.
- Derlon,A.L.M., 2006.« Etude pharmacocinétique de l'influence du sexe sur le profil plasmatique de la selamectine chez le chien ».
- Dickinson, D. A., and Forman, H. J.,2002.Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology* , 64, p.1019-26.
- Djebar, H and Djebar,M.R., 2000. Bioénergétique, Les mitochondries végétales. Revue des sciences et technologie ; Synthèse2000. Publication de l'Université de Annaba. Edition Végarol : 103.
- Djekoun,M.,Djebar, M.R., Zaoui, L., Bensoltane , S., et Djebar, H .,2012. Biochemical, Enzymatic and Energy Alteration observed in *saccharomyces cerevisiae* subjected to oxidative stress.AEJTS ,2 (1),p.36-42.
- Djekoun, M., 2012. Évaluation de l'effet du stress oxydatif généré par le Cadmium à l'échellecellulaire: Cas de *Saccharomyces cerevisiae*.Thèse de Doctorat de l'université de Annaba., 129p., p.34-110.
- Dood N.,(2008): “ Emamectine benzoate : Human health risk assessment for proposed uses on tree nuts and pistachios and as on injection treatment for ornamental/non-bearing tree”;p.5, 9, 12, 13 .

- Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Meth. Enzymol, 186, p.241-431.
- Druez, D., Marano, F., Calvayrac, R., Volochine, B. and Soufir, J.C., 1989. Effect of gossypel on the morphology, mobility and metabolism of a flagellated protist, *Dunaliella bioculata*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 21(2),p.367-374.
- 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, p.335 -338.
- El-Gendy,K.S.,Radwan,M.A and Gad,A.F.,2009.In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail,*Theba pisana* exposed to cooper-based pesticides.Chemosphere, 77,p.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, p.88-95.
- 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.
- EMA,The European Agency for the Evaluation of Medicinal Product, 2003 :EMA/MRL/546/99.
- Environmental Protection Agency (E.P.A) „2006."Emamectin; Pesticide Tolérance".
- FAO/OMS Commission du Codex Alimentarius, 1994. Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires, 2, FAO/OMS, Rome 477p.
- Faure-Frémiot., 1924: Contribution à la connaissance des infusoires planctoniques. *Bull. Biol. Fr. Belg., suppl. 6* : 1-171.
- Federal Register „2003 .«Emamectin ;Pesticide Tolerance, Rules and Regulations” Volume 68,Number 131,p.40791-40803.
- Fenske, C., and Gunther, B., 2001. Electro-fishing in the lab: A new method to detect actue effects of heavy metals and organic pollutants in invertebrate indicator organisms.Int.J.Hyg.Environ.Health,204:157 -163.

- Final Report., 2007. "Evaluation of the potential risks to consumers from indirect exposure to veterinary medicines".
- Fishbein, L., 1977. Toxicological aspects of fungicides, in Antifungal compounds, vol. 2, Marcel Dekker, New York, p.537-598.
- Fitzpatrick, P.J., Krag, T.O.B., Højrup, P., Sheehan, D., 1995a. Characterization of a glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Biochemical Journal*, 305, 145-150.
- Fitzpatrick, P.J., Sheehan, D., 1993. Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Xenobiotica*, 23, p.851-861.
- Foley, V., Sheehan, D., 1998. Glutathione S-transferases of the yeast *Yarrowia lipolytica* have unusually large molecular mass. *Biochemical Journal*, 333, p.839-845.
- Fourrier J., (1988) : « Chimie des Pesticides », Paris.
- Frías-Espéricueta, M., Abad-Rosales, S., Aída, C.N.V., Isidro Osuna, L., Pérez-Osuna, F., Olvera, R.L., Voltolina, D., 2008. Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles, *Aquatic Toxicology*, 89, p.152-157.
- Fukushima, S., Shiota, C., Ogawa, H. et Sasagawa, S., 1979. Effects of heavy metals on *Paramecium tetraurelia*. Effects on cell division. *Jap.J.Hyg.*, 34(5):507-510.
- Fussell, R. J., Jackson, A. K., Reynolds, S. L., Wilson, M. F., 2002. Assessment of the stability of pesticides during cryogenic sample processing. 1. Apples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, p.441-448.
- Gamble, S.C., Goldfarb, P.S., Porte, C., Livingstone, D.R., 1995. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Marine Environmental Research*, 39, p.191-195.
- Gebel, G., 2000. Structural evolution of water swollen perfluorosulfonated ionomers from dry membrane to solution. *Polymer*, 41: p.5829-5838.
- George, S.G., Young, P., 1988. Purification and properties of plaice liver cytosolic glutathione-S-transferases. *Marine Environmental Research*, 24, p.93-96.

- Gomot, A., 1997 a. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. Arch. Environ. Contam. Toxicol, 33, p.209-216.
- Gomot, A., 1997. Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme. Bull. Acad. Natle.Méd ,181,p.59-75.
- Gomot, A., Gomot, L., 1995. Neurohormonal control of body and shell growth of the snail *Helix*. Bull. Inst. Océanog. Monaco , 14, p.141-149.
- Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., Bruckert, S., 1989. Influence of soil on the growth on the land snail *Helix aspersa*.An experimental study of absorption route for the stimulating factors. J. Moll. Stud, 55, p.1-7.
- Gomot-de Vaufleury, 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 Vaufleury, A., Kerhoas, I., 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology ,64, p.434-442.
- Grange,D.Camard,J.P.,Host,S.,Grémy,I.,2008 .Les pesticides : considérations sanitaires.Environnement et Santé ; ISBN :978-2-7371-1621-6.
- Grara ,N.,Berrebbeh,H.,Rouabhi,R.,Atailia,A et Djebbar,M.R., 2009.Impact of pollution by industrial metallic Dust on Bio-Accumulator Organism *Helix aspersa*. Global Veterinaria, 3(4),p.276-280.
- Grara,N., 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur(gasteropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux .Thèse de doctorat de l'université de Annaba.120 ,p.91.
- Gravato,C , Teles,M.,Oliveira,M.,Santos,M.A.,2006.Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. – the influence of pre-exposure to b-naphthoflavone. Chemosphere, 65,p.1821–1830.
- Guengerich, F.P., 1991. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. Minireview. J. Biol Chem., 266, p.10019-10022.

- Gupta, P.K., Durve, V.S., 1986. Histopathological changes induced by pentachlorophenol and sodium pentachlorophenate in the mantle of the freshwater snail *Viviparus bengalensis* (L). *Acta Hydrochim. Hydrobiol*, 14, p.433–437.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), p.7130-7139.
- Halliwell, B., and Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57, p.715-724.
- Halliwell, B., Cross, C.E., 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, 102(10), p.5-12.
- Hames, C.A.C. and Hopkin, S.P., 1992. "The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods", *J.Zool.(Lond)* 217, 599-627.
- Hellawell, J .M., 1986. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management .Elsevier Applied publishers, London and New –York, 530p.
- 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.
- Heusser, S et Dupuy, H.G., 2011. De la structure tissulaire à la réalisation des fonctions chez les gastéropodes pulmonés (I) Elément d'histologie et de physiologie des espèces *Helix aspersa* et *Helix pomatia*. *Folia conchyliologica* , 10, p.16-25.
- Hinson, J.A., Kadlubar, F.F., 1988. Glutathione and glutathione transferases in the detoxification of drug and carcinogen metabolites. In *Glutathione Conjugation, Mechanisms and Biological Significance*, edited by B. Ketterer and H. Sies (London: Academic Press), p. 235-280.
- Hong, S-H., Park, H-J., Kong, K-H., 1999. Purification and biochemical properties of glutathione S-transferase from *Oryza sativa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 122B, p.21-27.
- Honigberg ., 1964: Morphology and evolution of Ciliophora. III. Diagnoses and Phylogenesis of 53 Saproelbiontes mainly of the order Heterotrichida. *Arch. Protistenk.*, 107. p.185-294.
- Hopkin, S.P., 1990. Critical Concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial Arthropods. *Funct. Ecol* , 4, p.321-327.

- Huggett, R.J., Kimerie,P.M., Mehrle, JR & Bergman, H.L., 1992. Biomaekers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Fla., Lewis Publishers, p. 347.
- Hurst,M. R., and Sheahan,D.A., 2003. The potential for oestrogenic effects of pesticides in headwater streams in the UK. *The Science of the Total Environment*, 301, p.87-96.
- Iglesias, J., Castillejo, J., 1999. Field observations on feeding of the land snail *Helix aspersa* Müller. *J. Moll. Stud*, 65, p.411-423.
- Ishaaya,I.,Degheele,D.,1998.“Insecticides with Novel Modes of Action;mechanism and application”,Eds, p.153-157.
- Ismert, M., Oster, T., Bagrel, D., 2002. Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere* 46, 273-280.
- Jaeschke, H., 1995: Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 209, p.104-111.
- Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, p.515-540.
- Jarvinen, W.A., Ankley, G.T., 1999. Linkage of Effects to Tissue Residues: Development of a Comprehensive Database for Aquatic Organisms to Inorganic and Organic Chemicals. SETAC Press, Pensacola.
- Jasso-Chavez., R., Pacheco-Rosales., A, Lira-Silva., E., Gallardo-Perez., J.C, Noemi Garcia, Rafael Moreno-Sanchez.,2010. Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis* *Aquatic Toxicology* vol,100, p. 329–338.
- 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.
- Jonnalagadda, P.R., Rao, B.P., 1996. Histopathological changes induced by specific pesticides on some tissues of the fresh water snail, *Bellamya dissimilis* M€ull. *Bull.*
- Juhasz A. L., and Naidu R., 2001. Extraction and recovery of organochlorine pesticides from fungal mycelia. *Journal of microbiology methods*, 39, p.149-158.
- Jumel, A., Lagadic, L., 2000. Metabolism of polysaccharides in *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) exposed to 4-nonylphenol and nonylphenol dodecylethoxylate in

- mesocosms. Third SETAC World Congress. Global Environmental Issues in the 21st Century: Problems, Causes and Solutions. Brighton, Angleterre.
- Kamisaka, K., Habig, W.H., Ketley, J.N., Arias, M., Jakoby, W.B., 1975. Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin. *European Journal of Biochemistry*, 60(1), p.153-161.
- Kammenga, J.E., Dallinger, R., Donker, M.H., Kohler, H.R., Simonsen, V., Triebskorn, R. and Weeks, J.M., 2000: Biomarkers in terrestrial for ecotoxicological soil risk assesement. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol 164. G. W. Ware Edition. 175 Fifth Ave/New York/NY 10010, Springer-Verlag. P.93-147.
- Keeran, W.S., Lee, R.F., 1987. The purification and characterization of glutathione Stransferase from the hepatopancreas of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 255(2), p.233-243.
- Klobucar, G.I., Lajtner, J., Erben, R., 1997. Lipid peroxidation and histopathological changes in the digestive gland of a freshwater snail *Planorbarius corneus* L. (Gastropoda, Pulmonata) exposed to chronic and sub-chronic concentrations of PCP. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, p.128–134.
- Koner, B.C., Banerjee, B.D and Ray, A.,1998: "Organochlorine pesticide,induced oxidative stress and immune suppression in rats".*Indian J Exp Biol*,36: 395-398.
- Kosmala, A.; Charvet, S.; Roger, M.C. and Faessel, B., 1999: Impact assesment of a wastewater treatment plant effluents using in stream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Water Res.*, 33(1), p.266-278.
- Kovecses, J. et David, J., 2005 : « Risque et impact envirennementaux potentiels des avermectines pour les écosystèmes d'eau du Quebec ».Centre Saint Laurant,Conservation de l'environnement.Canada.
- Krüger, K. et C.H. Scholtz.,1998a. « Changes in the structure of dung insect communities after ivermectin usage in a grassland ecosystem. I. Impact of ivermectin under drought conditions ». *Acta Oecologia*, 19 ,p.425-438.
- Lagadic, L., Caquet, T. & Amiard, J.C.,1997.Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux* (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard & F. Ramade), Masson, Paris, p. 1-9.

- Lagadic, L., Caquet, T., 1996. Marqueurs biologiques de pollution: des outils au service de l'écotoxicologie. *Phytoma - La Défense des Végétaux*, 480, p.10-13.
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade F., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment. (5) Invertebrate populations and communities, *Ecotoxicology*, 3(3), p.193-208.
- Lajtner, J., Erben, R., Klobucar, G.I.V., 1996. Histopathological effects of phenol on the digestive gland of *Amphimelania holandri* Fer (Gastropoda, Prosobranchia). *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 57, p.458-464.
- Lam, P.K.S., 1996 a. Effects of cadmium on the consumption and absorption rates of a tropical freshwater snail *Radix plicatulus*. *Chemosphere*, 32, 2127-2132.
- Laskowski, R., Hopkin, P., 1995 b. Accumulation of Zn, Cu, Pb, and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*) : Implication for Predators . *Environmental Pollution*, 91, p.289-297.
- Laurin, M.C., 2007. «Etudes biologique et toxicologique des pesticides utilisés en pomiculture québécoise sur le prédateur acarien *Anystis Baccarum* (L) et analyse critique des dispositifs d'évaluation canadien et américain de la toxicité des pesticides, université du Québec à Montréal ».
- LeBlanc, G.A., Cochrane, B.J., 1987. Identification of multiple glutathione S-transferases from *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 88B(1), p.39-45.
- Lemaire, P., Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, 1, p.1119-1149.
- Lin, P. H., La, D. K., Upton, P. B., Swenberg, J. A., 2002. Analysis of DNA adducts in rats exposed to pentachlorophenol. *Carcinogenesis*, 23, 2, p.365-369.
- Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 57, p.195-211.
- Livingstone, D.R., Farrar, S.V., 1984. Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo[a]pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L. *Science of the Total Environment*, 39, p.209-235.
- López, O., 2007. "Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides". *Toxicology Letters*. 171:3, p.146-153.

- Lotti, M., 1995. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clinical Chemistry*, 41(12), p.1814-1818.
- Lowe,D.M.,Moore,M.N.,Readman,J.W.,2006.Pathological reactions and recovery of hepatopancreatic digestive cells from the marine snail *Littorina littorea* following exposure to a polycyclic aromatic hydrocarbon.Marine Environmental Research,61,p.457-470.
- Luchtel, D.L., Deyrup-Olsen, I., 2001. Body wall: form and function. In: Baker, G.M. (Ed.), *The Biology of Terrestrial Molluscs*. Cabi Pub, p.146.
- Luis,G.,Valerio, Jr., 2009. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241 ,p.356–370.
- Madec, L., 1983. Importance des conditions climatiques et de l'origine des individus pour la reproduction de l'escargot petit-gris en élevage sous bâtiment contrôlé. Session ITAVI, Rennes.
- Marchese, M.R.and Brinkhurst, R.O., 1996: A comparison of two tubificid oligochaete species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia*, 334p.163-168.
- Marigomez, I., Kortabitarte, M., Dussart, G.B.J., 1998. Tissue- level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 34, p.167–176.
- Marinovich,M., Ghilardi, F., Galli, C. L., 1996. Effect of pesticide mixtures on in vitro nervous cells: Comparison with single pesticides. *Toxicology*, 108, p.201-206.
- Marletta,M.A.1993.Nitric oxide synthase structure and mechanism.*J.Biol.Chem.*268,p.12231-12234.
- Marnett, L.J., 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage.*Toxicology*,p.181-182,p.219-222.
- Martínez-Lara, E., George, S.G., López-Barea, J., Bárcena, J.A., 1997. Purification and characterization of multiple glutathione transferase isoenzymes from grey mullet liver. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53, p.759-768.
- Martoja, R., Martoja , M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, 347p.

- 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.
- Massoulié, J., Bon, S., 1993. L'acétylcholinestérase: une structure originale pour une fonction vitale. *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités*, 4(1), p.35-49.
- Mc Carty, L.S., Mackay, D., 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.*, 27, p.1719-1728.
- McKellar, Q., 1996. A et Benachaoui H.A. Avermectins and milbemycins. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 19: 133-351.
- Momayezi, M., P. Albrecht, H. Plattner, H.J. Schmidt, 2004. Temperature induced change of variant surface antigen expression in *Paramecium* involves antigen release into the culture medium with considerable delay between transcription and surface expression. *J. Memb. Biol.*, 200, p. 15-23.
- McPherson, C.A., Chapman, P.M., 2000. Copper effects on potential sediment test organisms: the importance of appropriate sensitivity. *Mar Pollut Bull* 40, p.656-665.
- Meissonier, E., Devisme, P., et Join-Lambert, P., 1997. « Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires », 9^e Edition du point vétérinaire, Maisson – Alfort, 1548.
- Mekail, A., et Zobayada, A., 2009. A study of the activity of Catalase and Glutathione S-transferases in weanling and adult rats intoxicated with Diazinon, Carbaryl and Lambda cyhalothrin. *J. Duuhok Univ.*, (12). 138-145.
- Meneghini, R., 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.*, 23, p.783-792.
- Merhi, M., 2008. Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin ».
- Moore, M. N., Mayernick, J. A., & Giam, C. S., 1985. Lysosomal responses to a polynuclear aromatic hydrocarbon in a marine snail: effects of exposure to phenanthrene and recovery. *Marine Environmental Research*, 17, p.230–233.
- Mora, P., Fournier, D., Narbonne, J-F., 1999a. Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 122C, 353-361.

- Mountassif, D., Kabine, M., Manar, R., Bourhim, N., Zaroual, Z., Latruffe, N., El Kebbjaj, M. S., 2007. Physiological, morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vivo cytotoxicity assessment of metallic pollution: Impact on D-B-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Ecological Indicators*, 7, p.882-894.
- Mushtaq M. et Syntaschos L.R., (1996) : *J. Agric. Chem.*, 44, p.3342-3349.
- Narbonne, J.M. X., 1993. Use of biomarkers in assessment of contamination in marine ecosystems. *Fundamental Approach and Applications*, MAP Technical Reports Series, 71, p.1-20.
- 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, p.295-304.
- OMS, (1999): "Evaluation des résidus de certains médicaments vétérinaires dans les aliments: cinquantième rapport du comité mixte FAO/OMS d'expert des additifs alimentaires".
- OMS, (2005): «Organisation mondiale de la santé, The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification».
- Otludil, B., Cengiz, E.I., Yildirim, M.Z., Ünver, Ö., Ünlu, E., 2004. The effects of endosulfan on the great ramshorn snail *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata) : a histopathological study. *Chemosphere* 56, p.707-716.
- Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C., 2005. Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Mar. Pollut. Bull.*, 50, 1548–1557.
- Pascal, S., Debrauwer, L., Ferte, M-P., Anglade, P., Rouimi, P., Scalla, R., 1998. Analysis and characterization of glutathione S-transferase subunits from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 134, p.217-226.
- 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, p.853-859.
- Pelmont, J., 1995 : *Enzymes, catalyseurs du monde vivant* (Grenoble: Presses Universitaires de Grenoble), 1039 p.

- Pemble, S.E., Wardle, A.F., Taylor, J.B., 1996.** Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochemical Journal*, 319, p.749-754.
- Pérez-López, M., Anglade, P., Bec-Ferté, M.P., Debrauwer, L., Perdu, E., Cravedi, J.P., Rouimi, P., 2000.** Characterization of hepatic and extrahepatic glutathione S-transferases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their induction by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22, p.21-32.
- Perez-Rama, M., Abalde, A.J., Herrero, L.C. and Torres, E., 2001:** Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (KYLIN) BUTCH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(9),p.2061-2066.
- Petrpoulos I.;Conconi M.;Wang X. ; Hoenel B. ;Bregegere F. ;Milner Y.and Friguet B.,(2000):** "Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells",*J, Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.*, 55,p.220-227.
- Picó, Y., Font, G., Mañes, J., 2004.** in *Handbook of food analysis*, 2nd Ed., L. M. L. Nollet (Ed.), Marcel Dekker, New York, NY, 1072 p.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., Tata, V.D. and Casini, A.F., 2003.** The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol*,66,p.1499-503.
- Possamai,F.P.,Fortunato,J.J.,Feir,G.,Agostinho,F.R.,Quevedo, J.,Wilhelm Filho, D.and Dal-Pizzol, F.,2006.**" Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rat" , *environment toxicology and pharmacology*,p.198-204.
- Power, A., McCarthy, R., Raggett, E., Sheehan, D., 1996.** Ligand-binding properties of the glutathione-binding protein of the mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 115B(4), p.439-443.
- Power, A., Sheehan, D., 1996.** Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114C(2), p.99-103.
- Prapantadara, L-A., Koottathep, S., Promtet, N., Hemingway, J., Ketterman, A.J., 1996.** purification and characterization of a major glutathione S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* (species B). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(3), p.277-285.

- Purchon, R.D., 1968. The Biology of the Mollusca. Pergamon Press, Oxford and London.
- Purves, W.K. , Orians G.H., Heller, H.G. et Sadava, D., 2000. Le monde du vivant, 2^{ème} édition Flammarion, p. 552-577.
- Purvine,J.,2005.“Biological evaluation and assessment of endangered threatened candidate and forest service sensitive plants and terrestrial animal species”.
- Radi, F., Beckman, J.S.,Busch, K.N and Freeman, B.A.,1991.Peroxynitrite oxidation of sulhydryls .the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide .J.Biol.Chem.,266,p.4244-4250.
- 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,p.40-46.
- 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, p.154–167.
- Rakitsky,V.N.,Koblyakov,V.A.,Tutusov,V.,2000.Nongentoxic(Epigentetic)Carcinogens:Pesticides as an Example.A critical Review.Teratogenesis,Carcinogenesis,and Mutagenesis,20,p.229- 240.
- Ravera, O., 1991. Mini-review: influence of heavy metals on the reproduction and embryonic development of freshwater pulmonates (Gastropoda, Mollusca) and cladocerans (Crustacea, Arthropoda). Comp. Biochem. Physiol., 100, p.215-219.
- Redouane-Salah, S., 2004. Effets des rejets métalliques des aciéries du complexe sidérurgique d'El-Hadjar de Annaba sur un model cellulaire marin: *Tetraselmis suecica*. Sciences et Technologies C-N°22, p.121-124.
- Regoli, F., Principato, G., 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,p.143-164.
- Regoli,F.,Gorbi,S.,Fattorini,D.,Tedesco,S.,Notti,A.,Machella,N.,Bocchetti,R.,Benedetti.,M.,Piva, F., 2006.Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organisme for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution:An integrated approach. Environmental Health Perspectives, 114,p.63-69.

- Réseau de Bassin Adour-Garonne, 1997. *Atlas et Données sur l'eau* (Toulouse: Publications de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne), 149 p.
- Ribera, D., Narbonne, J-F., Daubeze, M., Michel, X., 1989. Characterisation, tissue distribution and sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels. *Marine Environmental Research*, 28, p.279-283.
- Robert, E.T.and Huston,D.,1998.“ Metabolic pathways of agrochemicals insecticides and fungicides”. Royale Society of Chemistry (Great Britain).ISBN D 85.p.45-51.
- Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 1996. The development of tissue lesions in the snail *Lymnaea glabra* exposed to a sublethal dose of molluscicide. *Vet. Res.* 27, p.79–86.
- Rouabhi,R.,Djebbar-Berrebah,H.,and Djebbar, M.R.,2006. Evaluation of toxicity of two pesticides: Flucycloxuron and Diflubenzuron on a cellular model, *Paramecium sp. Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University*, 71/2a,p.83-90.
- Rouabhi,R., 2005. Impact de deux pesticides le Diflubenzuron et le Flucycloxuron sur trois modeles cellulaires alternatifs : *Paramecium .sp*, *Tetrahymena pyriformis*, *Tetraselmis suecica* et sur le developpement embryonnaire de la poule domestique (*Gallus domesticus*),thèse de doctorat université de Annaba.
- Rouimi, P., Anglade, P., Debrauwer, L., Tulliez; J., 1996. Characterization of pig liver glutathione S-transferases using HPLC-electrospray-ionization mass spectrometry. *Biochemical Journal*, 317, p.879-884
- Russell, L.K.,DeHaven, J.I and Botts, R.P., 1981.Toxic effects of cadmium on the Garden snail(*Helix aspersa*).*Bull.Environm.Contam.Toxicol.*26,p.634-640.
- Salama,AK.,Osman,K.,A,Saber,N.A Soliman,S.A .,2005. Oxidative stress induced by different pesticides in the land snails , *Helix aspersa* .*Pakistan journal of biological Sciences* ,8(1),p.92-96.
- Sanchez, P. & Tarazona, J.V. (2002) Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*. *Aquatic Toxicology*, 60, p.249–256.
- Sanusi,A.A.,2006. “Comportement physic-chimique et transport des pesticides particuliers et gazeux dans l’atmosphère” Thèse de doctorat de 3ème cycle,université Louis Pasteuret Strasbourg,p.22-72.

- Sauvant, M.P., Pepin, D. and Piccini, E., 1999. *Tetrahymena pyriformis*. A tool for toxicological studies. *Chemosphere*, 38(7), p.1631-1669.
- Sbartai, I., Berrebbah, H., Rouabhi, R., Sbartai, H., Smagghe, G. and Djebbar, M.R., 2009. Behavior of *Paramecium* sp. treated with bifenthrin with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci*, 1, p.13-18.
- Sbartai, I., Berrebbah, H., Sbartai, H., Djebbar, M.R., 2012. Evaluation of the toxicity of hydrazine (Bifenthrin) and oxadiazine (indoxacarb) observed in a unicellular eukaryotes: *Paramecium* sp. *Advanced in Environmental Biology*, 6 (8):2249-2258.
- Sbartai, I., 2013. Toxicité d'un Hydrazine carboxylate (Bifenthrin) et d'un Oxidiazine (Indoxacarb) observée chez un modèle cellulaire d'eau douce : *Paramecium* sp. thèse de doctorat de l'université d'Annaba, 132p.
- Scheifler, R., Gomot-de Vaufléury, A., Toussaint, M.L., Badot, P.M., 2002. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* 48, p.571-579.
- Schlenk, D., 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*, 39(1-12), p.48-53.
- Schrack, D.M et Coquil, 2009. « Rémanence des pesticides dans les eaux issues de parcelles agricoles récemment converties à l'agriculture biologique ». *Innovations Agronomiques* 4, p.259-268.
- Schwaiger, J., Wanker, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W and Triebkorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, Vol.6, p.75-86.
- Schwaiger, J., 2001. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Rec.* 8:231-240.
- Sharaf, H.M., 2009. Histochemical changes of carbohydrate and protein contents in the digestive gland cells of the land snail *Monacha cartusiana* following starvation. *Saudi Journal of Biological Science*. 16:51-55.
- Shoop, W. and Soll, M., 2002. "Ivermectin, abamectin and eprinomectin", Dans J. Vercruysse et R.S. Rew (éd), *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. CABI Publishing, New York, p.1-29.

- 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.Ecotoxicology and environmental Safety,73,p. 1728-1732.
- Stenersen,J., Guthenberg, C., Mannervik, B., 1979. Glutathione S-transferases in earthworms (Lumbricidae). *Biochemical Journal*, 181, p.47-50.
- Strong, L. et S. James.,1993. « Some effects of ivermectin on the yellow dung fly, *Scatophaga stercoraria* ». *Veterinary Parasitology*, 48 ,p.181-191.
- Sturm, A., Hansen, P.D., 1999. Altered cholinesterase and monooxygenase levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 42, p.9–15.
- Svendsen, T.S., Sommer,C.,Holter,P et Grønvold,J.,2002. « Survival and growth of *Lumbricus terrestris* (Lumbricidae) fed on dung from cattle given sustained-release boluses of ivermectin or fenbendazole ». *European Journal of Soil Biology*, 38;p.319-322.
- Syngenta.2007.Proclaim l'ennemie naturel de Tuta absoluta.10:2-6.
- 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 p.
- Talesa, V., Grauso, M., Giovannini, E., Rosi, G., Toutant, J-P., 1995. Acetylcholinesterase in tentacles of *Octopus vulgaris* (cephalopoda). Histochemical localization and characterization of a specific high salt-soluble and heparin-soluble fraction of globular forms. *Neurochemistry International*, 27(2), p.201-211.
- Talesa, V., Romani, R., Antognelli, C., Giovannini, E., Rosi, G., 2001. Soluble and membrane-bound acetylcholinesterases in *Mytilus galloprovincialis* (Pelecypoda: Filibranchia) from the northern Adriatic sea. *Chemico-Biological Interactions*, 134(2), p.151-166.
- Taylor, E.J., Maund, S.J. and Pascoe, D., 1991. Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebrates *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: Diptera) and *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea: Amphipoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 21,p.371–76.

- Terfaya, M., Djebbar, M.R., Rouabhi, R et Berrebbah, H.,2009. « Relationship between air pollution generated by traffic emission and cardiopulmonary disease in Annaba (Algeria).American Eurasian journal of Toxicological Sciences1(1),p.01-06.
- Terry-Robert,D.,Huston,H.,Philip,J. and Jewes,S.,1998. “ Metabolic pathways of agrochemicals, Insecticides and Fungicides”, PART TWO,p.89-93.
- 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.
- Triebskorn, R. et Köhler, H.R. ,1996. The impact of heavy metals on the grey garden slug, *Derocerasreticulum* (Müller): metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity.*Environ. Pollut*, 93, p.317-343.
- Triebskorn, R. Köhler, H.R.,1998. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil Invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. *Biomarkers*, 3, 109-127.
- Trielli, F., H. Politi, C. Falugi, M.U. Delmonte Corrado., 1997. Presence of molecules related to the cholinergic system in *Paramecium primaurelia*(Protista,Ciliophora) and possible role in mating pair formation : anexperimental study.*J.Exp. Zool.*, 279,p.633-638.
- Trielli, F., M. Giovanna Chessa, A. Amaroli, M. Ognibene, M. Delmonte Corrado, 2006. Effects of organophosphate coumpounds on a soil protest,*Colpoda inflate*(Ciliophora,Colpodidae).Chemosphere., 65,p.1731-1737.
- Trundle,D.,Marcial ,G .1988.Detection of Cholinesterases inhibition .The significance of Choliesterases measuremetns.*Annals of Clinical and Laboratory Science*.18 (5),345-352.
- UIPP.,(2009) : Union des Industries de la Protection des Plantes) site de l’union des industries de la protection des plantes <http://www.uipp.org> Page consultée.
- Van Bladeren, P.J., 1988. Formation of toxic metabolites from drugs and other xenobiotics by glutathione conjugation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 9, p.295-299.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen ,P.E.,2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13,p.57-149.
- Van Straalen, N.M., 1996. Critical body concentrations: their use in bioindication. In *Bioindicator Systems for Soil Pollution* Kluwer Academic, Amsterdam, p.5-16 .

- Von Wachtendonk, D., Neef, J., 1979. Isolation, purification and molecular properties of an acetylcholinesterase (e.c. 3.1.1.7) from the haemolymph of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol C*, 63C: 279–286.
- 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, p.103-107.
- Viarengo, A., 1994. Heavy metal cytotoxicity in marine organisms: effects on Ca²⁺ homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol*, 20, p.85–110.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C (1/2), p.187-190.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M., 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97C(1), p.37-42.
- Viarengo, A., Nott, J., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Pharmacol. Toxicol*, 104, p.355–372.
- Vidal, M.L., 2001. Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea* (Müller) - Purification et caractérisation des Glutathion S-Transferases. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux. 267, p.15, 17.
- Vigano, L., Arillo, A., Melodia F., Arlati O., Monti C. 1998. Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the River Po, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, p.404- 411.
- Weckberker, G., Cory, G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40, p.257-264.
- Wehner et Gehring., 1995. *Biologie et Physiologie Animales. Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles : Orientation comparée et évolutive*. Deboeck Université. Thieme Verlag, p.286-287.
- Wendt-Rasch L., Van den Brink P.J.; Crum S.J.H and Woin P., (2004): “ The effects of a pesticides mixture on aquatic ecosystem differing in trophic status: responses of the

macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community”, *Ecotox Environ, Safe* 57, p.283-398.

Wenwen , L., Lan, W., Dongmei, L., Tuan, X., Jixian, L., 2011. Histopathological and biochemical alteration of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere*. 84:689-694.

Wichterman N.R.; 1953: *The Biology of Paramecium*. *Blakiseon* (Pa), 527 p.

Wilbrink, M., Zijl, R., Roubos, E.W., Ter Maat, A., De Vlieger, T.A., Vermeulen, N.P.E., 1992. Effects of 2,2'-dichlorobiphenyl on egg laying in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol*, 102, p.3-9.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19, p.137-161.

Woese C.R., Olsen G.J., Ibba M. and Soll, D.; 2000: Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol Mol Biol Rev*, pp: 64.

Youbi M.; 2005: Effets de deux fongicides Artea et Punch nouvellement introduits en Algérie sur la physiologie et le métabolisme respiratoire du blé dur (*Triticum durum Desf*). Thèse de Magister de l'Université Badji Mokhtar de Annaba.

Young, M. S., Early, M. F., Mallet, C. R., Krol, J., 2001. Application of a mixed-mode solid-phase extraction and cleanup procedure for LC/MS determination of thiabendazole and carbendazime in apple juice. *Journal of AOAC international*, 84, 5, p.1608-1613.

Zaldibar, B., Cancio, I., Soto., M., Marigomez , I., 2007. Digestive cell in digestive gland epithelium of slugs experimentally exposed to a mixture of cadmium and kerosene. *Chemosphere*, 70, p.144-154.

Zaouani, M., 2010. Contribution à l'évaluation de la toxicité aiguë et subchronique d'un produit phytosanitaire (Proclaim) chez le rat wistar. Thèse de Doctorat de l'université Annaba. 97, p.47-48.

Sites Webs :

www.naturae-scientia.com

<http://assouguem.com/cour-fau/>