



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE CELLULAIRE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Toxicologie

## Intitulé

**Effet d'un fongicide à base de cuivre et/ou du cadmium sur les bio-indicateurs de la reproduction et du métabolisme énergétique chez un organisme sentinelle, *Helix aspersa*.**

Présentée par : M<sup>me</sup> FARFAR KHADIDJA

### Membres de jury :

KHEBBEB Mohamed El Hadi	Prof.	Directeur de thèse	Université d'Annaba.
DJEBAR Mohamed Reda	Prof.	Président	Université d'Annaba.
BERREBEH Houria	Prof.	Examineur	Université d'Annaba.
KIMOUR Mohamed Taher	Prof.	Examineur	Université d'Annaba.
GRARA Nedjoud	Prof.	Examineur	Université de Guelma.

Année universitaire : 2018/2019

# Sommaire

**Remerciements**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Introduction générale ..... 1**

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

<b>I. Pesticides ..... 3</b>	<b>3</b>
1. Généralités sur les pesticides ..... 3	3
1.1. Devenir des pesticides dans l'environnement ..... 4	4
1.2. Persistance des pesticides ..... 6	6
1.3. Toxicité des pesticides ..... 7	7
2. Généralités sur les fongicides ..... 8	8
2.1. Les fongicides minéraux ..... 8	8
2.2. Les fongicides organiques ..... 9	9
3. Le fongicide étudié ..... 11	11
3.1. Caractéristiques physico-chimiques des substances actives ..... 12	12
3.2. Mode d'action des substances actives ..... 13	13
3.3. Comportement et devenir dans l'environnement ..... 14	14
3.3.1. Comportement et devenir dans le sol ..... 14	14
3.3.2. Transfert vers les eaux souterraines ..... 15	15
3.3.3. Comportement dans l'air ..... 17	17
3.4. Effets toxicologiques ..... 18	18

<b>II.</b>	<b>Généralités sur les métaux lourds .....</b>	<b>19</b>
1.	Devenir des métaux dans les organismes .....	20
1.1.	Devenir des éléments métalliques dans les plantes .....	20
1.2.	Devenir des éléments métalliques dans les invertébrés .....	20
1.3.	Accumulation des EM .....	22
<b>III.</b>	<b>Généralités sur le cadmium .....</b>	<b>23</b>
1.	Métabolisme .....	24
2.	Ecotoxicité .....	25
3.	Mécanisme de toxicité .....	25
4.	Maladies induites par le cadmium .....	28
<b>IV.</b>	<b>Utilisation des escargots dans l'étude de la contamination de l'environnement .....</b>	<b>32</b>
<b>V.</b>	<b>Objectifs de l'étude .....</b>	<b>35</b>

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

<b>I.</b>	<b>Matériels chimique .....</b>	<b>36</b>
1.	Le fongicide étudié .....	36
2.	Le cadmium .....	36
3.	La mixture .....	36
<b>II.</b>	<b>Matériel biologique .....</b>	<b>37</b>
1.	Morphologie et anatomie d'Helix aspersa .....	37
2.	Hibernation .....	39
3.	Reproduction .....	39
4.	Croissance.....	39
<b>III.</b>	<b>Protocole expérimental .....</b>	<b>40</b>
<b>IV.</b>	<b>Dissection des escargots et prélèvement des organes</b>	<b>42</b>
<b>V.</b>	<b>Méthodes</b>	<b>42</b>
1.	Dosage des métabolites.....	42
2.	Dosage des indicateurs de stress oxydant .....	45
2.1.	Dosage du glutathion (GSH) .....	45
2.2.	Dosage de malondialdéhyde (MDA) .....	46

2.3. Dosage de l'activité acétylcholine Estérase (AChE) .....	46
3. Histologie .....	47
3.1. Préparation des échantillons .....	47
3.2. Méthodes .....	47
<b>VI. Analyse statistique des résultats .....</b>	<b>48</b>

## Chapitre 3 : Résultats

### 1<sup>ère</sup> Partie : Effet du cadmium et/ou de fongicide sur les paramètres physiologiques d'*Helix aspersa*

<b>I. Le poids moyen des escargots .....</b>	<b>49</b>
1. Effet de fongicide .....	49
2. Effet du cadmium .....	50
3. Effet du cocktail cadmium/fongicide .....	51
<b>II. Le poids moyen de l'hépatopancréas .....</b>	<b>51</b>
III. Discussion .....	52
IV. Conclusion .....	54

### 2<sup>ème</sup> Partie : Effet du cadmium et/ou de fongicide sur les paramètres biochimiques de l'hépatopancréas et les indicateurs de stress oxydant d'*Helix aspersa*

<b>I. Objectif de l'étude .....</b>	<b>55</b>
<b>II. Résultats .....</b>	<b>56</b>
1. Effet du cadmium et/ou de fongicide sur les paramètres biochimiques de l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> .....	56
1.1. Effet sur le taux des protéines totales.....	56
1.2. Effet sur le taux des glucides totaux .....	58
1.3. Effet sur le taux des lipides totaux .....	59
2. Effet du cadmium et/ou de fongicide sur les indicateurs de stress oxydant.....	61
2.1. Effet sur le taux de glutathion (GSH) .....	61
2.2. Effet sur le taux de malondialdéhyde (MDA) .....	63
2.3. Effet sur l'activité acétylcholine Estérase (AChE) .....	66
<b>III. Discussion .....</b>	<b>68</b>
<b>IV. Conclusion .....</b>	<b>74</b>



## Chapitre 4 : Etude *in silico*

I.	Introduction .....	76
1.	Les méthodes <i>in silico</i> (toxicologie prédictive) .....	76
2.	Objectif de travail .....	77
3.	Matériels et Méthodes .....	78
3.1.	Matériel biologique .....	78
3.2.	Matériels chimiques .....	78
3.3.	Matériel informatique .....	78
3.4.	Méthodes .....	81
II.	Résultats .....	81
1.	Etude prédictive des paramètres physiologiques .....	81
1.1.	Evolution du poids moyen d' <i>Hélix aspersa</i> .....	81
1.2.	Evolution du poids moyen de l'hépatopancreas .....	83
1.3.	Etude prédictive du taux des protéines totales de l'hépatopancreas d' <i>Hélix aspersa</i> .....	84
2.	Etude prédictive sur les indicateurs de stress oxydant .....	85
2.1.	Effet sur le taux de glutathion (GSH) .....	85
2.2.	Effet sur le taux de malondialdéhyde (MDA) .....	87
2.3.	Effet sur l'activité acétylcholine Estérase .....	88
III.	Discussion .....	89
IV.	Conclusion .....	91

## Chapitre 5 : Etude histopathologique

I.	Objectif de l'étude .....	92
II.	Résultats .....	92
1.	Effet du cadmium sur le tissu hépatopancreatique .....	96
1.1.	Traitement de 15 jours .....	96
1.2.	Traitement de 30 jours .....	96
1.3.	Traitement de 90 jours .....	96
2.	Effet du fongicide sur le tissu hépatopancreatique .....	96
2.1.	Traitement de 15 jours .....	96
2.2.	Traitement de 30 jours .....	96
2.3.	Traitement de 90 jours .....	97

3. Effet du cocktail (Cadmium/Fongicide) sur le tissu hépatopancréatique .....	97
3.1.Traitement de 15 jours .....	97
3.2.Traitement de 30 jours .....	97
3.3.Traitement de 90 jours .....	97
III. Discussion .....	98
IV. Conclusion .....	100
<b>Conclusion générale et perspective .....</b>	<b>101</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>103</b>

## **Annexes**

Annexe 1. Tableaux de réalisation de la gamme d'étalonnage

Annexe 2 : Valeurs prédictives du poids des escargots

Annexe 3 : Valeurs prédictives du poids de l'hépatopancréas

Annexe 4 : Valeurs prédictives du taux des protéines totales.

Annexe 5 : Valeurs prédictives du taux de GSH.

Annexe 6 : Valeurs prédictives du taux de MDA.

Annexe 7 : Valeurs prédictives de l'activité AChE.

## **Résumés**

Français

Anglais

Arabe

# *Dédicaces*

*Je dédie cette thèse :*

*À celle qui a consacré sa vie et souffert pour veiller à mon bien être, à la source de ma réussite, à mon grand héro de ma vie, à ma très chère mère*

*À la mémoire de mon très cher père*

*À mon mari Billel pour sa compréhension, ses encouragements et son soutien tout au long de mon parcours*

*À ma princesse Tesnim*

*À ma grand-mère Messouda*

*À mon très cher frère Fethi qui m'a beaucoup donné*

*À mes adorables sœurs: Soumaya et Roumaissa, merci pour votre soutien*

*À mes beaux parents qui m'ont beaucoup aidé*

*À mes belles sœurs Sara et Meriem*

*À mon adorable neveu Abd Elwaheb*

*À mes tantes et mes oncles*

*À chaque cousins et cousines*

*À mes meilleurs amies: Rahma, Imen, Amira.*

## **Remerciement**

*Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université d'Annaba dirigé par le Professeur **DJEBAR Med-Réda**. Merci pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe de recherche, m'avoir fait profiter de vos connaissances scientifiques, vos conseils, ainsi que votre confiance, qui m'ont été précieux et m'ont permis de mener à terme cette recherche, dans les meilleures conditions.*

*De simples remerciements ne sont pas suffisants pour exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de thèse : **Khebbeb Mohamed El Hedi** (Professeur). A la, fierté et à la chance d'avoir été votre thésard. Merci pour votre gentillesse, votre patience, votre écoute, votre disponibilité, vos nombreux conseils, et pour plein d'autres choses encore, merci, ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.*

*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.*

*Ma reconnaissance va tout particulièrement à Mme le Professeur **BERREBBAH Houria** de l'Université de Annaba. Depuis le master, elle m'a donné le goût de la recherche et m'a incitée à poursuivre dans cette voie. Un grand merci à elle, pour son aide précieuse et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier **Mr KIMOUR Mohamed Taher**, Professeur à l'Université de Annaba, non seulement pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse, mais aussi pour son aide scientifique, il m'a fait découvrir et apprécier l'aspect bioinformatique et modélisation, je dois dire que je n'ai jamais rencontré une personne aussi dévouée.*

*Ces mêmes remerciements s'adressent à **Mme GRARA Nedjoud**, Maitre de Conférences à l'Université de Guelma pour avoir accepté de juger ce travail et participer à ce jury en qualité d'examineur.*

*Je tiens tout particulièrement à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude à **Mr LANKAR Abdelaziz**, Professeur et ex-chef de service du laboratoire central d'anatomie et de cytologie CHU de Annaba, qui a consacré du temps à la relecture des articles et qui m'a beaucoup aidée pour les interprétations des coupes histologiques.*

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

*Enfin, un grand merci à tout membre de l'équipe du laboratoire de toxicologie cellulaire dont je suis très reconnaissante aussi bien pour leur soutien, leur disponibilité et leur bonne humeur. Merci à Lynda, Medina, Amira, Chiraz, Chahra, Amina et Ilyes.*

*A tous ceux que j'ai pas nommés, mais qui m'ont aidé Merci !!!!!!!*

## Liste des figures

	<i>Pages</i>
<i>Figure 01</i>	Mécanismes de la volatilisation ( <a href="http://www.cg66.fr/64-pesticides.htm">www.cg66.fr/64-pesticides.htm</a> ) 04
<i>Figure 02</i>	Devenir des pesticides dans l'environnement ( <a href="http://www.cg66.fr/64-pesticides.htm">www.cg66.fr/64-pesticides.htm</a> ) 05
<i>Figure 03</i>	Structure chimique du métalaxyl (INERIS, 2008) 11
<i>Figure 04</i>	Structure chimique d'oxychlorure de cuivre (INERIS, 2008) 12
<i>Figure 05</i>	Mécanismes d'induction du stress oxydant par le Cd (Bonfont-Rousselot 1994; Ercal <i>et al.</i> , 2001) 26
<i>Figure 06</i>	L'impact du cadmium sur ses cibles cellulaires conduit à la production des ERO (Waisberg <i>et al.</i> , 2003). 27
<i>Figure 07</i>	Résumé des effets moléculaires impliqués dans la carcinogénèse du cadmium (Waisberg <i>et al.</i> , 2003). 29
<i>Figure 08</i>	Les différentes voies de contamination d' <i>Helix aspersa</i> (Viard, 2004). 34
<i>Figure 09</i>	L'escargot <i>Helix aspersa</i> . 37
<i>Figure 10</i>	Morphologie externe de l'escargot ( <a href="http://biologiefsac.skyrock.com">http://biologiefsac.skyrock.com</a> ). 37
<i>Figure 11</i>	Anatomie interne (appareils génital et digestif) de l'escargot <i>Helix aspersa</i> (Beaumont et Cassier, 1998). 38
<i>Figure 12</i>	Schéma du protocole expérimental. 41
<i>Figure 13</i>	Dissection et prélèvement de l'hépatopancréas. 42
<i>Figure 14</i>	Principales étapes d'extraction des métabolites "protéines, lipides et glucides" (Shibko <i>et al.</i> , 1966). 44
<i>Figure 15</i>	Effet du cadmium sur le poids moyen d' <i>Helix aspersa</i> pendant 90 jours de traitement 49
<i>Figure 16</i>	Effet de fongicide sur le poids moyen d' <i>Helix aspersa</i> pendant 90 jours de traitement. 50
<i>Figure 17</i>	Effet du cocktail cadmium/fongicide sur le poids moyen d' <i>Helix aspersa</i> pendant 90 jours de traitement. 51
<i>Figure 18</i>	Effet du cadmium, de fongicide et de leurs mixtures sur le poids de l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> durant 90 jours de traitement. 52

Figure 19	Taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots traités par le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion.	62
Figure 20	Taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots traités par le fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion.	62
Figure 21	Taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots traités par la mixture ( $\text{CdCl}_2 + \text{Vacomyl-PLUS}$ ) administré par ingestion.	63
Figure 22	Taux de Malondialdéhyde ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots traités par le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion.	64
Figure 23	Taux de Malondialdéhyde ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots traités par le fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion.	65
Figure 24	Taux de Malondialdéhyde ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots traités par la mixture ( $\text{CdCl}_2 + \text{Vacomyl-PLUS}$ ) administré par ingestion	66
Figure 25	Effet de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion, sur l'activité Acétylcholine-estérase ( $\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots <i>Helix aspersa</i> .	66
Figure 26	Effet du fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion, sur l'activité Acétylcholine-estérase ( $\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots <i>Helix aspersa</i> .	67
Figure 27	Effet de la mixture ( $\text{CdCl}_2 + \text{Vacomyl-PLUS}$ ) administré par ingestion, sur l'activité Acétylcholine-estérase ( $\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez les escargots <i>Helix aspersa</i> .	68
Figure 28	Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur l'évolution du poids moyen d' <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	82
Figure 29	Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur l'évolution du poids moyen d' <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	82
Figure 30	Effet prédictif de concentrations croissantes du cocktail cadmium/fongicide sur l'évolution du poids moyen d' <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	82

<i>Figure 31</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur l'évolution du poids moyen de la glande digestive chez <i>Hélix aspersa</i> en fonction du temps.	83
<i>Figure 32</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur l'évolution du poids moyen de la glande digestive chez <i>Hélix aspersa</i> en fonction du temps.	83
<i>Figure 33</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes du cocktail cadmium/fongicide sur l'évolution du poids moyen de la glande digestive chez <i>Hélix aspersa</i> en fonction du temps.	84
<i>Figure 34</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur le taux des protéines totales hépatopancréatiques chez <i>Hélix aspersa</i> .	84
<i>Figure 35</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur le taux des protéines totales hépatopancréatiques chez <i>Hélix aspersa</i>	85
<i>Figure 36</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes du cocktail cadmium/fongicide sur le taux des protéines totales hépatopancréatiques chez <i>Hélix aspersa</i> .	85
<i>Figure 37</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur le taux de GSH hépatopancréatiques chez <i>Hélix aspersa</i> .	86
<i>Figure 38</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur le taux de GSH hépatopancréatiques chez <i>Hélix aspersa</i> .	86
<i>Figure 39</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur le taux de GSH hépatopancréatiques chez <i>Hélix aspersa</i> .	86
<i>Figure 40</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur le taux de MDA hépatopancréatiques chez <i>Hélix aspersa</i> .	87
<i>Figure 41</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur le taux de MDA hépatopancréatiques chez <i>Hélix aspersa</i> .	87
<i>Figure 42</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes du cocktail cadmium/fongicide sur le taux de MDA hépatopancréatiques chez <i>Hélix aspersa</i> .	88

<i>Figure 43</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur les variations de l'activité AChE chez <i>Hélix aspersa</i> .	88
<i>Figure 44</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur les variations de l'activité AChE chez <i>Hélix aspersa</i> .	89
<i>Figure 45</i>	Effet prédictif de concentrations croissantes du cocktail cadmium/fongicide sur les variations de l'activité AChE chez <i>Hélix aspersa</i> .	89
<i>Figure 46</i>	Observations microscopiques de l'hépatopancréas d'un escargot témoin (A : Gr × 40, A1 : Gr × 100) et après 15jours (B : Gr × 40, B1 : Gr × 100), 30 jours (C : Gr × 40, C1 : Gr × 100) et 90 jours (D : Gr × 40, D1 : Gr × 100) de traitement par le cadmium.	93
<i>Figure 47</i>	Observations microscopiques de l'hépatopancréas d'un escargot témoin (A : Gr × 40, A1 : Gr × 100) et après 15jours (B : Gr × 40, B1 : Gr × 100), 30 jours (C : Gr × 40, C1 : Gr × 100) et 90 jours (D : Gr × 40, D1 : Gr × 100) de traitement par le fongicide.	94
<i>Figure 48</i>	Observations microscopiques de l'hépatopancréas d'un escargot témoin (A : Gr × 40, A1 : Gr × 100) et après 15jours (B : Gr × 40, B1 : Gr × 100), 30 jours (C : Gr × 40, C1 : Gr × 100) et 90 jours (D : Gr × 40, D1 : Gr × 40) de traitement par le cocktail cadmium/fongicide.	95



## Liste des tableaux

	<i>Pages</i>
<i>Tableau 01</i>	Propriétés physico-chimiques du métalaxyl (INERIS, 2008) 12
<i>Tableau 02</i>	Propriétés physico-chimiques d'oxychlorure de cuivre (INERIS, 2008) 13
<i>Tableau 03</i>	Limites de quantification des matières actives et leurs métabolites (Anses, 2013) 18
<i>Tableau 04</i>	Classification des invertébrés terrestres selon Boháč et Pospíšil (1989) et les résultats obtenus par Dallinger (1993) pour quelques gastéropodes terrestres 23
<i>Tableau 05</i>	Toxicité du chlorure de cadmium sur différents invertébrés terrestres (Viard, 2004) 25
<i>Tableau 06</i>	Quelques propriétés physicochimiques et toxiques du cadmium (ATSDR, 2007 ; Handbook of chemistry and physics, CRC Press) 32
<i>Tableau 07</i>	Concentrations des mixtures utilisées 36
<i>Tableau 08</i>	Evolution du taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'hépatopancréas) chez les escargots traités par le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion 56
<i>Tableau 09</i>	Taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par le Fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion 57
<i>Tableau 10</i>	Taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par la mixture ( $\text{CdCl}_2$ + Fongicide) administré par ingestion 57
<i>Tableau 11</i>	Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion 58
<i>Tableau 12</i>	Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par le fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion 58
<i>Tableau 13</i>	Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par la mixture ( $\text{CdCl}_2$ + Vacomyl-PLUS) administré par ingestion 59
<i>Tableau 14</i>	Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion 60

<i>Tableau 15</i>	Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par le fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion	60
<i>Tableau 16</i>	Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par la mixture ( $\text{CdCl}_2$ + Fongicide) administré par ingestion	61

## Abréviations

<b>ACh :</b>	Acétylcholine
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AChE :</b>	Acétylcholine-Estérase
<b>Anses :</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation
<b>AOEL :</b>	(Acceptable Operator Exposure Level ou niveaux acceptables d'exposition pour l'opérateur) est la quantité maximum de substance active à laquelle l'opérateur peut être exposé quotidiennement, sans effet dangereux pour sa santé.
<b>ARfD :</b>	La dose de référence aiguë d'un produit chimique est la quantité estimée d'une substance présente dans les aliments ou l'eau de boisson, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée sur une brève période, en général au cours d'un repas ou d'une journée, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation Elle est exprimée en milligrammes de substance chimique par kilogramme de poids corporel (OMS, 1997).
<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>ASCh :</b>	l'acétylthiocholine
<b>ATPase :</b>	Protéine transmembranaire dont l'activité enzymatique utilise l'énergie issue de la dégradation de l'ATP en ADP et phosphate inorganique pour transporter des ions potassium et sodium contre leur gradient de concentration.
<b>BAF :</b>	Facteur de bioaccumulation
<b>BBC :</b>	Bleu brillant de coomassie
<b>BSA :</b>	Albumine de sérum de bœuf
<b>BChE :</b>	butyrylcholinestérase
<b>CAT :</b>	Catalase
<b>CdCl<sub>2</sub> :</b>	Di-chlorure de cadmium
<b>Co :</b>	Cobalt
<b>CO<sub>2</sub> :</b>	Dioxyde de carbone
<b>CL50 :</b>	Concentration entraînant 50 % de mortalité.
<b>CE50 :</b>	Concentration entraînant 50 % d'effets.
<b>CSEO :</b>	Concentration Sans Effet Observé
<b>Cu<sup>+</sup> :</b>	Ion cuivreux

<b>Cu<sup>2+</sup> :</b>	Ion cuivrique
<b>Cr<sup>3+</sup> :</b>	Ion chrome
<b>CGA:</b>	(2-[[[(RS)-1-Carboxy-ethyl)-(2-methoxy-acetyl)-amino]-3-methyl-benzoic acid)
<b>C-fos :</b>	proto-oncogènes
<b>C-myc :</b>	proto-oncogènes
<b>C-jun :</b>	proto-oncogènes
<b>DJA :</b>	La dose journalière admissible (DJA) d'un produit chimique est une estimation de la quantité de substance active présente dans les aliments ou l'eau de boisson qui peut être ingérée tous les jours pendant la vie entière, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation. Elle est exprimée en milligrammes de substance chimique par kilogramme de poids corporel (OMS, 1997).
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DT50 :</b>	Durée nécessaire à l'élimination de 50 % de la quantité initiale de la substance.
<b>DMT1 :</b>	transporteur de métaux divalent de type I
<b>DTNB :</b>	acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque
<b>ETM :</b>	Eléments traces métalliques
<b>ERO :</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>FAO :</b>	Food and Agriculture Organization
<b>ffM :</b>	fraction de formation cinétique
<b>GSH :</b>	Glutathion réduit
<b>GSSG :</b>	Glutathion oxydé
<b>GST :</b>	Glutathion-S-transférase
<b>HAPs :</b>	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
<b>hOGG1 :</b>	8-oxoguanine DNA glycosylase de type I de l'homme
<b>IARC :</b>	Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer
<b>INERIS :</b>	Institut national de l'environnement industriel et des risques
<b>IP3 :</b>	Phosphoinositide-binding protein
<b>Kdoc :</b>	coefficient d'adsorption par unité de masse de carbone organique.
<b>Kd :</b>	Coefficient de partition d'un soluté entre la phase liquide et la phase solide du sol.
<b>Kfoc:</b>	coefficient d'adsorption dans l'équation de Freundlich normalisé par la quantité de carbone organique du sol.
<b>Koc :</b>	Coefficient de partage carbone organique-eau

<b>Kow :</b>	Coefficient de partage octanol-eau
<b>NOA :</b>	(R)-2-[(2,6-Dimethyl-phenyl)-(2-methoxy-acetyl)-amino]-propionic acid)
<b>NOEL :</b>	No observed effect level (dose sans effet).
<b>OMS :</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>PECsol :</b>	concentrations prévisibles dans le sol
<b>PECeso :</b>	Concentrations prévisibles dans les eaux souterraines
<b>Pc :</b>	Poids corporel
<b>pH :</b>	Potentiel hydrogène
<b>RA :</b>	Radioactivité appliquée
<b>SOD :</b>	Superoxyde dismutase
<b>SCh :</b>	Thiocholine
<b>SFO :</b>	Simple First Order, déterminée selon une cinétique de 1er ordre simple.
<b>TBA :</b>	Acide thiobarbiturique
<b>TCA :</b>	Acide trichloroacétique
<b>WP :</b>	poudre mouillable
<b>XPA :</b>	Protéine impliquée dans la reconnaissance des lésions de l'ADN



# Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Depuis plus de cinquante ans, la pollution est l'un des plus graves problèmes auxquels est confronté notre monde moderne. On entend par pollution, la présence dans l'environnement des grandes quantités de produits chimiques dangereux, généralement créés par l'homme, dont les effets nuisibles peuvent se faire durant de longues périodes sur toute la planète. Cette pollution peut affecter l'eau, l'air et la terre. Elle peut être évidente (nappes d'hydrocarbures flottante sur la mer). Comme elle peut être beaucoup moins visible (pesticides répandus sur les champs ou métaux lourds dissous dans les systèmes aquatiques).

Dans notre pays, l'usage des pesticides se répand de plus en plus avec le développement de l'agriculture. Le terme de pesticides recouvre trois types de substances : les herbicides (contre les mauvaises herbes), les fongicides (contre les champignons et les moisissures) et les insecticides. L'utilisation des fongicides occupe la première place sur le podium, suivis d'insecticides, alors que les herbicides viennent en troisième position. Ces produits «nécessaires» pour améliorer les rendements agricoles et notre qualité de vie se sont avérés très toxiques à différents degrés. Pis, les laboratoires spécialisés dans l'analyse de résidu n'existent pas dans notre pays. Autrement dit, on ne peut en aucun cas estimer les traces de l'utilisation des pesticides, dans les aliments que nous consommons (fruits et légumes).

Dans l'environnement, les métaux sont présents, le plus souvent, à l'état de traces. En raison de la complexité des sols, l'évaluation de la contamination métallique s'avère très délicate. Certains sont purement toxiques pour les êtres vivants (cadmium) ; d'autres, essentiels à l'organisme et à de nombreuses fonctions biologiques, génèrent tout de même des effets toxiques sur l'organisme, passé un certain seuil de concentration (cuivre et zinc). Dans les deux cas, l'accumulation de ces métaux à l'intérieur d'un organisme est susceptible de déclencher l'apparition d'un stress oxydant (en générant des radicaux libres) et par conséquent une réaction de défense (Valko *et al.*, 2005).

Parmi ces métaux de transition se trouvent ceux qui possèdent des capacités d'interaction directe avec l'oxygène (cuivre) ; et ceux qui ont une action indirecte (cadmium et zinc). Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant un électron non apparié. Ces radicaux libres ont des conséquences biochimiques et cellulaires importantes. En générant des molécules biologiques anormales et en provoquant la surexpression de certains gènes, le stress oxydant potentialise l'apparition de maladies plurifactorielles (diabète, Alzheimer, etc.) et est la cause principale de nombreuses maladies souvent liées au vieillissement (cancer, cataracte etc.).

Par ailleurs, les cellules ont développé des systèmes de défenses pour métaboliser les espèces oxydantes et ainsi limiter les dégâts qu'elles provoquent. Ces systèmes antioxydants protègent les constituants cellulaires des agressions radicalaires en interagissant directement avec ces radicaux ou indirectement en produisant des peptides comme les métallothionéines ou le glutathion. Les systèmes de réparation permettent d'éliminer les dommages produits. Cependant la production massive d'espèces oxydantes et l'inhibition des activités des principales enzymes antioxydantes dans une cellule peuvent favoriser une mort cellulaire excessive ou une évolution tumorale (Araab, 2004).

Les méthodes chimiques utilisées ne donnent que des informations fragmentaires sur les polluants présents, sans aborder leurs éventuelles conséquences sur l'écosystème. Dans cette optique, les analyses en laboratoire, permettant de connaître le niveau de contamination d'un site, doivent être couplées à des expériences sur le terrain afin de déterminer les effets toxiques des polluants et leurs impacts sur l'environnement. L'**écotoxicologie** permet d'appréhender la pollution d'un écosystème.

L'évaluation du risque environnemental et écotoxicologique implique l'utilisation de marqueurs biologiques visant à mettre en évidence un stade précoce de la pollution (Van der oost *et al.*, 2003). Beaucoup de biomarqueurs biochimiques et cellulaires ont été étudiés dans les organismes aquatiques et terrestres en particulier, chez les mollusques bivalves et les poissons (Wang *et al.*, 2009 ; Khebbeb *et al.*, 2010) et les gastéropodes terrestres considérés comme d'excellents indicateurs de la pollution du milieu environnant (Sangita et Khangarot, 2011).

Il est donc primordial de surveiller et d'évaluer la qualité du milieu en termes de pollution industrielle et agricole par l'évaluation de biomarqueurs biochimiques. C'est dans ce contexte, que nous avons évalué par une étude expérimentale la toxicité du cadmium ou d'un fongicide à base d'oxychlorure de cuivre et de leur mixture, sur des organismes bio-accumulateurs et bio-indicateurs de pollution : l'escargot *Helix aspersa*.



## I. Pesticides

### 1. Généralités sur les pesticides

Le terme "pesticide" est une appellation générique couvrant toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications. La substance ou le microorganisme qui détruit ou empêche les organismes nuisibles de s'installer sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux est dénommée matière active, à laquelle sont associés dans la préparation, un certain nombre de « formulants » (mouillants, solvants, anti-mousses, ...) qui la rendent utilisable par l'agriculteur (ACTA, 2000).

Les **pesticides** regroupent l'ensemble des substances (molécules) ou produits (préparations) utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications pour éliminer les organismes nuisibles. On distingue deux types de pesticides : les produits **phytopharmaceutiques** ou produits **phytosanitaires** et les **biocides** (EC 2009a).

Les **phytosanitaires** (selon la directive 91/414/CE, EC 1991) sont des substances actives et des préparations contenant une ou plusieurs substances actives, qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur. Ils sont destinés à protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action. Et enfin détruire les végétaux indésirables, détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.

Les **biocides** (selon la directive 98/8/CE, EC 1998) sont des substances actives et des préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur, qui sont destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique.

Il existe plusieurs groupes de pesticides, mais les grands groupes de ces produits chimiques sont les :

- Insecticides, acaricides, nématocides ;
- Herbicides ;
- Molluscicides ;
- Rodenticides ;

- Fongicides (Viala, 1998).

### 1.1. Devenir des pesticides dans l'environnement

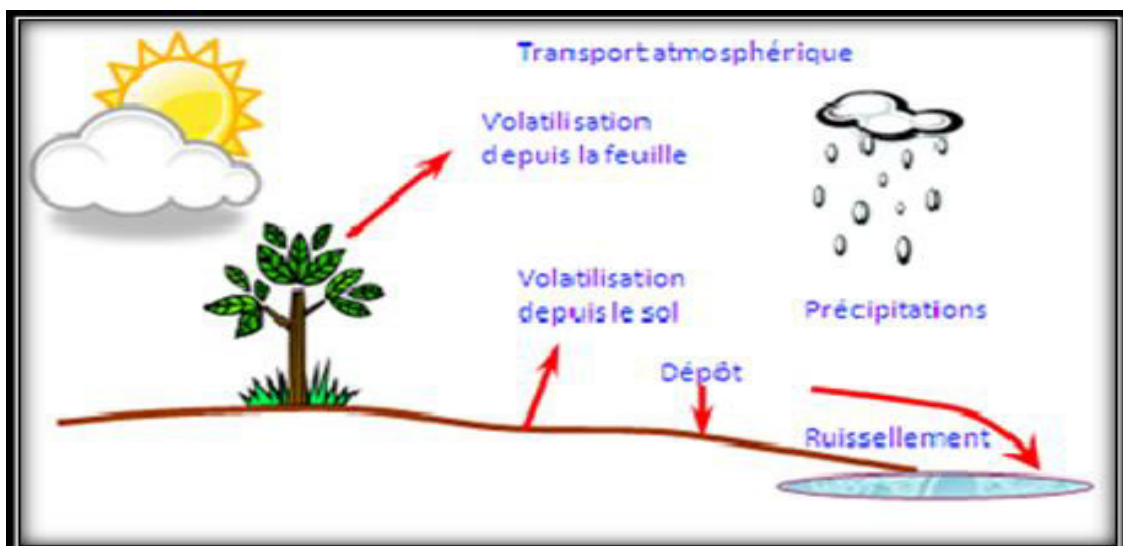
Les pesticides employés sont retrouvés à l'état de traces plus ou moins importantes dans quasiment tous les écosystèmes de notre planète. Ils prennent plusieurs chemins tels que : la dispersion, la bioaccumulation et la dégradation.

#### 1.1.A. La dispersion :

Les matières actives phytosanitaires sont appliquées le plus souvent sous forme de liquide pulvérisé sur les plantes et/ou sur le sol. Dans certains cas elles sont incorporées dans le sol, injectées ou déposées sous forme de granulés. La moitié du produit peut être entraînée par le vent en dehors de la zone à traiter et les matières actives peuvent se volatiliser, ruisseler ou être lessivées et atteindre les eaux de surface ou souterraines (Leviton, 1995).

##### ▪ La volatilisation :

Le terme de volatilisation désigne l'ensemble des procédés physico-chimiques de transfert des composés à partir des végétaux ou du sol vers l'atmosphère. Ce processus peut disperser une grande partie du produit épandu dans l'atmosphère (Fig. 1). C'est l'une des causes principales de fuites de pesticides hors de la zone cible (Taylor et Spencer, 1990).



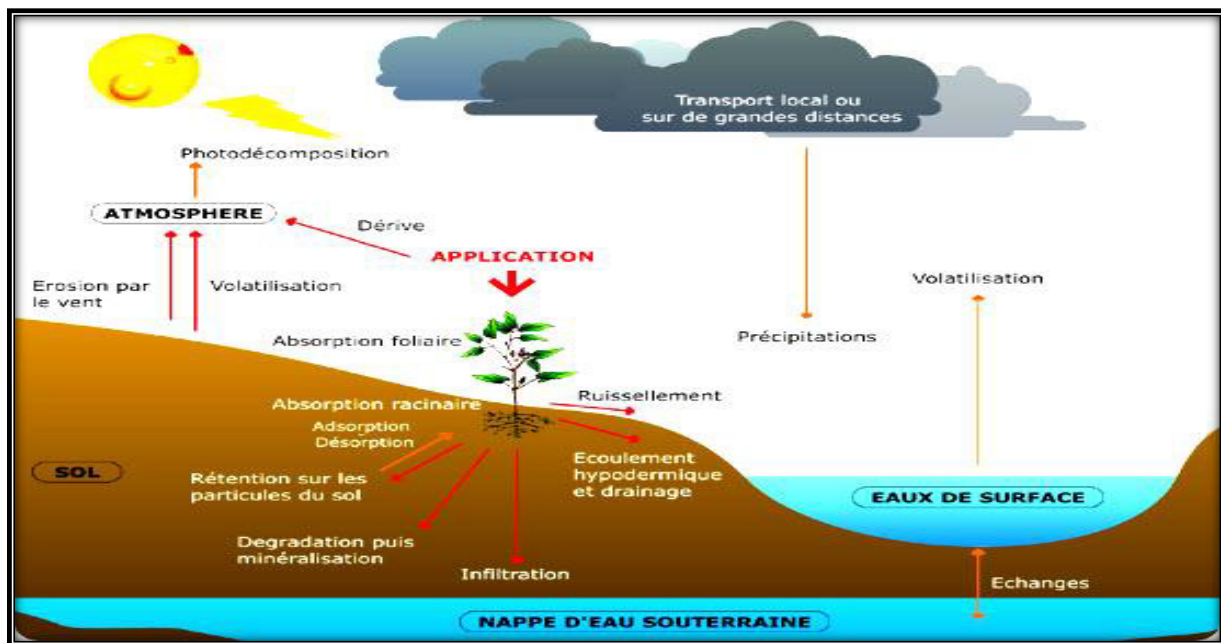
**Figure 1** : Mécanismes de la volatilisation

([www.cg66.fr/64-pesticides.htm](http://www.cg66.fr/64-pesticides.htm))

### ▪ Ruissellement et Infiltration :

L'eau peut entraîner la dispersion des pesticides dans le milieu par lavage des feuilles, ruissellement et infiltration (Fig. 2).

Le **ruissellement** est l'entraînement des pesticides par l'eau sur des surfaces inclinées, il contribue à la pollution des eaux de surface. L'**infiltration** est l'entraînement des pesticides par l'eau dans le sol, elle contribue surtout à la pollution des eaux profondes (Leonard, 1990).



**Figure 2 :** Devenir des pesticides dans l'environnement ([www.cg66.fr/64-pesticides.htm](http://www.cg66.fr/64-pesticides.htm))

#### 1.1.B. La bioaccumulation :

La bioaccumulation est la somme de deux processus : de bioconcentration et de bioamplification. La bioconcentration est l'absorption directe de toxiques par un organisme vivant à partir du milieu, alors que la bioamplification (biomagnification) est l'absorption alimentaire (Digeronimo, 1987).

Toute substance qui contamine le milieu naturel peut être concentrée par les êtres vivants grâce aux échanges permanents avec le milieu extérieur et aux divers processus métaboliques. Cette concentration se fait selon un niveau variable suivant le maillon de la chaîne trophique considéré et qui subit les effets à long terme (Lafont, 1975).

Les végétaux absorbent les pesticides par le système racinaire. Cette accumulation dans la biomasse des producteurs primaires à un taux bien supérieur à celui du sol, constitue le premier maillon de la concentration des chaînes trophiques alimentaires. Il y a également une concentration verticale des toxiques, le long des chaînes trophiques ; et le plus haut coefficient de concentration se trouve au niveau du dernier maillon (Lafont, 1975).

Les gastéropodes terrestres sont connus pour leur grande capacité d'accumulation des ETM et leur tolérance importante à de fortes concentrations dans l'environnement : ils appartiennent aux bioindicateurs par bioaccumulation. La plupart des métaux s'accumule principalement dans la glande digestive (Rabitsch, 1996 ; Berger et Dallinger, 1993, Dallinger, 1993), suivi par le rein et le pied. Seul le cuivre est distribué dans tous les organes car il intervient dans la composition de l'hémocyanine, protéine respiratoire transportant l'oxygène dans l'organisme (Rabitsch, 1996).

### **1.1.C. La dégradation :**

La dégradation constitue le processus qui conduit à la dispersion réelle de la matière active, soit par transformation partielle ou totale de la molécule d'origine en molécules inorganiques tel que :  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_3$  (Yajuraju, 1994). Lorsqu'elle est rapide et totale, elle contribue à la réduction du risque de dispersion de la matière active ou de ses métabolites. Dans la nature, il existe deux types de dégradation : dégradation abiotique (par des réactions physicochimiques dans le sol, l'eau et l'air), dégradation biotique ou la biodégradation (par les microorganismes) et la photo dégradation se fait par le rayonnement solaire (Calvet *et al.*, 2006)

### **1.2.Persistance des pesticides**

Quand les pesticides ne sont pas dégradés ou partiellement dégradés, ils se stabilisent dans les sols en se liant essentiellement à la matière organique. Ces liaisons sont plus ou moins fortes et évoluent dans le temps. D'autre part, la persistance d'un produit est influencée par les conditions environnementales (température, humidité, pH), par l'activité de la biomasse microbienne et par la présence d'autres pesticides ou substances chimiques dans le sol (Albin, 1999).

### **1.3. Toxicité des pesticides**

De nombreux pesticides sont toxiques pour les insectes bénéfiques, les oiseaux, les mammifères, les amphibiens ou les poissons. L'empoisonnement de la faune sauvage dépend :

- ✓ de la toxicité d'un pesticide et de ses autres propriétés (par exemple, les pesticides solubles dans l'eau peuvent polluer les eaux de surface) ;
- ✓ de la quantité appliquée, de la fréquence, du moment et de la méthode de pulvérisation (par exemple, la pulvérisation fine a tendance à être emportée par le vent) ;
- ✓ du climat ;
- ✓ de la structure de la végétation et du type de sol.

Les insecticides, rodenticides, fongicides et les herbicides, encore plus toxiques, menacent la faune sauvage qui y est exposée. Durant ces 40 dernières années, l'utilisation des très toxiques carbamates et organophosphorés a fortement augmenté.

Les pesticides utilisés en agriculture peuvent réduire l'abondance des mauvaises herbes et insectes, qui sont une source importante de nourriture pour de nombreuses espèces. Les herbicides peuvent changer les habitats en altérant la structure de la végétation, et finalement conduire au déclin de la population. Les fongicides ont également permis aux agriculteurs de ne plus avoir recours aux 'cultures secondaires' telles que l'herbe ou les racines. Cela a conduit au déclin de certaines mauvaises herbes des terres arables (Boatman *et al.*, 2007).

- ✓ Les pesticides affectent la faune sauvage directement et indirectement via les sources d'alimentation et les habitats.
- ✓ Les pesticides affectent les gastropodes, les vers de terre, le mycorhize symbiotique et d'autres organismes de sol.
- ✓ L'empoisonnement de la faune sauvage par des insecticides, rodenticides, fongicides (sur les semences traitées) et herbicides très toxiques peuvent provoquer le déclin majeur d'une population.
- ✓ Les pesticides accumulés le long de la chaîne alimentaire, particulièrement les perturbateurs endocriniens, présentent un risque à long-terme pour les mammifères, les oiseaux, les amphibiens et les poissons.
- ✓ Les insecticides et herbicides à large spectre réduisent les sources de nourriture pour les oiseaux et les mammifères. Cela peut amener à un déclin substantiel des populations d'espèces rares.

- ✓ En altérant la structure de la végétation, les herbicides peuvent rendre les habitats inappropriés pour certaines espèces. Cela menace les insectes, les oiseaux des zones agricoles et les mammifères.
- ✓ La composition et l'activité des communautés bactériennes peuvent être modifiées par les pesticides.

## 2. Généralités sur les fongicides

Très fréquemment employés contre les maladies cryptogamiques, les fongicides assurent une excellente protection contre le développement des champignons parasites et permettent l'obtention de plantes saines. On distingue deux grands groupes de fongicides : les fongicides minéraux et les fongicides organiques qui sont majoritairement des produits de synthèse.

### 2.1. Les fongicides minéraux : Parmi les fongicides minéraux on trouve :

- **Les fongicides à base de cuivre**

Ce sont les plus nombreux et les plus fréquents. Le plus connu est la bouillie bordelaise, mélange de sulfate de cuivre, de chaux et d'eau. Il existe également des préparations à base d'oxychlorure de cuivre. Les sels de cuivre agissent sur un très grand nombre de champignons qui sont responsables des tavelures, des mildious, chancres, et/ou pourriture grise.

- **Les fongicides à base de soufre**

Les vapeurs de soufre pénètrent dans les cellules et entrent en compétition avec l'oxygène dans les chaînes respiratoires. La qualité des soufres employés a une importance dans l'efficacité du traitement. On fait intervenir la finesse qui augmente la surface couverte et l'adhérence, la persistance, la densité qui doit être faible et enfin la fluence grâce à l'ajout d'un produit qui facilite l'épandage, améliore la répartition et accroît le pouvoir couvrant et pénétrant. La toxicité de ce type de fongicide est presque nulle vis à vis de l'homme et des animaux.

Il existe 3 types de fongicides soufrés : les soufres triturés utilisés sous forme de poudre, les soufres sublimés obtenus par condensation des vapeurs et employés en poudrage et les soufres mouillables utilisés en pulvérisations qui contiennent 80% de soufre à l'état pur et qui sont rendus miscibles à l'eau par l'adjonction de d'agents mouillants.

- **Les fongicides à base de permanganate de potassium**

Ils agissent uniquement à titre curatif sur les oïdiums qu'ils détruisent par contact.

## 2.2. Les fongicides organiques :

Les fongicides organiques sont arrivés sur le marché vers 1950, et se sont rapidement développés. Très efficaces, ils possèdent un large spectre d'action. Les fongicides organiques représentent un groupe important de molécules dont la structure chimique est variée. Parmi les principaux il y a :

- **Les carbamates**

® *Les dérivés de l'acide carbamique et benzimidazolés :*

A partir des années 1970, l'introduction du groupe des benzimidazolés a révolutionné le traitement de nombreuses maladies des plantes. Ce groupe comprend le bénomyl, le thiophanate-méthyl et le carbendazime (qui est aussi le principe actif des deux précédents). Les benzimidazolés ont une action inhibitrice sur la biosynthèse des microtubules et plus précisément sur la polymérisation de la tubuline. De ce fait, ils inhibent la mitose du champignon (Hutson et Myamoto, 1998).

® *Les dérivés de l'acide thiocarbamique et dithiocarbamique*

Les dérivés de l'acide thiocarbamique constituent une famille chimique très importante du point de vue phytosanitaire. Ces fongicides ont en commun leur absence totale de phytotoxicité, une polyvalence assez grande et une faible écotoxicité (Index phytosanitaire, 2001). On trouve dans cette famille : le mancozèbe, le manèbe, le propinèbe, le zinèbe et le ziram. Les dithiocarbamates ont une action inhibitrice sur la respiration des champignons. Ils agiraient également par le biais d'espèces réactives de l'oxygène à l'origine d'un stress oxydant. Ce groupe est surtout représenté par le thirame.

- **Les dérivés du phénol**

Ce groupe chimique, proche des dérivés du benzène est assez restreint. Son principal représentant est le dinocap qui agit sur la respiration (Index phytosanitaire, 2001). Le dinocap est phytotoxique si la température est supérieure à 35°C (Galet, 1999).

- **Les dicarboximides**

® *Les phthalimides* : Ces molécules ont une action sur la respiration du champignon. Les principaux représentants sont le captane et le folpel. Le folpel est un fongicide de contact multi-site homologué sur la vigne contre le mildiou, l'excoriose et le rougeot parasitaire.

® *Les imides cycliques* : Ces molécules causent des désordres dans les cellules du champignon spécialement quand celui-ci croît et se multiplie (Hutson et Miyamoto, 1998). L'iprodione, le procymidone et la vinchlozoline sont les plus utilisés.

- **Les amides et amines**

® *Les anilides* : Les fongicides de cette classe ont une action sur les Basidiomycètes. Ils inhibent la respiration du champignon par inhibition de la succinate déhydrogénase. Le carboxine et le flutolanil sont utilisés pour le traitement des plants et des semences, le mépronil sert au traitement du sol et des parties aériennes de la laitue ou de la scarole.

® *Les phénylamides* : Cette classe, qui comprend le bénomyl utilisé dans le traitement des parties aériennes de la tomate et de l'oignon contre le mildiou, et le métalaxyl pour traiter par exemple les parties aériennes des carottes contre la maladie de la bague ou de la tache ou sur les parties aériennes du cornichon ou du concombre contre le mildiou, tient une position importante dans le contrôle des attaques dues aux Oomycètes, pour lesquels de nombreux autres groupes sont peu efficaces.

- **Les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols**

Cette classe de fongicides agit sur les cellules du champignon en inhibant la synthèse des stérols. Ils ont un effet sur les attaques dues aux ascomycètes, aux basidiomycètes et aux champignons imparfaits mais ils n'ont pas d'activité sur les Oomycètes (Hutson et Miyamoto, 1998). Ils peuvent être utilisés lors de phénomènes de résistances aux benzimidazolés.

- **Les anilinopyrimidines**



Ce groupe comprend le cyprodinil et le pyriméthanil utilisé contre le développement de la pourriture grise au niveau des parties aériennes du fraisier. Leur mécanisme d'action est encore mal connu. Milling et Richardson (1995), rapportent que le pyriméthanil inhibe la sécrétion d'enzymes hydrolysantes et Masner *et al.*, (1994) qu'il est possible qu'ils inhibent la biosynthèse de la méthionine.

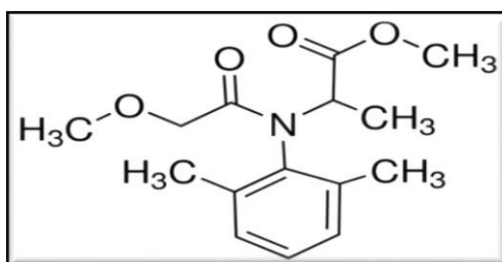
- **Les méthoxyacrylate et fongicides apparentés**

Ces produits ont été développés à partir de substances naturelles secrétées par des champignons de forêts. Le mode d'action de ces anti-fongiques est l'inhibition de la chaîne respiratoire du cytochrome b/c1 (Galet, 1999). Ce groupe est composé de l'azoxystrobine, du krésoxim-méthyl, de la picoxystrobine et de la trifloxystrobine.

### 3. Le fongicide étudié

Le fongicide utilisé dans notre étude est le VACOMYL-PLUS. Il comprend deux principes actifs : le métalaxyl et l'oxychlorure de cuivre.

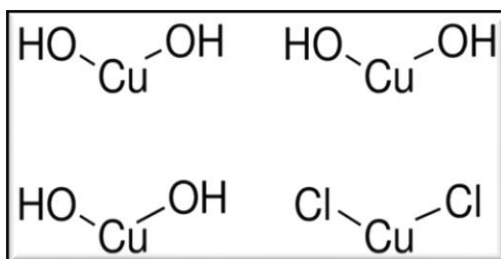
**Le métalaxyl** pour traiter les parties aériennes des carottes contre la maladie de la bague ou de la tache ou sur les parties aériennes du cornichon ou du concombre contre le mildiou, tient une position importante dans le contrôle des attaques dues aux Oomycètes, pour lesquels de nombreux autres groupes sont peu efficaces.



**Figure 3** : Structure chimique du métalaxyl (INERIS, 2008).

**L'oxychlorure de cuivre** possède plusieurs propriétés, Il est à la fois bactéricide et fongicide :

- ✓ Il permet d'éviter certaines maladies en agissant de façon préventive contre les bactéries.
- ✓ Il évite le développement des champignons en luttant contre leur germination.
- ✓ Il freine le développement des plantes : Il faut veiller à ne pas nuire aux végétaux en respectant à la fois la fréquence et la période de traitement.



**Figure 4** : Structure chimique d'oxychlorure de cuivre (INERIS, 2008).

### 3.1. Caractéristiques physico-chimiques des substances actives

#### 3.1.1. Métalaxyl

Les principales caractéristiques physico-chimiques du métalaxyl sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Propriétés physico-chimiques du métalaxyl (INERIS, 2008)

<i>Propriété</i>	<i>Résultat</i>
<i>Poids moléculaire</i>	279.33
<i>Formule brute</i>	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>
<i>Hydrolyse</i>	216 T1/2 en j      pH = 9
<i>Pression de vapeur</i>	0.0033 Pa
<i>Solubilité dans l'eau</i>	26000 mg/L
<i>Odeur</i>	Légère
<i>Couleur</i>	Jaune
<i>Densité</i>	1,05 – 1,07 g/cm <sup>3</sup> à 20 °C.
<i>Biodégradabilité</i>	Non facilement biodégradable
<i>Constante de Henry</i>	3.5e-05      Pa.m <sup>3</sup> /mol

<i>Coefficient de partage carbone organique-eau (Koc)</i>	660 L/Kg
<i>Log du coefficient de partage octanol-eau (log Kow)</i>	1.71

### 3.1.2. L'oxychlorure de cuivre

Les principales caractéristiques physico-chimiques d'oxychlorure de cuivre sont présentées dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Propriétés physico-chimiques d'oxychlorure de cuivre (INERIS, 2008)

<i>Propriété</i>	Résultat
<i>Etat physique</i>	Solide
<i>Masse moléculaire</i>	213.99
<i>Poids moléculaire</i>	427.13
<i>Formule brute</i>	H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> Cu <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
<i>Couleur</i>	Bleue verdâtre
<i>Odeur</i>	Faible
<i>Densité</i>	1.30
<i>Pression de vapeur</i>	Non disponible
<i>Solubilité dans l'eau</i>	7,3.10 <sup>5</sup> mg/L à 20 °C
<i>Biodégradabilité</i>	Non facilement biodégradable
<i>Point d'ébullition (°C)</i>	Se décompose partiellement en CuCl et Cl <sub>2</sub> à partir de 300 °C
<i>Coefficient de partage sol-eau : Kd (L/kg)</i>	2,7 – 6 353 L/kg

### 3.2. Mode d'action des substances actives

- Le métalaxyl

Il appartient à la famille des phénylamides. Il interfère avec les processus de synthèse de l'ARN64 ribosomique des Oomycètes, ce qui entraîne une inhibition de la croissance mycélienne et de la formation des spores. Le métalaxyl est systémique et véhiculé de façon acropétale via le xylème de la plante (Règlement CE n° 1272/2008).

- **L'oxychlorure de cuivre**

L'activité fongicide et bactériostatique de la préparation à base de cuivre est due aux ions cuivreux ( $\text{Cu}^{2+}$ ) libérés dans l'eau. Ils se combinent avec divers groupements chimiques des protéines des cellules ou de la membrane de l'agent pathogène et induisent des dénaturations de protéines et systèmes enzymatiques. Il s'agit d'une activité multi-sites.

Les ions cuivre présents sur les cultures traitées sont absorbés passivement par les spores des champignons et bactéries et s'y accumulent jusqu'au moment où leur concentration devient létale pour les cellules.

Le cuivre est plus actif contre les spores que contre les mycéliums des champignons : il doit être appliqué avant ou au tout début du développement de la maladie. Le cuivre est un fongicide de contact. Il présente une bonne persistance car l'ion cuivreux ne peut être altéré ou dégradé par la chaleur ou la lumière (Règlement CE n° 1272/2008).

### 3.3. Comportement et devenir dans l'environnement

#### 3.3.1. Devenir et comportement dans le sol

- **Métalaxyl**

En conditions contrôlées aérobies, le métalaxyl-M est principalement dégradé en un métabolite majeur, le **NOA** (R)-2-[(2,6-Dimethyl-phenyl)-(2-methoxy-acetyl)-amino]-propionic acid), qui atteint un maximum de 66 % de la radioactivité appliquée (RA). D'autres métabolites sont identifiés, notamment le **CGA** (2-[[((RS)-1-Carboxy-ethyl)-(2-methoxy-acetyl)-amino]-3-methyl-benzoic acid), mais sont mineurs (< 5 % de la RA). La proportion de résidus non-extractibles atteint un maximum de 29-73 % de la RA après 84-119 jours. La minéralisation atteint 16-37 % de la RA après 84-119 jours.

En conditions anaérobies, la voie de dégradation du métalaxyl-M est similaire à celle observée en conditions aérobies, mais la vitesse de dégradation est plus lente. La photodégradation dans le sol n'est pas une voie de dissipation significative.

- **Oxychlorure de cuivre**

Le cuivre est un composé inorganique qui ne peut être dégradé dans le sol. Il n'est donc pas possible de définir une voie et un taux de dégradation dans le sol comme il est fait habituellement pour les composés organiques.

Il peut toutefois être présent dans le sol sous différentes formes. Une grande partie sera fortement liée à différents constituants du sol, tandis que certaines espèces, représentant une fraction marginale, pourront être présentes en solution dans le sol. Le devenir et le comportement du cuivre dans le sol, ainsi que sa bio-disponibilité, dépendront fortement de la répartition de ces différentes formes.

La répartition et l'équilibre entre les différentes formes du cuivre dans le sol dépend de nombreux facteurs tels que le pH, la texture et la teneur en matière organique du sol. Si la forme potentiellement la plus mobile et la plus significative d'un point de vue toxicologique sont les ions  $\text{Cu}^{2+}$  présents dans l'eau du sol, il est cependant impossible de prédire avec certitude quelle proportion de la quantité totale de cuivre appliquée cette forme pourra représenter.

En conditions anaérobies, la différence de potentiel d'oxydo-réduction peut modifier la spéciation du cuivre dans le sol. Dans ces conditions, des ions  $\text{Cu}^{2+}$  peuvent être relargués, augmentant ainsi la quantité de cuivre en solution. Cet effet peut être contrebalancé par la formation des sels cuivriques et cuivreux.

### **3.3.2. Transfert vers les eaux souterraines**

#### *Adsorption et mobilité*

- **Métalaxyl**

Selon la classification de McCall, le métalaxyl est considéré comme moyennement à très fortement mobile dans le sol. Ses métabolites NOA et CGA sont très fortement mobiles dans le sol.

Les risques de transfert du métalaxyl et de ses métabolites vers les eaux souterraines ont été évalués selon les recommandations du groupe FOCUS (2000). Les paramètres d'entrée suivants ont été utilisés :

- pour le **métalaxyl-M** : DT50 = 14,6 jours (médiane des valeurs au laboratoire, n=5, 20°C, cinétique SFO), Kfoc = 39,9 mL/gOC et  $1/n = 0,926$  (médianes, n=20) ;
- pour le métabolite **NOA** : DT50 = 18,2 jours (moyenne géométrique des valeurs au laboratoire, n=5, 20°C, cinétique SFO), Kf oc = 11,3 mL/gOC et  $1/n = 0,929$  (médianes, n=13), fraction de formation cinétique (ffM) = 0,75 à partir du métalaxyl-M (moyenne, n=4) ;
- pour le métabolite **CGA** : DT50 = 15 jours (déterminée par modélisation inverse), Kfoc = 0,06 mL/gOC (déterminé par modélisation inverse) et  $1/n = 1$ , fraction de ffM = 0,10 à partir du métabolite NOA 409045 (n=1).

Les concentrations prévisibles dans les eaux souterraines (PECeso) calculées pour le métalaxyl sont inférieures à la valeur réglementaire de 0,1 µg/L pour l'usage revendiqué (valeurs maximale de 0,089 µg/L). Pour les métabolites NOA et CGA, les PECeso sont inférieures à la valeur de 10 µg/L (valeurs maximale de 3,65 et de 1,07 µg/L respectivement).

Le métalaxyl est stable à l'hydrolyse aux différents pH testés dans les conditions de température et de pH pertinentes du point de vue environnemental. Il est stable par photolyse. Il n'est pas facilement biodégradable.

Dans les systèmes eau-sédiment, le métalaxyl est dégradé dans l'eau en un métabolite majeur, le CGA, qui atteint un maximum de 69 % de la RA après 112 jours. Ce métabolite est également majeur dans le sédiment, où il atteint un maximum de 23 % de la RA après 56 jours. Le métalaxyl M est adsorbé sur le sédiment jusqu'à 20 % de la RA après 7 jours. Les résidus non-extractibles représentent 10 à 14 % de la RA après 240 jours. La minéralisation est faible (4 à 8 % de la RA après 240 jours).

- **Cuivre**

Bien qu'aucune information quantitative précise ne puisse être retenue pour l'évaluation des risques, le cuivre peut être considéré comme très faiblement mobile dans les sols.

En l'absence de valeurs acceptables pour les paramètres permettant de décrire la mobilité du cuivre dans le sol et faute de modèles validés pour ce type de composé inorganique, il n'est pas possible de donner une estimation fiable des concentrations prévisibles dans les eaux souterraines.

Cependant, le seuil réglementaire pour la concentration en cuivre dans les eaux de boisson est de 2 mg/L (directive 98/83/CE26). En considérant cette limite, le fond naturel de cuivre présent dans l'eau et les informations sur la mobilité du cuivre dans le sol, il n'est pas attendu que les usages agricoles du cuivre aboutissent à des risques inacceptables pour la contamination des eaux souterraines.

Bien que ne se dégradant pas, le cuivre peut réagir avec de nombreux autres éléments de sorte que la majeure partie du cuivre présent dans les systèmes aquatiques sera rapidement liée à des particules minérales et à la matière organique, ou précipitée sous la forme de sels insolubles.

Dans de l'eau pure, les ions  $\text{Cu}^{2+}$  ne sont présents qu'à des niveaux faibles. La concentration en ions  $\text{Cu}^{2+}$  sera plus importante à des pH faibles. Toutefois cette concentration va fortement dépendre de la concentration et du type d'éléments présents dans l'eau avec lesquels ils peuvent se lier.

Dans des études en microcosmes avec sédiment, le cuivre se dissipe de la phase aqueuse par un transfert vers le sédiment avec une DT50 maximum de 30,5 jours. Dans les sédiments, le cuivre est majoritairement lié à la phase solide. La concentration dans l'eau interstitielle est faible.

### **3.3.3. Comportement dans l'air**

- **Métalaxyl**

Compte tenu de sa pression de vapeur ( $3,3 \cdot 10^{-3}$  Pa à 20°C), le métalaxyl présente un potentiel de volatilisation non négligeable, selon les critères définis par le document guide européen FOCUS AIR (2008). Des expérimentations ont, par ailleurs, confirmé le potentiel de volatilisation du métalaxyl-M (volatilisation pouvant atteindre 49 % de la RA depuis le sol

après 48 heures et 35 % de la RA depuis les feuilles après 24 heures). Cependant, le potentiel de transport atmosphérique sur des longues distances est considéré comme faible (DT50 air comprise entre 4 et 6 heures (FOCUS AIR, 2008).

- **Cuivre**

Une transformation photochimique dans l'air ou un transfert du cuivre vers l'air depuis la surface des plantes ou du sol ne sont pas attendus.

Les limites de quantification LQ (la plus faible concentration d'un produit pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable) des substances actives, ainsi que leurs métabolites respectifs, dans les différents milieux sont les suivantes :

**Tableau 3 :** Limites de quantification des matières actives et leurs métabolites (Anses, 2013).

1 : Métabolite acide (CGA 62826) : (RS)-2-[(2,6-diméthyl-phényl)-méthoxyacétyl-amino]-propionique acid.

<i>Substances actives</i>	<i>Matrices</i>	<i>Composés analysés</i>	<i>LQ</i>
<i>Oxychlorure de cuivre</i>	Plantes	Cuivre	5 mg/kg
	Sol	Cuivre	5 mg/kg
	Eau de boisson et de surface	Cuivre dissous	0,1 µg/L
	Air	Cuivre	0,3 ng/m <sup>3</sup>
<i>Métalaxyl</i>	Plantes	Métalaxyl-M	0,02 mg/kg
		Métalaxyl (S-isomère)	0,02 mg/kg
	Sol	Métalaxyl-M	0,01 mg/kg
		Métalaxyl (S-isomère)	0,01 mg/kg
		Métabolite acide <sup>1</sup>	0,01 mg/kg
	Eau de boisson et de surface	Métalaxyl-M	0,05 µg/L
		Métalaxyl (S-isomère)	0,05 µg/L
		Métabolite acide	0,05 µg/L
Air	Métalaxyl (Métalaxyl-M et S-isomère)	2 µg/m <sup>3</sup>	

### 3.4.Effets toxicologiques

- **Métalaxyl**

La DJA du métalaxyl-M, fixée lors de son approbation, est de 0,08 mg/kg p.c./j. Elle a été déterminée en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose sans effet néfaste observé



obtenue dans une étude de toxicité de 90 jours par voie orale chez le chien. Les études réalisées donnent les résultats suivants :

- DL50 par voie orale chez le rat, supérieure à 3000 mg/kg p.c. ;
- DL50 par voie cutanée chez le rat, supérieure à 4000 mg/kg p.c. ;
- Non irritant pour les yeux chez le lapin ;
- Non irritant pour la peau chez le lapin ;
- Sensibilisant par voie cutanée chez le cobaye.

- **Oxychlorure de cuivre**

La DJA du cuivre fixée lors de son inscription à l'annexe I de la directive 91/414/CEE, est de **0,15 mg/kg p.c. /j**. Elle a été déterminée à partir de la valeur tolérable chez l'enfant (OMS, 1996) et en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose sans effet néfaste observé obtenue dans une étude de toxicité d'un an chez le chien. Les études réalisées donnent les résultats suivants :

- DL50 par voie orale chez le rat, supérieure à 2000 mg/kg p.c.;
- DL50 par voie cutanée chez le rat, supérieure à 2000 mg/kg p.c. ;
- Non irritant pour les yeux chez le lapin ;
- Non irritant pour la peau chez le lapin ;
- Non sensibilisant par voie cutanée chez le cobaye.

## II. Généralités sur les métaux

Les éléments métalliques peuvent être séparés en deux catégories, les éléments traces métalliques (ou ETM) et les éléments majeurs, dont il convient de préciser leur signification. Par définition, les **éléments traces** sont « les éléments minéraux constituant de la croûte terrestre, dont la concentration, pour chacun d'entre eux, est inférieure à 0,1% » (Baize, 1997) tels que le chrome, le nickel, le zinc, le cuivre, le plomb ou le cadmium. A l'inverse, les **éléments** dits **majeurs** interviennent pour 99,4% dans le total des éléments chimiques sur Terre et regroupent, entre autres, le fer et le manganèse. Après cette première classification, il est nécessaire de distinguer :

- *Les oligo-éléments ou métaux essentiels*, indispensables au fonctionnement des organismes biologiques, tels que le cuivre, le fer, le manganèse, le nickel, le zinc et le

chrome. Toutefois, présents à des concentrations excessives, ils deviennent toxiques pour les organismes.

- *Les éléments* à caractère *non indispensable*, toxiques aussi quand leurs concentrations dépassent certains seuils.

Des études ont montré que les métaux sont capables d'induire plusieurs pathologies (Valko *et al.* 2005). Certains sont purement toxiques pour les êtres vivants (cadmium). D'autres sont essentiels à l'organisme et à l'entretien des fonctions biologiques, générant tout de même des effets toxiques passé un certain seuil de concentration (cuivre et zinc).

## 1. Devenir des métaux dans les organismes

Pour évaluer l'effet ou la toxicité de polluants chez les invertébrés, il est nécessaire de connaître leur devenir (accumulation, excrétion ou transformation), leur distribution au sein de l'organisme et leur forme de stockage (Viard, 2004).

### 1.1. Devenir des éléments métalliques dans les plantes

La majorité des éléments métalliques présents dans le sol est facilement absorbée par les plantes et redistribuée dans leurs tissus (Zn, Mn, Cd). A l'opposé, certains éléments peuvent être fortement retenus dans les racines des plantes et n'atteindront donc jamais les parties supérieures (Fe, Pb, Cr<sup>3+</sup>) (Banuelos et Ajwa, 1999). Le devenir des EM dans les plantes est fortement lié aux processus régulant le métabolisme minéral et l'homéostasie. En conditions physiologiques normales, les plantes absorbent, solubilisent, transportent et utilisent ou séquestrent un grand nombre d'éléments (Banuelos et Ajwa, 1999). Lorsqu'ils sont présents en excès, les éléments métalliques absorbés par les cellules racinaires sont majoritairement immobilisés et détoxifiés par la formation de complexes avec des composés organiques tels que les acides aminés ou les phytochélatines (Morel, 1996). Les phytochélatines sont des protéines de liaison des éléments métalliques contenant des groupements sulphydryles et carboxyles capables de chélater les éléments métalliques. Elles possèdent une forte affinité pour le cadmium, le plomb ou le cuivre et jouent un rôle important dans la détoxification des EM et le maintien de l'homéostasie. Les EM sont alors transportés dans les différentes parties des plantes en fonction de l'élément métallique considéré mais aussi des caractéristiques physiologiques de la plante (Morel, 1996).

## 1.2. Devenir des éléments métalliques chez les invertébrés

### 1.2.1. Principales voies d'entrée dans l'organisme

La majorité des invertébrés terrestres, dont les gastéropodes, absorbent les EM essentiels ou toxiques par la nourriture et une absorption via l'épithélium digestif, ou par la peau (Marigomez, *et al.*, 2002; Scheifler, *et al.*, 2003). Une fois les différentes barrières biologiques passées (épithélium cutané et digestif), les éléments métalliques circulent dans l'organisme grâce à l'hémolymphe et sont distribués entre les différents organes où ils peuvent être stockés.

Les hémocytes jouent un rôle important dans le métabolisme des métaux et leur distribution dans les différents tissus (Cheng et Sullivan, 1984; Suresh et Mohandas, 1990), grâce à leur faculté de phagocytose des corps étrangers (Bulla and Cheng, 1997 ; Marigomez *et al.*, 2002).

Le transfert des éléments métalliques, au travers des membranes plasmiques cellulaires, s'effectue majoritairement par diffusion passive ou par des mécanismes nécessitant de l'énergie comme le transport par des protéines membranaires, spécifiques ou non, ou par endocytose des molécules (Marigomez, *et al.*, 2002).

### 1.2.2. Différentes formes de stockage des EM

#### 1.2.2.1. Les granules intracellulaires

Au niveau cellulaire, certains métaux sont directement dirigés vers des cellules spécifiques dans lesquelles ils seront séquestrés dans des granules de nature variée (Dallinger, 1993 ; Pihan, 2001).

Les granules sont des structures sphériques, denses aux électrons, classés en quatre catégories par Hopkin (1989) en fonction des affinités des métaux pour les ligands oxygénés (classe A), les ligands azotés ou soufrés (classe B) ou pour les deux types de ligands (classe intermédiaire) :

- *Les granules de type A*, constitués de couches concentriques de phosphates, de calcium et de magnésium, peuvent séquestrer des métaux de classe A et intermédiaire (Mn, Zn...). Chez les mollusques, ces granules, désignés concrétions ou sphéro-cristaux, permettraient la détoxification de ces EM ou la constitution de réserves de calcium. La tolérance de l'escargot vis-à-vis de concentrations élevées en Zn est due à l'incorporation de ce métal

dans des granules de pyrophosphate riches en calcium, présents dans les cellules à calcium de la glande digestive (Dallinger, 1993).

- *Les granules de type B*, d'aspect plus hétérogène, contiennent de grandes quantités de soufre, probablement issues de la dégradation de métallothionéines (Dallinger, 1993 ; Coeurdassier, 2001), associées avec des métaux de classe B ou intermédiaire (Cu, Cd, Zn, Pb...). Ces granules présentent une forme de stockage importante permettant la détoxification des EM.
- *Les granules de type C* sont composés presque exclusivement de fer, associés à d'autres EM (Pb ou Zn) chez les individus exposés à de fortes concentrations.
- Dans *les granules de type D*, aucun métal n'a jamais été détecté en quantité significative cas particulier des concrétions à silice dans les cellules rénales (Pihan, 2001).

Lorsqu'ils sont séquestrés dans des granules, les EM peuvent être stockés dans les tissus pendant de longues périodes (Dallinger, 1993) ou excrétés dans la lumière du tube digestif (Rainbow, 2002). Ces granules ont été observés chez de nombreux invertébrés terrestres dont les gastéropodes (Coeurdassier, 2001 ; Pihan, 2001).

#### 1.2.2.2. Les protéines liant les métaux

Au niveau moléculaire, quelques métaux tels que le zinc, le cuivre ou le cadmium, peuvent se lier à des métallothionéines cytosoliques ou d'autres protéines liant les métaux (Dallinger, 1993). Les métallothionéines sont des molécules de faible poids moléculaire, de composition en acides aminés distincts et riches en soufre, grâce auquel elles sont capables de lier des métaux des classes B ou intermédiaires. Inductibles lors d'exposition aux EM, les métallothionéines interviennent non seulement dans la détoxification des éléments toxiques mais aussi dans le maintien de l'homéostasie ou le métabolisme des éléments essentiels comme le cuivre ou le zinc, afin de les maintenir disponibles pour d'autres métalloprotéines comme l'hémocyanine (Dallinger, 1993 ; Hamza- Chaffai, *et al.*, 2000 ; Scheifler, 2002).

Les métaux présentent une affinité variable pour les MTs selon l'ordre Hg>>Cu-Ag>>Cd>Pb>Zn>Co>Fe. Dans la glande digestive des escargots, un des isoformes d'une métallothionéine entre en jeu dans l'accumulation, la fixation et la détoxification du cadmium. Le second isoforme, présent lui dans le manteau, se lie exclusivement au cuivre et permet la régulation de la concentration intracellulaire en cuivre (Dallinger, *et al.*, 2000; Hamza-Chaffai, *et al.*, 2000). Quand les possibilités de liaison aux métallothionéines sont saturées,

soit des effets toxiques apparaissent dans les cellules, soit une autre stratégie de détoxification intervient comme l'excrétion (Berger *et al.*, 1997). L'induction de la synthèse des métallothionéines, lors d'expositions au cadmium, au cuivre ou au zinc, permet leur utilisation comme biomarqueur d'exposition (Dallinger, *et al.*, 2000 ; Hamza-Chaffai, *et al.*, 2000).

### 1.2.3. Accumulation des EM

L'accumulation est un phénomène par lequel une substance, présente dans l'environnement, pénètre dans un organisme même si elle n'a aucun rôle métabolique, voire même si elle est toxique pour ce dernier (Ramade, 1992). L'accumulation traduit un état d'équilibre dynamique entre les processus d'absorption, de stockage et d'excrétion (Rainbow et Dallinger, 1993) et permet d'indiquer le niveau de contamination d'un milieu.

Parmi la faune du sol, les Collemboles, les Vers de terre, les Isopodes et les Gastéropodes présentent des facultés d'accumulation importantes. Boháč et Pospíšil (1989) ont proposé une classification des invertébrés terrestres en différents groupes en fonction de leur capacité à accumuler les métaux lourds (Tableau 14), représentée par le facteur de bioaccumulation (BAF) pour chacun des métaux : BAF > 2 macroconcentreur

$$1 \leq \text{BAF} \leq 2 \text{ microconcentreur}$$

$$\text{BAF} < 1 \text{ déconcentreur}$$

**Tableau 4** : Classification des invertébrés terrestres selon Boháč et Pospíšil (1989) et les résultats obtenus par Dallinger (1993) pour quelques gastéropodes terrestres.

Elément	Macroconcentreur	Microconcentreur	Déconcentreur
<b>Cd</b>	<i>Helix pomatia</i> , <b><i>Helix aspersa</i></b> , <i>Cepaea nemoralis</i> , <i>Arianta</i> <i>arbustorum</i>	-	-
<b>Cr</b>	-	-	Toutes les espèces étudiées
<b>Cu</b>	Arachnides, Lombricidés, Isopodes, Diplopodes, <i>Helix</i> <i>pomatia</i> , <b><i>Helix aspersa</i></b> , <i>Arianta arbustorum</i>		Hétéroptères
<b>Mn</b>	-	Lombricidés	Lombricidés, Arachnides, Diplopodes, Isopodes

<b>Pb</b>	Lombricidés, Isopodes, Diplopodes, Chilopodes	Coléoptères, <i>Helix pomatia</i> , <i>Arianta arbustorum</i>	
<b>Zn</b>	<i>Helix pomatia</i> , <i>Arianta arbustorum</i>	<i>Helix aspersa</i>	-

### III. Généralités sur le cadmium

Le cadmium (Cd) était inconnu jusqu'au 19<sup>ème</sup> siècle, quand ses caractéristiques physico-chimiques ont été mises en évidence et utilisées plus tard dans les batteries, pour protéger l'acier contre la corrosion ou encore comme stabilisant pour les plastiques et comme pigment dans les produits céramiques (Jarup, 2002). Le Cd est un métal blanc argenté, brillant, il est malléable et ductile. Le Cd est un membre du groupe II des éléments du tableau périodique. Il ne participe à aucun processus vital et est toxique à de très faibles concentrations.

Le Cd est un élément rare et réparti uniformément dans la croûte terrestre, où sa concentration moyenne est de 0,15 à 0,20 mg/kg (Fleischer 1974; Hiatt 1975). On le retrouve comme contaminant dans les sédiments, l'air, l'eau (Waisberg *et al.*, 2003), dans l'agriculture et les rejets industriels, la fumée de cigarette (Fassett 1975; He *et al.*, 2005; Jarup 2003; Trinchella *et al.*, 2006). Le traitement des ordures ménagères reste le premier secteur responsable d'émissions de Cd. Le Cd est classifié comme un carcinogène de type I par l'agence internationale pour la recherche sur le cancer et le programme national de toxicologie USA (IARC 1993; Oh *et al.*, 2006; US NTP 2000; Who 1992). De plus, de nombreuses études ont démontré que ce métal peut induire de multiples cancers au niveau des reins, des poumons, des testicules ou de la prostate.

#### 1. Métabolisme

Les sources d'exposition au Cd chez l'homme sont l'alimentation (poissons, végétaux dont les légumes riches en fibres ; (Jarup, 2002; Satarug and Moore, 2004)) et le tabagisme.

L'absorption intestinale de Cd (sous forme de Cd<sup>2+</sup>) chez l'homme est d'environ 30 µg/jour en fonction de l'âge, le sexe, ainsi que le régime alimentaire (Jarup, 2002; Satarug and Moore, 2004). L'efficacité de l'absorption du Cd est dépendante des conditions d'exposition :

5% du métal ingéré est absorbé par le tractus gastro-intestinal sous forme de sel, 90% du Cd inhalé est absorbé par voie pulmonaire (Jarup, 2002).

Chimiquement, il ressemble beaucoup au zinc et peut le remplacer isomorphologiquement dans presque tous ses minerais (Cotton, 1972; Lymburner, 1974). Dans les différents tissus ou les cellules de l'organisme, le Cd se fixe sélectivement sur un certain nombre de molécules telles que les métallothionéines (MTs) qui assurent sa détoxification. De ce fait, le Cd entre en compétition avec les autres métaux (zinc, cuivre). L'exposition au Cd peut aussi stimuler la production de MTs, ce qui rend la demi-vie biologique du Cd très longue ; entre 10 et 30 ans (Goyer, 1996; Stohs *et al.*, 2000). Moins de 10% du Cd absorbé sont excrétés dans l'urine et les fèces, ce qui explique les différents dommages cellulaires suite à une exposition chronique (Jarup, 2002). Les dommages relatifs à cette exposition sont des lésions hépatiques ou rénales, des dommages pulmonaires, un remodelage osseux pour des expositions extrêmes.

## 2. Ecotoxicité du cadmium

De nombreuses données sont disponibles concernant la toxicité du cadmium, le tableau 5 représente les données concernant sa toxicité sur les invertébrés terrestres.

**Tableau 5** : Toxicité du chlorure de cadmium sur différents invertébrés terrestres (Viard, 2004).

Organismes	Espèces	Critères d'effet	Valeurs ( $\mu\text{g/g}$ PS)	Référence
<b>Annélides</b>	<i>Eisenia fetida</i>	NOEC 56 jours	5	INERIS
	<i>Eisenia andrei</i>	NOEC 21 jours	10	INERIS
	<i>Enchytraeus albidus</i>	CL 50	554	Lock et Janssen, 2002a
		CE 50	130	
<b>Insectes</b>	<i>Folsomia candida</i>	NOEC 42 jours	50	INERIS
		NOEC 35 jours	71-148	INERIS
		CL 50	778-977	Crommentuijn <i>et al.</i> , (1995a, 1995b)
		CE 50	159-326	
		CSEO	34.8-326	
<b>Gastéropodes</b>	<i>Hélix aspersa</i>	CE 50	140	Gomot, 1997

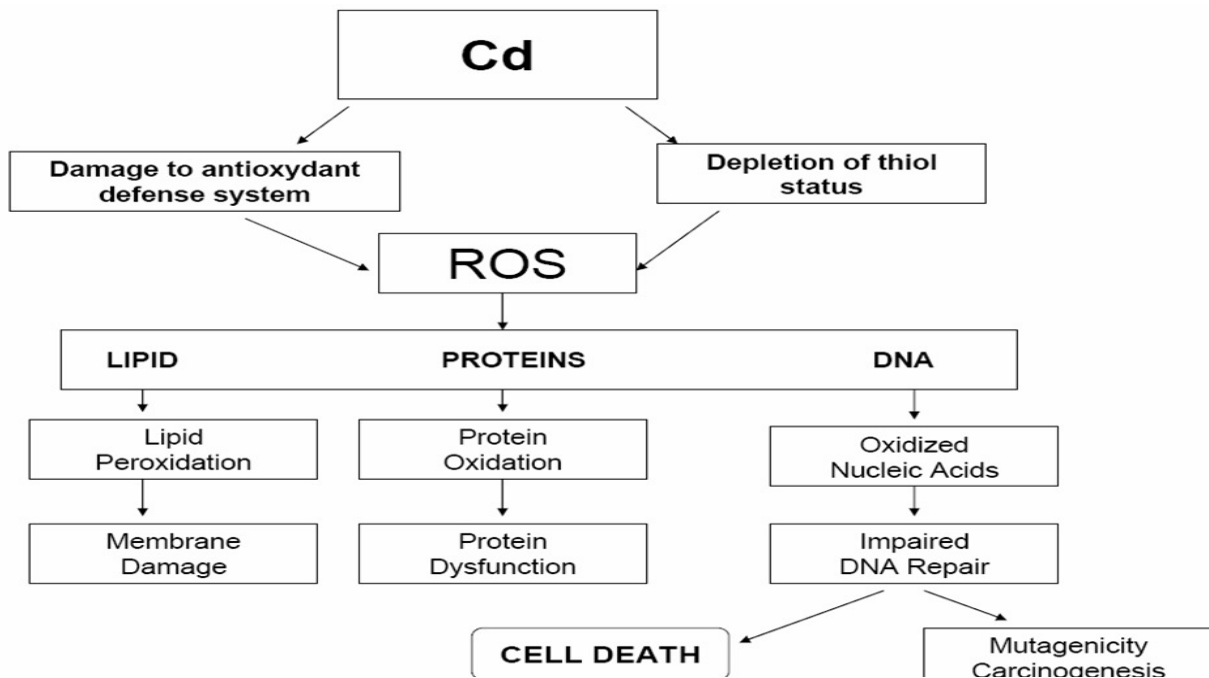
## 3. Mécanismes de toxicité de cadmium

Le cadmium est capable d'induire l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par des mécanismes indirects. Il est également décrit comme inhibiteur de la réparation de l'ADN (Waisberg *et al.*, 2003). Ce métal peut avoir une toxicité importante par interférence avec des métaux essentiels comme le fer, le cuivre et le zinc. Les perturbations engendrées par le Cd aboutissent à plusieurs conséquences néfastes pour la cellule (Viard, 2004).

### 3.1. Radicaux libres générés par le cadmium

Les effets toxiques du Cd sont essentiellement indirects. Ce métal lourd non oxydoréducteur en milieu biologique provoquerait la diminution des taux cellulaires des principaux systèmes antioxydants (figure 5). Des expositions courtes au Cd semblent inhiber les enzymes de stress comme la SOD (Stohs and Bagchi, 1995), la CAT et la GPx (Szuster-Ciesielska *et al.*, 2000). Par contre des expositions prolongées entraînent une augmentation des activités de certaines enzymes (Potts *et al.*, 2001; Waisberg *et al.*, 2003) et de l'expression de certaines protéines comme les métallothionéines, probablement à cause d'une adaptation suite à l'induction des gènes codant pour ces molécules. L'autre possibilité expliquant l'augmentation des ERO en présence de cadmium correspond au déplacement des métaux constituant la structure des SOD (Filipic *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). Ces altérations des molécules antioxydantes et de l'homéostasie des métaux physiologiques comme le calcium, le fer, le cuivre et le zinc (Aramini *et al.*, 1995; Predki and Sarkar 1994) peuvent se traduire par une démétallation des protéines, une altération des fonctions cellulaires faisant intervenir des thiols réactifs (antioxydants, oxydoréductases, protéines fer-soufre, signalisation redox basée sur des thiols réactifs), une interférence dans la signalisation dépendante du calcium. L'impact du Cd sur toutes ces cibles peut entraîner l'augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que les radicaux hydroxyles, superoxyde, ou le peroxyde d'hydrogène (Fotakis *et al.*, 2005; Galan *et al.*, 2001; O'Brien and Salacinski 1998; Oh *et al.*, 2006; Stohs *et al.*, 2001; Waisberg *et al.*, 2003) (figures 5 et 6). Les ERO vont engendrer une situation de stress oxydant dans la cellule et donc des dommages oxydatifs au niveau des macromolécules biologiques (peroxydation lipidique, lésions de l'ADN, modifications oxydatives des protéines) (Ercal *et al.*, 2001; Figueiredo-Pereira *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2006; Hengstler *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2006; Youngs *et al.*, 2000).





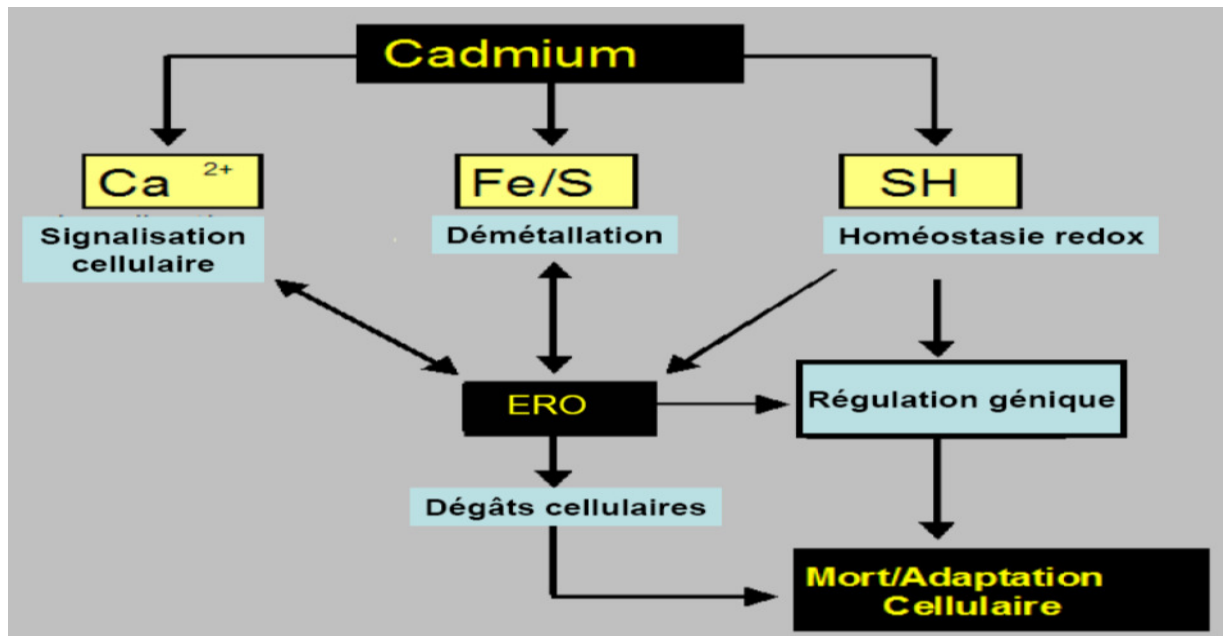
**Figure 5 :** Mécanismes d'induction du stress oxydant par le Cd (Bonnefont-Rousselot, 1994; Ercal *et al.*, 2001).

### 3.2. Cadmium et signaux intracellulaires de calcium

Le cadmium peut altérer l'homéostasie du calcium qui est un système universel et un messager intracellulaire versatile (Berridge *et al.*, 2000). Une intoxication au cadmium peut augmenter les taux de calcium via la protéine G couplée aux facteurs de liaisons de métaux (Faurkov and Bjerregaard, 2002). L'activation de la phospholipase C et la production de l'IP3 (Phosphoinositide-binding protein) par hydrolyse de la phosphatidylinositol s'ensuivent (Faurkov and Bjerregaard, 2002; Misra *et al.*, 2002). Cette cascade de signalisation induite par le Cd, déclenche la libération du calcium de ses compartiments de stockage. Par conséquent, en dépit de son action inhibitrice sur de nombreux types de canaux calciques et les pompes (Kiss and Osipenko, 1994), le cadmium peut induire une augmentation des concentrations cellulaires de calcium et ce dernier peut engendrer l'apoptose (Viard, 2004).

Un autre mécanisme par lequel le cadmium interfère avec l'homéostasie calcique est lié à sa capacité à moduler les récepteurs extracellulaires de calcium (Chang and Shoback, 2004). Ainsi, le Cd peut profondément affecter les fonctions des cellules exprimant ce système de détection de calcium extracellulaire. Le cadmium peut également réguler les signaux

calciques en exerçant des effets opposés sur le contrôle interne de calcium, par la promotion de l'efflux de calcium du réticulum endoplasmique (Palade *et al.*, 1989) ou en inhibant le réticulum sarcoplasmique calcium-ATPase (Beyersmann and Hechtenberg, 1997).



**Figure 6** : L'impact du cadmium sur ses cibles cellulaires conduit à la production des ERO (Waisberg *et al.*, 2003).

### 3.3. Cadmium et inhibition de la réparation de l'ADN

La carcinogénicité du Cd peut être expliquée par sa capacité à induire les ERO et les dommages de l'ADN. Par ailleurs le Cd peut agir par son interférence avec les facteurs de réparation de l'ADN (Filipic *et al.*, 2006; Filipic and Hei, 2004). Les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN sont de la famille des protéines à doigts de zinc et l'effet inhibiteur du Cd est lié au remplacement de ce zinc (Hartwig, 2001). Buchko *et al.*, (2000) ont utilisé une méthode spectrochimique pour étudier l'effet du Cd sur la structure de la protéine XPA impliquée dans la reconnaissance des lésions de l'ADN pendant la réparation par excision de nucléotides. Ces auteurs ont démontré que le Cd pouvait se lier aux groupements thiols des cystéines de XPA. Le complexe s'établit entre le Cd et les quatre cystéines de la région doigt de zinc de XPA. Par conséquent XPA ne peut plus se fixer à l'ADN (Asmuss *et al.*, 2000; Buchko *et al.*, 2000; Kopera *et al.*, 2004; Waisberg *et al.*, 2003).

L'exposition au Cd inhibe et modifie certaines protéines de la réparation par excision de base telle que la 8-oxoguanine DNA glycosylase de type I de l'homme (hOGG1). Cette

enzyme permet la réparation de la 8-OHdG. Plusieurs études ont démontré que le Cd réprime les gènes hOGG1 (Bertin and Averbeck, 2006; Potts *et al.*, 2003). Le Cd peut également inhiber la synthèse de l'ADN (Cao *et al.*, 2007). Toutes ces actions d'inhibition sont une contribution indirecte du Cd aux effets mutagènes et/ou à la carcinogénicité (Giaginis *et al.*, 2006).

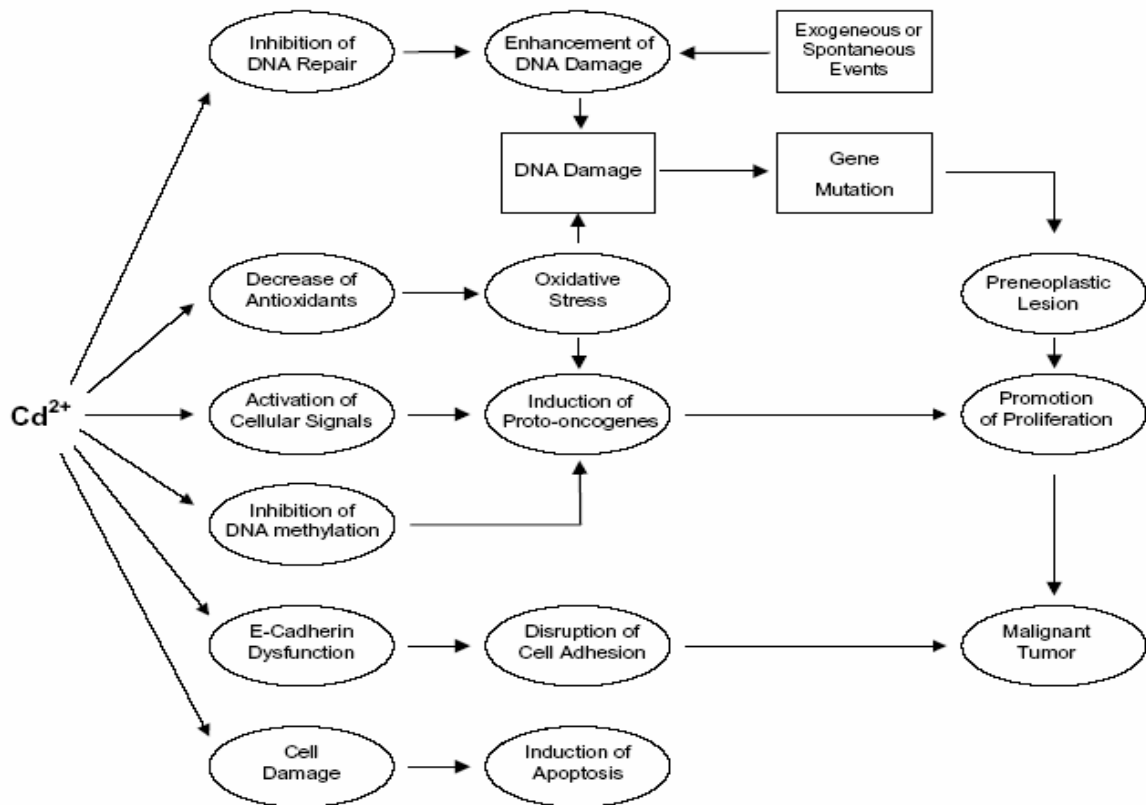
#### **4. Maladies induites par le cadmium**

##### **4.1. Cancer**

La lutte contre le cancer est l'axe de recherche biomédical le plus important des dernières années. Il existe plusieurs types de mécanismes impliqués dans la cancérogenèse Cd-induite. L'exposition au Cd a été associée aux cancers de poumons, de la prostate, du pancréas, du foie et des reins (Nawrot *et al.*, 2006; Verougstraete *et al.*, 2002; Waisberg *et al.*, 2003). Il a été classé comme cancérogène de type I par l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC).

Les mécanismes de cancérisation sont principalement indirects. Plusieurs études ont montré que le Cd ne peut se lier à l'ADN que dans des expériences *in vitro*. *In vivo*, le Cd a une affinité beaucoup plus grande pour d'autres molécules comme les métallothionéines (Goering *et al.*, 1993; Klaassen *et al.*, 1999; Waalkes, 2003). Les ERO générés par le Cd interviennent non seulement dans toutes les phases du développement d'un cancer mais aussi dans l'induction de certains proto-oncogènes : C-fos, C-jun, C-myc. D'autre part, l'exposition aux ERO favorise les dommages des bases de l'ADN dont la guanine oxydée en 8-OHdG (Bjelakovic *et al.*, 2004a, b; Blumberg and Block, 1994).

L'anion superoxyde et le système xanthine/xanthine oxydase qui le produit sont des promoteurs de la transformation néoplasique des cellules initiées. De nombreux polluants, incriminés dans la cancérogenèse, génèrent des ERO (Pryor, 1992) ; y compris le Cd (Filipic *et al.*, 2006) (figure 7).



**Figure 7** : Résumé des effets moléculaires impliqués dans la carcinogénèse du cadmium (Waisberg *et al.*, 2003). Dans la première colonne, sont décrites les cibles biochimiques immédiates du Cd. La deuxième colonne présente les conséquences au niveau de la physiologie cellulaire : inhibition de la réparation de l'ADN; inhibition des antioxydants entraînant ainsi le stress oxydant; activation des signaux et induction des protooncogènes cellulaires; inhibition de la méthylation de l'ADN; rupture de l'adhérence cellule-cellule. La colonne droite montre les liens probables entre les différentes étapes dans la carcinogénèse.

Le Cd peut non seulement induire le stress oxydant mais aussi la production indirecte des lésions en interférant avec les systèmes de réparation de l'ADN pour amplifier le niveau des mutations dues à des agents génotoxiques. Le Cd peut également favoriser la croissance de tumeurs par l'inhibition de la méthylation de l'ADN (Dainiak and Tan, 1995).

#### 4.2. Toxicité hépatique et rénale

Le cadmium est un des toxiques professionnels et environnementaux les plus dangereux. Chez des travailleurs exposés comme dans la région du comté de Kalmar en Suède, en Belgique ou dans le bassin du Jinzu au Japon, des effets néphrotoxiques élevés sont observés (Satarug and Moore, 2004). Les lésions rénales se traduisent par une augmentation de la

protéinurie tubulaire (excrétion de protéines de faible masse molaire) pouvant évoluer vers des dommages glomérulaires avec une forte diminution de l'efficacité de la filtration glomérulaire se caractérisant par une excrétion urinaire de protéines de grande masse molaire, une augmentation de l'excrétion urinaire de glucose, d'acides aminés, de calcium et réduction de la capacité de concentration des reins. Le Cd inhibe aussi la réabsorption de calcium en bloquant un canal calcique situé dans le tubule distal, et cela conduit à une hypercalcinurie et à la formation d'un caillot (Barbier *et al.*, 2004).

Le Cd absorbé via la voie gastro-intestinale ou pulmonaire peut aboutir au foie grâce à la circulation sanguine et complexé à diverses protéines comme l'albumine. Dans le foie, le Cd peut se conjuguer au glutathion (GSH) ou aux métallothionéines (MTs). Les complexes Cd-GSH et Cd-MTs formés arrivent ensuite au niveau des tubules proximaux où ils sont excrétés à hauteur de 50% et réabsorbés à hauteur de 50% par endocytose (Barbier *et al.*, 2005).

Les complexes réabsorbés sont dégradés par les lysosomes libérant du cadmium susceptible d'interagir d'autres composants cellulaires et de les endommager si le métal n'est pas repris en charge (Viard, 2004).

#### **4.3. Toxicité pulmonaire**

Le contenu en cadmium du tabac est élevé à cause des propriétés des plantes *Nicotiana* qui peuvent accumuler le Cd en se préservant de ses effets délétères. Le Cd présent dans le tabac varie entre 0,5 à 1 µg/cigarette. Environ 10% de l'oxyde de Cd inhalé se dépose dans les alvéoles pulmonaires ce qui conduit aux fibroses interstitielles, aux emphysèmes (Hart *et al.*, 2001) et aux adénocarcinomes pulmonaires (Waalkes, 2003). Les mécanismes provoquant ces pathologies ne sont pas entièrement compris mais la capacité du Cd à produire un stress oxydant semble importante dans le processus de cancérogenèse. 30 à 40% du Cd passe dans la circulation sanguine par un mécanisme non élucidé à ce jour mais qui pourrait utiliser le transporteur de métaux divalent de type I (DMT1). Les fumeurs ont une concentration sanguine de Cd de 4 à 5 fois plus élevée que les non-fumeurs et il s'accumule 2 à 3 fois plus de Cd dans les reins (Satarug and Moore, 2004).

#### **4.4. Autres maladies**

Il existe d'autres types de maladies comme les maladies neurodégénératives qui sont devenues un enjeu majeur de la recherche biomédicale avec l'augmentation de la durée de vie ; ou les maladies cardio-vasculaires qui occupent la première place dans les causes de mortalité en occident. De très importantes recherches ont été et sont encore menées qui ont conduit à l'élaboration d'un schéma de l'altération du système cardio-vasculaire avec le stress oxydant. Le stress oxydant généré par le cadmium (Cd) pourrait être un facteur important dans plusieurs perturbations neurologiques comme les maladies d'Alzheimer et Parkinson (Watjen and Beyersmann, 2004).

Par ailleurs, le syndrome d'Itaï-Itaï constitue la forme la plus sévère d'intoxication chronique par le Cd observée chez l'humain. Ce syndrome est endémique de la région du bassin de la rivière Jinzu dans la préfecture de Toyama (Japon) polluée par le cadmium provenant de mines de zinc, le cadmium étant rejeté dans la rivière comme sous-produit. Le syndrome d'Itaï-Itaï (littéralement syndrome « aïe-aïe ») se caractérise par une ostéomalacie et une ostéoporose associées à un dysfonctionnement des reins. Le contenu en Cd dans le squelette des individus affectés est beaucoup plus important que chez les individus non exposés (2,7 µg/g comparé à 0,3 µg/g pour les hommes et 1,8 µg/g comparé à 0,6 µg/g pour les femmes ; (Jarup 2002). Au stade le plus avancé de la maladie, les os se brisent au moindre choc occasionnant de multiples fractures extrêmement douloureuses qui sont à l'origine du nom de la maladie. Les personnes souffrant de malnutrition ainsi que les femmes ménopausées y sont plus particulièrement sensibles (Kjellstrom 1986). L'exposition au Cd peut également être responsable d'anémie chez l'humain (Horiguchi *et al.*, 1994) et chez les rongeurs (Hiratsuka *et al.*, 1996; Sakata *et al.*, 1988).

**Tableau 6 :** Quelques propriétés physicochimiques et toxiques du cadmium (ATSDR, 2007 ; Handbook of chemistry and physics, CRC Press)

<i>Propriété</i>	<b>Cd(Cl)</b>
<i>Masse molaire (g/mol)</i>	183,3
<i>Valence</i>	Cd <sup>2+</sup>
<i>Solubilité</i>	H <sub>2</sub> O, Acétone
<i>Potentiel redox</i>	Cd <sup>2+</sup> $\rightleftharpoons$ Cd

	-0,4
<i>DJA (mg/kg PC ; voix orale)</i>	$7.10^{-3}$
<i>Dans l'air</i>	$1,8.10^{-6}$
<i>Carcinogénicité (IARC)</i>	Groupe I
<i>DL50 (selon les espèces ; voix orale)</i>	0,18 g/kg : rat 0,06 g/kg : souris

#### IV. Utilisation des escargots dans l'étude de la contamination de l'environnement

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

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

Les organismes bioindicateurs d'effets doivent être sensibles à de faibles perturbations de l'environnement tandis que les organismes indicateurs de bioaccumulation doivent tolérer les contaminants à de fortes concentrations et présenter des propriétés bioaccumulatrices. Les gastéropodes terrestres, limaces et escargots, sont des herbivores et des détritivores qui jouent un rôle majeur dans de nombreux écosystèmes (Russell-Hunter, 1983). De par leur position dans la chaîne trophique, ils sont les proies de nombreux prédateurs, tels que les oiseaux, les mammifères ou les invertébrés, et peuvent donc être à l'origine de transferts de contaminants dans la chaîne trophique (Laskowski et Hopkin, 1996). C'est pourquoi, ces gastéropodes terrestres sont de plus en plus utilisés pour évaluer l'impact de contaminations sur leur milieu soit lors de tests en laboratoire, soit directement sur le site à étudier.

L'utilisation des invertébrés pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes a une longue histoire dans les milieux aquatiques (Phillips, 1977) et terrestres (Eijsackers, 1983). 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 des indicateurs écologiques pertinents (Berger et Dallinger, 1993 ; Cortet *et al.*, 1999), car :

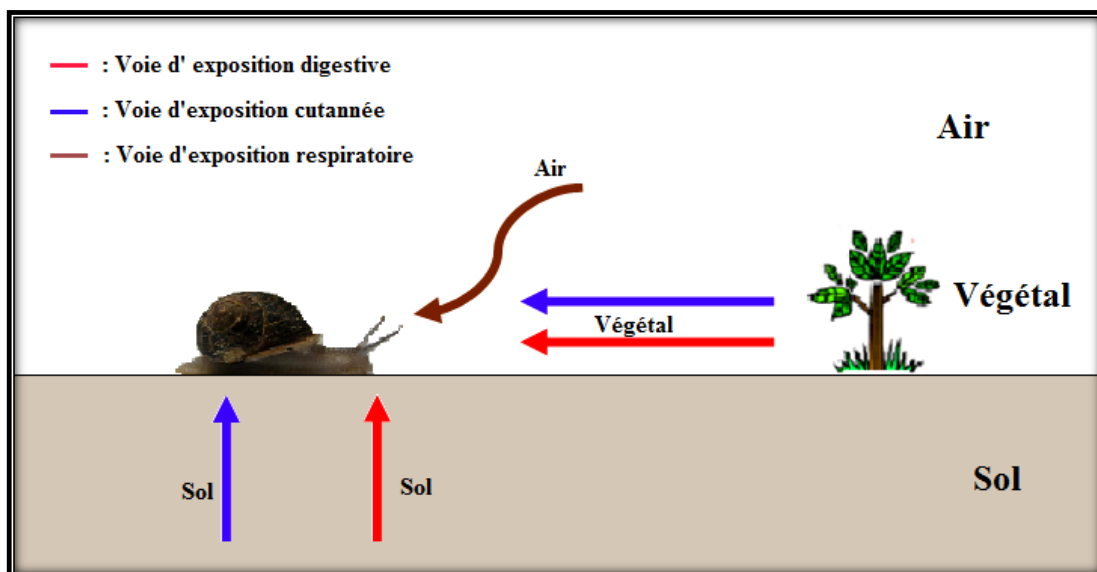
- ✓ ils représentent une biomasse significative au sein de la communauté des invertébrés du sol (Dallinger *et al.*, 2001),
- ✓ ils occupent une situation privilégiée à l'interface sol-plante-atmosphère (Barker, 2001),
- ✓ ils intègrent des sources et voies de contamination multiples (fig. 8)
- ✓ ils possèdent des capacités de bioaccumulation importantes pour de nombreux polluants métalliques (Menta et Parisi, 2001 ; Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2002 ; Viard *et al.*, 2004) et organiques (Coeurdassier *et al.*, 2001 ; Sverdrup *et al.*, 2006),
- ✓ ils présentent des réponses physiologiques (inhibition de croissance, de reproduction, mortalité) (Laskowski et Hopin, 1996a ; Gomot, 1997 ; Swaileh et Ezzughayyar, 2001 ; Gomot-de Vaufleury et Bispo, 2000 ; Notten *et al.*, 2006) et biochimiques (Coeurdassier *et al.*, 2001 ; Ismert *et al.*, 2002 ; Regoli *et al.*, 2006) quand ils sont exposés aux contaminants,
- ✓ ils constituent un élément des réseaux trophiques qui contribue au transfert des polluants du sol et/ou des plantes aux prédateurs (Beeby, 1985 ; Laskowski et Hopkin, 1996b ; Scheifler *et al.*, 2002a).

De nombreuses études ont démontré que les mollusques gastéropodes comme les escargots terrestres sont des bioindicateurs de pollution notamment des métaux et des HAPs (Boucenna, 2010 ; Dallinger *et al.*, 2001 ; Beeby et Richmond 2002 ; Regoli *et al.*, 2006 ; Barker 2001). Ces consommateurs primaires occupent une place particulière dans l'écosystème à l'interface sol-air-végétation (Figure 8). De ce fait, ils intègrent plusieurs sources de contamination (sol, atmosphère, végétaux) par voies digestive, respiratoire et/ou cutanée. Ils participent à la décomposition et à la fragmentation de la matière organique et sont impliqués dans de nombreuses chaînes alimentaires, y compris celle menant à l'homme (Barker 2004). Ils sont notamment indispensables à l'alimentation des oiseaux car ils leurs apportent une source de calcium nécessaire pour la construction de la coquilles des œufs et une étude a montré que la pollution par des métaux entraînant une diminution significative de la densité et de l'abondance des escargots induisait alors indirectement un effet sur les oiseaux (Eeva *et al.*, 2010).



Peu d'études sont consacrées aux effets des pesticides sur les escargots. Parmi les données disponibles, il apparaît que les carbamates et les insecticides organophosphorés entraînent une faible mortalité chez des escargots nourris pendant 10 jours avec de l'aliment contaminé (Schuytema *et al.*, 1994). Coeurdassier *et al.*, (2001) ont étudié les effets d'un insecticide organophosphoré, le diméthoate, sur la survie, la croissance et les acétylcholinestérases (AChE) et démontrent une inhibition de la croissance en relation avec l'accumulation de cette molécule. Ces auteurs ont également observé que les escargots sont plus sensibles aux pesticides contenus dans le sol que dans la nourriture (Coeurdassier *et al.*, 2002).

Parmi les espèces d'escargots utilisés en écotoxicologie, notre choix s'est porté sur l'escargot *Helix aspersa* (aussi nommé *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* dans la nomenclature récente, Barker, 2001) ou petit gris. 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.



**Figure 8 :** Les différentes voies de contamination d'*Helix aspersa* (Viard, 2004)

## V. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de cette étude n'est pas de démontrer la dangerosité du cadmium ou du fongicide (ce qui a déjà été montré) mais d'attirer l'attention sur l'effet cocktail qui est très souvent occulté et qui peut provoquer un stress oxydant à très faibles doses.

Cette thèse est constituée de cinq chapitres :

- ✓ Le premier est une **étude bibliographique** qui consiste en une synthèse des connaissances sur les pesticides, les fongicides, les métaux lourds et leurs propriétés, leurs voies d'absorptions, leurs toxicité, leurs métabolisme ainsi que leurs mécanismes d'actions.
- ✓ Dans le deuxième chapitre, nous abordons l'aspect expérimental en présentant les **matériels chimiques et biologique** étudiés, ainsi que le protocole expérimental.
- ✓ Le troisième chapitre est réservé à la présentation des **résultats de l'étude** : la première partie représente les paramètres physiologiques et leur discussion et la deuxième partie représente les paramètres biochimiques et enzymatiques avec leurs interprétations et discussions.
- ✓ Le quatrième chapitre consiste à prédire l'effet du cadmium et/ou de fongicide sur les paramètres morphophysiologiques et biochimiques d'*Helix aspersa*. **L'étude in silico** est effectuée à l'aide du modèle gris de prévision (forecasting grey model) ; suite à un historique de résultats des différents paramètres étudiés.
- ✓ Le cinquième chapitre est une **étude histopathologique** de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités par soit le cadmium seul, le fongicide seul ou le cocktail.

# **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

Tous les tests et les bio-essais de cette étude ont été réalisés au Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, du département de Biologie, Université Badji Mokhtar Annaba.

## I. Matériel chimique

Dans notre travail, nous avons utilisé deux produits chimiques appartenant à deux familles chimiques différentes : Un fongicide et un métal lourd.

### 1. Le fongicide étudié

Le fongicide choisi, utilisé sous la forme commerciale VACOMYL-PLUS® de la société VAPCO, il comprend deux matières actives ; le métalalaxyl à 15% (15g de métalaxyl dans 100 g de fongicide) et l'oxychlorure de cuivre à 35% (35 g d'oxychlorure de cuivre dans 100 g de fongicide). Il est utilisé dans le Nord-Est algérien contre le Mildiou, des arbres fruitiers, des cultures maraîchères et de la vigne. Il est sous forme de poudre mouillable : WP, de couleur bleu verdâtre.

Nous avons testé trois doses (0.5, 1 et 2 g/l) inférieures aux concentrations appliquées en culture. En effet le fongicide est appliqué à des concentrations de 250 g/hl, correspondant à 2.5 g/l. Ainsi, les concentrations choisies se rapportent à des concentrations plus faibles que celles réellement utilisées en culture.

### 2. Le cadmium

Le cadmium (Cd) est un métal blanc-bleuâtre, mou et très malléable. Il appartient à la famille des métaux de transition. Nous l'avons utilisé sous forme de dichlorure de cadmium  $\text{CdCl}_2$ . Nous avons retenu trois concentrations croissantes (200, 400 et 800  $\mu\text{g/l}$ ). Nous avons choisi des concentrations inférieures à la CE50 du cadmium (140 $\mu\text{g/g}$  PF) sur *Hélix aspersa*.

### 3. La mixture

L'objectif de ce travail est de montrer que la toxicité d'un fongicide à base d'oxychlorure de cuivre peut être exacerbée par la présence de Cadmium. A cet effet des

mixtures de notre deux xénobiotiques sont testées aux concentrations citées dans le tableau suivant (Tab 7).

**Tableau 7** : Concentrations des mixtures utilisées

	Cadmium ( $\mu\text{g/l}$ )	Fongicide (g/l)
T	0	0
M1	200	0,5
M2	400	1
M3	800	2

## II. Matériel biologique

### 1. Morphologie et anatomie d'*Helix aspersa*

L'escargot *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* O.F. Müller, 1774) sous-espèce *aspersa*, communément appelé Petit-Gris, est un mollusque gastéropode pulmoné appartenant à l'ordre des stylommatophores, famille des helicidae, sous-famille des helicinae (Beaumont et Cassier, 1998). Sa coquille, dextre, est de couleur brun-jaunâtre avec un diamètre variant de 20 à 35 mm et une hauteur de 25 à 40 mm (Fig. 10). Deux grandes parties sont distinguées : le pied et les viscères (Figure 10). Les viscères correspondent aux organes situés à l'intérieur de la coquille et comprennent le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge également dans le pied (Figure 11). Le pied comporte essentiellement la sole pédieuse, musculeuse, la partie antérieure du tube digestif et le système nerveux.



**Figure 9** : L'escargot *Helix aspersa*

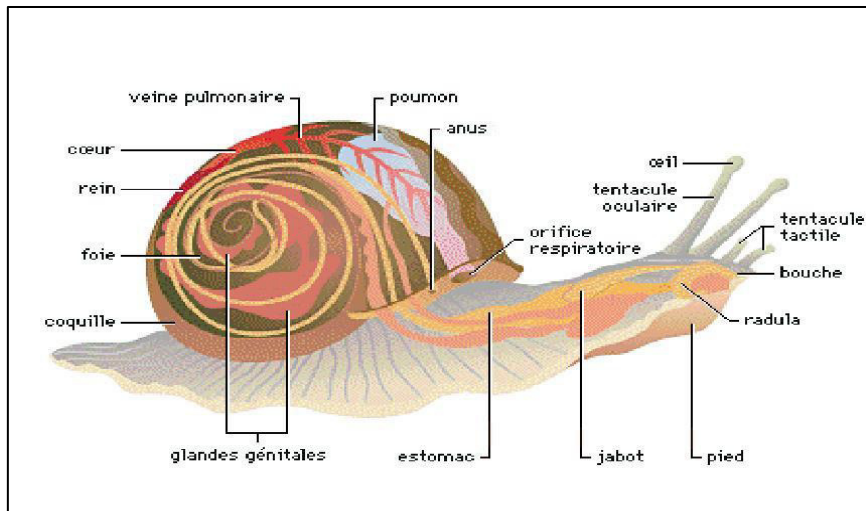


Figure 10 : Morphologie externe de l'escargot (<http://biologiefsac.skyrock.com>)

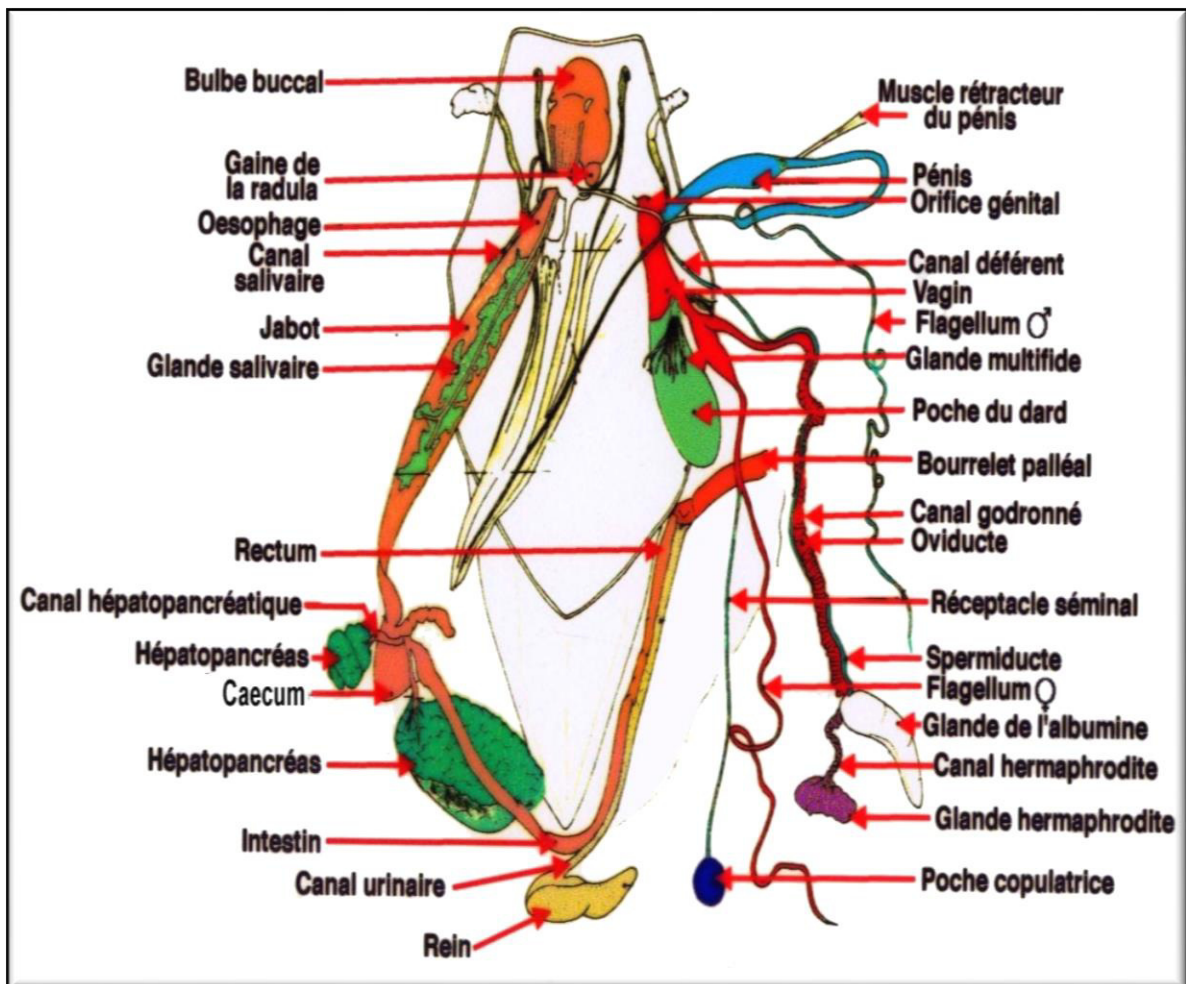


Figure 11 : Anatomie interne (appareils génital et digestif) de l'escargot *Helix aspersa* (Beaumont et Cassier, 1998).

L'escargot Petit-Gris est très répandu en Europe, en particulier dans les régions méditerranéennes et océaniques. Il colonise les milieux anthropisés et peut être considéré comme une peste dans les jardins. On le retrouve également dans les dunes, les bois, les rochers, les haies mais également dans les zones cultivées (Kerney *et al.* 2006).

Il se nourrit principalement de plantes, de lichens et de champignons. Son régime alimentaire n'est pas spécialisé et l'escargot s'adapte en fonction des plantes qui colonisent le milieu (Chevalier *et al.*, 2001). Le sol fait également partie de son alimentation et peut influencer sa croissance (Gomot *et al.*, 1989). Des sols pauvres en calcium peuvent constituer un facteur limitant à la croissance des escargots, le calcium étant un élément indispensable à la formation de la coquille (Dallinger *et al.*, 2001).

L'escargot compte de nombreux prédateurs, aussi bien des vertébrés, comme les oiseaux (grive), les petits mammifères (musaraigne, hérisson), les reptiles (lézard, couleuvre), que des invertébrés, comme les carabes, les vers luisants et les limaces (Barker 2004). L'homme le consomme également pour sa chair très appréciée, bien qu'en quantité moindre (15 tonnes de conserves en France en 2008) que l'escargot de Bourgogne *Helix pomatia* (876 tonnes de conserves en France en 2008). Le marché de l'escargot (toutes espèces comestibles confondues) est évalué à environ 2000 tonnes de conserves et 3000 tonnes de préparations culinaires à base d'escargot pour un chiffre d'affaire de l'ordre de 100 millions d'euros (<http://www.adepale.org/index.php?id=153>)

## 2. Hibernation et estivation

Le Petit-Gris est surtout actif la nuit et en période humide. Le jour ou lorsqu'il fait trop sec, il entre en estivation en se fixant contre une paroi et en obturant sa coquille d'un voile blanchâtre, l'épiphragme. A partir du mois d'octobre en Europe, l'escargot hiberne en s'enfouissant dans le sol. Sa coquille est alors obturée par un épiphragme épais. Il reprend généralement son activité au printemps quand les températures avoisinent les 12-14°C (Marasco et Murciano 2003; Kerney *et al.*, 2006).

## 3. Reproduction

La reproduction des escargots a lieu au printemps et en été. Les escargots terrestres sont hermaphrodites protandres (d'abord mâles puis femelles) et s'accouplent une ou plusieurs fois avant la ponte. Au cours de l'accouplement réciproque, ils vont échanger leurs

spermatophores qui contiennent les spermatozoïdes. La fécondation croisée est la règle générale, l'autofécondation étant extrêmement rare. Lors de l'accouplement, il se peut qu'un seul des deux escargots reçoive un spermatophore du fait que les spermatozoïdes ne soient pas encore arrivés à maturation chez l'autre escargot (Bride et Gomot, 1991). L'accouplement peut durer plus de 12h. Pour pondre, l'escargot creuse avec sa tête une cavité d'une profondeur de 2-3 cm dans le sol, et y dépose une ponte constituée d'une centaine d'œufs en moyenne. La ponte peut durer jusqu'à 36 heures. Les œufs vont ensuite se développer pendant 12-15 jours avant d'éclore. Les escargots éclos remontent ensuite en surface, ce qui peut encore prendre 4 à 5 jours (Le Calve, 1989).

#### 4. Croissance

Les jeunes éclos pèsent alors environ 25-35 mg. La croissance de l'escargot correspond à une prise de poids pouvant atteindre jusqu'à 14 g en conditions contrôlées favorables (photopériode 18 h de lumière par 24 h, 20°C et 80-90% d'humidité) et à un accroissement de la coquille en longueur, mais également en épaisseur (Gomot de Vaufleury, 2001). La croissance des escargots est caractérisée par 4 phases. Ils sont appelés « jeunes éclos » jusqu'à environ 1 g (correspondant à 1 mois), puis sont qualifiés de juvéniles jusqu'à environ 5 g et de subadultes jusqu'à 8-9 g. Lorsque les escargots atteignent la taille adulte après environ 4 mois de croissance en conditions contrôlées favorables, ils se bordent (phénomène caractérisé par le bord de la coquille qui s'incurve et par un épaississement du bord du manteau). La croissance de la coquille s'arrête alors, du moins en longueur, et les escargots, devenus adultes, terminent leur maturation sexuelle et deviennent aptes à se reproduire. En milieu naturel, la croissance est beaucoup plus longue et dure de 1 à 2 ans selon les conditions climatiques. La durée de vie en milieu naturel est en moyenne de 3-4 ans (Druart, 2012).

### III. Protocole expérimental

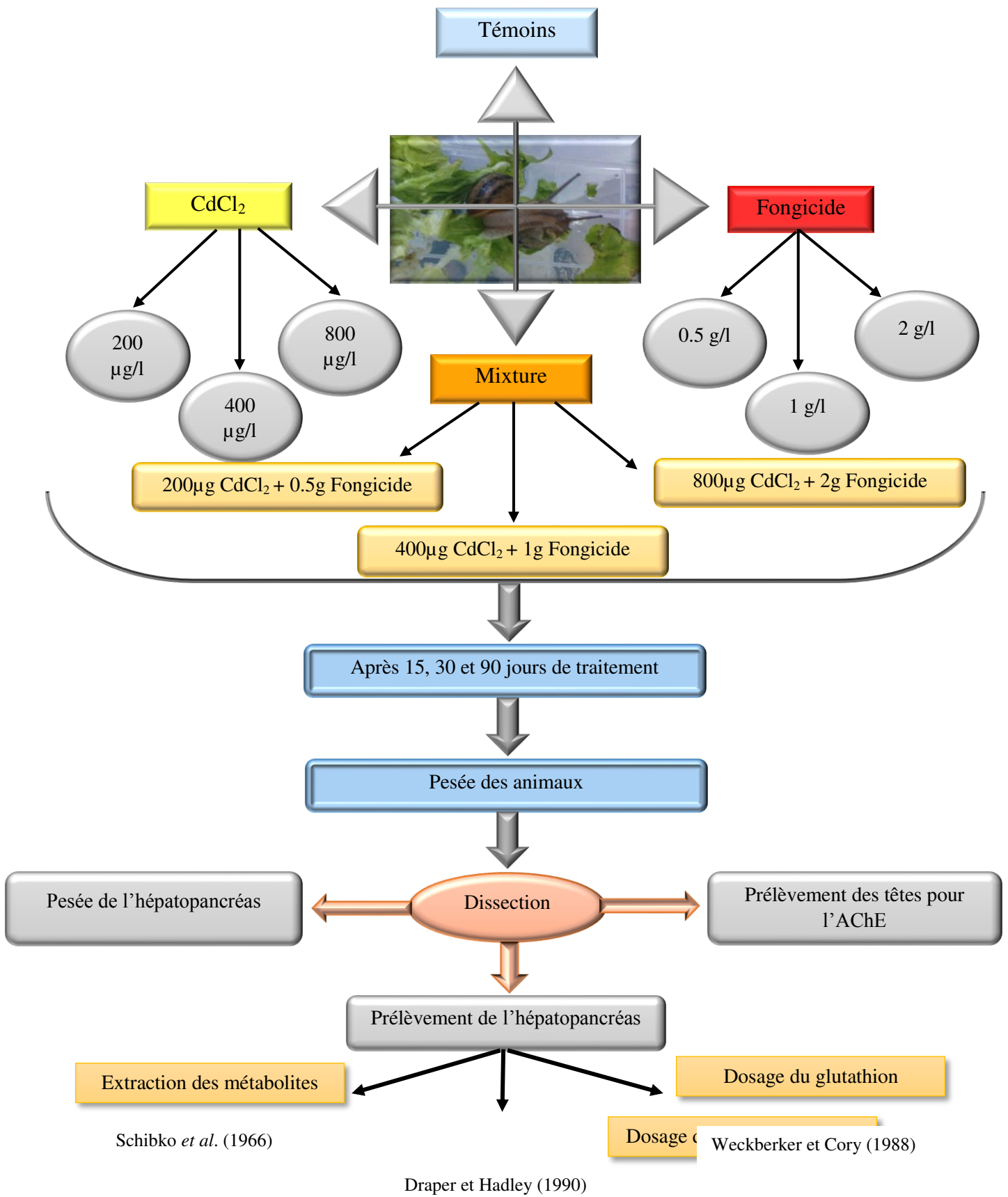
Les escargots *Helix aspersa* utilisés dans notre travail sont des sub-adultes ( $8 \pm 1$ g), collectés à partir d'un site peu pollué situé dans la région de Bouchegouf (Guelma). Les escargots sont ensuite transférés au laboratoire, où ils seront adaptés aux conditions contrôlées décrites par Gomot (1994) (température  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , photopériode 18hL/6hO, hygrométrie 80 à 90%) pendant deux semaines. Ils sont répartis dans des boîtes en polystyrène perforées ( $25 \times 13.5 \times 16.5$  cm).



Avant le début du traitement, les escargots en estivation sont remis en activité par pulvérisation d'eau distillée. Nous avons retenu 3 concentrations de chaque produit et un milieu témoin. Les escargots sont répartis en 10 lots de 12 escargots / lot.

Le traitement des animaux a été effectué en utilisant de la nourriture traitée (feuilles de laitues) par 1 ml des concentrations croissantes de cadmium (0.2, 0.4 et 0.8 $\mu$ g), de fongicide (0.5, 1 et 2mg) et de leur mixture (CdCl<sub>2</sub> + Fongicide, 1/1, V/V). Toutes les solutions à base de cadmium, de fongicide, et de leurs mixtures ont été préparées avec de l'eau distillée. Ces solutions sont renouvelées chaque semaine. La nourriture est fournie trois à quatre fois par semaine lors du nettoyage des boîtes.

Pour déterminer l'effet du cadmium, du fongicide, et de leurs mixtures l'expérience est menée durant 15 (aigüe), 30 (sub-aigüe) et 90 jours (chronique) sous des conditions contrôlées de laboratoire citées auparavant. Après chaque traitement nous avons pesé le poids de l'animal, de l'hépatopancréas (Paramètres physiologiques). Nous avons ensuite évalué les paramètres biochimiques (les protéines, lipides et glucides), les paramètres non enzymatiques (GSH et MDA) et enzymatique (AChE) (Fig. 12).



**Figure 12** : Schéma du protocole expérimental.

#### IV. Dissection des escargots et prélèvement des organes

Après chaque durée de traitement (15,30 et 90 jours), trois escargots de chaque lot choisis aléatoirement, sont sacrifiés par décapitation, et les têtes sont récupérées dans un tampon adéquat pour des analyses ultérieures. Les escargots sont disséqués et leurs hépatopancréas rapidement prélevés, pesés et divisés en 5 fragments destinés aux mesures des biomarqueurs biochimiques.

#### V. Méthodes

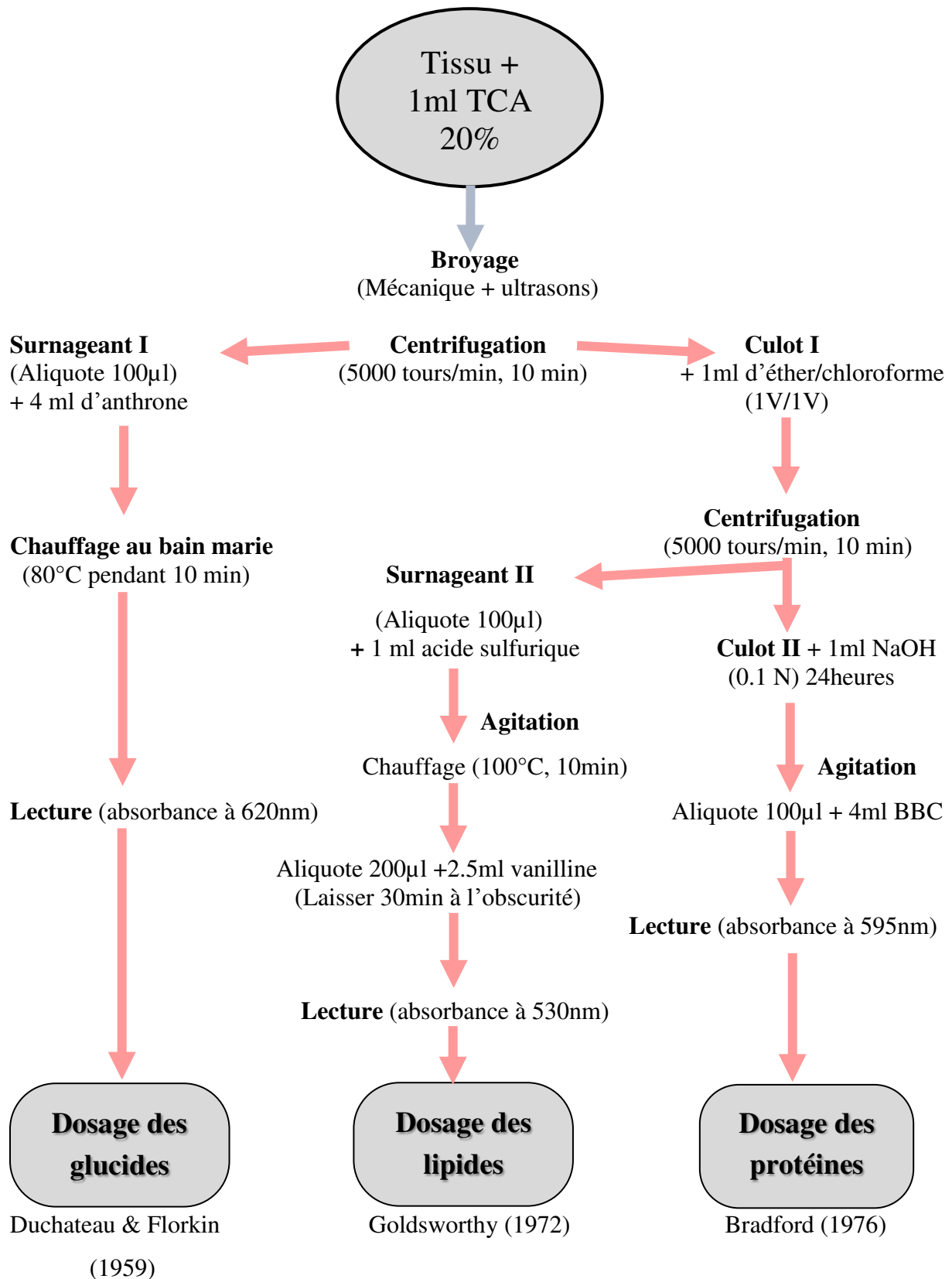
##### 1. Dosage des métabolites

L'extraction des différents métabolites (protéines, lipides et glucides) a été réalisée selon la méthode de Schibko *et al.* (1966). Après dissection, un fragment de l'hépatopancréas est pesé et conservé dans 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20 %. Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes de 100 µl et les taux des différents métabolites de l'hépatopancréas ont été quantifiés grâce aux équations des droites de régression déterminées à partir des courbes de références. Tous les dosages sont exprimés en µg/mg de tissu analysé.

La teneur en protéines totales de l'hépatopancréas a été quantifiée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de coomassie (100 mg de BBC + 50 mL d'éthanol. Agitation pendant deux heures + 100 mL d'acide orthophosphorique + H<sub>2</sub>O distillée : 1000 mL) comme réactif et l'albumine de sérum de boeuf (annexe 1a) comme standard. La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre visible (JENWAY 6300).

Le dosage des glucides totaux de de l'hépatopancréas est réalisé selon Duchateau & Florkin (1959). Cette méthode utilise l'antrone (annexe 1b) comme réactif et une solution mère de glucose (1g/L) comme standard (annexe 1b). La lecture des absorbances est réalisée à 620 nm.

Le dosage des lipides de la glande digestive est effectué selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972) utilisant la vanilline comme réactif et une solution mère de lipides comme standard (annexe 1c). Les absorbances sont obtenues, après 30 mn d'obscurité, à une longueur d'onde de 530 nm.



**Figure 18** : Principales étapes d'extraction des métabolites "protéines, lipides et glucides" (Shibko *et al.*, 1966).

## 2. Dosage des indicateurs de stress oxydant

### 2.1. Dosage du glutathion (GSH)

Le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, cystéine et de glucine. Le GSH est requis pour l'activité de plusieurs enzymes, il participe avec le glutathion réductase à l'établissement de ponts désulfures dans de nombreuses protéines et dans des hormones polypeptidiques et prend part au métabolisme des xénobiotiques. Il est aussi un substrat des glutathions peroxydases sélénodépendantes (GPx), et avoir présent dans la majorité des tissus. Il est intéressant de noter que le GSH peut chélater les ions  $\text{Cu}^+$  et ainsi limiter leur participation à la génération de radicaux libres par la réaction de Fenton (Hanna et Mason, 1992).

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 $\mu\text{l}$  du surnageant sont remplacés par 500 $\mu\text{l}$  d'eau distillée. Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

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

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

$\Delta Do$  : Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

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

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

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

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

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

## 2.2. Dosage de malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde MDA, "messager toxique secondaire" responsable de la cytotoxicité liée à la lipoperoxydation, est le représentant le plus réactif et le plus abondant des aldéhydes produits *in vivo* par la décomposition des hydroperoxydes lipidiques par les FAO (Cossu *et al.*, 1997). Il représente un marqueur important de la lipoperoxydation membranaire qui est un des premiers mécanismes d'atteinte cellulaire par les polluants (Ribera *et al.*, 1991; Klobucar *et al.*, 1997).

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

$$X = \frac{\Delta Do}{156} \times \frac{V_t}{V_s} \text{ / mg de protéines}$$

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

$\Delta Do$  : Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

156 : Coefficient d'extinction molaire du TBA.

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

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

## 2.3. Dosage de l'activité acétylcholine Estérase (AChE)

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).

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

$$X = \frac{\delta \text{ DO} / \text{min}}{1,36 \times 10^4} \times \frac{V_t}{V_h} \text{ / mg de protéines}$$

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

$\delta \text{ Do}$  : 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.

$V_t$  : Volume total de la cuve : 1,3 ml.

$V_s$  : Volume du surnageant de la cuve : 0,1 ml.

### 3. Histologie

#### 1. Préparation des échantillons

A la fin de chaque période de traitement (15, 30 et 90 jours), un individu choisi au hasard de chaque lot (témoins et traités), est décoquillé puis disséqué afin de prélever l'organe sur lequel va être réalisée une analyse histologique. Dans cette étude, des coupes histologiques ont été réalisées sur les hépatopancréas des escargots exposés en laboratoire au fongicide, au cadmium et aux mixtures cadmium + fongicide.

#### 2. Méthodes

Nous avons réalisé des coupes histologiques sur des fragments de l'hépatopancréas au laboratoire d'Anatomo-Pathologie de l'hôpital Ibn Rochd (Annaba).

Les échantillons sont fixés préalablement dans du formol à 10%, ensuite sont rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée. Puis déshydratés dans des bains d'alcool à degré

croissant (30 minutes dans un bain d'alcool à 70°, deux bains successifs de 15 minutes dans de l'alcool à 95° puis trois bains de 30 minutes dans de l'alcool à 100°).

Après déshydratation, l'alcool est remplacé par du toluène (trois bains de 15 minutes chacun) afin d'imprégner les échantillons par le solvant de la paraffine. Après 24 heures, les échantillons sont inclus dans la paraffine à l'aide de moules (barres de Leuckart) : après refroidissement, on se trouve donc en présence de blocs de paraffine durs, à l'intérieur desquels se trouvent les échantillons inclus et orientés selon le plan de coupe choisi.

Les coupes des blocs de paraffine (2µm) sont réalisées à l'aide d'un microtome Anglia scientific, étalées avec l'eau gélatinée et séchées à l'étuve (37 °C) pendant au moins 48 h. Les coupes sont par la suite déparaffinées avant d'être colorées à l'hématoxyline-éosine (hématoxyline 1 g, iodate de sodium 0,2 g, chloral hydraté 150 g) qui permet une coloration différentielle.

Après déshydratation dans les bains suivants : éthanol 95°, éthanol à 100° et enfin du xylène pur. Les lames colorées sont montées entre lames et lamelles avec une résine synthétique, le baume de Canada. (Martoja et Martoja, 1967).

\*Les observations des coupes sont effectuées avec un microscope MOTIC BA 400.

## **VI. Analyse statistique des résultats**

A la fin de chaque durée de traitement, les résultats obtenus de tous les paramètres sont comparés avec ceux du témoin en utilisant le test 't' de Student, suivi par l'analyse de la variance (ANOVA) à deux critères de classification. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 14.0 (Dagnelie, 1999). Pour chaque traitement, chaque paramètre est exprimé en moyennes  $\pm$  déviation standard (DS).



**Chapitre 3 :**

**Résultats**

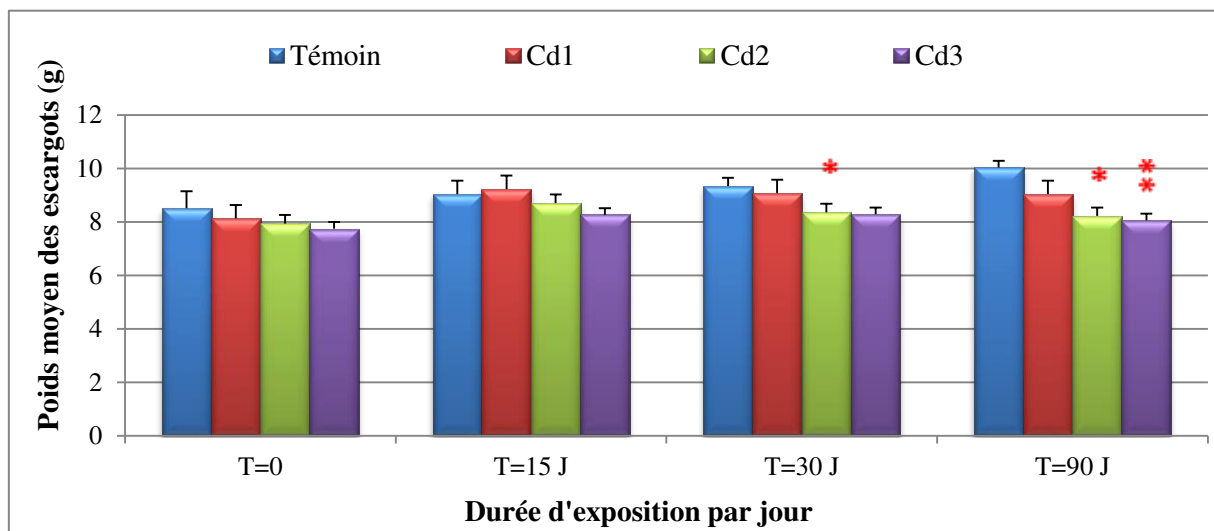
## 1<sup>ère</sup> Partie : Effet du cadmium et/ou de fongicide sur les paramètres morphophysiologiques d'*Helix aspersa*

### I. Evolution du poids moyen d'*Helix aspersa*

Les figures 14,15 et 16 représentent l'évolution du poids frais moyen des escargots sous l'effet du cadmium, du fongicide et des mixtures durant 90 jours de traitement. Nous constatons qu'après cette période, le poids moyen frais tend à diminuer d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) avec l'augmentation de la concentration du cadmium, du fongicide et de leurs mixtures par rapport aux escargots témoins.

Par contre, nous remarquons une augmentation du poids moyen des escargots traités par la plus faible concentration du cadmium ( $0.2 \mu\text{g}$ ) durant les deux premières semaines de traitement. A partir de la quatrième semaine de traitement, il y'a une diminution dose-dépendante et significative du poids à la dose 2 ( $0.4 \mu\text{g}$ ) par rapport aux escargots témoins.

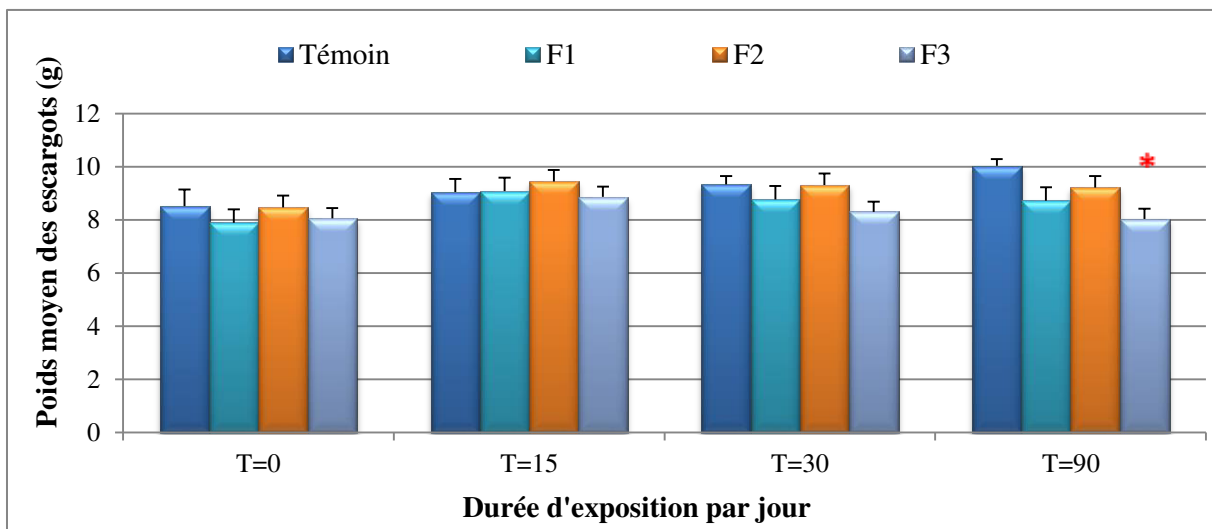
L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) pour les trois concentrations du cadmium.



**Figure 14 :** Effet du cadmium sur le poids moyen d'*Helix aspersa* pendant 90 jours de traitement ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

D'un autre côté, le poids frais moyen des escargots traités au fongicide seul (Fig. 15) a tendance à augmenter sous l'effet des trois concentrations après 15 jours traitement. Par contre, après 90 jours une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) touche également les escargots traités par la plus forte concentration (2 mg) par rapport aux témoins.

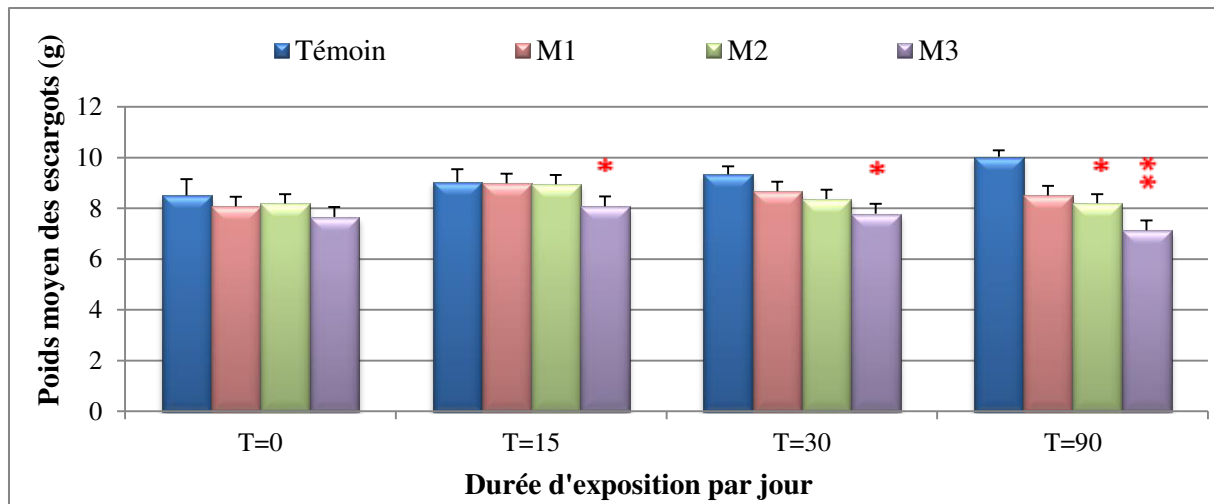
L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) seulement pour la plus forte concentration de fongicide (2 mg).



**Figure 15 :** Effet du fongicide sur le poids moyen d'*Helix aspersa* pendant 90 jours de traitement. ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

Enfin, le poids frais moyen des escargots traités au cocktail cadmium/fongicide diminue significativement après 15 et 30 jours de traitement. Cette diminution est dose dépendante et hautement significative à la concentration M3 (800  $\mu\text{g/l}$  + 2g/l) après 90 jours de traitement par rapport aux témoins.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) pour la plus forte dose de la mixture M3 et hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) pour la plus faible concentration M1.

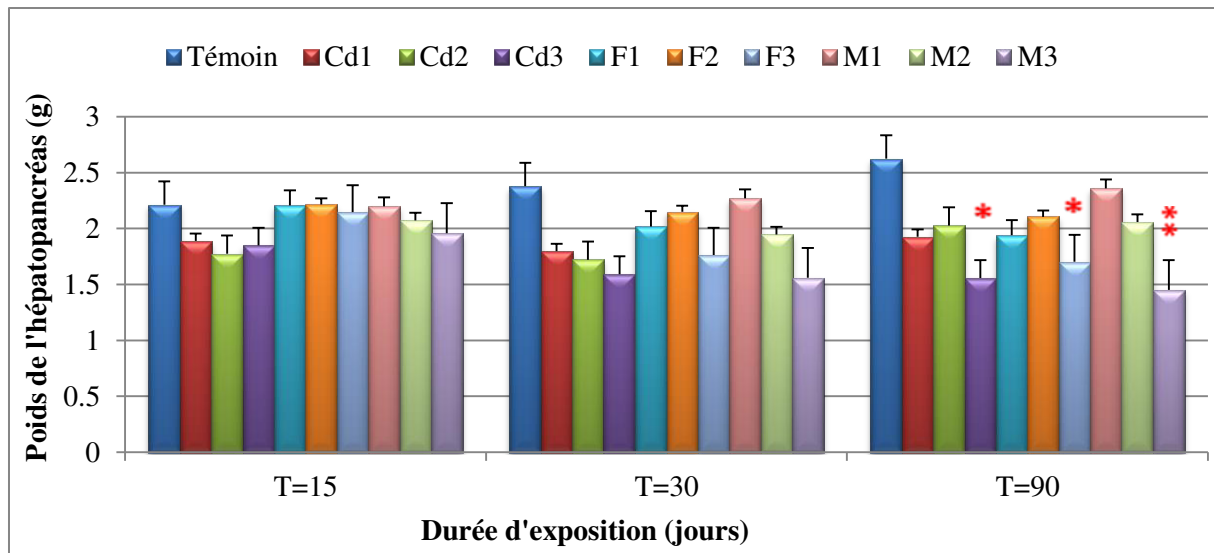


**Figure 16 :** Effet du cocktail cadmium/fongicide sur le poids moyen d'*Helix aspersa* durant 90 jours de traitement ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

## II. Evolution du poids moyen de l'hépatopancréas

La Figure (17) met en évidence l'évolution du poids moyen de l'hépatopancréas des escargots témoins et traités par des concentrations croissantes de cadmium, de fongicide et de leurs mixtures en fonction du temps. Une diminution dose-dépendante est notée pour les trois traitements après 15 et 30 jours. Cette diminution devient significative ( $p \leq 0.05$ ) chez les traités par la plus forte concentration du cadmium et de fongicide, et hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) pour la mixture M3 (800  $\mu\text{g/l}$  + 2g/l), par rapport à celui des escargots témoins.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) pour toute les doses testées du cadmium et pour la concentration M2 de la mixture.



**Figure 17 :** Effet du cadmium, de fongicide et de leurs mixtures sur le poids de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* durant 90 jours de traitement ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

### III. Discussion

Les mollusques gastéropodes sont connus par leur grande capacité d'accumulation des métaux lourds les plus fréquents, à savoir le Cu, le Pb, le Zn, le Cd et l'Al, cette propriété a été mise à profit pour utiliser les escargots comme bio indicateurs de pollution par les métaux lourds (Beeby et Richmond, 2002 ; Viard et al., 2004 ; Notten et al., 2005).

C'est pourquoi notre choix s'est porté sur ce modèle biologique et plus précisément sa glande digestive ou hépatopancréas qui est connue pour être le siège principal de métabolisation et/ ou de séquestration des métaux lourds (Dallinger et al., 1993).

Dans cette étude nous nous sommes intéressés en premier temps à l'effet du cadmium et/ou de fongicide sur l'évolution du poids des escargots. En effet la modification du comportement ainsi que la diminution des taux de survie, de croissance et de reproduction peut conduire à une modification de la dynamique d'une population, voir la disparition de l'espèce dans l'habitat pollué (Caswell, 2001). Ainsi dans notre travail, l'exposition des escargots par ingestion à des concentrations croissantes du cadmium, de fongicide ou de leurs mixtures a mis en évidence une diminution de leur masse corporelle. Selon Hames et Hopkin, (1989) ceci pourrait être dû à la variation des sécrétions d'enzymes digestives. Par ailleurs Simkiss et Watkins (1991), Hopkin et al (1995), Bibic et al (1997), Swaileh et Ezzughayyar

(2000) et Swaileh *et al.* (2002) stipulent que dans un environnement pollué, la répulsion de la nourriture entraîne un jeûne forcé des escargots qui entrent alors en estivation pour éviter la nourriture souillée, hypothèse confirmée par Notton *et al.* (2006) ou encore Gimbert *et al.* (2008) sur la croissance des juvéniles d'*Helix aspersa*. D'autre part, cette inhibition de croissance peut être due, comme décrite par Bonnard (2010), à la mise en place des systèmes de défense et de réparation des dommages à l'ADN, représentant un coût énergétique pour l'organisme. Ce coût énergétique de la pollution est désigné sous le terme de coût de la tolérance.

Cette capacité des escargots de détecter de fortes concentrations en métaux dans leur source de nourriture a déjà été montrée par Swaileh et Ezzughayyar (2000), chez *Helix engaddensis*, que si pendant quatre semaines, les escargots réduisaient ou refusaient totalement de se nourrir avec une nourriture contaminée en cuivre et cadmium, dès qu'ils disposaient de nourriture saine la cinquième et la sixième semaine, les escargots intoxiqués au cadmium continuaient de refuser la nourriture. Mais à l'opposé, les escargots intoxiqués au cuivre ont tout de suite recommencé à se nourrir normalement et ont rattrapé leur poids normal. Il apparaît donc évident que, selon le contaminant considéré, le refus de se nourrir provient d'un phénomène soit de toxicité soit de répulsion (Swaileh et Ezzughayyar, 2001).

Dans le même ordre d'idées ces résultats sont en accord avec les travaux de Laskowski et Hopkin., (1995 a) et Grara, (2011) qui ont travaillé sur la toxicité des métaux lourds sur *Helix aspersa*. Dans le même ordre d'idées Bouaricha, (2013) a étudié la toxicité du biopesticide l'Emamectine benzoate sur les escargots *Helix aspersa*, et a également mis en évidence une diminution du poids frais des escargots ou encore Bourbia, (2013) et Belhaouchet, (2014) sur la toxicité des insecticides et tout récemment Atailia, (2017) qui a noté également un effet inhibiteur des poussières métalliques sur la croissance des escargots.

D'un second temps, nous avons choisi de suivre l'évolution du poids de la glande digestive (hépatopancréas). Nos résultats mettent en évidence une diminution du poids de cet organe chez les animaux traités par le cadmium et le fongicide seul et plus significative pour la mixture. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Gomot-de Vaufleury et Kerhoas, (2000) qui ont trouvé qu'à l'échelle de l'organe, des concentrations de 200 µg Cadmium provoquent une inhibition importante du développement du tractus génital chez *H. aspersa*. Même chez les mammifères, la présence de métaux serait à l'origine d'une diminution du poids des organes mous (foie et rein) notamment chez le lapin (Tadjine, 2007),

et Grara, (2011) qui a mis en évidence une diminution du poids du rein et de l'hépatopancréase chez les escargots *Helix aspersa* contaminés par des métaux lourds ou encore ceux de Belhaouchet, (2014) qui a mis en évidence une diminution du poids de ces organes après traitement par de fortes concentrations de Spinosad. Ces résultats confirment l'importance du suivi des paramètres physiologiques dans l'évaluation de la contamination d'un milieu.

#### **IV. Conclusion**

En conclusion, ces perturbations du poids corporel et de la glande digestive est due éventuellement à la contamination digestive par le cadmium et/ou le fongicide. De plus, ces perturbations sont beaucoup plus marquées chez les escargots traités par le mélange Cd/fongicide. D'autre part, cette inhibition de croissance peut être due à la capacité des escargots de détecter la nourriture souillée donc ils réduisent de se nourrir mais aussi à la mise en place des systèmes de défense et de réparation des dommages à l'ADN, représentant un coût énergétique pour l'organisme.

Afin de mieux étayer nos résultats, et mieux évaluer l'impact de ces polluants sur cette espèce, il semble intéressant d'essayer de caractériser les perturbations des organismes par des approches biochimiques à travers le suivi des paramètres biochimiques et des biomarqueurs de stress oxydant.

## **2<sup>ème</sup> Partie : Effet du cadmium et/ou de fongicide sur les paramètres biochimiques de l'hépatopancréas et les indicateurs de stress oxydant d'*Helix aspersa***

### **I. Objectif de l'étude**

Une fois libérés dans l'environnement, les ETM sont soumis à des processus de transport et de dispersion complexes à l'intérieur et entre les différents compartiments de la biosphère. L'exposition dépend donc à la fois de la composition physico-chimique du milieu et de la biologie de l'organisme considéré (Gimbert, 2006). Les organismes vivants tels que l'escargot *Helix aspersa* ont, potentiellement, plusieurs voies d'absorption (digestive, cutanée et respiratoire) des polluants, dépendant principalement de l'écologie de l'organisme considéré.

Les escargots peuvent mettre en place des systèmes de défense qui leur permettent de tolérer le stress chimique engendré par les polluants bioaccumulés (Amiard-Triquet *et al.*, 2008). La réponse de ces organismes à la pollution des sols peut être mesurée à l'aide de biomarqueurs telles que l'inhibition, l'induction d'enzymes comme par exemple : l'induction de dommages moléculaires, cellulaires.... (Coourdassier *et al.*, 2001; Ismert *et al.*, 2002; Regoli *et al.*, 2006).

Un biomarqueurs peut être défini comme un paramètre moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental dont les changements, observables et/ou mesurables, révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère toxique" (Lagadic *et al.*, 1997). Les biomarqueurs constituent des indicateurs qui répondent de façon précoce et sensible à un dysfonctionnement et leur utilisation rend compte de la biodisponibilité des polluants et des effets qu'ils engendrent sur les organismes et les populations (McCarthy et Shugart, 1990).

Pour évaluer les effets de cadmium, de fongicide, et de leurs mixtures chez le gastéropode *Helix aspersa*, nous avons concentré notre étude sur certains paramètres biochimiques tels que les teneurs en métabolites (protéines, lipides et glucides), et des



biomarqueurs de stress oxydatif l'acétylcholinestérase, le malondialdéhyde et le taux de glutathion hépatopancréatique.

## II. Résultats

### 1. Effets du cadmium et/ou de fongicide sur les paramètres biochimiques de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*

#### 1.1. Effet sur le taux des protéines totales

##### 1.1.1. Effet du cadmium

Le tableau 8 illustre l'effet du cadmium sur le contenu des protéines totales de l'hépatopancréas d'escargots témoins et traités à différentes doses pendant 15, 30 et 90 jours.

Les résultats obtenus montrent, qu'après 15 jours de traitement, le cadmium entraîne une augmentation des teneurs protéiques avec la dose 2 (400µg/l) seulement par rapport au témoin. Les traitements pendant 30 et 90 jours et aux trois doses ne montrent pas de variations notables ( $p > 0.05$ ) de ces taux.

**Tableau 8.** Evolution du taux des protéines totales (µg/mg d'hépatopancréas) chez les escargots traités par le cadmium (CdCl<sub>2</sub>) administré par ingestion ( $m \pm s$ , n= 3).

Protéines	TRAITEMENT (jours)		
	15	30	90
<b>T</b>	14,27 ± 0,41	14,76 ± 1,01	14,73 ± 0,96
<b>Cd1</b>	11,91 ± 1,73	14,55 ± 0,97	14,45 ± 0,91
<b>Cd2</b>	18,03 ± 1,97	13,45 ± 0,34	13,92 ± 0,67
<b>Cd3</b>	12,30 ± 1,18	15,81 ± 0,14	16,77 ± 0,77

##### 1.1.2. Effet de fongicide

Les effets de fongicide commercial à base d'oxychlorure de cuivre et de métalaxyl sur le contenu en protéines totales de l'hépatopancréas d'escargots témoins et traités à différentes doses pendant 15, 30 et 90 jours ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) sont présentés dans le tableau 9.

Il montre, qu'après 15 jours, le fongicide provoque une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) du taux des protéines totales avec la plus forte concentration (2mg) par rapport aux témoins. Par contre après 30 et 90 jours ce fongicide entraîne une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) pour la dose F3.

**Tableau 9.** Taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par le Fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

Protéines	TRAITEMENT (jours)		
	15	30	90
T	14,27 $\pm$ 0,41	14,76 $\pm$ 1,01	14,73 $\pm$ 0,96
F1	15,92 $\pm$ 1,62	15,14 $\pm$ 0,92	14,56 $\pm$ 0,97
F2	09,26 $\pm$ 2,18	14,93 $\pm$ 0,87	11,45 $\pm$ 0,67
F3	06,94 $\pm$ 2,87	15,51 $\pm$ 1,45	17,20 $\pm$ 0,77

### 1.1.3. Effet du cocktail cadmium/fongicide

Les effets de la mixture (cadmium + fongicide) sur le contenu des protéines totales de l'hépatopancréas d'escargots témoins et traités à différentes doses pendant 15, 30 et 90 jours est présenté dans le tableau 10. Après 15 jours, la mixture provoque une diminution significative du taux des protéines totales avec les trois concentrations (M1, M2 et M3) par rapport aux témoins. Par contre après 30 et 90 jours ce fongicide entraîne une augmentation dose dépendante et significative ( $p \leq 0.05$ ) pour la dose M3.

**Tableau 10.** Taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par la mixture ( $\text{CdCl}_2$  + Fongicide) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

Protéines	TRAITEMENT (jours)		
	15	30	90
T	14,27 $\pm$ 0,41	14,76 $\pm$ 1,01	14,73 $\pm$ 0,96
M1	06,50 $\pm$ 2,09	14,38 $\pm$ 1,50	12,49 $\pm$ 1,69

<b>M2</b>	04,82 ± 1,98	16,50 ± 1,35	13,16 ± 1,41
<b>M3</b>	06,70 ± 2,34	18,36 ± 1,63	19,70 ± 0,97

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition non significatif ( $p \geq 0.05$ ) pour toutes les doses testées du cadmium, de fongicide et de leurs mélanges.

## 1.2. Effet sur le taux des glucides totaux

### 1.2.1. Effet du cadmium

Le tableau 11 représente l'effet du cadmium sur le contenu des glucides totaux de l'hépatopancréas d'escargots témoins et traités à différentes doses pendant 15, 30 et 90 jours.

Les résultats obtenus montrent, qu'après 30 jours de traitement, le cadmium provoque une diminution hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) pour les doses Cd1 et Cd2, par rapport aux témoins.

**Tableau 11.** Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

Glucides	TRAITEMENT (jours)		
	15	30	90
<b>T</b>	2,68 ± 0,56	2,65 ± 0,10	2,64 ± 0,52
<b>Cd1</b>	1,58 ± 0,18	2,02 ± 0,01	2,12 ± 0,11
<b>Cd2</b>	3,44 ± 0,38	3,33 ± 0,11	2,88 ± 0,87
<b>Cd3</b>	1,54 ± 0,21	3,73 ± 0,33	3,73 ± 1,02

### 1.2.2. Effet de fongicide

Le tableau 12 montre l'effet du fongicide sur le contenu des glucides totaux de l'hépatopancréas d'escargots témoins et traités à différentes doses pendant 15, 30 et 90 jours.

Les résultats obtenus montrent, qu'après 30 jours de traitement, ce fongicide entraîne une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) pour la dose 2 g/l par rapport aux témoins. Cette augmentation est non significative ( $p > 0.05$ ) après 15 et 90 jours de traitement.

**Tableau 12.** Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par le fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n=3$ ).

Glucides	TRAITEMENT (jours)		
	15	30	90
<b>T</b>	$2,68 \pm 0,56$	$2,65 \pm 0,10$	$2,64 \pm 0,52$
<b>F1</b>	$3,00 \pm 0,33$	$3,23 \pm 0,99$	$3,32 \pm 0,47$
<b>F2</b>	$2,94 \pm 1,04$	$3,13 \pm 0,63$	$3,09 \pm 0,37$
<b>F3</b>	$3,73 \pm 0,48$	$4,50 \pm 0,64$	$2,24 \pm 0,42$

### 1.2.3. Effet du cocktail cadmium/fongicide

Le tableau 13 montre l'effet du cocktail (cadmium + fongicide) sur le contenu des glucides totaux de l'hépatopancréas d'escargots témoins et traités à différentes doses pendant 15, 30 et 90 jours.

Ces mixtures affectent le contenu en glucides hépatopancréatiques. En effet une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) pour les trois doses est enregistrée, après 30 jours de traitement, cette augmentation est non significative ( $p > 0.05$ ) après 15 jours de traitement. Cependant, une diminution de ce taux après 90 jours, est notée à la mixture M2 par rapport aux témoins.

**Tableau 13.** Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par la mixture ( $\text{CdCl}_2 + \text{Vacomyl-PLUS}$ ) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n=3$ ).

Glucides	TRAITEMENT (jours)		
	15	30	90
<b>T</b>	$2,68 \pm 0,56$	$2,65 \pm 0,10$	$2,64 \pm 0,52$
<b>M1</b>	$2,40 \pm 0,59$	$5,84 \pm 0,29$	$2,05 \pm 1,12$
<b>M2</b>	$4,88 \pm 0,99$	$6,11 \pm 0,35$	$1,88 \pm 0,91$
<b>M3</b>	$6,02 \pm 2,15$	$6,44 \pm 0,76$	$2,20 \pm 1,27$

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) pour toutes les doses testées du cadmium et pour la deuxième dose du fongicide (1g/l).

### 1.3. Effet sur le taux des lipides totaux

#### 1.3.1. Effet du cadmium

Le tableau 14 montre l'effet du cadmium sur le contenu des lipides totaux de l'hépatopancréas d'escargots témoins et traités à différentes doses pendant 15, 30 et 90 jours.

On note une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) de la teneur lipidique, chez les traités par la plus faible dose, après 15 jours de traitement par rapport aux témoins. Les traitements 30 et 90 jours ne montrent pas de variations significatives ( $p > 0.05$ ) de cette teneur.

**Tableau 14.** Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

Lipides	TRAITEMENT (jours)		
	15	30	90
<b>T</b>	1,46 $\pm$ 0,23	1,45 $\pm$ 0,07	1,46 $\pm$ 0,23
<b>Cd1</b>	0,95 $\pm$ 0,14	0,48 $\pm$ 0,11	1,30 $\pm$ 0,52
<b>Cd2</b>	1,74 $\pm$ 0,32	0,90 $\pm$ 0,20	3,94 $\pm$ 1,33
<b>Cd3</b>	1,77 $\pm$ 0,32	1,99 $\pm$ 0,30	1,48 $\pm$ 0,12

#### 1.3.2. Effet de fongicide

Le tableau 15 montre l'effet du fongicide sur le contenu des lipides totaux de l'hépatopancréas d'escargots témoins et traités à différentes doses pendant 15, 30 et 90 jours. Nous remarquons, qu'après 15 jours de traitement le taux des lipides totaux augmente d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) pour la dose 2 g/l. Pour les traitements 30 et 90 jours, ce fongicide entraîne une diminution non significative ( $p > 0.05$ ), par rapport aux témoins.

**Tableau 15.** Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par le fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

Lipides	TRAITEMENT (jours)		
	15	30	90
<b>T</b>	1,46 $\pm$ 0,23	1,45 $\pm$ 0,07	1,46 $\pm$ 0,23
<b>F1</b>	1,55 $\pm$ 0,27	0,61 $\pm$ 0,10	2,02 $\pm$ 0,61

<b>F2</b>	2,82 ± 0,70	1,09 ± 0,18	1,51 ± 0,06
<b>F3</b>	3,74 ± 0,33	1,08 ± 0,11	1,15 ± 0,13

### 1.3.3. Effet du cocktail cadmium/fongicide

Le tableau 16 montre l'effet du cocktail (cadmium + fongicide) sur le contenu des lipides totaux de l'hépatopancréas d'escargots témoins et traités à différentes doses pendant 15, 30 et 90 jours.

Les mixtures M1, M2 et M3 modifient le taux des lipides totaux, après 15 jours de traitement. Cependant, cette mixture entraîne une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) du taux des lipides totaux avec la dose M1, après 15 jours de traitement, par rapport aux témoins.

**Tableau 16.** Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu de l'hépatopancréas) chez les escargots traités par la mixture ( $\text{CdCl}_2$  + Fongicide) administré par ingestion ( $\mathbf{m \pm s}$ ,  $n = 3$ ).

Lipides	TRAITEMENT (jours)		
	15	30	90
<b>T</b>	1,46 ± 0,23	1,45 ± 0,07	1,46 ± 0,23
<b>M1</b>	4,19 ± 0,64	1,20 ± 0,07	0,99 ± 0,15
<b>M2</b>	2,43 ± 0,76	1,26 ± 0,25	1,30 ± 0,11
<b>M3</b>	1,85 ± 0,59	1,92 ± 0,28	1,71 ± 0,46

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) pour la plus forte dose seulement de la mixture.

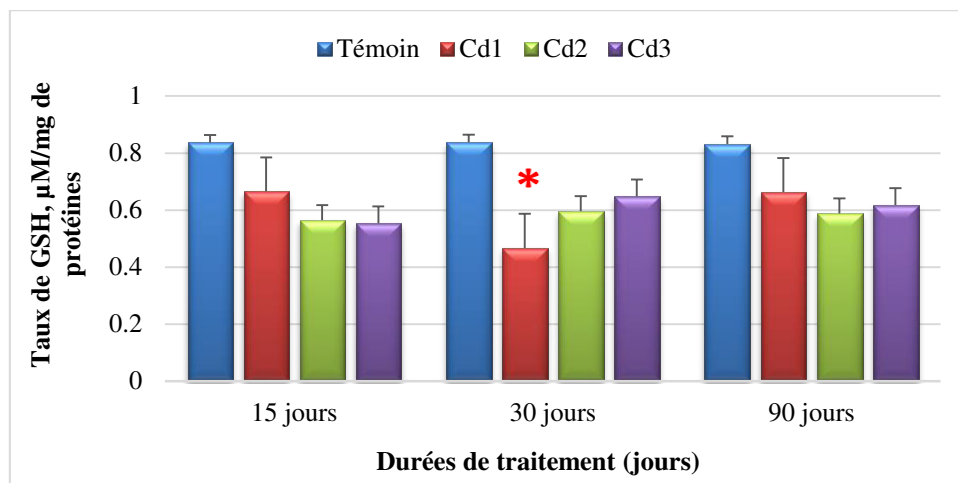
## 2. Effet du cadmium et/ou de fongicide sur les indicateurs de stress oxydant

### 2.1. Effet sur le taux de glutathion (GSH)

#### 2.1.1. Effet du cadmium

L'effet du cadmium sur le taux de GSH est présenté dans la Fig.19. Elle montre que le cadmium diminue le taux de glutathion par rapport aux escargots témoins, cette diminution est significative ( $p \leq 0.05$ ) chez les escargots traités par la plus faible dose (200  $\mu\text{g/l}$ ).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement au cadmium, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) pour la plus forte concentration (800 $\mu\text{g/l}$ ) du cadmium et hautement significatif ( $p \leq 0.01$ ) pour la deuxième concentration (400 $\mu\text{g/g}$ ).



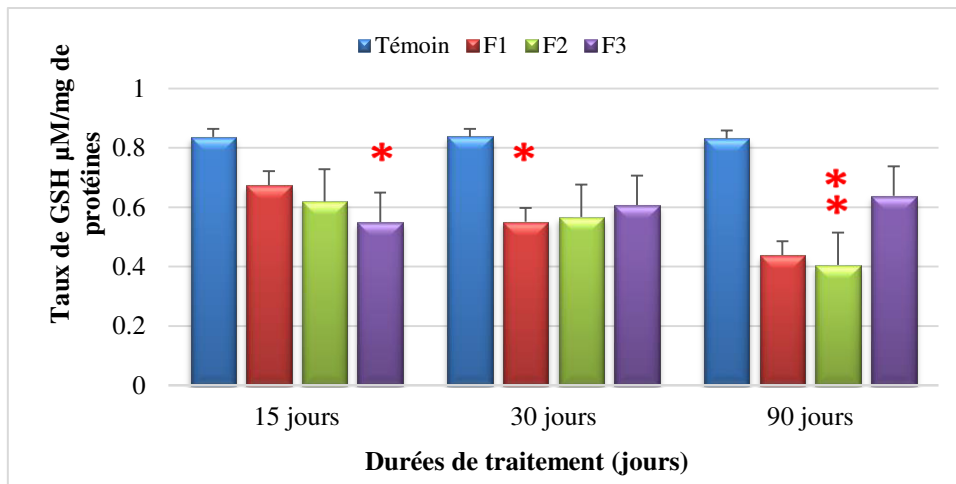
**Figure 19 :** Taux de glutathion ( $\mu\text{M/mg}$  de protéines) chez les escargots traités par le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

### 2.1.2. Effet du fongicide

L'effet du fongicide sur le taux de GSH est présenté dans la Fig.20. On remarque une diminution significative pour la plus forte dose (2g/l) à 15 jours de traitement et non significative après 30 et 90 jours de traitement par rapport aux témoins.

Une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ), chez les traités par la concentration 2g/l à 15 jours, chez les traités par la concentration 0.5g/l à 30 jours et hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) pour la dose 1g/l après 90 jours, par rapport aux témoins.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement au fongicide, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) pour les deux doses 1 et 2g/l.

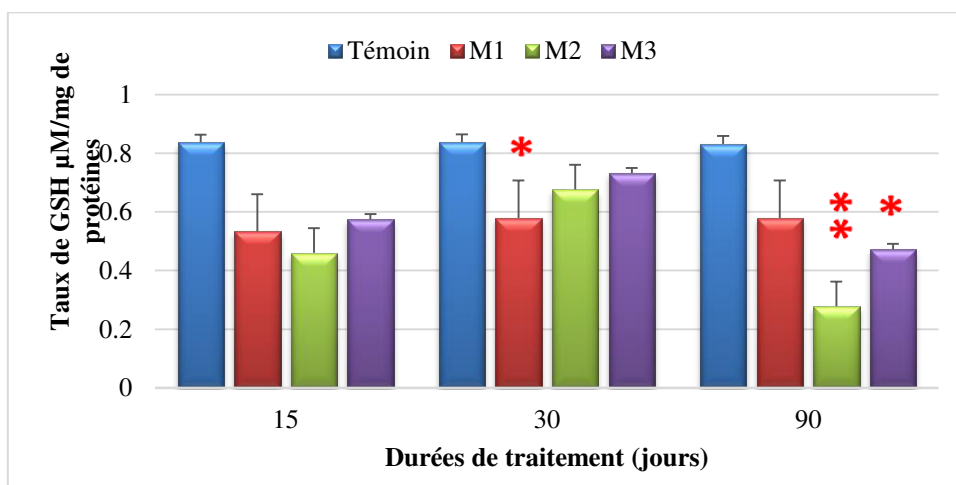


**Figure 20** : Taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les escargots traités par le fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

### 2.1.3. Effet du cocktail cadmium/fongicide

L'effet du cocktail sur le taux de GSH est présenté dans la Fig.21. Le traitement par ingestion à 15 jours diminue le taux de GSH par rapport aux témoins, après 30 jours cette diminution devient significative ( $p \leq 0.05$ ) pour la dose M1 et à 90 jours, elle est significative pour la plus forte dose et hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) pour la deuxième dose M2.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement aux mixtures, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) pour la plus faible dose de la mixture.



**Figure 21** : Taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les escargots traités par la mixture ( $\text{CdCl}_2 + \text{Vacomyl-PLUS}$ ) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

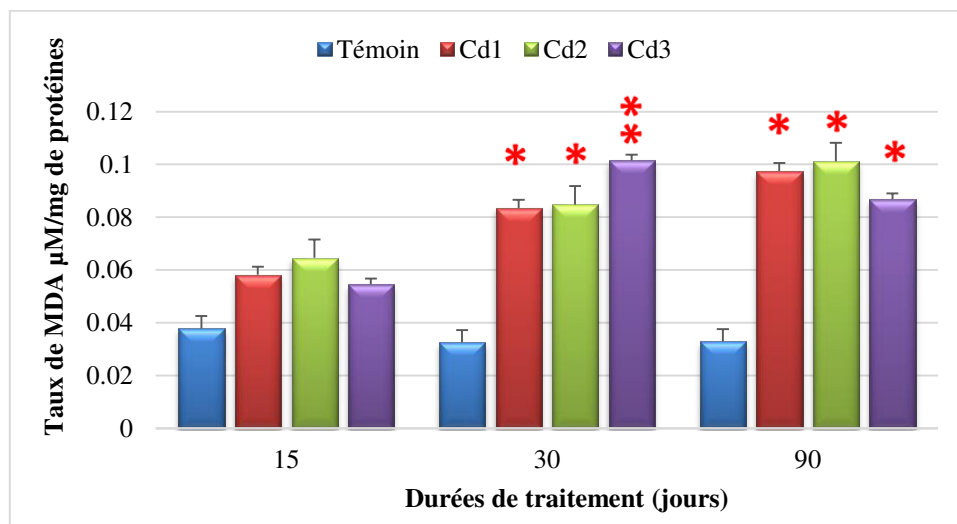


## 2.2. Effet sur le taux de malondialdéhyde (MDA)

### 2.2.1. Effet du cadmium

L'effet du cadmium sur le taux de MDA est présenté dans la Fig.22. Elle montre une augmentation du taux de MDA par rapport aux témoins à 15 jours de traitement. Les concentrations 200 et 400  $\mu\text{g/l}$  induisent une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) et hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) pour la concentration 800  $\mu\text{g/l}$  à 30 jours de traitement. Après 90 jours de traitement cette augmentation est significative ( $p \leq 0.05$ ) pour les trois concentrations (200, 400 et 800  $\mu\text{g/l}$ ).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement au cadmium, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) pour les deux doses 200 et 400  $\mu\text{g/l}$ .



**Figure 22 :** Taux de Malondialdéhyde ( $\mu\text{M/mg}$  de protéines) chez les escargots traités par le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

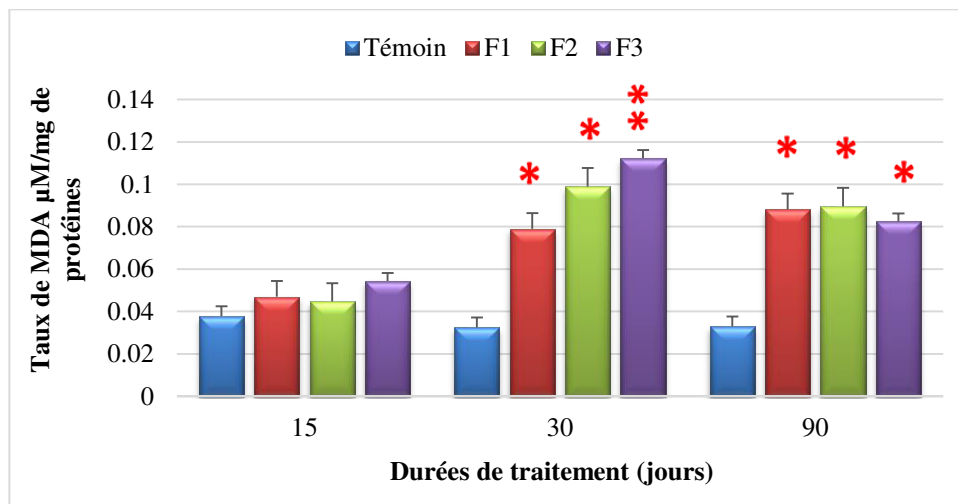
### 2.2.2. Effet de fongicide

L'effet de fongicide sur le taux de MDA est présenté dans la Fig.23. L'administration orale de ce fongicide induit une augmentation :

- non significative ( $p > 0.05$ ) du taux de MDA à 15 jours de traitement
- significative ( $p \leq 0.05$ ) pour la première et la deuxième concentration (0.5 et 1  $\text{g/l}$ ) à 30 jours de traitement
- hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) pour la plus forte concentration 2  $\text{g/l}$  à 30 jours de traitement

- significative ( $p \leq 0.05$ ) pour les concentrations 0.5, 1 et 2 g/l à 90 jours, par rapport aux escargots témoins.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement au fongicide, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition non significatif ( $p \geq 0.05$ ) pour les trois doses testées.



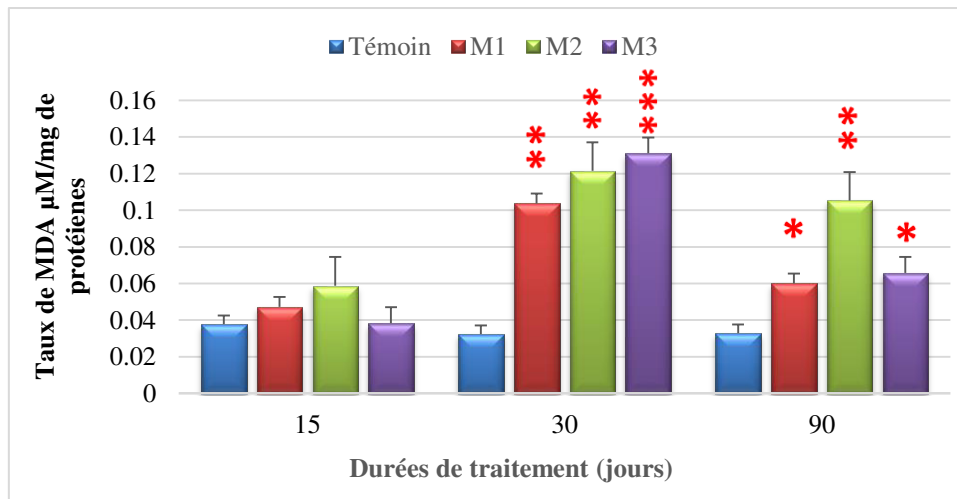
**Figure 23 :** Taux de Malondialdéhyde ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les escargots traités par le fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

### 2.2.3. Effet du cocktail cadmium/fongicide

L'effet du cocktail sur le taux de MDA est présenté dans la Fig.24. L'administration orale du cocktail induit une augmentation :

- non significative ( $p > 0.05$ ) après 15 jours de traitement chez les escargots traités par rapport aux témoins,
- hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) à 30 jours pour les concentrations M1 et M2 et après 90 jours de traitement pour la M2,
- très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez les traités par la plus forte concentration M3 à 30 jours de traitement,
- significative ( $p \leq 0.05$ ) à 90 jours de traitement pour les doses M1 et M3.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement aux mixtures, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) pour la concentration M2 de la mixture.



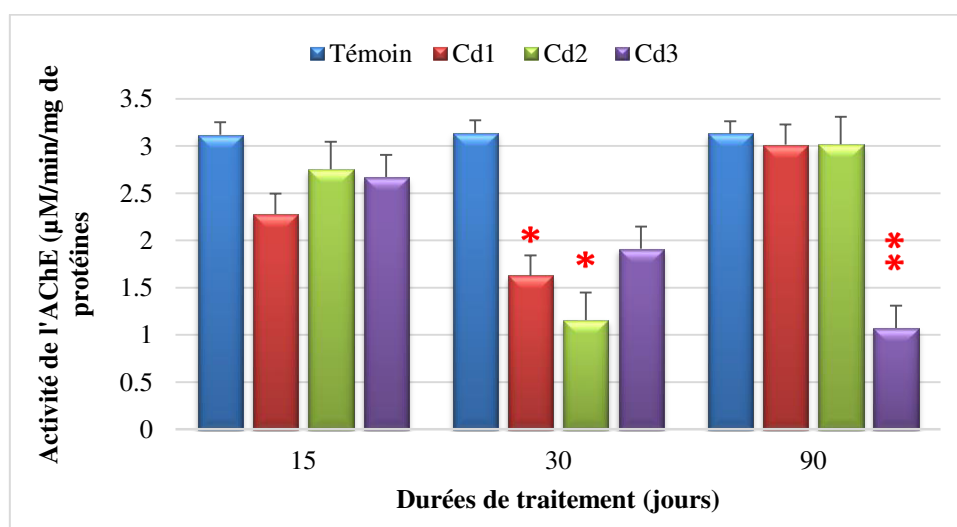
**Figure 24 :** Taux de Malondialdéhyde ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les escargots traités par la mixture ( $\text{CdCl}_2 + \text{Vacomyl-PLUS}$ ) administré par ingestion ( $m \pm s$ ,  $n=3$ ).

### 2.3.Effet sur l'activité acétylcholine Estérase

#### 2.3.1. Effet du cadmium

L'effet du cadmium sur l'activité Acétylcholine-estérase est présenté dans la Fig.25. Une diminution d'abord non significative ( $p > 0.05$ ) à 15 jours de traitement, puis significative ( $p \leq 0.05$ ) à 30 jours de traitement pour les concentrations 200 et 400  $\mu\text{g}/\text{l}$  et hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) pour la plus forte concentration (800  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) par rapport aux témoins.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement au cadmium, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition non significatif ( $p \geq 0.05$ ) pour les trois doses testées.

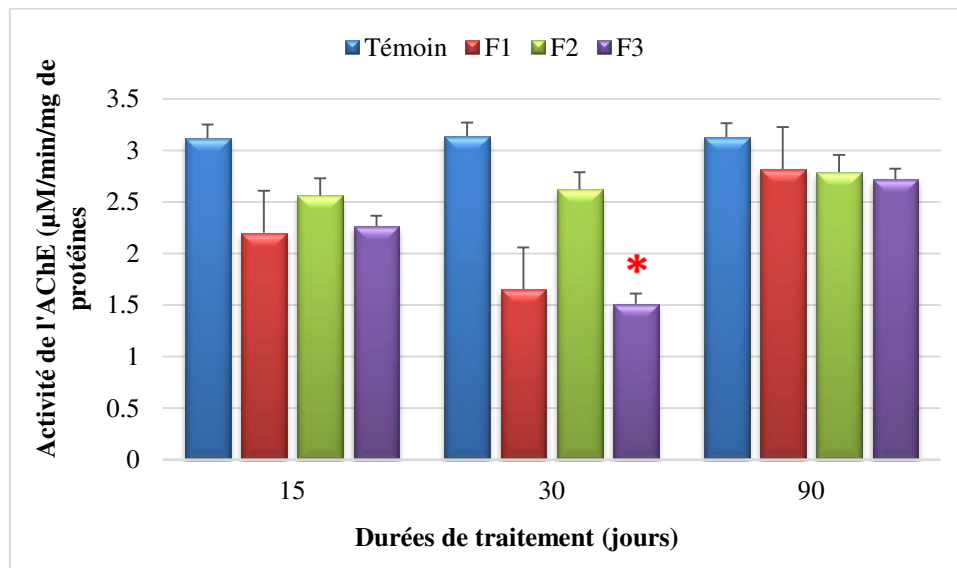


**Figure 25 :** Effet de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) administré par ingestion, sur l'activité Acétylcholine-estérase ( $\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez les escargots *Helix aspersa* ( $m \pm s$ ,  $n=3$ ).

### 2.3.2. Effet de fongicide

L'effet du fongicide sur l'activité Acétylcholine-estérase est présenté dans la Fig.26. On note une inhibition non significative ( $p > 0.05$ ) pour les trois concentrations à 15 et 90 jours de traitement par rapport aux témoins, ensuite une inhibition significative ( $p \leq 0.05$ ) chez les traités par la plus forte concentration (2 g/l) à 30 jours de traitement.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement au fongicide, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition significatif ( $p \leq 0.05$ ) seulement pour la concentration 1g/l.



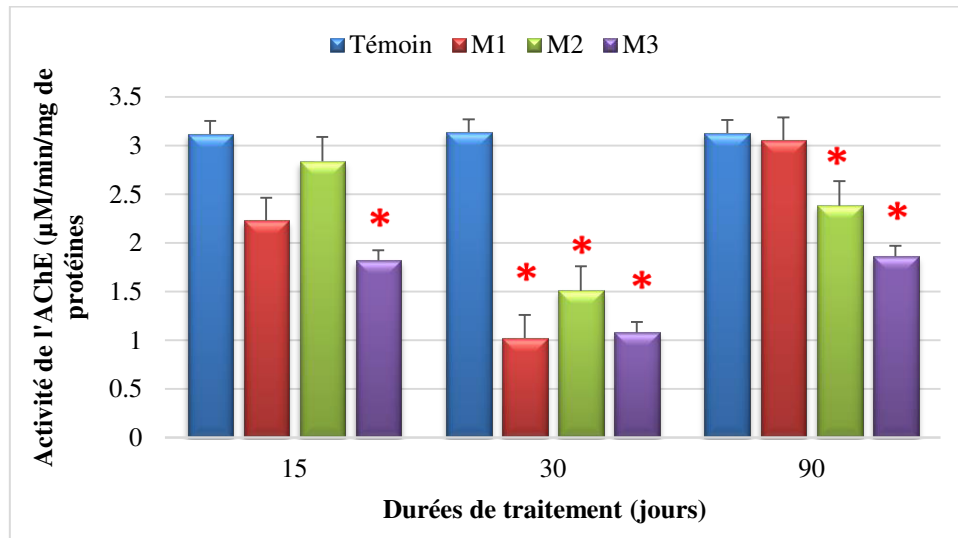
**Figure 26 :** Effet du fongicide (Vacomyl-PLUS) administré par ingestion, sur l'activité Acétylcholine-estérase ( $\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez les escargots *Helix aspersa* ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

### 2.3.3. Effet du cocktail cadmium/fongicide

L'effet du cocktail sur l'activité Acétylcholine-estérase est présenté dans la Fig.27. On remarque une diminution non significative ( $p > 0.05$ ) pour les concentrations M1 et M2 à 15 jours de traitement, et la dose M1 à 90 jours de traitement.

Cependant, une inhibition significative ( $p \leq 0.05$ ) est constatée pour les concentrations M3 de 15 jours de traitement, M1, M2 et M3 de 30 jours de traitement et M2 et M3 de 90 jours de traitement par rapport aux témoins.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement aux mixtures, de la durée d'exposition et de l'interaction traitement-durée d'exposition non significatif ( $p \geq 0.05$ ) pour les trois doses testées.



**Figure 27 :** Effet de la mixture ( $\text{CdCl}_2$  + Vacomyl-PLUS) administré par ingestion, sur l'activité Acétylcholine-estérase ( $\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez les escargots *Helix aspersa* ( $m \pm s$ ,  $n = 3$ ).

### III. Discussion

Afin d'évaluer l'impact toxicologique des polluants sur les organismes terrestres, l'utilisation des marqueurs biologiques ou biomarqueurs est indispensable. Les paramètres biochimiques et enzymatiques chez les organismes exposés aux contaminants toxiques ont été utilisés comme biomarqueurs et peuvent constituer un important outil de diagnostic pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (Forbes *et al.*, 1997; McLoughlin *et al.*, 2000).

Le taux de protéines hépatopancréatique des escargots traités par le cadmium, le fongicide et les mixtures diminue après 15 jours de traitement. Cependant, après 30 et 90 jours de traitement, la concentration en protéines augmente par rapport aux témoins. Cette augmentation est plus significative chez les traités par le cocktail cadmium/fongicide par rapport aux traités par soit le cadmium ou le fongicide seul.

Ces résultats suggèrent qu'au début de traitement (15 jours), il y'avait un stress oxydatif qui a causé une diminution du taux des protéines totales utilisées probablement pour la synthèse de biomarqueurs. En effet, cette diminution des réserves en protéines hépatopancréatiques des escargots peut être due à plusieurs mécanismes, en partie au stress résultant de l'effet de polluants étudiés, comme l'a déjà suggéré El-Wakil et Radwan (1991), d'un autre côté, elle est peut être due à la formation de lipoprotéines qui sont utilisées pour la réparation de cellules endommagées et organites tissulaires ou bien à l'utilisation directe des protéines par les cellules pour subvenir aux besoins énergétiques (Padmaja et Rao, 1994). Dans des conditions de stress, les escargots ont besoin de plus d'énergie pour détoxifier la substance toxique. Lorsque les escargots ont une quantité limitée de glucides et de lipides, la source d'énergie alternative pour répondre à la demande accrue d'énergie est les protéines (Moussard, 1999).

Nos résultats corroborent ceux d'El Gohary et Genena, (2011), Al-Fahmie, (2012) et Bourbia, (2013), qui ont mis en évidence une diminution du taux des protéines totales lors de l'exposition des escargots terrestres à des à certains polluants y compris les ETM. Dans le même contexte, Padmaja et Rao (1994) et El-Shenawy et *al.*, (2012) mentionnent un faible taux des protéines totales chez les escargots exposés aux pesticides et aux ETM.

Après 30 et 90 jours de traitement, une augmentation dose-dépendante du taux de protéines totales et plus significative pour les mixtures. Cette augmentation pourrait être liée au déclenchement du processus de détoxification mis en jeu qui englobe entre autres un important arsenal enzymatique et de molécules anti oxydantes (Nzengue, 2008).

Certaines études ont également montré une augmentation significative des protéines totales en raison du stress chimique dans divers modèles biologiques (Peccini *et al.*, 1994; Masaya *et al.*, 2002). Dans le même ordre d'idées, 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. De plus, les travaux de Grara, (2011), Bouaricha, (2013) et Belhaouchet, (2014) mettent en évidence aussi une augmentation du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas des escargots traités par des métaux lourds ou des pesticides.

Parallèlement nous avons mis en évidence une augmentation des teneurs en glucides totaux hépatopancréatiques chez les traités par le cadmium et/ou le fongicide après 15 et 30 jours de traitement, et à 90 jours nous avons noté une diminution significative ce taux. Une

augmentation du taux des glucides totaux est notée chez des escargots *Hélix aspersa* traités par des poussières métalliques (Grara et al., 2012c), il en est de même pour l'exposition de la même espèce à la mixture M4 des insecticides (Bourbia, 2013). De plus, Canesi et al., (1998) a mis en évidence une augmentation significative du taux des glucides de la moule *Mytillus galloprovincialis* en raison de l'inhibition de l'héxokinase.

En revanche, certaines études ont mis en évidence une diminution du taux des glucides totaux chez des plusieurs gastéropodes exposés à divers polluants de l'environnement, Radwan et al., (2008) a démontré que le traitement des escargots *Eobania vermiculata* par le méthomyl et le méthiocarbe provoque une diminution des glucides. Padmaja et Rao (1994) et El-Wakil et Radwan (1991) ont d'ailleurs suggérés que la diminution du taux de glycogène dans les tissus de l'escargot d'eau douce *Bellamya dissimilis* (Müller), exposé à plusieurs pesticides peut être due à l'utilisation du glycogène pour générer l'énergie nécessaire pour faire face à l'hypoxie provoquée par ces pesticides. Les carbohydrates constituent la source première et immédiate d'énergie (Moussard, 1999). Dans les conditions de stress, les réserves d'hydrates de carbone sont épuisées pour satisfaire les demandes énergétiques accrues (Arasta et al., 1996). Cette diminution est due d'après Nzengue (2008), à l'oxydation des glucides en présence des ions métalliques conduisant à la libération des aldéhydes et du peroxyde d'hydrogène.

Concernant l'effet du cadmium et/ou de fongicide sur les variations du taux des lipides totaux, nous avons mis en évidence une augmentation de ce taux dans l'hépatopancréas des escargots traités par le cadmium et la mixture, contrairement aux escargots traités par le fongicide qui ont mis en évidence de faible concentrations des lipides totaux.

Le taux de lipides peut être affecté par le mode de nutrition de l'escargot qui est herbivore dans les écosystèmes terrestres (Beeby, 1985). Selon El-Shenawy et al., (2012), les lipides augmentent de façon significative au niveau de la glande digestive de l'escargot *Eobania vermiculata* collectés à partir des zones pollués. De plus Boucenna, (2015), a mis en évidence une augmentation des lipides totaux au niveau de l'hépatopancréas lors de l'exposition des escargots *Hélix aspersa* à des particules métalliques d'origine industrielle. Par ailleurs, Bochoff et al., (2015), indiquent que les taux de lipides ne sont pas corrélés avec les concentrations d'ETM au niveau de la glande digestive de l'escargot *Cepaea nemoralis*. La diminution du taux des lipides peut être due selon Bourbia, (2013) au stress chimique causé par les mixtures des deux insecticides testés. Nos résultats vont dans le même sens que

ceux de Padjama et Rao (1994) et Boucenna, (2009) qui ont mis en évidence une diminution des lipides suite à l'exposition des escargots terrestres ou aquatiques aux divers polluants.

Ces perturbations lipidiques sont dues probablement à l'attaque radicalaire des membranes qui a pour conséquence des perturbations de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (Lawton et Donaldson, 1991). 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 peuvent être touchés : lipides, protéines et glucides et donc la membrane dans son ensemble (Radi *et al.*, 1991 ; Halliwell et Chirico, 1993), jusqu'à l'ADN et provoquant ainsi des pathologies divers (Curtin *et al.*, 2002 ; Gutteridge, 1992).

Huang et Fwu (1993) et Schilling *et al.*, (1995) stipulent que les effets spécifiques des attaques radicalaires se manifestent à l'échelle cellulaire par une peroxydation lipidique induisant des perturbations prononcées du fonctionnement cellulaire. 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). Une augmentation de la peroxydation lipidique est aussi enregistrée chez *Ruditapes decussatus* (Roméo et Gnassia-Barelli, 1997). De même, l'exposition des bivalves au cadmium a affecté l'activation des enzymes antioxydantes et augmente la peroxydation lipidique (Geret *et al.*, 2002; Khebbeb *et al.*, 2010) et le cadmium, le cuivre et le mercure ont stimulé la peroxydation des lipides dans la moule *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo *et al.*, 1990).

Le MDA est l'aldéhyde actif principal de la peroxydation des acides gras polyinsaturés des membranes (Coourdassier, 2001), c'est également un agent alkylant puissant capable de réagir avec les macromolécules biologiques. Il est utilisé comme indicateur de stress oxydatif induit par des contaminants (Pellerin-Massicote, 1997). Nos résultats ont mis en évidence, des teneurs très significatives de MDA au niveau de la glande digestive chez *Helix aspersa* traités par le cadmium et/ou le fongicide. Une induction du taux de MDA a été notée, suite à l'exposition d'autres espèces au cadmium (Cossu *et al.*, 2000; Guiguere *et al.*, 2003; Machreki-Ajmi *et al.*, 2008).

Nos résultats confirment ceux de Viarengo *et al.* (1990) qui a mis en évidence un taux élevé en MDA chez *Mytilus galloprovincialis*, traités avec des métaux lourds (cuivre) et ceux d'El-Gendy *et al.* (2009) qui ont étudié les effets d'un pesticide à base de Cuivre sur



l'escargot *Theba pisana*, et encore ceux de Amamra et al. (2015b) après une exposition des paramécies à la Cyperméthrine. 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. De plus, Otmani (2018) a mis en évidence une induction du taux de MDA chez les verres de terre *Allolobophora caliginosa* exposés au cadmium, zinc et au leur mixture.

Le système de défense antioxydant est présent dans toutes les cellules aérobie, neutralisant les réactions chimiques intermédiaires produites par voie endogène et/ou le métabolisme des xénobiotiques (Kappus, 1987; Winston, 1991). L'une des réactions majeure de la détoxification assurant la protection de l'organisme vivant dans un milieu pollué est la conjugaison avec le groupement thiol (-SH) du glutathion, un tripeptide soluble dans l'eau, appartient à la classe des petites molécules intracellulaires les plus abondantes (Meister et Anderson, 1983).

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). C'est un composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire, il est considéré comme la défense de deuxième ligne vitale contre les dommages oxydatifs qui sont les principaux capteurs non enzymatiques dans les cellules animales (Moumeni et al., 2016). 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 effets des concentrations croissantes du cadmium, de fongicide et de leurs mixtures sur *Hélix aspersa*, nos résultats montrent que le taux de GSH diminue au niveau de la glande digestive de tous les escargots traités. Plusieurs études confirment nos résultats, El Gendy et al., (2009) ont mis en évidence une diminution dose dépendante du taux de GSH au niveau de la glande chez l'escargot terrestre *theba pisana* exposé à des pesticides à base de cuivre (oxychlorure de cuivre, hydroxyde de cuivre et sulfate de cuivre), les travaux de de Salama et al., (2005), qui a testé trois pesticides, le paraquat dichlorure, le carbofuran et le

chlorpyforios) sur l'escargot terrestre *Helix aspersa*. Selon Grara. (2011) la diminution du taux de GSH serait due à l'enclenchement du processus de défense de l'organisme.

La forte réduction des teneurs en GSH peut refléter le stress oxydatif causés par le cadmium, le fongicide (à base de cuivre) et leurs mixtures et pourrait s'expliquer par une liaison directe de ces derniers avec le glutathion, en effet les groupements carboxyles du glutathion (groupe amine, groupe sulfhydryle (-GH) ainsi que deux peptides) se conjuguent avec le xénobiotique (Galaris *et al.*, 2002). Cette fixation possible de ces métaux (Cd et/ou Cu) aux groupements thiols du GSH permettrait, éventuellement, de prévenir des dommages cellulaires. Plusieurs études ont confirmé nos résultats et ont permis de mieux expliquer la relation entre la diminution de GSH et le niveau de contamination. Cela a été observé chez les moules *Crassostrea virginica* (Ringwood, 1999) et chez les bivalves *Unio limidus* exposées au cuivre (Cossu *et al.*, 2000). Une diminution du taux de GSH est notée chez *Perna viridis* (Geret *et al.*, 2002) et aussi chez *Ruditapes decussatus* (Khebbeb *et al.*, 2010) exposés au cadmium, et *Mytilus galloprovincialis* exposé au cuivre (Canesi *et al.*, 1998).

D'un autre côté, la diminution du taux de GSH peut être expliquée par l'augmentation de son utilisation par la GST dans les réactions de conjugaisons durant la phase II de la métabolisation. De plus, les études de Moumeni *et al.*, (2016), et Amamra *et al.*, (2015) ont élucidé un appauvrissement significatif de la teneur en GSH dans les paramécies exposées à l'insecticide,

Les ETM et les pesticides ont un effet neurotoxique qui se traduit par l'inhibition de l'activité acétylcholinestérase, cette enzyme ne joue aucun rôle dans la détoxification chez les vertébrés mais est impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme. Parmi les composés neurotoxiques, les insecticides organophosphorés et les carbamates sont considérés comme les plus puissants inhibiteurs spécifiques de cholinestérase. Cependant des mélanges complexes d'hydrocarbures ont été aussi cités dans la mesure de dépressions de l'AChE (Payne *et al.*, 1996). De plus, des études *in vitro* et *in vivo* menées sur des mammifères, des poissons ou des invertébrés ont relevé un effet inhibiteur de l'AChE par des métaux, incluant le Cadmium (Schmidt et Ibrahim, 1994; Labrot *et al.*, 1996 ; Grara, 2011).

L'inhibition de cette enzyme par de nombreux neurotoxiques entraîne une accumulation du médiateur chimique, l'acétylcholine (ACh), dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux, conduisant à la mort de l'individu

(Bocquené, 1997). Chez les invertébrés, le rôle des cholinestérase est moins clairement défini, bien que l'existence de motoneurones cholinergiques, ainsi que celle de récepteurs spécifiques à l'acétylcholine ait été mise en évidence chez les mollusques et les gastéropodes. L'activité AChE est utilisée comme marqueur d'exposition aux pesticides inhibiteurs chez les mollusques (Carpenter *et al.*, 1977; Weiss *et al.*, 1993).

Une inhibition de l'activité de l'AChE a été notée chez les escargots traités par le cadmium, le fongicide et leurs mixtures. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Grara *et al.*, (2012a), qui ont mis en évidence une diminution de l'activité AChE de l'ordre de 96%, selon Boucenna, (2016) cette activité est de l'ordre de 25% après exposition des *Helix aspersa* à des concentrations croissantes de poussières métalliques, il en est de même après traitement au spinosad (Belhaouchet, 2014), au Emamectine benzoate (Bouaricha, 2013), au thiaméthoxam, au téfluthrine et aux leurs mixtures (Bourbia, 2013). L'inhibition de l'acétylcholinestérase conduit à l'accumulation d'acétylcholine (ACh) au niveau des synapses cholinergiques à des niveaux toxiques conduisant à une sur-stimulation des récepteurs muscariniques et nicotiniqes. Ce "syndrome cholinergique» comprend les signes et symptômes tels que des troubles du comportement chez les escargots accompagné d'une inhibition de leurs croissance. (Bouaricha., 2013)

Dans le même ordre d'idée, les travaux de Soltani *et al.*, (2012), Bensouda et Soltani-Mazouni, (2014), Mebarki *et al.*, (2015) sur *Donax trunculus* de de la côte d'Annaba et sur *Liza aurata* (Bouzenda *et al.*, 2017) qui ont mis en évidence une inhibition de l'activité AChE du site Sidi Salem considéré comme pollué des métaux lourds comparé à d'autre site moins pollué. Aussi, une réduction de cette activité est notée chez les palourdes *Ruditapes philippinarum* exposés à des polluants neurotoxiques présents dans les eaux de drainage des zones agricoles (Matozzo *et al.*, 2012) et chez *Donax trunculus* provenant d'un site multi-contaminé par les activités agricoles et industrielles intensives par rapport au site de référence dans le golfe de Tunis (Tlili *et al.*, 2013).

#### IV. Conclusion

Dans les recherches écotoxicologiques les effets des mixtures de deux ou plusieurs polluants de l'environnement sont souvent négligé. Cette étude se concentre principalement sur les effets des mixtures de deux ou plusieurs polluants simultanément (cadmium et/ou de fongicide), comme déjà annoncé l'objectif principal de notre étude est d'attirer l'attention sur

l'effet cocktail, qui est très souvent occulté et qui peut provoquer un stress oxydant à très faibles doses.

D'un autre côté, la plupart des tests de toxicité actuels reposent sur des durées d'exposition courtes : de 24 à 96 heures pour les tests de toxicité aiguë (Atailia, 2017), généralement 28 jours pour les tests de toxicité sub-chronique. (Gimbert, 2006). A cet effet, nous avons choisi d'évaluer la toxicité de cadmium et/ou de fongicide (Vacomyl-PLUS) sur l'escargot *Hélix aspersa* durant 15 (toxicité aiguë), 30 (toxicité sub-aiguë) et 90 jours (toxicité chronique), dans le but d'obtenir la relation entre la durée d'exposition aux xénobiotiques et la réponse de ces organismes bioindicateurs.

En conclusion, nous avons mis en évidence une perturbation globale du métabolisme d'*Hélix aspersa* à travers :

- Diminution du taux des protéines totales chez tous les traités à 15 jours de traitement, et augmentation de ce taux à 30 et 90 jours ;
- Augmentation du taux des glucides totaux chez les traités par le cadmium et/ou le fongicide après 15 et 30 jours de traitement, et diminution de ce taux à 90 jours ;
- Augmentation du taux des lipides totaux dans l'hépatopancréas des escargots traités par le cadmium et la mixture après 15, 30 et 90 jours, et diminution de ce taux aux escargots traités par le fongicide à 30 et 90 jours.

Dans notre travail, lorsque le cadmium est combiné avec un fongicide à base de cuivre, nos résultats révèlent :

- Diminution du taux de GSH, **similaire** à celle de cadmium seul et le fongicide seul après 15 et 30 jours de traitement, et **synergique** à la M2 après 90 jours ;
- Induction du taux de MDA, **similaire** à celle des deux polluants à 15 et 30 jours d'exposition, et **antagoniste** à 90 jours pour les M1 et M3 ;
- Inhibition significative de l'activité AChE aux M2 et M3, **synergiques** à la M2 et **antagoniste** à la M3 après 90 jours de traitement.

Afin de mieux comprendre les effets de ces xénobiotiques et leur mode d'action, une étude *in silico* s'avère complémentaire, elle consiste à prédire l'effet à long terme du cadmium et/ou de fongicide sur quelques paramètres morphophysiologiques et biochimiques d'*Hélix aspersa*.



**Chapitre 4 :**  
***Etude in silico***

## I. Introduction

Comment prédire ce qui peut se passer plusieurs mois après une exposition, voire quelques années plus tard ? Il n'y a ni modèle *in vitro*, ni modèle *in vivo* possibles dans une approche prédictive. À l'évidence, il n'y a pas de réponse unique à cette question. La compréhension des mécanismes de toxicité à long terme, qui reste très parcellaire aujourd'hui, est sans doute nécessaire.

Le développement des méthodes d'analyse en toxicologie depuis une trentaine d'années repose sur le concept des 3R (Remplace, Réduit, Raffine), qui vise à diminuer autant que possible l'expérimentation animale, et à la remplacer par des méthodes *in vitro* ou *in silico* quand celles-ci sont validées, c'est-à-dire capables d'évaluer les dangers pour l'homme et l'environnement aussi bien que les études classiques *in vivo* (Bois, 2009).

La biologie systémique, qui associe des modèles informatiques, des données expérimentales et la biologie des systèmes intégrés, est une approche particulièrement intéressante et puissante pour rendre compte des effets au niveau d'un organisme. Cette nouvelle vision de la toxicologie doit prendre en compte plusieurs aspects essentiels :

- ✓ Evaluer un grand nombre de composés chimiques, en mélange, à des stades spécifiques de la vie d'un individu et en relation avec des pathologies particulières ;
- ✓ Réduire le coût et le temps de l'évaluation de la toxicité des produits chimiques ;
- ✓ Développer des bases scientifiques solides pour l'évaluation du risque environnemental des produits chimiques ;
- ✓ Minimiser l'utilisation des animaux pour tester ces produits.

### 1. Les méthodes *in silico* (toxicologie prédictive)

Les méthodes *in silico* qui utilisent la modélisation mathématique de données toxicologiques obtenues *in vitro* et *in vivo*, Par exemple, les QSAR (*quantitative structure activity relationships*) visent à modéliser la structure chimique d'un xénobiotique et son activité toxicologique. Ces méthodes peuvent être purement statistiques et/ou utiliser les connaissances d'experts toxicologues qui associent les fonctions et les motifs structuraux des molécules chimiques à des réponses toxiques spécifiques. On considère que ces approches pourraient réduire de 70% le recours aux tests sur l'animal (Bois, 2009).

Les modèles PBPK (*physiologically-based pharmacokinetic*) sont des modèles toxicocinétiques fondés sur les connaissances fondamentales de la physiologie humaine ou animale. Ils visent à déterminer par le calcul la vitesse d'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination d'un produit chimique. Ils ont été initialement développés pour des applications médicales et pharmacologiques et utilisent des paramètres physiologiques et biochimiques bien connus des pharmacologues. L'intérêt de cette approche serait également d'y introduire des facteurs de susceptibilité individuelle pour des situations spécifiques (asthmatiques, cardiaques, obèses, femmes enceintes, enfants, personnes âgées...). L'association entre les approches QSAR et PBPK devrait permettre de prédire une toxicité systémique sans avoir recours à l'expérimentation animale, mais elle nécessite d'avoir les données expérimentales suffisantes en amont pour l'établissement de modèles pertinents (Bois, 2009).

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 sans avoir recours à l'expérimentation animale, mais elle nécessite d'avoir les données expérimentales suffisantes en amont pour l'établissement de modèles pertinents. L'introduction des méthodes *in silico* dans la démarche toxicologique moderne doit permettre de limiter une expérimentation animale lourde, coûteuse, et qui n'est pas forcément représentative des situations humaines (Marano et Barouki, 2011).

## 2. Objectif de travail

Dans cette étude, nous avons exposé les escargots à différentes concentrations de cadmium, de fongicide et de leurs mixtures, mais dans le milieu naturel les escargots peuvent être exposés à différents mélanges de pesticides tout au long de leur vie et il est donc nécessaire de vérifier si ces réponses sont semblables (Wang et Rainbow, 2005). Il a été décrit que la durée d'adaptation change avec le temps de récupération en fonction des biomarqueurs, du polluant et de la sensibilité des espèces (Wu *et al.*, 2005).

Ceci nous a initié à utiliser un modèle *in silico* pour prédire les effets à long terme de cadmium, de fongicide et de leurs mixtures sur les paramètres morphophysiologiques, biochimiques et enzymatique de l'escargot *Hélix aspersa*. L'étude de la toxicité de ces



xénobiotiques a été effectuée à l'aide du modèle gris de prévision (forecasting grey model) ; suite à un historique de résultats des différents paramètres étudiés. Contrairement aux techniques de prévision (séries temporelles, réseaux de neurones, etc.), le modèle gris de prévision (Liu *et al.*, 2010), convient à la prévision non linéaire. Il a été appliqué avec succès dans de nombreux domaines, tels que l'économie, l'ingénierie industrielle, la biologie, etc.

### **3. Matériels et Méthodes**

#### **3.1. Matériel biologique :**

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

#### **3.2. Matériels chimiques :**

Les matériels chimiques utilisés dans notre étude sont le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ), le fongicide (Vacomyl-PLUS) et leur mixtures.

#### **3.3. Matériel informatique :**

Nous avons utilisé une implémentation en langage Python d'une méthode de prévision qui convient au mieux à notre cas d'étude. Cette implémentation a été effectuée sur un PC I3, sous windows 10 à 4 Go de RAM.

PYTHON est un langage de programmation interprété. Il est associé à un interpréteur de commandes disponible pour différents OS (Windows, Linux, Mac OS X, etc.). Ce langage de programmation est récemment développé. Son point fort est sa richesse expressive ainsi que sa capacité élevée de modélisation de phénomènes naturels. Il fait référence à un ensemble d'outils et bibliothèques (numpy, pandas, matplotlib, etc.), permettant de manipuler et d'analyser des données, implémentant la plupart des algorithmes d'intelligence artificielle, dont les arbres de décision, les réseaux Baysiens et les réseaux de neurones (witten *et al.*, 2000).

##### **3.3.1. Le modèle GM (1,N)**

Le modèle gris (Grey model) peut être utilisé pour prédire le comportement de séries temporelles non-linéaires. Il s'agit d'une méthode de prévision non statistique, particulièrement efficace lorsqu'on a un petit nombre d'échantillons ou quand le nombre d'observations (résultats) est réduit.

Il contient un système de comportement variable. Il peut analyser l'effet de plusieurs variables d'influence sur le comportement du système. Les variables de comportement du système peuvent être prédites, connaissant la tendance changeante des variables d'influence.

Le processus de modélisation est défini comme :

**Déf 1 :**  $x_1^{(0)} = x_1^{(0)}(1) x_1^{(0)}(2), \dots \dots x_1^{(0)}(n)$ , est supposé être la série de dates de la fonction système.

Après avoir déterminé les séquences initiales, le modèle GM (1, N) peut être implémenté en trois étapes :

### Etape 1. Opération de production cumulée.

Où : 1.  $x_2^{(0)} = x_2^{(0)}(1) x_2^{(0)}(2), \dots \dots x_2^{(0)}(n)$   
 $x_3^{(0)} = x_3^{(0)}(1) x_3^{(0)}(2), \dots \dots x_3^{(0)}(n)$   
 $x_N^{(0)} = x_N^{(0)}(1) x_N^{(0)}(2), \dots \dots x_N^{(0)}(n)$ , sont les séries de dates de facteurs pertinents,

2.  $X_i^{(1)}$  est les séries ( $i = 2, 3, \dots \dots, N$ ) générées par le cumul du premier ordre (1 – AGO),

3.  $Z_1^{(1)}$  représente la série de dates pour la moyenne la plus proche de  $x_1^{(1)}$  et est exprimé comme :  $x_1^{(0)}$  est le modèle Gris multi variable et mesuré comme GM (1,N).

### Etape 2. La détermination des paramètres de conduite.

Les séries de paramètres  $\hat{\alpha} = [a, b_2, \dots \dots, b_N]$ , supposant :

- a-  $x_1^{(0)} = (x_1^{(0)}(1), x_1^{(0)}(2), \dots \dots, x_1^{(0)}(n))$  est la série de dates caractéristiques du système,
- b-  $x_i^{(0)}$  ( $i = 2, 3, \dots \dots, N$ ) est la série de dates de facteurs pertinents,
- c-  $x_i^{(1)}$  est le 1- AGO séries de  $x_i^{(0)}$ ,

d-  $Z_1^{(1)}$  est la série de données de NNM de  $x_1^{(1)}$

Ensuite : Les séries des paramètres  $\hat{\alpha} = [a, b_2, \dots, b_N]$  peut être résolu par la méthode des moindres carrés (Least Square Method):

$$\hat{\alpha} = [a, b_2, \dots, b_N] = (B^T B)^{-1} B^T y$$

Où :

$$B = \begin{pmatrix} z_1^{(1)}(2) x_2^{(1)}(2), \dots, x_N^{(1)}(2) \\ z_1^{(1)}(3) x_2^{(1)}(3), \dots, x_N^{(1)}(3) \\ \vdots \\ z_1^{(1)}(n) x_2^{(1)}(n), \dots, x_N^{(1)}(n) \end{pmatrix}$$

$$Y = \begin{pmatrix} x_1^{(0)}(2) \\ x_1^{(0)}(3) \\ \vdots \\ x_1^{(0)}(n) \end{pmatrix}$$

Supposant :  $\hat{\alpha} = [a, b_2, \dots, b_n]^T$ , on obtient :  $\frac{dx_1^{(1)}}{dt} + ax_1^{(1)} = b_2 x_2^{(1)} + b_3 x_3^{(1)} + \dots + b_N x_N^{(1)}$

Supposant :  $x_i^{(0)}, x_i^{(1)}, (i = 1, 2, \dots, N)$ , B, Y,

$$\hat{\alpha} = [a, b_2, \dots, b_n]^T = (B^T B)^{-1} B^T Y$$

**Etape 3. Prédiction en utilisant l'opération de génération inverse cumulée.**

$$\hat{x}_1^{(1)}(k+1) = \left[ x_1^{(1)}(0) - \frac{1}{a} \sum_{i=2}^N b_i x_i^{(1)}(k+1) \right] e^{-ak} + \left[ \frac{1}{a} \sum_{i=2}^N b_i x_i^{(1)}(2+1) \right]$$

Où :  $x_1^{(1)}(0)$  est mis à  $x_1^{(1)}(1)$  en effectuant une opération inverse de génération cumulée (-1 AGO), les valeurs prévues sont obtenues par l'équation :

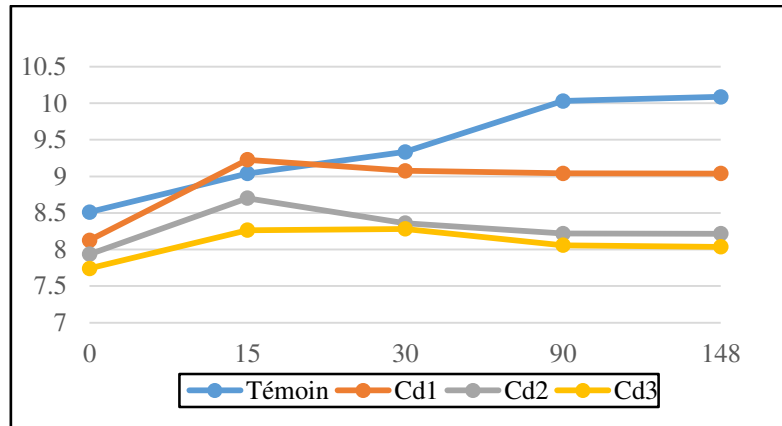
$$x_{(1)}^{1(0)}(k+1) = x_{(1)}^{1(1)}(k+1) - x_{(1)}^{1(1)}(k)$$

**3.4.Méthodes :**

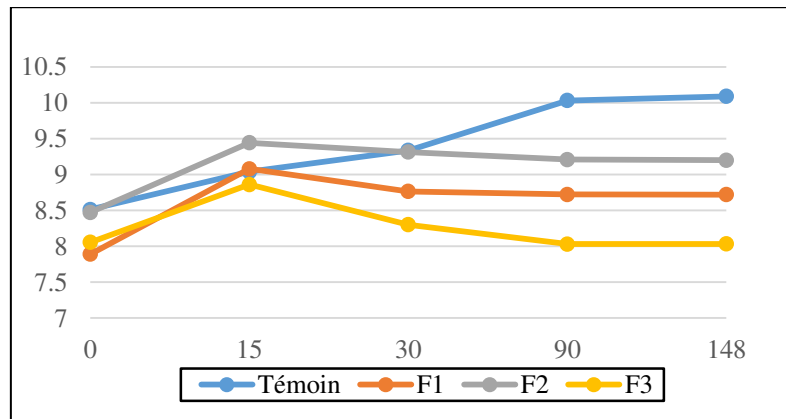
Nous avons retenu l'évolution des paramètres morphophysiologiques, les variations des protéines totales et les biomarqueurs de la toxicité (GSH, MDA et AChE).

**II. Résultats****1. Etude prédictive des paramètres morphophysiologiques****1.1. Evolution du poids moyen d'*Helix aspersa***

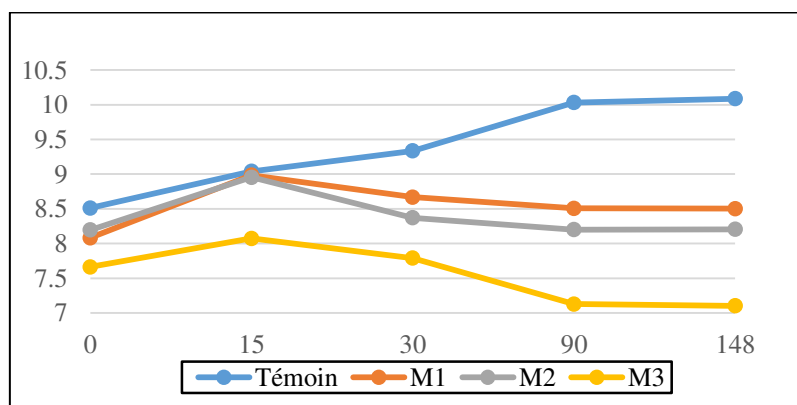
Les figures 28, 29 et 30 représentent l'évolution prédictive du poids moyen des escargots témoins et traités par des concentrations croissantes de cadmium et/ou de fongicide. Nous constatons une augmentation du poids de l'animal chez les témoins, mais chez les traités par les différentes concentrations des deux xénobiotiques, nous remarquons une diminution puis une stagnation du poids par rapport aux témoins.



**Figure 28** : Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur l'évolution du poids moyen d'*Helix aspersa* en fonction du temps.



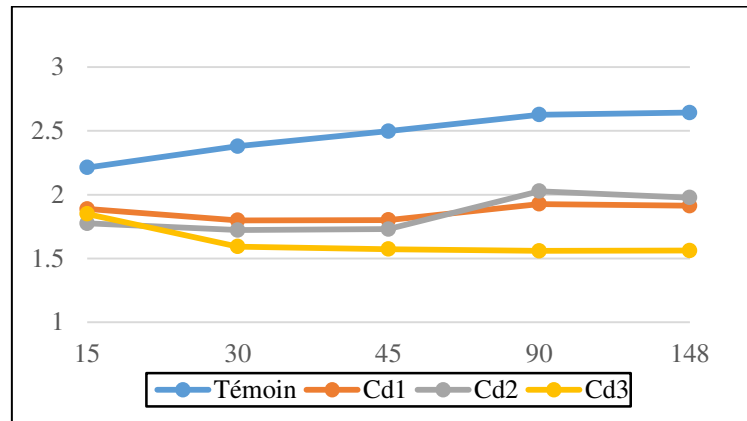
**Figure 29** : Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur l'évolution du poids moyen d'*Helix aspersa* en fonction du temps.



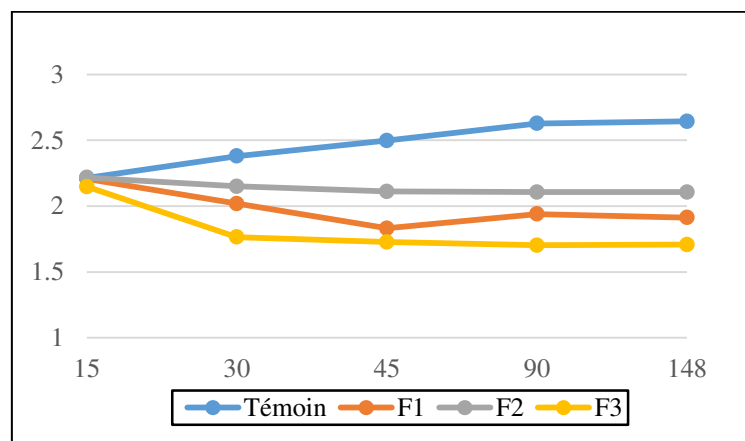
**Figure 30** : Effet prédictif de concentrations croissantes du cocktail cadmium/fongicide sur l'évolution du poids moyen d'*Helix aspersa* en fonction du temps.

## 1.2. Evolution du poids moyen de l'hépatopancréas

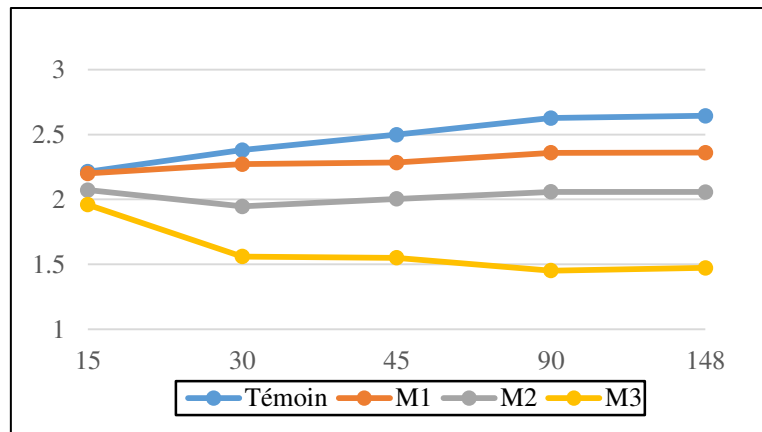
Les figures 31, 32 et 33 illustrent l'évolution prédictive du poids moyen de la glande digestive des escargots témoins et traités par des concentrations croissantes de cadmium et/ou de fongicide en fonction du temps. Nous remarquons une diminution ensuite une stagnation du poids de l'hépatopancréas des traités par rapport aux témoins.



**Figure 31** : Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur l'évolution du poids moyen de la glande digestive chez *Helix aspersa* en fonction du temps.



**Figure 32** : Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur l'évolution du poids moyen de la glande digestive chez *Helix aspersa* en fonction du temps.

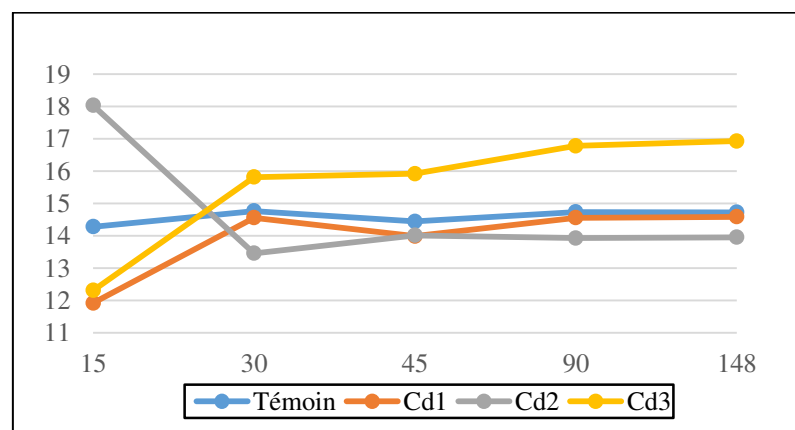


**Figure 33** : Effet prédictif de concentrations croissantes du cocktail cadmium/fongicide sur l'évolution du poids moyen de la glande digestive chez *Hélix aspersa* en fonction du temps.

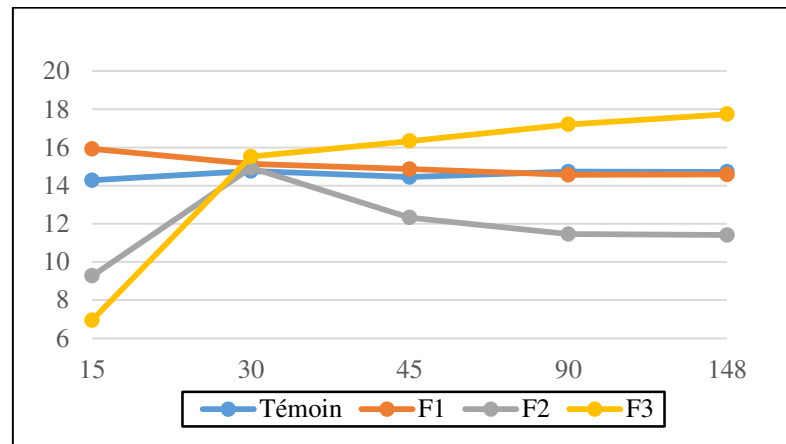
## 2. Etude prédictive du taux des protéines totales de l'hépatopancreas d'*Hélix aspersa*

Les figures 34, 35 et 36 illustrent les variations du taux des protéines totales de la glande digestive des escargots témoins et traités par des concentrations croissantes de cadmium ou/et de fongicide. Nous notons une diminution de ce taux chez les traités par les deux concentrations de cadmium 200 et 400  $\mu\text{g/l}$ , par contre une augmentation est remarquée chez les traités par la plus forte concentration 800  $\mu\text{g/l}$ .

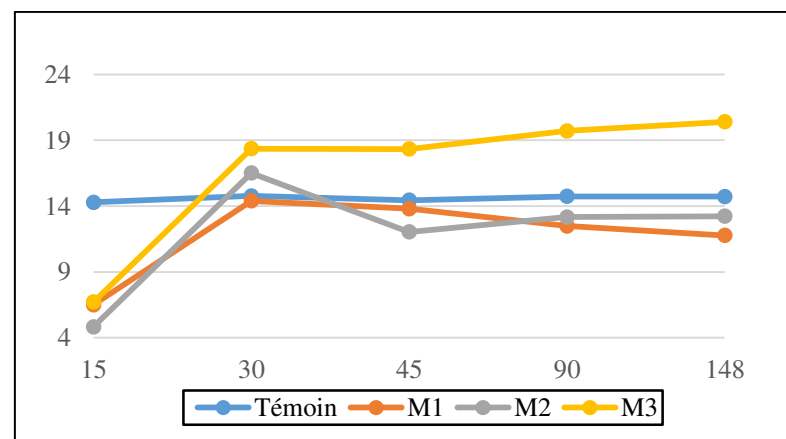
Également chez les traités par le fongicide seul, nous remarquons une diminution du taux des protéines totales pour la dose 1g/l et une augmentation de ce taux pour la plus forte concentration 2g/l. La même remarque pour la mixture cadmium/fongicide, il y'a une augmentation de ce taux chez les traités par la plus forte dose M3 (800 $\mu\text{g}$  + 2g), et une diminution pour les plus faibles doses M1 et M2.



**Figure 34** : Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur le taux des+ protéines totales hépatopancréatiques chez *Hélix aspersa*.



**Figure 35** : Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur le taux des protéines totales hépatopancréatiques chez *Hélix aspersa*.



**Figure 36** : Effet prédictif de concentrations croissantes du cocktail cadmium/fongicide sur le taux des protéines totales hépatopancréatiques chez *Hélix aspersa*.

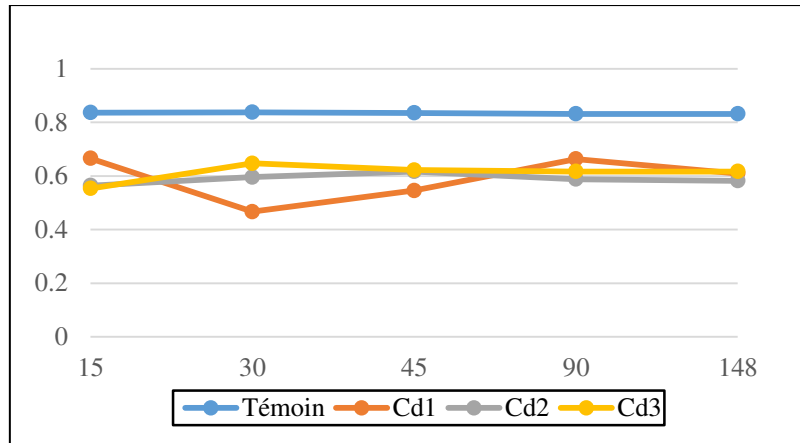
### 3. Etude prédictive sur les indicateurs de stress oxydant

#### 3.1. Le taux de glutathion (GSH)

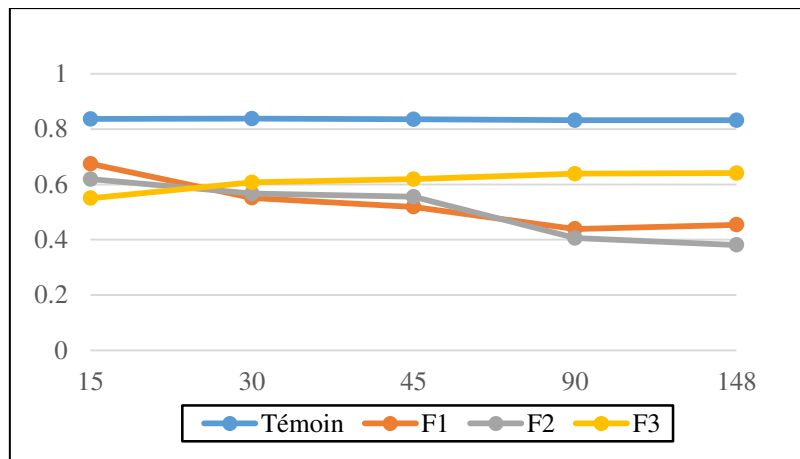
Les figures 37, 38 et 39 représentent les variations prédictives des escargots témoins et traités par des concentrations croissantes du cadmium ou/et de fongicide sur le taux de GSH hépatopancréatiques.



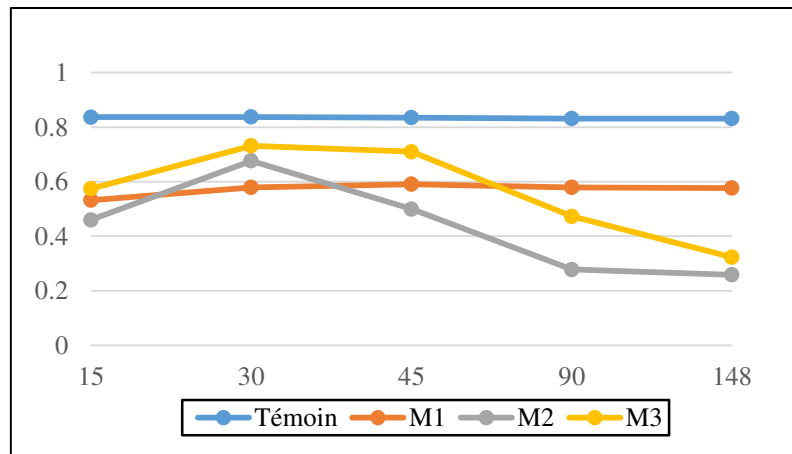
Nous remarquons une diminution du taux de GSH chez tous les escargots traités par rapport aux témoins. Cette diminution est plus marquée chez les traités par la mixture et plus précisément la mixture M2, qui atteint la valeur de 0,259  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines, par rapport aux témoins dont le taux est d'environ 0,8319  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines.



**Figure 37** : Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur le taux de GSH hépatopancréatiques chez *Helix aspersa*.



**Figure 38** : Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur le taux de GSH hépatopancréatiques chez *Helix aspersa*.

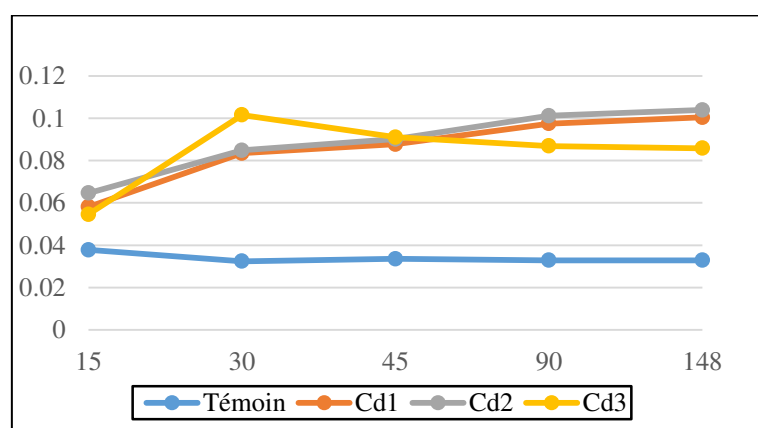


**Figure 39** : Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur le taux de GSH hépatopancréatiques chez *Hélix aspersa*.

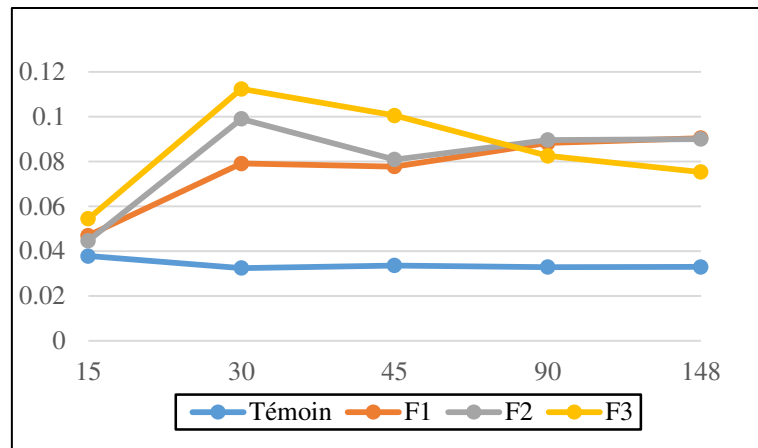
### 3.2. Le taux de malondialdéhyde (MDA)

Les figures 40, 41 et 42 illustrent les variations prédictives du taux de MDA hépatopancréatiques des escargots témoins et traités par des concentrations croissantes du cadmium ou/et de fongicide. Nous constatons une augmentation de ce taux chez tous les traités par rapport aux témoins.

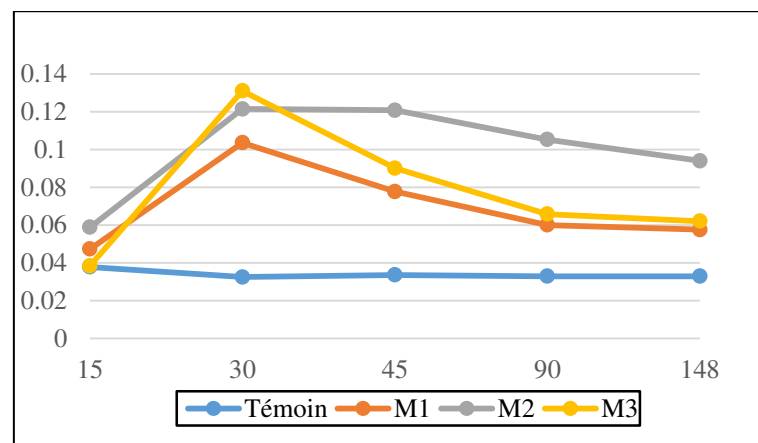
En revanche, nous notons une légère diminution du taux prédictif de MDA chez les traités par les concentrations F3 (2g), M2 (400 $\mu$ g + 1g) et M3 (800 $\mu$ g + 2g), par rapport à la précédente durée de traitement (90 jours).



**Figure 40** : Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur le taux de MDA hépatopancréatiques chez *Hélix aspersa*.



**Figure 41** : Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur le taux de MDA hépatopancréatiques chez *Helix aspersa*.

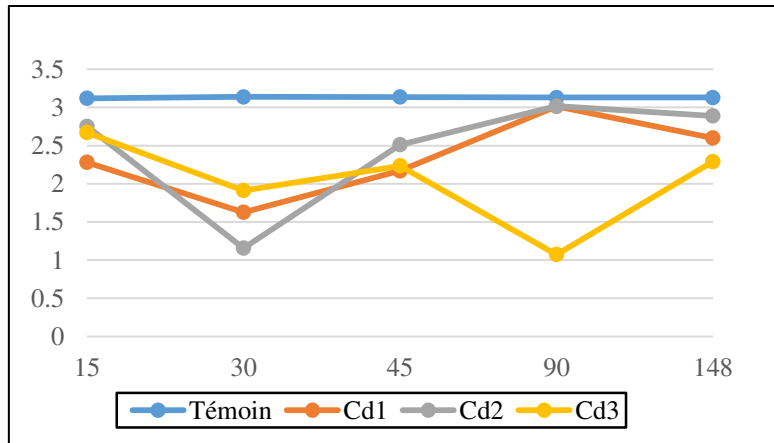


**Figure 42** : Effet prédictif de concentrations croissantes du cocktail cadmium/fongicide sur le taux de MDA hépatopancréatiques chez *Helix aspersa*.

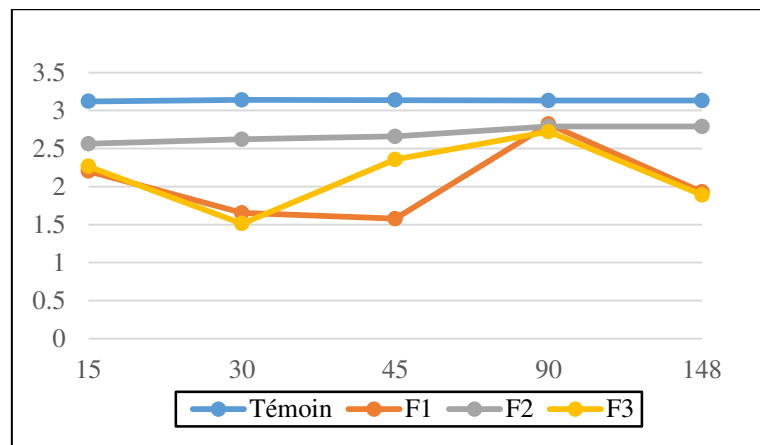
### 3.3. L'activité acétylcholine Estérase (AChE)

Les figures 43, 44 et 45 illustrent les variations prédictives de l'activité AChE des escargots témoins et traités par des concentrations croissantes du cadmium ou/et de fongicide. Nous constatons une inhibition de l'activité acétylcholine-estérase chez tous les escargots traités par rapport aux témoins.

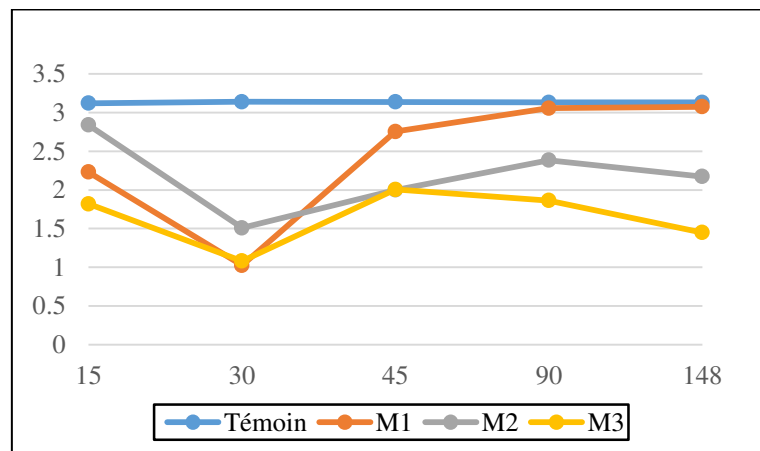
Pareillement, nous remarquons une diminution de cette activité chez les traités par le cadmium seul et le fongicide seul, et plus significative chez les traités par les mixtures par rapport à la précédente durée de traitement.



**Figure 43 :** Effet prédictif de concentrations croissantes du cadmium sur les variations de l'activité AChE chez *Helix aspersa*.



**Figure 44 :** Effet prédictif de concentrations croissantes de fongicide sur les variations de l'activité AChE chez *Helix aspersa*.



**Figure 45 :** Effet prédictif de concentrations croissantes du cocktail cadmium/fongicide sur les variations de l'activité AChE chez *Helix aspersa*.

### III. Discussion

La prévision de séries temporelles est un domaine passionnant de recherche. L'un des objectifs principaux de la statistique appliquée est d'établir des modèles de prévision, à partir de données observées, sans utiliser, ni les mêmes outils, ni les mêmes méthodes. Statisticiens, économètres, économistes, financiers ont toujours la volonté massive de modéliser les séries chronologiques et d'en prédire leurs comportements futurs. Dans la plupart des cas, leurs inputs, ce sont les données observées.

À très court terme, le prévisionniste peut identifier l'écart de prévision, après avoir comparé la prévision réalisée avec la réalité observée. Mais, pour le long terme, il doit faire des hypothèses restrictives sur l'évolution de cet écart. Ainsi, bien que les techniques classiques de prévision à court terme se basent sur l'hypothèse de la présence d'une forte corrélation entre les observations successives des variables explicatives et exploitent ainsi les modèles stochastiques de régression linéaire autorégressifs, elles souffrent du problème de raccord entre prévisions et observations. Ceci se traduit techniquement par le fait qu'en pratique, l'analyse basée sur la modélisation, reste très restreinte, parce qu'elle ignore tout comportement dynamique qui justifie l'endogénéité des structures de dépendances non-linéaires, entre les observations successives, lors de l'évolution des variables dans le temps. Donc, si sophistiqué qu'il soit, une technique de prévision ne peut produire que des prédictions approximatives et par conséquent, le fait de négliger l'importance de l'approche dynamique en modélisation, ceci nous laisse penser qu'il permet l'omission de plusieurs faits stylisés importants, sur la dynamique des différentes phases de l'évolution cyclique de ces variables.

Suite aux échecs répétés des tentatives linéaires de modélisations et surtout de prévisions, l'analyse et la prédiction de **séries temporelles non-linéaires** à temps discret seront des défis scientifiques importants, qui trouvent leurs exigences dans de nombreuses applications scientifiques, qui touchent des domaines importants de l'analyse conjoncturelle et l'analyse prévisionnelle. Durant la dernière décennie, la recherche s'est orientée vers l'utilisation des modèles empiriques d'ajustement non-linéaire. Ces modèles flexibles sont capables de fournir une meilleure caractérisation du comportement des séries chronologiques non linéaires à temps discret (Alimi, 2011).

Afin de combler ce déficit de recherche, le modèle Gris GM (1, N) permettant de modéliser avec une petite quantité d'échantillons et de prédire des résultats de plusieurs paramètres étudiés. Ren *et al.*, 2013 ont utilisés le modèle Gris pour prédire le rendement de

bio hydrogène dans des conditions de données rares. Ils ont utilisés le pH, la concentration en glucose et en sulfate de fer comme variables indépendantes et le rendement en bio hydrogène comme variable dépendante. Leurs résultats montrent que la méthode proposée permet de prédire le rendement en bio hydrogène dans de rares conditions de données et que l'effet des facteurs ayant une influence sur le rendement pourrait également être identifié. D'après la comparaison avec les résultats prédits par le réseau de neurones artificiels, ils pourraient conclure que le modèle gris a une meilleure prévisibilité avec des données rares.

Plus récemment, employé par Jingzheng Ren (2018), en vue de modéliser un système de digestion anaérobique afin d'obtenir un rendement plus élevé en méthane. Ces résultats démontrent que le modèle GM (1, N) peut efficacement simuler un système de digestion anaérobie dans les cas de mauvaise information avec moins de temps de calcul. Ce type de modèle proposé présente les deux avantages les plus significatifs suivants : (1) Les utilisateurs n'ont pas besoin de connaître le mécanisme des variables étudiés ; et (2) nécessite moins des données avec une meilleure précision.

Ceci ouvre un cadre privilégié pour notre étude de modélisation de valeurs prédictives suite à un historique temporel de nos résultats des paramètres morphométriques ou des dosages biochimiques.

**D'après les résultats prédictifs obtenus, en utilisant une implémentation en PYTHON et le modèle Gris GM (1, N), il apparait clairement que l'évolution des paramètres morphométriques et biochimiques est similaire à l'évolution de nos résultats.**

#### **IV. Conclusion**

Cette question des effets à long terme nécessite des apports conceptuels nouveaux et peut bénéficier de la biologie théorique, par exemple, la métabolisation des molécules chimiques xénobiotiques est une étape importante de leur élimination et donc de notre survie dans un environnement riche en composés potentiellement toxiques. Or ce système métabolique qui doit gérer des dizaines de milliers de molécules est, par économie, imparfait. Qui plus est, il génère des métabolites réactifs qui constituent une étape nécessaire mais très éphémère de ces voies biologiques. Ainsi, à chaque mise en jeu du système métabolique de détoxification, il y a production très transitoire de molécules réactives qui ne sont pas un danger

réel si elles ne sont générées que peu de fois, mais qui peuvent le devenir si ces processus adaptatifs se répètent souvent (effet à long terme). Ainsi, notre système de détoxification transforme un danger immédiat en un danger retardé (Barouki, 2010).

L'identification *in silico* des effets toxiques provoqués par les produits toxiques 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 onéreuses que les essais cliniques (Bouaricha, 2013).

En observant les résultats obtenus grâce à l'utilisation de l'outil informatique Prédiction, en particulier le modèle de séries temporelles non-linéaires Gris GM (1, N), nous pouvons conclure que ces produits (cadmium ou fongicide), ont des effets plus significatifs lorsqu'ils sont combinés à long terme.

**Chapitre 5 :**

**Etude**

**histopathologique**



## I. Objectif de l'étude

Afin de mieux étayer les mécanismes biochimiques mis en jeu lors d'un stress aux ces deux contaminants (cadmium et/ou fongicide) chez *Helix aspersa*, nous avons jugé utile d'effectuer une recherche des éventuelles perturbations tissulaires au niveau d'un organe cible (hépatopancréas). Nous nous sommes focalisés sur le tissu hépatopancréatique en raison de sa forte implication dans le phénomène de métabolisation, en plus cet organe est le passage obligatoire de la plus-part des xénobiotiques.

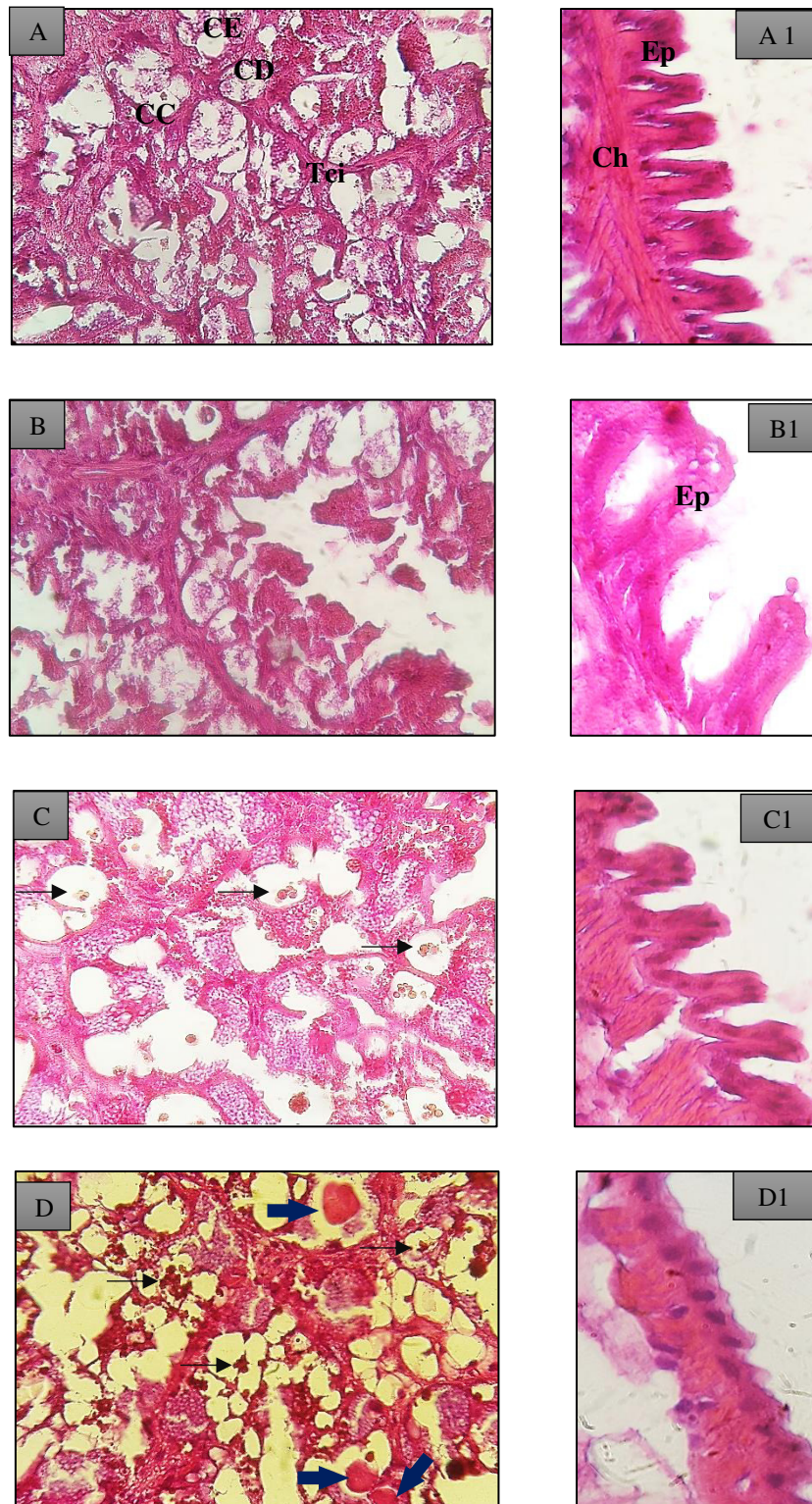
L'hépatopancréas est l'organe le plus important dans la détoxification des xénobiotiques chez les mollusques. Cet organe est responsable de la production d'enzymes digestives, l'absorption des nutriments et la digestion par endocytose de substances alimentaires, et de l'excrétion (Owen, 1996).

Le but principal de ce chapitre a été d'évaluer les altérations aiguës, sub-aiguës et chroniques engendrés par ces xénobiotiques, sur la glande digestive.

## II. Résultats

Chez les escargots l'hépatopancréas occupe un volume important de la masse viscérale, il est formé de deux lobes, qui 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 (Heusser et Dupuy, 2011).

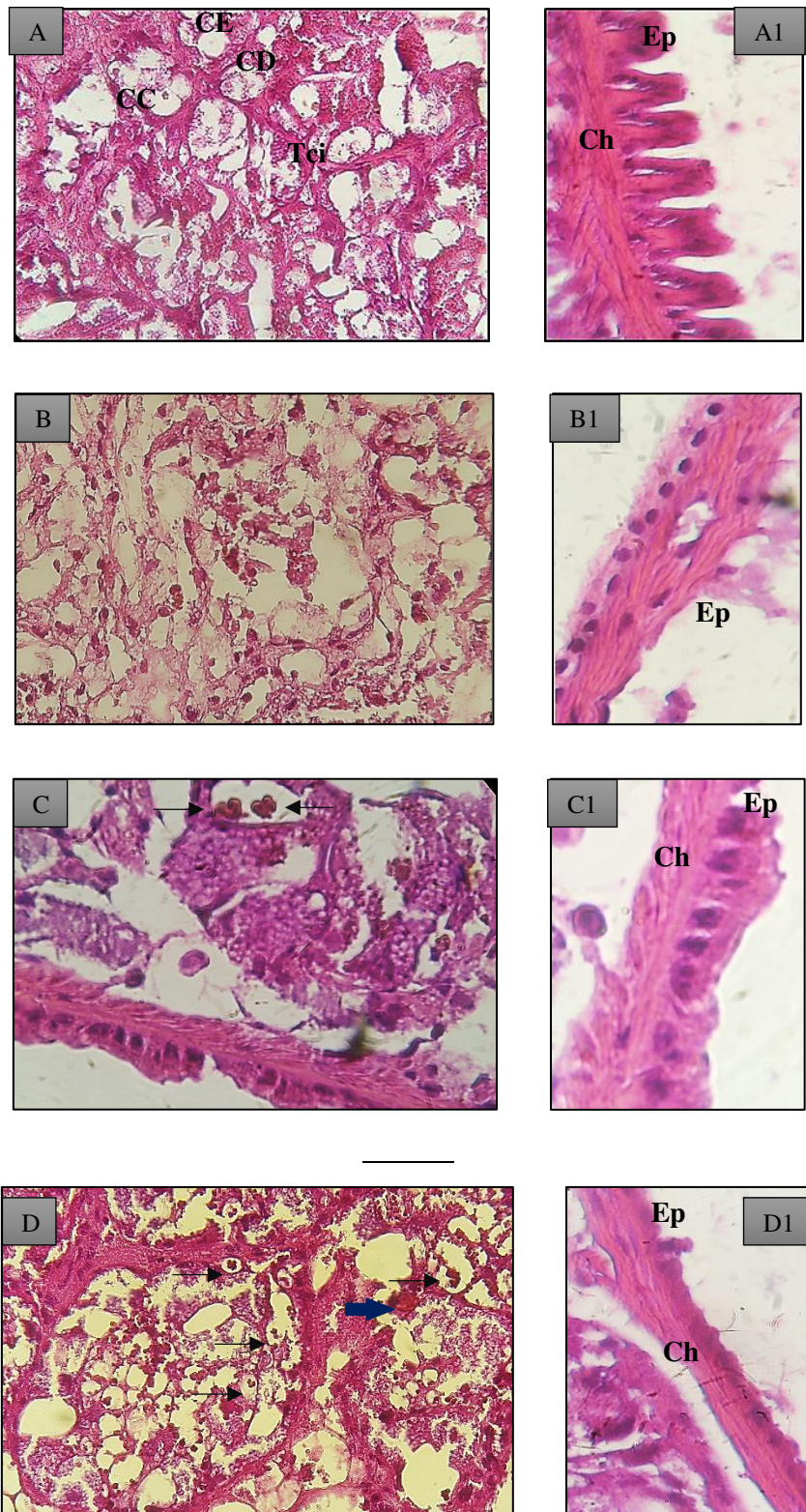
La paroi des tubules hépatopancréatiques est constituée d'un épithélium simple et haut, les cellules qui le composent présentent des morphologies diverses mais relèvent de trois types cellulaires principales : Des cellules digestives ou sécrétrices (CD), les plus abondantes, produisant des enzymes digestives 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 cellulaire (Zaldibar et *al.*, 2008).



Les cellules digestives (CD); les cellules à calcium (CC); les cellules excrétoires (CE); le tissu connectif intertubulaire (Tci); épithélium (Ep) ; chorion (Ch) ; ➡ Apoptose ; ◄ Accumulation du produit.

**Figure 46 :** Observations microscopiques de l'hépatopancreas d'un escargot témoin (A : Gr × 40, A1 : Gr × 100) et après 15 jours (B : Gr × 40, B1 : Gr × 100), 30 jours (C : Gr × 40, C1 : Gr × 100) et 90 jours (D : Gr × 40, D1 : Gr × 100) de traitement par le cadmium.

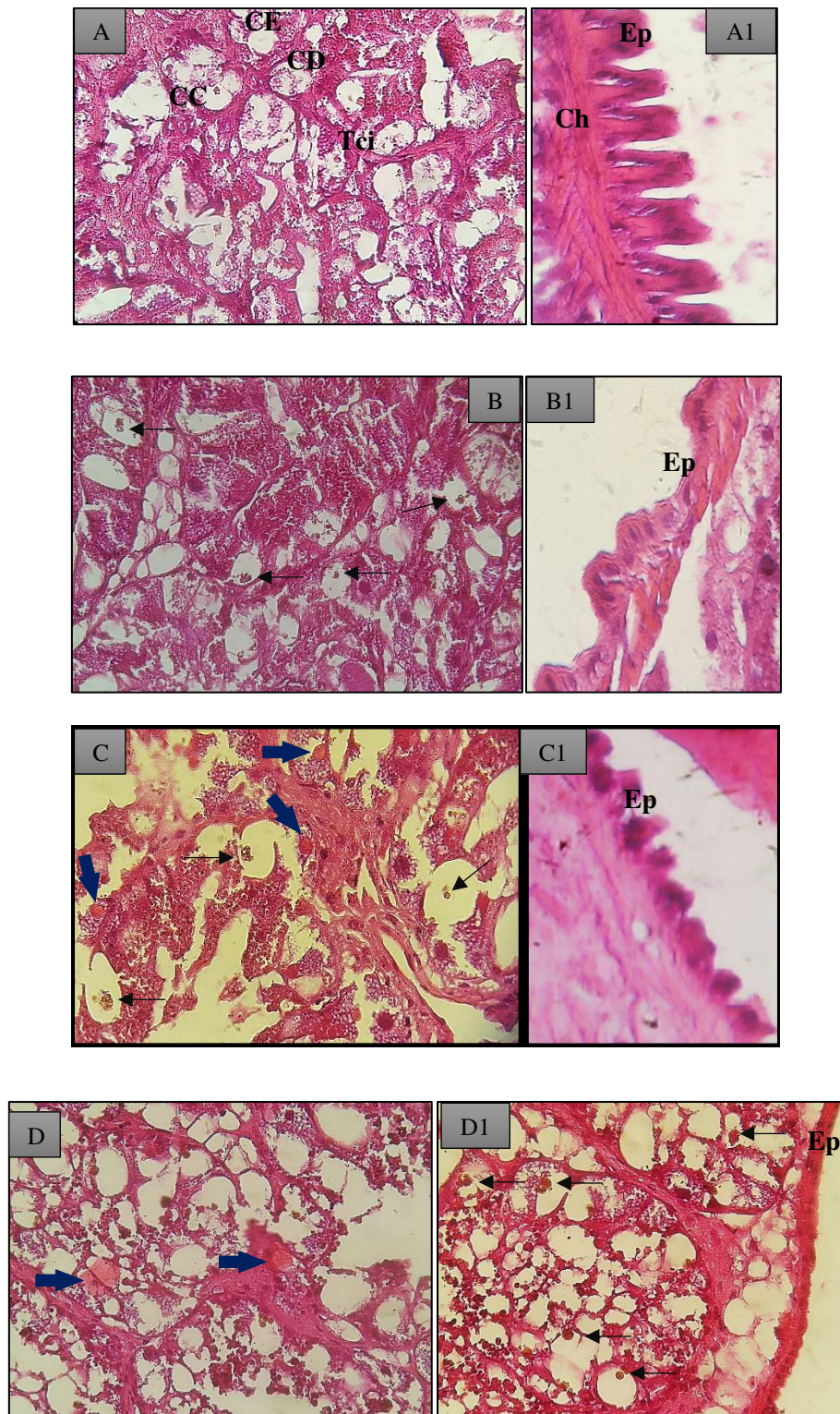




Les cellules digestives (CD); les cellules à calcium (CC); les cellules excrétoires (CE); le tissu connectif intertubulaire (Tci); épithélium (Ep) ; chorion (Ch) ; ➡ Apoptose ; ← Accumulation du produit.

**Figure 47** : Observations microscopiques de l'hépatopancreas d'un escargot témoin (A : Gr × 40, A1 : Gr × 100) et après 15 jours (B : Gr × 40, B1 : Gr × 100), 30 jours (C : Gr × 40, C1 : Gr × 100) et 90 jours (D : Gr × 40, D1 : Gr × 100) de traitement par le fongicide.





Les cellules digestives (CD); les cellules à calcium (CC); les cellules excrétoires (CE); le tissu connectif intertubulaire (Tci); épithélium (Ep) ; ➡ Apoptose ; ← Accumulation du produit.

**Figure 48 :** Observations microscopiques de l'hépatopancreas d'un escargot témoin (A : Gr × 40, A1 : Gr × 100) et après 15 jours (B : Gr × 40, B1 : Gr × 100), 30 jours (C : Gr × 40, C1 :

Gr × 100) et 90 jours (D : Gr × 40, D1 : Gr × 40) de traitement par le cocktail cadmium/fongicide.

### **1. Effet du cadmium sur le tissu hépatopancréatique**

La figure 46 illustre des coupes histologiques effectuées au niveau de l'hépatopancréas, des escargots témoins et exposés durant 15, 30 et 90 jours au cadmium à 800µg/l.

#### **1.1. Traitement de 15 jours**

L'examen histopathologique de l'hépatopancréas des escargots traités, met en évidence un épithélium relativement conservé de hauteur normale, diminution du nombre des cellules digestives et prolifération des cellules excrétoires.

#### **1.2. Traitement de 30 jours**

Les mêmes altérations ont été observées avec une hypertrophie des cellules accompagnée par destruction des membranes et l'apparition des nécroses, avec la présence de particules de couleur foncée (possiblement sont des particules de cadmium).

#### **1.3. Traitement de 90 jours**

L'observation microscopique du tissu illustre, diminution de la hauteur du revêtement épithéliale, destruction des parois cellulaire et par conséquent des cellules nécrosées et fusionnées. Avec l'accumulation de cadmium au niveau cellulaire, suivi par la présence de corps condensés sphériques de tailles importantes, qui représente le début de la mort cellulaire programmée.

### **2. Effet du fongicide sur le tissu hépatopancréatique**

La figure 47 illustre des coupes histologiques effectuées au niveau de l'hépatopancréas, des escargots témoins et exposés durant 15, 30 et 90 jours au fongicide à 2g/l.

#### **2.1. Traitement de 15 jours :**

L'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots exposés durant 15 jours au fongicide, a montré un épithélium relativement conservé, avec une dilatation des acini.

#### **2.2. Traitement de 30 jours :**

L'observation microscopique du tissu illustre, une diminution de la hauteur de l'épithélium accompagnée par fibrose de chorion (couleur rose), altération considérable des cellules, qui sont clarifiées et tuméfiées, et aussi une diffusion du produit au niveau cellulaire.

### **2.3.Traitement de 90 jours :**

Les mêmes altérations ont été observées avec, un remarquable aplatissement de l'épithélium, fibrose du chorion, qui contient de nombreux vaisseaux dilatés, aussi une atrophie des cellules avec destruction des parois accompagnée par n des nécroses, nous avons également noté l'accumulation de nombreuses particules de couleur jaune brun, possiblement sont des particules de cuivre et aussi l'apparition des apoptoses.

## **3. Effet du cocktail (Cadmium/Fongicide) sur le tissu hépatopancréatique**

La figure 48 illustre des coupes histologiques effectuées au niveau de l'hépatopancréas, des escargots témoins et exposés durant 15, 30 et 90 jours à la plus forte concentration de la mixture cadmium/fongicide 800µg/l + 2g/l.

### **3.1.Traitement de 15 jours**

L'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots exposés à la mixture durant 15 jours, a montré un épithélium partiellement conservé, une dégénérescence des cellules digestives et prolifération des cellules excrétoires une atrophie des acini, avec diffusion des produits dans les cellules.

### **3.2.Traitement de 30 jours**

Les manifestations histologiques induites par la présence du cocktail pendant 30 jours se traduisent par, une diminution de la hauteur du revêtement épithéliale, une hypertrophie cellulaire, un élargissement de la lumière tubulaire, et encore l'accumulation des produits qui a causé des apoptoses.

### **3.3.Traitement de 90 jours**

L'observation des coupes réalisées au niveau de l'hépatopancréas des escargots exposé au cocktail cadmium/fongicide, a mis en évidence une fibrose plus importante du chorion avec aplatissement total de l'épithélium (il forme complètement un trait), une diffusion et

accumulation des toxiques dans les cellules, en conséquence une destruction, une lyse cellulaire et l'apparition des nécroses et également des apoptoses.

### III. Discussion

L'hépatopancréas est considéré comme l'un des organes les plus importants impliqués dans la détoxification des xénobiotiques, chez les gastéropodes (Ismert *et al.*, 2002), toute atteinte de son intégrité aura pour conséquence des perturbations de son fonctionnement. De ce fait, l'exposition aux polluants peut causer des altérations cytologiques et ultrastructurales très importantes au niveau de la glande digestive (Frías *et al.*, 2008). Ces altérations peuvent être utilisées en tant que bio marqueurs d'exposition aux métaux (Amaral *et al.*, 2004).

L'examen histologique de *Helix aspersa* traité par le cadmium, le fongicide et leur mixture a mis en évidence des altérations en réponse à tous les traitements, ce qui témoigne de l'effet toxique des deux produits testés. A la première durée de traitement, l'épithélium est relativement conservé chez les traités par le cadmium, fongicide et leur mixture avec dilatation ou atrophie des acini, une diminution du nombre des cellules digestives et prolifération des cellules excrétoires. Ces résultats sont en accord avec ceux de Włostowski *et al.*, (2014), qui n'ont observé aucun changement histopathologique (nécrose) dans l'intestin de tous les escargots testés, et aussi ceux de Radziun *et al.*, (2011), qui n'ont signalé aucun effet cytotoxique significatif sur les cultures cellulaires de mammifères traités par les NPs d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Cette prolifération des cellules du tissu conjonctif était également liée au Cu et au Fe, et a déjà été signalé chez les bigorneaux (gastéropodes marins) après leur exposition au Cu et Zn (Soto *et al.*, 1999). Une explication possible de cet événement est l'existence de granules de Fe et de Cu dans les cellules de dégénérescence (Haszprunar 1996), et le rôle de ces cellules dans la formation de détoxification de l'hémocyanine et des métaux, ce qui signifie que ces cellules (rhogocytes) peuvent réagir rapidement et plus tôt que les cellules épithéliales à calcium lorsqu'ils sont exposés à des niveaux élevés d'exposition au Fe et au Cu dans l'environnement (Luchtel et Deyrup-Olsen 2001).

Dès 30 jours de traitement, nous avons mis en évidence une hypertrophie cellulaire, une dégénérescence des cellules digestives, une prolifération des cellules excrétoires, un



élargissement de la lumière tubulaire et une diminution de la hauteur de l'épithélium accompagnée par fibrose de chorion. Ces résultats corroborent avec ceux de Chabicoovsky et *al.*, (2003) ont mis en évidence une hypertrophie des cellules excrétoires des escargots soumis à des polluants métalliques, et ce de Ataila, (2017) qui a noté une prolifération des cellules excrétrices et une dégénérescence des cellules digestives chez les escargots exposés aux différentes concentrations de poussières métalliques ainsi que chez les escargots placés sur le site industriel. La perte des cellules digestives semble être une réponse générale après une exposition aux métaux lourds chez les gastéropodes terrestres et elle est reliée principalement à la détérioration du processus digestif provoqué par la présence des particules métalliques (Zaldibar *et al.*, 2008; 2007). D'un autre coté selon Marigomez *et al.*, (1996,1998) la prolifération des cellules excrétrices et les changements dans leur proportion après exposition chronique à des polluants semblent être une réponse générale chez les mollusques.

D'un autre côté, L'observation des coupes réalisées au niveau de l'hépatopancréas des escargots exposé au cadmium et/ou au fongicide durant 90 jours, a mis en évidence une fibrose importante du chorion avec aplatissement total de l'épithélium avec dilatation des vaisseaux, diffusion des toxiques dans les cellules, une destruction et lyse cellulaire. Nous avons également révélé l'accumulation de nombreuses particules de couleur différentes (jaune chez les traités par le fongicide et bleue chez les traités par le cadmium) confirmant ainsi la grande capacité de bioaccumulation de l'espèce étudiée. Nos résultats corroborent ceux de Kruatrachue *et al.*, (2011) qui ont mis en évidence l'accumulation de granulés noirs de taille variable au niveau de la glande digestive de *Pomacea canaliculata* après exposition aux sédiments contaminés par les ETM. D'après Amarel *et al.*, (2014) , ces particules sont des dépôts métalliques présents dans les cellules du tissu conjonctif et qui sont absents dans les cellules calciques de l'épithélium de la glande digestive. Et encore, nous avons mis en évidence la présence de corps condensés sphériques de tailles importantes. Selon Włostowski *et al.*, (2014) la présence de ces corps sphériques dans les cellules de la glande intestinale des *Helix pomatia* est expliqué par le démarrage de la mort cellulaire programmée (apoptose). Pareillement, Thit *et al.*, (2013, 2015) indiquent que le traitement de *Xenopus laevis* perles NPs de Cu provoque une apoptose des cellules épithéliales rénales. L'apoptose et la nécrose sont considérées comme des mécanismes de réponses sévères liés à la toxicité d'aluminium chez les rats (Brenner, 2002).



#### IV. Conclusion

La métabolisation des xénobiotiques est une étape importante de leur élimination et donc de notre survie dans un environnement riche en composés potentiellement toxiques. Or ce système métabolique qui doit gérer des dizaines de milliers de molécules est, par économie, imparfait. Qui plus est, il génère des métabolites réactifs qui constituent une étape nécessaire mais très éphémère de ces voies biologiques. Ces intermédiaires réactifs peuvent se lier à des macromolécules et entraîner une toxicité. Ainsi, à chaque mise en jeu du système métabolique de détoxification, il y a production très transitoire de molécules réactives qui ne sont pas un danger réel si elles ne sont générées que peu de fois, mais qui peuvent le devenir si ces processus adaptatifs se répètent souvent (à long terme). De ce fait, notre système de détoxification transforme un danger immédiat en un danger retardé.

D'après nos résultats histopathologiques, nous pouvons conclure que l'effet du cocktail cadmium/fongicide sur le tissu hépatopancréatique, est plus important en terme des altérations observés, comparé à celui du cadmium seul ou de fongicide seul. Ce qui témoigne de la dangerosité et la toxicité des mixtures des polluants à l'échelle tissulaire.

L'exposition chronique de ces organismes sentinelles au cadmium ou/et de fongicide, provoquent de sérieuses anomalies causé par l'accumulation de ces produits au niveau cellulaire, confirmant ainsi le phénomène de la toxicité à long terme.

# **Conclusion générale et perspectives**

## Conclusion générale et perspectives

Dans leur environnement naturel, les escargots assimilent les contaminants par contact (avec des substrats variés tels que le sol, les lixiviats du sol et la litière végétale), par ingestion (de plantes et de sol), de même que par les voies respiratoires (Coeurdassier *et al.*, 2001).

Les risques encourus par ces organismes terrestres dépendent de la durée d'exposition au toxique et de l'importance des dommages physiologiques (diminution du taux de croissance, de reproduction ou de survie) et biochimiques engendrés (Van Straalen, 1994).

Nous avons choisi d'évaluer la toxicité du cadmium, d'un fongicide à base de cuivre et de leurs mixtures traités par voie orale, sur un bioindicateur de pollution l'escargot terrestre *Helix aspersa*, les expérimentations sont menées durant 15 (aigue), 30 (sub-aigüe) et 90 jours (chronique). L'objectif principal de cette étude est de montrer que le cocktail cadmium/fongicide peut provoquer un stress oxydant à très faibles doses et d'attirer l'attention aussi sur le facteur temps, qui est très souvent négligé.

En conclusion, il apparaît clairement que l'escargot *Hélix aspersa* est un excellent bioindicateur environnementale, il est particulièrement sensible à une pollution par ce fongicide et/ou le cadmium. Cette sensibilité s'est manifestée par des altérations dans le développement des escargots à travers la diminution de la masse corporelle et du poids de l'hépatopancréas.

D'un autre côté, nous avons mis en évidence une perturbation du métabolisme globale à travers une baisse du taux des protéines et une augmentation du taux des glucides et des lipides. Cependant, ces perturbations sont beaucoup plus marquées chez les escargots traités par le mélange Cd/fongicide.

Concernant les biomarqueurs du stress oxydant, le cadmium et/ou le fongicide provoquent une diminution du taux de GSH et une induction de MDA qui confirme une peroxydation lipidique traduisant une dégradation de la membrane cellulaire. En plus, l'activité AChE est inhibée en présence de ces contaminants, cette inhibition est beaucoup plus importante chez les mixtures.

Ainsi, le cadmium semble plus toxique lorsqu'il est combiné avec un fongicide à base de cuivre sur ces organismes bioindicateurs, cette toxicité dépend de la durée d'exposition, nos résultats montrent qu'après 90 jours de traitement, les valeurs sont plus significatives. Et

ces dernières valeurs ont été confirmées par l'étude prédictive réalisée par la méthode de gris (Grey model 1, N), sur les paramètres physiologiques et biochimiques d'*Helix aspersa*.

Concernant les altérations tissulaires, nos observations mettent en évidence des anomalies plus graves chez l'escargot exposé à la mixture qu'au cadmium ou fongicide seul, aussi une accumulation des deux toxiques est remarquée après traitement de 90 jours, ce qui témoigne de la gravité de la toxicité à long terme.

Si la plupart des objectifs définis au début de ce manuscrit sont atteints, certaines études ont soulevé quelques limites amenant des perspectives à ce travail :

- Une des perspectives prioritaire est de réaliser des dosages des métallothionéines et d'autres biomarqueurs (GPX, SOD) afin d'affiner la compréhension des mécanismes du métabolisme de ces métaux (Cd et Cu).
- établir une étude comparative entre plusieurs voies de traitement et déterminer quelles source(s) et voie(s) d'exposition conduisent à une toxicité du cocktail cadmium/fongicide chez l'escargot.
- Il serait souhaitable de déterminer quelles peuvent être les conséquences sur les escargots d'une exposition cumulée à l'ensemble de cadmium/fongicide ou d'autres pesticides au cours de leur cycle de vie (œufs, juvéniles, sub-adultes et adultes). Cette étude s'approcherait encore un peu plus du risque réel encouru par les organismes vivant dans la nature et permettrait de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre les contaminants environnementaux (synergie, antagonisme).

# **Références bibliographiques**

Al-Fahmie, Z.H. (2012). Using the biochemical and histological changes of terrestrial snail (*Eobania vermiculata*) as biomarker indicators of pollution of some heavy metals. M.Sc. Thesis, Faculty of science, Taif University.

Al-Mutairi, D.A., Craik, 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.

Amamra R., Djebar M R., Moumeni O., Azzouz Z., Zeriri I., Atailia A., Benosmane S., Berrebbah H., 2015b. Lipid peroxidation, oxidative stress and respiratory metabolism alteration in the freshwater ciliate *Paramecium tetraurelia* exposed to cypermethrin, a pyrethroid insecticide. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 6 (4),115-123.

Amaral, A., da Cunha, H., Rodrigues, A .,2004. The connective tissue index of *Helix aspersa* as a metal biomarker. *BioMetals* 17: 625–629.

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.

Anses : L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, dossier n°2009-1563 – RIDGOLD F (2013) et dossier n° 2009-0872 – PERGADO C PEPITE (2011).

Araab, N., 2004. LES BIOMARQUEURS CHEZ LES POISSONS ET LES BIVALVES : DE L'EXPOSITION A L'EFFET ET DU LABORATOIRE AU TERRAIN. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux. 159p.

Aramini, J. M., Hiraoki, T., Ke, Y., Nitta, K., and Vogel, H. J. (1995). Cadmium-113 NMR studies of bovine and human alpha-lactalbumin and equine lysozyme. *Journal of biochemistry* 117, 623-8.

Arasta T., Bais V.S., Thakur P., 1996. Effect of Nuvan on some biological parameters of Indian catfish, *Mystus vittatus*. *Journal of Environmental Biology*. 17: 167-169.

Atailia, A. 2017. Impact de la pollution industrielle (métaux lourds) sur le développement et la reproduction de l'escargot *Helix aspersa*: Effets sur les biomarqueurs. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. 90p.

Aurousseau, B., 2002. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux : Consequence sur la reproduction, la physiologie et la qualite de leurs produits. *INRA Prod.Anim.* 15(1) ,67-82.

Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Cougnon, M., and Poujeol, P. (2005). Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron* 99, p105-10.

Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Poujeol, P., and Cougnon, M. (2004). Acute study of interaction among cadmium, calcium, and zinc transport along the rat nephron in vivo. *American journal of physiology* 287, F1067-75.

- Barouki R. Linking long-term toxicity of xeno-chemicals with short-term biological adaptation. *Biochimie* 2010 ; 92 : 1222-1226.
- Barker GM (2001). *The Biology of terrestrial molluscs*. Wallingford U.K, C.A.B. International.
- Barker GM (2004). *Natural enemies of terrestrial mollusks*. Wallingford, UK, CABI Publishing 644p.
- Beaumont A et Cassier P (1998). *Travaux pratiques de biologie animale. Zoologie Embryologie Histologie*, Dunod. Paris 502p.
- Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A., 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathy-modiolusazoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol*, 75, p.354–373.
- Beeby A et Richmond L., 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators* 14: 261-270.
- Beeby, A., 1985. The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfer of lead through a polluted ecosystem. *Journal of Applied Ecology* 22, 267-275.
- Belhaouchet, N., 2014. Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution : *Helix aspersa*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. 68 pages.
- Bensouda L, Soltani-Mazouni N. 2014. Measure of oxidative stress and neurotoxicity biomarkers in *Donax trunculus* from the Gulf of Annaba (Algeria): Case of the Year 2012. *Annual Research & Review in Biology* 4(12):1902-1914.
- Berger, B. et Dallinger, R.,1993. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental pollution. *Environmental Monitoring Assessment*, 25: 65-84.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews* 1, 11-21.
- Bertin, G., and Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549-59.
- Beyersmann, D., and Haase, H. (2001). Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* 14, 331-41.
- Beyersmann, D., and Hechtenberg, S. (1997). Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicology and applied pharmacology* 144, 247-61.
- 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.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R. G., and Gluud, C. (2004a). Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, CD004183.

- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R. G., and Gluud, C. (2004b). Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and metaanalysis. *Lancet* 364, 1219-28.
- Blumberg, J., and Block, G. (1994). The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study in Finland. *Nutrition reviews* 52, 242-5.
- Boatman ND, 2007. Impacts of agricultural change on farmland biodiversity in the UK, In: Hester RE, and Harrison RM (eds), Biodiversity under threat, RSC Publishing, Cambridge, UK, pp. 1-32.
- Bochoff, M., Jordaens, K., Baguet, S., Bervoets, L. (2015). Trace metal transfer in a soil-plant-snail microcosm field experiment and biomarker responses in snails. *Ecological Indicators*, 48, 636-648.
- Bocquené, G., Roig, A., Fournier, D., 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase.
- Bonnard, O. M., (2010). Relations « biodisponibilité-genotoxicité-écotoxicité » des hydrocarbures aromatiques polycycliques (hap) dans les sols de friches industrielles. Thèse de doctorat. *Université paul verlaine – metz*, 3-11.
- Bonnefont-Rousselot, D. (1994). Irradiation des membranes cellulaires. *J. Chim. Phys* 91, 968-983.
- Bouaricha, H. 2013. Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium sp.*).Thèse de doctorat de l'université de Annaba. 131pages.
- 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*. Mémoire de magister, Université Badji Mokhtar, Annaba. 74 p.
- Bourbia-Ait Hamlet, S., 2013. Évaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhar, Annaba. 110 pages.
- Bouzenda R, Soltani N, Khebbab MEH. 2017. Assessment of pollution in the Gulf of Annaba (Algeria) by monthly measurements of two biomarkers in a fish species *Liza aurata*. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(1): 366-372.
- Bradford M.M., 1976.A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Brenner, S., (2002). Aluminium neurotoxicity is reduced by dantrolene and dimethyl sulfoxide in cultured rat hippocampal neurons. *Biol Trace Element Res*. 86, 86-89.
- Bride J et Gomot L (1991). "Asynchronous development of the genital-tract during growth and reproduction in the snail, *Helix aspersa*." *Reproduction Nutrition Development* 31(1): 81-96.



- Buchko, G. W., Hess, N. J., and Kennedy, M. A. (2000). Cadmium mutagenicity and human nucleotide excision repair protein XPA: CD, EXAFS and (1)H/(15)N-NMR spectroscopic studies on the zinc(II)- and cadmium(II)-associated minimal DNA-binding domain (M98-F219). *Carcinogenesis* 21, 1051-7.
- Canesi, L., Ciacci, C., Piccoli, G., Stocchi, V., Viarengo, A., Gallo, G., 1998. In vitro and in vivo effects of Heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: The role of glutathione. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 120(2), 261-268.
- Carlsen S, Spliid N et Svensmark B (2006). "Drift of 10 herbicides after tractor spray application. 2. Primary drift (droplet drift)." *Chemosphere* 64(5): 778-786.
- Carpenter D.O., Swann J.W., Yarowsky P.J., 1977. Effect of curare on responses to different putative transmitters in *Aplysia* neurons. *Journal of Neurobiology*. 8(2): 119-132.
- Caswell,H.,2001.Matrix population Models:contruction,analysis,and interpretation,second edition,Sinauer Associates(Eds.),Sunderland,Massachussets,USA,722p.
- Chabicovsky,M., Klepal,W., Dallinger,R.,2003. Mechanisms of cadmium Toxicity in terrestrial pulmonates programmed cell death and metallothioneins overload. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23,648- 655.
- Chandran, R., Sivakumar, A., Mohandass, S., Aruchami, M., 2005 . Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica* . *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140, 422–426.
- Chang, W., and Shoback, D. (2004). Extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptors--an overview. *Cell calcium* 35, 183-96.
- Chevalier L, Desbuquois C, Le Lannic J et Charrier M (2001). "Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata)." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 324(11): 979-987.
- Coeurdassier M, Gomot de Vaufleury A, Saint-Denis M, Ribera D, Narbonne JF et Badot PM (2002). "Effects of dimethoate on snail B-esterase and growth as a function of dose, time and exposure route in a laboratory bioassay." *Biomarkers* 7(2): 138-150.
- Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M., 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: Effects of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 (9): 1951-1957.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipidperoxidation in fresh water bivalves *Unio tumidus* as biomarker of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol Environ Saf*, 38: 122– 131.
- Cotton, F. W., G. (1972). Zinc, cadmium and mercury. *Advanced inorganic chemistry. 3e édition. Interscience Publishers.*, 503.
- Curtin, J. F., Donovan, M., and Cotter, T. G., 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of immunological methods*, 265, 49-72.

- D. Taylor, The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotox. Environ. Safe.* 71(1983) : 33-42.
- Dagnelie, P., 1999. Statistiques théoriques et appliquées. Tome 2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Univ De boeck et Larcier, 659p.
- Dallinger R, Berger B, Triebkorn-Köhler R et Köhler H (2001). Soil biology and ecotoxicology. The biology of terrestrial molluscs. Barker GM. Oxon, CABI: 489- 525.
- Dallinger, R., 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, Lewis Publishers, 245-289.
- Draper, H. H. and Hadley, M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421–431.
- Duchateau Gh., Florkin M., 1959. Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie.* 67(2): 306-314.
- Eeva T, Rainio K et Suominen O (2010). "Effects of pollution on land snail abundance, size and diversity as resources for pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*." *Science of the Total Environment* 408(19): 4165-4169.
- El-Gendy K.S., Radwan M.A., Gad A.F., 2009. In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. *Chemosphere.* 77(3): 339-344.
- El-Gohary, L. R, et Genena, M.A.(2011). Biochemical effect of three molluscicide baits against the two land snails, *Monacaha cantiana* and *Eobania vermiculata* (Gastropoda: Helicidae). *Int.J.Agric.Res.* 6, 682-690.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology.* 7: 88-95.
- El-Shenawy, N.S., Mohammadden, A., et El-Fahmie, Z.H. (2012). Using the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system of the land snail *Eobania vermiculata* as biomarkers of terrestrial heavy metal pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 347-354.
- EL-Wakil , H.B ., Radwan ,M.A., (1991). Biochemical studies on the terrestrial snail, *Eobania vermiculata* (Muller ) treated with some pesticides , *J.Environ .sci .Health* ,B 26, 479-489 .
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., et Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry* 1, 529-39.
- Fassett, D. W. (1975). Cadmium: biological effects and occurrence in the environment. *Annual review of pharmacology* 15, 425-35.
- Fauriskov, B., and Bjerregaard, H. F. (2002). Evidence for cadmium mobilization of intracellular calcium through a divalent cation receptor in renal distal epithelial A6 cells. *Pflugers Arch* 445, 40-50.

- Figueiredo-Pereira, M. E., Yakushin, S., and Cohen, G. (1998). Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 273, 12703-9.
- Filipic, M., and Hei, T. K. (2004). Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutation research* 546, 81-91.
- Filipic, M., Fatur, T., and Vudrag, M. (2006). Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Human & experimental toxicology* 25, 67-77.
- Fisher, D. E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78, 539-42.
- Fleischer, M. C. (1974). Environmental impact of cadmium: a review by the panel on hazardous trace substances. *Environ. Health Perspect.* 7, 253-323.
- FOCUS (2000) FOCUS groundwater scenarios in the EU review of active substances, Report of the FOCUS groundwater scenarios workgroup, EC document reference Sanco/321/2000, rev.2, 202pp.
- Forbes V.A., Forbes T.L., Rivière J.-L., 1997. Écotoxicologie: théorie et applications. Editions Quae, Paris. 424 p.
- Fotakis, G., and Timbrell, J. A. (2006). Modulation of cadmium chloride toxicity by Sulphur amino acids in hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* 20, 641-8.
- Fotakis, G., Cemeli, E., Anderson, D., and Timbrell, J. A. (2005). Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. *Toxicol In Vitro* 19, 481-9.
- Fränzle O (2006). "Complex bioindication and environmental stress assessment." *Ecological Indicators* 6(1): 114-136.
- Frías,E, Abad,R., Aidée C., Nevárez,V, Isidro ,L, Páez,O., Lozan,O., Domenico,V.,2008. Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquatic Toxicology* .89 ,152–157.
- Galan, A., Troyano, A., Vilaboa, N. E., Fernandez, C., de Blas, E., and Aller, P. (2001). Modulation of the stress response during apoptosis and necrosis induction in cadmium-treated U-937 human promonocytic cells. *Biochimica et biophysica acta* 1538, 38-46.
- Galaris, D., Evangelou, A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42, 93-103.
- Geret F, Jouan A, Tupin V, Bebianno MJ, Cosson RP. 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources* 15, 61-66.
- Giaginis, C., Gatzidou, E., and Theocharis, S. (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 213, 282-90.
- Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., and Demnerova, K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation research* 559, 49-57.

- Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., and Demnerova, K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation research* 559, 49-57.
- Giguère Y, Couillard, PGC, Campbell O, Perceval L, Hare B, Pinel-Alloul J, Pellerin J. 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 64, 185–200.
- Gimbert F., Mench M., Coeurdassier C., Badot P.-M. de Vaufleury A., 2008. Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field. *Environmental Pollution*. 152: 736-745.
- Gimbert, F., De Vaufleury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., & Badot, P.- M., 2006. Modelling chronic exposure to contaminated soil: A toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environ. Int.*, 32, 866–875.
- Gimbert, F., de Vaufleury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Badot, P. M., 2006. Modelling chronic exposure to contaminated soil : a toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environnement International* 32,866-875.
- Goering, P. L., Fisher, B. R., and Kish, C. L. (1993). Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 122, 139-48.
- Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J., 1972. Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*. 18: 545-551.
- Gomot A, Gomot L, Boukraa S et Bruckert S (1989). "Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa* - an experimental study of the absorption route for the stimulating factors." *Journal of Molluscan Studies* 55: 1-7.
- Gomot de Vaufleury A (2001). Regulation of growth and reproduction. The biology of terrestrial molluscs. Barker GM. Oxon, CABI: 331-355.
- Gomot, A. (1997). Dose-dependant effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33: 209-216.
- Gomot, A., 1994. Contribution à l'étude de la croissance d'escargots du genre *Helix* : influence de facteurs de l'environnement, nutrition et composition biochimique, contrôle neuroendocrine. *Doctorat Sciences de la Vie*, n°398, Université de Besançon, France.
- 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. *Environmental Sciences and Technology*. 34: 1865-1870.
- Gomot-de Vaufleury A., Keroas I., 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 64: 434-442.
- Goyer, R. (1996). Toxic effects of metals. In *Casarett and Doull's Toxicology (Curtis D. Klaassen, Ed)*, McGraw-Hill, pp. 691-736.

Grara N., Boucenna M., Atailia A., Berrebbah H., Djebar M.R., 2012. Stress oxydatif des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-Est algérien) chez l'escargot *Helix aspersa*. *Environnement, Risques & Santé*. 11(3): 221-229.

Grara, N., 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux .Thèse de doctorat de l'université de Annaba.120 ,91 pages.

Guidance document on the assessment of the relevance of metabolites in groundwater of substances regulated under Council directive 91/414/EEC. Sanco/221/2000-rev4, 25 February 2003.

Gutteridge, J., 1992. Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm*, 19, 598-620.

Halliwell, B., and Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition* 57, 715S-724S; discussion 724 S- 725 S.

Hames,C.A.C. and Hopkin, S.P., 1989. 'The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods', *J. Zool. (Lond.)* 217, 599–627.

Hanna, P.M., Mason, R.P., 1992. Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu (I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spintrapping technique. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 295, 205-13.

Hansen, B. H., Romma, S., Garmo, O. A., Pedersen, S. A., Olsvik, P. A., and Andersen, R. A. (2007). Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere* 67, 2241-9.

Hansen, J. M., Zhang, H., and Jones, D. P. (2006). Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free radical biology & medicine* 40, 138-45.

Hartwig, A. (2001). Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxidants & redox signaling* 3, 625-34.

Haszprunar G. 1996 The molluscan rhogocyte (pore-cell, blasenzelle, cellule nucale), and its significance for ideas on nephridial evolution. *J Moll Stud* 62, 185–211.

He, L., Girijashanker, K., Dalton, T. P., Reed, J., Li, H., Soleimani, M., and Nebert, D. W. (2006). ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. *Molecular pharmacology* 70, 171-80.

He, Z. L., Yang, X. E., and Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol* 19, 125-40.

Heusser S., Dupuy H.G., 2011. SYNTHÈSE de la structure tissulaire à la réalisation des fonctions chez les Gastéropodes Pulmonés (I) Eléments d'histologie et de physiologie des espèces *Helix aspersa* et *Helix pomatia*. *Folia chonchiliologica* 10: 3-25.

Hengstler, J. G., Bolm-Audorff, U., Faldum, A., Janssen, K., Reifenrath, M., Gotte, W., Jung, D., Mayer-Popken, O., Fuchs, J., Gebhard, S., Bienfait, H. G., Schlink, K., Dietrich, C., Faust,

- D., Epe, B., and Oesch, F. (2003). Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* 24, 63-73.
- Hengstler, J. G., Pilch, H., Schmidt, M., Dahlenburg, H., Sagemuller, J., Schiffer, I., Oesch, F., Knapstein, P. G., Kaina, B., and Tanner, B. (2001). Metallothionein expression in ovarian cancer in relation to histopathological parameters and molecular markers of prognosis. *International journal of cancer* 95, 121-7.
- Hiatt, V. H., JE. (1975). The environmental impact of cadmium: an overview. *Int. J. Environ.* 7, 277-285.
- Hiratsuka, H., Katsuta, O., Toyota, N., Tsuchitani, M., Umemura, T., and Marumo, F. (1996). Chronic cadmium exposure-induced renal anemia in ovariectomized rats. *Toxicology and applied pharmacology* 137, 228-36.
- Hopkin, S.P., 1995. Deficiency and excess of essential and non-essential metals in terrestrial insects, In: Harrington, R., Stork, N.E., (Eds.), *Insects in a Changing Environment*, Academic Press, London 251-270.
- Horiguchi, H., Teranishi, H., Niiya, K., Aoshima, K., Katoh, T., Sakuragawa, N., and Kasuya, M. (1994). Hypoproduction of erythropoietin contributes to anemia in chronic cadmium intoxication: clinical study on Itai-itai disease in Japan. *Archives of toxicology* 68, 632-6.
- Huang, C.J., Fwu, M. (1993). Degree of Protein Deficiency Affects the Extent of the Depression of the Antioxidative Enzyme Activities and the Enhancement of Tissue Lipid Peroxidation in Rats. *The Journal of Nutrition* 123, 803-810.
- Huang, M., Krepiy, D., Hu, W., and Petering, D. H. (2004a). Zn-, Cd-, and Pb-transcription factor IIIA: properties, DNA binding, and comparison with TFIIIA-finger 3 metal complexes. *Journal of inorganic biochemistry* 98, 775-85.
- Huang, M., Shaw, I. C., and Petering, D. H. (2004b). Interprotein metal exchange between transcription factor IIIa and apo-metallothionein. *Journal of inorganic biochemistry* 98, 639-48.
- Huang, Y. H., Shih, C. M., Huang, C. J., Lin, C. M., Chou, C. M., Tsai, M. L., Liu, T. P., Chiu, J. F., and Chen, C. T. (2006). Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *Journal of cellular biochemistry* 98, 577-89.
- IARC, I. a. f. r. o. c. (1993). Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. In: *International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans*. IARC Scientific Publications, Lyon. 58, 119-237.
- 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.
- J.F.Chiffolleau, J.L.Gonzalez, P. Miramand, & B.Thouvenin, . Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire. Programme scientifique Seine-Aval 10 (1999): 31 p.
- Jarup, L. (2002). Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 2, 35-9.



Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin* 68, 167-82.

Kappus H., 1987. Oxidative stress in chemical toxicity. *Archives of Toxicology*. 60: 144-149.  
Kerney M, Cameron R et Bertrand A (2006). A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, Delachaux et Niestlé SA.

Khebbeb MEH, Nadji S, Amrani A. 2010. The effect of cadmium exposure on malonedialdehyde and reduced glutathione concentrations in several tissues of a bivalve mollusc (*Ruditapes decussatus*) fished from Mellah lagoon (North East of Algeria). *Annals of Biological Research* 1 (2) :166-173.

Kiss, T., and Osipenko, O. N. (1994). Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacological reviews* 46, 245-67.

Klaassen, C. D., and Lehman-McKeeman, L. D. (1989). Regulation of the isoforms of metallothionein. *Biological trace element research* 21, 119-29.

Klaassen, C. D., Liu, J., and Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39, 267- 94.

Klaassen, C. H., Jeunink, M. A., Prinsen, C. F., Ruers, T. J., Tan, A. C., Strobbe, L. J., and Thunnissen, F. B. (2003). Quantification of human DNA in feces as a diagnostic test for the presence of colorectal cancer. *Clinical chemistry* 49, 1185-7.

Klobucar, G.I.V., Lajtner, J. et Erben, R.,1997. Lipid peroxydation and histopathological changes in the digestive gland of a freshwater Planorbis corneus L. (Gastropoda: Pulmonata) exposed to chronic and sub-chronic concentrations of PCP. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 58, 128-134.

Kopera, E., Schwerdtle, T., Hartwig, A., and Bal, W. (2004). Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. *Chemical research in toxicology* 17, 1452-8.

Kruatrachue, M., Sumritdee, C., Pokethitiyook, P., Singhakaew., S. 2011. Histopathological effects of contaminated sediments on golden apple snail (*Pomacea canaliculata*, Lamarck 1822). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(6),610–614.

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

Lagadic, L., Caquet T. et Amiard J.C., 1997. Biomarqueurs en ecotoxicologie : principes et definitions, in Masson, ed., Biomarqueurs en ecotoxicologie - Aspects fondamentaux: Paris, 1-10.

Laskowski, R. et Hopkin, S.P. (1996a). Effect of Zn, Cu, Pb and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34(1): 59-69.

Laskowski, R. et Hopkin, S.P. (1996b). Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): implications for predators. *Environmental Pollution*, 91(3): 289-297.

- Laskowski, R., Hopkin, P., 1995 . Accumulation of Zn, Cu, Pb, and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*) : Implication for Predators . *Environmental Pollution*, 91, 289-297.
- Lawton, L.J., Donaldson, W.E., 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research*, 28, 83–97.
- Le Calve D (1989). "Influence des conditions d'incubation des oeufs sur les six premières semaines de la croissance d'escargots petits-gris, *Helix aspersa* Müller (Gasteropode, Pulmone, Stylommatophore)." *Bulletin de la Société zoologique de France* 114: 101-110.
- Lopez, E., Arce, C., Oset-Gasque, M. J., Canadas, S., and Gonzalez, M. P. (2006). Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free radical biology & medicine* 40, 940-51.
- Luchtel DL, Deyrup-Olsen I. 2001 Body wall: form and function. In: Barker GM, ed. *The Biology of Terrestrial Molluscs*. Wallingford: CABI Publishing: 147–178.
- Liu, S., Dang, Y., Fang, Z., Xie, N., *Grey System Theory and Its Application*. Science Press, Beijing China, 2010.
- Lymburner, D. (1974). Environmental contaminants inventory. *The production, use and distribution of cadmium in Canada, Centre canadien des eaux intérieures, Direction des eaux intérieures, Ottawa. Report Series.*, 39.
- Machreki-Ajmi M, Ketata I, Ladhar-Chaabouni R, Hamza-Chaffai A. 2008. The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. *Ecotoxicology* 17, 1–11.
- Marasco F et Murciano C (2003). *Les escargots*. Elevage. Paris, Editions de Vecchi.
- Matozzo V, Binelli A, Parolini M, Previato M, Masiero L, Finos L et al. 2012. Biomarkers responses in the Clam *Ruditapes philippinarum* and contamination levels in sediments from seaward and landward sites in the lagoon of Venice. *Ecological Indicators* 19:191-205.
- Marigomez, I., Kortabitarte, M., Dussart, G.B.J., 1998. Tissue-level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 167e176.
- Marigomez, I., Soto, M., Kortabitarte, M., 1996. Tissue-level biomarkers and biological effect of mercury on sentinel slugs, *Arion ater*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 54–62.
- Martoja R, Martoja-Pierson M. 1970 *Técnicas de Histología Animal*. Barcelona: Toray Masson S.A.
- McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., Dishburger H.J. (1981), Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis, In: Test protocols for environmental fate and movement of toxicants, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington , Va., USA.
- McCarthy J.F., Shugart L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination, *in* Journal of McCarthy F., and Shugart L.R., eds., *Biomarkers of environmental contamination*: Boca Raton, FL, USA, Lewis Publishers. 3-16.



- McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M., Yu H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 2085-2092.
- Mebarki R, Khebbab MEH, Soltani N. 2015. Biomonitoring of El Mellah Lagoon (Northeast, Algeria): Seasonal variation of biomarkers in *Cerastoderma glaucum* (Mollusc, Bivalvia).
- Meister A., Anderson M.E., 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*. 52: 711-760.
- Misra, U. K., Gawdi, G., Akabani, G., and Pizzo, S. V. (2002). Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cellular signalling* 14, 327-40.
- Moumeni O., Berrebbah H., Azzouz Z., Amamra R., Otmani H., Alayat A., Benosmane S., Djebbar M.R., 2016. Effects of Cycloxydim on Population Growth, Phagocytosis, Contractile Vacuole Activity and Antioxidant Responses in the Freshwater Ciliate (*Paramecium tetraurelia*). *Res. J. Environ. Toxicol.*, vol 10 (2): 115125,
- Moussard C., 1999. La biochimie, Biochimie structurale et métabolique, Médecine, Pharmacie, Sciences. De Boek&Larciers.a., Bruxelles. 294 p.
- Nawrot, T., Plusquin, M., Hogervorst, J., Roels, H. A., Celis, H., Thijs, L., Vangronsveld, J., Van Hecke, E., and Staessen, J. A. (2006). Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *The lancet oncology* 7, 119-26.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., 2005 .Heavy metal concentration in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental pollution* ,138,178-190.
- Notten., M. J. M., Oosthoek, A. J. P., Rozema, J., Aerts, R., 2006. Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the landsnail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. *Ecotoxicology*, 15, 295-3.
- Nzengue, Y., 2008. Comparaison des mecanismes de toxicite redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des metallothioneines et de P53. These de doctorat, Universite JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1, France .299 pages.
- O'Brien, P., and Salacinski, H. J. (1998). Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Archives of toxicology* 72, 690-700.
- Oh, S. H., Choi, J. E., and Lim, S. C. (2006). Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology* 220, 1-12.
- Owen G.,1966 .Digestion. In: Wilbur KM, Yonge CM, eds.*Physiology of Mollusca*, Vol 2, New York: Academic Press:53–96.
- Otmani, H. 2018. Evaluation de la toxicité de quelques métaux lourds sur le comportement d'un modèle animal du groupe des Coelomates. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. 120 pages.

- Padmaja J.R., Rao M.B., 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail, *Bellammyadissimillis* (Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53: 142-148.
- Payne J.F., Mathieu A., Melvin W., Fancey L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*. 32: 225-231.
- Pellerin -Massicotte J., 1997. Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal de Recherche Océanographique*. 22: 91-98.
- Pergher G, Gubiani R et Tonetto G (1997). "Foliar deposition and pesticide losses from three air-assisted sprayers in a hedgerow vineyard." *Crop Protection* 16(1): 25-33.
- Potts, R. J., Watkin, R. D., and Hart, B. A. (2003). Cadmium exposure down-regulates 8-oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology* 184, 189-202.
- Predki, P. F., and Sarkar, B. (1994). Metal replacement in "zinc finger" and its effect on DNA binding. *Environmental health perspectives* 102 Suppl 3, 195-8.
- Rabitsch, W.B., 1996. Metal accumulation in terrestrial pulmonates at a Lead/zinc smelter site in Arnoldstein, Austria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56:734-741.
- Radi, F., Beckman, J.S., Busch, K.N., Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulhydryls. The cytotoxic potential of superoxyde and nitrite oxyde. *J. Biol. Chim.*, 266, 4244-4250.
- Radwan M.A., Essawy A.E., Abdelmeguid N.E., Hamed S.S., Ahmed A.E., 2008. Biochemical and histochemical on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pesticides Biochemistry and Physiology*. 90: 154- 167.
- Radziun, E., Dudkiewicz Wilkzynska, J., Ksiazek, I., Nowak, K., Anuszewka, E. L., Kunicki, A., Olszina, A., Zabkowski, T. (2011). Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicology in vitro*. 25(8), 1684-1700.
- Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006.
- Regoli F, Gorbi S, Fattorini D, Tedesco S, Notti A, Machella N, Bocchetti R, Benedetti M et Piva F (2006). "Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicological effects of urban pollution: an integrated approach." *Environmental Health Perspectives* 114(1): 63-69.
- Regoli, F., 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 organism for

monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environ. Health Perspect.* 114, 63–69.

Ribera, D., Narbonne, J.F., Michel, X., Livingstone, D.R. et O'hara, S., 1991. Responses of antioxydants and lipid peroxydation in mussels to oxydative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 100, 178-181.

Ringwood AH, Conner DF, Keppler CJ, A.A. Dinovo AA. 1999. Biomarker studies with juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) deployed in-situ Biomarkers, 4, 400 - 414.

Roméo M, Gnassia-Barelli M. 1997. Effect of Heavy Metals on Lipid Peroxidation in the Mediterranean Clam *Ruditapes decussatus* Comparative Biochemistry and Physiology 118, 33-37.

Russell-Hunter, W.D. (1983). Overview: Planetary distribution and ecological constraints upon the Mollusca. In *The Mollusca Vol 6: Ecology*, Ed W.D. Russell-Hunter, Academic Press, London, 1-27.

Salama A.K., Osman K.A., Saber N.A., Soliman S.A., 2005. Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 8: 92-96.

Satarug, S., and Moore, M. R. (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental health perspectives* 112, 1099-103.

Schmidt, G. H., Ibrahim, N. M. M., 1994. Heavy metal content (Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>) in various body parts: its impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adults. *Ecotoxicol Environ Saf*, 29, 148-164.

Schilling, B., Lerch, K., 1995. Cloning, sequencing and heterologous expression of the monoamine oxidase gene from *Aspergillus niger*. *Molecular and General Genetics MGG*, 247:430-438.

Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyneck, C., Newhall, A., and Freidman, L., 1966. A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt. Biochem*, 19, 415-428.

Simkiss K., Watkins B., 1991. Differences in zinc uptake between snails (*Helix aspersa* Müller) from metal- and bacteria-polluted sites. *Functional Ecology*. 5: 787-794.

Soltani N, Amira N, Sifi K, Beldi H.2012. Environmental monitoring of the Annaba Gulf (Algeria) : Measurement of biomarkers in *Donax trunculus* and metallic pollution. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 137(1-4):51-60.

Soto M, Lekube X, Marigómez I. 1999 Autometallographical localization of Cu and Zn within target cell compartments of winkles following exposure to Cu & Zn mixtures. *Eur J Histochem* 43, 323–334.

- Stohs, S. J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology & medicine* 18, 321-36.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E., and Bagchi, M. (2000). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19, 201-13.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E., and Bagchi, M. (2001). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20, 77-88.
- Swaileh K.M., Ezzughayyar A., 2000. Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 47: 253-260.
- Swaileh K.M., Ezzughayyar A., 2001. Dose-dependent effects of dietary Pb and Zn on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 50: 9-14.
- Szuster-Ciesielska, A., Stachura, A., Slotwinska, M., Kaminska, T., Sniezko, R., Paduch, R., Abramczyk, D., Filar, J., and Kandefer-Szerszen, M. (2000). The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 145, 159-71.
- Tadjine, A., 2007. Impact de la pollution atmosphérique d'origine particulaire sur deux modèles (le rat et le lapin). Approche histologique, biochimique, hématologique et toxicologique. Thèse de doctorat. Université de Annaba .104 pages.
- Thit, A., Banta, J. T., Selk, H., (2015). Bioaccumulation, subcellular distribution and toxicity of sediment-associated copper in the ragworm *Nereis diversicolor*. The relative importance of aqueous copper, copper oxide nanoparticles. *Environmental Pollution*. 202, 50-57.
- Thit, A., Selk, H., Bjerrgaard, H. F., (2013). Toxicity of CuO nanoparticles and Cu ions to tight epithelial cells from *Xenopus laevis* (A6). Effect of proliferation, cell cycle progression and cell death. *Toxicology in vitro*. 27(5), 1596-1601.
- Tlili S, Minguez L, Giamberinic L, Geffard A, Boussetta H, Mouneyraca C. 2013. Assessment of the health status of *Donax trunculus* from the Gulf of Tunis using integrative biomarker indices. *Ecological Indicators* 32:285-293.
- Trinchella, F., Riggio, M., Filosa, S., Volpe, M. G., Parisi, E., and Scudiero, R. (2006). Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144, 272-8.
- Tiszczenko, E., Olen'ska, O., Aleksandrowicz Winston G.W., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative biochemistry and Physiology*. 100C: 173-176.
- US NTP (2000). *Ninth report on carcinogens. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC, USA*.
- Valko, M., Morris, H., and Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry* 12, 1161-208.

- Verougstraete, V., Lison, D., and Hotz, P. (2002). A systematic review of cytogenetic studies conducted in human populations exposed to cadmium compounds. *Mutation research* 511, 15-43.
- Viard-La Rocca, B., 2004. Mise au point et validation sur sites contaminés (ETM-HAP) gastéropode terrestre *Hélix aspersa*. Thèse de doctorat. *Université de Metz, France*. 222 pages.
- Viarengo L, Canesi M, Pertica G, Poli MN, Moore M. Orunesay M. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *mytilus galloprovincialis* lam. *Comparative Biochemistry and Physiology* 97, 37-42.
- Vidal.ML ., 2001.Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalves d'eau douce *Corbicula fluminea*(Muller)- Purification et caraterisation des Glutathion S-Transférases .Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux .267 ,p.15,17.
- Vischetti C, Cardinali A, Monaci E, Nicelli M, Ferrari F, Trevisan M et Capri E (2008). "Measures to reduce pesticide spray drift in a small aquatic ecosystem in vineyard estate." *Science of the Total Environment* 389(2-3): 497-502.
- Waalkes, M. P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutation research* 533, 107-20.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95-117.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95-117.
- Wang W.X., Rainbow P.S., 2005. Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61: 145-159.
- Wang, A. Y., Bobryshev, Y. V., Cherian, S. M., Liang, H., Tran, D., Inder, S. J., Lord, R. S., Ashwell, K. W., and Farnsworth, A. E. (2001a). Expression of apoptosis-related proteins and structural features of cell death in explanted aortocoronary saphenous vein bypass grafts. *Cardiovascular surgery (London, England)* 9, 319-28.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., and Rao, K. M. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 36, 1434-43.
- Wang, Z., Jiang, C., Ganther, H., and Lu, J. (2001b). Antimitogenic and proapoptotic activities of methylseleninic acid in vascular endothelial cells and associated effects on PI3K-AKT, ERK, JNK and p38 MAPK signaling. *Cancer research* 61, 7171-8.
- Watjen, W., and Beyersmann, D. (2004). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* 17, 65-78.
- Watjen, W., Cox, M., Biagioli, M., and Beyersmann, D. (2002a). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9-activation. *Biometals* 15, 15-25.

- Watjen, W., Haase, H., Biagioli, M., and Beyersmann, D. (2002b). Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. *Environmental health perspectives* 110 Suppl 5, 865-7.
- Watjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkotter, A., Tran-Thi, Q. H., Proksch, P., and Kahl, R. (2005). Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *The Journal of nutrition* 135, 525-31.
- Weckberker, G. and Cory, G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemial 1210 cells in vitro. *Cancer letters* 40: 257-264.
- Weiss K.R., Brezina V., Cropper E.C., Heierhorst J., Hooper S.L., Probst W.C., Rosen S.C., Vilim F.S., Kupfermann I., 1993. Physiology and biochemistry of peptidergic cotransmission in: *Aplysia*. *Journal of Physiology*. 87: 141-151.
- Who (1992). Cadmium. *Environmental Health Criteria*. World Health Organization, Geneva.
- Witten, I.H., Frank, E. 2000. Data Mining: Pratical machine learning tools and techniques with java implementation. *Morgan Kaufmann Publishers*, San Franciscio, California.
- Włostowski T., Kozłowski P., Łaskiewicz B., 2014. Accumulation of Cadmium in and Its Effect on the Midgut Gland of Terrestrial Snail *Helix pomatia* L. from Urban Areas in Poland. *Bull Environ Contam Toxicol*. 93:526–531.
- Wu R.S.S., Siu W.H.L., Shin P.K.S., 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*. 51: 623-634.
- Youngs, H. L., Sundaramoorthy, M., and Gold, M. H. (2000). Effects of cadmium on manganese peroxidase competitive inhibition of MnII oxidation and thermal stabilization of the enzyme. *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 1761-9.
- Zaldibar, B., Cancio, I., Soto, M., Marigomez, I., 2007. Digestive cell turnover in digestive gland epithelium of slugs experimentally exposed to a mixture of cadmium and kerosene. *Chemosphere* ,70, 144-154.
- Zaldibar,B., Cancio,I., Soto,M., Marigomez,I.,2008. Changes in cell-type composition in digestive gland of slugs and its influence in biomarkers following transplantation between a relatively unpolluted and a chronically metal-polluted site. *Environmental Pollution* (156)367-379.

# **Annexes**

## Annexes

### Annexe 1. Tableaux de la réalisation de la gamme d'étalonnage

Annexe 1.1. Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines hépatopancréatiques.

<i>Tubes</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<i>Solution mère de BSA (<math>\mu\text{g}</math>)</i>	0	20	40	60	80	100
<i>Eau distillée (<math>\mu\text{l}</math>)</i>	100	80	60	40	20	0
<i>BBC (ml)</i>	4	4	4	4	4	4

Annexe 1.2. Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des glucides hépatopancréatiques.

<i>Tubes</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<i>Solution mère de glucose (<math>\mu\text{l}</math>)</i>	0	20	40	60	80	100
<i>Eau distillée (<math>\mu\text{l}</math>)</i>	100	80	60	40	20	0
<i>Anthrone (ml)</i>	4	4	4	4	4	4

Annexe 1.3. Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des lipides hépatopancréatiques.

<i>Tubes</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<i>Solution mère de lipides (<math>\mu\text{l}</math>)</i>	0	20	40	60	80	100
<i>Solvant éther/chloroforme (1V/1V) (<math>\mu\text{l}</math>)</i>	100	80	60	40	20	0
<i>Vanilline (ml)</i>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5



## Annexe 2 : Valeurs prédictives du poids des escargots

```
+-----+
+----- dataSet: POIDS Témoin -----+
+-----+
['Poids (g)', 'Témoin ', 'Durées de traitement (Jours)']
['8.51231', '1', '0']
['9.03941', '1', '15']
['9.334367', '1', '30']
['10.03105', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ Poids prévu au temps t+1: 10.0783 -----+
+-----+
```

Annexe 2.1. Valeur prédictive du poids des escargots témoins.

```
===== RESTART: C:\PYTHON\GM1NPoids_cd1.py =====
+-----+
+----- dataSet: POIDS Cd1 -----+
+-----+
['Poids (g)', 'Cadmium D1(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['8.1269', '0.2', '0']
['9.22675714', '0.2', '15']
['9.07588', '0.2', '30']
['9.041675', '0.2', '90']
+-----+
+-----+
+ Poids prévu au temps t+1: 9.0387 -----+
+-----+
>>> |
```

Annexe 2.2. Valeur prédictive du poids des escargots traités par le cadmium à 200µg/l.

```
===== RESTART: C:\PYTHON\GM1NPoids_cd1.py =====
+-----+
+----- dataSet: POIDS Cd2 -----+
+-----+
['Poids (g)', 'Cadmium D2(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['7.93674444', '0.4', '0']
['8.701975', '0.4', '15']
['8.3602', '0.4', '30']
['8.21928', '0.4', '90']
+-----+
+-----+
+ Poids prévu au temps t+1: 8.2165 -----+
+-----+
~ ~ ~
```

Annexe 2.3. Valeur prédictive du poids des escargots traités par le cadmium à 400µg/l.

```
+-----+
+----- dataSet: POIDS Cd3 -----+
+-----+
['Poids (g)', 'Cadmium D3(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['7.74165556', '0.8', '0']
['8.2633', '0.8', '15']
['8.28144', '0.8', '30']
['8.05782', '0.8', '90']
+-----+
+-----+
+ Poids prévu au temps t+1: 8.0376 -----+
+-----+
```

Annexe 2.4. Valeur prédictive du poids des escargots traités par le cadmium à 800µg/l

```

+-----+
+----- dataSet: POIDS F1 -----+
+-----+
['Poids (g)', 'Fongicide D1(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['7.89098889', '0.5', '0']
['9.079475', '0.5', '15']
['8.76496', '0.5', '30']
['8.721475', '0.5', '90']
+-----+
+-----+
+ Poids prévu au temps t+1: 8.7188 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 2.5.** Valeur prédictive du poids des escargots traités par le fongicide à 0.5g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: POIDS F2 -----+
+-----+
['Poids (g)', 'Fongicide D2(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['8.47145556', '1', '0']
['9.44191111', '1', '15']
['9.31331667', '1', '30']
['9.2083', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ Poids prévu au temps t+1: 9.1997 -----+
+-----+

```

**Annexe 2.6.** Valeurs prédictives du poids des escargots traités par le fongicide à 1g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: POIDS F3 -----+
+-----+
['Poids (g)', 'Fongicide D3(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['8.05623333', '2', '0']
['8.85983333', '2', '15']
['8.30015', '2', '30']
['8.029825', '2', '90']
+-----+
+-----+
+ Poids prévu au temps t+1: 8.0328 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 2.7.** Valeurs prédictives du poids des escargots traités par le fongicide à 2g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: POIDS M1 -----+
+-----+
['Poids (g)', 'Mixture M1(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['8.08324444', '0.7', '0']
['8.98528889', '0.7', '15']
['8.66942', '0.7', '30']
['8.50808', '0.7', '90']
+-----+
+-----+
+ Poids prévu au temps t+1: 8.5016 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 2.8.** Valeur prédictive du poids des escargots traités par le cocktail cadmium/fongicide (200µg + 0.5g).

```

+-----+
+----- dataSet: POIDS -----+
+-----+
['Poids (g)', 'Mixture M2(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['8.194933333', '1.4', '0']
['8.955233333', '1.4', '15']
['8.370425', '1.4', '30']
['8.2006', '1.4', '90']
+-----+
+-----+
+ Poids prévu au temps t+1: 8.2052 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 2.9.** Valeur prédictive du poids des escargots traités par le cocktail cadmium/fongicide (400µg + 1g).

```

+-----+
+----- dataSet: POIDS M3 -----+
+-----+
['Poids (g)', 'Mixture M3(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['7.6621667', '2.8', '0']
['8.0734125', '2.8', '15']
['7.78985', '2.8', '30']
['7.1287', '2.8', '90']
+-----+
+-----+
+ POIDS prévu au temps t+1: 7.1018 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 2.10.** Valeur prédictive du poids des escargots traités par le cocktail cadmium/fongicide (800µg + 2g).

### Annexe 3 : Valeurs prédictives du poids de l'hépatopancréas

```

+-----+
+----- dataSet: Hépat0 Témoin -----+
+-----+
["Poids de l'hépat0", 'Témoin(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.2133', '1', '15']
['2.379586667', '1', '30']
['2.49788', '1', '45']
['2.626933333', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ Hépat0 prévu au temps t+1: 2.6433 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 3.1.** Valeur prédictive du poids de l'hépatopancréas des escargots témoins.

```

+-----+
+----- dataSet: Hépat0 Cd1 -----+
+-----+
["Poids de l'hépat0", 'Cadmium D1(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['1.888333333', '0.2', '15']
['1.798066667', '0.2', '30']
['1.801354122', '0.2', '45']
['1.9263', '0.2', '90']
+-----+
+-----+
+ Hépat0 prévu au temps t+1: 1.9127 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 3.2.** Valeur prédictive du poids de l'hépatopancréas des escargots traités par le cadmium à 200µg/l.

```

+-----+
+----- dataSet: HépatO Cd2 -----+
+-----+
["Poids de l'hépatO", 'Cadmium D2(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['1.775333333', '0.4', '15']
['1.722133333', '0.4', '30']
['1.729899601', '0.4', '45']
['2.0269', '0.4', '90']
+-----+
+-----+
+ HépatO prévu au temps t+1: 1.9771 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 3.3.** Valeur prédictive du poids de l'hépatopancréas des escargots traités par le cadmium à 400µg/l.

```

+-----+
+----- dataSet: HépatO Cd3 -----+
+-----+
["Poids de l'hépatO", 'Cadmium D3(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['1.849', '0.8', '15']
['1.592266667', '0.8', '30']
['1.572500234', '0.8', '45']
['1.558733333', '0.8', '90']
+-----+
+-----+
+ HépatO prévu au temps t+1: 1.5611 -----+
+-----+
<<<

```

**Annexe 3.4.** Valeur prédictive du poids de l'hépatopancréas des escargots traités par le cadmium à 800µg/l.

```

+-----+
+----- dataSet: HépatO F1 -----+
+-----+
["Poids de l'hépatO", 'Fongicide D1(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.206566667', '0.5', '15']
['2.0183', '0.5', '30']
['1.831611111', '0.5', '45']
['1.940166667', '0.5', '90']
+-----+
+-----+
+ HépatO prévu au temps t+1: 1.9131 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 3.5.** Valeur prédictive du poids de l'hépatopancréas des escargots traités par le fongicide à 0.5g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: HépatO F2 -----+
+-----+
["Poids de l'hépatO", 'Fongicide D2(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.2163', '1', '15']
['2.149666667', '1', '30']
['2.111154451', '1', '45']
['2.105866667', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ HépatO prévu au temps t+1: 2.1062 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 3.6.** Valeur prédictive du poids de l'hépatopancréas des escargots traités par le fongicide à 1g/l

```

+-----+
+----- dataSet: Hépat0 F3 -----+
+-----+
["Poids de l'hépat0", 'Fongicide F3(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.147933333', '2', '15']
['1.764866667', '2', '30']
['1.726498511', '2', '45']
['1.702366667', '2', '90']
+-----+
+-----+
+ Hépat0 prévu au temps t+1: 1.708 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 3.7.** Valeur prédictive du poids de l'hépatopancréas des escargots traités par le fongicide à 2g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: Hépat0 M1 -----+
+-----+
["Poids de l'hépat0", 'Mixture M1(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.1994', '0.7', '15']
['2.271933333', '0.7', '30']
['2.284200123', '0.7', '45']
['2.359', '0.7', '90']
+-----+
+-----+
+ Hépat0 prévu au temps t+1: 2.3597 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 3.8.** Valeur prédictive du poids de l'hépatopancréas des escargots traités par la mixture cadmium/fongicide (200µg + 0.5g).

```

+-----+
+----- dataSet: Hépat0 M2 -----+
+-----+
["Poids de l'hépat0", 'Mixture M2(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.072166667', '1.4', '15']
['1.945766667', '1.4', '30']
['2.00451', '1.4', '45']
['2.058633333', '1.4', '90']
+-----+
+-----+
+ Hépat0 prévu au temps t+1: 2.0568 -----+
+-----+
<<<

```

**Annexe 3.9.** Valeur prédictive du poids de l'hépatopancréas des escargots traités par la mixture cadmium/fongicide (400µg + 1g).

```

+-----+
+----- dataSet: Hépat0 M3 -----+
+-----+
["Poids de l'hépat0", 'Mixture M3(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['1.959633333', '2.8', '15']
['1.560466667', '2.8', '30']
['1.55034', '2.8', '45']
['1.451866667', '2.8', '90']
+-----+
+-----+
+ Hépat0 prévu au temps t+1: 1.473 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 3.10.** Valeur prédictive du poids de l'hépatopancréas des escargots traités par la mixture cadmium/fongicide (800µg + 2g).

## Annexe 4 : Valeurs prédictives du taux des protéines totales.

```
+-----+
+----- dataSet: Protéines Témoin -----+
+-----+
['Protéines', 'Témoin(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['14.27847061', '1', '15']
['14.76468349', '1', '30']
['14.44366213', '1', '45']
['14.73322754', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ Protéines prévu au temps t+1: 14.7252 -----+
+-----+
>>>
```

### Annexe 4.1. Valeur prédictive du taux des protéines totales des escargots témoins.

```
+-----+
+----- dataSet: Protéines Cd1 -----+
+-----+
['Protéines', 'Cadmium D1(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['11.91497753', '0.2', '15']
['14.55454259', '0.2', '30']
['13.98452202', '0.2', '45']
['14.55454259', '0.2', '90']
+-----+
+-----+
+ Protéines prévu au temps t+1: 14.586 -----+
+-----+
>>>
```

### Annexe 4.2. Valeur prédictive du taux des protéines totales des escargots traités par le cadmium à 200µg/l.

```
+-----+
+----- dataSet: Protéines Cd2 -----+
+-----+
['Protéines', 'Cadmium D2(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['18.03053134', '0.4', '15']
['13.45891047', '0.4', '30']
['14.00956522', '0.4', '45']
['13.92690105', '0.4', '90']
+-----+
+-----+
+ Protéines prévu au temps t+1: 13.9508 -----+
+-----+
>>>
```

### Annexe 4.3. Valeur prédictive du taux des protéines totales des escargots traités par le cadmium à 400µg/l.

```
+-----+
+----- dataSet: Protéines Cd3 -----+
+-----+
['Protéines', 'Cadmium D3(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['12.30640037', '0.8', '15']
['15.81211403', '0.8', '30']
['15.91664555', '0.8', '45']
['16.77918271', '0.8', '90']
+-----+
+-----+
+ Protéines prévu au temps t+1: 16.929 -----+
+-----+
>>>
```

### Annexe 4.4. Valeur prédictive du taux des protéines totales des escargots traités par le cadmium à 800µg/l.

```

+-----+
+----- dataSet: Protéines F1 -----+
+-----+
['Protéines', 'Fongicide D1(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['15.92587506', '0.5', '15']
['15.14054823', '0.5', '30']
['14.86675851', '0.5', '45']
['14.56120876', '0.5', '90']
+-----+
+-----+
+ Protéines prévu au temps t+1: 14.5813 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 4.5.** Valeur prédictive du taux des protéines totales des escargots traités par le fongicide à 0.5g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: Protéines F2 -----+
+-----+
['Protéines', 'Fongicide D2(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['9.268517989', '1', '15']
['14.93709797', '1', '30']
['12.3235332', '1', '45']
['11.45756099', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ Protéines prévu au temps t+1: 11.4058 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 4.6.** Valeur prédictive du taux des protéines totales des escargots traités par le fongicide à 1g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: Protéines F3 -----+
+-----+
['Protéines', 'Fongicide D3(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['6.948075055', '2', '15']
['15.51740088', '2', '30']
['16.3338462', '2', '45']
['17.20765931', '2', '90']
+-----+
+-----+
+ Protéines prévu au temps t+1: 17.7477 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 4.7.** Valeur prédictive du taux des protéines totales des escargots traités par le fongicide à 2g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: Protéines M1 -----+
+-----+
['Protéines', 'Mixture M1(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['6.500188668', '0.7', '15']
['14.3877472', '0.7', '30']
['13.7951232', '0.7', '45']
['12.49020924', '0.7', '90']
+-----+
+-----+
+ Protéines prévu au temps t+1: 11.7731 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 4.8.** Valeur prédictive du taux des protéines totales des escargots traités par le cocktail cadmium/fongicide (200µg + 0.5g).

```

+-----+
+----- dataSet: Protéines M2 -----+
+-----+
['Protéines', 'Mixture D2(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['4.825309936', '1.4', '15']
['16.50592209', '1.4', '30']
['12.0338564', '1.4', '45']
['13.16515233', '1.4', '90']
+-----+
+-----+
+ Protéines prévu au temps t+1: 13.2236 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 4.9.** Valeur prédictive du taux des protéines totales des escargots traités par le cocktail cadmium/fongicide (400µg + 1g).

```

+-----+
+----- dataSet: Protéines M3 -----+
+-----+
['Protéines', 'Mixture D3(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['6.708619625', '2.8', '15']
['18.36062961', '2.8', '30']
['18.3303755', '2.8', '45']
['19.70352132', '2.8', '90']
+-----+
+-----+
+ Protéines prévu au temps t+1: 20.3906 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 4.10.** Valeur prédictive du taux des protéines totales des escargots traités par le cocktail cadmium/fongicide (800µg + 2g).

## Annexe 5 : Valeurs prédictives du taux de GSH.

```

+-----+
+----- dataSet: GSH Témoin -----+
+-----+
['GSH', 'Traitements Témoin(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.836842805', '1', '15']
['0.837508487', '1', '30']
['0.835400788', '1', '45']
['0.831874736', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ GSH prévu au temps t+1: 0.8319 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 5.1.** Valeur prédictive du taux de GSH des escargots témoins.

```

+-----+
+----- dataSet: GSH Cd1 -----+
+-----+
['GSH', 'Cadmium D1(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.665723383', '0.2', '15']
['0.467015202', '0.2', '30']
['0.54550184', '0.2', '45']
['0.663136067', '0.2', '90']
+-----+
+-----+
+ GSH prévu au temps t+1: 0.6094 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 5.2.** Valeur prédictive du taux de GSH des escargots traités par le cadmium à 200µg/l.



```

+-----+
+----- dataSet: GSH Cd2 -----+
+-----+
['GSH', ' Cadmium D2(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.564222569', '0.4', '15']
['0.595691988', '0.4', '30']
['0.616687745', '0.4', '45']
['0.587989115', '0.4', '90']
+-----+
+-----+
+ GSH prévu au temps t+1: 0.5821 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 5.3.** Valeur prédictive du taux de GSH des escargots traités par le cadmium à 400µg/l.

```

+-----+
+----- dataSet: GSH Cd3 -----+
+-----+
['GSH', ' Cadmium D3(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.553420154', '0.8', '15']
['0.647502277', '0.8', '30']
['0.622245132', '0.8', '45']
['0.617058395', '0.8', '90']
+-----+
+-----+
+ GSH prévu au temps t+1: 0.6167 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 5.4.** Valeur prédictive du taux de GSH des escargots traités par le cadmium à 800µg/l.

```

+-----+
+----- dataSet: GSH F1 -----+
+-----+
['GSH', ' Fongicide D1(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.674187515', '0.5', '15']
['0.550932821', '0.5', '30']
['0.518555678', '0.5', '45']
['0.438627267', '0.5', '90']
+-----+
+-----+
+ GSH prévu au temps t+1: 0.4538 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 5.5.** Valeur prédictive du taux de GSH des escargots traités par le fongicide à 0.5g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: GSH F2 -----+
+-----+
['GSH', ' Fongicide F2(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.618628934', '1', '15']
['0.566967328', '1', '30']
['0.55516622', '1', '45']
['0.405501734', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ GSH prévu au temps t+1: 0.3809 -----+
+-----+
...

```

**Annexe 5.6.** Valeur prédictive du taux de GSH des escargots traités par le fongicide à 1g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: GSH F3 -----+
+-----+
['GSH', ' Fongicide F3(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.549940305', '2', '15']
['0.607063607', '2', '30']
['0.61888845', '2', '45']
['0.638612165', '2', '90']
+-----+
+-----+
+ GSH prévu au temps t+1: 0.6406 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 5.7.** Valeur prédictive du taux de GSH des escargots traités par le fongicide à 2g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: GSH M1 -----+
+-----+
['GSH', ' Mixture D1(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.53257656', '0.7', '15']
['0.579142825', '0.7', '30']
['0.591235444', '0.7', '45']
['0.579142825', '0.7', '90']
+-----+
+-----+
+ GSH prévu au temps t+1: 0.5772 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 5.8.** Valeur prédictive du taux de GSH des escargots traités par la mixture cadmium/fongicide (200µg + 0.5g).

```

+-----+
+----- dataSet: GSH M2 -----+
+-----+
['GSH', ' Mixture D2(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.460270697', '1.4', '15']
['0.676496998', '1.4', '30']
['0.50000874', '1.4', '45']
['0.278198412', '1.4', '90']
+-----+
+-----+
+ GSH prévu au temps t+1: 0.259 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 5.9.** Valeur prédictive du taux de GSH des escargots traités par la mixture cadmium/fongicide (400µg + 1g).

```

+-----+
+----- dataSet: GSH M3 -----+
+-----+
['GSH', ' Mixture D3(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.574465945', '2.8', '15']
['0.73177107', '2.8', '30']
['0.71004552', '2.8', '45']
['0.472791835', '2.8', '90']
+-----+
+-----+
+ GSH prévu au temps t+1: 0.3233 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 5.10.** Valeur prédictive du taux de GSH des escargots traités par la mixture cadmium/fongicide (800µg + 2g).

## Annexe 6 : Valeurs prédictives du taux de MDA.

```
+-----+
+----- dataSet: MDA Témoin -----+
+-----+
['MDA', 'Traitements Témoin(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.037773758', '1', '15']
['0.032436857', '1', '30']
['0.03354456', '1', '45']
['0.032885352', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ MDA prévu au temps t+1: 0.0329 -----+
+-----+
```

### Annexe 6.1. Valeur prédictive du taux de MDA des escargots témoins.

```
+-----+
+----- dataSet: MDA Cd1 -----+
+-----+
['MDA', 'Cadmium D1(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.058140983', '0.2', '15']
['0.083480785', '0.2', '30']
['0.08771355', '0.2', '45']
['0.097458353', '0.2', '90']
+-----+
+-----+
+ MDA prévu au temps t+1: 0.1004 -----+
+-----+
```

### Annexe 6.2. Valeur prédictive du taux de MDA des escargots traités par le cadmium à 200µg/l.

```
+-----+
+----- dataSet: MDA Cd2 -----+
+-----+
['MDA', 'Cadmium D2(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.064589449', '0.4', '15']
['0.084824418', '0.4', '30']
['0.09007511', '0.4', '45']
['0.101157886', '0.4', '90']
+-----+
+-----+
+ MDA prévu au temps t+1: 0.1039 -----+
+-----+
```

### Annexe 6.3. Valeur prédictive du taux de MDA des escargots traités par le cadmium à 400µg/l.

```
+-----+
+----- dataSet: MDA Cd3 -----+
+-----+
['MDA', 'Cadmium D3(µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.054563214', '0.8', '15']
['0.101544864', '0.8', '30']
['0.09104559', '0.8', '45']
['0.086818432', '0.8', '90']
+-----+
+-----+
+ MDA prévu au temps t+1: 0.0858 -----+
+-----+
```

### Annexe 6.4. Valeur prédictive du taux de MDA des escargots traités par le cadmium à 800µg/l.

```

+-----+
+----- dataSet: MDA F1 -----+
+-----+
['MDA', 'Fongicide D1(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.046959909', '5', '15']
['0.079034987', '5', '30']
['0.077736522', '5', '45']
['0.08824032', '5', '90']
+-----+
+-----+
+ MDA prévu au temps t+1: 0.0904 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 6.5.** Valeur prédictive du taux de MDA des escargots traités par le fongicide à 0.5g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: MDA F2 -----+
+-----+
['MDA', 'Fongicide(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.044643457', '1', '15']
['0.099011708', '1', '30']
['0.080822512', '1', '45']
['0.089528655', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ MDA prévu au temps t+1: 0.09 -----+
+-----+
...

```

**Annexe 6.6.** Valeur prédictive du taux de MDA des escargots traités par le fongicide à 1g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: MDA F3 -----+
+-----+
['MDA', 'Fongicide D3(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.054410073', '2', '15']
['0.112365466', '2', '30']
['0.100455111', '2', '45']
['0.082529259', '2', '90']
+-----+
+-----+
+ MDA prévu au temps t+1: 0.0753 -----+
+-----+
...

```

**Annexe 6.7.** Valeur prédictive du taux de MDA des escargots traités par le fongicide à 2g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: MDA M1 -----+
+-----+
['MDA', 'Mixture D1 (g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.04730124', '0.7', '15']
['0.103648212', '0.7', '30']
['0.077724148', '0.7', '45']
['0.059999871', '0.7', '90']
+-----+
+-----+
+ MDA M1 prévu au temps t+1: 0.0576 -----+
+-----+

```

**Annexe 6.8.** Valeur prédictive du taux de MDA des escargots traités par la mixture cadmium/fongicide (200µg + 0.5g).

```

+-----+
+----- dataSet: MDA M2 -----+
+-----+
['MDA', 'Mixture D2 (g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.058852253', '1.4', '15']
['0.121524956', '1.4', '30']
['0.12078322', '1.4', '45']
['0.105272559', '1.4', '90']
+-----+
+-----+
+ MDA prévu au temps t+1: 0.094 -----+
+-----+

```

**Annexe 6.9.** Valeur prédictive du taux de MDA des escargots traités par la mixture cadmium/fongicide (400µg + 1g).

```

+-----+
+----- dataSet: MDA M3 -----+
+-----+
['MDA', 'Mixture D3 (g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['0.038413676', '2.8', '15']
['0.13106583', '2.8', '30']
['0.09013655', '2.8', '45']
['0.065822677', '2.8', '90']
+-----+
+-----+
+ MDA prévu au temps t+1: 0.0621 -----+
+-----+

```

**Annexe 6.9.** Valeur prédictive du taux de MDA des escargots traités par la mixture cadmium/fongicide (800µg + 2g).

## Annexe 7 : Valeurs prédictives de l'activité AChE.

```

==== RESTART: C:\PYTHON\GM1NACHe.py =====
+-----+
+----- dataSet: AChE Témoin -----+
+-----+
['AChE ', 'Témoin (g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['3.120185207', '1', '15']
['3.13909876', '1', '30']
['3.13648522', '1', '45']
['3.130853525', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ AChE prévu au temps t+1: 3.1308 -----+
+-----+

```

**Annexe 7.1.** Valeur prédictive de l'activité AChE des escargots témoins

```

==== RESTART: C:\PYTHON\GM1NACHe.py =====
+-----+
+----- dataSet: AChE Cd1 -----+
+-----+
['AChE ', 'Cadmium D1 (g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.280656151', '0.2', '15']
['1.626124459', '0.2', '30']
['2.169447824', '0.2', '45']
['3.015213256', '0.2', '90']
+-----+
+-----+
+ AChE prévu au temps t+1: 2.5997 -----+
+-----+

```

**Annexe 7.2.** Valeur prédictive de l'activité AChE des escargots traités par le cadmium à 200µg/l.

```

===== RESTART: C:\PYTHON\GM1NAChe.py =====
+-----+
+----- dataSet: AChE Cd2 -----+
+-----+
['AChE ', 'Cadmium D2(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.754249563', '0.4', '15']
['1.157221959', '0.4', '30']
['2.51236323', '0.4', '45']
['3.017895645', '0.4', '90']
+-----+
+-----+
+ AChE prévu au temps t+1: 2.89 -----+
+-----+
...

```

**Annexe 7.3.** Valeur prédictive de l'activité AChE des escargots traités par le cadmium à 400µg/l.

```

+-----+
+----- dataSet: AChE Cd3 -----+
+-----+
['AChE ', 'Cadmium D3(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.671084537', '0.8', '15']
['1.912262646', '0.8', '30']
['2.234555101', '0.8', '45']
['1.073702896', '0.8', '90']
+-----+
+-----+
+ AChE prévu au temps t+1: 2.2917 -----+
+-----+
^^^

```

**Annexe 7.4.** Valeur prédictive de l'activité AChE des escargots traités par le cadmium à 800µg/g.

```

+-----+
+----- dataSet: AChE F1 -----+
+-----+
['AChE ', 'Fongicide D1(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.20242343', '0.5', '15']
['1.653959249', '0.5', '30']
['1.577745511', '0.5', '45']
['2.821711421', '0.5', '90']
+-----+
+-----+
+ AChE prévu au temps t+1: 1.9282 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 7.5.** Valeur prédictive de l'activité AChE des escargots traités par le fongicide à 0.5g/l.

```

---
===== RESTART: C:\PYTHON\GM1NAChe.py =====
+-----+
+----- dataSet: AChE F2 -----+
+-----+
['AChE ', 'Fongicide D2(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.562900786', '1', '15']
['2.621871778', '1', '30']
['2.660045651', '1', '45']
['2.789502249', '1', '90']
+-----+
+-----+
+ AChE prévu au temps t+1: 2.7898 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 7.6.** Valeur prédictive de l'activité AChE des escargots traités par le fongicide à 1g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: AChE F3 -----+
+-----+
['AChE ', 'Fongicide D3(g)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.2662', '2', '15']
['1.5121', '2', '30']
['2.3564', '2', '45']
['2.7218', '2', '90']
+-----+
+-----+
+ AChE prévu au temps t+1: 1.8892 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 7.7.** Valeur prédictive de l'activité AChE des escargots traités par le fongicide à 2g/l.

```

+-----+
+----- dataSet: AChEM1 -----+
+-----+
['AChE ', 'Mixture M1 (g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.230780491', '0.7', '15']
['1.024853698', '0.7', '30']
['2.754125466', '0.7', '45']
['3.05635143', '0.7', '90']
+-----+
+-----+
+ Poids prévu au temps t+1: 3.0752 -----+
+-----+

```

**Annexe 7.8.** Valeur prédictive de l'activité AChE des escargots traités par la mixture (200µg + 0.5g).

```

+-----+
+----- dataSet: AChE M2 -----+
+-----+
['AChE ', 'Mixture (g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['2.838579312', '1.4', '15']
['1.508596605', '1.4', '30']
['2.000311528', '1.4', '45']
['2.383536785', '1.4', '90']
+-----+
+-----+
+ AChE prévu au temps t+1: 2.1736 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 7.9.** Valeur prédictive de l'activité AChE des escargots traités par la mixture (400µg + 1g).

```

+-----+
+----- dataSet: AChE M3 -----+
+-----+
['AChE ', 'Mixture M3(g, µg)', 'Durées de traitement (Jours)']
['1.818705952', '2.8', '15']
['1.080574361', '2.8', '30']
['2.00544123', '2.8', '45']
['1.862189936', '2.8', '90']
+-----+
+-----+
+ AChE prévu au temps t+1: 1.4496 -----+
+-----+
>>>

```

**Annexe 7.10.** Valeur prédictive de l'activité AChE des escargots traités par la mixture (800µg + 2g).

# Résumés



## Résumé Français

La présence de substances non naturelles dans l'environnement augmente proportionnellement à leur utilisation par l'Homme. Ainsi le développement de l'agriculture aura très certainement pour conséquence une augmentation de la concentration de pesticides et de produits chimiques dans l'air, les eaux et les sols. Ils pourront donc atteindre les écosystèmes. Dans cette étude nous nous sommes intéressés aux effets d'un fongicide à base de cuivre, du cadmium et de leur mixtures sur des organismes bio-accumulateurs et bio-indicateurs de la pollution : l'escargot *Helix aspersa*. Nous avons choisi trois durées de traitement : Aigue (15 jours), sub-aigue (30 jours) et chronique (90 jours). Après chaque durée de traitement, nous avons pesé le poids de l'animal et de l'hépatopancréas (Paramètres physiologiques). Nous avons ensuite évalué les paramètres biochimiques (les protéines, lipides et glucides), les paramètres non enzymatiques (GSH et MDA) et enzymatique (AChE). Les premiers résultats montrent que la présence de cadmium et/ou de fongicide provoquent une inhibition de croissance des animaux traités, ainsi réduisent le poids de la glande digestive.

De plus des perturbations plus significatives sont également notées dans la composition biochimique de l'hépatopancréas de *Helix aspersa* (glucides totaux, lipides totaux et en protéines totales) après traitement à la mixture cadmium/fongicide. Le suivi des biomarqueurs du stress oxydant montre des perturbations suite à la contamination par ces polluants. Nous avons, mis en évidence une induction de MDA ainsi qu'une déplétion du taux de GSH, témoignant de la survenue d'une peroxydation lipidique. Enfin, le cadmium, le fongicide à base de cuivre et leur mixture inhibe de façon significative l'activité AChE.

D'après les résultats prédictifs obtenus suite à la modélisation de valeurs prédictives, en utilisant l'outil PYTHON et le modèle Grey GM (1, N), il apparait clairement que l'évolution des paramètres physiologiques et biochimiques est similaire à l'évolution de nos résultats. L'aspect histologique de l'hépatopancréas a permis d'illustrer les atteintes tissulaires de l'exposition au cadmium et/ou au fongicide, qui se manifestant par une hypertrophie cellulaire, une diminution de la hauteur de l'épithélium accompagnée par fibrose de chorion, des apoptoses des cellules et une présence de particules confirmant ainsi la bioaccumulation de ces deux toxiques.

Mots clés : Pollution, métaux lourds, cadmium, fongicide, *Helix aspersa*, bio-indicateurs.

## Résumé Anglais

The presence of unnatural substances in the environment increases in proportion to their use by humans. Thus, the development of agriculture will most certainly result in an increase in the concentration of pesticides and chemicals in the air, water and soil. They will be able to reach ecosystems.

In this study, we were interested on the effects of a copper fungicide, cadmium and their mixtures on bio-accumulators and bio-indicators of pollution: the snail *Helix aspersa*. We chose three treatment times: Acute (15 days), sub-acute (30 days) and chronic (90 days). After each treatment period, we weighed the weight of the animal and of hepatopancreas (physiological parameters). Then we evaluated the biochemical parameters (proteins, lipids and carbohydrates), the parameters non-enzymatic (GSH and MDA) and enzymatic (AChE). The first results show that the presence of cadmium and / or fungicide causes a growth inhibition of the treated animals, thus reduce the weight of the digestive gland.

In addition, the most significant disturbances are also noted in the biochemical composition of the hepatopancreas of *Helix aspersa* (proteins, lipids and carbohydrates) after treatment with the cocktail cadmium / fungicide. The monitoring of biomarkers of oxidative stress shows disturbances due to contamination by these pollutants. We have demonstrated induction of MDA and a depletion of GSH, demonstrating the occurrence of lipid peroxidation. Finally, cadmium, copper fungicide and their mixture significantly inhibit AChE activity.

Based on predictive results from predictive modeling, using the PYTHON tool and the Grey model (1, N), it is clear that the evolution of morphometric and biochemical parameters is similar to the evolution of our results.

Histopathology aspect of the digestive gland of hepatopancreas has illustrated the tissue damage from exposure to cadmium and / or fungicide, which manifested by cellular hypertrophy, a decrease in the height of the epithelium accompanied by fibrosis of chorion, apoptosis of the cells and a presence of particles thus confirming the bioaccumulation of these two toxins.

Key words: Pollution, heavy metals, cadmium, fungicide, *Helix aspersa*, bioindicators.

## Résumé Arabe

يزداد وجود المواد غير الطبيعية في البيئة بما يتناسب مع استخدامها من قبل البشر وبالتالي فإن تطوير الزراعة سيؤدي بالتأكيد إلى زيادة تركيز مبيدات الآفات والمواد الكيميائية في الهواء والماء والتربة و سيكونون قادرين على الوصول إلى النظم البيئية.

قمنا في هذه الدراسة بالتحقيق في آثار مبيد فطريات النحاس والكامبيوم ومخاليطهما على المكونات البيولوجية للتلوث :  
الحلزون *Hélix aspersa*.

لقد اخترنا ثلاث مرات للعلاج: حادة (15 يوماً) ، دون الحاد (30 يوماً) ومزمنة (90 يوماً) بعد كل فترة علاج ، قمنا بوزن الحيوان والكبد ثم قمنا بتقييم المعلمات البيوكيميائية (البروتينات والدهون والكاربوهيدرات) ، المعلمات غير الأنزيمية (MDA و GSH) وأنزيمي (AChE).

تظهر النتائج الأولى أن وجود الكامبيوم و / أو مبيد الفطريات يسبب تثبيط نمو الحيوانات المعالجة ، وبالتالي تقليل وزن الغدة الهضمية. بالإضافة إلى ذلك ، لوحظت اضطرابات أكثر أهمية في التركيب الكيميائي الحيوي للكبد

بالإضافة رصد المؤشرات الحيوية من الأوكسدة يظهر اضطرابات بعد تلوث هذه الملوثات. لقد أظهرنا تحريضاً لـ MDA ، مما يدل على حدوث بيروكسيد دهني إلى استنفاد لمستوى GSH.

وأخيراً ، فإن الكامبيوم والمبيد للفطريات النحاسية ومزيجها يثبط النشاط AChE

الكلمات المفتاحية: التلوث ، المعادن الثقيلة ، الكامبيوم ، مبيد الفطريات ، اللولب المتغيرات الحيوية