



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

These En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat  
Spécialité : BIOLOGIE ANIMALE

Intitulé

**Évaluation de la toxicité de mixtures de  
pesticides sur un bioindicateur  
de la pollution des sols *Helix aspersa***

Presentée par : M<sup>me</sup> BOURBIA-AIT HAMLET Smina

Membres de Jury:

Mr DJEBAR Med Réda (Professeur)	Président	Universié de ANNABA
Mme DJEKOUN Samira (Professeur)	Directeur de thèse	Universié de ANNABA
Mme BERREBBAH Houria (Professeur)	Examineur	Universié de ANNABA
Mr HOUHAMDI Moussa (Professeur)	Examineur	Universié de GUELMA
Mme TADJINE Aïcha (M.C. A)	Examineur	Universié d'EL-TARF
Mme SOUIKI Lynda (M.C. A)	Examineur	Universié de GUELMA

Année universitaire : 2012/2013

## *Remerciements*

*Un grand Merci à (auss)...*

*A Dieu pour le réveil de chaque matin, les challenges de chaque journée et pour m'avoir donné l'opportunité de mener à terme ce travail de thèse.*

*Bien que cette page soit la première que vous lirez, elle a été la dernière à être rédigée. Malgré le plaisir que j'ai eu à l'écrire, j'ai repoussé sa rédaction le plus longtemps possible. Deux raisons principales expliquent ma réticence. Tout d'abord, la rédaction des remerciements, symbole de l'accomplissement et de la clôture d'une longue et heureuse aventure humaine et scientifique, est le signal ultime qu'il est temps de tourner la page. Mais surtout, le désir et le devoir de n'oublier aucune des personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce travail, et de le formuler avec les mots les plus justes possibles en font un exercice précis, qui, bien qu'agréable, m'a demandé un certain temps...*

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Annaba dirigé par le Professeur **DJEBAR Mohammed Réda**. Je tiens à le remercier pour m'avoir si bien accueillie au sein du laboratoire, mais également pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

Ma reconnaissance va tout particulièrement à Madame le Professeur **BERREBBAH Houria** de l'université de Annaba pour son aide précieuse et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant la lourde tâche d'être rapporteur de ce travail.

*De simples remerciements ne sont pas suffisants pour exprimer toute ma reconnaissance envers ma directrice de thèse, Madame **DJEKOUN BENSOLTANE Samira** (Professeur). Elle a assuré un encadrement d'une rare qualité scientifique et humaine. Ses précieux conseils, remarques et critiques pertinentes et constructives m'ont guidée tout au long de la thèse. A la fierté et à la chance d'avoir été votre thésard vient maintenant s'ajouter la difficulté d'être à la hauteur de tout ce que vous m'avez apportée, et, croyez-moi, la pression est grande. Merci.*

*Je tiens à remercier Monsieur **HOUHAMDI Moussa**, Professeur à l'université de Guelma pour avoir accepté de juger ce travail et participer à ce jury en qualité d'examinateur.*

*Ces mêmes remerciements s'adressent à Madame **TADJINE Aïcha**, Maître de Conférences au Centre Universitaire d'El-Tarf, et Mademoiselle **SOUIKI Lynda**, Maître de Conférences à l'Université de Guelma, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*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, toutes ces quatre années de thèse n'auraient pu aboutir sans le soutien inconditionnel de mon mari. Merci d'avoir toujours été présent pour moi, même dans les moments les plus difficiles... qui me supporte, soutient, écoute et encourage encore aujourd'hui. Ma vie à ses côtés m'a procurée joie, paix et force, nécessaires au bon déroulement de ce travail.*

*Que soient également remerciées le Dr. **YASSI Fatiha** du laboratoire central d'anatomie et de cytologie pathologique de l'hôpital Ibn Rochd-CHU Annaba lors de la réalisation et de la préparation des coupes histologiques et le Dr. **BOULOUDENINE Manel** pour m'avoir dépannée pour certains problèmes techniques.*

*Je remercie très chaleureusement **BENAMARA Amel**, **BENCHALALE Wafa** et **AMRANI Leila** toujours disponibles pour un coup de main. Leur sympathie, leur aide et leur attention me tiennent cordialement. Merci infiniment.*

*Je voudrais aussi remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur aide ou non mais surtout pour tous les bons moments passés en leur compagnie.*

*Je profite également de ces quelques mots pour encourager les nouveaux arrivants, en espérant que malgré les périodes d'errance qui jalonnent parfois la vie d'un doctorant, vous trouviez le même plaisir que j'ai pu avoir tout au long de ce travail.*

*Que ceux que j'aurais pu oublier puissent m'en excuser !*

**Merci à toutes et à tous !**

## *Dedicaces*

*Une pensée émue à mon père, c'est pour toi, et grâce à toi que j'ai fait ce parcours et je regrette de ne pas t'avoir parmi nous en ce moment tant attendu. J'espère que tu sois fière de moi là où tu es, dans mon cœur et mon esprit en toute circonstance*

*À la mémoire de ma sœur, Hayette Eddine, si adorable et si exceptionnelle, t'es jamais partie pour moi*

*À ma très chère mère, Sans elle rien n'aurait pu être fait*

*À mon mari Hichem*

*À mes enfants : Meriem et Yassine,  
sans oublier Maria et Abd El-Malek*

*À mon frère Yahia , à Mes sœurs Meriem et Fatma*

*À ma belle famille Bourbia*

# SOMMAIRE

	Page
<b>Remerciements</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	

<b>Introduction générale</b> .....	1
------------------------------------	---

## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

<b>1<sup>ère</sup> PARTIE : Etude bibliographique sur les pesticides</b>
--

4

1. Définition .....	4
2. Classification.....	4
3. Problèmes de pollution diffuse et de contamination .....	5
4. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement .....	5
4.1. Contamination des eaux .....	5
4.2. Contamination de l'air.....	7
4.3. Contamination des sols.....	7
5. Les possibles modes d'expositions de l'homme aux pesticides.....	8
6. Mesure de l'exposition.....	9
7. Exposition professionnelle.....	9
8. Exposition non professionnelle.....	10
9. Exposition à des mélanges de pesticides.....	10

<b>2<sup>ème</sup> PARTIE : Classification des insecticides et choix des insecticides étudiés</b>
---

12

1. Les différentes familles.....	12
2. Les insecticides étudiés.....	16

2.1. Le thiaméthoxam.....	16
2.1.1. Propriétés physicochimiques.....	17
2.1.2. Effets toxicologiques .....	18
2.1.3. Métabolisme.....	19
2.2. La téfluthrine .....	21
2.2.1. Propriétés physicochimiques.....	21
2.2.2. Effets toxicologiques .....	22
2.2.3. Métabolisme.....	24

<p><b>3<sup>ème</sup> PARTIE : Choix du modèle biologique :</b>  <b>l'escargot terrestre <i>Helix aspersa</i></b></p>
---

26

**CHAPITRE II : Effets du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures sur le comportement et les paramètres morphophysiologiques de *Helix aspersa***

1. Objectifs et principe de l'étude.....	28
2. Matériel et méthodes.....	29
2.1. Matériel biologique.....	29
2.2. Choix des insecticides.....	32
2.2.1. Le thiaméthoxam.....	33
2.2.2. La téfluthrine.....	33
2.2.3. Les mixtures.....	33
2.3. Conduite de l'essai.....	34
2.3.1. Protocole d'intoxication des escargots.....	34
2.3.2. Dissection de l'escargot pour le prélèvement des organes.....	35
2.3.3. Effets comportementaux.....	36
2.3.4. Biomarqueurs physiologiques.....	37
2.4. Analyse statistique.....	38
3. Résultats.....	38
3.1. Estimation du taux d'alimentation.....	38

3.2. Effets sur le comportement.....	38
3.3. Effets sur les paramètres morphométriques.....	39
3.3.1. La mortalité.....	39
3.3.2. Evolution du poids frais des escargots.....	40
3.3.3. Le poids frais moyen des escargots.....	43
3.3.4. Le poids frais moyen de l'hépatopancréas.....	44
3.3.5. Le poids frais moyen de la coquille.....	45
4. Discussion.....	46
4.1. Mortalité.....	46
4.2. Réponses comportementales.....	46
4.3. Réponses physiologiques.....	47
5. Conclusion .....	49

### **CHAPITRE III : Effets du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures sur la composition en métabolites de l'hépatopancréas et les indicateurs du stress oxydant de *Helix aspersa***

1. Objectifs et principe de l'étude.....	50
2. Matériel et méthodes.....	54
2.1. Préparation des échantillons.....	54
2.2. Extraction et dosage des métabolites.....	54
2.3. Dosages des indicateurs du stress oxydant.....	56
2.3.1. Dosage de l'activité acétylcholinestérase (AChE).....	56
2.3.2. Dosage de l'activité glutathion S-transférase (GST).....	57
2.3.3. Dosage de l'activité catalase (CAT).....	58
2.3.4. Dosage du glutathion (GSH).....	58
2.4. Analyse statistique.....	59
3. Résultats.....	60
3.1. Effet du pH.....	60
3.2. Effets du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures sur la composition biochimique de l'hépatopancréas.....	60
3.2.1. Effets sur le taux des protéines.....	60

3.2.2. Effets sur le taux des glucides.....	63
3.2.3. Effets sur le taux des lipides.....	65
3.3. Effets du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures sur les indicateurs du stress oxydant.....	67
3.3.1. Effets sur l'activité acétylcholinestérase (AChE).....	67
3.3.2. Effets sur l'activité de la glutathion S-transférase (GST).....	70
3.3.3. Effets sur l'activité catalase (CAT).....	71
3.3.4. Effets sur le taux de glutathion (GSH).....	73
4. Discussion.....	76
5. Conclusion.....	83

## **CHAPITRE IV : Effets du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures sur l'hépatopancréas de *Helix aspersa* : Etude histopathologique**

1. Objectifs et principe de l'étude.....	85
2. Matériel et méthodes.....	86
2.1. Préparation des échantillons.....	86
2.2. Microscopie optique.....	86
2.2.1. Fixation.....	86
2.2.2. Inclusion.....	86
2.2.3. Coupe.....	87
2.2.4. Coloration.....	87
2.2.5. Montage.....	87
2.2.6. Observation.....	87
3. Résultats.....	88
3.1. Effets du thiaméthoxam.....	91
3.2. Effets de la téfluthrine.....	91
3.3. Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine.....	92
4. Discussion.....	92
5. Conclusion.....	94

# **CHAPITRE V : Effets du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures vis-à-vis des escargots juvéniles *Helix aspersa* : Détermination des effets sur la croissance pondérale par contamination de la nourriture**

1. Objectifs et principe de l'étude.....	96
2. Matériel et méthodes.....	97
2.1. Reproduction, ponte, incubation et éclosion.....	97
2.2. Animaux.....	98
2.3. Schéma expérimental.....	100
2.4. Estimation de la croissance et de la mortalité.....	100
2.5. Analyses statistiques.....	101
3. Résultats.....	102
3.1. La mortalité.....	102
3.2. Evolution de la croissance pondérale et du diamètre.....	102
4. Discussion.....	106
5. Conclusion.....	108
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>110</b>

## **Références bibliographiques**

### **Annexes**

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

Annexe 2 : Exemple de tableau de données de la croissance de *Helix aspersa*

Annexe 3 : Exemple de tableaux de coefficients de croissance de la biomasse (a)  
et du diamètre coquillère moyen (b) de *Helix aspersa*

Annexe 4 : Production scientifique (Publications et communications)

### **Résumés**

Français

Anglais

Arabe

# LISTE DES FIGURES

		<b>Page</b>
<b>Figure 1</b>	Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (INERIS, 2005) .....	<b>6</b>
<b>Figure 2</b>	Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (CPP, 2002).....	<b>8</b>
<b>Figure 3</b>	Structure chimique du thiaméthoxam (A.R.L.A.S.C., 2007).....	<b>16</b>
<b>Figure 4</b>	Structure chimique de la téfluthrine (A.R.L.A.S.C., 2010).....	<b>21</b>
<b>Figure 5</b>	Escargot <i>Helix aspersa</i> .....	<b>31</b>
<b>Figure 6</b>	Morphologie externe de l'escargot (Kerney <i>et al.</i> , 2006).....	<b>31</b>
<b>Figure 7</b>	Anatomie interne (appareils génital et digestif) de l'escargot <i>Helix aspersa</i> (Beaumont et Cassier, 1998) .....	<b>31</b>
<b>Figure 8</b>	Dispositif de contamination de <i>Helix aspersa</i> par la laitue.....	<b>34</b>
<b>Figure 9</b>	Dissection des viscères de l'escargot.....	<b>35</b>
<b>Figure 10</b>	Dissection des viscères et observation des organes en place, avec représentation de la ligne (---->) de décapitation et de dissection séparant le pied des viscères et des principaux organes internes.....	<b>35</b>
<b>Figure 11</b>	Effets du thiaméthoxam sur le poids frais moyen des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de six semaines.....	<b>41</b>
<b>Figure 12</b>	Effets de la téfluthrine sur le poids frais moyen des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de six semaines.....	<b>42</b>
<b>Figure 13</b>	Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine sur le poids frais moyen des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de six semaines.....	<b>43</b>
<b>Figure 14</b>	Effets du thiaméthoxam et de la téfluthrine et de leurs mixtures sur le poids frais moyen des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) après six semaines de traitements.....	<b>44</b>

<b>Figure 15</b>	Effets du thiaméthoxam et de la téfluthrine et de leurs mixtures sur le poids frais moyen de l'hépatopancréas des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) après six semaines de traitements.....	<b>45</b>
<b>Figure 16</b>	Effets du thiaméthoxam et de la téfluthrine et de leurs mixtures sur le poids frais moyen coquillère des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) après six semaines de traitements.....	<b>46</b>
<b>Figure 17</b>	Représentation schématique des voies majeures conduisant à la détoxification et à la toxification des xénobiotiques organiques chez les animaux (Michel, 1993) .....	<b>52</b>
<b>Figure 18</b>	Extraction et dosage des métabolites (glucides, lipides, et protéines) de l'hépatopancréas chez les adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> selon Shibko <i>et al.</i> (1966).....	<b>55</b>
<b>Figure 19</b>	Taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement au thiaméthoxam administré par ingestion.....	<b>61</b>
<b>Figure 20</b>	Taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement à la téfluthrine administrée par ingestion.....	<b>62</b>
<b>Figure 21</b>	Taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement aux mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion.	<b>62</b>
<b>Figure 22</b>	Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement au thiaméthoxam administré par ingestion.....	<b>64</b>
<b>Figure 23</b>	Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement à la téfluthrine administré par ingestion.....	<b>64</b>
<b>Figure 24</b>	Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement aux mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion.	<b>65</b>

<b>Figure 25</b>	Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement au thiaméthoxam administré par ingestion.....	<b>66</b>
<b>Figure 26</b>	Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement à la téfluthrine administré par ingestion.....	<b>66</b>
<b>Figure 27</b>	Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement aux mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion.....	<b>67</b>
<b>Figure 28</b>	Effets du thiaméthoxam, administré par ingestion, sur l'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>68</b>
<b>Figure 29</b>	Effets de la téfluthrine administrée par ingestion, sur l'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>69</b>
<b>Figure 30</b>	Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion, sur l'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>69</b>
<b>Figure 31</b>	Effets du thiaméthoxam, administré par ingestion, sur l'activité spécifique de la GST ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>70</b>
<b>Figure 32</b>	Effets de la téfluthrine administrée par ingestion, sur l'activité spécifique de la GST ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>71</b>
<b>Figure 33</b>	Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion, sur l'activité spécifique de la GST ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>72</b>
<b>Figure 34</b>	Effets du thiaméthoxam, administré par ingestion, sur l'activité spécifique de la CAT ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>72</b>
<b>Figure 35</b>	Effets de la téfluthrine administrée par ingestion, sur l'activité spécifique de la CAT ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>74</b>

<b>Figure 36</b>	Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion, sur l'activité spécifique de la CAT ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>74</b>
<b>Figure 37</b>	Effets du thiaméthoxam, administré par ingestion, sur le taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>75</b>
<b>Figure 38</b>	Effets de la téfluthrine administrée par ingestion, sur le taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>75</b>
<b>Figure 39</b>	Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion, sur le taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 6 semaines de traitement.....	<b>76</b>
<b>Figure 40</b>	: Observations au microscope optique de coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d'un escargot témoin <i>Helix aspersa</i> (a), montrant un tubule digestif et d'escargots après 6 semaines de traitement au thiaméthoxam par voie orale (b), (c), (d) et (e). (a), (b), (d), (e) (grossissement 400 $\times$ ) et (c) (grossissement 1 000 $\times$ ).....	<b>88</b>
<b>Figure 41</b>	Observations au microscope optique de coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d'un escargot témoin <i>Helix aspersa</i> (a), et d'escargots après 6 semaines de traitement à la téfluthrine par voie orale (b), (c), (d) et (e) (grossissement 400 $\times$ ).....	<b>89</b>
<b>Figure 42</b>	Observations au microscope optique de coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d'un escargot témoin <i>Helix aspersa</i> (a), et d'escargots après 6 semaines de traitement aux mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine par voie orale (b), (c), (d) et (e) (grossissement 400 $\times$ ).....	<b>90</b>
<b>Figure 43</b>	Devenir du surplus énergétique (énergie disponible après excréation et métabolisme général). Si une proportion $q$ de cette énergie est allouée à la croissance, une proportion $1 - q$ sera disponible pour la reproduction (Lauwrence <i>et al.</i> , 2003).....	<b>96</b>
<b>Figure 44</b>	Schéma de la reproduction, la ponte, l'éclosion et l'élevage de <i>Helix aspersa</i> .....	<b>99</b>

**Figure 45** Effets du thiaméthoxam et de la téfluthrine sur le poids moyen des juvéniles de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de huit semaines..... **103**

**Figure 46** Effets du thiaméthoxam et de la téfluthrine sur le diamètre coquillère moyen des juvéniles de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de huit semaines..... **105**

# LISTE DES TABLEAUX

	<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b> Propriétés physico-chimiques du thiaméthoxam (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007).....	<b>17</b>
<b>Tableau 2</b> Propriétés physico-chimiques de la téfluthrine (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2010).....	<b>22</b>
<b>Tableau 3</b> Composition des mixtures testées.....	<b>33</b>
<b>Tableau 4</b> Dilutions d'insecticides utilisées et pH correspondant.....	<b>35</b>
<b>Tableau 5</b> Mortalité des escargots adultes durant les six semaines de traitement par les deux insecticides et leurs mixtures.....	<b>40</b>
<b>Tableau 6</b> Dilutions utilisées pour chaque insecticide.....	<b>100</b>
<b>Tableau 7</b> Mortalité des escargots juvéniles durant les huit semaines de traitement par les deux insecticides et leurs mixtures.....	<b>102</b>
<b>Tableau 8</b> Effets des insecticides et de leurs mixtures sur le poids et le diamètre coquillère moyens des escargots juvéniles <i>Helix aspersa</i> .....	<b>106</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ACh :</b>	Acétylcholine
<b>AChE :</b>	Acétylcholinestérase
<b>ACTA :</b>	Association de coordination technique agricole
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>A.R.L.A.S.C :</b>	Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada
<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>CAS :</b>	Chemical Abstracts Service
<b>CAT :</b>	Catalase
<b>Cd :</b>	Cadmium
<b>CDNB :</b>	1-chloro-2-4 dinitrobenzène
<b>CEC :</b>	Commission of the European community.
<b>CHU :</b>	Centre hospitalier universitaire
<b>CPP :</b>	Comité de la Prévention et de la Protection
<b>Cr :</b>	Chrome
<b>DDT :</b>	Dichlorodiphényltrichloroéthane
<b>DGCCRF :</b>	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
<b>DNase :</b>	Déoxyribonucleases
<b>DO :</b>	Densité optique
<b>DSENO :</b>	Dose Sans Effet Nocif Observé
<b>EDTA :</b>	Ethylène diamine tétra-acétique
<b>ETM :</b>	Eléments traces métalliques
<b>DTNB :</b>	Acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
<b>FAO :</b>	Food and Agriculture Organization
<b>GABA :</b>	L'acide $\gamma$ -aminobutyrique
<b>GSH :</b>	Glutathion réduit
<b>GSSG :</b>	Glutathion oxydé
<b>GST :</b>	glutathion S-transférase
<b>G6PD :</b>	<i>Glucose-6-phosphate déshydrogénase</i>

<b>GPx :</b>	Glutathion peroxydase
<b>HAPs :</b>	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
<b>HCH :</b>	Hexachlorocyclohexane
<b>IgA :</b>	Immunoglobulines de type A
<b>IgG :</b>	Immunoglobulines de type G
<b>IgM :</b>	Immunoglobulines de type M
<b>INERIS :</b>	Institut national de l'environnement industriel et des risques
<b>IUCPA :</b>	Union internationale de chimie pure et appliquée
<b>K<sub>oe</sub> :</b>	Coefficient de partage n-octanol-eau
<b>LD50 :</b>	Dose ou concentration létale pour 50% des organismes exposés, par rapport au témoin.
<b>LDH :</b>	Lactate déshydrogénase
<b>LMR :</b>	Limite maximale applicable aux résidus.
<b>OGM :</b>	Organisme génétiquement modifié
<b>OMS :</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>OPs :</b>	Organophosphorés
<b>P450 :</b>	Cytochrome P450
<b>Pb :</b>	Plomb
<b>PCB :</b>	Polychlorobiphényle
<b>pH :</b>	Potentiel hydrogène
<b>pK<sub>a</sub> :</b>	Constante de dissociation
<b>RNase :</b>	Ribonucléase
<b>SAS :</b>	Société par actions simplifiée
<b>-SH :</b>	Groupe thiol
<b>SOD :</b>	Superoxyde dismutase
<b>TBARS :</b>	Espèces réactives avec l'acide thiobarbiturique ( <i>thiobarbituric acid reactive species</i> )
<b>TBT :</b>	Tributylétain
<b>TCA :</b>	Acide trichloroacétique
<b>UIPP :</b>	Union des Industries et de la Protection des Plantes
<b>Zn :</b>	Zinc

# *INTRODUCTION GENERALE*

## INTRODUCTION GENERALE

Avant l'utilisation des produits phytosanitaires, les systèmes de culture étaient conçus pour assurer le meilleur compromis entre le risque phytosanitaire et le potentiel de production de la culture. Cependant, les pertes en rendement des productions agricoles dues aux maladies, aux ravageurs et aux mauvaises herbes pouvaient atteindre des proportions importantes (Oerke et Dehne, 1997).

Après la seconde guerre mondiale, les pesticides ont permis le développement de l'agriculture et ont contribué à l'augmentation des rendements et à la régulation de la production agricole. L'utilisation des produits phytosanitaires a également limité ou éradiqué un certain nombre de maladies parasitaires très meurtrières. Cependant, aujourd'hui, les pesticides sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement. Ils sont en effet fréquemment mis en cause dans la dégradation de la qualité des eaux douces souterraines et des eaux côtières, dans la réduction de la biodiversité terrestre constatée dans les zones agricoles et dans les milieux "naturels" contaminés ou bien encore dans des cas de surmortalité des abeilles et de baisse de production des ruches. Par ailleurs, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent une corrélation entre l'utilisation professionnelle des pesticides et l'apparition de certaines pathologies dans les populations concernées. Des effets cancérigènes, neurotoxiques ou de type perturbation endocrinienne des pesticides ont été mis en évidence chez l'animal. La question des risques pour l'homme est donc posée tant au niveau professionnel qu'à celui du consommateur.

Le marché mondial des pesticides est globalement stable depuis quelques années et représente actuellement 40,475 milliards de dollars. L'Europe est le plus gros consommateur (avec 31,7% du marché) devant l'Asie (23,1%), les Amériques (Sud : 20,8% ; Nord : 20,6%) et l'Afrique (3,8%). Au niveau des cibles des produits, ce sont les herbicides qui sont le plus utilisés mondialement (46,9%) devant les fongicides (25,9%), les insecticides (24,1%) et les divers (rodenticides, molluscicides...) (UIPP, 2009).

Dans les pays sous-développés, même les produits très toxiques, dont l'usage a été interdit dans les pays riches, sont encore largement utilisés, et avec beaucoup moins de précautions. Selon un communiqué de presse de la FAO (1<sup>er</sup> février 2001), environ 30% des pesticides commercialisés dans les pays en voie de développement ne sont pas conformes aux standards de qualité internationaux, car ils contiennent beaucoup d'impuretés très toxiques.

En Algérie, l'usage des insecticides, des fertilisants, des engrais, des détergents et autres produits phytosanitaires se répand de plus en plus avec le développement de l'agriculture, mais aussi dans le cadre des actions de lutte contre les vecteurs nuisibles. La lutte antiacridienne menée au cours de cette dernière décennie a entraîné par ailleurs le déversement de milliers de tonnes d'insecticides. Par exemple, au cours de la campagne de lutte antiacridienne de 2004-2005, plusieurs tonnes de pesticides (des organophosphorés, des carbamates et la deltaméthrine) ont été utilisées par épandage ou par pulvérisation dans les régions infestées par le criquet pèlerin, dans les régions du Sud et dans le Tell. Puis, depuis les cinq dernières années, une autre forme d'utilisation intensive de pesticides se généralise dans de nombreuses wilayates du pays, dans le cadre du Programme national de lutte contre les zoonoses et plus particulièrement dans la lutte contre une pathologie vectorielle : la leishmaniose, une maladie qui a pris de l'ampleur malheureusement dans toutes les régions du pays, compte tenu des bouleversements écologiques et des dégradations environnementales urbaines et rurales. Ces divers types de traitements par les pesticides se font généralement pour parer à l'urgence, mais sans souci aucun des conséquences environnementales directes et des conséquences sanitaires sur le long terme liées aux infiltrations de ces substances non dégradables dans les sols, dans les sources et les nappes, puis vers les écosystèmes: les végétaux, les animaux et nécessairement l'homme (Bouziani, 2007).

Récemment, l'usage des pesticides ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. Cependant, les analyses des résidus de pesticides ne sont pas faites systématiquement. C'est donc, dans ce contexte, que nous avons évalué par une étude expérimentale l'effet de deux insecticides le thiaméthoxam, la téfluthrien et leurs mixtures sur le gastéropode terrestre *Helix aspersa*, qui est l'une des espèces d'escargots la plus abondante dans la région Nord-Est de l'Algérie. On constate que pour les deux substances actives choisies, il existe peu de données de toxicité, particulièrement au niveau du compartiment terrestre. Il est donc important de compléter les études existantes sur ces molécules pour apporter des informations sur leur toxicité.

## **Définition des objectifs**

L'objectif général de cette étude est d'évaluer les effets de deux insecticides et de leurs mixtures, à large spectre d'utilisation et notamment dans la région Nord-Est algérienne, grâce à l'utilisation d'un modèle bioindicateur présent dans les écosystèmes terrestres, l'escargot *Helix aspersa*. Pour y répondre, ce manuscrit est organisé en cinq grandes parties :

- ❖ la première partie synthétise les connaissances sur le devenir et les effets des pesticides en général, et des insecticides étudiés en particulier, ainsi que sur les critères de choix du modèle biologique utilisé en évaluation du risque. Elle définit également les objectifs ;
- ❖ la deuxième partie est consacrée à l'examen des aspects comportementaux et morphométriques (poids frais moyen des escargots, de la coquille et de l'hépatopancréas) ;
- ❖ la troisième partie est consacrée à la détermination de la composition biochimique de l'hépatopancréas (protéines, glucides et lipides), aux dosages des biomarqueurs enzymatiques (activités spécifiques de l'acétylcholinestérase, la glutathion S-transférase et la catalase), et non enzymatiques (le taux de glutathion) ;
- ❖ la quatrième partie est destinée à l'exploration histopatologique de l'hépatopancréas des escargots ;
- ❖ la cinquième partie présente une étude de la croissance pondérale réalisée sur les juvéniles de *Helix aspersa*, visant à déterminer les effets des deux insecticides et de leurs mixtures en conditions de laboratoire ;
- ❖ enfin, la conclusion générale discute de la relation entre les résultats présentés dans les chapitres précédents, fait le bilan de la contribution apportée par cette étude à la recherche en écotoxicologie et restitue l'ensemble de ces apports dans le contexte global de l'évaluation des risques des pesticides. Les perspectives envisagées dans la continuité de ces travaux sont également présentées.

# CHAPITRE I

## *Synthèse Bibliographique*

# 1<sup>ère</sup> PARTIE : Etude bibliographique sur les pesticides

## 1. Définition

Le terme "pesticides" 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 substance active (anciennement 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, 2005).

## 2. Classification

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est complexe. D'une manière générale, ils peuvent être classés en fonction de la nature de l'espèce à combattre mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose. L'index de l'ACTA qui référence les principaux produits autorisés et commercialisés mentionnait 489 substances actives en 2005 et 2600 préparations commerciales (liste arrêtée en Juillet 2004). De plus, les variétés et les quantités utilisées diffèrent selon les pays où ils sont utilisés. Néanmoins, les systèmes de classification sont universels.

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

Le deuxième système de classification tient compte de la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires. Les principaux groupes

chimiques comprennent les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoïdes, les triazines et les urées substituées.

### **3. Problèmes de pollution diffuse et de contamination**

L'utilisation des produits phytosanitaires a permis d'augmenter considérablement les rendements agricoles en réduisant les pertes dues aux ravageurs des cultures, mais cela n'a pas été sans contrepartie. Dans les années 70, des premiers travaux ont montré que les produits phytosanitaires peuvent aussi être transférés vers les eaux de surface et les eaux de profondeur (Schiavon and Jacquin, 1973). Ceci enclenche une prise de conscience des pouvoirs publics dans le monde. En 1972, les organochlorés sont interdits d'utilisation aux Etats-Unis et en Europe et une réglementation concernant spécifiquement les produits phytosanitaires est mise en place dans les années 80.

### **4. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement**

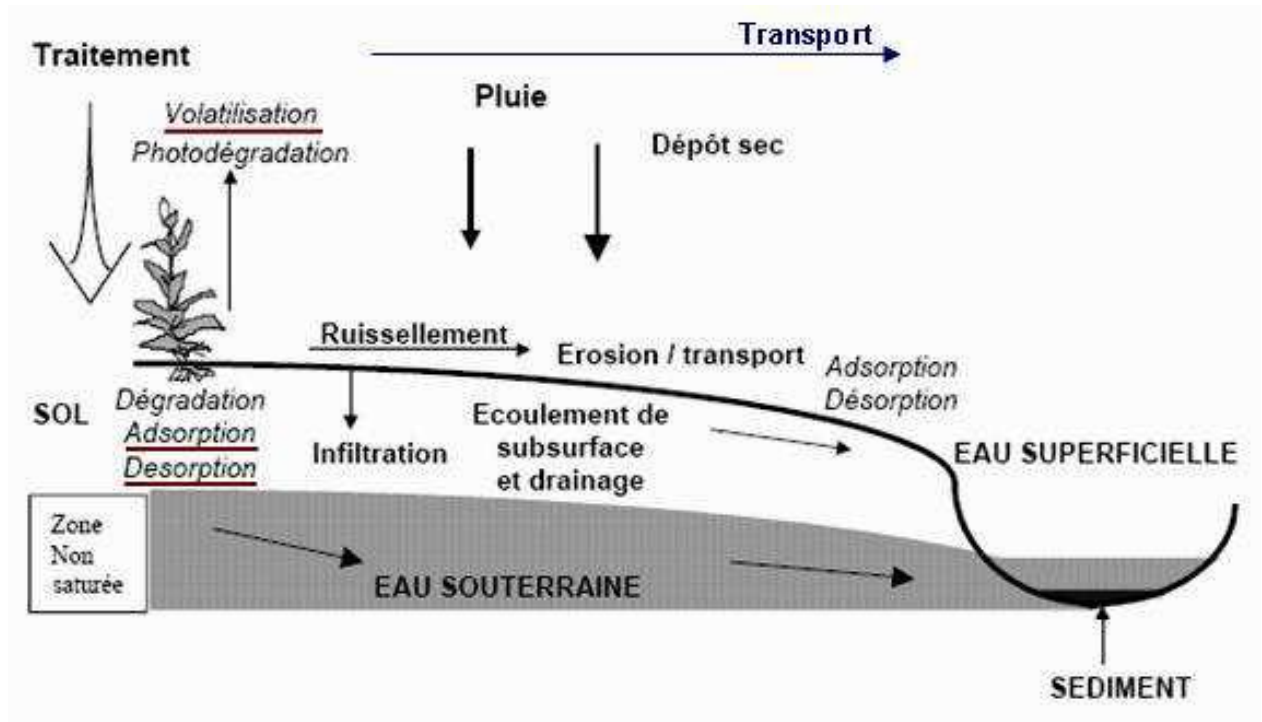
Malgré un souci croissant de protection de l'environnement, lors de l'utilisation des produits phytosanitaires, une certaine quantité de ces substances se retrouve dans l'environnement, principalement dans l'air par dérive sous forme de gouttelettes ou sur le sol (Pimentel, 1995). Ils peuvent alors être soumis à différents processus (Fig. 1) (INERIS, 2005):

- la photo-dégradation (Marcheterre *et al.*, 1988);
- la dégradation par le phénomène d'hydrolyse aqueuse (Wolfe *et al.*, 1990) ou de biodégradation grâce aux micro-organismes présents dans le sol (Colin, 2000);
- la rétention dans le sol jusqu'à la formation de résidus liés (adsorption) (par exemple l'accumulation des fongicides à base de cuivre dans les sols);
- le transport vers d'autres compartiments environnementaux par des processus physicochimiques (volatilisation) ou via un vecteur, l'eau par lixiviation ou ruissellement ou les particules de sol (désorption) (Van Der Werf, 1996).

#### **4.1. Contamination des eaux**

Une des conséquences environnementales majeures de l'agriculture intensive actuelle est la dégradation de la qualité des eaux (Ippolito *et al.*, 2012). Cette dégradation se traduit, pour les eaux de surface comme pour les eaux souterraines, par une pollution liée à la dissémination des produits phytosanitaires, des engrais minéraux azotés et phosphatés ou

encore des effluents d'élevage. Les pesticides peuvent facilement pénétrer dans le sol et les sources d'eau.



**Figure 1: Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (INERIS, 2005).**

La contamination par les pesticides est le plus souvent un phénomène irrégulier. Il est à noter que des pics de concentration sont fréquemment observés dans les quelques heures qui suivent les épisodes pluvieux (Schulz, 2001; Neumann *et al.*, 2003) et que la contamination des eaux de surface est d'autant plus élevée que la surface des bassins versants est faible (Schulz, 2004). Par ailleurs, dans certaines régions, une part significative de la contamination des eaux peut parfois provenir du dépôt de substances transportées par voie aérienne (Blanchoud *et al.*, 2002) ou beaucoup plus fréquemment découler d'usages autres qu'agricoles, qu'il s'agisse du désherbage des infrastructures de transport ou industrielles, des parcs et jardins ou bien d'utilisations domestiques (Gerecke *et al.*, 2002; Revitt *et al.*, 2002; Schiff *et al.*, 2002; Blanchoud *et al.*, 2004).

## 4.2. Contamination de l'air

### ▪ Air extérieur

La présence de pesticides est observée dans toutes les phases atmosphériques en concentrations variables dans le temps (avec parfois un caractère saisonnier, en lien avec les périodes d'application) et dans l'espace (selon la proximité des sources). L'air et l'eau pouvaient être contaminés, de manière locale, mais aussi à distance des lieux de traitement. Cette contamination est chronique. Des composés peu volatils ou interdits ont parfois été observés. Dans le cas spécifique de traitements en serre, des concentrations élevées ont pu être observées juste après l'application et malgré une décroissance, ces concentrations peuvent rester à un niveau significatif pendant plusieurs jours après le traitement (Bouvier *et al.*, 2006).

### ▪ Air intérieur

Les pesticides peuvent contaminer l'air intérieur non seulement suite à leur application ou leur stockage dans les logements mais également du fait du transport des produits utilisés à l'extérieur (agriculture, jardins, parcs) par l'intermédiaire des chaussures, des vêtements, des animaux domestiques ou par l'air. Il existe très peu de programmes de recherche dans le domaine de la qualité de l'air intérieur (Bouvier *et al.*, 2006).

## 4.3. Contamination des sols

La contamination des sols par différentes substances, dont les pesticides, a été reconnue comme l'une des principales menaces qui pèsent sur les sols (CEC, 2002). Les pesticides dans les sols peuvent provenir des activités agricoles mais également des activités d'entretien des espaces verts et jardins ou de désherbage des réseaux routiers et ferrés. La vitesse d'infiltration des pesticides dans le sol dépend du sol (humidité, taux de matière organique, pH) et du pesticide (Swarcewicz et Gregorczyk A., 2012). Par ailleurs, il n'existe pas de dispositif équivalent à ceux relatifs à l'eau et à l'air pour la caractérisation de la contamination des sols par les pesticides, que ce soit en France ou dans les autres pays d'Europe.

Il est connu que les insecticides organochlorés sont assez persistants dans l'environnement et certains, bien qu'interdits d'usage peuvent rester présents dans le sol pendant plusieurs années (lindane, alpha-HCH). A l'heure actuelle les insecticides utilisés (organophosphorés, pyréthriinoïdes, carbamates et autres) se dégradent rapidement, par contre les herbicides sont assez persistants dans les sols et leurs produits de dégradation sont souvent

stables. La pollution chronique par certaines substances minérales persistantes (cuivre dans les fongicides employés en viticulture) (Chaignon *et al.*, 2003) et l'existence éventuelle de "résidus liés" (non extractibles par les méthodes classiques d'analyse) pose la question du risque environnemental à long terme (Barraclough *et al.*, 2005), notamment dans le cas d'une réallocation des terres agricoles à d'autres usages. D'autres sources de contamination des sols proviennent des industries produisant et/ou procédant au stockage des substances phytosanitaires.

## 5. Les possibles modes d'expositions de l'homme aux pesticides

Les pesticides sont utilisés, non seulement dans l'agriculture, mais aussi par divers autres acteurs (industries, collectivités territoriales) ainsi qu'en usage domestique et vétérinaire. Des problèmes de résidus dans les légumes, les fruits, etc., sont aussi mis en évidence. L'exposition aux pesticides se caractérise donc par une multiplicité des voies d'exposition, ces substances pouvant pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation. La grande variété de produits rend difficile l'évaluation des expositions des populations, qu'il s'agisse de la population exposée professionnellement (agriculteurs ou manipulateurs), ou de la population générale. La figure 2 résume les possibles modes d'exposition de l'environnement et de l'homme aux pesticides.

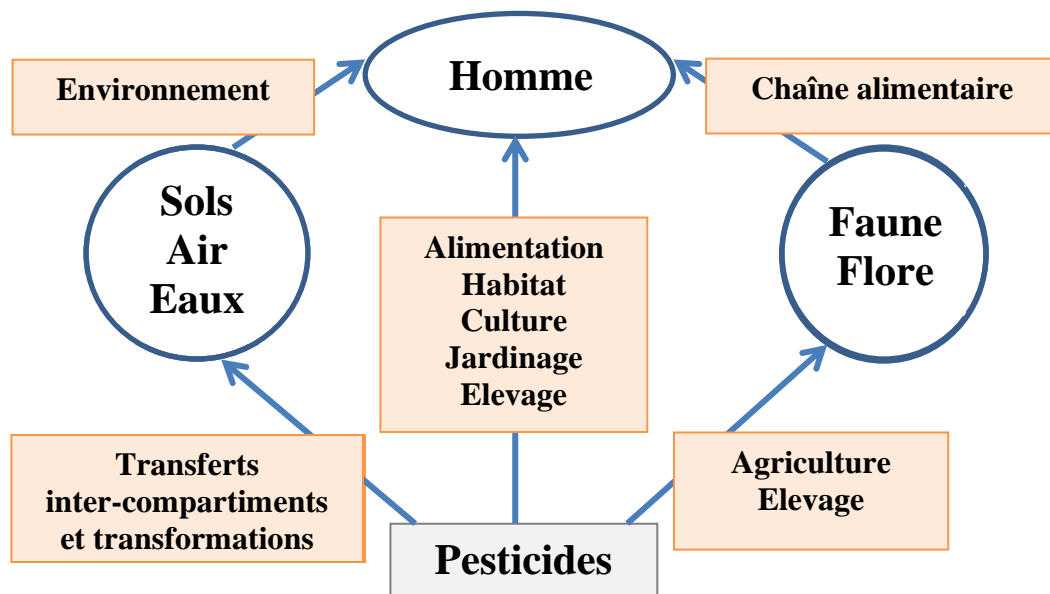


Figure 2 : Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (CPP, 2002).

## 6. Mesure de l'exposition

La diversité des produits et des pratiques et l'évolution des matières actives entraînent des difficultés méthodologiques considérables qui limitent l'estimation de l'exposition aux pesticides. Par ailleurs, la mesure des expositions peut être influencée par les situations exceptionnelles, voire accidentelles (Van Zelm *et al.*, 2009). Il est difficile de dissocier les effets propres à chaque substance active; les produits sont souvent utilisés en mélange (Sarigiannis et Hansen, 2012) et les formulations peuvent aussi contenir d'autres produits toxiques (adjuvants ou autres «formulants») (Zeljezic *et al.*, 2006).

Certains outils permettant d'estimer les expositions aux pesticides ont été décrits :

- **des outils biologiques**; tels que le dosage direct des pesticides ou de leurs métabolites dans les compartiments biologiques (e.g, le sang), ou la recherche d'effets précoces (e.g, la génotoxicité);
- **des modèles prédictifs**, surtout appliqués aux professionnels, prenant en compte les méthodes d'application, les moyens de protection, ...
- **la reconstitution des expositions anciennes** au moyen de matrices activités-expositions construites idéalement par type de culture et par région.

## 7. Exposition professionnelle

L'exposition professionnelle concerne essentiellement les personnes manipulant les produits, au moment de la préparation, de l'application et du nettoyage des appareils de traitement. Les agriculteurs constituent une population particulièrement exposée qui forme un groupe sentinelle pour l'observation d'éventuels effets des pesticides. Cependant, les données des bilans de surveillance systématique ne portent souvent que sur des manifestations toxiques aiguës ou subaiguës. L'exposition professionnelle aux pesticides des agriculteurs est très variable et complexe selon les exploitations agricoles. Elle est le plus souvent saisonnière et correspond à une succession de journées d'utilisation de produits chimiquement différents au cours de la saison et souvent également au cours d'une même journée (CPP, 2002). En général, l'exposition est essentiellement cutanée, à moindre mesure aérienne et secondairement orale (repas, tabac,... sur le lieu de travail). L'absorption des pesticides par la peau est révélée comme la voie d'exposition la plus significative en milieu agricole (Jakubowski and Trzcinka-Ochocka, 2005). Par ailleurs, bien que les équipements de protection individuelle (gants, masques, combinaisons) constituent les principales mesures de prévention mises en œuvre afin de réduire l'exposition des professionnels, une étude menée

en France (Baldi *et al.*, 2006), a mis en évidence une insuffisance de l'efficacité de ces équipements.

## **8. Exposition non professionnelle**

L'ensemble de la population peut être exposé aux pesticides lors des usages domestiques ou d'entretien des jardins mais surtout à des résidus de ces pesticides au travers de son environnement (eau, air, particules en suspension, poussières) et de son alimentation. Les chiffres de l'OMS indiquent que la contamination des aliments par les pesticides est la voie d'exposition de loin la plus importante. Les évaluations de risque attribuent 90% de l'exposition à l'alimentation contre 10% à l'eau. Le dernier rapport de la commission des communautés européennes concernant le suivi des résidus des pesticides dans les produits végétaux (Commission of the European Communities, 2007). Les principaux résultats montrent la présence de résidus détectables avec des niveaux inférieurs aux LMR dans 43% et supérieurs à ces limites dans 5% des 57 334 échantillons de fruits, légumes et céréales analysés.

## **9. Exposition à des mélanges de pesticides**

A l'heure actuelle, l'évidence de l'exposition de la population générale à des mélanges de résidus de pesticides dans l'alimentation ou l'environnement suscite l'intérêt des experts en matière de santé publique. Une même culture peut recevoir, ensemble ou séparément, différents pesticides ayant des mécanismes d'action similaires ou différents. Les agriculteurs et la population habitant dans une zone agricole sont exposés à des formulations et des mélanges de pesticides (Yanez *et al.*, 2002).

Près de 24% des échantillons analysés par la DGCCRF en France en 2003 contenaient plus de 2 résidus mais à des teneurs souvent inférieures aux LMR (en particuliers, salades, agrumes, pommes, fraises, raisins et poires). Les connaissances en matière d'effets combinés des pesticides sont encore très lacunaires.

Par ailleurs, les opinions concernant l'existence ou non d'une menace pour la santé humaine suite à l'exposition à des faibles doses de pesticides sont divisées. Dans une communication publiée en 2003, le parlement de la Commission Européenne déclare que «Même à faible niveau, l'exposition au cours des dernières décennies à un mélange complexe de polluants dans l'air, l'eau, la nourriture, les produits de consommation et les bâtiments, peuvent avoir un effet significatif sur l'état de santé des citoyens européens» (CEC, 2003).

Cependant, l'hypothèse largement adoptée par plusieurs auteurs considère qu'une exposition à des mélanges des produits chimiques à des doses bien au-dessous de la DSENO de chaque constituant est sans problème pour la santé. Dans une revue récente, Kortenkamp *et al.* (2007) ont montré que des effets significatifs peuvent être observés en présence de combinaisons de pesticides même à des doses bien inférieures à leurs DSENO et quel que soit le mode d'action de ces produits. Ils ajoutent également que l'hypothèse assimilant la DSENO à une dose à «zéro effet» serait erronée parce qu'elle ne prend pas en considération le fait que des interactions beaucoup plus complexes qu'une simple additivité d'effet pourraient avoir lieu. Il ne faut donc pas exclure la possibilité d'effets sur la santé d'une exposition à des mélanges de faibles doses de pesticides. En revanche, cette conclusion est essentiellement basée sur les études expérimentales et, à l'heure actuelle, il n'y a aucune étude d'observation permettant de mettre en évidence l'impact d'une exposition aux pesticides à faibles doses et à long terme à laquelle la population générale est soumise.

## **2<sup>ème</sup> PARTIE : Classification des insecticides et choix des insecticides étudiés**

### **1. Les différentes familles**

- ❖ **Les carbamates** : sont des insecticides à large spectre utilisés couramment depuis leur mise au point dans les années cinquante. Ce sont des esters de l'acide carbamique généralement non hydrosolubles; cependant certaines molécules (aldicarbe, carbofurane par exemple) sont aliphatiques, ce qui leur confère un caractère hydrosoluble plus marqué et des propriétés systémiques. Ces insecticides sont généralement doués d'une toxicité marquée envers les Vertébrés et les Hyménoptères auxiliaires comme l'abeille (Bloomquist, 1996). Ce sont des molécules neurotoxiques appartenant au groupe des inhibiteurs de la cholinestérase. Les carbamates agissent en inactivant (de façon réversible) cette enzyme par le biais de la carbamylation d'un résidu sérine du site actif; l'acétylcholine n'est plus dégradée et s'accumule alors dans l'espace inter-synaptique. Cela crée une hyperstimulation post-synaptique aboutissant à des symptômes tels des convulsions, tremblements, hyperexcitabilité évoluant vers la mort (Bloomquist, 1996).
  
- ❖ **Les organophosphorés** : sont des esters de l'acide phosphorique, ils constituent une grande famille aux structures et propriétés chimiques extrêmement variées. Leur mode d'action est comparable à celui des carbamates: ce sont comme eux des inhibiteurs de la cholinestérase. Ils inactivent cette enzyme par phosphorylation d'un résidu sérine du site actif. L'accumulation du neurotransmetteur (ACh) qui en résulte est responsable d'un déséquilibre dans la neurotransmission et des symptômes observés (hyperexcitation, convulsions, paralysie) qui se terminent par la mort de l'insecte. Les effets ne sont pas immédiats mais l'inactivation de l'enzyme est irréversible, contrairement aux carbamates (Bloomquist, 1996).  
C'est un groupe d'insecticides peu sélectifs, généralement assez toxiques pour les Vertébrés (Farahat *et al.*, 2003). La plupart est classée très dangereux pour les abeilles et leur emploi est interdit durant la floraison. Leur persistance sur les surfaces traitées est plutôt faible car leur dégradation en composés non toxiques par la lumière se fait en

quelques heures ou quelques jours. Ils ont ainsi peu à peu remplacé les organochlorés. Ils sont toutefois de moins en moins utilisés car considérés dangereux en se basant sur les critères d'homologation actuels (Pedigo, 2002).

Les organophosphorés aliphatiques possèdent une longue chaîne carbonée. On trouve dans ce groupe le malathion, le diméthoate, le trichlorfon, l'acéphate ou le méthamidophos. Les dérivés phénolés sont plus stables et donc plus rémanents que les dérivés aliphatiques. Les dérivés hétérocycliques (dont les cycles contiennent des atomes de soufre ou d'azote) sont les composés les plus stables. Figurent dans ce groupe le diazinon, le phosmet, le méthidathion ou le chlorpyrifos (Bloomquist, 1996).

- ❖ **Les pyréthroïdes :** (ou pyrétrinoïdes) ne sont pas des insecticides très récents puisque leur premier représentant, l'alléthrine, a été développé en 1949. Les premiers composés de cette famille étaient d'origine végétale (le pyrèthre), extraits de fleurs séchées d'une espèce de chrysanthème (Pedigo, 2002).

Chimiquement, les pyréthroïdes sont des esters liposolubles. En conséquence il n'existe aucun pyréthroïde doté de propriétés systémiques (Delorme, 2002). Ils sont classés en deux types, selon la nature de la partie alcool de la molécule, avec des conséquences sur leur action. Les pyréthroïdes de type I provoquent une hyperexcitation et des convulsions chez les insectes, les composés de type II sont plutôt responsables d'ataxie. Dans les deux cas les effets apparaissent très rapidement (une à deux minutes), c'est l'effet «knockdown». Ce sont des neurotoxiques qui agissent en retardant ou empêchant la fermeture des canaux sodiques membranaires le long de l'axone, ils perturbent ainsi la transmission de l'influx nerveux au niveau des neurones centraux ou périphériques (Soderlund, 2012). L'action très brève des molécules de type I désorganise l'influx nerveux des neurones sensitifs et moteurs et même des interneurons du système nerveux central. Le blocage prolongé (plusieurs minutes) des canaux sodiques par les pyréthroïdes de type II entraîne une perte d'excitabilité du neurone. La perturbation du message électrique le long de l'axone est responsable de la libération anormale de neurotransmetteurs au niveau synaptique et donc des effets observés, en particulier sur les mouvements de l'insecte (Bloomquist, 1996).

Les pyréthroïdes sont efficaces à très faibles doses par rapport aux carbamates ou organophosphorés et sont en général d'une plus grande sécurité d'utilisation pour l'homme ou les insectes auxiliaires de l'agriculture. L'amélioration progressive des premières molécules, en particulier quant à leur stabilité, a permis leur utilisation pour la

protection des cultures. Cependant leur dégradation par les rayons ultraviolets est facile et la rémanence sur les végétaux traités et dans les sols dépasse rarement une semaine (Pedigo, 2002). La famille est habituellement divisée en quatre générations de composés avec une amélioration nette d'efficacité pour les molécules de dernière génération. Parmi les pyréthroïdes de troisième génération citons le fenvalérate et la perméthrine. Les molécules de quatrième génération agissent à des doses encore plus faibles; parmi elles, la cyperméthrine, le fluvalinate, la deltaméthrine, la bifenthrine, la  $\lambda$ -cyhalothrine, la cyfluthrine, l'esfenvalérate, et la téfluthrine (Pedigo, 2002).

- ❖ **Les organochlorés** : constituent la plus vieille classe d'insecticides de synthèse; ce sont les premiers à avoir été largement utilisés. Ils sont d'une grande efficacité mais leur très grande persistance et leur accumulation dans l'écosystème et la santé humaine font que leur usage a été progressivement et presque totalement abandonné.

Le DDT est l'un d'entre eux, c'est l'insecticide le plus connu du vingtième siècle, très largement utilisé dans les années quarante à soixante avant que l'on ne se rende compte de ses puissants effets non intentionnels. Le lindane, a connu un grand succès. Son emploi n'est plus autorisé mais certains pays en voie de développement l'utilisent encore (ACTA, 2005; Pedigo, 2002).

Tous les organochlorés n'ont pas le même mode d'action; le DDT semble agir sur la transmission de l'influx nerveux le long de l'axone en perturbant les flux transmembranaires de sodium et potassium. Les cyclodiènes, le lindane, l'endosulfan agiraient sur la synapse GABAergique en inhibant les flux membranaires de chlore au travers des récepteurs canaux postsynaptiques au GABA (Bloomquist, 1996; Callec *et al.*, 1986).

- ❖ **Les néonicotinoïdes** : il s'agit d'une classe d'insecticides de synthèse dont la découverte est relativement récente. Ce sont des dérivés d'une molécule naturelle: la nicotine, l'alcaloïde du tabac, utilisé comme insecticide depuis le XVIIIème siècle. Très toxique par contact, la nicotine est dangereuse pour les insectes mais aussi pour l'homme. Les néonicotinoïdes sont d'une plus grande sécurité d'emploi (Bloomquist, 1996).

Le principal représentant du groupe des néonicotinoïdes est l'imidaclopride, la clothianidine, le nitempyram, le thiamethoxam et l'acetamipride.

Les néonicotinoïdes sont agonistes de l'acétylcholine sur les récepteurs cholinergiques nicotiniques postsynaptiques. L'imidaclopride a une plus grande affinité pour les

récepteurs des insectes que pour ceux des vertébrés, ce qui explique sa faible toxicité pour ces derniers (Matsuda *et al.*, 2001). Cependant d'autres sites d'actions sont vraisemblablement impliqués dans leur toxicité; leur mécanisme d'action est certainement plus complexe, avec l'intervention de plusieurs sous-types de récepteurs cholinergiques (Buckingham *et al.*, 1997).

❖ **Les régulateurs de croissance** : sont des insecticides utilisés depuis 25 ans sur beaucoup de cultures, actuellement en plein développement car actifs sur des phénomènes biologiques spécifiques aux insectes que sont le développement et la mue et donc moins dangereux pour les Vertébrés. Certains comme l'azadirachtine sont même spécifiques de certains insectes et ont un spectre très étroit. Leur mode d'action original leur assure une efficacité sur des ravageurs résistants à d'autres molécules. Par contre, et contrairement à la plupart des neurotoxiques, ils n'ont pas d'action immédiate sur les insectes (Pedigo, 2002; Tasei, 2001). Les analogues de l'hormone juvénile (notamment méthoprène, pyriproxifène et le fénoxycarbe) retardent la métamorphose et rallongent donc la phase larvaire, ce qui conduit à la mort de l'insecte. A l'opposé, les analogues de l'ecdysone (tébufénoside) accélèrent les processus de mue. Une substance naturelle identifiée récemment, l'azadirachtine, s'oppose au contraire à l'action de l'ecdysone (Bloomquist, 1996; Pedigo, 2002).

Les inhibiteurs de la synthèse de chitine ne sont pas des perturbateurs hormonaux puisqu'ils agissent en bloquant la polymérisation de la chitine, le principal constituant de la cuticule des insectes ; la cuticule est alors trop peu résistante pour la survie de l'insecte. Certains ont une action ovicide. Citons le diflubenzuron, le lufénuron, la buprofézine ou l'hexaflumuron; tous appartiennent à la classe des benzoylphenylurées, des composés liposolubles comportant des atomes halogénés (Bloomquist, 1996; Pedigo, 2002).

Les familles présentées dans cette partie sont les principales et il existe de nombreuses autres molécules, naturelles (nicotine, pyrèthre, roténone) ou de synthèse, aux modes d'action variés (Pedigo, 2002).

La plupart des insecticides actuels agissent sur le système nerveux. La recherche élabore constamment de nouvelles molécules toujours plus sélectives et agissant à faibles doses, ceci afin de diminuer au maximum leurs effets non intentionnels. Cependant tout insecticide reste dangereux pour l'homme, l'environnement ou la faune auxiliaire.

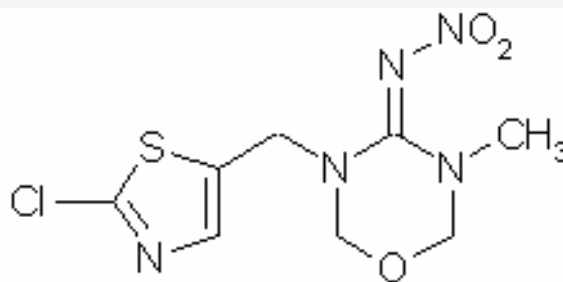
## 2. Les insecticides étudiés

Dans notre travail, deux insecticides appartenant à deux familles chimiques ont été choisis :

### 2.1. Le thiaméthoxam

Le premier insecticide est un néonicotinoïde, le thiaméthoxam utilisé sous forme de préparation commerciale, l'Actara® (25 g de thiaméthoxam dans 100 g d'insecticide) de la société Syngenta Agro SAS. Il est utilisé à large spectre dans la région Nord-Est algérienne contre les insectes piqueurs et suceurs des céréales, des arbres fruitiers et des cultures maraîchères. Il est utilisé en culture à des doses allant de 800 à 4000 mg/L d'insecticide (formulation commerciale), correspondant à 200 à 1000 mg/L de thiaméthoxam (matière active).

Le thiaméthoxam est un insecticide organique synthétique appartenant à la famille chimique des néonicotinoïdes (Fig. 3), classe des thianicotynils, de formule chimique 3-(2-chloro-thiazol-5-ylméthyl)-5-méthyl-[1,3,5]-oxadiazinan-4 -ylidène-N-nitroamine). C'est une nouvelle classe d'insecticides la plus importante développés au cours des trois dernières décennies. Son intérêt est dû à la lutte contre les insectes qui sont résistants aux autres classes de pesticides et de sa toxicité modérée pour les mammifères (Bingham *et al.*, 2008) les oiseaux et les poissons (Tomizawa et Casida, 2005), parce qu'ils se lient au niveau du récepteur nicotinique de l'acétylcholine postsynaptique, plus abondante chez les insectes que chez les animaux à sang chaud.



**Figure 3 : Structure chimique du thiaméthoxam (A.R.L.A.S.C., 2007).**

#### 2.1.1. Propriétés physicochimiques

Les principales caractéristiques physico-chimiques de la substance active sont présentées dans le tableau 1 (A.R.L.A.S.C., 2007).

**Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du thiaméthoxam (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007).**

Propriété	Résultat														
État physique et couleur	Poudre de couleur blanc cassé														
Odeur	Inodore														
Union internationale de chimie pure et appliquée (IUCPA)	3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylméthyl)-5-méthyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidène(nitro)amine														
Chemical Abstracts Service (CAS)	3-[(2-chloro-5-thiazolyl)méthyl]tétrahydro-5-méthyl-Nnitro- 4H-1,3,5-oxadiazin-4-imine														
Numéro CAS	153719-23-4														
Poids moléculaire	291,7 g/mol <sup>-1</sup>														
Formule brute	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S														
Point ou plage de fusion	139,1 °C														
Densité à 25 °C	1,57 × 10 <sup>3</sup> kg/m <sup>3</sup>														
Pression de vapeur à 20 °C	2,7 × 10 <sup>-9</sup> Pa														
Constante de la loi d'Henry à 20 °C	1,9 × 10 <sup>-10</sup> Pa m <sup>3</sup> /mol														
Spectre d'absorption ultraviolet (UV)-visible	Pas d'absorption significative aux longueurs d'onde > 300 nanomètres (nm)														
Solubilité dans l'eau à 25 °C	4,1 g/L														
Solubilité dans des solvants organiques à 20 °C	<table border="0"> <thead> <tr> <th align="left">Solvant</th> <th align="right">Solubilité (g/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Acétone</td> <td align="right">48</td> </tr> <tr> <td>Dichlorométhane</td> <td align="right">110</td> </tr> <tr> <td>Acétate d'éthyle</td> <td align="right">7</td> </tr> <tr> <td>1-octanol</td> <td align="right">0,62</td> </tr> <tr> <td>Méthanol</td> <td align="right">13</td> </tr> <tr> <td>Toluène</td> <td align="right">0,68</td> </tr> </tbody> </table>	Solvant	Solubilité (g/L)	Acétone	48	Dichlorométhane	110	Acétate d'éthyle	7	1-octanol	0,62	Méthanol	13	Toluène	0,68
Solvant	Solubilité (g/L)														
Acétone	48														
Dichlorométhane	110														
Acétate d'éthyle	7														
1-octanol	0,62														
Méthanol	13														
Toluène	0,68														
Coefficient de partage <i>n</i> -octanol-eau (log <i>K</i> <sub>oe</sub> ) à 25°C	Log <i>K</i> <sub>oe</sub> = - 0,13														
Constante de dissociation (p <i>K</i> <sub>a</sub> )	Pas de dissociation dans la plage 2 à 12 de pH														
Stabilité (température, métaux)	Aucun changement du thiaméthoxam par contact avec les métaux (acier inoxydable, acier moulé, étain et aluminium) et les ions métalliques (Zn <sup>+2</sup> , Al <sup>+3</sup> , Cu <sup>+2</sup> et Fe <sup>+2</sup> ).														

### 2.1.2. Effets toxicologiques

- **Toxicité aiguë** le thiaméthoxam est faiblement toxique, la LD50 par voie orale est > 5000 mg/kg de poids corporel chez le rat (A.R.L.A.S.C., 2007). La LD50 chez le rat

par voie cutanée est  $> 2000$  mg/kg. Il est considéré légèrement irritant pour les yeux et la peau (lapins), et sans effet pour des cobayes (A.R.L.A.S.C., 2007). Concernant la toxicité d'inhalation aiguë chez le rat, la LC50 aéroportée du thiaméthoxam est  $> 2.79\text{mg/m}^3$  d'air sous forme d'aérosol. Ces valeurs représentent les concentrations auxquelles les symptômes d'empoisonnement aéroportés possibles sont maximaux (A.R.L.A.S.C., 2007).

Ramazan *et al.* (2010) ont rapporté que l'exposition à un néonicotinoïde (l'imidaclopride) à des concentrations de 10 mM pendant un temps inférieur à 1 mn peut changer les propriétés membranaires des neurones des cellules stellaires de souris et, en conséquence, leur fonction. Kawther et El-Gendy (2010) ont montré que l'administration orale de 14,976 mg/kg d'imidaclopride chez la souris entraîne à une augmentation significative des activités des enzymes antioxydantes comme la CAT, la SOD, la GPx et la TPS. Cependant, l'activité G6PD reste inchangée, et le niveau de teneur en GSH diminué.

- **Toxicité chronique :** chez le rat, le rein et le foie sont particulièrement sensibles au thiaméthoxam. Des lésions de ces organes sont provoquées par des doses à partir de 63mg/kg de poids corporel par jour chez les mâles après une exposition de 2 ans (A.R.L.A.S.C., 2007).
- **Effets mutagéniques :** le thiaméthoxam est non mutagène. Les mutations géniques sur les cellules bactériennes (spécialement sur les de souches de *Salmonella typhimurium* et de *E. coli* par 312.5 à 5 000  $\mu\text{g}$  de thiaméthoxam/plaque, et sur les cellules de mammifères (hamster chinois par 61,67 à 2 220  $\mu\text{g/ml}$  ont montré des effets négatifs (A.R.L.A.S.C., 2007).
- **Effets sur la reproduction :** une étude sur la reproduction des rats, alimentés jusqu'à 61 mg/kg p.c./j n'a entraîné à aucun effet néfaste attribuable au traitement sur les indices de reproduction (accouplement, gestation, fertilité, viabilité). Quant aux signes de sensibilité des petits, les effets sur les testicules n'ont été observés qu'après exposition *in utero* et post-natale (A.R.L.A.S.C., 2007).

- **Effets neurotoxiques :** une étude sur la neurotoxicité des rats, alimentés jusqu'à 500mg/kg p.c. n'a entraîné à aucun signe histopathologique attribuable au traitement au niveau du système nerveux central ou périphérique (A.R.L.A.S.C., 2007).
- **Effets écotoxiques :** en fait, il existe peu de données d'écotoxicité sur d'autres organismes que les insectes pour le thiaméthoxam. Cette molécule semble pourtant relativement toxique pour les organismes aquatiques (Sánchez-Bayo and Goka, 2006). La plupart des auteurs rapportent des données d'écotoxicité du thiaméthoxam sur des insectes (Tomizawa *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2006; Menandro, 2008). Cependant, ce composé est surtout mis en cause dans le phénomène de surmortalité des abeilles (Nauen *et al.*, 2001; Iwasa *et al.*, 2004, Rortais *et al.*, 2005; Aliouane *et al.*, 2009; Henry *et al.*, 2012).

### 2.1.3. Métabolisme

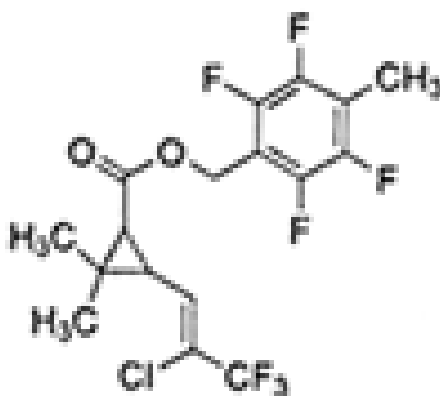
- **Vitesse et degré d'absorption et d'excrétion :** l'absorption et l'élimination est rapides chez le rat et la souris. L'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion ne dépendent d'aucun des facteurs suivants : sexe, dose, prétraitement, du radiomarqueur. Chez les rats, la concentration sanguine atteint un pic à 4 - 6h, suivi d'élimination rapide. La demi-vie pour l'élimination de la radioactivité dans le sang est de 3 h. Le thiaméthoxame est le principal composé détecté dans les extraits sanguins (82 %) suivi du CGA 322704 (16 %). On ne retrouve que des traces de CGA 265307 (0,3 %) et aucun CGA 330050. Environ 84 - 95 % de la dose est excrétée dans l'urine et 2,5 - 6 % est excrétée dans les matières fécales en moins de 24 h. Moins de 0,2 % de la dose est détectée dans l'air expiré. Environ 20 - 30 % de la dose est biotransformée. Chez la souris, la concentration sérique maximale est atteinte 0,5 h après l'administration de la dose avec une demi-vie pour l'élimination de la radioactivité dans le sang de 4 h. Environ 72 % de la dose est excrétée dans l'urine et 19 % dans les matières fécales. Une petite quantité est décelée dans l'air expiré (0,2 %). Environ 30 - 60 % de la dose est biotransformée (A.R.L.A.S.C., 2007).

- **Distribution et organes cibles :** chez le rat, le thiaméthoxam est largement distribué dans les tissus, les concentrations maximales étant décelées dans les muscles squelettiques dans les 8 h suivant l'administration de la dose et représentant 10 à 15 % de la dose administrée. La demi-vie pour l'élimination dans les tissus se situe entre 2 et 6 h. Après 7 j, les quantités résiduelles dans les tissus sont toutes très faibles, les maximums étant mesurés dans le foie (0,01 - 0,04 % de la dose). Chez la souris, le thiaméthoxame est le principal composé détecté dans les extraits sanguins (78 %) dans les quatre premières heures suivant l'administration de la dose, tandis que le CGA 265307 est le principal métabolite dans le plasma 6 h après l'administration de la dose (43,3 - 54,5 % de radioactivité), ce qui montre la rapidité du métabolisme du composé d'origine. On observe aussi le CGA 322704 dans le plasma en concentration similaire (19,5 - 25,6 %) au composé d'origine (A.R.L.A.S.C., 2007).
- **Composé(s) toxicologiquement significatif(s) :** seulement trois métabolites urinaires représentent plus de 1 - 2 % de la dose administrée chez le rat. Le composé d'origine CGA293343 constitue 69 - 83 % chez le rat (31 - 44 % chez la souris); le CGA 322704 est le principal métabolite urinaire chez le rat (5 - 13 % de la dose) et la souris (8 - 12 % de la dose). Le CGA 265307 représente de 1 - 2 % de la dose chez les rats et de 9 - 18 % de la dose chez les souris. Les concentrations de CGA 265307 sont approximativement 22 fois plus grandes dans le plasma de la souris que dans le plasma du rat après une semaine d'alimentation. Après 10 semaines, la concentration de CGA 265307 dans le plasma de souris augmente près de 3,6 fois (donnant à penser qu'il y a induction de voies métaboliques) tandis que celle dans le plasma du rat diminue, la différence entre les deux étant approximativement de l'ordre de 140 fois. Les taux métaboliques dans le foie de souris sont 54 fois (par le CGA 322704) et 87 fois (par le CGA 330050) plus élevés que ceux dans le foie du rat et 371 fois et 238 fois plus élevés respectivement que ceux dans le foie humain. La différence entre les deux espèces pour le CGA 330050 était de l'ordre de 15 fois pour toute la durée de l'étude. La principale différence entre le métabolisme du rat et de la souris, qui pourrait mener à une différence dans la toxicité à long terme, est la production du métabolite CGA 330050 chez la souris (A.R.L.A.S.C., 2007).

## 2.2. La téfluthrine

Le deuxième insecticide est un pyréthrianoïde, la téfluthrine utilisée également sous forme de préparation commerciale Force® (1,5 g de téfluthrine dans 100 g d'insecticide), de la société Syngenta Agro SAS. Il est couramment utilisé contre les insectes du sol qui s'attaquent aux cultures maraîchères, à la pomme de terre, aux arbres fruitiers, à la vigne et aux céréales. Il est utilisé en cultures à des doses allant de 12 à 50 kg/ha d'insecticide (formulation commerciale), correspondant à 18 à 75 mg/m<sup>2</sup> de téfluthrine (matière active).

La téfluthrine est un insecticide pyréthrianoïde synthétique (Fig. 4), de formule chimique 2,3,5,6-tetrafluoro-4-méthylphenyl) methyl (1R,3R)-rel-3-[(1Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propen-1-yl]-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylate, photostable, au pouvoir insecticide agissant par contact et ingestion sur une gamme très étendue d'insectes, sur toutes les cultures et à doses très faibles. Les pyréthrianoïdes sont des insecticides neurotoxiques auxquels sont attribués également des effets néfastes sur les systèmes immunitaire, hormonal et reproducteur. Ils sont abondamment utilisés en agriculture, mais aussi en horticulture, en extermination et dans le traitement d'infestations parasitaires humaines et animales (gale, poux). Ces derniers, bien qu'en général relativement peu toxiques pour les mammifères, sont dangereux pour l'environnement, aquatique notamment, et les animaux à sang froid (Fortin *et al.*, 2008).



**Figure 4 : Structure chimique de la téfluthrine (A.R.L.A.S.C., 2010).**

### 2.2.1. Propriétés physicochimiques

Les principales caractéristiques physico-chimiques de la substance active sont présentées dans le tableau 2 (A.R.L.A.S.C., 2010).

**Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques de la téfluthrine (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2010).**

Propriété	Résultat
État physique	solide granulés
Couleur	havane à brun rouge
Union internationale de chimie pure et appliquée (IUCPA)	[(chloro-2-trifluoro-3,3,3-propène-1-yl-(Z))- 3-diméthyl-2,2-cyclopropanecarboxylate- (1RS)-cis de tétrafluoro-2,3,5,6-méthyl-4- benzyle
Chemical Abstracts Service (CAS)	[1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ (Z)]-( $\pm$ )-(2,3,5,6-tétrafluoro-4-méthylphényl)méthyl 3-(2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propényl)-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylate
Numéro CAS	79538-32-2
Poids moléculaire	418,7 g/mol <sup>1</sup>
Formule brute	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> ClF <sub>7</sub> O <sub>2</sub>
Pression de vapeur à 20 °C	8,4 mPa
Spectre d'absorption ultraviolet (UV)-visible	Pas d'absorption prévue à $\lambda > 300$ nanomètres
Solubilité dans l'eau à 25 °C	0,02 mg/L
Coefficient de partage <i>n</i> -octanol-eau (log <i>K</i> <sub>oc</sub> ) à 25 °C	Log <i>K</i> <sub>oc</sub> = 6,5
Constante de dissociation (pKa)	> 9 (l'hydrolyse interdit toute mesure)

### 2.2.2. Effets toxicologiques

- **Toxicité aiguë** : la téfluthrine est fortement toxique, la DL50 par voie orale est 21,8 à 34,6 mg/kg de poids corporel chez le rat (A.R.L.A.S.C., 2010). La DL50 par voie cutanée est 316 à 177 mg/kg. Il est considéré légèrement irritant pour la peau et dangereux pour les yeux chez le lapin, et sans effet pour des cobayes. La toxicité d'inhalation aiguë (dans de l'alcool éthylique) chez le rat est élevée avec 0,049 à 0,037 mg/L (A.R.L.A.S.C., 2010).

Salah *et al.* (2010) ont testé la téfluthrine administrée par voie orale à une dose de 1.1mg/Kg pendant 15 j chez les rats *Rattus norvegicus*. Ces auteurs ont montré une diminution significative du nombre de globules rouges et de la teneur en hémoglobine,

une activation de la LDH plasmatique et une réduction des immuno-globulines (IgG, IgA et IgM). En plus, ils ont constaté une réduction du contenu hépatique en acides nucléiques (ARN et ADN) et une diminution des activités des nucléases (RNase et DNase) par rapport aux valeurs de la normale chez le groupe témoin sain. Des aberrations chromosomiques et des anomalies des spermatozoïdes sont significativement augmentés après l'ingestion de la téfluthrine, par rapport au groupe témoin. L'index mitotique et le nombre de spermatozoïdes a diminué significativement en raison de la cytotoxicité potentielle de la téfluthrine. Spencer *et al.* (2001) et Spencer et Sham (2005) ont rapporté les effets possibles de la téfluthrine, sur des myocytes ventriculaires isolés de rat.

- **Toxicité chronique :** chez le rat, les systèmes digestif, nerveux et sanguin, ainsi que les organes comme le rein et le foie sont particulièrement sensibles à la téfluthrine. Des lésions sont provoquées par des doses à partir de 0.5 mg/kg de poids corporel par jour (dans de l'huile de maïs par capsule) chez les mâles après une exposition d'une année (A.R.L.A.S.C., 2010).
- **Effets mutagéniques :** les mutations géniques par la téfluthrine sur les cellules bactériennes (spécialement sur les de souches de *Salmonella typhimurium* par 0,02 à 50 mg/ml de téfluthrine), et sur les cellules de mammifères (souris, par 250 à 4000µg/ml) ont montré des effets négatifs (A.R.L.A.S.C., 2010).
- **Effets sur la reproduction :** une étude sur la reproduction des rats, alimentés jusqu'à 12 mg/kg p.c./j a entraîné à des effets importants attribuables au traitement sur les indices de reproduction (accouplement, gestation, fertilité, viabilité). Quant aux signes de sensibilité des petits, plusieurs animaux ont été trouvés morts, et d'autres, ont été sacrifiés en raison de leur mauvais état clinique (A.R.L.A.S.C., 2010).
- **Effets écotoxiques :** les pyréthriinoïdes sont peu toxiques pour les mammifères, notamment grâce à leur rapide inactivation par hydrolyse en acides et alcools (Ray, 1991). Comme pour le thiaméthoxam, il existe peu de données d'écotoxicité sur d'autres organismes que les insectes pour la téfluthrine (Pilz *et al.*, 2009). Cependant, ils semblent relativement toxiques pour les organismes aquatiques (Hill, 1989; Eells *et*

*al.*, 1993; Balint *et al.*, 1995; Kontreczky *et al.*, 1997; Datta et Kaviraj, 2003; Koprucua et Aydın, 2004).

Chez *Helix pomatia*, Kiss (1988) a rapporté la modification de l'activité des neurones sous l'effet de la deltaméthrine (pyréthriinoïde). Devare *et al.* (2007) ont étudié, en laboratoire et en serre, sur du maïs transgénique la persistance et l'activité des protéines Cry3Bb sur les populations microbiennes en présence de la téfluthrine. Ils ont démontré un plus fort potentiel de minéralisation de l'azote (nécessaire pour le maïs au cours du remplissage des grains), des taux de nitrification des sols importants et une plus grande activité de micro-organismes de minéralisation de l'N des parcelles traitées à la téfluthrine.

Fortin *et al.* (2008) ont suggéré que l'exposition aux pesticides est ubiquiste. Ils ont montré que chez plus de 90% des participants, lors d'une étude épidémiologique, excrétaient les principaux métabolites de pyréthriinoïdes et pyréthrines à un niveau supérieur au seuil de détection analytique.

### 2.2.3. Métabolisme

- **Absorption et excrétion :** d'après une étude réalisée sur les rats par l'absorption d'une dose orale unique de 1 à 10 mg/kg p.c. de téfluthrine marquée, il est possible que l'absorption soit incomplète à cause de la grande quantité de téfluthrine radiomarquée présente dans les matières fécales après 24 h. Les teneurs observées dans le foie, les reins, le tissu adipeux abdominal et le sang varient en fonction du temps (A.R.L.A.S.C., 2010).
- **Distribution et organes cibles :** chez les rats, la téfluthrine a été entièrement métabolisée, si l'on en juge par l'absence du composé d'origine inchangé dans la bile ou l'urine. Les produits métaboliques générés étaient largement conjugués, à l'exception de l'acide 2,3,5,6-tétrafluoro-4-hydroxyméthylbenzoïque et de l'acide 2,3,5,6-tétrafluoro-4-méthylbenzoïque, qui sont excrétés sous la forme de métabolites libres.

Les principaux métabolites isolés dans l'urine sont le glucuronide de l'alcool 2,3,5,6-tétrafluoro-4-méthylbenzylique et l'acide *cis*-3-(*Z*-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-ényl)-2-hydroxyméthyl-2-méthylcyclopropanecarboxylique. Les métabolites secondaires sont le 2,3,5,6-tétrafluoro-*p*-xylène-diol, le *cis*-3-(*Z*-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-ényl)-2-hydroxyméthyl-2-méthylcyclopropanecarboxylate de 4-

carboxy-2,3,5,6-tétrafluorobenzyle et l'acide *cis*-3-(*Z*-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-ényl)-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylique.

Les principaux métabolites isolés dans les matières fécales sont le *cis*-3-(*Z*-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-ényl)-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylate de 2,3,5,6-tétrafluoro-4-hydroxyméthylbenzyle, le 2 *cis*-3-(*Z*-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-ényl)-2-hydroxyméthyl-2-méthylcyclopropanecarboxylate de 2,3,5,6-tétrafluoro-4-méthylbenzyle, le *cis*-3-(*Z*-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-ényl)-2-hydroxyméthyl-2-hydroxyméthylbenzyle et l'acide 2,3,5,6-tétrafluoro-4-hydroxyméthylbenzoïque (A.R.L.A.S.C., 2010).

### **3<sup>ème</sup> PARTIE : Choix du modèle biologique :** ***l'escargot terrestre Helix aspersa***

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

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

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

De nombreuses études ont démontré que les mollusques gastéropodes comme les escargots terrestres sont des bioindicateurs de pollution notamment des métaux et des HAPs (Barker, 2001; Dallinger *et al.*, 2001; Beeby et Richmond, 2002; de Vaufleury *et al.*, 2006a; de Vaufleury *et al.*, 2006b; Regoli *et al.*, 2006; Grara *et al.*, 2012). Ces consommateurs primaires occupent une place particulière dans l'écosystème à l'interface sol-air-végétation. De ce fait, ils intègrent plusieurs sources de contamination (sol, atmosphère, végétaux) par voies digestive, respiratoire et/ou cutanée. Ils participent à la décomposition et à la fragmentation de la matière organique et sont impliqués dans de nombreuses chaînes alimentaires, y compris celle menant à l'homme (Barker, 2004). Ils sont notamment indispensables à l'alimentation des oiseaux car ils leur 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). Parmi les espèces les plus ubiquistes, *Helix aspersa* (escargot petit gris, syn. *Cantareus aspersus* ou

*Cornu aspersum* O.F. Müller, 1774). S'ils sont assez rares au milieu des champs et des prairies, ils fréquentent la périphérie des zones cultivées, les lisières de forêts, voire les milieux forestiers (Kerney *et al.*, 2006). Leurs capacités de résistance et d'accumulation des métaux ont été démontrées chez de nombreuses espèces (*Helix pomatia*, Dallinger et Wieser, 1984; *Helix aspersa*, Scheifler *et al.*, 2002a; *Cepaea nemoralis*, Notten *et al.*, 2005; *Pomacea paludosa*, Hoang *et al.*, 2008; *Theba pisana*, Radwan *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). L'insecticide pentachlorophénol n'est pas mortel pour les escargots à des concentrations de 1000 mg kg<sup>-1</sup> dans la nourriture (Gomot-de Vaufleury, 2000). 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 autres paramètres de toxicité étudiés pour l'évaluation du risque des sols, les effets toxiques directs sur la survie, la croissance et la reproduction (Beeby et Richmond, 1988; Radwan et Salama, 1999; Coeurdassier *et al.*, 2000; Gomot-de Vaufleury, 2000; 2001; Snyman *et al.*, 2002; Salama *et al.*, 2005; Snyman *et al.*, 2005; Regoli *et al.*, 2006; Druart *et al.*, 2010). Sur chaque étude réalisée en laboratoire, des informations peuvent être apportées sur les mécanismes d'action des pesticides, par la mesure d'effets sur des activités enzymatiques notamment (Coeurdassier *et al.*, 2001; Schreck *et al.*, 2008; Laguerre *et al.*, 2009; Mazzia *et al.*, 2011).

Les résultats des études ultérieures ont montré le potentiel des escargots en tant que bioindicateurs à l'interface sol-air-plantes. Ce potentiel doit être développé pour apporter des informations sur le comportement et les effets des très nombreuses molécules utilisées en tant que pesticides afin d'alimenter l'évaluation du risque environnemental.

## CHAPITRE II

*Effets du thiaméthoxam,  
de la téfluthrine et de leurs  
mélanges sur le comportement et les  
paramètres morphophysologiques  
de Helix aspersa*

## 1. Objectifs et principe de l'étude

Au niveau individuel, les effets toxiques des contaminants sur les processus physiologiques des invertébrés peuvent se traduire par une altération de plusieurs fonctions vitales et peuvent se répercuter sur les performances individuelles impliquées dans la dynamique des populations (taux de natalité, taux de mortalité, âge de première reproduction) (Forbes et Forbes, 1994). Ces effets sont les conséquences de changements métaboliques, cellulaires ou tissulaires mais aussi de modifications comportementales.

- Des altérations structurales et ultrastructurales de l'épithélium digestif peuvent induire une réduction des capacités de digestion et d'assimilation des aliments pour les organismes exposés, notamment des gastéropodes terrestres (Russell *et al.*, 1981; Marigomez *et al.*, 1996; Köhler et Triebkorn, 1998).
- Des variations de la consommation d'oxygène d'arthropodes (Mc Kenney et Matthews, 1990) et de mollusques (Forbes et Depledge, 1992) ont été reliées au niveau de contamination du milieu, sans être expliquées par des effets physiologiques causaux.
- Les modifications de l'acquisition, de la production de l'énergie et/ou de son allocation pour différentes fonctions vitales de l'individu (compromis énergétique entre toutes les fonctions) comme par exemple la diminution des ressources énergétiques disponibles pour la croissance et la reproduction, peuvent provoquer une baisse des performances individuelles voire aboutir à la mort de l'individu (Callow et Sibly, 1990; Forbes et Forbes, 1994).
- L'inhibition de la croissance induite par les contaminants peut résulter de troubles métaboliques, comportementaux ou de perturbations du contrôle neuroendocrine. Au niveau individuel, une conséquence écophysiologique importante de l'inhibition de croissance est d'engendrer un retard de la période de maturité sexuelle (Laskowski et Hopkin, 1996b).
- Plusieurs processus physiologiques sont susceptibles d'être impliqués dans les perturbations de la reproduction. Des insecticides et des perturbateurs endocriniens sont responsables de perturbations des processus métaboliques et hormonaux liés à la

reproduction de gastéropodes aquatiques (Wilbrink *et al.*, 1992; Jumel *et al.*, 2000). Les effets délétères sur la reproduction peuvent concerner des perturbations de la gamétogenèse (Russell *et al.*, 1981), du développement des organes reproducteurs (Caquet et Lagadic, 1998; Gomot-de Vaufleury et Keroas, 2000) ou encore du développement embryonnaire (Ravera, 1991). Les mécanismes biochimiques et physiologiques responsables de tels effets restent à identifier.

Des altérations comportementales, comme la diminution de la prise alimentaire, peuvent perturber les performances individuelles en modifiant l'acquisition de l'énergie (Caquet et Lagadic, 1998). Les relations intraspécifiques (changement des comportements reproducteur ou d'accouplement, Sheehan, 1984) et interspécifiques (diminution du comportement de fuite face au prédateurs, baisse de compétitivité, Atchinson *et al.*, 1996) peuvent également être modifiées. Les effets écophysiologiques et les modifications comportementales peuvent se répercuter aux niveaux d'organisation supérieurs et être en partie responsables des perturbations populationnelle, communautaire et écosystémique.

Les objectifs de cette partie ont été la mise en place d'élevage afin de disposer d'individus pour les expérimentations en milieu contrôlé, puis la recherche des effets des différents traitements choisis sur le comportement des escargots et sur certains paramètres morphométriques.

## **2. Matériel et méthodes**

Tous les bioessais de cette étude ont été réalisés au Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, du département de Biologie, Université Badji Mokhtar Annaba.

### **2.1. Matériel biologique**

L'escargot *Helix aspersa* (Fig. 5) 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 35mm et une hauteur de 25 à 40mm. Deux grandes parties sont distinguées : le pied et les viscères (Fig. 6). 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 (Fig. 7). Le pied comporte essentiellement la sole pédieuse, musculieuse, la partie antérieure du tube digestif et le système nerveux.

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.

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).

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. 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. En effet, ils ne sont pas tous matures au même moment du fait de l'asynchronisme du développement du tractus génital pendant la croissance (Bride et Gomot, 1991). L'accouplement peut durer plus de 12h. La fécondation a lieu au niveau de la chambre de fertilisation, à la surface de la glande à albumen, généralement une quinzaine de



Figure 5: Escargot *Helix aspersa*.

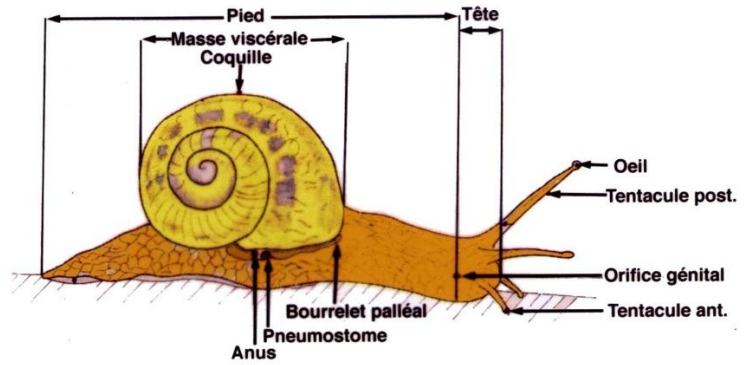


Figure 6 : Morphologie externe de l'escargot (Kerney *et al.*, 2006).

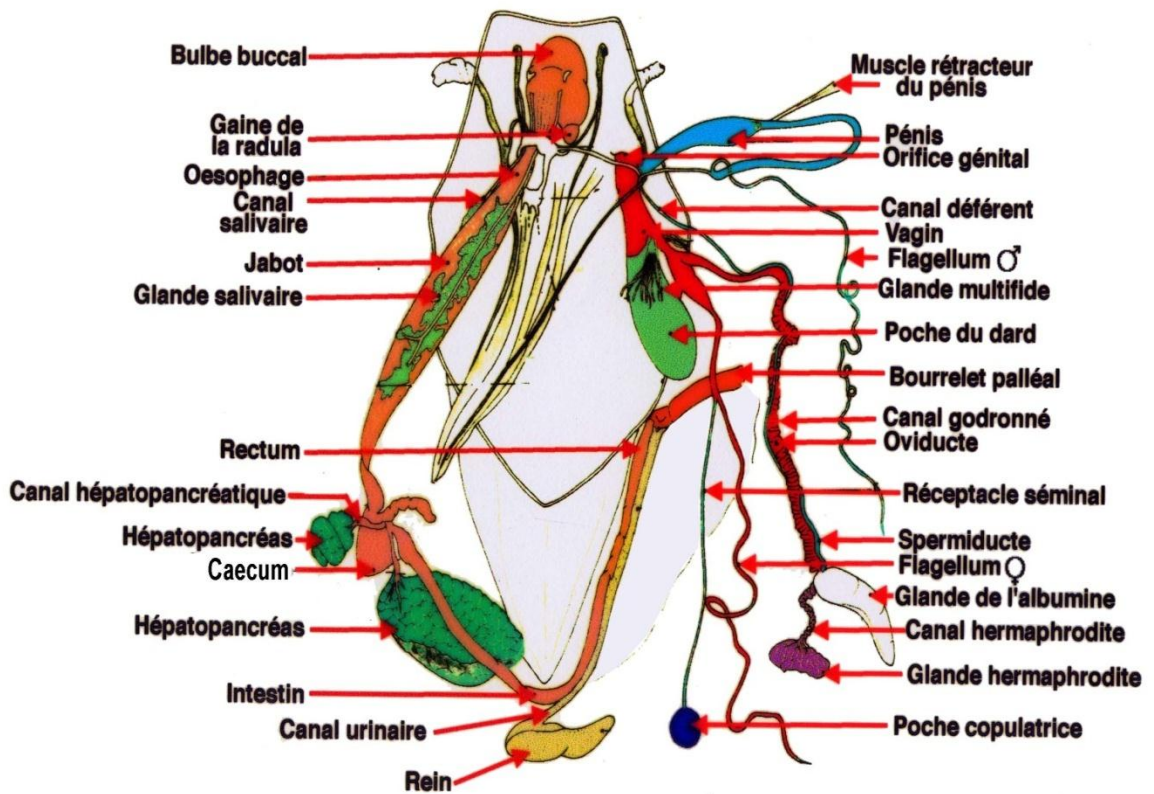


Figure 7 : Anatomie interne (appareils génital et digestif) de l'escargot *Helix aspersa* (Beaumont et Cassier, 1998).

jours après l'accouplement. Les ovocytes fécondés sont alors entourés d'albumen secrété par la glande à albumen, qui constitue les réserves nutritives pour le développement embryonnaire, puis d'une coque calcaire. 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 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 (Gomot de Vaufleury, 2001).

## **2.2. Choix des insecticides**

La première étape de notre travail a consisté à définir les insecticides et les mélanges d'insecticides à tester. Plusieurs possibilités pouvaient être envisagées. Les pesticides peuvent être testés en mélange en fonction de leur nature chimique, de leurs modes d'action, leurs cibles cellulaires et/ou physiologiques, de la probabilité pour les consommateurs d'être exposés à ceux-ci (Apport Journalier Maximum Théorique, AJMT), de leur présence dans des compartiments particuliers de l'alimentation (fruits, légumes, eau, céréales, etc.), des tonnages utilisés, ou en fonction de la présence de résidus dans l'alimentation.

Pour nos études nous avons choisi dans un premier temps de déterminer les pesticides les plus utilisés sur les fruits et légumes dans la région Nord-Est algérienne par une enquête personnelle. Cette démarche nous a conduits à choisir 2 insecticides et leurs mixtures qui figuraient dans la liste des pesticides les plus utilisés par les agriculteurs. Il s'agit de deux insecticides; le thiaméthoxam et la téfluthrine.

Afin de mimer l'exposition des invertébrés aux deux insecticides, les concentrations étudiées devaient refléter les concentrations des insecticides égales ou inférieures à celles utilisées en cultures. Cependant les mélanges nous posaient un problème; selon le type de culture ainsi que selon les pratiques agricoles, il était difficile de choisir des concentrations à partir de ces valeurs. Ainsi, nous avons retenu les mélanges des concentrations consécutives choisies pour les deux insecticides dès le départ.

### 2.2.1. Le thiaméthoxam

Le thiaméthoxam a été utilisé sous forme de préparation commerciale. Nous avons choisi quatre doses (25, 50, 100 et 200 mg/L) inférieures ou égales à des concentrations appliquées en culture. En effet, l'insecticide est appliqué à des concentrations allant de 800 à 4000 mg/L, correspondant à 200 à 1000 mg/L de thiaméthoxam (matière active). Ainsi, les concentrations choisies se rapportent à des concentrations plus faibles que celles rencontrées par les escargots en culture.

### 2.2.2. La téfluthrine

La téfluthrine a été utilisée sous forme de préparation commerciale. Nous avons choisi quatre doses (0, 5, 10, 20 et 40 mg/L) inférieures ou égales à des concentrations appliquées en culture. En effet, l'insecticide est appliqué à des concentrations allant de 12 à 50 kg/ha, correspondant à 18 à 75 mg/m<sup>2</sup> de téfluthrine (matière active). Ainsi, les concentrations choisies se rapportent également à des concentrations plus faibles que celles rencontrées par les escargots en culture.

### 2.2.3. Les mixtures

Les mixtures ont été testées aux concentrations citées ci-dessus (Tab. 3).

**Tableau 3 : Composition des mixtures testées.**

Mixture	Désignation	Concentration en thiaméthoxam et téfluthrine
Mixture 1 :	M1	25 mg/L de thiaméthoxam + 5 mg/L de téfluthrine
Mixture 2 :	M2	50 mg/L de thiaméthoxam + 10 mg/L de téfluthrine
Mixture 3 :	M3	100 mg/L de thiaméthoxam + 20 mg/L de téfluthrine
Mixture 4 :	M4	200 mg/L de thiaméthoxam + 40 mg/L de téfluthrine

## 2.3. Conduite de l'essai

### 2.3.1. Protocole de contamination des escargots

Les escargots utilisés sont les adultes de *Helix aspersa* collectés d'un site non traité par les pesticides, situé dans la région de Guelma (Nord-Est algérien). 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. Cependant, ils sont nourris exclusivement de feuilles de laitue fraîche (Fig. 8). Les 260 individus choisis ont une masse moyenne de  $14,44 \pm 0.2$  g et un diamètre coquillère moyen de  $37 \pm 0.5$  mm. En premier lieu, ils sont divisés en 4 lots : un premier lot témoin de 20 escargots et trois autres lots de 80 escargots chacun. Le deuxième, le troisième et le quatrième lot d'escargots sont destinés aux traitements au thiaméthoxam, à la téfluthrine et aux mixtures respectivement.



**Figure 8 : Dispositif de contamination de *Helix aspersa* par la laitue.**

Chaque lot (de 80 escargots), à son tour, est réparti en 4 groupes de 20 animaux chacun et maintenus dans des boîtes en polystyrène perforées ( $25 \times 13.5 \times 16.5$  cm). Les groupes d'escargots sont nourris de laitue fraîche (escargots témoins), ou de laitue imbibée (durant 30 s) de solution d'insecticide selon le tableau 4. Toutes les dilutions d'insecticide à base de thiaméthoxam, de téfluthrine, et de leurs mixtures ont été préparées avec de l'eau distillée. Les solutions d'insecticide sont renouvelées chaque semaine. La nourriture est fournie trois à quatre fois par semaine lors du nettoyage des boîtes.

Pour déterminer l'effet de l'insecticide, l'expérience est menée durant 6 semaines sous des conditions contrôlées de laboratoire citées auparavant.

**Tableau 4 : Dilutions d'insecticides utilisées et pH correspondant.**

<b>Groupes</b>		<b>pH</b>
<b>Groupe T</b>	Escargots témoins non traités	5.80
<b>Groupe Th1</b>	Escargots traités avec 25 mg/L de thiaméthoxam	6.52
<b>Groupe Th2</b>	Escargots traités avec 50 mg/L de thiaméthoxam	6.12
<b>Groupe Th3</b>	Escargots traités avec 100 mg/L de thiaméthoxam	5.81
<b>Groupe Th4</b>	Escargots traités avec 200 mg/L de thiaméthoxam	5.18
<b>Groupe Te1</b>	Escargots traités avec 5 mg/L de téfluthrine	6.61
<b>Groupe Te2</b>	Escargots traités avec 10 mg/L de téfluthrine	6.69
<b>Groupe Te3</b>	Escargots traités avec 20 mg/L de téfluthrine	6.47
<b>Groupe Te4</b>	Escargots traités avec 40 mg/L de téfluthrine	6.48
<b>Groupe M1</b>	Escargots traités avec 25 mg/L de thiaméthoxam + 5 mg/L de téfluthrine	6.58
<b>Groupe M2</b>	Escargots traités avec 50 mg/L de thiaméthoxam + 10 mg/L de téfluthrine	6.20
<b>Groupe M3</b>	Escargots traités avec 100 mg/L de thiaméthoxam + 20 mg/L de téfluthrine	6.66
<b>Groupe M4</b>	Escargots traités avec 200 mg/L de thiaméthoxam + 40 mg/L de téfluthrine	6.03

### **2.3.2. Dissection de l'escargot pour le prélèvement des organes**

A la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine de traitement, les escargots sont pesés. Ensuite, les animaux sont sacrifiés par décapitation (Fig. 9, 10), et les têtes sont récupérées dans le tampon adéquat pour des analyses ultérieures. Les escargots sont décoquillés et leurs hépatopancréas rapidement excisés et pesés. 8 spécimens choisis au hasard de chaque traitement sont sacrifiés, et parmi lesquels, 5 spécimens sont destinées aux mesures des biomarqueurs physiologiques.

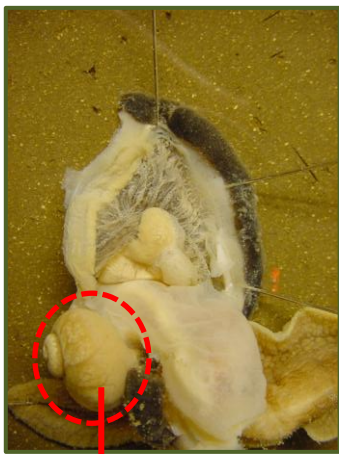


Figure 9 : Dissection des viscères de l'escargot.

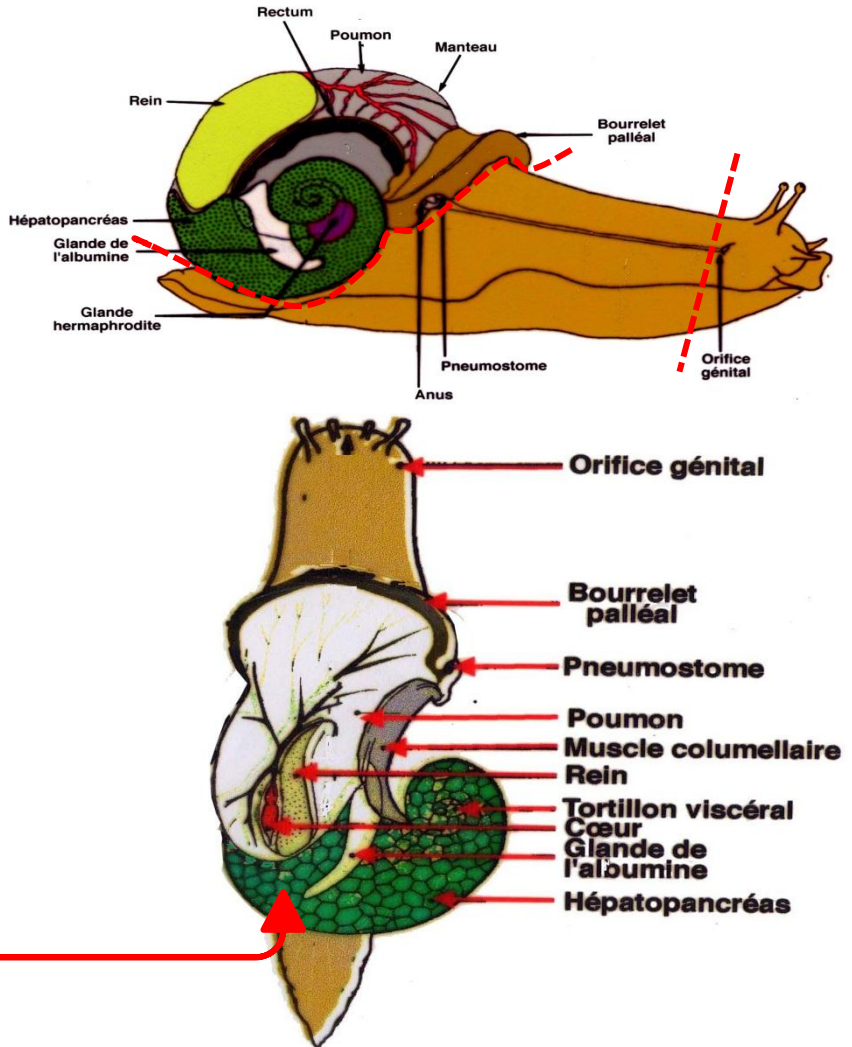


Figure 10 : Dissection des viscères et observation des organes en place, avec représentation de la ligne (----->) de décapitation et de dissection séparant le pied des viscères et des principaux organes internes.

### 2.3.3. Effets comportementaux

Au cours de l'exposition aux différents traitements, nous avons également cherché à caractériser les effets des insecticides testés sur les comportements plus ou moins perturbés de *Helix aspersa*. Lorsqu'il est inactif, nous avons observé que *Helix aspersa* a tendance à se réfugier sur des supports situés à quelques cm du fond de la boîte (position haute). Ceci a déjà

été rapporté par d'autres auteurs (Chevallier, 1992). A partir de ces observations, certains comportements peuvent être observés, comme se nourrir normalement ou fuir la nourriture, ou en fonction de l'activité des animaux et de leur position spatiale dans l'enceinte d'essai : par exemple, actif ou inactif en position haute ou sur les supports, ou encore, actif ou inactif sur la nourriture.

Ces comportements sont observés, les jours de changement de nourriture. Si la position dans les enceintes peut être facilement relevée, l'activité des animaux est notée de la façon suivante : la boîte est ouverte et le couvercle retourné est posé sur la paille. Après une minute, les escargots en mouvement sont considérés comme actifs, ceux qui restent immobiles sont inactifs. Cette méthode est retenue plutôt qu'une observation directe sans ouverture de la boîte car les escargots ont une activité plutôt nocturne si bien qu'au moment des observations, la quasi-totalité des escargots sont inactifs. L'activité ainsi observée représente donc plutôt un état de réceptivité et une capacité à réagir à une stimulation mécanique (déplacement et ouverture de la boîte). Les résultats sont exprimés sous forme d'observations hebdomadaires de chaque comportement vis-à-vis des concentrations d'un insecticide par rapport au témoin.

#### **2.3.4. Biomarqueurs physiologiques**

Plusieurs paramètres biométriques sont considérés, à savoir :

- ❖ la **mortalité** : le contrôle de la vitalité des individus de *Helix aspersa* au cours des essais est effectué au moment des renouvellements de nourriture, de chaque semaine de test. Dans tous les cas, les individus morts sont évacués des enceintes d'essai. La mort d'un individu est généralement facile à déterminer : le pied flasque et jaunâtre est le plus souvent sorti de la coquille. La sole pédieuse n'adhère à aucune surface. Le corps luisant et très visqueux indique que la liquéfaction des tissus est en cours. L'odeur nauséabonde que dégage l'escargot est également un indicateur. En cas de doute, le pied est stimulé à l'aide d'une aiguille ou d'une paire de pinces brucelles. L'absence de réaction permet de conclure à la mort de l'individu.
- ❖ Le **poids frais de l'escargot** (tissus mous + coquille) est mesuré à l'aide d'une balance de précision modèle OHAUS®ANALYTICAL Plus, de façon hebdomadaire, avant et pendant la durée du traitement. Les pesées sont toujours réalisées avant le nettoyage de l'enceinte d'essai (Gomot, 1997a).

- ❖ Le **poids frais de la coquille** et le **poids frais de l'hépatopancréas** sont mesurés à l'aide de la même balance utilisée précédemment. Cette pesée est effectuée après le sacrifice des animaux, à la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine de traitement par les insecticides.

## 2.4. Analyse statistique

Les moyennes  $\pm$  déviation standard (DS), avec un niveau significatif de  $p \leq 0.05$ , sont calculées pour chaque groupe d'expérience. Le test 't' de Student, l'analyse de la variance à un et deux critères de classification ont permis de mettre en évidence les différences entre les groupes étudiés au cours des tests effectués sur les paramètres physiologiques. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 13.31.

## 3. Résultats

### 3.1. Estimation du taux d'alimentation

Le taux de laitue consommée par les escargots n'a pas été mesuré car nous avons constaté que les feuilles de laitue trempées dans l'insecticide perdaient rapidement leur fraîcheur par rapport à celle des escargots témoins (trempées dans l'eau distillée), ainsi il était impossible de quantifier le taux de feuilles consommées avec précision, et il était donc impossible d'estimer le taux d'alimentation.

### 3.2. Effets sur le comportement

Les escargots exposés au thiaméthoxame ont montré une série de symptômes. Le premier symptôme est la perte de la chimioréception, de sorte que les escargots ne sont plus attirés par la nourriture de façon dose-dépendante comparé aux escargots témoins. A la concentration élevée de thiaméthoxam (200 mg/L), les escargots passent la plupart de leur temps au sommet des boîtes sans montrer aucune activité locomotrice et nutritionnelle après la première semaine d'exposition. À la concentration 100 mg/L, presque tous les escargots refusent de consommer les feuilles de laitue après 3 semaines d'exposition. Toutefois, aux concentrations les plus faibles 50 et 25 mg/L, la plupart des animaux ont montré une activité similaire à celle des escargots témoins pendant la période expérimentale.

Les escargots exposés aux concentrations 5 et 10 mg/L de téfluthrine sont le plus souvent observés en activité comparable aux escargots témoins, durant les six semaines de traitement. Cependant, à la concentration 20 mg/L, les individus ont tendance à être moins actifs, dès la deuxième semaine de traitement, et sont préférentiellement en position haute sur le couvercle comparés aux escargots témoins. Enfin, à la plus forte concentration testée (40mg/L), tous les escargots fuient la nourriture, se positionnent au sommet des boîtes, et n'ont pratiquement pas d'activité locomotrice, dès la première semaine de traitement. La consommation de la laitue contaminée diminuait d'une façon dose-dépendante.

Enfin, les escargots exposés aux M1 et M2 avaient des comportements similaires à ceux des escargots témoins durant toute la durée du traitement. Cependant, les différences entre les groupes exposés et les groupes témoins sont exclusivement notées aux deux plus fortes mixtures testées. Ainsi, à la M3, les escargots en tendance à fuir la nourriture dès la troisième semaine de traitement. A la M4, tous les escargots fuient la nourriture et se positionnent au sommet des boîtes dès la première semaine de traitement. La consommation de la laitue contaminée diminuait d'une façon dose-dépendante pour les M1, M2 et M3, et était nulle à la plus forte mixture testée (M4), comparée à celle des escargots témoins.

### **3.3. Effets sur les paramètres morphométriques**

Les données morphométriques (détermination de la mortalité, le poids frais de l'escargot, de l'hépatopancréas et de la coquille), ont été collectées chez la totalité des individus témoins et traités examinés grâce aux méthodes décrites précédemment.

#### **3.3.1. La mortalité**

Durant l'expérience, la mortalité était faible, avec seulement 25 individus sur 260 escargots, ce qui représente 9.61 %. La mortalité (Tab. 5) est survenue comme suit : 4 individus dans le groupe Te4 durant la première semaine de traitement; 10 individus durant la deuxième semaine de traitement : 2 individus dans le groupe Th2, 4 individus dans le groupe Te4 et les 4 autres dans le groupe M4; 7 individus pendant la troisième semaine : 1 individu dans le groupe T, 2 individus dans le groupe Te1 et 4 individus dans le groupe Te4, et enfin 4 individus durant la quatrième semaine dans le groupe Th4.

**Tableau 5 : Mortalité des escargots adultes durant les six semaines de traitement par les deux insecticides et leurs mixtures.**

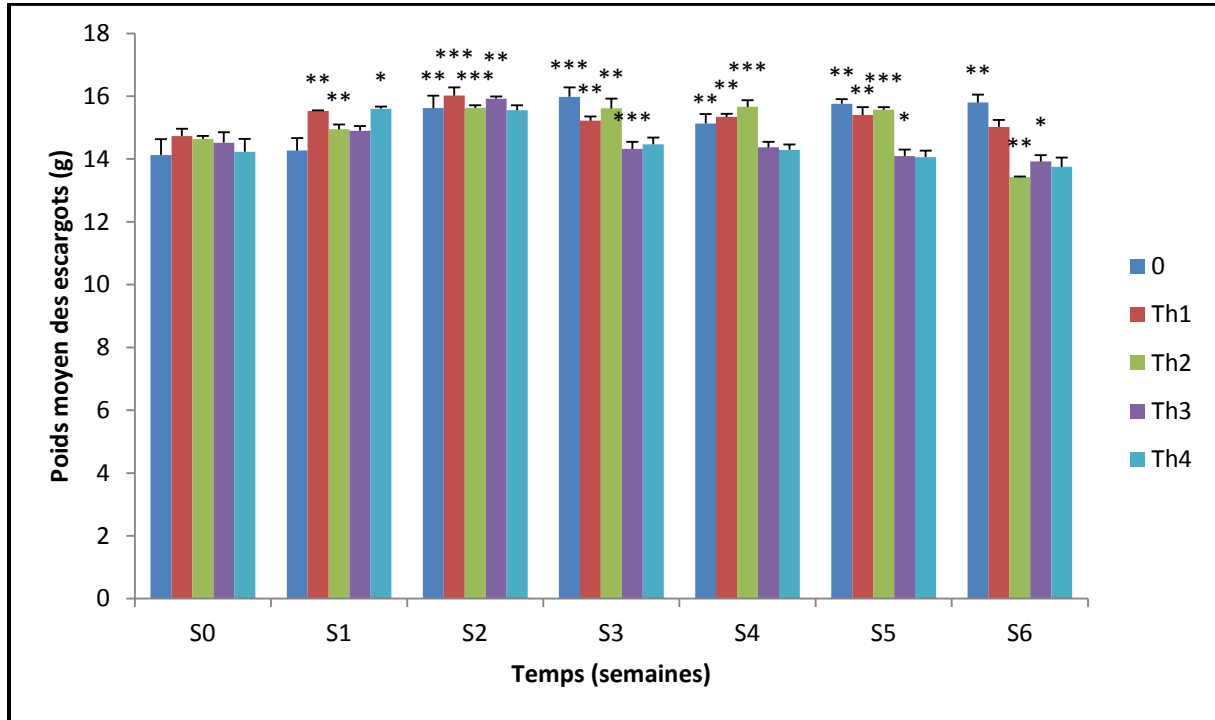
<b>Période d'exposition</b> <b>Groupe</b>	<b>Début de l'expérience</b>	<b>1<sup>ère</sup> semaine</b>	<b>2<sup>ème</sup> semaine</b>	<b>3<sup>ème</sup> semaine</b>	<b>4<sup>ème</sup> semaine</b>	<b>5<sup>ème</sup> semaine</b>	<b>6<sup>ème</sup> semaine</b>	<b>Mortalité totale</b>
<b>Groupe T</b>	0	0	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<b>Groupe Th1</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>Groupe Th2</b>	0	0	2	0	0	0	0	<b>2</b>
<b>Groupe Th3</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>Groupe Th4</b>	0	0	0	0	4	0	0	<b>4</b>
<b>Groupe Te1</b>	0	0	0	2	0	0	0	<b>2</b>
<b>Groupe Te2</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>Groupe Te3</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>Groupe Te4</b>	0	4	4	4	0	0	0	<b>12</b>
<b>Groupe M1</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>Groupe M2</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>Groupe M3</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>Groupe M4</b>	0	0	4	0	0	0	0	<b>4</b>
<b>Mortalité totale</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>25</b>

### 3.3.2. Evolution du poids frais des escargots

L'évolution du poids frais moyen des escargots sous l'effet du thiaméthoxam, de la téfluthrine et des mixtures (Fig. 11, 12 et 13) durant les six semaines de traitement présente une certaine similitude. A la fin de l'expérience, le poids frais moyen des escargots traités avait tendance à diminuer d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) avec l'augmentation de la concentration des deux insecticides et de leurs mixtures par rapport au poids frais moyen des escargots témoins.

Ainsi, le poids frais moyen des escargots traités au thiaméthoxam a tendance à augmenter sous l'effet des quatre concentrations (Fig. 11) durant les deux premières semaines de traitement. A partir de la troisième semaine d'exposition, il y a une diminution hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du poids frais moyen à la concentration 100 mg/L, et non significative ( $p > 0.05$ ) à la concentration 200 mg/L par rapport à celui des escargots témoins. Cette

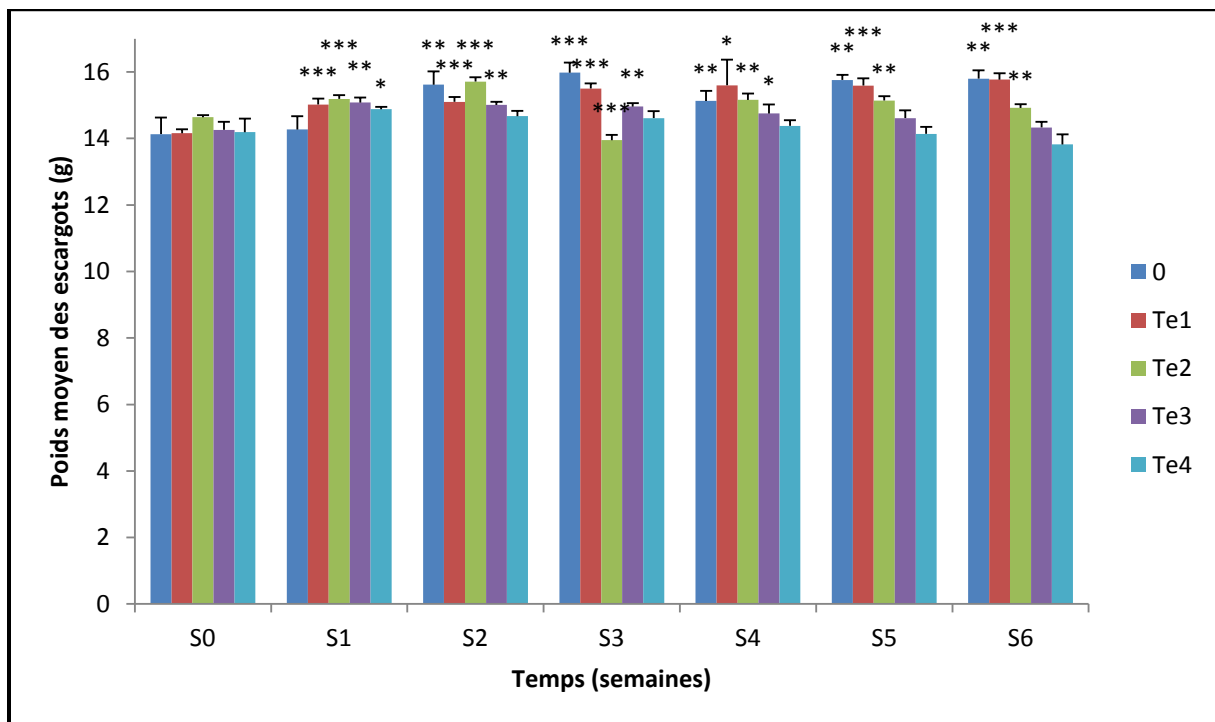
diminution du poids touche également les escargots traités à la concentration 50 mg/L d'une façon très significative ( $p \leq 0.01$ ), durant la sixième semaine de traitement.



Moyennes  $\pm$  SD; n = 5. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les masses moyennes des escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. Test 't' de Student : \*pour  $p \leq 0.05$ , \*\* pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 11 : Effets du thiaméthoxam sur le poids frais moyen des adultes de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de six semaines.**

D'un autre côté, le poids frais moyen des escargots traités à la téfluthrine augmente significativement (Fig. 12) au cours des deux premières semaines d'exposition. A partir de la troisième semaine d'exposition, il y a une diminution hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du poids frais moyen à la concentration 10 mg/L par rapport à celui des escargots témoins. Une diminution non significative ( $p > 0.05$ ) du poids touche également les escargots traités aux concentrations 20 et 40 mg/L, à partir de la cinquième semaine de traitement.

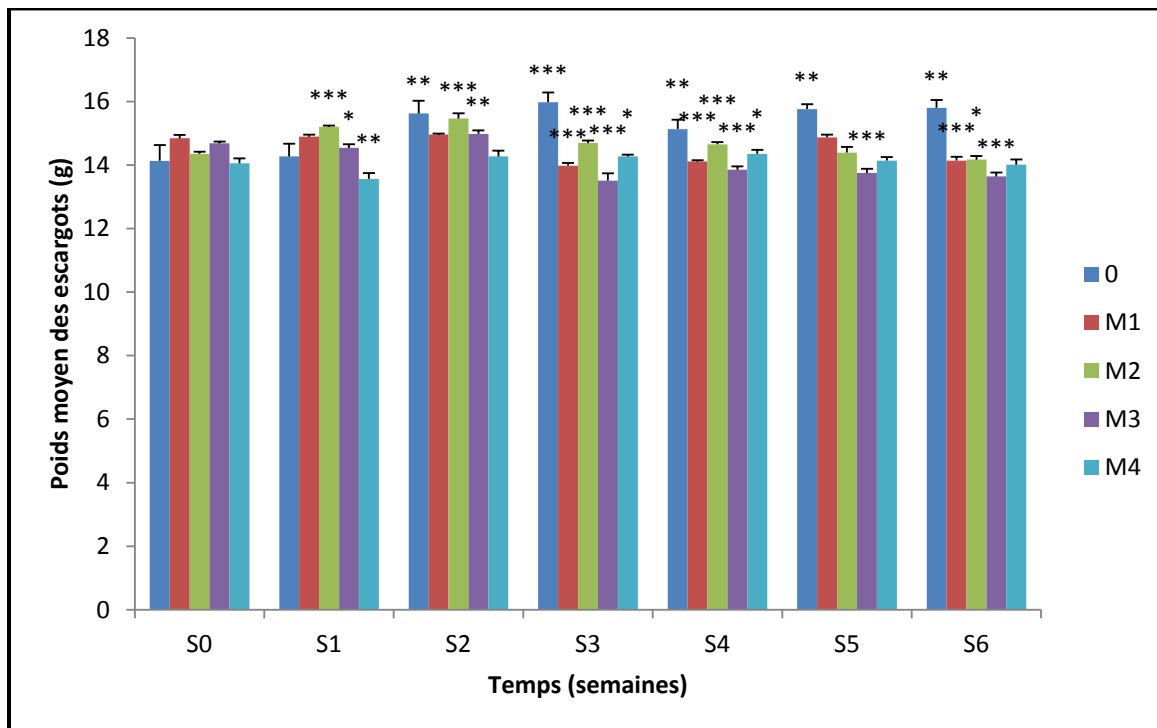


Moyennes  $\pm$  SD; n = 5. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les masses moyennes des escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. Test 't' de Student : \*pour  $p \leq 0.05$ , \*\* pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 12 : Effets de la téfluthrine sur le poids frais moyen des adultes de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de six semaines.**

Enfin, le poids frais moyen des escargots traités aux mixtures (Fig. 13) montre une diminution très significative ( $p \leq 0.01$ ) à partir de la première semaine d'exposition à la M4. Ensuite, cette diminution touche également les mixtures M1 et M3 à partir de la troisième semaine de traitement et la M2 à la sixième semaine par rapport aux escargots témoins.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement, de la durée de traitement et de l'interaction traitement-durée de traitement hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) pour les deux insecticides et leurs mixtures.



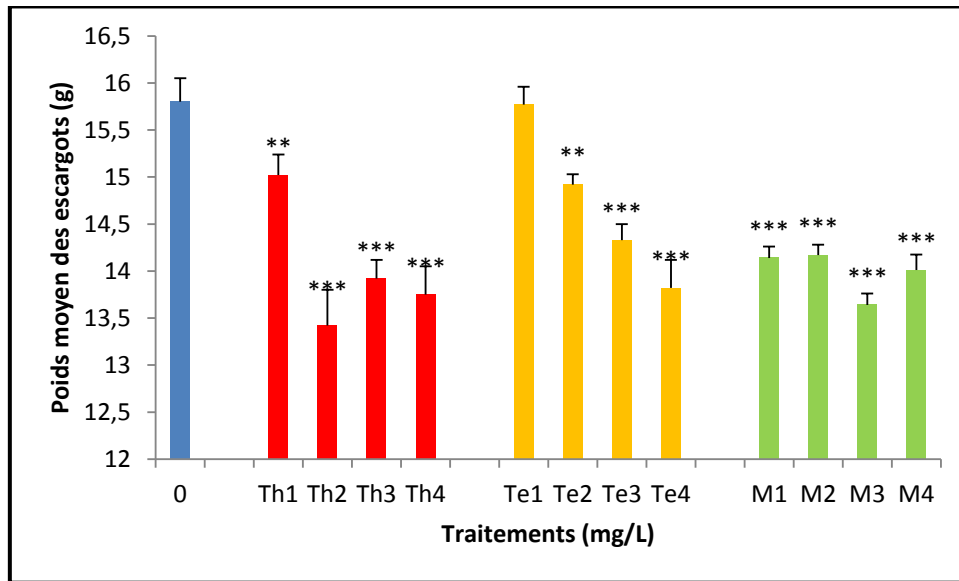
Moyennes  $\pm$  SD; n = 5. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les masses moyennes des escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. Test 't' de Student : \*pour  $p \leq 0.05$ , \*\* pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 13 : Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine sur le poids frais moyen des adultes de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de six semaines.**

### 3.3.3. Le poids frais moyen des escargots

L'effet des deux insecticides et de leurs mixtures sur le poids frais moyen des escargots est présenté dans la figure 14. Une diminution dose-dépendante et significative du poids est notée pour les deux insecticides par rapport à celui des témoins. Cependant, la M3 semble avoir un effet plus marqué sur le poids par rapport aux M1, M2 et M4.

L'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA), révèle un effet de traitement aux insecticides testés hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) par rapport aux escargots témoins.



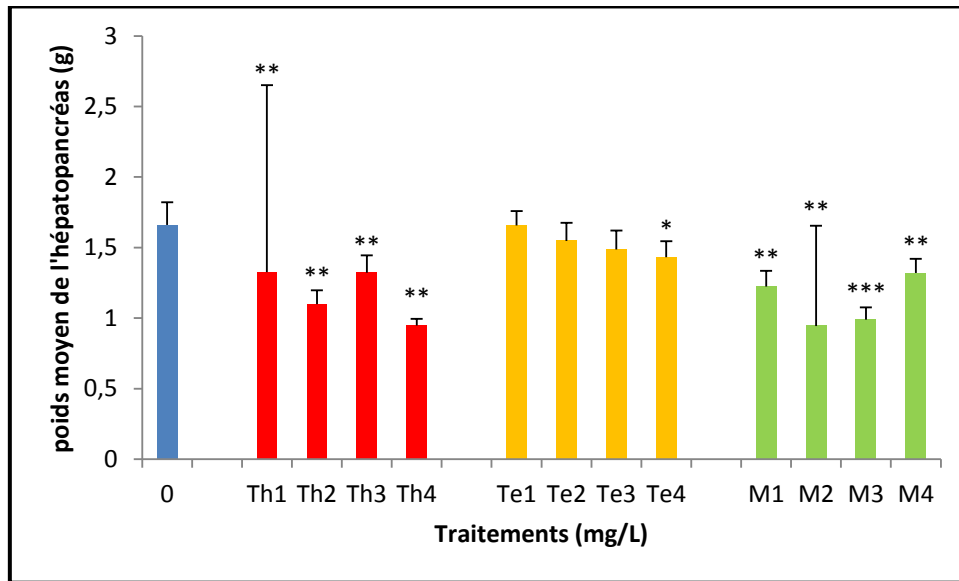
Moyennes  $\pm$  SD; n = 5. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les masses moyennes des escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. Test 't' de Student : \*\*pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 14 : Effets du thiaméthoxam et de la téfluthrine et de leurs mixtures sur le poids frais moyen des adultes de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) après six semaines de traitements**

### 3.3.4. Le poids frais moyen de l'hépatopancréas

Le poids frais moyen de l'hépatopancréas (Fig. 15) diminue d'une façon très significative ( $p \leq 0.01$ ) à partir de la plus faible concentration de thiaméthoxam. Cependant, l'évolution de ce poids par exposition des escargots à la téfluthrine, montre une diminution non significative ( $p > 0.05$ ) aux concentrations 5, 10 et 20 mg/L, et significative ( $p \leq 0.05$ ) à la concentration 40 mg/L par rapport à celui des escargots témoins. Les M1, M2 et M4 réduisent très significativement ( $p \leq 0.01$ ) le poids frais moyen de l'hépatopancréas. Cette diminution est plus importante ( $p \leq 0.001$ ) sous l'effet de la M3.

L'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA), révèle un effet de traitement aux insecticides testés hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) par rapport à celui des escargots témoins.



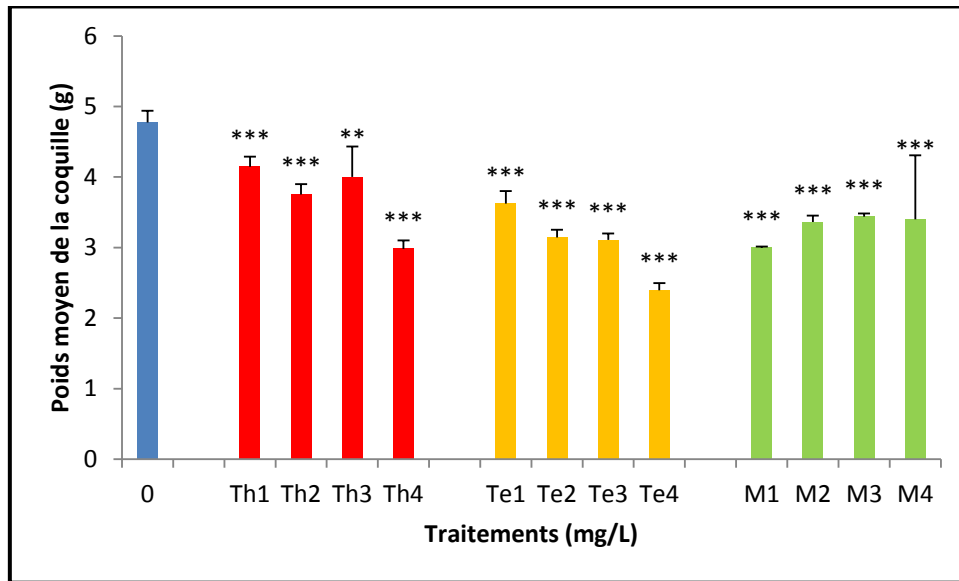
Moyennes  $\pm$  SD; n = 5. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les masses moyennes des escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. Test 't' de Student : \*pour  $p \leq 0.05$ , \*\* pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 15 : Effets du thiaméthoxam et de la téfluthrine et de leurs mixtures sur le poids frais moyen de l'hépatopancréas des adultes de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) après six semaines de traitements**

### 3.3.5. Le poids frais moyen de la coquille

Le poids frais moyen de la coquille (Fig. 16) diminue d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) à partir de la plus faible concentration des deux insecticides et de leurs mixtures. Cependant, l'exposition au thiaméthoxam entraîne une réduction plus importante du poids frais hépatopancréatique par rapport à la téfluthrine.

L'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA), montre un effet de traitement aux insecticides testés hautement significatif ( $P \leq 0.001$ ) par rapport aux escargots témoins.



Moyennes  $\pm$  SD; n = 5. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les masses moyennes des escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. Test 't' de Student : \*\*pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 16 : Effets du thiaméthoxam et de la téfluthrine et de leurs mixtures sur le poids frais moyen coquillère des adultes de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) après six semaines de traitements**

## 4. Discussion

### 4.1. Mortalité

La mortalité des escargots observée dans cette étude (9.61 %) est peu similaire à celle (13%) observée dans l'expérience de Schuytema *et al.* (1994) après exposition des escargots *Helix aspersa* à 5mg/Kg de carbaryl pendant 14 jours. Cependant, les mêmes auteurs n'ont pas montré d'effets létaux chez la même espèce d'escargots exposés *via* l'alimentation jusqu'à des concentrations de 5000 mg kg<sup>-1</sup> après ingestion de glyphosate. En effet, la mortalité des escargots dépend de l'espèce testée et de sa sensibilité vis-à-vis des substances testées.

## 4.2. Réponses comportementales

Les effets inhibiteurs du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures aux plus fortes concentrations, sur le comportement locomoteur et nutritif des adultes de l'escargot *Helix aspersa* peut suggérer un effet neurotoxique des deux insecticides et de leurs mixtures sur cette espèce de gastéropode. En effet, les effets inhibiteurs du thiaméthoxam sur le comportement locomoteur des insectes (Bingham *et al.*, 2008) et d'abeilles (Aliouane *et al.*, 2009) et le comportement des rats (Rodrigues *et al.*, 2010) ont déjà été étudiés. De la même manière, les effets inhibiteurs de la téfluthrine ont été également rapportés chez les rats (Righi et Palermo-Neto *et al.*, 2003). De plus, les néonicotinoïdes et les pyréthri-noïdes sont des substances neurotoxiques, ayant des effets délétères sur le système nerveux, mais d'autres systèmes peuvent aussi être affectés par ces molécules (Glickman et Lech, 1982; Palermo-Neto *et al.*, 2003; Datta et Kaviraj, 2003).

Chez les gastéropodes, des effets léthargiques d'OPs dont le diméthoate ont été observés notamment chez les juvéniles ainsi que chez les adultes de *Helix aspersa* (Schuytema *et al.*, 1994; Coeurdassier *et al.*, 2001). Chez les individus juvéniles, les effets comportementaux significatifs sont observés aux plus fortes concentrations testées pendant les 4 semaines de test. Cependant, chez les adultes, le diméthoate provoque une inactivité marquée des escargots, surtout pendant les 2 premières semaines d'exposition.

Enfin, pour les modifications de comportement notées dans notre étude, pour des concentrations en insecticides élevées, il sera nécessaire de rechercher ces effets comportementaux et leurs conséquences dans des conditions d'environnement et d'application des insecticides écologiquement plus réalistes.

## 4.3. Réponses physiologiques

Les escargots exposés par ingestion au thiaméthoxam, à la téfluthrine et leurs mixtures apparaissent assez sensibles à ses deux insecticides aux conditions de laboratoire. Ainsi, les faibles concentrations d'insecticides inhibent la prise de poids des escargots à partir de la troisième semaine de traitement, sans pour autant limiter l'accumulation possible de ses molécules toxiques ou de leurs métabolites dans leurs organes. Toutefois, dans les cas extrêmes, en présence de fortes concentrations de ces composés, l'inhibition de la prise de poids peut être due à la répulsion de la nourriture, et donc au jeune prolongé des escargots. Les deux insecticides et leurs mixtures réduisent également le poids frais moyen de l'hépatopancréas et celui de la coquille après six semaines de traitement.

En effet, Schuytema *et al.* (1994), ont rapporté que la réduction significative ( $p < 0.05$ ) du poids (total, coquillère et des tissus mous) des escargots traités avec l'aminocarbe, le méthyl parathion et le paraquat est liée à la nature et à la dose du pesticide administré. Aussi Coeurdassier *et al.* (2001) ont observé une diminution dose-dépendante de la croissance et de la survie des escargots induite par le diméthoate, et l'exposition par la voie épithéliale induit la plus forte toxicité. Dans la même optique, Gomot-de Vaufleury et Bispo (2000) se sont intéressés aux effets de l'ingestion à partir d'un sol contaminé avec du pentachlorophénol, du trichlorophénol et du naphthalène ou de la pulvérisation de son lixiviat sur la croissance de *Helix aspersa aspersa* et *Helix aspersa maxima* exposés pendant 28 jours. Une forte inhibition de la croissance est observée chez *Helix aspersa aspersa* alors qu'elle ne l'est qu'aux plus fortes concentrations chez *Helix aspersa maxima*. Les deux sous espèces sont moins sensibles à l'exposition cutanée et n'a aucun effet sur la croissance de *Helix aspersa maxima*. En plus, El-Wakil et Attia (1999) ont montré que l'ingestion de dimiline n'a pas d'effet léthal sur les adultes de l'escargot *Theba pisana* à 10 000 µg, alors que l'exposition des juvéniles pendant 35 jours à 1 000 µg de dimiline provoque une inhibition de croissance significativement plus importante.

Ainsi, Viard *et al.* (2004) ont fait des constatations similaires en présence d'une contamination en plomb : c'est l'extrême concentration en plomb dans le sol, détectée par les escargots, qui limite leur taux de consommation et donc inhibe partiellement leur croissance. Ainsi, Simkiss et Watkins (1990) suggéraient déjà que *Helix aspersa* est capable de détecter de fortes concentrations en zinc dans sa nourriture, ce qui entraîne une diminution du taux de consommation de la nourriture fortement contaminée. Toutefois, cette inhibition de croissance peut aussi être due à un phénomène de toxicité. Swaileh et Ezzughayyar (2000) ont montré, 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).

Selon Gomot (1997), le mécanisme impliqué dans l'inhibition de croissance des escargots nourris avec de la nourriture contaminée est difficile à identifier. Il pourrait s'agir

d'une inhibition de synthèse d'une hormone de croissance essentielle à la croissance des escargots.

D'un autre côté, Viard *et al.* (2004) ont rapporté que les mesures de bioaccumulation dans les viscères des escargots permettent d'évaluer au plus juste le niveau de contamination d'un sol en HAP. L'existence de cette relation pourrait amener à une bioindication possible des molécules organiques par *Helix aspersa*. Cependant, du fait des difficultés analytiques et/ou de l'absence de méthodes d'analyse facilement accessibles, il existe peu d'études ayant mesuré la bioaccumulation des insecticides étudiés dans les tissus animaux.

La diminution dose- dépendante du poids frais moyen de la coquille des escargots traités par les deux insecticides étudiés et leurs mixtures pourrait s'expliquer par une interférence possible du thiaméthoxam et/ou de la téfluthrine et/ou de leurs métabolites dans le métabolisme du calcium (Ca). En effet, le Ca joue un rôle important dans le développement du corps entier des escargots et en particulier celui de la coquille. Ceci a été montré chez *Helix aspersa* (Gomot *et al.*, 1989) et chez *Achatina fulica* (Irlande, 1991). Ces auteurs expliquent cet effet par une augmentation de l'épaisseur et de la masse de la coquille. La coquille est constituée principalement par du carbonate de calcium et une matrice organique appelée le chonchiolin (Heller et Magaritz, 1983). Ainsi, Gimbert *et al.* (2008) ont démontré une diminution de 30% de la masse de la coquille des escargots exposés à un sol artificiel contaminé par le cadmium. Cependant, Jordaens *et al.* (2006) n'ont pas trouvé de relation significative entre la pollution des sols par les ETM (Cd, Cr, Pb et Zn) et la solidité des coquilles des escargots *Cepea nemoralis* prélevés *in situ*.

## **5. Conclusion**

Enfin, ces altérations du poids frais moyen des escargots et celles de l'hépatopancréas et de la coquille pourraient être dues à la contamination par les insecticides, mais aussi à une perturbation dans la composition biochimique des tissus, la composition minérale de la coquille et les réserves énergétiques accumulées par cette espèce d'escargot pour assurer sa croissance et sa reproduction. Ainsi, une perturbation de la composition biochimique en protéines, glucides et lipides peut être utilisée comme biomarqueur de contamination et évaluer son impact sur des processus physiologiques tels que la croissance ou la reproduction indispensable au maintien et à la survie de l'espèce.

## CHAPITRE III

*Effets du thiaméthoxam,  
de la téfluthrine et de leurs  
mélanges sur la composition en  
métabolites de l'hépatopancréas et  
les indicateurs du stress oxydant  
de Helix aspersa*

## 1. Objectif et principe de l'étude

L'étude de la réponse biologique des organismes vivants aux polluants chimiques présents dans l'environnement terrestre représente un outil de diagnostic qui n'est pas destiné à dupliquer ou remplacer la surveillance chimique, mais qui doit être intégré dans les programmes de surveillance de l'environnement. Complémentaires des analyses chimiques, ces indicateurs biologiques peuvent jouer le rôle de systèmes d'alarme précoces d'une contamination. Dans le contexte de l'exposition des invertébrés aux pesticides, il semble intéressant d'essayer de caractériser les perturbations des organismes par des approches biochimiques à travers le suivi de biomarqueurs.

Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997). Les biomarqueurs 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).

Un biomarqueur mesuré au niveau de l'individu n'a de signification écotoxicologique que s'il permet de décrire, expliquer et même parfois prédire les effets des polluants sur les populations évoluant dans cet environnement contaminé. Ainsi, chez les invertébrés, sont mesurés des biomarqueurs mettant en évidence :

- des réponses génotoxiques (tests micronoyaux),
- des réponses neurotoxiques (activité cholinestérase),
- la capacité des individus à mobiliser des systèmes de défense en présence de toxiques : biotransformation, métabolisation ou détoxification enzymatique (méthylthionéines, glutathion-S-transférase : GST, éthoxyrésorufine O-déséthylase : EROD, etc.) ; réaction du système antioxydant (superoxyde dismutase, catalase, etc.) ; réactions immunitaires...

Nous nous focaliserons dans cette étude sur certains des biomarqueurs les plus utilisés actuellement sur les organismes terrestres (Saint-Denis *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2006; Gambi *et al.*, 2007; Reinecke *et al.*, 2007). Ces biomarqueurs sont décrits ci-dessous.

✓ **Activité cholinestérase**

Dans les jonctions inter-neuronales ou neuro-musculaires, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui permet la transmission de l'influx nerveux. Libéré dans l'espace synaptique, ce neurotransmetteur se fixe sur les récepteurs cholinergiques au niveau de la membrane post-synaptique. L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur entraîne une dépolarisation membranaire à l'origine du potentiel d'action.

L'acétylcholinestérase est l'enzyme qui dégrade par hydrolyse ce médiateur chimique afin de stopper rapidement la stimulation du récepteur (Bocquené et Galgani, 1998).

Les insecticides organophosphorés et les carbamates sont les principaux contaminants de l'environnement qui inhibent l'activité acétylcholinestérase (Reinecke *et al.*, 2007).

✓ **Activités enzymatiques du système de biotransformation des toxiques**

Contrairement à l'activité acétylcholinestérase, les biomarqueurs du système de biotransformation ne mettent pas en évidence l'effet perturbateur d'un toxique sur une activité enzymatique mais la prise en charge de ce xénobiotique dans une voie de métabolisation (Lagadic *et al.*, 1997) souvent à la base de la détoxification.

En effet, un bon nombre de composés organiques présentent un caractère lipophile qui leur permet de s'accumuler au sein des réserves lipidiques des organismes et dans les membranes cellulaires (essentiellement constituées de phospholipides). La présence de telles molécules entraîne rapidement la mise en route des systèmes biochimiques de détoxification dont le rôle est de rendre hydrosolubles ces composés dangereux, afin de faciliter leur excrétion.

Certains organes du corps contiennent donc des enzymes chargées de catalyser une série de réactions permettant de détoxifier l'organisme des composés nocifs présents. Ces réactions peuvent également conduire à une toxication de la molécule, devenant alors encore plus nocive pour l'organisme.

Enfin, la biotransformation de toute molécule xénobiotique à caractère hydrophobe met en jeu des mécanismes permettant d'augmenter son hydrosolubilité afin de faciliter son excrétion (Fig. 17). Ce processus se déroule principalement au niveau de la glande digestive (hépatopancréas) chez les mollusques et s'effectue en deux étapes (Michel, 1993):

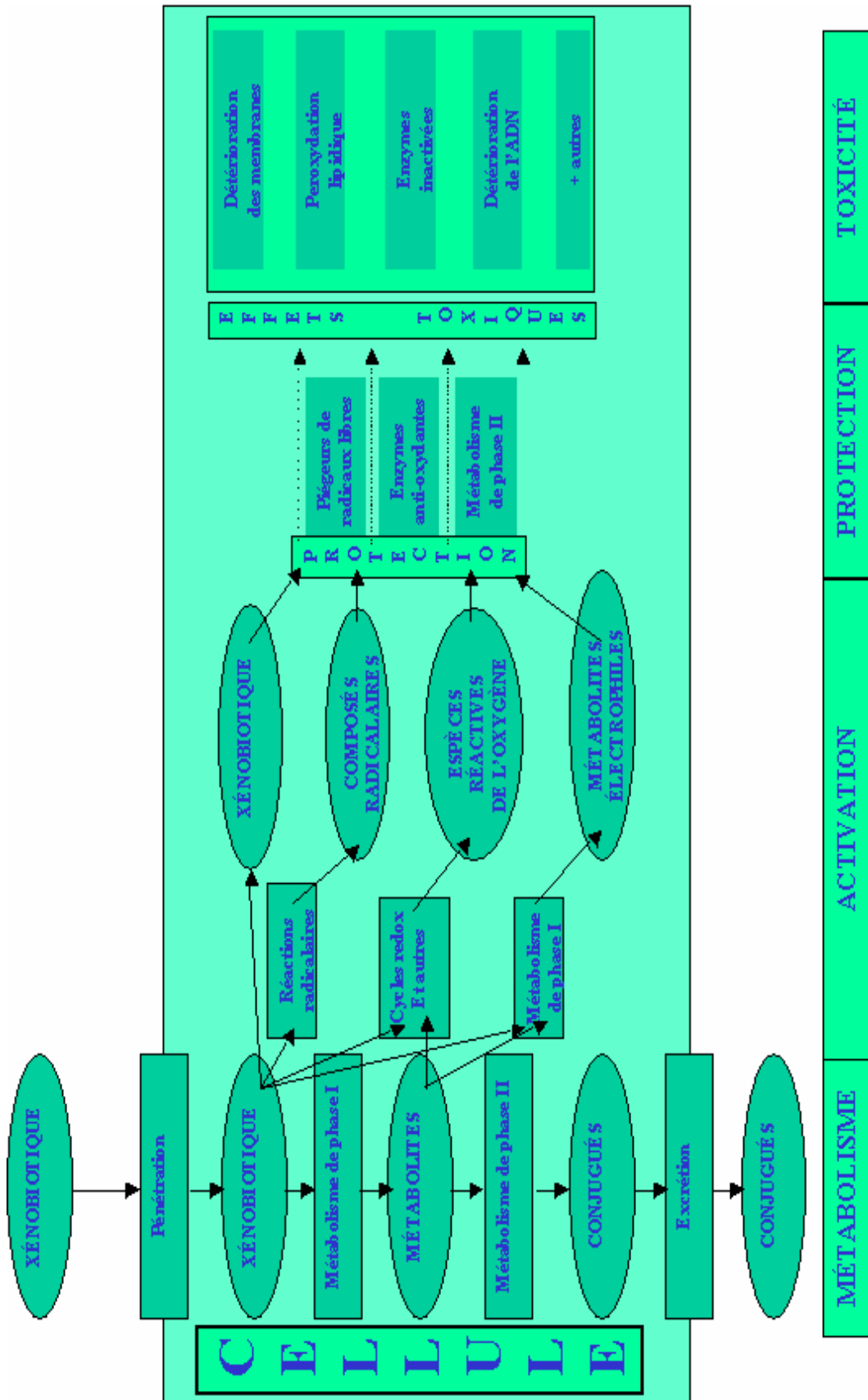


Figure 17 : Représentation schématique des voies majeures conduisant à la détoxification et à la toxication des xénobiotiques organiques chez les animaux (Michel, 1993).

1. une phase de fonctionnalisation (oxydation, réduction, hydrolyse) ou phase I rendant la molécule plus polaire. Ce mécanisme est assuré par les complexes multienzymatiques dépendants du cytochrome P450.
2. une phase de conjugaison ou phase II qui intervient soit à la suite des réactions de phase I, soit directement sur les molécules possédant des groupements hydroxyles, sulfhydriles ou carboxyliques. Les enzymes intervenant sont principalement les UDP-glucuronosyl-transférases, les glutathion-S-transférases, les sulfotransférases et catalyse respectivement la conjugaison du substrat avec l'acide glucuronique, le glutathion, le sulfate ou une molécule d'eau.

Des transformations non enzymatiques peuvent également se produire par captage de formes actives de l'oxygène induites par le métabolisme oxydatif cellulaire. Ces activités de peroxydation peuvent constituer une part importante du métabolisme chez certains organismes invertébrés (Livingstone *et al.*, 1993).

Les activités enzymatiques les plus employées comme biomarqueurs d'exposition chez les mollusques, sont les enzymes dépendantes du cytochrome P450 qui assurent la phase I de détoxification, et les enzymes de phase II, comme la glutathion S-transférase, qui prennent en charge les métabolites de phase I afin d'en faciliter l'excrétion. Des activités enzymatiques moins spécifiques que les précédentes (enzymes dépendantes du cytochrome P450), les enzymes antioxydantes, permettent d'établir que les organismes ont été soumis à un stress oxydant dû à la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Chez les mollusques exposés à des xénobiotiques organiques, la pollution chimique augmente fortement les activités enzymatiques antioxydantes (Livingstone *et al.*, 1990).

Les paramètres biochimiques mesurés dans cette étude sont les teneurs en métabolites (glucides totaux, protéines totales et lipides totaux), le taux de glutathion (GTH) et les activités enzymatiques acétylcholinestérase (AChE), glutathion S-transférase (GST) et catalase (CAT).

L'objectif principal de ce chapitre a été de déterminer la composition biochimique de l'hépatopancréas (protéines, glucides et lipides), et de doser certains biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques chez l'escargot terrestre *Helix aspersa* sous l'effet des différents traitements.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Préparation des échantillons

A la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine de traitement et après le sacrifice des escargots (cité auparavant), 8 spécimens choisis au hasard de chaque traitement sont destinés aux dosages des métabolites, et parmi lesquels, 5 spécimens sont destinées aux mesures des biomarqueurs du stress oxydatif.

### 2.2. Extraction et dosage des métabolites

Après la dissection, l'extraction (Fig. 18) des différents métabolites (protéines totales, glucides totaux et lipides totaux) a été réalisée selon le procédé de Schibko *et al.* (1966) sur un fragment (100 mg) de l'hépatopancréas prélevé et conservé dans 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20 %. Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes de 100 µL. 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<sup>1</sup> (G250) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf comme standard (annexe 1a). La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm.

Le dosage des glucides totaux de de l'hépatopancréas est réalisé selon Duchateau & Florkin (1959). Cette méthode utilise l'anthrone<sup>2</sup> 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<sup>3</sup> comme réactif et une solution mère de lipides<sup>4</sup> comme standard (annexe 1c). Les absorbances sont obtenues, après 30 mn d'obscurité, à une longueur d'onde de 530 nm.

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.

- 1- 100 mg de BBC + 50 mL d'éthanol. Agitation pendant deux heures + 100 mL d'acide orthophosphorique + H<sub>2</sub>O distillée q.s.p. 1000 mL.
- 2- 150 mg d'anthrone + 75 mL d'acide sulfurique + 25 mL H<sub>2</sub>O distillée.
- 3- 0.38 g de vanilline + 55 mL H<sub>2</sub>O distillée + 195 mL d'acide orthophosphorique à 85%.
- 4- 25 mg d'huile de table + 10 mL de solvant chloroforme/méthanol (V/V).



### 2.3. Dosages des indicateurs du stress oxydant

Les têtes des adultes de l'escargot *Helix aspersa* des séries témoins et traitées aux deux insecticides et à leurs mixtures ont fait l'objet d'un dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE). L'hépatopancréas excisé du reste de la masse viscérale a servi au dosage du glutathion (GTH), aux dosages des activités de la glutathion S-transférase (GST) et de la catalase (CAT).

Tous les dosages ont été menés sur des échantillons biologiques prélevés après 6 semaines d'exposition aux différents traitements. Par ailleurs, la concentration en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminée suivant la méthode de Bradford (1976), afin de pouvoir calculer les différentes activités spécifiques.

#### 2.3.1. Dosage de l'activité acétylcholinestérase (AChE)

Le dosage de l'activité AChE a été mené selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) qui consiste à fournir à l'enzyme (AChE) un substrat artificiel analogue, l'acétylthiocholine, qui sera hydrolysé en acide acétique et thiocholine. Cette dernière en présence de DTNB (acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) donne un produit jaune le TNB (acide 5-thio-2-nitrobenzoïque) que l'on dose à une longueur d'onde de 412 nm.

Les têtes des escargots témoins et traitées sont homogénéisées dans 1ml de solution détergente<sup>1</sup> à l'aide d'un broyeur ultra-turrax à 12 000 tours.min<sup>-1</sup> pendant une à deux minutes et cinq répétitions sont réalisées. L'homogénat est centrifugé à une vitesse de 5 000 g pendant 5mn. Le surnageant est récupéré pour servir comme source d'enzyme.

Le dosage de l'activité AChE est réalisé sur une fraction aliquote de 100 µl auquel on ajoute 100 µl de DTNB<sup>2</sup> et 1 ml de tampon Tris (0.1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes, et afin d'épuiser la réaction spontanée, 100 µl de substrat acétylthiocholine<sup>3</sup> sont ajoutés. La lecture des absorbances a lieu toutes les 4 mn pendant 20 mn à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc, où 100 µl de solution détergente remplacent la source d'enzyme. L'activité AChE est calculée selon la formule suivante:

$$x = \frac{\delta DO/min}{1,36 \times 10^4} \times \frac{Vt}{Vh} / mg \text{ de prot}$$

$x$  : micromoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines,

$\delta DO$  : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat,

$1.36 \times 10^4$  : coefficient d'extinction molaire du DTNB ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),

Vh : volume de l'homogénat (100  $\mu$ L),  
 Vt : volume totale de la cuve (1 300  $\mu$ L),  
 mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg.

- 1- 38.03 mg d'éthylène glycol tris beta aminoéthyl éther *NNN'N'*(EGTA) + 1 mL de Triton X 100 % + 5.845 g de NaCl + 80 mL de tampon Tris 10 mM, pH 7.
- 2- (39.6 mg de DTNB + 15 mg de CO<sub>3</sub>HNa) dans du tampon Tris 0.1 M, pH 7.
- 3- 118 mg d'acétylcholine + 5 mL d'eau distillée.

### 2.3.2. Dosage de l'activité glutathion S-transférase (GST)

Le dosage de la GST est réalisé selon la méthode de Habig *et al.* (1974) basée sur la mesure photométrique de la cinétique de conjugaison du produit formé avec un substrat, le 1-chloro-2-4 dinitrobenzène (CDNB) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH). Les fragments de l'hépatopancréas sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate de sodium (0.1 M, pH 6) et cinq répétitions sont réalisées. L'homogénat est centrifugé à 14 000g pendant 30 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme. Une aliquote de 200  $\mu$ l du surnageant est additionné de 1.2 ml de substrat CDNB (1mM) dans du tampon phosphate 0,1M, pH 6. La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5mn à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200  $\mu$ l d'eau distillée à la place du surnageant. L'activité spécifique de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante :

$$x = \frac{\delta DO/min}{9,6} \times \frac{Vt}{Vh \times mg \text{ de prot}}$$

*x* : micromoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines,  
 $\delta DO$  : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat,  
 9.6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB ( $mM^{-1} cm^{-1}$ ),  
 Vh : volume de l'homogénat (200  $\mu$ L),  
 Vt : volume totale de la cuve (1 400  $\mu$ L),  
 mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg.

### 2.3.3. Dosage de l'activité catalase (CAT)

La mesure de la CAT est déterminée selon la méthode de Regoli et Principato (1995) dont le principe repose sur la variation de la densité optique consécutive à la disparition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à une longueur d'onde de 240 nm. Les fragments de l'hépatopancréas sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate<sup>1</sup> (0.1 M, pH 7.5). L'homogénat est centrifugé à 15 000 g pendant 10 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel contient 20 µl de surnageant, 200 µL de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>1</sup> et 780 µL de tampon phosphate<sup>2</sup>. La réaction est déclenchée par l'addition de l'eau oxygénée. Le dosage s'effectue en suivant la cinétique de la réaction pendant 1 mn à 240 nm dans des cuves UV en quartz au spectrophotomètre. L'activité spécifique de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante :

$$x = \frac{\Delta DO}{\epsilon \times L \times \text{mg de prot}}$$

$x$  : micromoles d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommées par minute et par mg de protéines,

$\Delta DO$  : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat,

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène à 240 nm (0.04 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>),

$L$  : longueur de la cuve utilisé (1 cm),

mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg.

1- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (à conserver à 4°C et à l'abri de la lumière)

1.7 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) + 100 mL de tampon phosphate.

2- Tampon Phosphate ( pH 7.5 ; 0,1 M ; à conserver à 4°C)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 0.1 M; M = 136.09 g/mol → 6,8 g + 500 mL d'eau → pH 4.32

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3H<sub>2</sub>O à 0.1 M; M = 228.22 g/mol → 11.4 g + 500 mL d'eau → pH 9.06

125 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 25 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pour obtenir un pH 7.5.

### 2.3.4. Dosage du glutathion (GSH)

Le taux de GSH est quantifié selon la méthode de Weckberker & Cori (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-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements thiols (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm.

Le dosage s'effectue après homogénéisation des échantillons dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0.02 M (7.448 g d'EDTA, 1 000 ml d'eau distillée). Afin de protéger les groupements thiols du glutathion, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0.25 % (0.25 g d'ASS, 100 ml d'eau distillée) où 0.2 ml d'ASS sont additionnés à 0.8 ml d'homogénat. Après agitation, le mélange est plongé dans un bain de glace pendant 15 mn, puis centrifugé à 1 000 tours/mn pendant 5mn.

Une aliquote de 500 µl du surnageant récupéré est ajoutée à 1 ml du tampon Tris/EDTA (0.02 M, pH 9.6) (63.04 g de Tris, 7.4448 g d'EDTA, 1000 ml d'eau distillée) et 0.025 ml de DTNB (0.01 M) (3.96 g DTNB, 1 000 ml d'éthanol absolu). La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 mn de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc où les 500 µl du surnageant sont remplacés par 500µl d'eau distillée. Le taux de GTH est estimé selon la formule suivante :

$$x = \frac{\Delta DO}{13,1} \times \frac{Vd}{Vh} \times \frac{Vt}{Vs} / mg \text{ de prot}$$

$x$  : micromoles de substrat hydrolysé par mg de protéines,

$\Delta DO$  : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat,

13.1 : coefficient d'extinction molaire du groupement thiol (-SH),

$Vd$  : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1ml (0.2 ml d'ASS + 0.8 ml d'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 de surnageant + 1 ml de Tris/EDTA + 0.025ml de DTNB),

$Vs$  : volume du surnageant dans la cuve : 0.5 ml,

mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg.

## 2.4. Analyse statistique

Les moyennes  $\pm$  déviation standard (DS), avec un niveau significatif de  $p \leq 0.05$ , sont calculées pour chaque groupe d'expérience. La régression linéaire, le test 't' de Student,

l'analyse de la variance à un critère de classification ont permis de mettre en évidence les différences entre les groupes étudiés au cours des tests effectués sur les dosages biochimiques et les activités enzymatiques. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 13.31.

### **3. Résultats**

Les effets des deux insecticides commerciaux à base de thiaméthoxam (0, 25, 50, 100 et 200 mg/L) et à base de téfluthrine (0, 5, 10, 20 et 40 mg/L) et de leurs mixtures sur les indicateurs biochimiques du stress oxydant de *Helix aspersa* ont été estimés après 6 semaines de traitement.

#### **3.1. Effet du pH**

L'influence du pH de la laitue traités sur l'hépatopancréas n'était pas significative. Comme les valeurs de pH des solutions testées sont comprises entre 5.18 et 6.52 (Tab. 4), il est probable que les effets observés sur l'hépatopancréas sont plus dus aux substances chimiques testées qu'au faible pH.

#### **3.2. Effets du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures sur la composition biochimique de l'hépatopancréas**

##### **3.2.1. Effets sur le taux des protéines**

###### **➤ Effet du thiaméthoxam**

Les effets de l'insecticide commercial à base de thiaméthoxam (0, 25, 50, 100 et 200mg/L) sur le contenu en protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) sont présentés dans la figure 19. Elle montre que la teneur en protéines augmente de façon non significative ( $p>0.05$ ) pour les concentrations 25 et 50 mg/L. Cependant, ces teneurs sont très significativement ( $p\leq 0.01$ ) diminuées pour les concentrations 100 et 200 mg/L dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.

Les résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification révèlent un effet significatif ( $p\leq 0.05$ ) du traitement au thiaméthoxam.

###### **➤ Effet de la téfluthrine**

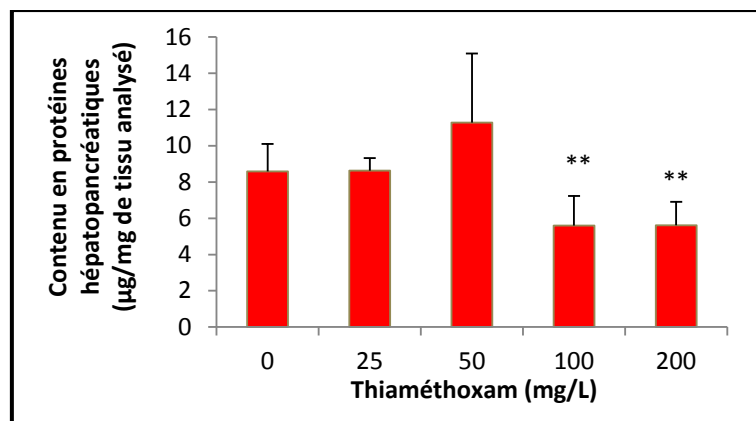
Les effets de l'insecticide commercial à base de téfluthrine (0, 5, 10, 20 et 40 mg/L) sur le contenu en protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) sont illustrés dans la figure 20.

Elle montre que la teneur en protéines augmente de façon non significative ( $p>0.05$ ) pour les concentrations 5, 10 et 20 mg/L. Cependant, ces teneurs sont très significativement ( $p\leq 0.01$ ) diminuées pour la concentration 40 mg/L dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification révèlent un effet significatif ( $p\leq 0.05$ ) du traitement à la téfluthrine.

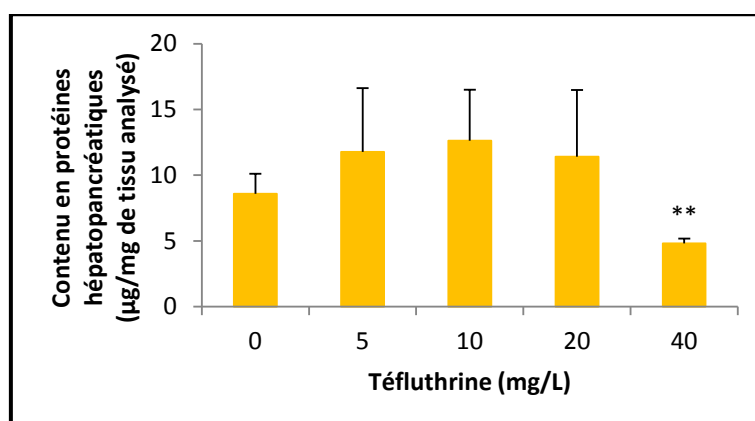
#### ➤ Effet des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine

Les mixtures, administrées par voie orale aux adultes de *Helix aspersa*, affectent le contenu en protéines hépatopancréatiques (Fig. 21). En effet, une augmentation significative ( $p\leq 0.05$ ) du taux des protéines est enregistrée à la M1, et une augmentation hautement significative ( $p\leq 0.001$ ) est enregistrée à la M2. Cependant, une diminution non significative ( $p>0.05$ ) du taux des protéines est notée aux deux mixtures M3 et M4.



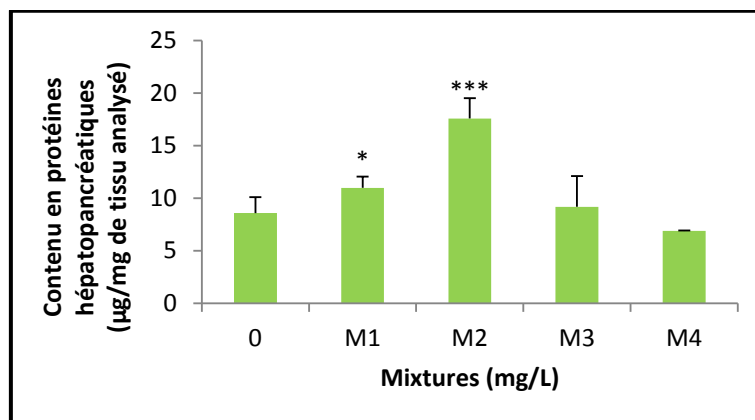
Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD,  $n = 8$ . Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des contenus en protéines chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p\leq 0.01$ .

**Figure 19 : Taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement au thiaméthoxam administré par ingestion.**



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 8. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des contenus en protéines chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$ .

**Figure 20 : Taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement à la téfluthrine administrée par ingestion.**



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 8. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des contenus en protéines chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \* pour  $p \leq 0.05$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 21 : Taux des protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement aux mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion.**

### **3.2.2. Effets sur le taux des glucides**

#### **➤ Effet du thiaméthoxam**

Le traitement au thiaméthoxam n'affecte pas le taux en glucides à la concentration 25mg/L (Fig. 22). Ensuite, le taux en glucides diminue de façon non significative ( $p>0.05$ ) à la concentration 50mg/L, de façon très significative ( $p\leq 0.01$ ) à la concentration 100 mg/L et de façon hautement significative ( $p\leq 0.001$ ) à la concentration 200 mg/L.

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification révèlent un effet significatif ( $p\leq 0.05$ ) du traitement au thiaméthoxam.

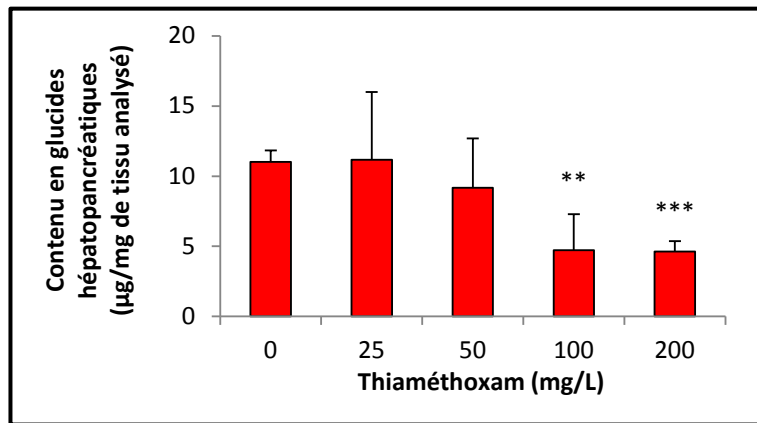
#### **➤ Effet de la téfluthrine**

La téfluthrine appliquée par ingestion augmente de manière hautement significative ( $p\leq 0.001$ ) le contenu en glucides totaux de l'hépatopancréas aux concentrations 5, 10 et 20 mg/L (Fig. 23). Ensuite, une diminution très significative ( $p\leq 0.01$ ) est constatée à la concentration 40 mg/L.

Les résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification révèlent un effet hautement significatif ( $p\leq 0.001$ ) du traitement à la téfluthrine.

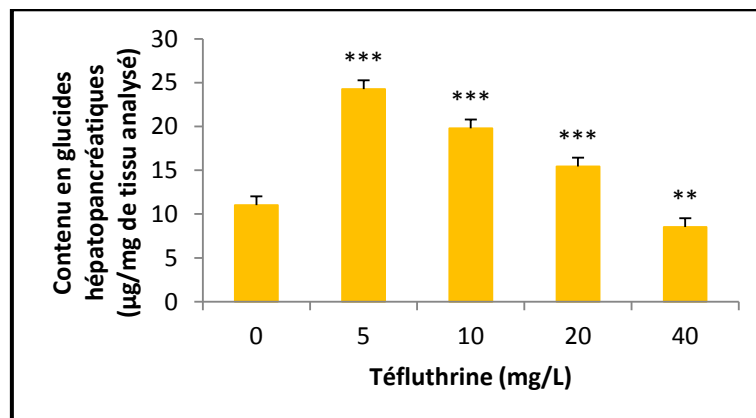
#### **➤ Effet des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine**

Les mixtures M1, M2 et M3 appliquées par ingestion modifient de manière non significative ( $p>0.05$ ) le contenu en glucides totaux de l'hépatopancréas (Fig. 24). Cependant, une augmentation hautement significative ( $p\leq 0.001$ ) est constatée à la M4.



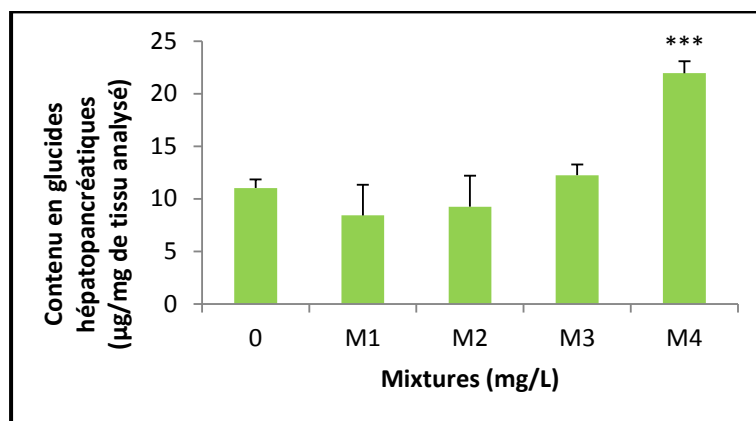
Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 8. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des contenus en glucides chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 22 : Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement au thiaméthoxam administré par ingestion.**



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 8. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des contenus en glucides chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 23 : Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement à la téfluthrine administré par ingestion.**



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 8. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des contenus en glucides chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 24 : Taux des glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement aux mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion.**

### 3.2.3. Effets sur le taux des lipides

#### ➤ Effet du thiaméthoxam

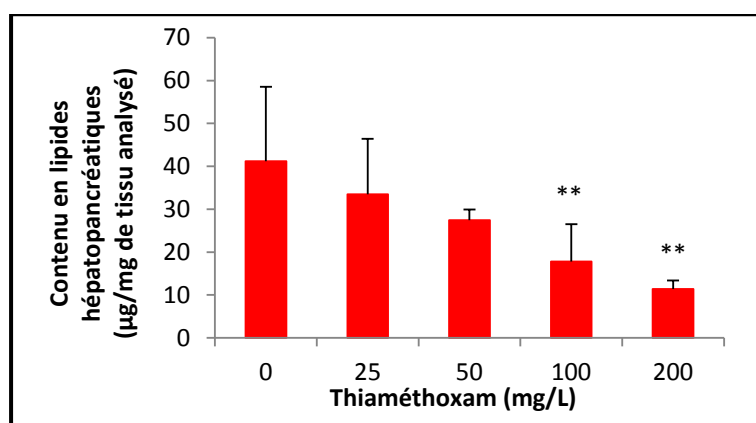
Le thiaméthoxam réduit de façon non significative ( $p > 0.05$ ) le contenu en lipides aux concentrations 25 et 50 mg/L (Fig. 25). Cependant, ces teneurs sont très significativement ( $p \leq 0.01$ ) diminuées pour les concentrations 100 et 200 mg/L dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.

Les résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification révèlent un effet significatif ( $p \leq 0.05$ ) du traitement au thiaméthoxam.

#### ➤ Effet de la téfluthrine

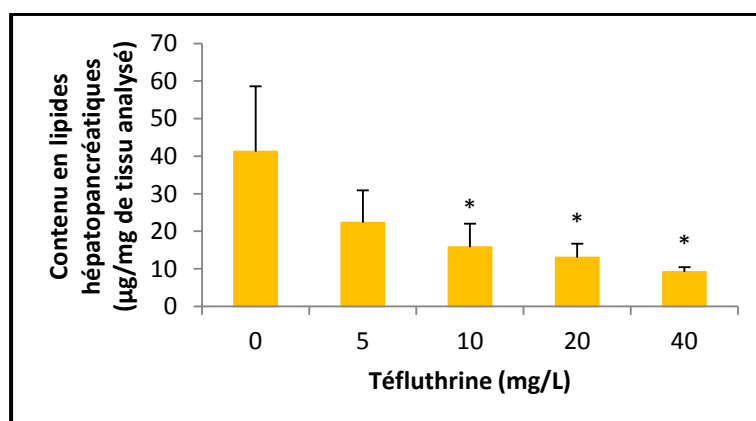
Le traitement à la téfluthrine diminue le contenu en lipides de façon non significative ( $p > 0.05$ ) à la concentration 5mg/L (Fig. 26). Cependant, ces teneurs sont significativement ( $p \leq 0.05$ ) diminuées aux concentrations 10, 20 et 40 mg/L dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.

Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification révèlent un effet hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) du traitement à la téfluthrine.



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 8. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des contenus en lipides chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$ .

**Figure 25 : Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement au thiaméthoxam administré par ingestion.**

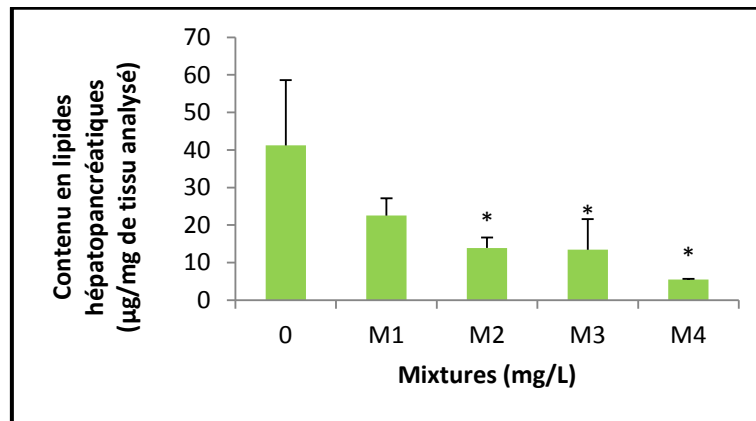


Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 8. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des contenus en lipides chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \* pour  $p \leq 0.05$ .

**Figure 26 : Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement à la téfluthrine administré par ingestion.**

### ➤ Effet des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine

La mixture M1 appliquée par ingestion diminue de manière non significative ( $p > 0.05$ ) le contenu en lipides totaux de l'hépatopancréas (Fig. 27). Cependant, une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) du taux des lipides est constatée aux mixtures M2, M3 et M4.



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD,  $n = 8$ . Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des contenus en lipides chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \* pour  $p \leq 0.05$ .

**Figure 27 : Taux des lipides totaux ( $\mu\text{g/mg}$  de tissu analysé) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement aux mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion.**

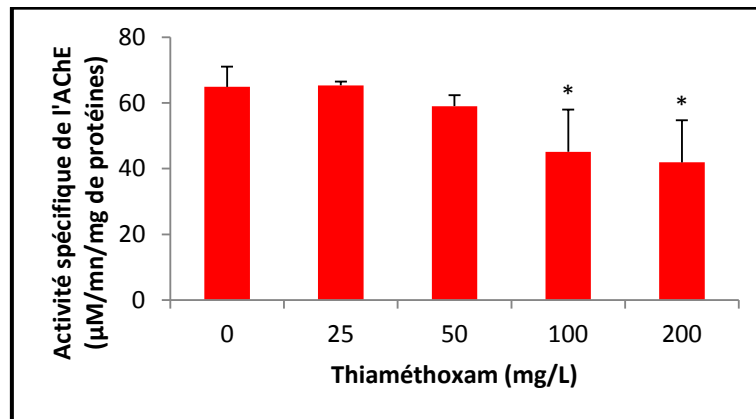
### 3.3. Effets du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures sur les indicateurs du stress oxydant

#### 3.3.1. Effets sur l'activité acétylcholinestérase (AChE)

##### ➤ Effet du thiaméthoxam

L'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M/mn/mg}$  de protéines) chez les adultes de *Helix aspersa*, témoins et traités par voie orale au thiaméthoxam est représentée dans la figure 28. Une diminution d'abord, non significative ( $p > 0.05$ ) de l'activité de l'enzyme est enregistrée aux concentrations 25 et 50 mg/L, puis significative ( $p \leq 0.05$ ) aux concentrations 100, 200mg/L avec un effet dose-dépendant.

L'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) du traitement au thiaméthoxam.



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD,  $n = 5$ . Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \* pour  $p \leq 0.05$ .

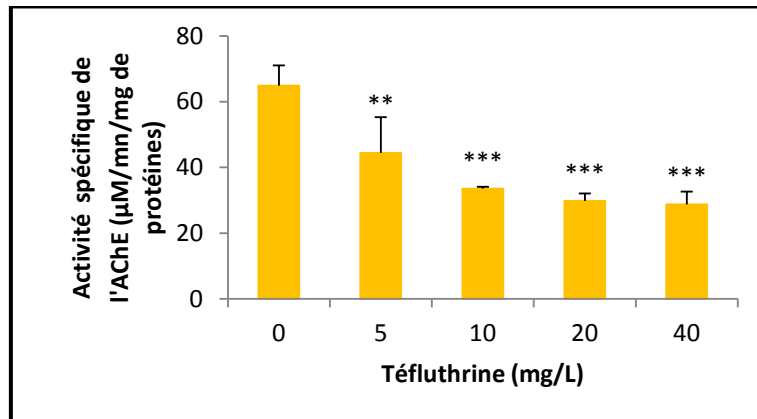
**Figure 28 : Effets du thiaméthoxam, administré par ingestion, sur l'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**

➤ **Effet de la téfluthrine**

La téfluthrine appliquée par ingestion à la concentration 5 mg/L, inhibe de manière très significative ( $p \leq 0.01$ ) l'activité de l'AChE (Fig. 29). Ensuite, cette diminution devient hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) aux concentrations 10, 20 et 40 mg/L, avec un effet dose-dépendant. L'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) du traitement à la téfluthrine.

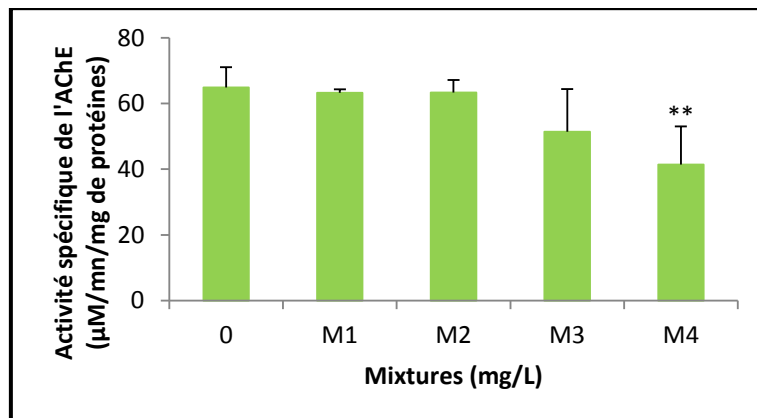
➤ **Effet des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine**

Les traitements aux mixtures M1, M2 et M3 diminuent de façon non significative ( $p > 0.05$ ) l'activité de l'AChE (Fig. 30). Cette inhibition de l'activité enzymatique devient très significative ( $p \leq 0.001$ ) à la M4.



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$  et \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 29 : Effets de la téfluthrine administrée par ingestion, sur l'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**



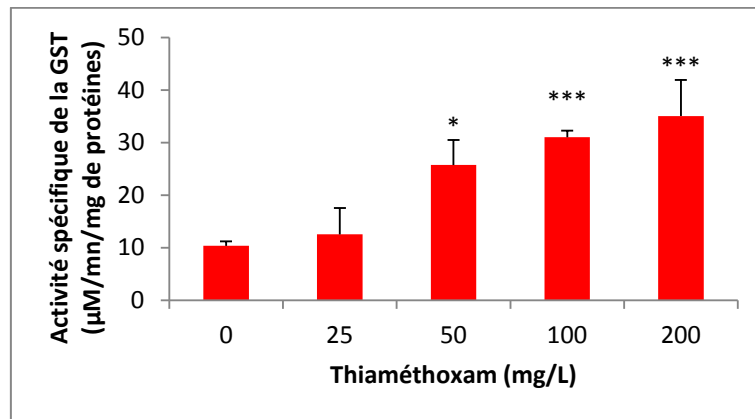
Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$ .

**Figure 30 : Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion, sur l'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**

### 3.3.2. Effets sur l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

#### ➤ Effet du thiaméthoxam

Le traitement orale à la concentration 25 mg/L de thiaméthoxam augmente de façon non significative ( $p > 0.05$ ) l'activité spécifique de la GST ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) par rapport à celle des escargots témoins (Fig. 31). La concentration 50 mg/L induit une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) de l'activité de l'enzyme. Ensuite, les concentrations 100 et 200 mg/L induisent une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de l'activité GST, avec un effet dose-dépendant. L'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) du traitement au thiaméthoxam.



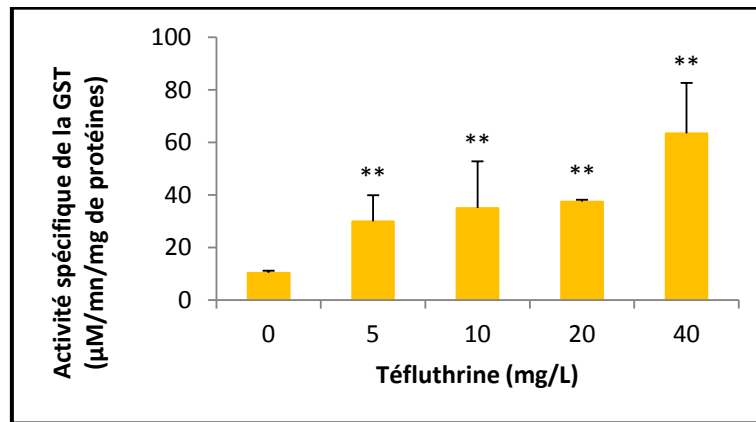
Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD,  $n = 5$ . Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \* pour  $p \leq 0.05$  et \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 31 : Effets du thiaméthoxam, administré par ingestion, sur l'activité spécifique de la GST ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**

#### ➤ Effet de la téfluthérine

L'estimation de l'activité spécifique de la GST chez les escargots *Helix aspersa* traités oralement à la téfluthérine est montrée dans la figure 32. L'insecticide induit une augmentation très significative ( $p \leq 0.01$ ) de l'activité GST par rapport à celle des escargots témoins aux concentrations 5, 10, 20 et 40 mg/L.

L'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) du traitement à la téfluthrine.



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD,  $n = 5$ . Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$ .

**Figure 32 : Effets de la téfluthrine administrée par ingestion, sur l'activité spécifique de la GST ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**

#### ➤ Effet des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine

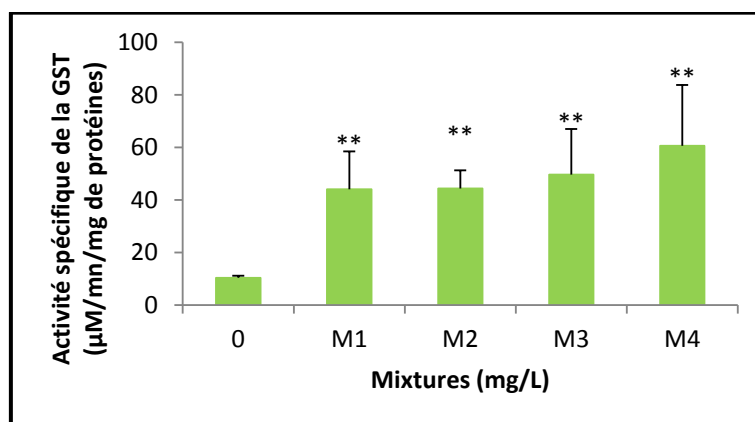
Les traitements aux mixtures M1, M2, M3 et M4 augmentent de façon hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) l'activité de la GST (Fig. 33), par rapport à celle des escargots témoins.

### 3.3.3. Effets sur l'activité catalase (CAT)

#### ➤ Effet du thiaméthoxam

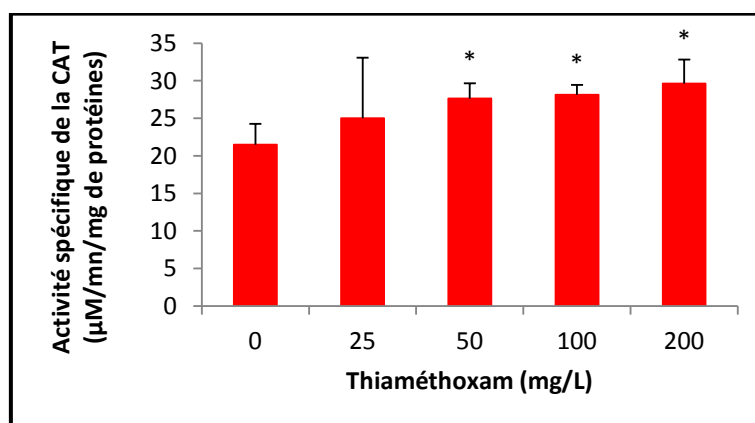
Le traitement orale à la concentration 25 mg/L de thiaméthoxam augmente de façon non significative ( $p > 0.05$ ) l'activité spécifique de la CAT ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) par rapport à celle des escargots témoins (Fig. 34). Les concentrations 50, 100 et 200 mg/L induisent une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) de l'activité de l'enzyme, avec un effet dose-dépendant.

L'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet significatif ( $p \leq 0.05$ ) du traitement au thiaméthoxam.



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$ .

**Figure 33 : Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion, sur l'activité spécifique de la GST ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \* pour  $p \leq 0.05$ .

**Figure 34 : Effets du thiaméthoxam, administré par ingestion, sur l'activité spécifique de la CAT ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**

➤ **Effet de la téfluthrine**

L'estimation de l'activité spécifique de la CAT chez les escargots *Helix aspersa* traités oralement à la téfluthrine est montrée dans la figure 35. L'insecticide induit une augmentation très significative ( $p \leq 0.01$ ) de l'activité CAT par rapport à celle des escargots témoins aux concentrations 5, 10 et 20 mg/L, et hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) à la concentration 40mg/L. L'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet très significatif ( $p \leq 0.01$ ) du traitement à la téfluthrine.

➤ **Effet des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine**

Le traitement à la mixture M1 augmente de manière non significative ( $p > 0.05$ ) l'activité de la CAT (Fig. 36) par rapport à celle des escargots témoins. Cette augmentation de l'activité enzymatique devient hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) aux mixtures M2, M3 et M4.

### **3.3.4. Effets sur le taux de glutathion (GSH)**

➤ **Effet du thiaméthoxam**

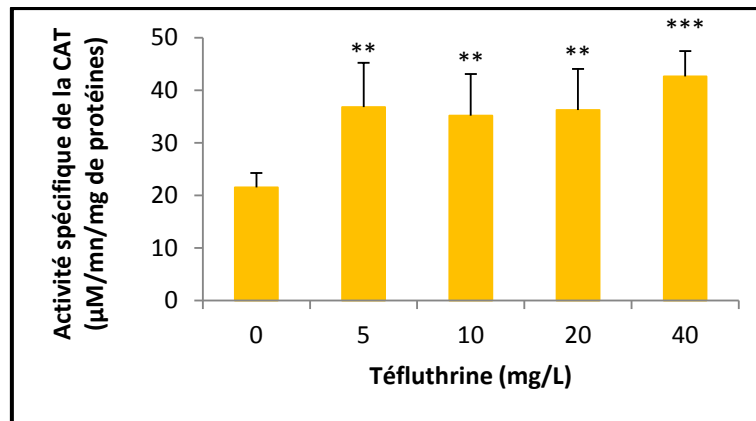
Le taux de GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les adultes de *Helix aspersa*, témoins et traités par voie orale au thiaméthoxam est représentée dans la figure 37. Une diminution d'abord, non significative ( $p > 0.05$ ) du taux de GSH est enregistrée à la concentration 25mg/L, puis cette diminution devient très significative ( $p \leq 0.01$ ) aux concentrations 50, 100 et 200mg/L avec un effet dose-dépendant.

L'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet très significatif ( $p \leq 0.01$ ) du traitement au thiaméthoxam.

➤ **Effet de la téfluthrine**

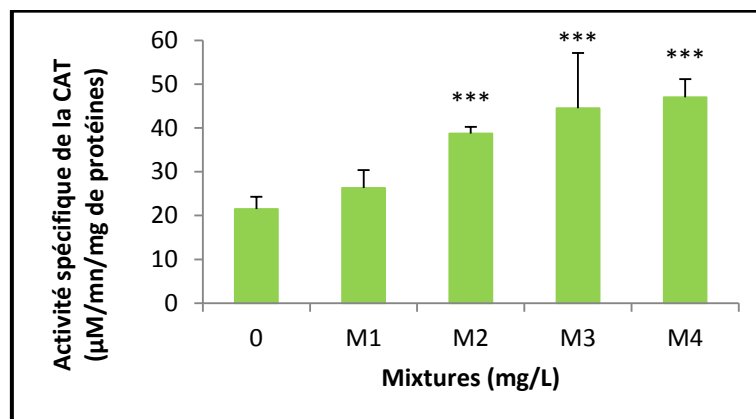
L'estimation du taux de GSH chez les escargots *Helix aspersa* traités oralement à la téfluthrine est montrée dans la figure 38. L'insecticide induit une diminution non significative ( $p > 0.5$ ) du taux de GSH par rapport à celle des escargots témoins à la concentration 5 mg/L, très significative ( $p \leq 0.01$ ) aux concentrations 10 et 20 mg/L. Cette diminution devient hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) à la concentration 40 mg/L.

L'analyse de la variance à un critère de classification montre un effet très significatif ( $p \leq 0.01$ ) du traitement à la téfluthrine.



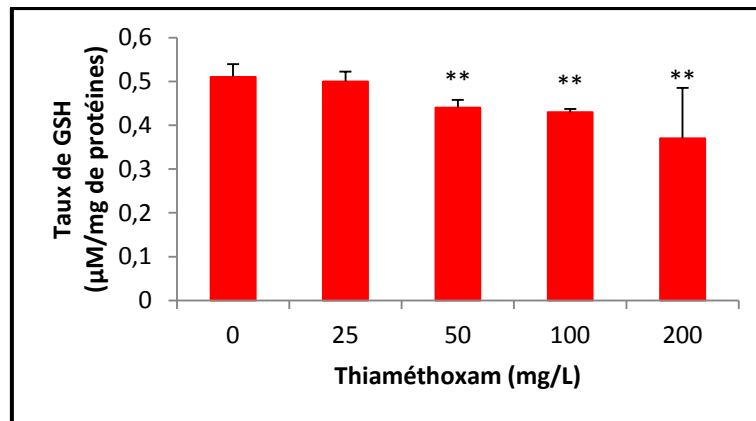
Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD,  $n = 5$ . Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 35 : Effets de la téfluthrine administrée par ingestion, sur l'activité spécifique de la CAT ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**



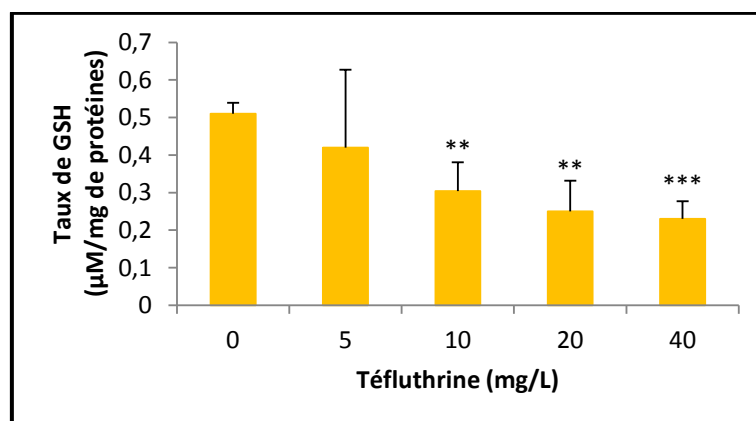
Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD,  $n = 5$ . Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 36 : Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion, sur l'activité spécifique de la CAT ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD,  $n = 5$ . Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$ .

**Figure 37 : Effets du thiaméthoxam, administré par ingestion, sur le taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**

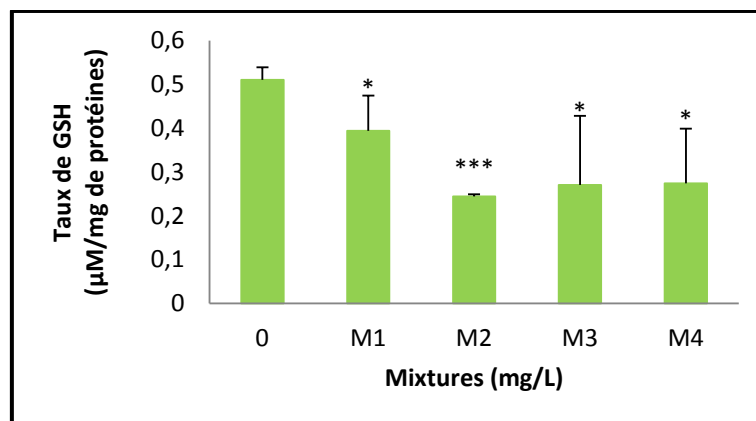


Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD,  $n = 5$ . Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \*\* pour  $p \leq 0.01$  et \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 38 : Effets de la téfluthrine administrée par ingestion, sur le taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**

➤ **Effet des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine**

Les traitements aux mixtures M1, M3 et M4 diminuent de manière significative ( $p \leq 0.05$ ) le taux de GSH (Fig. 39) par rapport à celui des escargots témoins. Cette diminution du taux de GTH devient hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) à la mixture M2.



Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD,  $n = 5$ . Les astérisques symbolisent une différence significative dans les moyennes des activités enzymatiques chez les escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. \* pour  $p \leq 0.05$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 39 : Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine administrées par ingestion, sur le taux de glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez *Helix aspersa* après 6 semaines de traitement.**

#### 4. Discussion

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

Le taux des glucides dans l'hépatopancréas des escargots traités au thiaméthoxam et à la téfluthrine était dose-dépendante. En effet, 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 (Arasta *et al.*, 1996). Nos résultats sont conformes avec ceux de El-Wakil et Radwan (1991). Padmaja et Rao (1994) 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 l'Endosulfan, le Méthyl parathion, le Quinalphos et le Nuvan peut être due à l'utilisation du glycogène pour générer l'énergie nécessaire pour faire face à l'hypoxie provoquée par ces pesticides. La déplétion en glycogène des tissus hépatiques peut être également interprétée comme une réponse non spécifique au stress chimique avec cependant des conséquences sur la mobilisation à long terme des réserves énergétiques et ainsi sur la sensibilité au stress et la susceptibilité des individus aux maladies (Schwaiger *et al.*, 1997).

Quant aux taux des glucides chez les escargots traités par les mixtures M1, M2 et M3, ils montrent des modifications non significatives contrairement à la M4 qui montre une augmentation significative. En fait, il n'existe pas vraiment de règle générale qui permet d'expliquer ou de prédire la toxicité associée à un mélange donné de produits chimiques. Ainsi, les mixtures M1, M2 et M3 semblent n'avoir aucun effet sur le métabolisme des glucides, alors que la M4 semble avoir un effet synergique sur le même métabolisme. Ceci peut être expliqué par plusieurs hypothèses comme l'augmentation des réserves énergétiques, ou par des changements structuraux ou de perméabilité des membranes cellulaires (Carpy *et al.*, 2000).

Plusieurs investigations sur les effets des polluants organiques sur le métabolisme énergétique ont été menées. La diminution des réserves de glycogène est une réponse notée chez plusieurs gastéropodes pulmonés exposés à des insecticides OPs et carbamate, notamment *Biomphalaria alexandrina*, *Bulinus trincatus* (Sharaf *et al.*, 1975) et *L. acuminata* (Mahendru et Agarwal, 1981; Singh et Agarwal, 1989). Chez *L. palustris* exposée à l'hexachlorobenzène en mésocosme, Baturu *et al.* (1995) observent une stimulation de l'activité enzymatique d'hydrolyse des polysaccharides et une réduction de la teneur en glycogène dans le manteau et la masse viscérale. Pour la même espèce exposée à des alkylphénols en mésocosme, Jumel et Lagadic (2000) rapportent une augmentation de la demande énergétique des animaux qui se traduit par une mobilisation rapide des réserves de glycogène du manteau et une diminution de la teneur en protéine et de la masse de la glande à albumen. L'énergie mobilisée n'est pas investie dans la reproduction puisqu'aucune ponte n'est produite. L'exposition en mésocosme de *L. stagnalis* au fomésafène provoque une

réduction des réserves en glycogène des animaux qui peut être impliquée dans la réduction de l'activité ovipositive (Jumel *et al.*, 2000).

Une diminution dose-dépendante des protéines totales et des lipides totaux a été notée chez les escargots traités par les deux insecticides comparés aux escargots témoins. En effet, les lipides constituent le carburant énergétique privilégié proposé aux tissus en cas de besoins après les hydrates de carbone, mais les protéines sont principalement impliqués dans l'architecture de la cellule. Pendant les périodes de stress chronique, ils constituent aussi une autre source d'énergie (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). En outre, ces résultats sont semblables à ceux de Radwan *et al.*, (2008). Ainsi, ils ont rapporté que l'effet significatif des deux carbamates testés sur la diminution des taux de protéines et des lipides au bout de 7 jours implique la possibilité que ces molécules exercent des effets cytotoxiques, qui dépendent fortement de l'interférence avec le niveau des lipoprotéines et le taux de biosynthèse. De plus, la diminution des réserves en protéines solubles de l'hépatopancréas des escargots peut être due en partie au stress résultant de l'effet de l'insecticide testé, comme l'a déjà suggéré El-Wakil et Radwan (1991). En effet, ces auteurs ont attribué ce stress à un déséquilibre entre le taux de synthèse et de dégradation protéique. Padmaja et Rao (1994) ont suggéré que la diminution des lipides et des protéines tissulaire chez l'escargot *B. dissimilis* (Müller) après exposition aux pesticides peut être due à plusieurs mécanismes, parmi lesquels l'utilisation directe des protéines par les cellules pour subvenir aux besoins énergétiques.

L'augmentation significative du taux des protéines aux mixtures M1 et M2 et les variations non significatives de ce même taux aux mixtures M3 et M4 peuvent s'expliquer par une forte induction de protéines spécifiques aux mixtures M1 et M2 sous l'effet du stress chimique, et la réduction possible de cette synthèse protéique, suite à une exposition intense (M3 et M4) et à l'hépatotoxicité qui en découle, ce qui peut conduire à des faux négatifs. D'ailleurs, les mêmes constatations ont été faites auparavant par Lagadic *et al.* (1997) sous l'effet des contaminants chez les invertébrés.

La diminution dose-dépendante du taux des lipides après exposition de *Helix aspersa* aux mixtures M1, M2, M3 et M4 peut être due au stress chimique causé par les composés testés. En effet, Eissa *et al.* (2002) ont rapporté que l'effet nocif de composés chimiques pourrait être attribué à l'augmentation de l'utilisation de l'énergie et/ou à l'altération des

organites des cellules (des escargots traités) et qu'ils peuvent interférer avec la synthèse des protéines.

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). Les biomarqueurs du stress environnemental mesurés dans cette étude sont le taux de glutathion (GSH) et les activités enzymatiques acétylcholinestérase (AChE), catalase (CAT) et la glutathion S-transférase (GST).

L'AChE ne joue aucun rôle dans la détoxification chez les vertébrés mais est impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme. L'inhibition de l'enzyme par de nombreux neurotoxiques entraîne une accumulation du médiateur chimique, l'acétylcholine (ACh), dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux, conduisant à la mort de l'individu (Bocquené, 1996). Parmi les composés neurotoxiques, les insecticides organophosphorés et les carbamates sont considérés comme les plus puissants inhibiteurs spécifiques de cholinestérase (Cassanelli *et al.*, 2006; Alout *et al.*, 2007). Mais des mélanges complexes d'hydrocarbures ont été aussi cités dans la mesure de dépressions de l'AChE (Payne *et al.*, 1996).

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

Nos résultats montrent que le thiaméthoxam, la téfluthrine et leurs mixtures utilisées aux doses choisies, inhibent significativement l'activité spécifique de l'AChE chez *Helix aspersa*. La téfluthrine semble avoir un effet plus marqué sur cette inhibition que le thiaméthoxam. Cependant, les mixtures choisies semblent être moins neurotoxiques à l'égard de ce gastéropode. Compte tenu de l'activité AChE, qui est un biomarqueur spécifique d'exposition aux pesticides organophosphorés (Mazzia *et al.*, 2011), bromés et aux carbamates (Laguerre *et al.*, 2009), il est certain que les déséquilibres mesurés sur cette activité enzymatique reflètent moins un effet spécifique qu'un impact global de la contamination.

Des effets neurotoxiques de substances organiques non-molluscicides ont été évalués, notamment par Rorke *et al.* (1974) qui observent une inhibition de 90% de l'activité des cholinestérases dans l'hémolymphe de *Helix aspersa* provoquée *in vitro* par une solution de  $10^{-4}$ g/L fenitro-oxon (OPs) ou de physostigmine (carbamate). Le fenitrothion et le diéthylphénylphosphate (OPs) ne provoquent aucune inhibition des cholinestérases à la concentration de  $10^{-3}$ g/L (Coeurdassier *et al.*, 2002). L'inhibition de l'activité AChE, chez *Helix aspersa*, a été également rapportée après traitement topique au méthomyl, au carbofuran, au chlorpyrifos et au paraquat (Salama *et al.*, 2005). En effet, ces auteurs ont démontré que les deux carbamates, le carbofuran et le méthomyl étaient plus puissants vis-à-vis de l'inhibition de l'AChE que les deux organophosphorés le chlorpyrifos et le paraquat. Chez *Pomacea patula*, Mora *et al.* (2000) montrent une inhibition de l'activité des AChE qui est corrélée à la concentration en carbaryl dans le même organe.

Chez *Helix aspersa*, Coeurdassier *et al.* (2001) ont également démontré que l'activité AChE est inhibée de 10% après 7 jours d'exposition au diméthoate à des concentrations très proches de celles recommandées pour l'épandage en champ. L'inhibition de l'activité AChE, connue pour être relativement spécifique de l'exposition aux OPs et aux carbamates, est également provoquée, à un degré moindre, par d'autres composés organiques naturels, synthétiques et des ions métalliques (Mora, 1998).

Les catalases (CAT) sont des enzymes péroxysomales dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatifs au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, les PCB, certains pesticides (Livingstone *et al.*, 1993) et les métaux (Labrot *et al.*, 1996), mais ceci de façon irrégulière *in vivo*, les résultats montrant tantôt une augmentation de l'activité (Di Giulio *et al.*, 1993), tantôt une baisse (Labrot *et al.*, 1996). Une des hypothèses retenue est que cette activité enzymatique semble très sensible aux facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle (Pellerin-Massicotte, 1994), hypothèse corroborée par les résultats obtenus par Pellerin-Massicotte *et al.* (1997), observant une induction de l'activité catalase dans un endroit non pollué qui pourrait être due à un stress physiologique comme une répétition de la ponte. Selon ces auteurs, la catalase pourrait être sensible à des variations subtiles des conditions environnementales.

Chez *Helix aspersa*, l'induction de l'activité CAT est obtenue après traitement au thiaméthoxam, à la téfluthrine et à leurs mixtures. En effet, chacun des deux insecticides et leurs mixtures semblent intensifier l'activité des enzymes antioxydantes de l'hépatopancréas de *Helix aspersa*, y compris celle de la CAT en réponse à l'augmentation du stress oxydatif.

Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress oxydant en laboratoire et surtout *in situ* montrent que le caractère aspécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte (Cossu *et al.*, 1997).

Des résultats similaires ont été observés par Salama *et al.* (2005), chez la même espèce de gastéropode après exposition au méthomyl et au chlorpyrifos. Cependant, les mêmes auteurs ont constaté que cette activité enzymatique diminue après exposition au carbofuran et au paraquat. Quant à El-Gendy *et al.* (2009), ils ont rapporté une induction de l'activité CAT hépatopancréatique chez *Theba pisana*, suite aux traitements par des pesticides à base de cuivre. L'augmentation de l'activité CAT a déjà été relevée chez d'autres organismes comme les poissons et les bivalves exposés à des polluants organiques (HAP, PCB, pesticides et engrais chimiques) (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993; Torreilles *et al.*, 1996; Cossu *et al.*, 1997).

Les GST sont des enzymes de biotransformation de phase II, dont la fonction est de conjuguer à une molécule de GSH une grande variété de substrats pour permettre leur élimination. Ces substrats peuvent être des molécules endogènes, mais aussi des xénobiotiques comme les HAP, les PCB et les pesticides. Ces enzymes sont présentes sous plusieurs isoformes dont certaines sont inductibles par les contaminants qu'elles détoxiquent. Cette particularité en fait une activité intéressante en tant que biomarqueur de contamination, notamment par les contaminants organiques lipophiles de types HAP, PCB et pesticides (Narbonne *et al.*, 1991).

Ainsi, le thiaméthoxam, la téfluthrine et leurs mixtures, appliqués par ingestion aux adultes de *Helix aspersa* induisent une augmentation significative de l'activité GST. Sachant que les GST font partie des premières enzymes antioxydantes à répondre à la présence d'un xénobiotique, l'induction de l'activité de cette enzyme, indiquerait probablement un taux élevé de conjugaison des composés testés avec le GSH, et de ce fait, une activation possible des défenses antioxydantes.

L'induction de l'activité de cette enzyme est en accord avec les résultats signalés par Gagné *et al.* (2006) qui démontre que les polluants augmentent l'activité GST de la glande digestive chez les bivalves *Mya arenaria*. L'augmentation de l'activité GST observée peut être due à l'activation du système naturel antioxydant par les pesticides. Cependant, aucune variation significative de l'activité GST n'a été observée chez des moules *Mytilus galloprovincialis* collectées sur un site fortement contaminé en PCB (lagune de Venise, Italie) (Livingstone *et al.*, 1995). Par contre, Cheung *et al.* (2002) ont observé une induction de l'activité GST, positivement corrélée à la somme des PCB chez des moules *Perna viridis* transplantées sur de nombreux sites contaminés autour de Hong Kong. Enfin, une forte

réserve quant à l'inductibilité des GST chez les bivalves a été émise par Fitzpatrick *et al.* (1997) qui ont observé une forte activité GST chez *Mytilus edulis* exposées à des effluents industriels, mais n'ont noté aucun changement pour des effluents d'une tannerie de cuir. Notons également que Torres et Mason (2002) ont observé une inhibition de l'activité GST (in vitro) chez des escargots *Helix aspersa* exposés à 10 µM de TBT.

Le système de défense antioxydant est présent dans toutes les cellules aérobies, 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 GSH joue un rôle central dans le processus de défense intracellulaire (Arrigo, 1999), il neutralise le peroxyde organique, élimine les hydrocarbures par conjugaison au groupement thiol, et se lie aux ions des métaux lourds (Adam *et al.*, 2005). Le glutathion existe sous deux formes, oxydée GSSG et réduite GSH, et ces enzymes comprennent la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion S-transférase (GST) qui sont impliqués dans la détoxification (Kizek *et al.*, 2004). Une déficience en GSH expose les cellules à un risque de dommage oxydatif (Droge, 2002).

Une réduction significative des teneurs en GSH est enregistrée dans notre étude chez les individus de *Helix aspersa* après exposition au thiaméthoxam, à la téfluthrine et à leurs mixtures. La diminution du taux de GSH enregistrée dans notre étude peut refléter le stress oxydatif causés par les deux insecticides testés et leurs mixtures. En effet, le GSH est un antioxydant dont la diminution devrait contribuer à la protection de l'animal de l'effet de chacun des composés testés. En effet, la fixation possible de ces insecticides aux groupements thiols du GSH permettrait, éventuellement, de prévenir des dommages cellulaires.

Plusieurs travaux confirment les résultats obtenus et aide à mieux expliquer la relation entre la diminution du taux de GSH et le niveau de contamination. Cela est rapporté par Salama *et al.* (2005) avec la même espèce de gastéropode *Helix aspersa*, après traitement au méthomyl et au chlorpyrifos. Cependant, les mêmes auteurs ont observé une diminution significative et non significative après exposition au carbofuran et au paraquat respectivement. Une autre étude sur la réponse antioxydante a indiqué une diminution du taux de GSH comme réponse générale des mollusques bivalves exposés aux contaminants (Suteau *et al.*, 1988; Regoli et Principato, 1995). La réduction du taux de GSH a été également

démontrée par El-Gendy *et al.* (2009) dans la glande digestive de *Theba pisana* après traitement aux pesticides.

D'autre part, la réduction du taux de GSH peut être expliquée par l'augmentation de son utilisation par la GST dans les réactions de conjugaisons avec les insecticides testés, ceci est en accord avec nos résultats qui indiquent une induction de la GST suite aux traitements testés. Canesi *et al.* (1998) ont également constaté une diminution du taux de GSH dans la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* exposée aux contaminants.

Dans cette étude, nous avons exposé les escargots à différentes concentrations de thiaméthoxam, de téfluthrine et de leurs mixtures pendant six semaines, 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). Après des expériences en laboratoire, Wu *et al.* (2005) ont conclu que même si certains biomarqueurs (induction enzymatique, l'intégrité lysosomale) sont clairement réversibles après réduction de la pollution, d'autres réponses (dommages aux cellules) peuvent être permanentes et non réversibles. Afin d'élucider cette question (exposition chronique, ré-adaptation), des expériences doivent être réalisées à l'avenir. 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).

En outre, il serait intéressant de quantifier le thiaméthoxam (Martel et Lair, 2011), la téfluthrine (European Commission, 2010) et leurs métabolites dans les tissus des escargots pour élucider les effets de ces insecticides sur les gastropodes terrestres et notamment chez *Helix aspersa*.

## 5. Conclusion

En conclusion, nous pouvons suggérer que les perturbations notées dans la composition biochimique de l'hépatopancréas de *Helix aspersa* (contenu en glucides totaux, en lipides totaux et en protéines totales) après traitement au thiaméthoxam, à la téfluthrine et à leurs mixtures sont probablement liées soit :

- à des interactions de ces molécules chimiques avec les enzymes clés du métabolisme entraînant à une augmentation ou à une diminution de l'utilisation de l'énergie ;
- à des perturbations de la perméabilité membranaires, par des altérations des membranes cellulaires ou des organites ;

- à des interférences avec la synthèse des protéines (fonctionnelles et/ou structurales).

La réponse des constituants métaboliques n'est pas suffisante pour évaluer l'impact des deux insecticides et de leurs mixtures sur l'escargot *Helix aspersa*, en outre, il est important d'étudier d'autres biomarqueurs plus sensibles et plus spécifiques aux polluants. Ainsi, l'étude de la réponse de quelques biomarqueurs de stress environnemental est évaluée chez *Helix aspersa*.

Nos résultats révèlent une corrélation entre l'induction du système de détoxification et la neurotoxicité des molécules testées. En effet, il semblerait que le thiaméthoxam et la téfluthrine sont neurotoxiques (inhibition de l'AChE) et induisent de manière significative la GST et la CAT et diminuent de façon significative le taux de GSH. Quant à la sensibilité de *Helix aspersa* vis-à-vis des mixtures, elle a montré :

- une inhibition significative de l'AChE uniquement à la M4 ;
- une induction significative de la GST, similaire à celle des deux insecticides ;
- une induction significative de la CAT, synergique à celle des deux insecticides aux M2, M3 et M4 ;
- une diminution du taux de GSH, synergique à celle des deux composés testés, uniquement à la M2.

En effet, les éventuels effets néfastes d'un mélange de contaminants peuvent résulter d'interactions complexes impliquant leur métabolisme, leurs différents modes d'action ou leurs différentes cibles. De ce fait, une étude du métabolisme de ces molécules et de leurs mixtures s'avère nécessaire et complémentaire à la compréhension de cette différence de toxicité.

## CHAPITRE IV

*Effets du thiaméthoxam,  
de la téfluthrine et de leurs  
mélanges sur l'hépatopancréas de  
Helix aspersa :  
Etude histopathologique*

## 1. Objectifs et principe de l'étude

Les contaminants peuvent atteindre toutes les organelles intracellulaires et modifier leur nombre, leur structure et leur localisation dans la cellule. Ils peuvent aussi agir sur les réserves énergétiques (lipides et glycogène) intracellulaires (Triebkorn *et al.*, 1997; 2002; Gernhöfer *et al.*, 2001). L'étude de ces dommages ultrastructuraux représente un outil puissant pour révéler les effets d'une exposition sublétales à des xénobiotiques et indiquer leurs sites et leurs modes d'action au sein de différents types cellulaires, comme les cellules branchiales, rénales et hépatiques (Triebkorn *et al.*, 1997; Braunbeck, 1998; Gernhöfer *et al.*, 2001). Les dommages ultrastructuraux sont considérés comme des biomarqueurs sensibles, peu variables dans le temps et intégrateurs d'effets liés à différents stress environnementaux incluant la contamination chimique (Braunbeck et Völkl, 1993). Les modifications peuvent apparaître et disparaître avec un certain décalage dans le temps par rapport à l'impact toxique. Triebkorn *et al.* (2002) considèrent ce type de réponse comme un bon marqueur de pollution chronique et un outil pour l'évaluation rétrospective d'événements de pollution ponctuels. L'étude des réponses ultrastructurales présente l'intérêt de pouvoir caractériser l'intégrité de divers organes provenant d'un seul individu et d'évaluer ainsi l'impact des polluants environnementaux sur l'état de santé global des organismes exposés (Gernhöfer *et al.*, 2001).

Ainsi, l'exposition à des molécules chimiques, ainsi que l'accumulation de ces molécules dans les organismes peuvent produire diverses lésions histopathologiques, induire un dysfonctionnement des organes et affecter l'intégrité des fonctions physiologiques et donc le bien-être des individus. L'altération des tissus hépatiques peut par exemple réduire la capacité des organismes à produire des enzymes pour éliminer les xénobiotiques (telles que les GST), à stocker d'importantes réserves énergétiques (lipides, glycogène), à synthétiser la vitellogénine nécessaire au développement des œufs, à convertir les lipides et protéines en énergie disponible pour les diverses fonctions physiologiques (Adams *et al.*, 1990).

Les effets des contaminants sur l'intégrité des tissus de divers organes ont été mis en évidence chez plusieurs espèces de gastéropodes, en plus de *Helix aspersa* (Viard, 2004; Snyman *et al.*, 2005; Druart, 2010), d'autres espèces comme *Eobania vermiculata* (Hamed *et al.*, 2007; Radwan *et al.*, 2008), *Arion ater* (Zaldibar *et al.*, 2008) ont été étudiées.

L'hépatopancréas, site important du métabolisme, de l'accumulation, de la biotransformation, et de l'excrétion de nombreux xénobiotiques, fait partie des organes les plus étudiés (Odendaal et Reinecke, 2003; Hamed *et al.*, 2007; Radwan *et al.*, 2008; Zaldibar *et al.*, 2008).

L'objectif de cette partie a été la réalisation d'une étude histopathologique de l'hépatopancréas des escargots afin de compléter la panoplie des paramètres morphométriques et biochimiques sous l'effet des différents traitements.

Pour rendre visible les atteintes du tissu hépatopancréatique, nous avons utilisé la microscopie optique. Les coupes destinées à l'observation en microscopie optique et leurs préparations suivent généralement le même protocole : fixation, inclusion, coupe, coloration et montage. Toutes ces étapes ont été réalisées au laboratoire central d'anatomie et de cytologie pathologique de l'hôpital Ibn Rochd-CHU Annaba.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Préparation des échantillons**

A la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine de traitement et après le sacrifice des escargots, 8 individus choisis au hasard au niveau des lots (témoins et traités) sont destinés aux dosages biochimiques (sus cités), et parmi lesquels, 4 individus sont destinés aux études histologiques.

Pour l'étude histopathologique de l'hépatopancréas, ce dernier subit les étapes suivantes: fixation, inclusion, coupe, coloration et montage décrites ci-dessous pour des observations en microscopie optique.

### **2.2. Microscopie optique**

#### **2.2.1. Fixation**

La fixation permet la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit impérativement être réalisée après la dissection de l'escargot (séparation du pied et des viscères quand les escargots sont encore vivants), par immersion de l'échantillon dans un grand volume de liquide fixateur, le liquide de Bouin. Compte tenu de leur taille, les échantillons séjournent trois jours dans ce fixateur (Preece, 1972).

#### **2.2.2. Inclusion**

Cette étape a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Les échantillons sortis du formol sont rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine : de part son caractère hydrophobe, les échantillons doivent donc subir, dans un premier temps, une déshydratation par immersion successives 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°. Ensuite, l'alcool est remplacé par du toluène (trois bains de 15 minutes chacun) afin d'imprégner les échantillons par le solvant de la paraffine.

Dans un deuxième temps, les échantillons sont placés à l'étuve dans un bain de paraffine liquide (étuve à 56-58°C) afin qu'elle imprègne totalement l'échantillon. Après une nuit, les échantillons sont inclus dans la paraffine à l'aide de moules (barres de Leuckart) : après refroidissement, 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.

### **2.2.3. Coupe**

Les coupes des blocs de paraffine, de 6µm d'épaisseur, sont réalisées par un microtome de type Leitz et sont collées sur des lames de verre grâce à de l'eau albumineuse.

### **2.2.4. Coloration**

Comme les colorants sont en solution aqueuse, les lames doivent être déparaffinées avant de pouvoir être réhydratées (coloration à l'hématoxyline-éosine). Le déparaffinage consiste à chauffer les lames, jusqu'à fusion de la paraffine, avant de les immerger dans trois bains successifs de toluène. Ensuite, les lames sont plongées dans des bains d'alcool à degré décroissant (un bain d'alcool à 100°, deux bains d'alcool à 95° puis un bain d'alcool à 70°) puis colorées (Martoja et Martoja-Pierson, 1967; Gabe, 1968).

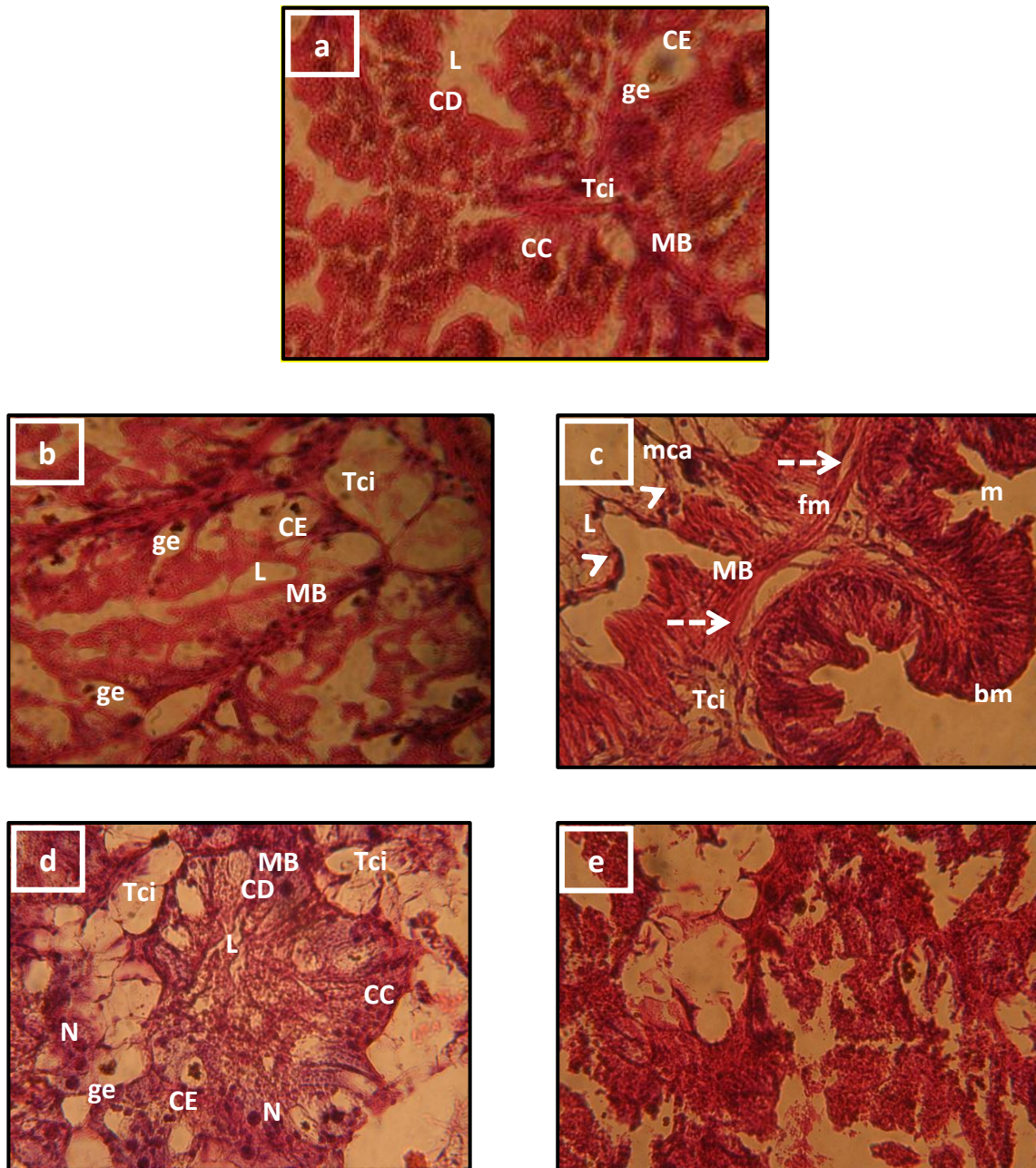
### **2.2.5. Montage**

Après avoir subi une nouvelle déshydratation (deux bains d'alcool à 95°C puis à 100°, trois bains de toluène), les lames colorées sont montées entre lames et lamelles avec une résine synthétique, le baume de Canada. Les lames sont alors prêtes pour être observées au microscope optique.

### **2.2.6. Observation**

L'observation des coupes histologiques de l'hépatopancréas est réalisée avec un microscope (Zeiss Axio Imager 2) équipé d'une caméra (Zeiss AxioCam MRc5) permettant la prise d'images avec un logiciel d'imagerie numérique (AxioVision release 4.8.2).

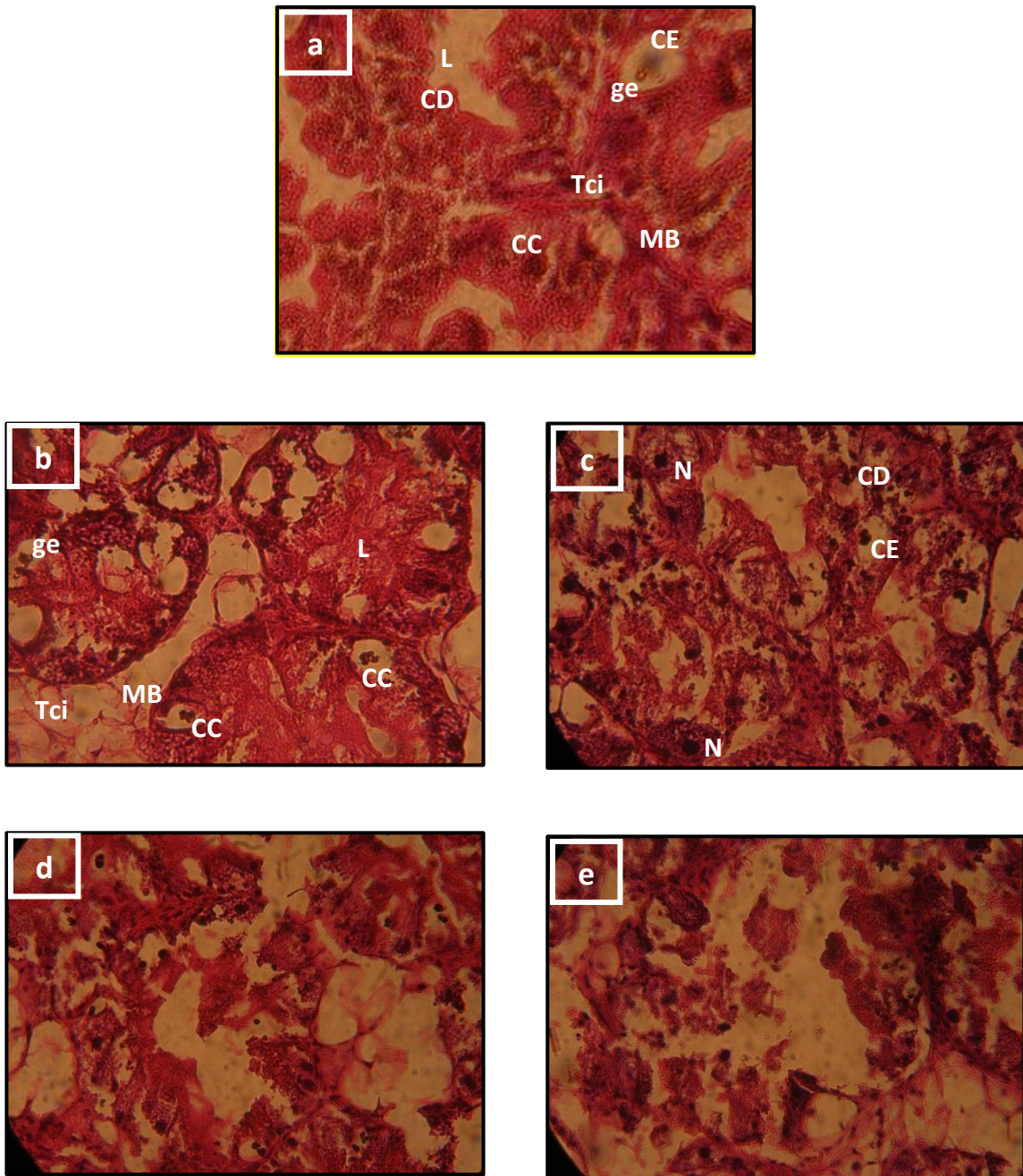
### 3. Résultats



La lumière du tubule digestif (L); les cellules digestives (CD); les cellules à calcium (CC); les cellules excrétoires (CE); le tissu connectif intertubulaire (Tci); les granules excrétoires (ge); la membrane basale (MB); les fibres musculaires (fm) --->; les microvilli (m); la bordure en brosse des microvilli (bm); le noyau (N); la membrane cellulaire apicale (mca) >.

(a) Escargots témoins, (b) escargots traités avec 25 mg/L de thiaméthoxam, (c) escargots traités avec 50 mg/L de thiaméthoxam, (d) escargots traités avec 100 mg/L de thiaméthoxam, (e) escargots traités avec 200 mg/L de thiaméthoxam.

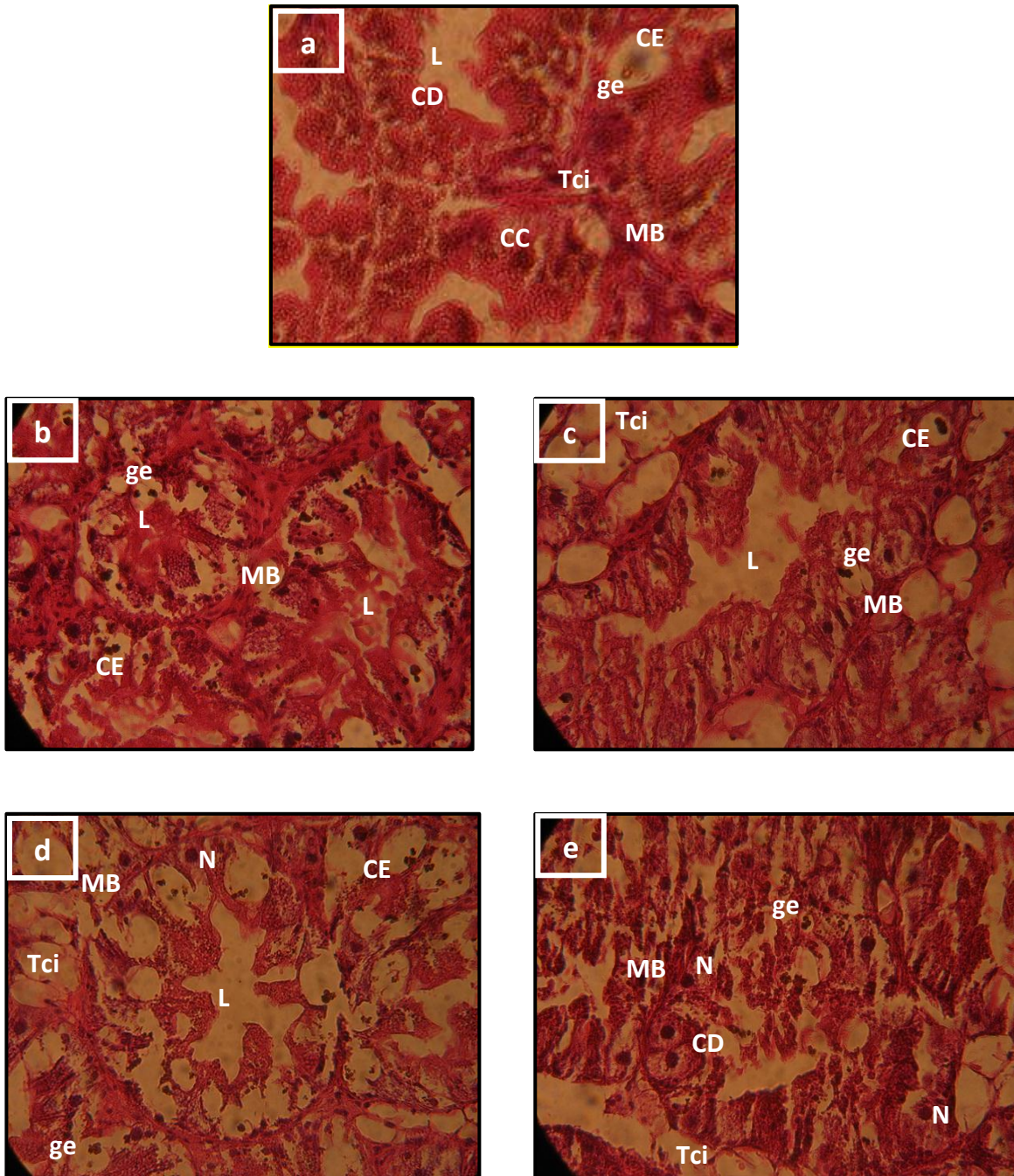
**Figure 40: Observations au microscope optique de coupes transversales d'une partie de l'hépatopancréas d'un escargot témoin *Helix aspersa* (a), montrant un tubule digestif et d'escargots après 6 semaines de traitement au thiaméthoxam par voie orale (b), (c), (d) et (e). (a), (b), (d), (e) (grossissement 400×) et (c) (grossissement 1 000×).**



La lumière du tubule digestif (L); les cellules digestives (CD); les cellules à calcium (CC); les cellules excrétoires (CE); le tissu connectif intertubulaire (Tci); les granules excrétoires (ge); la membrane basale (MB); le noyau (N).

(a) Escargots témoins, (b) escargots traités avec 5 mg/L de téfluthrine, (c) escargots traités avec 10 mg/L de téfluthrine, (d) escargots traités avec 20 mg/L de téfluthrine, (e) escargots traités avec 40 mg/L de téfluthrine.

**Figure 41: Observations au microscope optique de coupes transversales d'une partie de l'hépatopancreas d'un escargot témoin *Helix aspersa* (a), et d'escargots après 6 semaines de traitement à la téfluthrine par voie orale (b), (c), (d) et (e) (grossissement 400×).**



La lumière du tubule digestif (L); les cellules digestives (CD); les cellules à calcium (CC); les cellules excrétoires (CE); le tissu connectif intertubulaire (Tci); les granules excrétoires (ge); la membrane basale (MB); le noyau (N).

(a) Escargots témoins, (b) escargots traités avec la M1, (c) escargots traités avec la M2, (d) escargots traités avec la M3, (e) escargots traités avec la M4.

**Figure 42: Observations au microscope optique de coupes transversales d'une partie de l'hépatopancreas d'un escargot témoin *Helix aspersa* (a), et d'escargots après 6 semaines de traitement aux mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine par voie orale (b), (c), (d) et (e) (grossissement 400×).**

Une section histologique de l'hépatopancréas du groupe témoin est illustrée dans la figure 40a. Cette coupe montre que le tissu de la glande digestive est constitué essentiellement par la juxtaposition de nombreux tubules digestifs de différentes formes et tailles, séparés par l'espace inter tubulaire, constitué de vaisseaux hémolymphatiques et d'hémocytes. La lumière des tubules est bordée par un épithélium simple associant plusieurs types cellulaires. Les cellules qui le composent présentent des morphologies diverses mais révèlent trois types cellulaires principales : les cellules digestives, les cellules à calcium, et les cellules excrétoires (Zaldibar *et al.*, 2008). Les tubules sont maintenus cohérents par le tissu intertubulaire connectif. Les cellules digestives constituent la principale composante cellulaire de l'épithélium des tubules de la glande digestive, et sont relativement polymorphes selon le stade de la digestion (Hamed *et al.*, 2007; Heusser et Dupuy, 2011).

### **3.1. Effets du thiaméthoxam**

Après 6 semaines de traitement au thiaméthoxam, l'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots contaminés a montré des altérations en réponse à tous les traitements. A la concentration 25 mg/L de thiaméthoxam (Fig. 40b), une remarquable augmentation du nombre de vacuoles excrétoires, la dégénérescence partielle de certaines cellules digestives et un tissu intertubulaire plus important et plus élargit sont observées. Aussi, à la concentration de 50 mg/L (Fig. 40c), les mêmes altérations ont été observées, accompagnées par des altérations de la membrane cellulaire apicale et la libération des fragments dans la lumière du tubule, des cassures de la membrane basale de manière dose-dépendante. A la concentration de 100 mg/L (Fig. 40d), l'examen histologique a montré une dégénérescence très avancée des cellules digestives et à calcium, des membranes basales des tubules digestifs, une diminution du nombre des cellules à calcium. Les tubules ont montré une lumière complètement rétrécie et remplie de débris tissulaires. Les tubules digestifs apparaissaient entremêlés par endroits, à cause de la dégénérescence très importante de la membrane basale délimitant les tubules. Enfin, à la concentration 200 mg/L (Fig. 40e), les tissus connectifs, les tubules digestifs et leurs membranes sont sévèrement endommagés.

### **3.2. Effets de la téfluthrine**

L'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots exposés à la téfluthrine a mis en évidence des altérations tissulaires doses-dépendantes comparé à celui des escargots témoins. En effet, à la concentration 5 mg/L, la figure 41b montre un élargissement important

du tissu intertubulaire connectif, une lumière des tubules très rétrécie, un nombre relativement élevé des cellule excrétoires, remplies de granules, et une dégénérescence des membranes basales. A cette même concentration, la structure générale des tubules est encore potentiellement conservée. A la concentration 10 mg/L (Fig. 41c), une dégénérescence avancée des membranes basales est observée, avec une altération de tous les types cellulaires, à savoir, les cellules digestives, à calcium et excrétoires, et prépondérance des agrégats cellulaires. Aux concentrations 20 et 40 mg/L (Fig. 41d et 41e), une altération complète du tissu hépatique est constatée.

### **3.3. Effets des mixtures de thiaméthoxam et de téfluthrine**

Enfin, l'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots exposés aux mixtures M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> et M<sub>4</sub> a montré des altérations tissulaires en réponse à toutes les mixtures comparé à celui des escargots témoins. Ces altérations sont doses- dépendantes. La M<sub>1</sub> (Fig. 42b) provoque une fragmentation des membranes basales, apicales et des tubules, accompagnée par un rétrécissement de la lumière tubulaire et une altération de tous les types cellulaires. La M<sub>2</sub> (Fig. 42c) entraîne les mêmes effets histopathologiques que la M<sub>1</sub>, avec cependant, une lumière tubulaire plus élargie. La M<sub>3</sub> (Fig. 42d) et la M<sub>4</sub> (Fig. 42e) entraînent à une dégénérescence très avancée de toutes les structures tubulaires. Les contours cellulaires sont moins visibles après exposition à la M<sub>4</sub> par rapport à la M<sub>3</sub>, cependant, certaines cellules digestives sont mieux conservées après traitement à la M<sub>4</sub> comparé à la M<sub>3</sub>, à laquelle, tous les types cellulaires sont affectés.

## **4. Discussion**

Les insecticides pénètrent dans le corps de l'escargots par diverses voies et franchissent plusieurs barrières avant d'atteindre l'hépatopancréas, organe de détoxification des xénobiotiques (Triebkorn et Künast, 1990; Hamed *et al.*, 2007; Frias-Espericueta *et al.*, 2008). Ils peuvent être réversiblement absorbés par l'hépatopancréas, puis sont détoxifiés et finalement excrétés (Ishaaya, 2001).

L'examen histologique de l'hépatopancréas de *Helix aspersa* traité par le thiaméthoxam, la téfluthrine et leurs mixtures a mis en évidence des altérations qualitatives importantes dès la plus faible concentration testée. En effet, l'exposition aux pesticides peut causer des altérations cytologiques très importantes au niveau de l'hépatopancréas qui joue un rôle crucial dans la détoxification des polluants (Frias-Espericueta *et al.*, 2008).

Ces observations sont en parfait accord avec celles des travaux de Russell *et al.* (1981), Jonnalagadda et Rao (1996) et de Chabicovsky *et al.* (2004). L'étude histologique a révélé une dégénérescence des tubules digestifs, une fragmentation des cellules digestives et des ruptures au niveau de la membrane basale des tubules de manière dose-dépendante, conduisant à une détérioration sévère du tissu de la glande digestive aux plus fortes concentrations. Ces résultats corroborent avec ceux de Radwan *et al.* (2008) et Hamed *et al.* (2007), selon qui les altérations structurales et la perte des cellules digestives essentiellement et des autres types cellulaires semblent être une réponse générale après une exposition aux pesticides et notamment aux carbamates chez l'escargot terrestre *Eobania vermiculata*. La détérioration des cellules digestives entraînent par conséquent, l'altération du processus digestif global provoquée par l'ingestion des pesticides.

Les modifications structurales et ultrastructurales en réponse à l'absorption de composés organiques ont été aussi mises en évidence chez la limace *D. reticulatum* exposée à des molluscicides. Ainsi, Triebkorn et Ebert (1989) ont étudié les effets de l'application orale et dermale d'un carbamate et du métaldéhyde sur les cellules à mucus de l'épiderme et du tractus digestif de *D. reticulatum*. Le carbamate cause des dommages cellulaires moins sévères que le métaldéhyde qui induit la destruction des cellules à mucus. La production de mucus augmente immédiatement après l'application des 2 molluscicides mais cesse rapidement dans le cas du métaldéhyde en raison de son impact sévère sur l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. Le mucus produit suite à l'exposition joue un rôle de barrière protectrice entre la substance toxique et les tissus exposés; il évite le contact direct et, de par sa composition modifiée, permet une détoxification du produit. Chez la même espèce de limace, Triebkorn et Künast (1990) montrent que les effets ultrastructuraux sur les cellules du tractus digestif dus à l'ingestion de concentrations sublétales de cloethocarb (réactions de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique, des cellules à mucus) peuvent être distingués de ceux induits par des concentrations létales (élongation des cellules, dommages aux noyaux et aux mitochondries, destruction des membranes).

D'autre part, les modifications structurales observées aux concentrations élevées pourraient être dues au jeûne prolongé causé par la répulsion de la nourriture contaminée et par conséquent, par l'estivation induite (Heiba, 1988; El-Emam et Ebeid, 1989; Saad, 1990; El-Saadany *et al.*, 1994; Sharaf, 2009).

La sévérité et la fréquence des lésions observées dépendent de l'espèce considérée, varient selon l'organe et sont plus prononcées aux concentrations les plus élevées (Schwaiger *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 1990). Cependant, les altérations histopathologiques observées,

intègrent les effets de nombreux facteurs de stress directement ou indirectement liés à la contamination et leur étude permet de détecter des effets secondaires du stress polluant tels que le parasitisme. Schwaiger (2001) suggère qu'en affectant le système immunitaire, les contaminants affaiblissent les organismes exposés, qui deviennent plus sensibles aux infections parasitaires et indirectement moins résistants aux effets toxiques des polluants.

A l'heure actuelle, les données existantes sont insuffisantes pour conclure sur l'effet de l'exposition des gastéropodes aux pesticides, d'une part parce que les concentrations testées ne sont pas représentatives de l'exposition réelle, et d'autre part parce que les interactions révélées à ces fortes doses ne représentent pas nécessairement celles qui pourraient être observées aux faibles doses.

D'autre part, certaines études ont montré que l'effet d'un mélange ne reflète pas nécessairement les effets des substances prises individuellement (Padhi *et al.*, 2008). Les interactions possibles entre les composants d'un mélange sont donc assez complexes et rendent la prédiction de l'effet global très difficile. Lodivici *et al.* (1994) ont testé un mélange de pesticides comparable à celui auquel la population générale est exposée via l'alimentation en croisant des données de consommation avec des données d'analyse de résidus de pesticides. Ces auteurs ont montré que des doses relativement faibles (comparables aux doses d'exposition du consommateur adulte) d'un mélange de 15 pesticides étaient capables de provoquer des dommages à l'ADN via un mécanisme de génération de radicaux libres au niveau de foie de rats exposés par voie orale. Par contre, dans une étude portant sur un modèle de carcinogénèse *in vivo* chez le rat (Ito *et al.*, 1995), les auteurs n'ont pas observé d'effets en présence de mélanges de pesticides à des faibles doses.

## 5. Conclusion

Au terme de cette partie, nous pouvons conclure que l'administration de la téfluthrine par voie orale est plus toxique vis-à-vis de l'hépatopancréas de *Helix aspersa*, que le thiaméthoxam, et que les effets histopathologiques des mixtures M1, M2, M3 et M4 semblent moins prononcés que ceux des deux insecticides administrés à part.

En effet, l'hépatopancréas des escargots traités présentent d'importantes anomalies après exposition aux deux insecticides et leurs mixtures. L'altération de la structure de l'hépatopancréas témoigne de l'effet toxique du néonicotinoïde testé, ainsi que celui du pyréthrianoïde et de leurs mixtures, ou bien celui de leurs métabolites, altérant ainsi le processus de la digestion. Ainsi, en plus des effets neurotoxiques des insecticides testés ou de

leurs métabolites, il semblerait qu'ils aient des effets sur d'autres systèmes, comme le système digestif chez les gastéropodes terrestres et spécialement chez *Helix aspersa*.

Notre exploration histopathologique de l'hépatopancréas après exposition aux deux insecticides et leurs mixtures chez *Helix aspersa* demeure à compléter en utilisant des coupes histologiques au niveau d'autres organes de l'escargot (comme le rein, le poumon, l'appareil génital ou la sole pédieuse) susceptibles d'être affectés par les composés testés.

## CHAPITRE V

*Effets du thiaméthoxam,  
de la téfluthrine et de leurs  
mélanges vis-à-vis des escargots  
juvéniles *Helix aspersa* :  
Effets sur la croissance pondérale  
par contamination de la  
nourriture*

## 1. Objectif et principe de l'étude

Les effets des polluants sur la respiration, les processus d'osmorégulation, et neuro-endocriniens sont relativement bien décrits et certaines réponses telles que la consommation d'oxygène, le rythme cardiaque, les flux ioniques et certains paramètres sanguins sont utilisées comme marqueurs précoces d'expositions subaiguës, variables et complexes caractérisant les conditions environnementales (Handy et Depledge, 1999). Cependant, ces réponses physiologiques ne sont que transitoires et donc inadaptées à la détection d'événements de pollution passés, contrairement aux altérations tissulaires capables de perdurer suite à un stress (Triebskorn *et al.*, 1997).

Les réponses des organismes à la contamination chimique de l'environnement leur permettent, dans une certaine limite, de se maintenir ou de rétablir un certain équilibre. Ces mécanismes homéostatiques se traduisent à l'échelle de l'individu par une dépense d'énergie qui peut être directement évaluée via le « Scope for Growth », le EAC « Adenylate Energy Charge », le CEA « Cellular Energy Allocation » (Le Gal *et al.*, 1997; Lawrence *et al.*, 2003). Le coût énergétique d'un stress environnemental se solde par une diminution de la quantité d'énergie disponible pour la reproduction et la croissance et en conséquence par une réduction de la fitness des individus (Fig. 43).

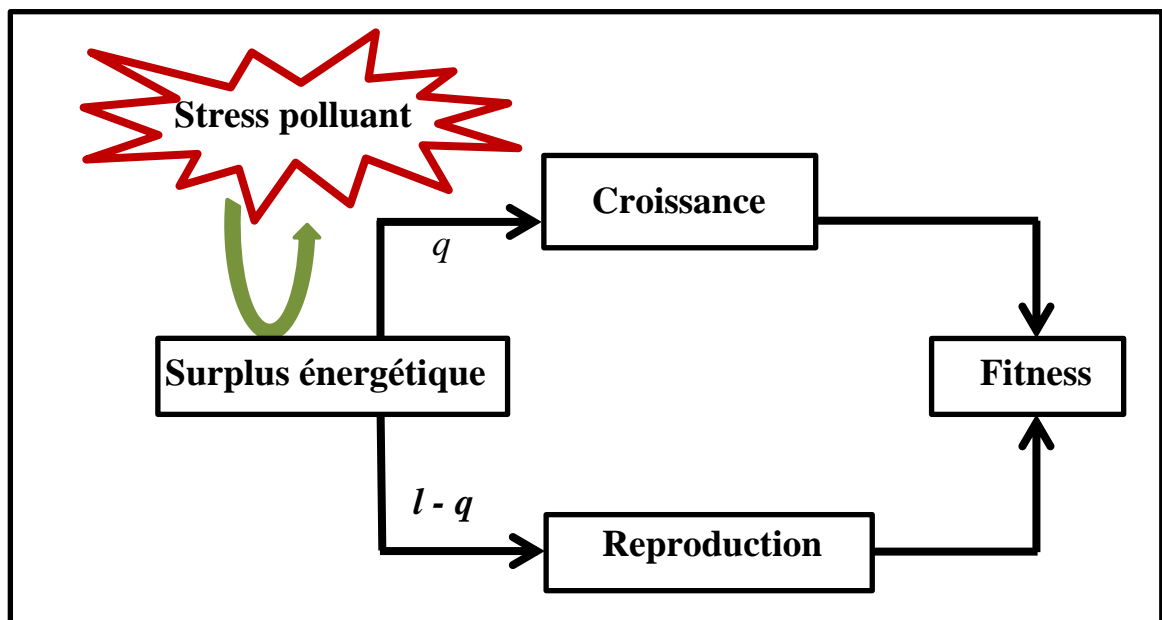


Figure 43 : Devenir du surplus énergétique (énergie disponible après excréation et métabolisme général). Si une proportion  $q$  de cette énergie est allouée à la croissance, une proportion  $l - q$  sera disponible pour la reproduction (Lawrence *et al.*, 2003).

Un moyen d'évaluer l'état de santé général d'un individu est donc d'étudier le devenir de son « surplus énergétique ». L'augmentation d'allocation d'énergie pour un processus doit résulter en une diminution de l'allocation d'énergie pour les autres processus. Ainsi s'énonce le principe du compromis ou « trade-off » que les organismes appliquent en permanence dans leur environnement pour maintenir leur fitness. Ainsi, une modification de la croissance peut refléter un changement de la quantité d'énergie présente dans un organisme et suggérer l'existence d'une diminution de la conversion énergétique en tissus somatiques. Ainsi, l'étude de la croissance permet d'observer indirectement les effets d'un stress polluant sur une des composantes de la fitness des organismes et présente l'avantage d'intégrer l'histoire de vie des individus (Adams *et al.*, 1992; Laroche *et al.*, 2002; Marchand *et al.*, 2003).

En raison du nombre limité de données disponibles sur la toxicité des contaminants sur les organismes vivants dans le sol, les problèmes d'évaluation de l'écotoxicité des sols et des déchets sont très préoccupants. Les essais actuellement disponibles utilisent les organismes de la faune du sol limités aux embranchements annélides (vers de terre et Enchytraeidae) (ISO 11268-2, 1998; ISO 16387, 1998), aux arthropodes (insectes: Collemboles et Coléoptères) (ISO 11267, 1999; NF X 31-260, 1999) et aux gastéropodes (NF X 31-255-2, 2001; ISO 15952, 2006).

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).

En raison de la toxicité des molécules étudiées (Tomizawa et Casida, 2005; Bingham *et al.*, 2008; Fortin *et al.*, 2008), et des relations étroites entre les systèmes nerveux et neuroendocrinien, et les mécanismes physiologiques fondamentaux tel que la croissance, nous évaluons dans ce chapitre les effets du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures par une méthode d'exposition par ingestion et par contact, sur la croissance pondérale des juvéniles de l'escargot *Helix aspersa*.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Reproduction, ponte, incubation et éclosion**

La reproduction est réalisée en récupérant les futurs escargots reproducteurs après une période de dormance (phase de repos) au sec et à température ambiante (15 à 20°C) d'environ 11 semaines (de juin à la mi-août). Les escargots réveillés sont hydratés et nourris de laitue

fraîche le long de la période entre le moment du réveil et le début de l'essai. A partir de la mi-août, les escargots sont mis en reproduction jusqu'au mois d'octobre dans des boîtes munies de pots de ponte en polystyrène, remplis de terreau humide afin d'éviter la déshydratation des œufs pondus. Lorsque les premiers accouplements ont été observés, les escargots pondueurs sont repérés. Ensuite, les pots de ponte libérés par les escargots reproducteurs sont retirés (Fig. 44) puis placés dans une boîte d'incubation. Après 22 jours d'incubation, a eu une première ponte (Fig. 44), suivie par une deuxième ponte trois jours après. La moyenne du nombre d'œufs pondus était de  $96 \pm 3$  œufs. L'éclosion commence 11 à 13 jours après la ponte des œufs et dure plusieurs jours (3 à 4 jours). Le nombre d'éclos des deux pontes était de 160 œufs. Les escargots fraîchement éclos (ou naissains) restent tout d'abord collés les uns aux autres en grappes sur le fond du récipient, puis, quelques jours plus tard, ils commencent à migrer vers le couvercle. Pendant cette migration, ils sont nourris de feuilles de laitue fraîche. Quelques jours après cette migration (de 6 à 10 jours), les naissains sont plus pigmentés. Après 4 semaines de nursery (correspondant aux premières quatre semaines de l'élevage), les 160 juvéniles sont triés afin d'obtenir la population la plus homogène possible pour la poursuite de la croissance sans et avec les traitements aux insecticides. Ce tri est nécessaire car la population est relativement hétérogène à la fin de la période de nursery; en moyenne, de 15 % à 30 % (ISO 15952, 2006) des escargots juvéniles issus d'une ponte restent «nains» et ne sont pas conservés pour le reste du processus d'élevage. Dans notre cas, 26 escargots nains (16.25 %) ont été séparés des juvéniles utilisés dans cet essai.

## **2.2. Animaux**

Les escargots utilisés sont les juvéniles de *Helix aspersa*, dont les individus sont âgés de 4 semaines, d'une masse fraîche moyenne de  $0,515 \pm 0.004$  g et un diamètre de coquille moyen de  $10.57 \pm 0.06$  mm. Les juvéniles utilisés proviennent de pontes réalisées dans notre laboratoire, et sont élevés sous des conditions contrôlées, décrites par Gomot (1994),

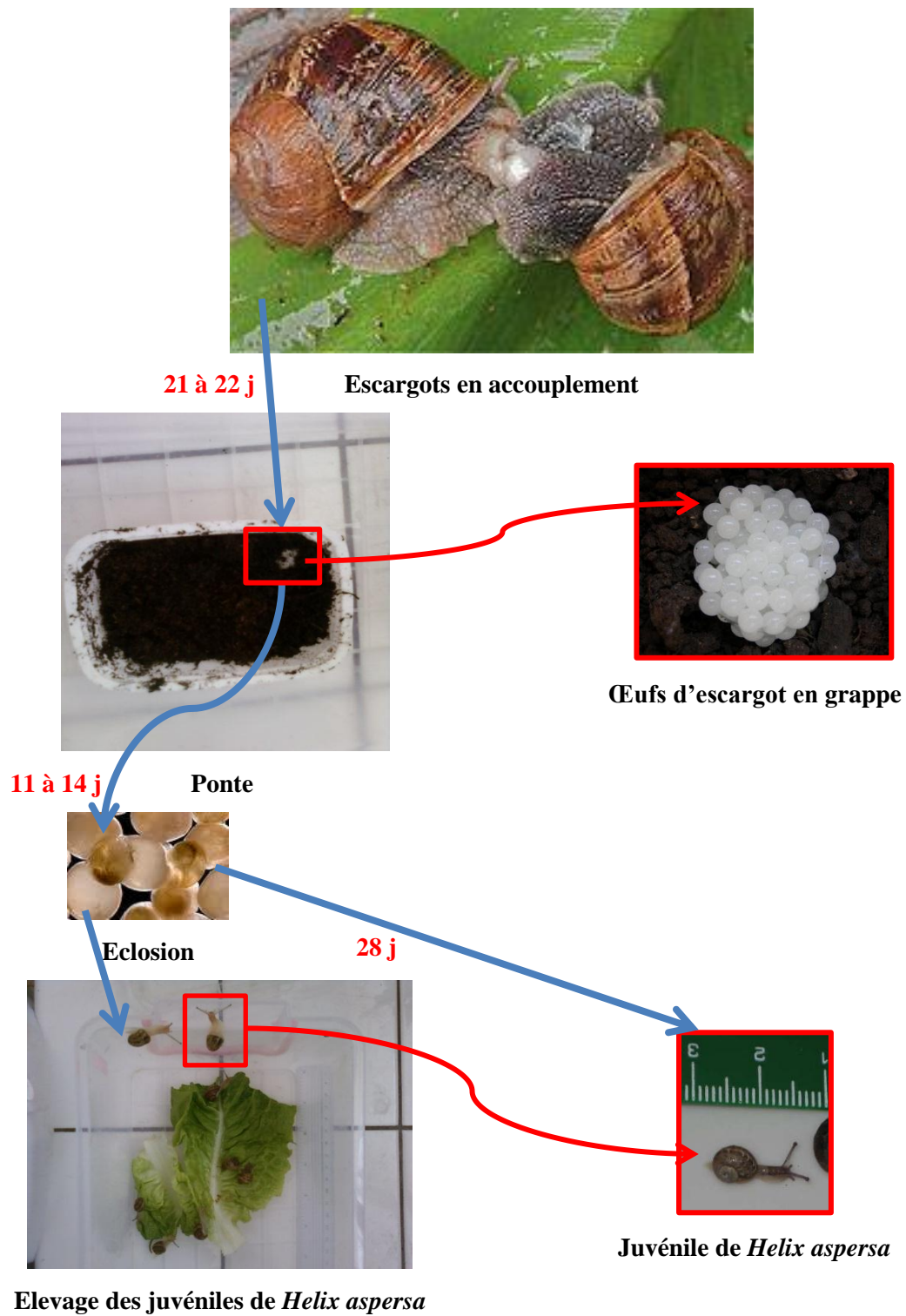


Figure 44 : Schéma de la reproduction, la ponte, l'éclosion et l'élevage de *Helix aspersa*.

température  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , photopériode 18hL/6hO, hygrométrie 80 à 90 %. Cependant, ils sont nourris exclusivement de feuilles de laitue fraîche.

### 2.3. Schéma expérimental

105 escargots juvéniles sont répartis en 7 groupes de 15 animaux chacun (3 réplicats par groupe). Chaque réplicat est constitué de 5 escargots maintenus dans une boîte de polystyrène perforée de dimensions  $25 \times 13.5 \times 16.5$  cm. L'humidité élevée est assurée par une éponge imbibée d'eau. Les 7 groupes d'escargots juvéniles sont nourris de laitue fraîche (escargots témoins), ou de laitue imbibée (durant 30 s) de solution d'insecticide selon le tableau 6 :

**Tableau 6 : Dilutions utilisées pour chaque insecticide.**

Groupe	
<b>Groupe T</b>	Escargots témoins non traités
<b>Groupe Th1</b>	Escargots traités avec 25 mg/L de thiaméthoxam
<b>Groupe Th2</b>	Escargots traités avec 50 mg/L de thiaméthoxam
<b>Groupe Te1</b>	Escargots traités avec 5 mg/L de téfluthrine
<b>Groupe Te2</b>	Escargots traités avec 10 mg/L de téfluthrine
<b>Groupe M1</b>	Escargots traités avec 25 mg/L de thiaméthoxam + 5 mg/L de téfluthrine
<b>Groupe M2</b>	Escargots traités avec 50 mg/L de thiaméthoxam + 10 mg/L de téfluthrine

La nourriture est fournie trois à quatre fois par semaine, de même que le nettoyage des boîtes. Pour déterminer l'effet des deux insecticides, l'expérience est menée durant 8 semaines sous des conditions contrôlées de laboratoire citées auparavant.

### 2.4. Estimation de la croissance et de la mortalité

La croissance pondérale est évaluée chaque semaine en pesant les escargots à presque  $\pm 0.1$  g avec une balance modèle OHAUS®ANALYTICAL Plus, et en mesurant le diamètre coquillère à presque  $\pm 1$  mm avec un pied à coulisse précision 0.02 cm (annexe 2). Le pourcentage d'inhibition du poids moyen ( $P_{pi}$ ) (ISO 15952, 2006) est calculé pour comparer le poids moyen des groupes traités avec celui du groupe témoin (annexe 3a),

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

Où le groupe  $G_X$  représente les groupes d'escargots  $G_{Th1}$ ,  $G_{Th2}$ ,  $G_{Te1}$ ,  $G_{Te2}$ ,  $G_{M1}$  et  $G_{M2}$ ;  $m_{Tn}$  est la masse des escargots du groupe témoin à l'instant  $t = n$  semaines ;  $m_{T0}$  est la masse des escargots du groupe témoin au début de l'expérience;  $m_{Gn}$  est la masse des escargots du groupe  $G_X$  à l'instant  $t = n$  semaines;  $m_{G0}$  est la masse des escargots du groupe  $G_X$  au début de l'expérience.

Le pourcentage d'inhibition du diamètre moyen ( $P_{di}$ ) (ISO 15952, 2006) est calculé pour comparer le diamètre des groupes traités avec celui du groupe témoin (annexe 3b),

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

Où  $d_{Tn}$  est le diamètre coquillère des escargots du groupe témoin à l'instant  $t = n$  semaines;  $d_{T0}$  est le diamètre des escargots du groupe témoin au début de l'expérience;  $d_{Gn}$  est le diamètre des escargots du groupe  $G_X$  à l'instant  $t = n$  semaines;  $d_{G0}$  est le diamètre des escargots du groupe  $G_X$  au début de l'expérience.

Le nombre de juvéniles dans chaque groupe est compté chaque semaine pour estimer le pourcentage de mortalité après 8 semaines de traitement.

## 2.5. Analyses statistiques

Pour chaque concentration d'insecticide, le poids moyen et le diamètre coquillère moyen sont exprimés en moyennes  $\pm$  déviation standard (DS) chaque semaine. A la fin de l'expérience, les résultats obtenus des traitements 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 13.31.

### 3. Résultats

#### 3.1. La mortalité

Durant l'expérience, la mortalité était faible, avec seulement 20 individus sur 105 escargots juvéniles, ce qui représente 19.04 %. La mortalité (Tab. 7) est survenue comme suit : 2 individus dans le groupe  $G_{M1}$  durant la deuxième semaine de traitement, 5 individus durant la troisième semaine de traitement : 2 individus dans le groupe  $G_{M1}$  et les 3 autres dans le groupe  $G_{M2}$ , 3 individus pendant la quatrième semaine dans le groupe  $G_{M1}$ , 3 individus durant la sixième semaine : 1 individu dans le groupe  $G_{Te2}$  et 2 individus dans le groupe  $G_{M2}$ , 4 individus durant la septième semaine : 2 individus dans le groupe  $G_{Th2}$  et 2 autres dans le groupe  $G_{Te1}$ , et enfin 2 individus durant la huitième semaine dans le groupe  $G_{Te2}$ .

**Tableau 7 : Mortalité des escargots juvéniles durant les huit semaines de traitement par les deux insecticides et leurs mixtures.**

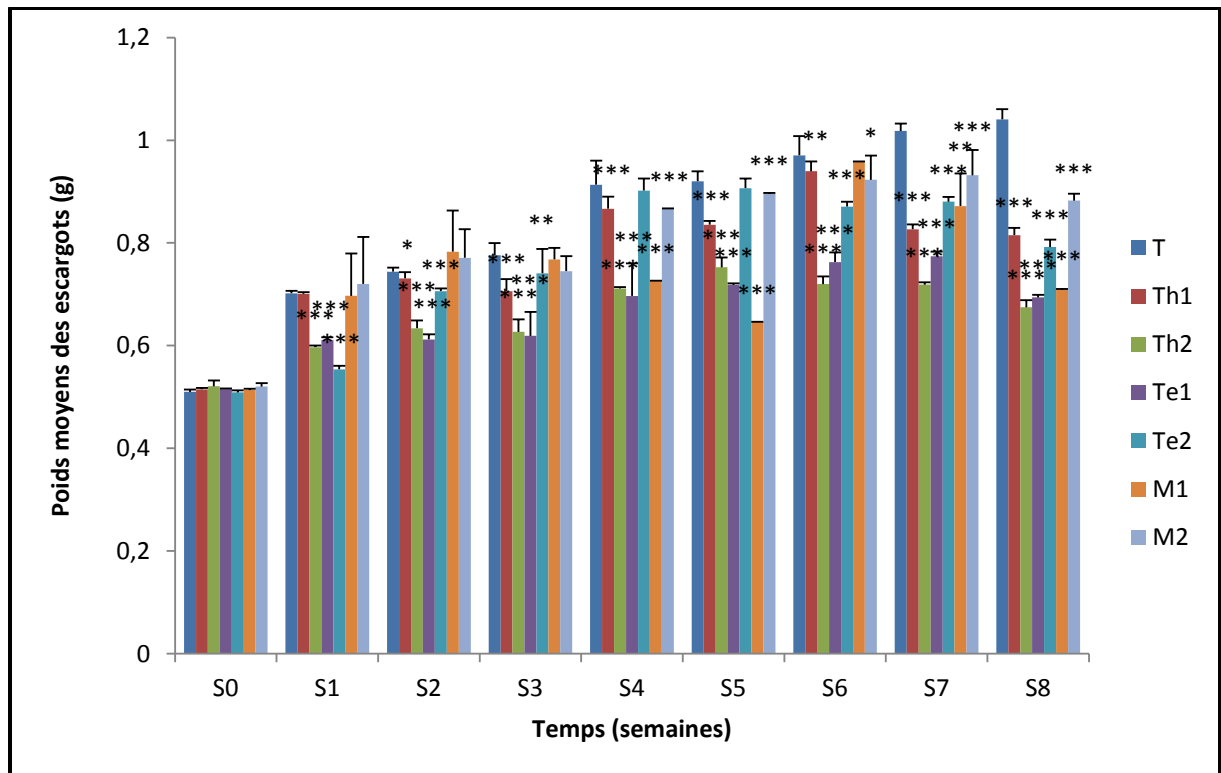
<div style="display: inline-block; transform: rotate(-45deg);">Période d'exposition</div> Groupe	Début de l'expérience	1 <sup>ère</sup> semaine	2 <sup>ème</sup> semaine	3 <sup>ème</sup> semaine	4 <sup>ème</sup> semaine	5 <sup>ème</sup> semaine	6 <sup>ème</sup> semaine	7 <sup>ème</sup> semaine	8 <sup>ème</sup> semaine	Mortalité totale
<b>Groupe T</b>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<b>Groupe Th1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Groupe Th2</b>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<b>Groupe Te1</b>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<b>Groupe Te2</b>	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3
<b>Groupe M1</b>	0	0	2	2	3	0	0	0	0	7
<b>Groupe M2</b>	0	0	0	3	0	0	2	0	0	5
<b>Mortalité totale</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>20</b>

#### 3.2. Evolution de la croissance pondérale et du diamètre

Les juvéniles témoins ont multiplié leur masse moyenne par un facteur de 2.04. Les escargots des groupes  $G_{Th1}$ ,  $G_{Th2}$ ,  $G_{Te1}$ ,  $G_{Te2}$ ,  $G_{M1}$  et  $G_{M2}$ , ont multiplié leur masse moyenne par un facteur 1.59, 1.32, 1.36, 1.55, 1.38 et 1.63 respectivement. Les résultats de la croissance coquillère concordent avec ceux de la masse. Ainsi, les escargots des groupes  $G_T$ ,  $G_{Th1}$ ,  $G_{Th2}$ ,  $G_{Te1}$ ,  $G_{Te2}$ ,  $G_{M1}$  et  $G_{M2}$  ont multiplié leur diamètre coquillère moyen par un facteur 1.25, 1.14, 1.08, 1.08, 1.10, 1.10 et 1.12 respectivement.

A la fin de l'expérience, la masse moyenne des escargots traités avait tendance à diminuer avec l'augmentation de la concentration des deux insecticides (Fig. 45). Cependant, cette diminution de la masse moyenne est très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport à la masse des témoins dans les groupes d'escargots  $G_{Th2}$ ,  $G_{Te1}$  et  $G_{Te2}$ .

La concentration 25 g/L de thiaméthoxam entraîne une diminution de la masse moyenne des juvéniles d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) comparée aux escargots du groupe témoin (Fig. 45) à partir de la troisième semaine de traitement. Quant à la concentration 50 g/L, la diminution de la masse moyenne est survenue dès la première semaine de traitement d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.001$ ).



Moyennes  $\pm$  SD ; n = 8-15. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les masses moyennes des escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. Test 't' de Student : \* pour  $p \leq 0.05$ , \*\* pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 45 : Effets du thiaméthoxam et de la téfluthrine sur le poids moyen des juvéniles de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de huit semaines.**

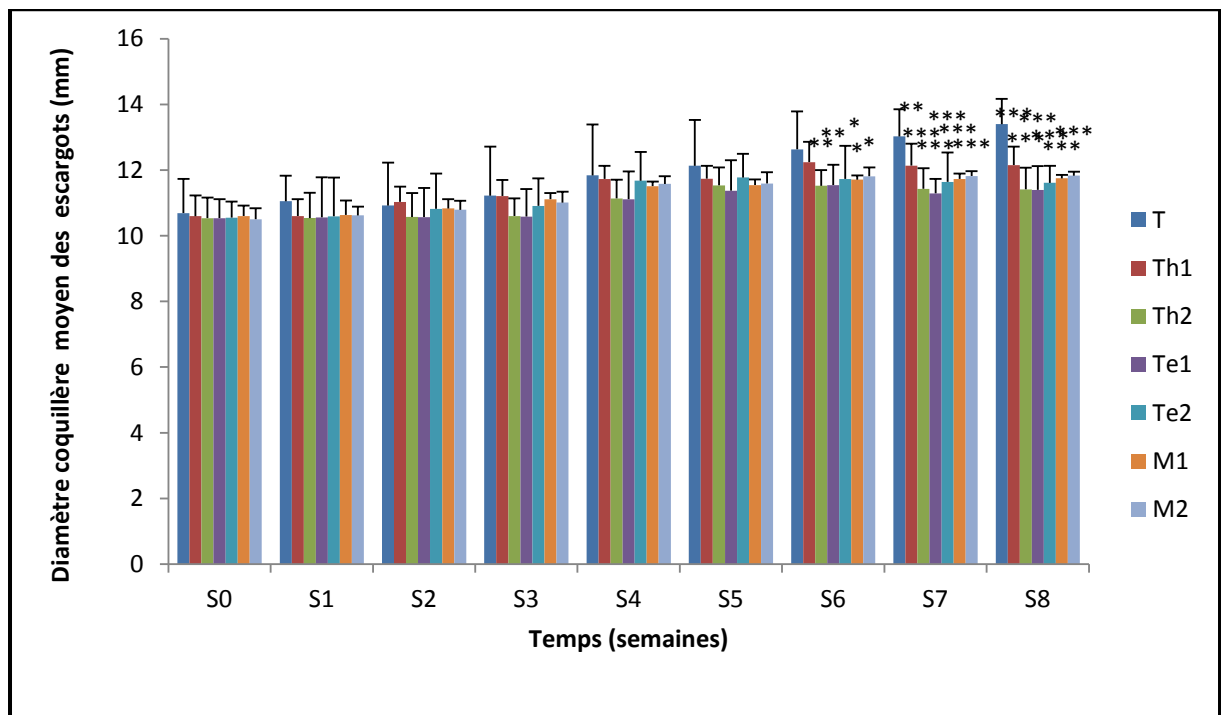
A la fin de l'essai, la masse moyenne des escargots traités par le thiaméthoxam a tendance à diminuer avec l'augmentation de la concentration de l'insecticide comparée à celle des escargots du groupe témoin. Cette diminution est hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) comparée à la masse moyenne des juvéniles du groupe témoin à partir de la première semaine de traitement.

La concentration 5 g/L de téfluthrine entraîne une diminution de la masse moyenne d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) comparée aux escargots du groupe témoin (Fig. 45) dès le début du traitement. Cependant, une rapide récupération de la masse moyenne des juvéniles après exposition à la concentration 10 mg/L de l'insecticide a été observée durant la troisième, la quatrième et la cinquième semaine de traitement. Ensuite, une diminution hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de la masse moyenne des escargots est observée à partir de la sixième semaine de traitement.

La  $M_1$  et la  $M_2$  n'affectent pas la masse moyenne durant les trois premières semaines de traitement et entraînent une diminution de la masse moyenne d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) comparée aux escargots du groupe témoin (Fig. 45) à partir de la quatrième semaine de traitement.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement, de la durée de traitement et de l'interaction traitement-durée de traitement hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ) pour les deux insecticides et leurs mixtures.

A la fin de l'expérience, le diamètre coquillère moyen des escargots traités diminue d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport aux escargots du groupe témoin (Fig. 46). Cette diminution était significative ( $p \leq 0.05$ ) dans les groupes  $G_{Th2}$  et  $G_{Te1}$  à partir de la sixième semaine de traitement. Cette diminution devient significative ( $p \leq 0.05$ ) pour le groupe  $G_{Th1}$  et très significative ( $p \leq 0.01$ ) pour le groupe  $G_{Te2}$  à partir de la septième semaine de traitement. L'exposition aux  $M_1$  et  $M_2$  n'affecte pas le diamètre coquillère moyen durant les cinq premières semaines de traitement et entraînent une diminution de la masse moyenne d'une façon significative ( $p \leq 0.05$ ) comparée aux escargots du groupe témoin (Fig. 46) à la sixième semaine de traitement, et hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) à la septième et huitième semaine de traitement.



Moyennes  $\pm$  SD ; n = 8-15. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les diamètres coquillères moyens des escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. Test 't' de Student : \* pour  $p \leq 0.05$ , \*\* pour  $p \leq 0.01$ , \*\*\* pour  $p \leq 0.001$ .

**Figure 46 : Effets du thiaméthoxam et de la téfluthrine sur le diamètre coquillère moyen des juvéniles de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de feuilles de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de huit semaines.**

Au bout de 4 semaines de traitement, le pourcentage d'inhibition de la masse moyenne des groupes  $G_{Th1}$ ,  $G_{Th2}$ ,  $G_{Te1}$ ,  $G_{Te2}$ ,  $G_{M1}$  et  $G_{M2}$  calculé (Tab. 8) est de 11.57, 50.06, 53.70, 2.82, 11.57 et 19.14 respectivement. Le pourcentage d'inhibition du diamètre coquillère moyen est de 1.30, 47.82, 50.00, 2.17, 20.86 et 6.08 respectivement. Après 8 semaines de traitement, le pourcentage d'inhibition de la masse moyenne des mêmes groupes est de 42.50, 69.00, 65.36, 45.89, 63.17 et 35.61 respectivement. Le pourcentage d'inhibition du diamètre coquillère moyen était de 42.61, 67.71, 68.26, 60.88, 57.56 et 50.92 respectivement.

**Tableau 8 : Effets des insecticides et de leurs mixtures sur le poids et le diamètre coquillère moyens des escargots juvéniles *Helix aspersa*.**

Traitement (mg/L)	Début de l'expérience		2 <sup>ème</sup> semaine		4 <sup>ème</sup> semaine		6 <sup>ème</sup> semaine		8 <sup>ème</sup> semaine	
	Poids moyen (mg) ± SD P <sub>m</sub>	Diamètre moyen (mm) ± SD D <sub>m</sub>	% IP <sub>m</sub>	% ID <sub>m</sub>	% IP <sub>m</sub>	% ID <sub>m</sub>	% IP <sub>m</sub>	% ID <sub>m</sub>	% IP <sub>m</sub>	% ID <sub>m</sub>
Témoins	510.10 ± 4.50	10.69 ± 1.04	0	0	0	0	0	0	0	0
25 mg/L de thiaméthoxam	515.00 ± 2.87	10.59 ± 0.63	5.55	- 89.13	11.57	1.30	6.69	15.20	42.50	42.61
50 mg/L de thiaméthoxam	521.0 ± 11.23	10.53 ± 0.63	47.02	84.78	50.06	47.82	54.46	49.22	69.00	67.71
5 mg/L de téfluthrine	515.50 ± 1.03	10.53 ± 0.57	55.99	86.95	53.70	50.00	45.14	48.19	65.36	68.26
10 mg/L de téfluthrine	509.00 ± 3.98	10.55 ± 0.48	16.24	- 17.39	2.82	2.17	21.68	39.17	45.89	60.88
25 mg/L de thiaméthoxam + 5 mg/L de téfluthrine	513.69 ± 2.34	10.60 ± 0.31	- 15.11	0.00	11.57	20.86	3.47	42.78	63.17	57.56
50 mg/L de Thiaméthoxam + 10 mg/L de téfluthrine	520.71 ± 6.56	10.50 ± 0.33	1.56	- 26.08	19.14	6.08	17.00	32.47	35.61	50.92

% IP<sub>m</sub> : % d'inhibition du poids moyen,

% ID<sub>m</sub> : % d'inhibition du diamètre moyen.

#### 4. Discussion

Ce bio-essai s'inscrit dans la continuité des expériences présentées et vise à déterminer les effets sur la survie et la croissance des escargots juvéniles exposés au thiaméthoxam, à la téfluthrine et à leurs mixtures.

La faible mortalité des escargots observée dans cette étude (19.05 %) est supérieur à celle (5%) observée dans l'expérience de Gomot (1997), celle (4.3 %) de Scheiffler *et al.* (2002), et enfin celle (3 à 7 %) de Viard *et al.* (2004).

Durant cette étude, l'humidité relative et la température n'étaient pas des facteurs limitant vis-à-vis de la croissance des escargots juvéniles. Cependant, plusieurs auteurs comme Gomot (1994) ou Jess et Marks (1998) ont montré que les températures supérieures à 15°C stimulent la croissance avec un optimum de croissance à 23°C. Cependant, la qualité de la nourriture semble jouer un rôle primordial (Scheiffler *et al.*, 2002; Viard et Pihan, 2004)

dans la croissance des escargots. Ainsi, dans cette expérience, les escargots témoins nourris avec les feuilles de laitue fraîche ont montré un facteur de croissance (2.04) supérieur à celui des escargots juvéniles des travaux antérieurs (Viard et Pihan, 2004) nourris également de feuilles de laitue fraîche (1.26), et inférieur à celui des escargots nourris de farine (5.25), ou encore avec la combinaison farine et laitue (6.92), ou la combinaison farine et feuilles de trèfle (6.41), ou enfin, la combinaison farine plus feuilles de laitue et feuilles de trèfle (6.91).

Les effets induits sur la croissance (poids et diamètre coquillère moyens) par les deux concentrations de thiaméthoxam augmentent en fonction du temps d'une façon dose-dépendante. L'accroissement de la toxicité des deux insecticides avec le temps n'est cependant pas similaire. Une rapide récupération de la croissance (poids moyen) des juvéniles après la troisième semaine de traitement à la concentration 10 mg/L de téfluthrine a été observée jusqu'à la cinquième semaine de traitement, et un freinage dès la sixième semaine jusqu'à la fin du traitement. Ceci suggère un effet réversible possible de la téfluthrine vis-à-vis de la croissance par rapport à celui du thiaméthoxam qui semble être irréversible. Ainsi, Bluzat et Seugé (1979) ont fait les mêmes constatations avec le lindane. Ils ont rapporté que cet insecticide avait un caractère réversible vis-à-vis de la croissance et de la minéralisation coquillère. Cependant, les juvéniles de *Helix aspersa* semblent, d'une part, plus sensibles au traitement par les deux insecticides, chacun à part, que par les mixtures. D'autre part, les escargots juvéniles semblent plus sensibles au traitement à la M1 qu'à la M2. Ces résultats suggèrent que les mixtures soient moins toxiques vis-à-vis de la croissance des juvéniles que les insecticides pris à part.

Ces données reflètent le déclin de la croissance des escargots (masse et diamètre coquillère) sous l'effet de tous les traitements. La réduction significative de la croissance des juvéniles exposés au thiaméthoxam, à la téfluthrine et à leurs mixtures peut s'expliquer par une réduction des réserves énergétiques, allouées à la croissance (contenus en lipide et en glucides) dans les cellules de stockage des tissus des escargots, cette réduction est probablement provoquée par la mobilisation de ces ressources pour l'initiation des processus de détoxification.

La réduction de la croissance pondérale notée dans les groupes d'escargots traités par le thiaméthoxam et la téfluthrine et les mixtures comparés aux escargots du groupe témoin est en parfait accord avec les résultats de Coeurdassier *et al.* (2001), Seugé et Bluzat (1980) et Schuytema *et al.* (1994). En effet, Schuytema *et al.* (1994), ont rapporté que la réduction significative ( $p \leq 0.05$ ) du poids et du diamètre coquillère des escargots traités avec l'Aminocarbe, le Méthyl parathion et le Paraquat est liée à la nature et à la dose du pesticide

administré. De plus, l'ensemble des résultats semble indiquer que la réduction de la croissance est liée au mode (Salama *et al.*, 2005; Radwan *et al.*, 2008) et à la durée d'exposition à un pesticide (Rorke *et al.*, 1974; Seugé et Bluzat, 1980; Coeurdassier *et al.*, 2001) testé. D'autre part, Bluzat et Seugé (1979) ont montré chez le mollusque *Lymnea stagnalis* que le Carbaryl et le Lindane provoquent dans le cas d'une intoxication chronique, une diminution de la croissance des coquilles.

Aussi, les effets des pesticides diffèrent selon les espèces de gastéropodes traités. Ainsi, Genena et Mostafa (2008) ont constaté une large différence de sensibilité aux pesticides entre deux genres d'escargots *Monacha cantiana* et *Eobania vermiculata*. Judge (1969) avait fait les mêmes constatations entre deux espèces de limaces du genre *Deroceras* traitées par les mêmes molluscicides.

D'un autre côté, la différence de croissance observée entre les deux insecticides pourrait être attribuée à la structure chimique de la matière active des insecticides (Oliveira-Filho *et al.*, 2005; Druart *et al.*, 2010) et (ou) notamment de leurs adjuvants consécutifs. Cependant, les données toxicologiques sur les adjuvants sont rares, pour argumenter les effets possibles d'un pesticide (matière active et adjuvant) donné. Cette différence de croissance peut être attribuée également à la différence de solubilité des molécules testées et des mixtures, leurs affinités vis-à-vis des différentes cibles biologiques ou à d'autres facteurs ignorés jusqu'à présent chez les gastéropodes.

En se basant sur le pourcentage d'inhibition du poids moyen (Tab. 8) et au bout de 8 semaines de traitement, la toxicité des insecticides décroît dans l'ordre suivant : Th2 (69%) > Te1 (65.36%) > M1 (63.17%) > Te2 (45.89%) > Th1 (42.50%) > M2 (35.61%). D'autre part, en se basant sur le pourcentage d'inhibition du diamètre coquillière moyen, le classement était comme suit : Te1 (68.26%) > Th2 (67.71%) > Te2 (60.88%) > M1 (57.56%) > M2 (50.92%) > Th1 (42.61%).

## 5. Conclusion

Les interrogations sur les conséquences environnementales des pesticides nécessitent le développement de méthodes adaptées pour l'analyse de leurs effets sur les invertébrés terrestres, notamment sur l'escargot *Helix aspersa*. La sensibilité du modèle aux deux insecticides et leurs mixtures montre bien leur action, plus ou moins importante sur les paramètres cinétiques étudiés : le poids et le diamètre coquillière.

Il serait intéressant de détecter la présence des deux insecticides dans les tissus des escargots exposés en continu aux plus fortes concentrations dans la nourriture. Les résultats peuvent indiquer, par la suite, les effets des insecticides à des concentrations représentatives de l'environnement, cependant, la détection de résidus dans les tissus peut présenter un risque potentiel de transfert dans la chaîne alimentaire. Ce bio-essai de toxicité subchronique peut compléter le panel des tests déjà réalisés pour évaluer la toxicité des contaminants dans le sol, et plus particulièrement des pesticides.

Cette expérience présente un apport de recherche sur l'exposition subchronique des escargots à des niveaux faibles de contaminations par les insecticides et sous des conditions de laboratoire. Cette approche toxicodynamique globale, a mis en évidence une inhibition de croissance chez les escargots exposés à la laitue contaminée par deux insecticides et leurs mixtures, appartenant à deux classes de composés sur une espèce d'invertébré du sol, *Helix aspersa*, susceptible d'être utilisée comme bioindicateur de pollution des sols, d'abord aux différents pesticides actuellement présents dans l'environnement, ensuite et par référence à ces résultats, à d'autres xénobiotiques plus récemment utilisés et faisant l'objet d'une évaluation des risques qu'ils pourraient engendrer aux écosystèmes terrestres.

*CONCLUSION GENERALE*  
*ET PERSPECTIVES*

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les pesticides sont des produits chimiques de nature organique ou métallique qui sont actuellement présents sous forme de résidus dans tous les compartiments de l'environnement. Bien que des solutions alternatives à leur utilisation intensive soient en développement (cultures biologiques, plantes OGM, « vaccination » des plantes grâce à l'application de stimulateurs de défenses naturelles...), elles ne remplaceront probablement pas, ni dans l'immédiat ni totalement, les applications de pesticides. Le problème de la contamination se pose donc encore pour de nombreuses années. Le nombre de molécules disponibles sur le marché étant considérable, toutes ne font pas l'objet d'une évaluation approfondie. Aussi, de nombreuses données manquent sur les quantités résiduelles réellement présentes dans les différents milieux, sur leur comportement et leur devenir dans ces compartiments et sur leur devenir et leur toxicité pour les organismes.

Ainsi, le principal objectif de notre travail de thèse était d'étudier les effets de deux insecticides, le thiaméthoxam (néonicotinoïde) et la téfluthrine (pyréthrianoïde) et de leurs mixtures appliquées par voie orale, à des concentrations inférieures ou égales de celles recommandées pour l'épandage en champ, sur l'escargot terrestre *Helix aspersa*, utilisé comme espèce bioindicatrice de la contamination des sols. Les expérimentations ont été menées sur le comportement, certains paramètres morphométriques, la biochimie de l'hépatopancréas, la mesure de quelques biomarqueurs du stress oxydant (AChE, GST, CAT et GTH), et la croissance des juvéniles.

En conclusion, l'ensemble de ces bioessais ne permet pas de répondre de façon définitive à la question de savoir si l'exposition des escargots à un mélange de pesticides reflète nécessairement les effets des substances prises individuellement. Cependant, elles montrent qu'il est important d'apporter un éclairage à cette question.

Les insecticides testés et leurs mixtures entraînent des altérations comportementales, comme la diminution de l'activité et de la prise alimentaire aux plus fortes concentrations. Ainsi, ces molécules perturbent les performances individuelles en modifiant l'acquisition de l'énergie. En plus, ces altérations comportementales sont accompagnées par une réduction significative des paramètres physiologiques tels que le poids frais moyen des escargots, le poids frais moyen de l'hépatopancréas et celui de la coquille. Ces perturbations

physiologiques peuvent entraîner, par conséquent, des effets délétères sur la reproduction pouvant concerner des perturbations de la gamétogenèse, du développement des organes reproducteurs, ou encore du développement embryonnaire. Les mécanismes biochimiques et physiologiques responsables de tels effets restent à identifier.

D'un autre côté, la composition biochimique de l'hépatopancréas est également affectée par les insecticides testés, avec une baisse significative des protéines, des glucides et des lipides. Cependant, la téfluthrine semble avoir des effets plus marqués sur les différents métabolites dosés.

En plus, le thiaméthoxam, la téfluthrine et leurs mixtures exercent une action neurotoxique chez les adultes de *Helix aspersa* se traduisant par une inhibition de l'activité AChE. Toutefois, la téfluthrine semble être plus toxique que le thiaméthoxam et les mixtures. Ces perturbations nerveuses peuvent expliquer, au moins en partie, les diminutions observées de la durée des prises alimentaires et de la quantité d'aliment ingéré. Les deux insecticides et leurs mixtures induisent également le système de détoxification par le biais d'une augmentation des activités de la GST et celle de la CAT et une diminution du taux de GTH. Ses modifications sont probablement liées à une augmentation de la libération d'espèces réactives de l'oxygène en présence des insecticides.

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

Enfin, l'inhibition de la croissance des juvéniles de *Helix aspersa* induite par les effets des deux molécules et leurs mixtures peut résulter de troubles métaboliques, comportementaux ou de perturbations du contrôle neuroendocrine, d'autant plus que les deux insecticides ont montré des effets neurotoxiques chez les adultes de ce gastéropode.

Une des principales limites de nos études est l'état plutôt descriptif des résultats, lié pour beaucoup, au temps qui nous était imparti, 4 années, pour mettre en place, au laboratoire, la démarche conceptuelle ainsi que les approches techniques pour la développer. Nous avons encore besoin de temps pour explorer différentes pistes de recherche qui nous permettront de mieux évaluer et expliquer les phénomènes observés pendant ces 4 années. Les perspectives de ces travaux sont donc nombreuses et concernent les points suivants :

- Le mécanisme d'action de la toxicité cellulaire : bien que les méthodes utilisées aient permis l'observation d'un effet dû à l'exposition aux insecticides, elles ne renseignent pas de façon rigoureuse sur le mécanisme d'action de ces substances ni sur la nature

de ces effets c'est-à-dire par exemple les cibles affectées (ADN, protéines ou voies de signalisation, ...), ni sur la gravité des effets (réversibilité, adaptabilité cellulaire). Ainsi, il serait nécessaire d'aborder d'autres approches afin de mieux comprendre l'effet des insecticides testés. Il serait également intéressant de tester des cocktails sur d'autres espèces de gastéropodes ou d'autres invertébrés terrestres possédant des capacités métaboliques différentes et faire la relation métabolisme/effets.

- Le mécanisme d'action moléculaire des insecticides : il serait intéressant de prolonger la durée d'exposition des animaux afin de savoir si les perturbations fonctionnelles observées pourraient aboutir à l'apparition d'une pathologie moléculaire au niveau des cellules hépatiques et/ou des autres tissus. En parallèle, des études plus approfondies (étude de génotoxicité, comme par exemple l'utilisation d'un test de «comet» pour la recherche d'un dommage à l'ADN) permettront de savoir si une atteinte de l'ADN serait déclenchée suite à l'exposition aux insecticides chacun à part, ou suite à l'exposition aux mélanges.
- Quelques études ont montré des différences de toxicité entre substances actives et formulations commerciales. L'évaluation du risque ne prend pas toujours en compte les interactions entre substances actives dans un même produit, entre substance(s) active(s) et adjuvant(s) pour la fabrication d'un produit ou entre produits phytosanitaires qui vont être appliqués en même temps sur la parcelle ou à courts intervalles de temps. En effet, s'il peut y avoir simple additivité de la toxicité de chaque substance, il peut également y avoir antagonisme (toxicité moindre par rapport à une simple additivité attendue) ou synergie (toxicité supérieure par rapport à une simple additivité attendue). C'est donc une perspective d'analyses complémentaires qui doit être prévue pour une évaluation objective des risques.
- La présence des insecticides dans les différents organes : plusieurs questions sont posées. Les insecticides administrés par voie orale parviennent-ils aux autres systèmes en plus du système digestif et nerveux ? Sous quelle (s) forme (s) ? Y sont-ils stockés et/ou métabolisés et comment agissent-ils à ce niveau ? Pour répondre à ces questions, il serait intéressant d'essayer de doser les insecticides ou leurs métabolites, d'abord dans l'hépatopancréas et le cerveau, et d'y déterminer la présence éventuelle de

métabolites. Ceci nous permettra également de savoir si l'effet observé est attribuable à l'ensemble des deux composés ou à une substance spécifique.

- Le développement d'approches complémentaires : il existe peu d'études rapportant les effets des molécules étudiées dans cette thèse en conditions *in situ* sur les animaux. Il serait intéressant de préconiser le développement d'études sur le terrain en conditions réelles d'application dans le cadre d'une démarche d'évaluation du risque pour compléter la démarche effectuée au laboratoire.
- L'estimation de l'exposition par voie topique : il serait intéressant de tester les insecticides et leurs mélanges par application topique pour établir une étude comparative avec la voie orale.
- L'association des pesticides à d'autres contaminants de l'environnement : outre la grande variété de mélanges de résidus de pesticides présents dans le sol, pouvant changer quantitativement et qualitativement dans le temps, la possibilité de présence d'autres contaminants de l'environnement rend le phénomène plus difficile à étudier; ces contaminants pouvant interagir avec les pesticides en augmentant ou diminuant leur toxicité et inversement. Il est par conséquent très difficile d'établir le mélange « parfait » qui présentera d'une façon complète l'exposition réelle des escargots via l'alimentation. L'association avec des contaminants environnementaux serait donc indispensable pour mimer au mieux l'exposition réelle et prévoir les risques réels.

Dans l'état actuel de nos connaissances, si les indicateurs écologiques ou biologiques sont largement utilisés, l'emploi des biomarqueurs dans la surveillance de l'environnement est encore limité à certains types de pollution bien précis. Mais si nous admettons qu'un effet toxique est toujours lié à une expression biochimique, physiologique ou anatomique chez les êtres vivants, nous pouvons envisager le développement dans le futur d'autres indicateurs biologiques et élargir ainsi le spectre des contaminations décelées.

Au cours de ces années de thèse, nous avons pu par des approches expérimentales aborder la problématique des effets des mélanges de pesticides. Nous avons montré que certains mélanges d'insecticides à des faibles doses sont capables d'exercer des effets au niveau individuel chez *Helix aspersa*. Cependant, les résultats de ces études ne peuvent être

généralisés ni à d'autres invertébrés, ni à l'ensemble des molécules (pesticides et autres contaminants) présents dans l'environnement. D'autres études seront donc nécessaires pour confirmer les hypothèses soulevées au cours de nos travaux.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACTA, 2005. Index Phytosanitaire ACTA 2005. 41<sup>ème</sup> éd. Paris. *Association de Coordination Technique Agricole*. France. 820 p.
- Adam V., Petrlovà J., Potesil D., Lubal P., Zehnàlek J., Sures B; Kizek R., 2005. New electrochemical biosensor to determine platinum cytostatic to DNA structure. *Chemistry Listy*. 99: 353-393.
- Adams S.M., Crumby W.D., Greeley M.S., Shugart L.R., Saylor C.F., 1992. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 24: 347-60.
- Adams S.M., Shugart L., Southworth G.R., Hinton D.E., 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: *Biomarkers of environmental contamination* (eds. McCarthy J. F., Shugart L. R.). Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton. 333-353.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 2007. Rapport d'évaluation du thiaméthoxam - ERC2007-01. Santé Canada, CANADA. 105 p.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 2010. Rapport d'évaluation de la téfluthrine - PRVD2010-01. Santé Canada, CANADA. 129 p.
- Aliouane Y., El Hassani AK., Gary V., Armengaud C., Lambin M., Gauthier M., 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behaviour. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28(1): 113–122.
- Alout H., Berthomieu A., Hadjivassilis A., Weill M., 2007. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37(1): 41-47.
- Amiard J.C., Métayer C., Baud J.P., Ribeyre F., 1994. Influence of some ecological and biological factors on metal bio-accumulation in young oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg) during their spat rearing. *Water Research*. 28: 219-231.
- 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.
- Arrigo A.P., 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biology & Medicine*. 27: 936-944.

- Atchinson G.J., Sandheinrich M.B., Bryan M.D., 1996. Effects of environmental stressors on interspecific interactions of aquatic animals. In *Ecotoxicology: a Hierarchical Treatment* (eds. M.C. Newman et C.H. Jagoe), Lewis, Boca Raton. 319-346.
- Baldi I., Lebailly P., Jean S., Rougetet L., Dulaurent S., Marquet P., 2006. Pesticide contamination of workers in vineyards in France. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. 16(2): 115-124.
- Balint T., Szegletes T., Szegletes Zs., Halasy K., Nemcsok J., 1995. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidation and the pyrethroid deltamethrin. *Aquatic Toxicology*. 33: 279-295.
- Barker G.M., 2001. *The Biology of terrestrial molluscs*. Wallingford U.K, C.A.B. International. 558 p.
- Barker G.M., 2004. *Natural enemies of terrestrial mollusks*. Wallingford, UK, CABI Publishing, p. 644.
- Barraclough D., Kearney T., Croxford A., 2005. Bound residues: environmental solution or future problem? *Environmental Pollution*. 133(1): 85-90.
- Baturo W., Lagadic L., Caquet T., 1995. Growth, fecundity and glycogen utilization in *Lymnaea palustris* (Mollusca: Gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14: 503-511.
- Beaumont A., Cassier P., 1998. *Travaux pratiques de biologie animale. Zoologie Embryologie Histologie*, Dunod, Paris. 502p.
- Beeby A., Richmond L., 1988. Variation in the mineral composition of eggs of snail, *Helix aspersa* between populations exposed to different levels of metal contamination. *Environmental Pollution*. 101: 25-31.
- Beeby A., Richmond L., 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators*. 1(4): 261-270.
- Bingham G., Gunning R.V., Delogu G., Borzatta V., Field L.M., Moores G.D., 2008. Temporal synergism can enhance carbamate and neonicotinoid insecticidal activity against resistant crop pests. *Pest Management Science*. 64: 81-85.
- Blanchoud H., Farrugia F., Mouchel J.M., 2004. Pesticide uses and transfers in urbanised catchments. *Chemosphere*. 55(6): 905-913.
- Blanchoud H., Garban B., Ollivon D., Chevreuil M., 2002. Herbicides and nitrogen in precipitation : progression from west to east and contribution to the Marne river (France). *Chemosphere*. 47(9): 1025-1031.

- Bloomquist J.R. Insecticides : chemistries and characteristics. In: E. B. Radcliffe and W. D. Hutchison [eds.], Radcliffe's IPM World Textbook. [consulté le, 10/10/2011].  
<http://ipmworld.umn.edu>, University of Minnesota, St. Paul, MN, 1996.
- Bluzat R., Seugé J., 1979. Etude de la toxicité chronique de deux insecticides (Carbaryl et Lindane) à la génération F1 de *Lymnea stagnalis* L. (Mollusque Gastéropode pulmoné). 1. Croissance des coquilles. *Hydrobiology*. 65(3): 245-255.
- Bocquené G., 1996. L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. *Thèse de Doctorat, Ecole Pratique des Hautes Etudes*. 250 p.
- Bocquené G., Galgani F., 1998. Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds. *Techniques in Marine Environmental Science*. 22: 1-12.
- Bonmatin J.-M., Moineau I., Lecoublet S., 2001. Neurotoxiques systémiques : biodisponibilité, toxicité, et risque pour les insectes pollinisateurs. «Le cas de l'imidaclopride». In : Produits phytosanitaires : analyse, résidus, métabolites, écotoxicologie, modes d'action, transfert. Couderchet M., Eulaffroy P., Vernet G. Eds. Presses Universitaires de Reims. 175-181.
- Bouvier G., Blanchard O., Momas I., Seta N., 2006. Environmental and biological monitoring of exposure to organophosphorus pesticides : application to occupationally and non-occupationally exposed adult populations. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. 16(5): 417-426.
- Bouziani M., 2007. L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de médecine et de la santé. *Santémaghreb*. [consulté le, 11/12/2011].  
<http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm>.
- 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.
- Braunbeck T., 1998. Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics - structural biomarkers of environmental contamination. In: *Fish Ecotoxicology* (eds. Braunbeck T., Hinton D. E., Streit B.). Birkhäuser Verlag, Berlin. 61-140.
- Braunbeck T., Völkl A., 1993. Toxicant-induced cytological alterations in fish liver as biomarkers of environmental pollution? A case study on hepatocellular effects of dinitro-*o*-cresol in golden ide. In: *Fish: ecotoxicology and ecophysiology* (eds.

- Braunbeck T., Hanke W., Segner H.), Weinheim ; New York ; Basel ; Cambridge: VCH. 55-80.
- Bride J., 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.
- Brown L.A., Ihara M., Buckingham S.D., Matsuda K., Sattelle D.B., 2006. Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemistry*. 99: 608-15.
- Brown P.J., Long S.M., Spurgeon D.J., Svendsen C., Hankard P.K., 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a noncarcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*. 57: 1675-1681.
- Buckingham S.D., Lapied B., Le Corrionc H., 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *The Journal of Experimental Biology*. 200: 2685-2692.
- Callec J.-J., Hue B., Callec M., 1986. Le neurone, cible potentielle pour les insecticides. In : Insectes, insecticides, santé. Colloque national mode d'action et utilisation des insecticides. Angers, 19-22 novembre 1985. Paris : ACTA. 93-108.
- Calow P., Sibly R.M., 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Functional Ecology*. 4: 283-288.
- Caquet T., Lagadic L., 1998. Conséquences d'atteintes individuelles précoces sur la dynamique des populations et la structuration des communautés et des écosystèmes. In Utilisation de Biomarqueurs pour la Surveillance de la Qualité de l'Environnement (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard et F. Ramade), Lavoisier TEC & DOC, Paris. 265-298.
- 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.
- Carpy S.A., Kobel W., Doe J., 2000. Health risk of low-dose pesticides mixtures: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. 3(1): 1-25.
- Cassaneli S., Reyes M., Rault M., Manicardi G.C., Sauphanon B., 2006. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide resistant population of the godling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36: 642-653.
- CEC, 2002. Making the environment Healthier for Our Kids - An overview of environmental challenges to the health of North America's children.

- CEC, 2003. A european environment and health strategy. *Commission of the European community*.
- Chabicoovsky M., Klepal W., Dallinger R., 2004. Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates programmed cell death and metallothionein overload. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23: 648-655.
- Chaignon V., Sanchez-Neira I., Herrmann P., Jaillard B., Hinsinger P., 2003. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution*. 123(2): 229-238.
- Charvet R., Katouzian-Safadi M., Colin M.-E., Marchand P.-A., Bonmatin J.-M., 2004. Insecticides systémiques de nouveaux risques pour les insectes pollinisateurs. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 62: 29-35.
- Cheung C.C.C., Zheng G.J., Lam P.K.S., Richardson B.J., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*. 45: 1-2, 181-191.
- Chevallier H., 1992. L'élevage des Escargots. *Production et Préparation du Petit-Gris*. 2<sup>ème</sup> édition. Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort. Paris. 144 p.
- Chevalier L., Desbuquois C., Le Lannic J., 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., Badot P.M., 2000. Dose- dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa aspersa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 2571-2578.
- Coeurdassier M., Gomot de Vaufleury A., Saint-Denis M., Ribera D., Narbonne J.F., Badot P.M., 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.
- Colin F., 2000. Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires. Cas de l'Atrazine dans le bassin versant de Sousson (Gers, France). *Unité mixte Cemagref-ENGREF. Structure des systèmes spatiaux*. 233 p.

- Commission of the European Communities, 2007. Monitoring of pesticides residues in products of plant origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein 2005.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A., Vasseur P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38: 122-131.
- CPP, 2002. Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. *Comité de la Prévention et de la Protection*. 47 p.
- Dallinger R., Berger B., Triebkorn-Köhler R., Köhler H., 2001. Soil biology and ecotoxicology. *The biology of terrestrial molluscs*. Barker G.M. Oxon, CABI: 489-525.
- Dallinger R., Wieser W., 1984. Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 79 (1): 117-124.
- Datta M., Kaviraj A., 2003. Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to freshwater catfish *Clarias gariepinus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 70 (2): 296-299.
- Delorme R., 2002. Les insecticides systémiques en protection des plantes. In : AFSSA (Ed.). Analyse des phénomènes d'affaiblissement des colonies d'abeilles. Paris, 64-68. [consulté le, 05/02/2011 en ligne].  
<http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/comptenduabeille.pdf>.
- Devare M., Londono-R L.M., Thies J.E., 2007. Neither transgenic Bt maize (MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affect soil microbial activity or biomass: A 3-year field analysis. *Soil Biology & Biochemistry*. 39: 2038-2047.
- de Vaufléury A., Cœurassier M., Pandard P., Scheifler R., Lovy C., Crini N., Badot P.-M., 2006. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soil ? *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25: 797-806.
- Dévier M.H., Augagneur S., Budzinski H., Mora P., Narbonne J. F., Garrigues P., 2003. Microcosm TBT bioaccumulation and multi-biomarker assessment in the blue mussel *Mytilus* sp. *Environmental Toxicology and Chemistry*, in press.
- Di Giulio R.T., Habig C., Gallagher E.P., 1993. Effects of black rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology*. 26: 1-22.

- Drechsel D.A., Patel M., 2008. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 44(11): 1873-1886.
- Droge W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82: 47-95.
- Druart C., Scheifler R., de Vaufleury A., 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. *Journal of Hazardous Materials*. 184(1-3): 26-33.
- Duchateau Gh., Florkin M., 1959. Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. 67(2): 306-314.
- Eells J.T., Rasmussen J.L., Bandettini P.A., Propp J.M., 1993. Differences in the neuroexcitatory actions of pyrethroid insecticides and sodium channel-specific neurotoxins in rat and trout brain synaptosomes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 123: 107-119.
- Eeva T., Rainio K., Suominen O., 2010. Effects of pollution on land snail abundance, size and diversity as resources for pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*. *Science of the Total Environment*. 408 (19): 4165-4169.
- Eissa S.H., Rizk E.T., Abou-Shafey A.E., Mona M.H., Atlum A., 2002. Toxicological effect on *Euphorbia peplus* water suspension on hemocytes of the fresh water snails, *Biomphalaria alexandrina* and *Lanistes carinatus*. *Proc LCBS*. 2: 417-447.
- El-Emam M.A., Ebeid F.A., 1989. Effect of *Schistosoma mansoni* infection, starvation and molluscicides on acid phosphate transaminases and total protein in tissues and hemolymph of *Biomphalaria alexandrina*. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*. 19(1): 139-147.
- El-Gendy K.S., Aly N.M., Mahmoud F.H., Kenawy A., El-Sebae A.K.H., 2010. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 215-221.
- 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.
- 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-Saadany M.M., Mohamed A.M., Hanna M.Y., Mersal H., 1994. Effect of starvation on the glycogen content and total protein in relation to gametogenesis in the land snail *Eobania vermiculata*. *Journal of Egyptian German Society of Zoology*. 13: 267-282.
- El-Wakil H.B., Attia A.M., 1999. Effect of selected insecticides on terrestrial snails *Eobania vermiculata* (Müller) and *Theba pisana* (Müller) with respect to some morphological changes in Egypt. *Journal of Environmental Sciences and Health B*. 34: 47-60.
- El-Wakil H.B., Radwan M.A., 1991. Biochemical studies on the terrestrial snail *Eobania vermiculata* (Müller) and *Thebapisana* ((Müller) treated with some pesticides. *Journal of Environmental Science Health*. B34: 47-60.
- European Commission, 2010. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document N° SANCO/10684/2009. [consulté le, 13/05/2011].  
[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf)
- Farahat T.M., Abdelrasoul G.M., Amr M.M., Shebl M.M., Farahat F.M., Anger W.K., 2003. Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. *Occupational and Environmental Medicine*. 60: 279-86.
- Fitzpatrick P.J., O'Halloran J., Sheehan D., Walsh A.R., 1997. Assessment of glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*. 2: 51-56.
- Forbes T.L., Kure L.K., 1996. The role of pore water versus ingested sediments in the bioavailability of organic contaminants in marine sediments. In: *Bioavailability as a Key Property in Terrestrial Ecotoxicity Assessment and Evaluation*, Fraunhofer IRB Verlag, Schmallenberg. 55-69.
- Forbes V.A., Forbes T.L., Rivière J.-L., 1997. *Écotoxicologie: théorie et applications*. Editions Quae, Paris. 424 p.
- Forbes, V.E., Depledge M.H., 1992. Cadmium effects on the carbon and energy balance of mud snails. *Marine Biology*. 113: 263-269.
- Forbes V.E., Forbes T.L., 1994. *Ecotoxicology in Theory and Practice*. Chapman & Hall, London. 242 p.
- Fortin M.C., Bouchard M., Carrier G., Dumas P., 2008. Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. *Environmental Research*. 107: 343-350.

- Fränze O., 2006. Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecological Indicators*. 6(1): 114-136.
- Frias-Espericueta M.G., Abad-Rosales S., Aidée C.N.V., Isidro-Osuna L., Pàez-Osuna F., Olvera R.L., Voltolina D., 2008. Histological effects of a combination of heavy metals on pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquatic Toxicology*. 89: 152-157.
- Gabe M., 1968. Techniques histologiques, Masson et Cie Editeurs, Paris., 1113 p.
- Gagné F., Blaise C., Pellerin J., Pelletier E., Strand J., 2006. Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive periode. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64: 348-361.
- Gambi N., Pasteris A., Fabbri E., 2007. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C. 145: 678-685.
- Genena M.A.M., Mostafa F.A.M., 2008. Molluscicidal activity of six pesticides against the two land snails, *Monacha cantiana* and *Eobania vermiculata* (Gastropoda : Helicidae) under laboratory conditions. *Journal of Agricultural Sciences of Mansoura University*. 33(7): 5307-5315.
- Gerecke A.C., Scharer M., Singer H. P., Muller S.R., Schwarzenbach R.P., Sagesser M., Ochsenbein U., Popow G., 2002. Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants-current situation and reduction potential. *Chemosphere*. 48(3): 307-315.
- Gernhöfer M., Pawert M., Schramm M., Müller E., Triebkorn R., 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 8: 241-260.
- 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.
- Glickman A.H., Lech J.J., 1982. Differential toxicity of transper-methrin in rainbow trout and mice. II. Role of target organ sensitivity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 66: 162-171.
- Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J., 1972. Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*. 18: 545-551.

- 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 A., 1997a. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 33: 209-216.
- Gomot A., Gomot L., Boukraa S., Bruckert S., 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa* - an experimental study of the absorption route for the stimulating factors. *Journal of Molluscan Studies*. 55: 1-7.
- Gomot-de Vaufleury A., 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 46: 41-50.
- Gomot-de Vaufleury A., 2001. Regulation of growth and reproduction. *The biology of terrestrial molluscs*. Barker GM. Oxon, CABI: 331-355.
- 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.
- 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.](#)
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974. Glutathione *S*-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249: 7130-7139.
- Hamed S.S., Abdelmeguid N.E., Essawy A.E., Radwan M.A., Hegazy A.E., 2007. Histological and Ultrastructural Changes Induced by Two Carbamate Molluscides on the digestive Gland of *Eobania vermiculata*. *Journal of Biological Sciences*. 7(6): 1017-1037.
- Handy R., Depledge M.H., 1999. Physiological responses: their measurement and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotoxicology*. 8: 329-349.
- Heiba F.N., 1988. Effect of starvation on reproduction of the land snail *Theba pisana*. *Journal of Egyptian German Society of Zoology*. 25: 63-76.
- Heller J., Magaritz M., 1983. From where do land snails obtain the chemicals to build their shells? *Journal of Molluscan Studies*. 49: 116-121.

- Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.-F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S., Decourtye A., 2012. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science*. 336(6079): 348-350.
- 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.
- Hill I.R., 1989. Aquatic organisms and pyrethroids. *Pesticides Sciences*. 27: 429-465.
- Hoang T.C., Rogevich E.C., Rand G.M., Gardinali P.R., Frakes R.A., Bargar T.A., 2008. Copper desorption in flooded agricultural soils and toxicity to the Florida apple snail (*Pomacea paludosa*): Implications in Everglades restoration. *Environmental Pollution*. 154 (2): 338-347.
- Ian Spencer C., James S. K., 2005. Mechanisms Underlying the Effects of the Pyrethroid Tefluthrin on Action Potential Duration in Isolated Rat Ventricular Myocytes. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 315: 16-23.
- INERIS, 2005. Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation. *Institut national de l'environnement industriel et des risques*. [consulté le, 04/05/2011].  
[http://www.ineris.fr/centredoc/rap\\_restitution\\_sphair\\_1\\_2.pdf](http://www.ineris.fr/centredoc/rap_restitution_sphair_1_2.pdf).
- Ippolito A., Carolli M., Varolo E., Villa S., Vighi M., 2012. Evaluating pesticide effects on freshwater invertebrate communities in alpine environment: a model ecosystem experiment. *Ecotoxicology*. 21: 2051-2067.
- Irlande M.P., 1991. The effect of dietary calcium on growth, shell thickness and tissue calcium distribution in the snail *Achatina fulica*. *Comparative biochemistry and Physiology*. 98 A: 111-116.
- Ishaaya I., 2001. Biochemical sites of insecticide action and resistance. Springer – Verlag Berlin Heidelberg. 283-321.
- ISO 11267, 1999. Qualité du sol - Inhibition de la reproduction de *Collembola (Folsomia candida)* par des polluants du sol.
- ISO 11268-2, 1998. Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) - Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction.
- ISO 15952, 2006. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae), Determination of the effects on growth by soil contamination, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

- ISO 16387, 1998. Qualité du sol - Effets des polluants sur *les Enchytraeidae (Enchytraeus sp.)* - Détermination des effets sur la reproduction et la survie.
- Ito N., Hagiwara A., Tamano S., Hasegawa R., Imaida K., Hirose M., Shirai T., 1995. Lack of carcinogenicity of pesticide mixtures administered in the diet at acceptable daily intake (ADI) dose levels in rats. *Toxicology Letters*. 82-83, 513-520.
- Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe M.R., 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*. 23: 371-378.
- Jakubowski M., Trzcinka-Ochocka M., 2005. Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *Journal of Occupation Health*. 47(1): 22-48.
- Jess S., Marks R.J., 1998. Effect of temperature and photoperiod on growth and reproduction of *Helix aspersa* var. *maxima*. *Journal of Agricultural Sciences*. 130: 367-372.
- Jonnalagadda P.R., Rao M.B., 1996. Histopathological Changes Induced by Specific Pesticides on Some Tissues of the Fresh Water Snail, *Bellamya dissimilis* Müller. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 57: 648-654.
- Jordaens K., Wolf H., Vandecasteele B., Blust R., Backeljau T., 2006. Associations between shell strength, shell morphology and heavy metals in the land snail *Cepaea nemoralis* (Gastropoda, Helicidae). *Science of the Total Environmental*. 363: 285-293.
- Judge F.D., 1969. Preliminary screening of candidate molluscicides. *Journal Econ Entomology*. 62: 1393-1397.
- Jumel A., Gaboriau G., Lagadic L., 2000. Mixture toxicity of fomesafen and nonylphenol polyethoxylates on the reproduction of the pond snail *Lymnaea stagnalis*: preliminary results in laboratory and in mesocosms. *Eurotox Congress*. Londres, Angleterre.
- Jumel A., Lagadic L., 2000. Metabolism of polysaccharides in *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) exposed to 4-nonylphenol and nonylphenol dodecylethoxylate in mesocosms. *Third SETAC World Congress. Global Environmental Issues in the 21th Century: Problems, Causes and Solutions*. Brighton, Angleterre.
- Kappus H., 1987. Oxidative stress in chemical toxicity. *Archives of Toxicology*. 60: 144-149.
- Kerney M., Cameron R., Bertrand A., 2006. A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, Delachaux et Niestlé SA. 97 p.
- Kiss T., 1988. Properties of Na channels in identified snail (*Helix pomatia* L.) neurones modified by deltaméthrin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 32: 247-252.

- Kizek R., Vacek J., Trnková L., Jelen F., 2004. Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris (2-carboxyethyl) phosphine. *Bioelectrochemistry*. 63: 19-24.
- Köhler H.-R., Belitz B., Eckwert H., Adam R., Rahman B. et Trontelj P., 1998. Validation of *hsp70* stress gene expression as a marker of metal effects in *Deroceras reticulatum* (Pulmonata): correlation with demographic parameters. *Environ Toxicol Chem*. 17: 2246-2253.
- Kontreczky C.S., Farkas A., Nemcsok J., Salanki J., 1997. Short and long-term effects of deltamethrin on filtering activity of freshwater mussel (*Anodonta cygnea* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38: 195-199.
- Koprucua K., Aydın R., 2004. The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 80: 47-53.
- Kortenkamp A., Faust M., Scholze M., Backhaus T., 2007. Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environmental Health Perspectives*. 1: 106-114.
- Labrot F., Ribera D., Saint-Denis M., Narbonne J.F., 1996. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*. 1: 21-28.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Collection Écologie, Masson, Paris, 419 p.
- Laguerre C., Sanchez-Hernandez J.C., Köhler H.R., Triebkorn R., Capowiez Y., Rault M., Mazzia C., 2009. B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. *Environmental Pollution*. 157 (1): 199-207.
- Laroche J., Quiniou L., Juhel G., Auffret M., Moraga D., 2002. Genetic and physiological responses of flounder (*Platichthys flesus*) populations to chemical contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21: 2705-12.
- Laskowski R., Hopkin S.P., 1996b. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 34: 59-69.
- Lawrence A.J., Arukwe A., Moore M., Sayer M., Thain J., 2003. Molecular/cellular processes and the physiological response to pollution. In: *Effects of pollution on fish, molecular*

- effects and population responses* (eds. Lawrence A. J., Hemingway K. L.), Blackwell Sciences. 83-133.
- Ledirac N., Antherieu S., d'Uby A.D., Caron J.C., Rahmani R., 2005. Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species. *Toxicological Sciences*. 86(2): 444-452.
- Lee J., Huang M.S., Yang I.C., Lai T.C., Wang J.L., Pang V.F., Hsiao M., Kuo M.Y., 2008a. Essential roles of caspases and their upstream regulators in rotenone-induced apoptosis. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*. 371(1): 33-38.
- Le Gal Y., Lagadic L., Le Bras S., Caquet T., 1997. Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. In: *Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux* (eds. Lagadic L., Caquet T., Amiard J. C., Ramade F.), Paris. 241-285.
- Li Q., Kawada T., 2006. The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells. *Cellular and Molecular Immunology*. 3(3): 171-178.
- Livingstone D.R., Lemaire P., Matthews A., Peters L.D., Bucke D., Law R.J., 1993. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Marine Pollution Bulletin*. 26: 602-606.
- Livingstone D.R., Lemaire P., Matthews A., Peters L.D., Porte C., Fitzpatrick P.J., Förli L., Nasci C., Fossato V., Wootton N., Goldfarb P., 1995. Assessment of the impact of organic pollutants on Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy: biochemical studies. *Marine Environmental Research*. 39: 235-240.
- Lodovici M., Aiolfi S., Monserrat C., Dolara P., Medica A., Di Simplicio P., 1994. Effect of a mixture of 15 commonly used pesticides on DNA levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*. 13(3): 163-168.
- Mahendru V.K., Agarwal R.A., 1981. Changes in carbohydrate metabolism in various organs of the snail *Lymnaea acuminata* following exposure to trichlorfon. *Acta of Pharmacology*. 48: 377-381.
- Marasco F., Murciano C., 2003. Les escargots. *Elevage*. Paris, Editions de Vecchi. 103 p.
- Marchand J., Tanguy A., Laroche J., Quiniou L., Moraga D., 2003. Responses of European flounder *Plastichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Marine Ecology Progress Series*. 260: 273-284.

- Marcheterre L., Choudhry, G., Webster G., 1988. Environmental Photochemistry of Herbicides. *Reviews of Environmental Contaminations and Toxicology*. 103: 61-126.
- Marigomez I., Soto M., Kortabitarte M., 1996. Tissue-level biomarkers and biological effects of mercury on sentinel slugs, *Arion ater*. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*. 31: 54-62.
- Martel A.C., Lair C., 2011. Validation of a highly sensitive method for the determination of neonicotinoid insecticides residues in honeybees by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 91(10): 978-988.
- Martoja R., Martoja P.M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, Paris VI. 345 p.
- Matsuda K., Buckingham S.D., Kleier D., Rauh J.J., Grauso M., Sattelle D.B., 2001. Neonicotinoids : insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 22 (11): 573-580.
- Mazzia C., Capowiez Y., Sanchez-Hernandez J.C., Köhler H.-R., Triebkorn R., Rault M., 2011. Acetylcholinesterase activity in the terrestrial snail *Xeropicta derbentina* transplanted in apple orchards with different pesticide management strategies. *Environmental Pollution*. 159(1): 319-323.
- 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.
- Mc Carty L.S., Mackay D. 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environmental Science and Technology*. 27: 1719-1728.
- Mc Kenney C.L., Matthews E., 1990. Alterations in the energy metabolism of an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) as indicators of stress from chronic pesticide exposure. *Mar Environ Res*. 30: 1-19.
- 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.
- Meister A., Anderson M.E., 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*. 52: 711-760.
- Menandro N.A., 2008. Insecticidal activity of thiamethoxam against the bamboo powder post beetle *Dinoderus minutus* Fabr. (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Pestides Sciences*. 81: 109-113.

- Michel X., 1993. Contribution à l'étude des interactions entre les contaminants chimiques organiques et les organismes marins : bases moléculaires et applications à la biosurveillance de l'environnement côtier. *Thèse de l'Université de Bordeaux I*, n° d'ordre 993.
- Mora B.R., Martinez-Tabche L., Sanchez-Hidalgo E., Hernandez G.C., Ruiz M.C.G., Murrieta F.F., 2000. Relationship between toxicokinetics of carbaryl and effect on acetylcholinesterase activity in *Pomacea patula* snail. *Ecotoxicological Environmental Safety*. 46: 234-239.
- Mora P., 1998. Caractérisation des cholinestérasés de trois mollusques bivalves : *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et *Corbicula fluminea*. Contribution au développement d'un biomarqueur de contamination des milieux marins et dulçaquicoles. Rapport de Thèse N° 1912, Université Bordeaux I, Bordeaux. 260 p.
- Moussard C., 1999. La biochimie, Biochimie structurale et métabolique, Médecine, Pharmacie, Sciences. De Boek&Larciers.a., Bruxelles. 294 p.
- Narbonne J.F., Garrigues P., Ribera D., Raoux C., Mathieu A., Lemaire P., Salaün J.P., Lafaurie M., 1991. Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean sea. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 100: 37-42.
- Nauen R., Bretshneider T., 2002. New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook*. 13(6): 241-245.
- Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U., Schmuck R., 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Management Science*. 57: 577-86.
- Neumann M., Liess M., Schulz R., 2003. A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. *Chemosphere*. 51(6): 509-513.
- NF X 31-255-2, 2001. Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (*Helix aspersa*) - Partie 2: Détermination des effets sur la croissance par contamination par le sol.
- NF X 31-260, 1999. Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des larves d'insectes (*Oxythyrea funesta*) - Détermination de la toxicité aiguë en utilisant un substrat de sol artificiel.

- Notten M.J.M., Oosthoek A.J.P., Rozema J., Aerts R., 2005. Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution*. 138 (1): 178-190.
- Odendaal J.P., Reinecke A.J., 2003. Quantifying histopathological alterations in the hepatopancreas of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a biomarker of cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56(2): 319-325.
- Oerke E., Dehne H., 1997. Global crop production and the efficacy of crop production current situation and futures trends. *European Journal of Plant Pathology*. 103: 203-215.
- Oliveira-Filho E.C., Geraldino C.K., Paumgarten F.J., 2005. Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 52: 104-112.
- Padhi B.K., Pelletier G., Williams A., Berndt-Weis L., Yauk C., Bowers W.J., and Chu I., 2008. Gene expression profiling in rat cerebellum following in utero and lactational exposure to mixtures of methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Toxicological Letters*. 176(2): 93-103.
- 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.
- Palermo-Neto J., De Oliveira M.C., de Souza W.R., 2003. Effects of physical psychological stressors on behavior macrophage activity and Ehrlich tumor growth. *Brain Behavior Immunity*. 17: 43-54.
- 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.
- Pedigo L.P., 2002. Entomology and pest management. Fourth edition. Prentice Hall, 742 p.
- Pellerin-Massicotte J., 1994. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystems Health*. 3: 101-111.
- 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.

- Pilz C., Keller S., Kuhlmann U., Toepfer S., 2009. Comparative efficacy assessment of fungi, nematodes and insecticides to control western corn rootworm larvae in maize. *BioControl*. 54: 671-684.
- Pimentel D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pest: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 8: 17-29.
- Preece A., 1972. A manual for histologic technicians. Little, Brown and Company, Boston.
- Radwan M.A., El-Gendy K.S., Gad A.F., 2010. Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*. 79 (1): 40-46.
- Radwan M.A., 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.
- Radwan M.A., Salama A.K., 1999. Thiodicarb biotransformation to methyl, toxicities and acetylcholinesterase inhibition in the land snail, *Helix aspersa* (Muller). *The Journal of Pest Control and Environmental Science*. 7: 59-70.
- Ramazan B., Erdogan S., Theophilidis G., Baydas G., Naziroglu M., 2010. Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patch-clamp recording. *Neuro Toxicology*. 31: 113-120.
- Ravera O., 1991. Mini-review: influence of heavy metals on the reproduction and embryonic development of freshwater pulmonates (Gastropoda, Mollusca) and cladocerans (Crustacea, Arthropoda). *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 100: 215-219.
- Ray D.E., 1991. Pesticides derived from plants and other organisms. In : Hayes WJ, Laws ER, eds. *Handbook of Pesticide Toxicology*. San Diego : Academic Press, 585-636.
- Regoli F., Gorbi S., Fattorini D., 2006. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environmental Health Perspective*. 114: 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 ecotoxicological effects of urban pollution: an integrated approach. *Environmental Health Perspectives*. 114 (1): 63-69.

- Regoli F., Principato G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to, metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 31: 143-164.
- Reinecke S.A., Reinecke A.J., 2007. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66: 92-101.
- Revitt D., Ellis J., Llewellyn N., 2002. Seasonal removal of herbicides in urban runoff. *Urban Water*. 4: 13-19.
- Righi D.A., Palermo-Neto J., 2005. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on peritoneal macrophage activity in rats. *Toxicology*. 212: 98-106.
- Rio M.J., Velez-Pardo C., 2008. Paraquat induces apoptosis in human lymphocytes: protective and rescue effects of glucose, cannabinoids and insulin-like growth factor-1. *Growth Factors*. 26(1): 49-60.
- R.N.O., 1995. Surveillance du milieu marin. Ministère de l'Environnement. 32p.
- Rodrigues K.J.A., Santana M.B., Do Nascimento J.L.M., Picanço-Diniz, D.L.W., Maués L.A.L., Santos S.N., Ferreira V.M.M., Alfonso M., Durán R., Faro L.R.F., 2010. Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 73: 101-107.
- Rodriguez-Ariza A., Martinez-Lara E., Pascual P., Pedrajas J.R., Abril N., Dorato G., Toribio F., Bárcena J.A., Peinado J., Pueyo C., López-Barea J., 1993. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Science of the Total Environment*. (Suppl.): 109-116.
- Rorke M.A., Gardner D.R., Greenhalgh N., 1974. Lethality and behavioural symptoms produced by some organophosphorous compounds in the snail (*Helix aspersa*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 11: 417-424.
- Rortais A., Arnold G., Halm M. P., Touffet-Briens F., 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*. 36: 71-83.
- Russell L.K., DeHaven J.I., Botts R.P., 1981. Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 26: 634-640.

- Saad A.A., 1990. Effect of starvation on carbohydrate and protein inclusions in the digestive gland cells of the land snail *Eobania vermiculata*. *Journal Facultative Education*. 15: 147-159.
- Saint-Denis M., Narbonne J.F., Arnaud C., Ribera D, 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 395-404.
- Salah S.H., Abdou H.S., Abdel Rahim E.A., 2010. Modulatory effect of vitamins A, C and E mixtures against tefluthrin pesticide genotoxicity in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 98: 191-197.
- 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.
- Sánchez-Bayo F., Goka K., 2006. Influence of light in acute toxicity bioassays of imidacloprid and zinc pyriithione to zooplankton crustaceans. *Aquatic Toxicology*. 78: 262-71.
- Sarigiannis D.A., Hansen U., 2012. Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals - A challenge for policy makers. *Sarigiannis and Hansen Environmental Health*, 11(Suppl 1): S18, 1-12.
- Saulsbury M.D., Heyliger S.O., Wang K., Round D., 2008. Characterization of chlorpyrifos-induced apoptosis in placental cells. *Toxicology*. 244(2-3): 98-110.
- Scheifler R., Gomot de Vaufleury A., Badot P.M., 2002a. Transfer of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: bioaccumulation and effects. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 53(1): 148-153.
- Schiavon M., Jacquin F., 1973. Studies on the migration of two triazines as influenced by precipitation. *Symposium on Herbicides and the Soil*. 80-90.
- Schiff, K., Bay, S., and Stransky, C., 2002. Characterization of stormwater toxicants from an urban watershed to freshwater and marine organisms. *Urban Water*. 4: 215-227.
- Schreck E., Geret F., Gontier L., Treilhou M., 2008 a. Development and validation of a rapid multiresidue method for pesticide determination using gas chromatography-mass spectrometry: a realistic case in vineyard soils. *Talanta*. 78: 298-303.
- Schreck E., Geret F., Gontier L., Treilhou M., 2008 b. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere*. 71: 1832-1839.

- Schulz R., 2001. Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the Lourens River, Western Cape, South Africa: importance of a single event. *Water Research*. 35(8): 1869-1876.
- Schulz R., 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint source insecticide pollution: a review. *Journal of Environmental Quality*. 33(2): 419-448.
- Schuytema G.S., Nebeker A.V., Griffis W.L., 1994. Effects of dietary exposure to forest pesticides on the brown garden snail *Helix aspersa* Muller. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 26 (1): 23-28.
- Schwaiger J., 2001. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 8: 231-240.
- Schwaiger J., Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Triebkorn R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6: 75-86.
- Seugé J., Bluzat R., 1980. Toxicité à long terme d'un insecticide organophosphoré (Fenthion) chez le mollusque *Lymnea stagnalis* L. *Hydrobiology*. 26: 241-248.
- Sharaf A.A., Mohamed A.M., Abu El-Ghar M.R., Mousa A.H., 1975. Control of snail hosts of Bilharziasis in Egypt. 3. Effect of the organophosphorus insecticide dursban on carbohydrate metabolism of the snail *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. *Egyptian Journal of Bilharziose*. 2: 49-61.
- Sharaf H.M., 2009. Histochemical changes of carbohydrate and protein contents in the digestive gland cells of the land snail *Monacha cartusiana* following starvation. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 16: 51-55.
- Sheehan P.J., 1984. Effects on individuals and population. In *Effects of Pollutants at the Ecosystem Level* (eds P.J. Sheehan, D.R. Miller, G.C. Butler et P. Bourdeau), John Wiley & Sons, London. 23-50.
- Shibko S., Koivistoinen P., Tratyneek C. A., Newhall A.R., Freidman L., 1966. A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, Lipid and Glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytic Biochemistry*. 19: 415-429.
- 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.
- Singh D.K., Agarwal R.A., 1989. Toxicity of piperonyl butoxide-carbaryl synergism on the snail *Lymnaea acuminata*. *International Review of Hydrobiology*. 74: 689-699.

- Snyman R.G., Reinecke A.J., Reinecke S.A., 2002. Field application of a lysosomal assay as biomarker of copper oxychloride exposure, in the snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 69: 117-122.
- Snyman R.G., Reinecke A.J., Reinecke S.A., 2005. Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 47-52.
- Soderlund D.M., 2012. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*. 86: 165-181.
- Spencer C.I., Yuill K.H., Borg J.J., Hancox J.C., Kozlowski R.Z., 2001. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 298: 1067-1082.
- Sunol C., Babot Z., Fonfria E., Galofre M., Garcia D., Herrera N., Iraola S., Vendrell I., 2008. Studies with neuronal cells: From basic studies of mechanisms of neurotoxicity to the prediction of chemical toxicity. *Toxicology In Vitro*. 22(5): 1350-1355.
- Sur R., Stork A., 2003. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. Proceedings of the 8th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group. Hazards of pesticides to bees. *Bulletin of Insectology*. 56(1): 35-40.
- Suteau P., Daubeze M., Migaud M.L., Narbonne J.F., 1988. PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring. *Marine Ecological progress search*. 46: 45-49.
- Swaihleh 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.
- Swaihleh 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.
- Swarcewicz M.K., Gregorczyk A., 2012. The effects of pesticide mixtures on degradation of pendimethalin in soils. *Environmental Monitoring Assessment*. 184: 3077-3084.
- Tasei J.-N., 2001. Effects of insect growth regulators on honey bees and non-*Apis* bees. *Apidologie*. 32: 527-545.
- Tomizawa M., Casida J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacological Toxicology*. 45: 247-268.

- Tomizawa M., Zhang N., Durkin K.A., Olmstead M.M., Casida J.E., 2003. The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity for the *Drosophila* nicotinic receptor: an anomaly for the nicotinoid cation- $\pi$  interaction model. *Biochemistry*. 42: 78196-7827.
- Toreilles J., Guérin M.C., Roch P., 1996. Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense endocrine. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie. 319(3): 209-218.
- Torres R., Mason A.Z., 2002. The effect of tributyl tin (TBT) on glutathione-s-transferase (GST) of the common garden snail, *Helix aspersa*. Molecular Toxicology Laboratory, Department of Biological Sciences, California State University, Long Beach, CA, USA. [consulté le, 09/10/2012].  
[http://www.cnsm.csulb.edu/programs/nsfs/students/current/research/ronnatorres/ronna\\_introdcion.html](http://www.cnsm.csulb.edu/programs/nsfs/students/current/research/ronnatorres/ronna_introdcion.html).
- Triebskorn R., Adam S., Casper H., Honnen W., Pawert M., Schramm M., Schwaiger J., Kohler H.R., 2002. Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology*. 11: 451-65.
- Triebskorn R., Ebert D., 1989. The importance of the mucus production in slugs' reaction to molluscicides on the mucus production system. In: *Slugs and Snails in World Agriculture*. Monograph 41 (ed. I.F. Henderson), British Crop Protection Council, London. 373-378.
- Triebskorn R., Florschütz A., 1993. Transport of uncontaminated and molluscicide-containing food in the digestive tract of the slug *Deroceras reticulatum* (Müller). *Journal of Molluscan Studies*. 59: 35-42.
- Triebskorn R., Köhler H.R., Honnen W., Schramm M., Adams S.M., Müller E.F., 1997. Induction of heat shock proteins, changes in leaver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field ? *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6: 57-73.
- Triebskorn R., Künast C., 1990. Ultrastructural changes in the digestive system of *Deroceras reticulatum* (Mollusca: Gastropoda) induced by lethal and sublethal concentrations of the carbamate molluscicide Cloethocarb. *Malacologia*. 32: 89-106.
- UIPP, 2009. Rapport d'activité 2008-2009. Union des Industries et de la Protection des Plantes.
- Van Der Werf H., 1996. Assessing the impact on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 60: 81-96.

- Van Zelm R., Huijbregts M.A.J., Posthuma L., Wintersen A., Van de Meent D., 2009. Pesticide ecotoxicological effect factors and their uncertainties for freshwater ecosystems. *International Journal Life of Cycle Assessment*. 14: 43-51.
- Viard B., Maul A., Pihan J.-C., 2004. Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination. *Journal of Environmental Monitoring*. 6: 103-107.
- 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.
- Weckbecker G., Cory J.G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 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.
- Wilbrink M., Zijl R., Roubos E.W., Ter Maat A., De Vlieger T.A., Vermeulen N.P.E., 1992. Effects of 2,2'-dichlorobiphenyl on egg laying in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 102: 3-9.
- Winston G.W., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative biochemistry and Physiology*. 100C: 173-176.
- Wolfe N., Mingelgrin U., Miller G., 1990. Abiotic transformations in : Water, sediments and soils. *Soil Science Society of America*. Madison, Wisconsin, USA. 433 p.
- 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.
- Xiao N., Jing B., Ge F., Liu X., 2006. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere*. 62: 1366-1373.
- Yanez L., Ortiz D., Calderon J., Batres L., Carrizales L., Mejia J., Martinez L., Garcia- Nieto E., Diaz-Barriga F., 2002. Overview of human health and chemical mixtures: problems facing developing countries. *Environmental Health Perspectives*. 6: 901-909.
- Zaldibar B., Cancio I., Soto M., Marigomez I., 2008. Changes in cell-type composition in digestive gland of slugs and its influence in biomarkers following transplantation

between a relatively unpolluted and chronically metal-polluted site. *Environmental Pollution*. 156: 367-379.

Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V., Perkovic P., 2006. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicology In Vitro*. 20(6): 923-935.

# *ANNEXES*

## **Annexe 1 : Tableaux de la réalisation de la gamme d'étalonnage**

### **Annexe 1a : Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines hépatopancréatiques.**

<b>Tubes</b>	1	2	3	4	5	6
<b>Quantité d'albumine (µg)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Eau distillée (µl)</b>	100	80	60	40	20	0
<b>BBC (ml)</b>	4	4	4	4	4	4

### **Annexe 1b : Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des glucides hépatopancréatiques.**

<b>Tubes</b>	1	2	3	4	5	6
<b>glucose (µl)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Eau distillée (µl)</b>	100	80	60	40	20	0
<b>Anthrone (ml)</b>	4	4	4	4	4	4

### **Annexe 1c : Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des lipides hépatopancréatiques**

<b>Tubes</b>	1	2	3	4	5	6
<b>Solution mère de lipides (µl)</b>	100	80	60	40	20	0
<b>Solvant chloroforme/méthanol (µl)</b>	4	4	4	4	4	4







## **Annexe 4 : Production scientifique (Publications et communications)**

### **Publications internationales (2)**

1. **Aït Hamlet S.**, Bensoltane S., Djekoun M., Yassi F., Berrebbah H., (2012). Histological changes and biochemical parameters in the hepatopancreas of terrestrial gastropod *Helix aspersa* as biomarkers of neonicotinoid insecticide exposure. African Journal of Biotechnology, 11 (96): 16277-16283.
2. **Aït Hamlet S.**, Bensoltane S., Djekoun M., Berrebbah H., Djebbar M.R. (2013). Effets de deux insecticides sur la croissance pondérale de l'escargot terrestre *Helix aspersa*. Bulletin de la Société Zoologique de France, *sous presse*.

### **Communications internationales (5)**

1. Bensoltane S., **Aït Hamlet S.**, Djekoun M., Yassi F., Berrebbah H., Djebbar M.R. Effets d'un insecticide néonicotinoïde sur la croissance des juvéniles de l'escargot terrestre *Helix aspersa*. Congrès de la Société Zoologique de France, Nice 13-16 septembre 2011.
2. **Aït Hamlet S.**, Bensoltane S., Yassi F., Berrebbah H., Djebbar M.R. Etude biochimique et histologique de la glande digestive d'un gastéropode terrestre *Helix aspersa* traité par un insecticide néonicotinoïde. Congrès de la Société Zoologique de France, Nice 13-16 septembre 2011.
3. **Aït Hamlet S.**, Bensoltane S., Djekoun M., Berrebbah H., Djebbar M.R. Effets d'un insecticide pyréthriinoïde sur la croissance pondérale des juvéniles de l'escargot terrestre *Helix aspersa*. Le 3<sup>ème</sup> Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie et d'Ichtyologie, Maroc, Marrakech 06-10 novembre 2012.
4. Bensoltane S., **Aït Hamlet S.**, Djekoun M., Berrebbah H., Djebbar M.R. Biomarqueurs d'exposition en milieu terrestre : impact de la téfluthrine sur l'activité de trois systèmes enzymatiques chez *Helix aspersa*. Le 3<sup>ème</sup> Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie et d'Ichtyologie, Maroc, Marrakech 06-10 novembre 2012.
5. **Aït Hamlet S.**, Bensoltane S., Yassi F., Berrebbah H., Djebbar M.R. Etude biochimique et histologique de la glande digestive d'un gastéropode terrestre *Helix aspersa* traité par un insecticide pyréthriinoïde. Le 3<sup>ème</sup> Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie et d'Ichtyologie, Maroc, Marrakech 06-10 novembre 2012.



EFFETS DE DEUX INSECTICIDES SUR LA CROISSANCE PONDERALE  
DE L'ESCARGOT TERRESTRE *HELIX ASPERSA*

Smina AÏT HAMLET<sup>1</sup>, Samira BENSOLTANE<sup>1,2</sup>, Mohammed DJEKOUN<sup>1,3</sup>,  
Houria BERREBBAH<sup>1</sup>, Mohammed Réda DJEBAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de toxicologie cellulaire, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji-Mokhtar, Annaba, B.P.12, 23000, Algérie.

[smina1981@hotmail.fr](mailto:smina1981@hotmail.fr)

<sup>2</sup>Faculté de Médecine, Université Badji-Mokhtar, Annaba, 23000, Algérie.

[bensoltane\\_samira@yahoo.fr](mailto:bensoltane_samira@yahoo.fr)

<sup>3</sup>Faculté des Sciences et de l'Univers, Département de Biologie, Université du 08 Mai 1945, Guelma, 24000, Algérie.

[djekoun\\_mohamed64@yahoo.fr](mailto:djekoun_mohamed64@yahoo.fr)

**Auteur correspondant :** Smina AIT HAMLET

### Résumé

Le travail exposé dans cet article a pour but de tester l'effet de deux insecticides, le premier est à base de thiaméthoxam (25/100 g de matière active) et le deuxième est à base de tefluthrine (1.5/100 g de matière active) sur la croissance pondérale d'un invertébré bioindicateur, l'escargot *Helix aspersa* dans des conditions de laboratoire.

Des escargots juvéniles ont été exposés par ingestion et par contact pendant 8 semaines à des feuilles de laitue fraîche imbibées d'insecticides. Les effets des deux insecticides, ayant des modes d'action différents ont été comparés. La croissance, la viabilité et la mortalité des escargots juvéniles sont notées d'une façon hebdomadaire pendant la période de traitement.

Les effets induits sur la croissance par les deux concentrations de thiaméthoxam augmentent en fonction du temps d'une façon dose-dépendante. L'accroissement de la toxicité des deux insecticides avec le temps n'est cependant pas similaire. Une rapide récupération de la croissance des juvéniles après l'exposition à l'une des deux concentrations de tefluthrine a été observée. Les résultats de cette étude suggèrent que les juvéniles de *Helix aspersa* peuvent

être utilisés comme bio-indicateurs pour tester et comparer l'effet des pesticides sous des conditions de laboratoire.

**Mots clés :** *Helix aspersa* ; escargots juvéniles ; insecticides ; thiaméthoxam ; tefluthrine ; croissance ; toxicité.

### **Effects of two insecticides on ponderal growth of terrestrial snail *Helix aspersa***

**Abstract.** The work exposed in this article aims at testing the effect of two insecticides, the first one is thiamethoxam-based insecticide (25/100 g of active ingredient) and the second is tefluthrin-based insecticide (1.5/100 g of active ingredient) on the ponderal growth of the snail *Helix aspersa* under laboratory conditions.

The juvenile snails were exposed by ingestion and contact during 8 weeks at fresh lettuce leaves imbued with insecticide solutions. Effects of the both insecticides, with different mode of action, were compared.

The growth, the viability and the mortality of juvenile snails are noted weekly during the treatment period. Effects induced on the growth by the two concentrations of thiamethoxam increase in terms of time by dose-related manner. However, the increase in the toxicity of the two insecticides with the time is not similar. A rapid recuperation on the growth of juveniles after exposure in one of both concentrations of tefluthrin was observed. The results of this study suggested that the juveniles of the snail *Helix aspersa* can be used as bio-indicators to test and compare the effect of pesticides under laboratory conditions.

**Key words :** *Helix aspersa* ; juvenile snails ; insecticides ; thiamethoxam ; tefluthrin ; growth; toxicity.

# *RESUMES*

## RESUME

Les organismes vivant dans le sol, sont soumis à des fluctuations régulières des paramètres abiotiques, ainsi qu'à une contamination chimique du milieu due aux activités anthropiques. Ils sont donc sujets à des stress multiples auxquels ils doivent faire face.

Le but de ce travail était d'étudier les effets de deux insecticides, à large spectre d'utilisation dans la région Nord-Est algérienne, le thiaméthoxam (néonicotinoïde), la téfluthrine (pyréthrianoïde) et leurs mixtures sur une espèce bioindicatrice en écotoxicologie, l'escargot terrestre *Helix aspersa*. Leurs effets ont été étudiés non seulement par une approche ciblée au laboratoire, consistant à évaluer l'effet de ces molécules et de leurs mixtures sur le comportement, à déterminer la composition biochimique de l'hépatopancréas, à mesurer les niveaux de défenses enzymatiques anti-oxydantes, à estimer les effets histopathologiques, mais aussi par une approche toxico-dynamique, au moyen d'une étude de la croissance des juvéniles.

Le thiaméthoxam, la téfluthrine et leurs mixtures ont montré des effets inhibiteurs aux plus fortes concentrations, sur le comportement locomoteur et nutritif des adultes de l'escargot *Helix aspersa*. Aussi, les faibles concentrations d'insecticides inhibent la prise de poids des escargots à partir de la troisième semaine de traitement. Pareillement, dans les cas extrêmes, en présence de fortes concentrations de ces composés, l'inhibition de la prise de poids, pourrait être due à la répulsion de la nourriture, et au jeûne prolongé des escargots. Les deux insecticides et leurs mixtures réduisent également le poids frais moyen de l'hépatopancréas et celui de la coquille après six semaines de traitement.

Des perturbations significatives sont également notées dans la composition biochimique de l'hépatopancréas de *Helix aspersa* (contenu en glucides totaux, en lipides totaux et en protéines totales) après traitement au thiaméthoxam, à la téfluthrine et à leurs mixtures.

Quant aux antioxydants, nos résultats révèlent une induction du système de détoxification ainsi qu'une neurotoxicité des molécules testées. En effet, le thiaméthoxam et la téfluthrine inhibent l'AChE, induisent de manière significative la GST et la CAT et diminuent de façon significative le taux de GTH. Concernant la sensibilité de *Helix aspersa* vis-à-vis des mixtures, les biomarqueurs du stress oxydant montrent des résultats variables.

L'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots traités a mis en évidence des altérations qualitatives importantes dès les plus faibles concentrations testées.

Enfin, le suivi de la croissance des juvéniles de *Helix aspersa* a montré le déclin de la croissance des escargots (masse et diamètre coquillère) sous l'effet de tous les traitements.

En revanche, la mesure des résidus de pesticides dans les tissus d'origine animale reste un challenge fort, et qui est en plus au cœur des préoccupations environnementales actuelles.

**Mots clés :** *Helix aspersa*, insecticides, thiaméthoxam, téfluthrine, mixtures, hépatopancréas, comportement, physiologie, biomarqueurs, histologie, croissance, juvéniles.

## ABSTRACT

Organisms living in the soil are subject to regular fluctuations of abiotic parameters, and chemical contamination of the environment due to human activities. Thus, they are subject to multiple stressors.

The aim of this work was to study the effects of two insecticides, which are widely used in the Algerian North-East region, the thiamethoxam (neonicotinoid), the tefluthrin (pyrethroid) and their mixtures on a bioindication species in ecotoxicology, the land snail *Helix aspersa*. These effects have been studied by a targeted approach in laboratory by assessing the effect of these molecules and their mixtures on behavior, to determine the biochemical composition of the hepatopancreas, to measure levels of enzymatic antioxidant defenses, to estimate the histopatologic effects and also by a toxicodynamic approach, by a study of the juvenile growth.

The thiamethoxam, the tefluthrin and their mixtures showed inhibitory effects at higher concentrations, on locomotor behavior and nutrition in adult snails *Helix aspersa*. Also, low concentrations of insecticides inhibit the gain of weight from the third week of treatment. However, in extreme cases, in the presence of high concentrations of these compounds, inhibition of weight's gain may be due to the repulsion of food, and thus, by induced estivation. Both insecticides and their mixtures also reduced the average fresh weight of the hepatopancreas and the average fresh weight of the shell after six weeks of treatment.

Significant disruptions are also noted in the biochemical composition of the hepatopancreas of *Helix aspersa* (content of total carbohydrate, content of total lipid and total protein) after treatment with the thiamethoxam, the tefluthrin and their mixtures.

Our results showed an induction of detoxification system and the neurotoxicity of the compounds tested. Indeed, the thiamethoxam and the tefluthrin inhibit the AchE, and induce significantly the GST and the CAT and reduce significantly the rate of the GTH. About the sensitivity of *Helix aspersa* against the mixtures, biomarkers of oxidative stress showed different results.

Histological examination of the hepatopancreas of treated snails showed significant qualitative alterations at the lowest concentrations tested.

Finally, monitoring of the growth juvenile's *Helix aspersa* showed the decline of snails growth (mean weight and mean diameter shell) under the effect of all treatments.

However, the dosage of pesticide's residues in animal tissues remains a strong challenge, which is in addition, at the heart of current environmental preoccupations.

**Keywords:** *Helix aspersa*, insecticides, thiamethoxam, tefluthrin, mixtures, hepatopancreas, behavior, physiology, biomarkers, histology, growth, juveniles.

## المخلص

الكائنات الحية التي تعيش في التربة، تخضع لتقلبات منتظمة للمعلومات الغير حيوية، والتلوث الكيميائي للبيئة بسبب الأنشطة البشرية. فهذا ، فالكائنات تخضع لضغوطات متعددة. كان الهدف من هذا العمل، دراسة آثار مبيدين حشريين كثيري الاستعمال في شمال شرق الجزائر *le thiaméthoxam* و *la téfluthrine* ومخاليطهما على نوع من القواقع الكثيرة الاستعمال كمؤشر التلوث الإيكولوجي، الحلزون الترابي *Helix aspersa* ، وقد تم دراسة هذه النثار في المختبر، من خلال نهج لتقييم تأثير المركبات المختارة وخلائطها على السلوك، لتحديد التركيب البيوكيميائي للبنكرياس الكبدي، لقياس مستويات مضادات الأكسدة الأنزيمية، لدراسة الآثار على الأنسجة « Histopathologie » وأخيرا بدراسة نمو صغار الحلزون.

وأظهر *le thiaméthoxam* و *la téfluthrine* وخلائطهما آثارا مثبطة في التركيزات المرتفعة على السلوك الحركي وعلى التغذية عند كبار الحلزون. وأظهرت التركيزات المنخفضة من المبيدات الحشرية منع في زيادة الوزن عند الفواقع ابتداء من الأسبوع الثالث من العلاج. ومع ذلك ، في الحالات القصوى، في وجود تركيزات عالية من هذه المركبات قد يكون التثبيط في زيادة الوزن، بسبب التناثر من المواد الغذائية وبسبب الامتناع عن الأكل لفترة طويلة. المبيدان الحشريان ومخاليطهما يقللان أيضا من متوسط الوزن الطازج للبنكرياس الكبدي والفواقع بعد ستة أسابيع من العلاج.

وأظهرت نتائج بحثنا أيضا ، إضطرابات معتبرة في التركيب البيوكيميائي (كمية السكريات، كمية الدهون، كمية البروتينات الكلية) بعد العلاج بالمبيدان ومخاليطهما.

كما أظهرت نتائج دراسة مضادات الأكسدة لنظام إزالة السموم، تفعيل نظام إزالة التسمم والسمية العصبية للمركبات المدروسة. أظهر *le thiaméthoxam* و *la téfluthrine* إنخفاضا في النشاط الأنزيمي AChE وزيادة في النشاط الأنزيمي GST و CAT ونقصانا في كمية GTH. في ما يخص المؤشرات الحيوية، أظهر الحلزون *Helix aspersa* حساسية متباينة تجاه مختلف المخاليط.

أظهرت الدراسة النسيجية للبنكرياس الكبدي للحلزون بعد المعالجة بمختلف المواد محل البحث، إتلاف نوعي لمختلف الأنسجة ، وهذا إبتداء من التركيزات المنخفضة.

كما أظهرت نتائج نمو الفواقع تراجعاً. و أخيراً، فإن مدى متبقيات المبيدات في أنسجة الحيوان لا يزال يشكل تحدياً قوياً، وهو في قلب الاهتمامات البيئية الحالية.

**الكلمات الدالة :** *Helix aspersa*، مبيدات حشرية *thiaméthoxam*، *téfluthrine*، مخاليط،

البنكرياس الكبدي، السلوك، الفيزيولوجيا، المؤشرات الحيوية، الدراسة النسيجية، النمو، صغار الحلزون.