



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Larbi Tébessi –Tébessa -



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

Département de Biologie Appliquée

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Science Biologie

Option: Toxicologie, Xénobiotiques et Risque Toxicologique

Thème:

### **Nantoxicité de Séléniure de Cadmium (NPs) sur les paramètres de stress oxydatif d'un modèle cellulaire biologique alternatif *Helix aspersa***

Présenté par:

**M<sup>elle</sup> BOUKHALLOUT Fatma**

**M<sup>elle</sup> TOUATI Karima**

**Devant le jury**

**Mr. GOUDJIL Taher**

**M.C.B Université de Tébessa**

**Président**

**Mr.ROUABHI Rachid**

**Professeur Université de Tébessa**

**Promotrice**

**Melle. BELLAL Warda**

**M.A.A Université de Tébessa**

**Examineur**

**Date de soutenance: 30/05/ 2016**

## ملخص

تركز دراستنا التجريبية على تقييم السمية و الاجهاد التاكسدي الناتج عن الجسيمات النانومترية CdSe بتراكيز مختلفة ( 3.6 و 7.2 ميكرو غرام/غ) على مؤشرات الاجهاد التاكسدي للحزون *Helix aspersa*.

دراسة السمية شبه المزمدة (45 يوم) تكون عن طريق الحقن على مستوى القدم.

الجسيمات النانومترية CdSe اثرت سلبا على الحزون من خلال النقص الملحوظ في مستوى قواقع الحزونات، اما فيما يخص المؤشرات الحيوية لاحظنا زيادة في كمية البروتينات و الغلوسيدات و انخفاض في مستوى الليبيدات إضافة إلى ذلك نقصان في معدل GSH مع نظام إزالة التسمم من خلال الزيادة في النشاط الانزيمي GST,CAT,GPX,MDA على مستوى البنكرياس الكبدي.

**الكلمات المفتاحية:** السمية، نظام إزالة التسمم، الإجهاد التاكسدي، CdSe, *Helix aspersa*  
GST,CAT,GPX,MDA,GSH

## Abstract

Our experimental study focuses on the assessment of nanotoxicity and stress oxidative induced by cadmium selenide at low concentrations of (3.6 ,7.2 $\mu$ g / g) on bio accumulator and bioindicator of pollution *Helix aspersa*; during a period of study of 45 days, our treatment are made by injection ( *Intrapoda*).

The obtained results show that the presence of CdSe in the form of nanometal NPs causes a reduction in lipid levels, an increasing in the rate of protein and carbohydrates result of disturbances of the biochemical composition in hepatopancreas.

Regarding the study of biomarkers of exposure we have demonstrated a significant decrease in GSH, showing a significant increase in MDA levels, enzyme activity of GST, CAT and GPx in the hepatopancreas.

**Keywords:** *Helix aspersa*, cadmium selenide, bio indicator, bioaccumulation, carbohydrates, proteins, GSH, MDA, GST, CAT, GPx, nanotoxicity, oxidative stress.

## Résumé

Notre étude expérimentale s'intéresse à l'évaluation de la nanotoxicité et le stress oxydative induit par le séléniure de cadmium (NPs) à des concentrations croissantes de (1.2 et 2.4µg/ml/g) sur des organismes bioaccumulateur et bioindicateur de pollution *Helix aspersa*, il s'agit d'une étude de toxicité subchronique (45 jours) par injection (*Intrapoda*).

Les résultats obtenus montrent que la présence de CdSe sous forme de NPs métallique provoque une réduction du taux des lipides, Ainsi une augmentation du taux des protéines et des glucides suite à des perturbations de la composition biochimique au niveau de l'hépatopancréas.

En ce qui concerne l'étude des biomarqueurs d'exposition nous avons mis en évidence une diminution significative dans le taux de GSH, et une augmentation significative du taux de MDA, l'activité des enzymes GST, CAT et GPx dans l'hépatopancréas sont aussi augmentée.

**Mots clés :** *Helix aspersa*, Séléniure de cadmium, bio indicateur, bio accumulateur, glucides, protéines, lipides, GSH, MDA, GST, CAT, GPx , nanotoxicité, stress oxydative.



## *Remerciement*

*En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH, le Clément qui manifeste sa clémence, qui m'a donné la force, le courage et la patience durant ces longues années d'étude.*

*Mes remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté des sciences exactes et science de la nature et de la vie pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.*

*Je dois tous les respects à mon encadreur le Pr. Rouabhi Rachid, pour son soutien moral et matériel à la réalisation de ce travail.*

*Un très grand merci a, Mr Goudjil Taher Docteur et maitre de conférences a l'université de*

*Tébessa, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Je tiens également a remercions M<sup>lle</sup> Bellal Warda. d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et de faire partie du jury de cette soutenance.*

*Merci bien.*

*Un Grand merci pour Mr Gasmi salim , pour ses remarques qui ont toujours très constructives.*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.*

*Merci a tous.*



## *Dédicace*

*Après un remerciement sincère à dieu. Avec les bons sentiments je dédie ce modeste travail en signe de respect et de reconnaissance respectivement.*

### *A mon père:*

*Le soleil de ma vie, le bon cœur, le meilleur père, je vous suis redevable à tous les efforts que vous avez fournis pour moi*

*Papa.....merci*

*A celle qui reliée par le paradis, A ma chère mère. (Que dieu le tout puissant accorde au défunt sa sainte miséricorde et l'accueille en son vaste paradis).*

### *A ma mère "Nabila"*

*Si tu savais combien je t'aime, tu comprendras que déjà personnellement sans toi je n'ai pas jamais survécu, merci pour la patience, le soutien de tous les jours.*

*Mes très chers frères : Aymane, Ibrahim « floussa »*

*Ma très chère sœur : « Ismahane » qui m'aidez, m'encouragez et qui m'a soutenu dans les moments difficiles ; à vous avez mon amour et mes respects et ainsi son mari « Adel ».*

*Mes sœurs : Amel et son mari « faissel », Nini et « abdalghani ».*

*A les fleurs de notre vie « Douidi » et « sirine ».*

*Et particulièrement à ma grand-mère « Nena Mebareka » pour ses encouragements, son soutien maternel et moral ; que dieu la bénisse et la garde sous sa miséricorde.*

*Tous les membres de ma famille grands et petits*

*A ma fidèle binôme patouma et sa famille.*

*A mes très chers amis : Madiha, Basma, Sara, Amel, abdalwahab,*

*Chah, Zina, Sabrina, Linda, Radhia*

*A tous mes collègues de la promotion MASTER 02 T.XRT*

*karima*





# Dédicace

*Grace à **dieu**, le tout puissant; j'ai accomplie ce travail dans l'effort et le sacrifice.*

*Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études.*

*« Mon père **Abid-Allah yarhmo**- à l'être le plus près a mon cœur, qui a été toujours le meilleurs guide dans ma vie. »*

*« mon mère **Mréya** qui ma toujours entouré d'amour et de tendresse »*

*A mon encadreur « Pr. Rouabhi Rachid »*

*A mes beaux frères*

*A mes très chères sœurs*

*A mon amie et ma sœur :Kimo 'merci pour ça amitié'*

*A tous mes amies intimes surtout, Douha., Hassouna , Nadjwa et Maryouma.*

*A M Gasmi Salim pour sa disponibilité permanente et sec conseils dans notre travail*

*2<sup>ème</sup> année Master T : XRT A mes collègues de la classe de*

*A tous les personnes qui m'ont aidé pour accompli ce travail surtout El-Mouldi H*



# FATMA

## Liste des figures

<b>Figures</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 01</b>	Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques	03
<b>Figure 02</b>	Les procédés d'élaboration des nanoparticules	04
<b>Figure 03</b>	Représentation schématique du fullerène C60	04
<b>Figure 04</b>	Représentation schématique et visuelle d'un point quantique	07
<b>Figure 05</b>	Voies d'exposition de l'homme aux nanoparticules (en rouge) et devenir dans le corps humain (bleu).	10
<b>Figure 06</b>	Les sources d'exposition, la biodistribution et l'élimination des nanoparticules dans l'organisme	12
<b>Figure 07</b>	Structure chimique de CdSe (NP)	13
<b>Figure 08</b>	Nanocristaux de semi-conducteur de CdSe soumis à des rayons UV, dont la taille varie de 2 nm (bleu) à 8 nm (rouge)	14
<b>Figure 09</b>	Source endogènes des espèces réactives	17
<b>Figure 10</b>	Réduction monovalente de l'oxygène	18
<b>Figure 11</b>	Réactions de la peroxydation lipidique	22
<b>Figure 12</b>	Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	23
<b>Figure 13</b>	Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires	24
<b>Figure 14</b>	Les trois types de la SOD	25
<b>Figure 15</b>	Insertion de la vitamine E au sein de la membrane lipidique.	28
<b>Figure 16</b>	Le petit gris ( <i>Helix aspersa</i> )	30
<b>Figure 17</b>	Anatomie de l'escargot	31
<b>Figure 18</b>	Nourriture d' <i>Helix aspersa</i> au laboratoire.	34
<b>Figure 19</b>	Traitement de l'escargot par l'injection	35
<b>Figure 20</b>	Sacrifice et dissection des animaux.	36
<b>Figure 21</b>	Prélèvement des organes (l'hépatopancréas).	36

<b>Figure 22</b>	Evolution du diamètre (D) de la coquille des escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p > 0.05$ ).	43
<b>Figure 23</b>	Pourcentage de mortalité des escargots après traitement de dose (de 1.2 $\mu\text{g/ml/g}$ et 2.4 $\mu\text{g/ml/g}$ ).	44
<b>Figure 24</b>	Variation de teneur en glucide ( $\mu\text{g}$ ) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p < 0.001$ ).	45
<b>Figure 25</b>	Variation de teneur en lipides ( $\mu\text{g}$ ) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p < 0.001$ ).	46
<b>Figure 26</b>	Variation de teneur en protéines (mg) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement.	47
<b>Figure 27</b>	Taux de GSH ( $\mu\text{mol/mg}$ protéine) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p < 0.001$ ).	48
<b>Figure 28</b>	Activité de catalase ( $\mu\text{mol/min/mg}$ protéine) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p < 0.001$ ).	49
<b>Figure 29</b>	Activité de GST ( $\mu\text{mol/min/mg}$ protéine) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p < 0.001$ ).	50
<b>Figure 30</b>	Activité de GPx en ( $\mu\text{mol/min/mg}$ protéine) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p < 0.001$ ).	51
<b>Figure 31</b>	Activité de MDA ( $\mu\text{mol/min/mg}$ protéine) des escargots témoins et traité après 45 jours de traitement ( $p < 0.001$ ).	52

## Liste des tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Tableau 01</b>	Mortalité des escargots adultes durant les six semaines de traitement par CdSe(NPs).	44



### *Liste des symboles*

<b>Abréviation</b>	<b>Désignation</b>
%	pourcentage
µg	microgramme
µl	microlitre
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acides gras polyinsaturés
BBC	Bleu Brillant de Coumassie
BSA	Albumine sérum de bœuf
C°	Degré Celsius
Ca <sup>++</sup>	Ion de calcium
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CdCl <sub>2</sub>	Chlorure de cadmium
CdSe	sélénure de cadmium
Cm	Centimètre
Cu	Cuivre
DO	Densité optique
DTNB	Acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra
ERO	Espèces Réactives de l'oxygène
Fd	Facteur de dilution
Fe	Fer
GPx	Glutathion-S-Transférase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydée
GST	Glutathion-S-Transférase
h	Heure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
Kg	Kilogramme
L	Longueur
MDA	Malondialdehyde
Mg	Milligramme
Min	minute
ML	millilitre
nm	nanomètre
nM	nanomole
NPs	nanoparticules
NTC	Les nanotubes de carbone
p	Seuil de signification
pH	Potentiel hydrogen
ppm	Partie par million
PTP	Pore de transition de perméabilité
RL	Radicaux libres
Se	Sélénium

SiO <sub>2</sub>	dioxyde de soufre
SOD	Superoxyde dismutase
SSA	Acide sulfosalicylique
t	tours
TBA	acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
TiO <sub>2</sub>	dioxyde de titane
TP	tampon phosphate
UV	ultra violet
Zn	Zinc
ZnO	oxyde de zinc
D	Diamètre



# Table des matières

ملخص

*Abstract*

*Résumé*

*Remerciements*

*Dédicace*

*Liste des tableaux*

*Liste des figures*

*Liste des symboles*

*Table des matières*

*Introduction*

## *Partie bibliographique*

### *I. Les nanoparticules*

<b>I. Généralités</b>	<b>03</b>
<b>1. Définition de nanoparticule</b>	<b>03</b>
<b>2. Procédure de fabrication</b>	<b>03</b>
2.1. Voie descendante	03
2.2. Voie ascendante	03
<b>3. Classification et propriétés</b>	<b>04</b>
<b>3.1. Principales nanoparticules à base de carbone</b>	<b>04</b>
3.1.1. Les fullerènes	04
3.1.2. Les nanofeuillets de graphène	05
3.1.3. Les nanotubes de carbone	05
3.1.4. Les nanofibres de carbone	05
3.1.5. Le noir de carbone	06
<b>3.2. Autres nanoparticules inorganiques</b>	<b>06</b>
3.2.1. Les métaux	06
3.2.2. Les oxydes métalliques	06
3.2.3. Les points quantiques	06
<b>3.3. Nanoparticules organiques</b>	<b>07</b>
3.3.1. Les polymères organiques	07
3.3.2. Nanoparticules d'inspiration biologique	07
<b>4. Risques des nanoparticules pour l'homme et l'environnement</b>	<b>08</b>
4.1. Effets des nanoparticules sur l'environnement	08
4.1.1. Risques pour les écosystèmes et les organismes vivants	08

4.2. Effets des nanoparticules sur l'homme	09
4.2.1. Toxicocinétique des nanoparticules	09
4.2.2. Voies d'entrée et translocation des nanoparticules dans l'organisme	09
4.2.3. Mécanisme d'action	11
4.2.3.1. Stress oxydant	11
4.2.3.2. Réaction inflammatoire	11
4.2.4. Elimination	11
4.3. Effets sur la santé humaine	12
<b>II. Nanoparticule de Séléniure de cadmium</b>	<b>13</b>
1. Définition	13
2. Propriété	13
3. Application	14
4. Synthèse de CdSe	14
5. Toxicologie	15
<i>II. Stress oxydatif</i>	
1. Le stress oxydatif	16
2. Les radicaux libres	16
3. Origine des radicaux libres	16
3.1. Endogène	16
3.2. Exogène	17
4. Site de production des radicaux libres	17
5. Types des radicaux libres	18
5.1. Radicaux libres de l'oxygène (ROS)	18
5.1.1. Radicaux superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ )	18
5.1.2. Radicaux hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ )	19
5.1.3. Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )	19
5.1.4. Rôle physiologique des espèces réactives oxydante	19
5.2. Espèces réactives de l'azote	20
5.2.1. Monoxyde d'azote	20
5.2.2. Nitrique dioxyde $NO_2^{\cdot}$	20
5.2.3. Peroxynitrite ( $ONOO^-$ )	20
5.2.4. Rôles physiologiques des espèces réactives de l'azote	20
6. Conséquence moléculaire de stress oxydant	20
6.1. Peroxydation lipidique	21
6.1.1. Initiation	21
6.1.2. Propagation	21

6.1.3. Terminaison	21
6.2. Oxydation des protéines	22
6.3. Dommages de l'ADN	23
7. Les systèmes de défenses antioxydants	24
7.1. Définition	24
7.2. Sources des antioxydants	24
7.3. Les systèmes antioxydants enzymatiques	25
7.3.1. La superoxyde dismutase (SOD)	25
7.3.2. La glutathion peroxydase (GPx)	26
7.3.3. La catalase (CAT)	26
7.4. Les systèmes antioxydants non-enzymatique	27
7.4.1. Glutathion (GSH)	27
7.4.2. La vitamine C	27
7.4.3. Le coenzyme Q	27
7.4.4. La vitamine E ( $\alpha$ - tocophérol)	28
7.4.5. Les caroténoïdes	29
7.4.6. L'acide urique	29
7.4.7. Les Oligoéléments	29

## *Partie pratique*

### I. Matériel et méthodes

1. Matériel	30
1.1. Matériel biologique	30
1.1.1. Morphologie d' <i>Helix aspersa</i>	30
1.1.2. Anatomie d' <i>Helix aspersa</i>	30
1.1.3. L'espèce en milieu naturel	31
1.1.4. Rythme d'activité	31
1.1.5. Estivation et hibernation	31
1.1.6. Croissance	32
1.1.7. Reproduction	32
1.1.8. Choix du modèle biologique 'l'escargot terrestre <i>Helix aspersa</i> '	33
1.2. Matériel chimique	33
2. Méthode d'élevage et traitement	34
2.1. Remise en activité des animaux avant les tests de toxicité (traitement à CdSe)	34
2.2. Conditions d'élevage	34
2.3. Lotissement et traitement des animaux	35
2.4. Sacrifice des animaux et extraction d'hépatopancréas	35

<b>3. Méthodes</b>	<b>36</b>
<b>3.1. Biomarqueurs physiologiques</b>	<b>36</b>
<b>3.2. Paramètres métaboliques</b>	<b>37</b>
<b>3.2.1. Extraction des métabolites</b>	<b>37</b>
<b>3.2.1.1. Dosage des glucides</b>	<b>38</b>
<b>3.2.1.2. Dosage des lipides</b>	<b>38</b>
<b>3.2.1.3. Dosage des protéines</b>	<b>38</b>
<b>3.3. Paramètres enzymatiques</b>	<b>39</b>
<b>3.3.1. Dosage du glutathion (GSH)</b>	<b>39</b>
<b>3.3.2. Dosage de glutathion peroxydase (GPx)</b>	<b>39</b>
<b>3.3.3. Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GST)</b>	<b>40</b>
<b>3.3.4. Dosage de l'activité catalase (CAT).</b>	<b>41</b>
<b>3.3.5. Dosage du malondialdéhyde (MDA)</b>	<b>42</b>

## *II. Résultats*

<b>1. Étude des paramètres morpho-physiologiques</b>	<b>43</b>
<b>1.1. Effet de CdSe (NPs) sur l'évolution du diamètre (D) de la coquille des escargots</b>	<b>43</b>
<b>1.2. Effet de CdSe (NPs) sur la mortalité chez les escargots</b>	<b>44</b>
<b>2. Étude des paramètres biochimiques et enzymatiques</b>	<b>45</b>
<b>2.1. Effet de CdSe (NPs) sur les paramètres biochimiques chez les escargots</b>	<b>45</b>
<b>2.1.1. Effet de CdSe (NPs) sur le taux des glucides chez les escargots</b>	<b>45</b>
<b>2.1.2. Effet de CdSe (NPs) sur le taux des lipides chez les escargots</b>	<b>46</b>
<b>2.1.3. Effet de CdSe (NPs) sur le taux des protéines chez les escargots</b>	<b>47</b>
<b>2.2. Effet de CdSe (NPs) sur les paramètres non *enzymatiques chez les escargots</b>	<b>48</b>
<b>2.2.1. Effet de CdSe sur le taux de GSH</b>	<b>48</b>
<b>2.2.2. Effet de CdSe (NPs) sur les variations de l'activité de (MDA)</b>	<b>49</b>
<b>2.2.3. Effet de CdSe (NPs) sur les variations de l'activité de la glutathion-S-</b>	<b>50</b>
<b>transférase (GST)</b>	
<b>2.2.4. Effet de CdSe (NPs) sur les variations de l'activité de la glutathion</b>	<b>51</b>
<b>peroxydase (GPx)</b>	
<b>2.2.5. Effet de CdSe (NPs) sur l'activité de catalase</b>	<b>52</b>

## *III. Discussion*

<i>III. Discussion</i>	<b>53</b>
<i>Conclusion et perspective</i>	<b>59</b>
<i>Références bibliographiques</i>	<b>61</b>
<i>Annexes</i>	

## **Introduction**

Depuis la révolution industrielle, l'empreinte de l'homme sur son environnement devient de plus en plus importante. Les activités humaines sont en constante évolution et les procédés industriels changent avec chaque nouvelle avancée technologique. Depuis le début du nouveau millénaire, le domaine d'innovation qui progresse le plus rapidement est sans aucun doute la nanotechnologie (**François, 2012**). Avec les changements technologiques, la nature des contaminants émis par les activités humaines change également. Les recherches en toxicologie environnementale doivent suivre l'émergence de ces nouveaux contaminants afin de prévenir leurs impacts sur la santé humaine et l'environnement. Les nanomatériaux sont la plus récente addition à la diversité des contaminants environnementaux provenant des activités humaines (**Delay et Frimmel, 2012 ; Bioanal et Poole, 2003**).

Cependant la compréhension de leurs effets sur les organismes est encore à ses débuts. En raison de leur taille nanométrique, les nanomatériaux possèdent des propriétés physico-chimiques différentes des mêmes matériaux de plus grande taille. Ces propriétés uniques sont utilisées dans tous les domaines d'applications (**François, 2012**).

Le développement des nanotechnologies augmente le risque d'exposition aux contaminants de taille nanométrique. Le risque toxicologique de ces composés est cependant difficile à évaluer car plusieurs aspects des mécanismes de toxicité des nanomatériaux ne sont pas encore bien compris (**François, 2012**).

La toxicité des NPs métalliques a été montrée chez plusieurs organismes, cependant plusieurs questions fondamentales demeurent quant à leurs effets sur les systèmes biologiques. Leur taille à l'échelle nanométrique peut entraîner des effets toxiques nouveaux et différents qui ne sont pas encore élucidés. Pour permettre un développement responsable et sécuritaire des nanotechnologies utilisant des NPs métalliques, une meilleure compréhension des mécanismes de toxicité des NPs métalliques au niveau cellulaire est donc requise (**François, 2012**).

Il est donc nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement à travers des organismes ou un ensemble d'organismes que l'on utilise comme sentinelles en étudiant les modifications physiologiques, biochimiques et écologiques qui les affectent.

Ces êtres vivants très sensibles aux contaminants présentent l'intérêt de se prêter plus facilement que l'homme aux études des effets des polluants et permettent de mettre en évidence des pollutions chroniques ou brutales (**Little et al., 1990**).

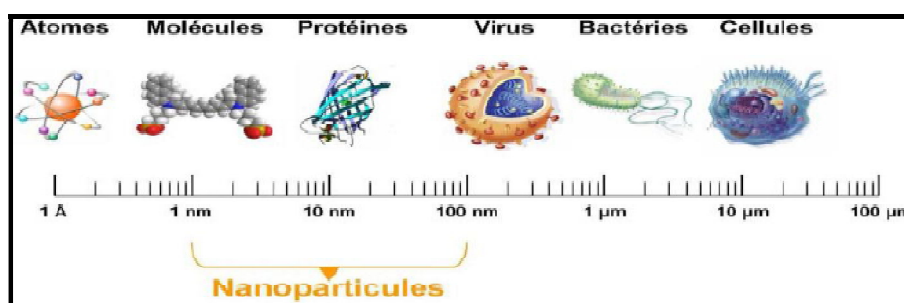
Pour cela on a fixé quelques buts à atteindre :

- ✓ Évaluation la nanotoxicité induite par séléniure de cadmium (NPs).
- ✓ Les effets de CdSe (NPs) sur les paramètres enzymatiques et non enzymatiques de stress oxydatif chez un bioindicateur présent dans les écosystèmes terrestres, l'escargot *Helix aspersa*.

## I. Généralités

### 1. Définition de nanoparticule

La nanoparticule est une particule avec un diamètre suffisamment petit pour que les propriétés physiques et chimiques diffèrent de façon mesurable de celles des matériaux en vrac (Kohler et Fritzsche, 2004). En générale, leur diamètre est inférieur à 100 nm environ (figure 01) ([www.techno-science.net](http://www.techno-science.net)).



**Figure 01:** Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques ([www.techno-science.net](http://www.techno-science.net)).

### 2. Procédure de fabrication

Il existe actuellement deux méthodes de production des nanomatériaux (figure 02).

#### 2.1. Voie descendante

Consiste à fractionner un matériau classique jusqu'à obtenir la dimension voulue. Ainsi dans le secteur de l'électronique, se sont développés, par miniaturisation, d'abord des composants micrométriques, puis des composants nanométriques (Anonyme, 2007).

#### 2.2. Voie ascendante

Permet d'assembler la matière atome par atome, pour construire des molécules. Elle concerne par exemple les nanotubes de carbone et les fullerènes. Elle fait appel le plus souvent à des méthodes physiques (pyrolyse laser, micro-ondes...) chimiques (techniques sol-gel, réactions en phase vapeur, liquide, solide...) et mécaniques. La production de nanotubes de carbone requiert d'autres méthodes (Anonyme, 2007).

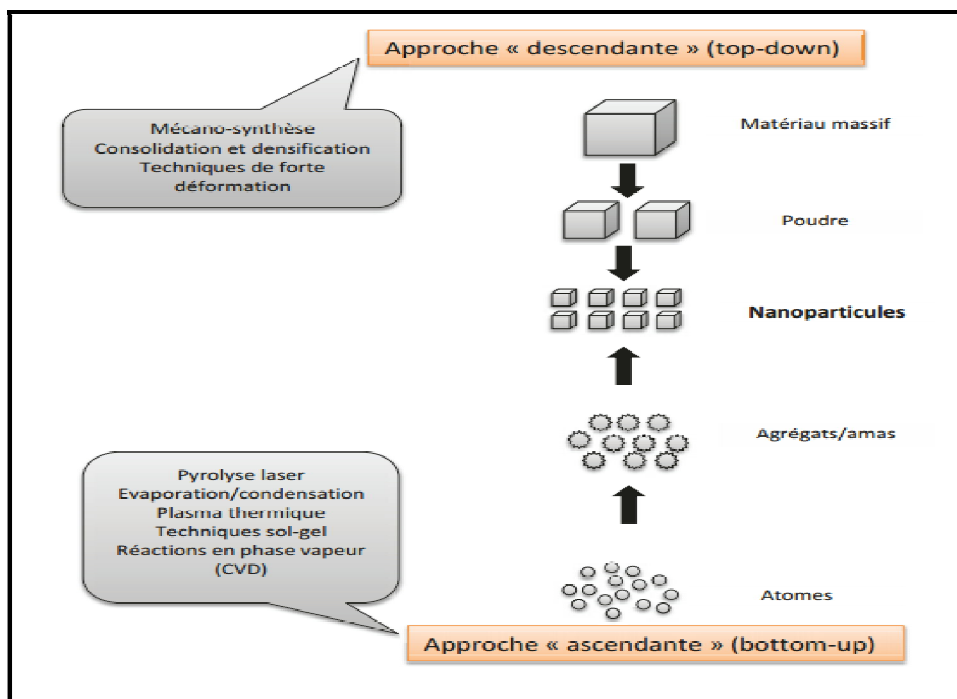


Figure 02 : Les procédés d'élaboration des nanoparticules (Anonyme, 2007).

### 3. Classification et propriétés

#### 3.1. Principales nanoparticules à base de carbone

##### 3.1.1. Les Fullerènes

Les fullerènes sont des cages constituées des atomes de carbone qui sont liés à trois autres atomes en hybridation (figure 03). La forme la plus étudiée, la plus facile et la moins coûteuse à produire, comprend 60 atomes de carbone (C<sub>60</sub>), d'un diamètre d'environ 1 nm. Les fullerènes possèdent des propriétés spécifiques ; Antioxydant, résistance physique, super conductivité, et haute tolérance des systèmes biologiques (Sano et al., 2002).

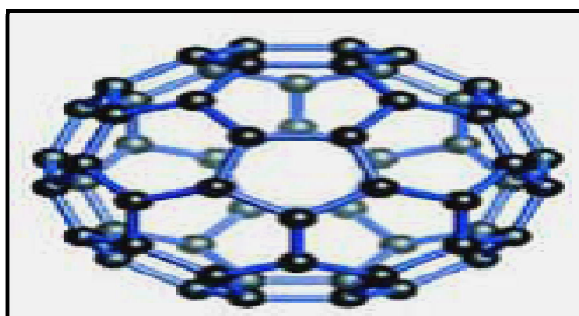


Figure 03 : Représentation schématique du fullerène C<sub>60</sub> (Sano et al., 2002).



Compte tenu de leurs propriétés intéressantes, il a été utilisé dans le domaine électronique, des piles, des cellules solaires, des cellules à combustion, pour l'entreposage des données ou l'entreposage de gaz, ou encore comme additifs dans les plastiques.

Les fullerènes pourraient être remplis de différentes substances et trouver des applications médicales notamment dans le domaine thérapeutique contre le cancer ou le virus du VIH (Claude et al, 2006).

### 3.1.2. Les nanofeuillets de graphène

Les feuillets de graphène apparaissent des propriétés électroniques, magnétiques, optiques et mécaniques uniques et des applications sont actuellement envisagées en recouvrement comme dans le domaine des composants électroniques flexibles (Claude et al., 2006).

### 3.1.3. Les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone constituent une nouvelle forme cristalline du carbone (Hett, 2004), Légers, chimiquement très stables et totalement insolubles. La résistance mécanique en tension des NTC est plus de soixante fois supérieure aux meilleurs aciers, même si leur poids est plus de six fois inférieure (Aitken et al., 2004). Ils démontrent une très grande surface spécifique et révèlent une grande capacité d'absorption moléculaire (Maynard et al., 2004).

Les NTC sont classés parmi les matériaux les plus prometteurs et les chercheurs ont décelé chez eux toute une gamme d'applications potentielles: émetteurs d'électrons, super condensateurs, entreposage de gaz dont l'hydrogène, batteries, composites structuraux (Eklund et al., 2007).

### 3.1.4. Les nanofibres de carbone

Tout comme les NTC, les nanofibres de carbone sont constituées de feuillets de graphène. Ils forment plutôt une structure en forme de cône ou de tasse. Compte tenu de ces particularités, les propriétés mécaniques et électriques des nanofibres seront différentes de celles des NTC. On envisage leur utilisation comme additifs dans les polymères, comme supports catalytiques et pour l'entreposage des gaz (Claude et al., 2006).

### 3.1.5. Le noir de carbone

Le noir de carbone est constitué de matériel graphitique, généralement d'une dimension de 20 à 70 nm. Ces particules, majoritairement sphériques, sont liées en agrégats qui interagissent fortement entre eux pour former des agglomérats. Ces derniers sont souvent commercialisés sous forme de pastilles ou de blocs et sont utilisés depuis plusieurs décennies, principalement comme pigments et agents de renforcement dans le caoutchouc, notamment pour les pneus (Claude et al., 2006).

## 3.2. Autres nanoparticules inorganiques

### 3.2.1. Les métaux

A majorité des métaux ont été ou peuvent être produits dans des dimensions nanométriques. Parmi ceux-ci, les nanoparticules d'or sont particulièrement étudiées. Leurs propriétés uniques permettent d'envisager une série d'applications, notamment comme marqueur optique pour le diagnostic médical ou comme agent de traitement contre le cancer (Hansen, 2009).

### 3.2.2. Les oxydes métalliques

Plusieurs oxydes métalliques de dimension nanométrique ont été créés mais les plus courants, car produits à grande échelle, sont probablement la silice, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc. Ils sont utilisés principalement dans la synthèse des plastiques et du caoutchouc en tant qu'agents actifs et d'additifs (SiO<sub>2</sub>), des crèmes solaires (TiO<sub>2</sub>, ZnO) et de pigments pour la peinture (TiO<sub>2</sub>). Différents oxydes métalliques sont apparus sous formes variées : nanotubes, nano-tiges, nano-flocons, etc. (Anonyme, 2008).

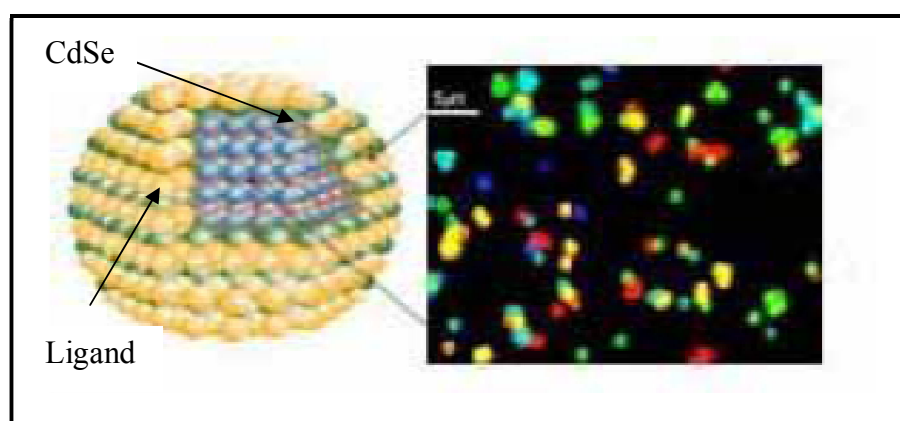
### 3.2.3. Points quantiques

Sont typiquement composés de combinaisons d'éléments des groupes II et IV ou des groupes III et V du tableau périodique. Ils ont été élaborés sous forme de semi-conducteurs, d'isolants, de métaux, de matériaux magnétiques. Le nombre d'atomes des points quantiques, qui peuvent varier de 1 000 à 100 000 (Aitken et al., 2004). Ils peuvent absorber la lumière ultraviolette (Michalet et al., 2005).

Ils se composent de plusieurs couches (figure 03). Le premier niveau est composé d'un nanocristal dont la taille doit être parfaitement contrôlée car la couleur émise

change avec le diamètre des particules. Il s'agit principalement de CdSe le deuxième niveau se compose d'une couche de polymères biocompatibles. Enfin le ligand spécifique des molécules ou cellules cibles compose la dernière couche (**Viala et Botta, 2005**).

La flexibilité des points quantiques et les propriétés optiques associées permettent d'envisager des applications dans des domaines tel le codage optique multi-couleurs dans l'étude d'expression génétique, dans des écrans à haute résolution et à haute vitesse et en imagerie médicale (**Michalet et al., 2005**).



**Figure 04:** Représentation schématique et visuelle d'un point quantique (**Michalet et al., 2005**).

### 3.3. Nanoparticules organiques

#### 3.3.1. Les polymères organiques

Plusieurs de ces polymères organiques sont à même d'être préparés sous forme de nanofils, donnant lieu à leur utilisation dans l'élaboration de systèmes d'ultrafiltration en phase liquide ou gazeuse, ou comme senseurs notamment. Certaines nanofibres organiques biodégradables pourraient être utilisées en médecine pour la réingénierie tissulaire, la régénération osseuse ou encore pour contrôler les médicaments (**Anonyme, 2008**).

#### 3.3.2. Nanoparticules d'inspiration biologique

Les NP d'inspiration biologique sont très diversifiées mais regroupent normalement des structures dans lesquelles une substance biologique est encapsulée, emprisonnée ou absorbée

à la surface. Ces structures, largement étudiées dans le domaine médical et pharmacologique (Claude et al., 2006).

#### 4. Risques des nanoparticules pour l'homme et l'environnement

##### 4.1. Effets des nanoparticules sur l'environnement

La présence de substances non naturelles dans l'environnement augmente proportionnellement à leur utilisation par l'Homme. Ainsi le développement des nanotechnologies et de leurs utilisations, aura très certainement pour conséquence une augmentation de la concentration en nanoparticules dans l'air, les eaux et les sols. Ils pourront donc atteindre les écosystèmes.

Des études commencent à montrer l'impact que pourrait avoir les NPs sur l'environnement, mais actuellement il est difficile de savoir si les NPs vont poser un problème pour l'environnement à court ou à long terme (Angelique, 2008).

##### 4.1.1. Risques pour les écosystèmes et les organismes vivants

A ce jour, peu d'études ont été menées afin d'évaluer les effets des nanoparticules sur les écosystèmes. Certaines études montrent que les nanoparticules peuvent avoir des effets néfastes sur la faune et la flore aquatique (Smith et al., 2007). De même les nanoparticules peuvent aussi avoir des effets sur la croissance des végétaux terrestres. En effet, les nanoparticules d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  sont capables d'inhiber la croissance de différentes espèces de plantes (Yang and Watts, 2005).

Enfin, certains nanoparticules peuvent fixer d'autres polluants à leur surface, ce qui dans certains cas rend moins toxique le polluant et dans d'autres cas augmente l'effet toxique (Navarro et al., 2008). Cependant, pour la plupart de ces études, des effets sont observés à des concentrations élevées qui ne reflètent probablement pas les conditions environnementales. De plus il faudrait étudier une très grande diversité de modèles et de nanoparticules pour pouvoir prédire les conséquences sur l'environnement à court ou à long terme (Angélique, 2008).

## 4.2. Effets des nanoparticules sur l'homme

### 4.2.1. Toxicocinétique des nanoparticules

Les paramètres d'absorption, de métabolisme, de distribution et d'élimination des nanoparticules demeurent très partiellement documentés (**Viala et Botta, 2005**).

### 4.2.2. Voies d'entrée et translocation des nanoparticules dans l'organisme

Les différentes voies, l'exposition, orale, respiratoire, cutanée et par injection directe, doivent être considérées indépendamment les unes des autres, car elles peuvent présenter des réponses fortement variables (**Viala et Botta, 2005**).

D'une manière générale, les activités biologiques augmentent au fur et à mesure que la taille des particules diminue, les plus petites représentent un volume moindre, ce qui se concrétise par un plus grand nombre de particules avec une plus grande aire de surface par unité de masse, c'est-à-dire une plus grande surface spécifique (exprimé en  $m^2/g$ ) (**Viala et Botta, 2005**).

Ceci explique, partiellement au moins le risque accru d'activités biologiques potentiellement toxiques. À titre d'exemple, il a été décrit que les nanoparticules d'aluminium (l'une des plus exploitées commercialement) d'un diamètre moyen de 13 nm inhibaient la croissance des racines de cinq espèces de végétaux (**Viala et Botta, 2005**).

Si l'exposition est respiratoire, les NP aéroportées inhalées pourront se déposer tout le long de l'arbre pulmonaire et non uniquement au niveau alvéolaire. De par leur extrêmement petite taille, une fraction des particules nanométriques peut franchir les organes extra-pulmonaires. Ceci implique une migration de certaines particules solides, à travers les couches épithéliales pulmonaires jusqu'aux systèmes sanguin et lymphatique de même qu'à travers les terminaisons nerveuses des nerfs olfactifs, le long des axones neuronaux jusqu'au système nerveux central (**Ostiguy et al., 2008**). A d'autre côté, l'absorption cutanée pourrait être une voie d'exposition plus importante que l'inhalation pour les travailleurs manipulant des nanomatériaux préparés et utilisés sous forme de colloïdes (**Colvin, 2003**).

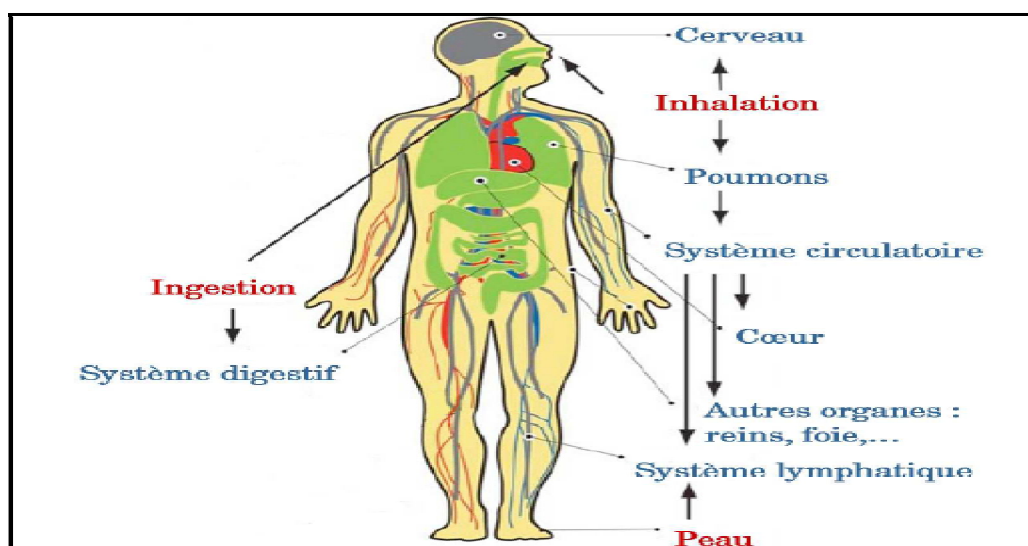
Les NP liposolubles pourraient possiblement se déplacer dans l'espace intercellulaire de la couche cornée et traverser les cellules, les follicules pileux ou les canaux sudoripares. La

zone non vascularisée de la peau pourrait également servir de réservoir pour les NP, d'où elles ne pourraient pas être éliminées par les macrophages (Monteiro and Inman, 2006).

Les NP absorbées par la peau pourront se retrouver dans la circulation systémique après avoir franchi toutes les couches de la peau (Monteiro and Inman, 2006). L'absorption peut être facilitée si la couche cornée de la peau est endommagée. De plus, les conditions d'exposition en milieu de travail (par exemple le taux d'humidité ou la pression liée à la manipulation) peuvent avoir une influence sur l'absorption cutanée (Zhao et al., 2007).

Néanmoins, des NP peuvent se retrouver dans le tractus gastro-intestinal suite à la déglutition dans le système digestif de NP provenant du système respiratoire via l'ascenseur mucociliaire. La translocation de NP de l'intestin vers le sang et la lymphe est possible (Zhao et al., 2007).

De nombreux usages thérapeutiques et diagnostiques sont attendus pour les nanomatériaux. C'est pourquoi, les expositions par voie intraveineuse ou intramusculaire seront à considérer. On observe que lors de l'administration des médicaments à base de nanoparticules par voie intraveineuse à un animal, ce médicament se concentrent essentiellement au niveau des tissus du système réticulo-endothélial, c'est à dire principalement dans le foie (Chiannil et al., 1990). Une étude décrit que 133 jours après leur injection intraveineuse, il est toujours possible d'en détecter dans les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse des souris (Hagens, 2007).



**Figure 05:** Voies d'exposition de l'homme aux nanoparticules (en rouge) et devenir dans le corps humain (bleu) (Buzea et al., 2007).

### 4.2.3. Mécanisme d'action

Une fois les NP pénétrées dans les cellules, ils interagissent avec les structures sous-cellulaires, ce qui conduit à l'induction de stress oxydatif comme principal mécanisme d'action des NPs (**Maynard and Kuempel, 2005**).

#### 4.2.3.1. Stress oxydant

In vivo et in vitro, de nombreuses études suggèrent que les NP, induisent un stress oxydatif au niveau cellulaire, particulièrement lorsqu'il y a exposition à la lumière, aux UV ou aux métaux de transition (**Oberdörster, 2005**).

Il a été démontré que les NP se localisent préférentiellement dans les mitochondries qui constituent les sites des réactions d'oxydo-réduction. Cette localisation pourrait modifier la production des formes réactives de l'oxygène et perturber ou surcharger les mécanismes antioxydants. Ainsi, le stress oxydatif cellulaire expliquerait la genèse des effets toxiques des NP manufacturées (**Oberdörster, 2005**).

#### 4.2.3.2. Réaction inflammatoire

L'inflammation est une réaction non spécifique à toute agression vis-à-vis de l'organisme. La littérature au sujet des particules montre que les NP induisent une réaction inflammatoire plus importante que la réaction induite par les mêmes particules, mais de taille micrométrique. Cette réaction inflammatoire, associée à l'induction d'un stress oxydant, peut diminuer progressivement. Si non, la réponse inflammatoire entraînera la dysfonction de l'organe (**Oberdörster, 2005**).

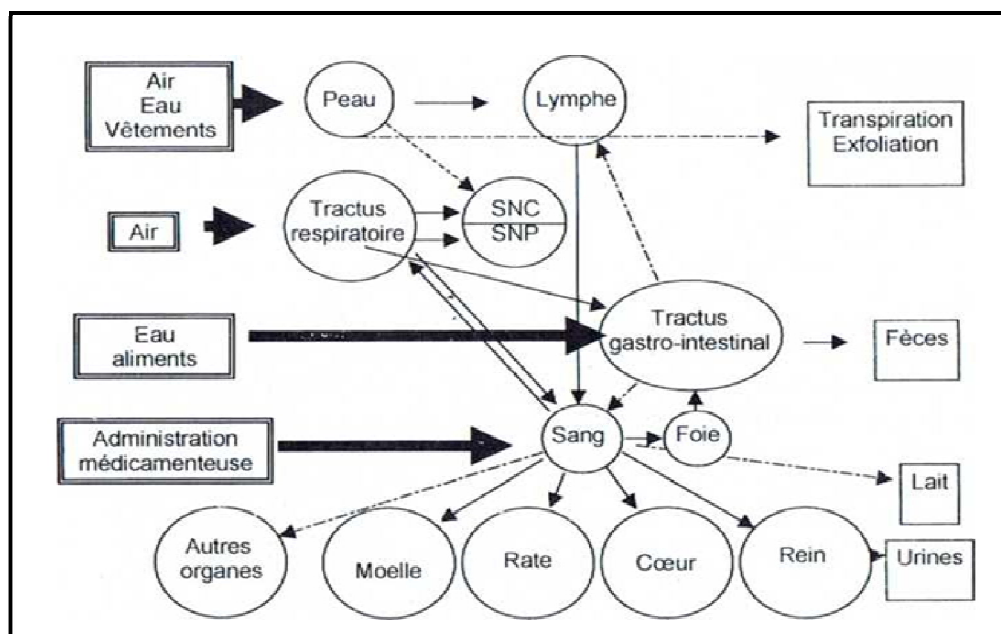
### 4.2.4. Elimination

L'élimination des nanomatériaux est encore très mal connue et dépend essentiellement de la voie d'exposition et des paramètres physico-chimiques du matériau étudié (taille, état de surface...). Pour les nanomatériaux présents dans la circulation systémique, on cite souvent la voie classique d'élimination rénale, comme c'est le cas pour les fullerènes et les nanotubes de carbone. Une autre voie a été suggérée pour les nanoparticules de polystyrène, le foie avec excrétion dans la bile (**Furumoto et al., 2001**).

Dans les voies aériennes, il faut distinguer :

- ✓ Les nanoparticules solubles seront éliminées par dissolution, ce processus d'élimination chimique se produit dans le tractus respiratoire.
- ✓ Les nanoparticules insolubles ou peu solubles sont éliminées en 1 à 2 jours par l'action des cellules ciliées assurant une élimination physique.

Mais dans le cas d'une ingestion de ces particules, un petit nombre d'études a été réalisé sur leur élimination, certaines montrent une élimination rapide essentiellement dans les selles, le reste dans l'urine, et un passage de petite partie dans le sang (figure 06) (**Oberdörster, 2000**).



**Figure 06 :** Les sources d'exposition, la biodistribution et l'élimination des nanoparticules dans l'organisme (**Viala et Botta, 2005**).

### 4.3. Effets sur la santé humaine

Plusieurs études montrent que de forte concentration en particules fines ont un impact à court terme sur l'état de santé en particulier en ce qui concerne des problèmes respiratoires, cardiovasculaires (**Peters et al., 1997**) et d'autre au niveau de cerveau, on pourrait néanmoins envisager la possibilité de formation d'œdèmes cérébraux pouvant mener à des lésions cérébrales et des pathologies neurologiques (**Roney et al., 2005**).

Les études in vivo permettent de déterminer les effets directs des nanoparticules. Cependant elles restent des études ne représentent pas forcément la réalité des effets sur



l'homme, elles montrent que les NPs peuvent être responsables de pathologies, principalement au niveau des organes directement exposés mais aussi dans tous les autres organes. Cependant, il faut noter que la nature et l'intensité des effets dépendent des caractéristiques des nanoparticules. De plus ces études sont la plupart du temps réalisées avec de fortes concentrations en nanoparticules (Ostiguy et al., 2008).

Enfin à l'heure actuelle, il manque beaucoup d'informations pour pouvoir établir une liste exhaustive des effets des nanoparticules sur la santé humaine en fonction de leurs natures et/ou de leurs caractéristiques (Ostiguy et al., 2008).

## II. Nanoparticule de Séléniure de cadmium

### 1. Définition

Le séléniure de cadmium est un composé inorganique à la formule CdSe, qui est classé comme un semi-conducteur II-VI, c'est-à-dire issu de l'interaction d'atomes de cadmium (colonne II) de la classification périodique et d'atomes de sélénium (colonne VI) (Florence, 2014).

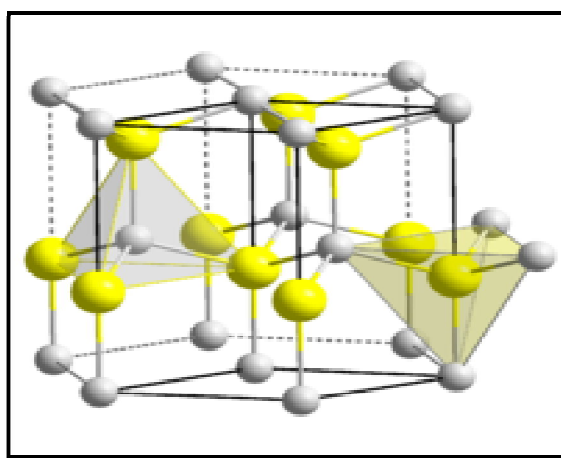
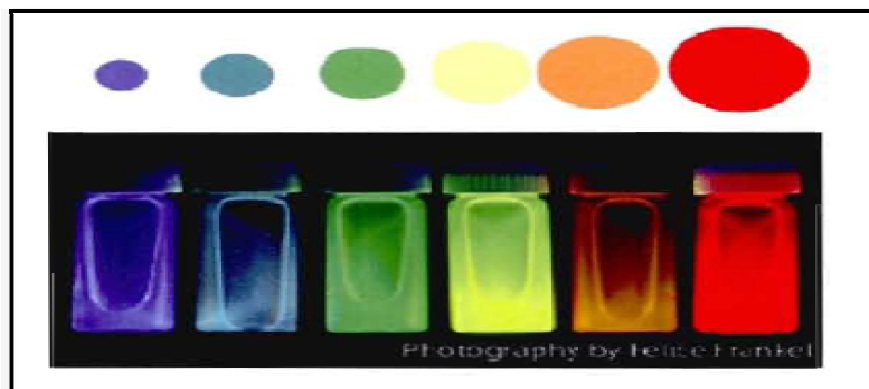


Figure 07 : Structure chimique de CdSe (NP) (Florence, 2014).

### 2. Propriété

Les études montrés que la morphologie de la nanoparticule de CdSe est pas uniforme et contient de nombreux petits NPs irréguliers, et moyenne de leur taille des particules est d'environ 15 nm (Zhang et al., 2002). Il synthétisé sous forme de poudre présente une structure hexagonale (Punita and Kedar, 2012).

Ces NPs ont attiré beaucoup d'attention en raison de leur photo- et électroluminescence, propriétés de taille-dépendant et des applications prometteuses électrique (**Murray et al., 1993**), en particulier sous forme nanocristalline fluorescent, c'est-à-dire sous un rayonnement UV, il peut émettre de la lumière (figure 08).



**Figure 08** : Nanocristaux de semi-conducteur de CdSe soumis à des rayons UV, dont la taille varie de 2 nm (bleu) à 8 nm (rouge) (**Sullivan, 2007**).

### 3. Application

Un conduit à NP de CdSe à utiliser pour des dispositifs optoélectroniques, un laser diodes (**Ding et al., 2004**). Ces propriétés construisent nanostructures semi-conducteur convenant à plusieurs types d'applications, de revêtements anti-réfléchissants (**Park et al., 2004**), pour la détection biomoléculaire (**Tansil and Gao, 2006**) et des dispositifs d'émission de lumière (**Colvin et al., 1994**).

### 4. Synthèse de CdSe

La synthèse typique de CdSe contient la poudre très pure  $\text{CdCl}_2$  (99.9%), le sélénium élémentaire (99.999%), Ethylène glycol et l'hydrate d'hydrazine. Dans ce procédé de synthèse,  $\text{CdCl}_2$  (4g) et le sélénium élémentaire (2g) a été prise avec déionisée l'eau, l'éthylène glycol et l'hydrazine dans un rapport volumique spécifique, dans une capacité de 200 ml fiole conique. Ensuite, la solution a été chauffée au reflux sous agitation forte à  $60^\circ\text{C}$  pendant 6 heures. Les précipités noirs a été recueilli et lavé avec de l'éthanol et eau distillée à plusieurs reprises, puis sous vide à  $50^\circ\text{C}$ , pendant 5h (**Punita and Kedar, 2012**).

## 5. Toxicologie

Aujourd'hui la NPs de CdSe est plus utilisée dans le domaine médical, généralement sous forme du quantum dots, qui possèdent des effets délétères vis-à-vis de l'environnement et de la santé. Le potentiel toxique de quantum dots dépendra de ses propriétés physico-chimiques, c'est-à-dire de la nature chimique du noyau (constitué de CdSe), de l'enveloppe qui rendra la nanoparticule biocompatible (**Viala et Botta, 2005**).

La stabilité des recouvrements de surface du quantum dots conditionne leur toxicité à long terme. La désagrégation de ces enveloppes peut entraîner la mise en contact des systèmes biologiques avec le noyau de la particule (**Viala et Botta, 2005**). In vitro, ces nanoparticule peuvent être internalisés par endocytose dans de nombreux types cellulaires et peuvent persister à l'intérieure des cellules pendant plusieurs semaines. In vivo, les sources potentielles d'expositions aux ces nanoparticules devraient être l'environnement, le poste de travail, les administrations médicales à visées diagnostique et thérapeutique. Ainsi, les expositions par voie cutanée, par inhalation, ingestion ou injection sont possibles (**Viala et Botta, 2005**).

Le cadmium est en effet réputé pour sa toxicité même à de très faibles concentrations. La distribution systémique de CdSe a été documentée chez les rongeurs, ainsi que les phénomènes d'accumulation dans divers organes (**Viala et Botta, 2005**).

## 1. Stress oxydatif

Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydants (**Angelos et al., 2005**).

## 2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié) (**Angelos et al., 2005**) sur son orbitale externe (couche de valence). Cet électron célibataire offre une très grande réactivité chimique. Ces radicaux libres sont produits dans tous les tissus et cellules de l'organisme et peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acide nucléiques (**Angelos et al., 2005**).

## 3. Origine des radicaux libres

Deux origines des radicaux libres : endogène et exogène.

### 3.1. Endogène

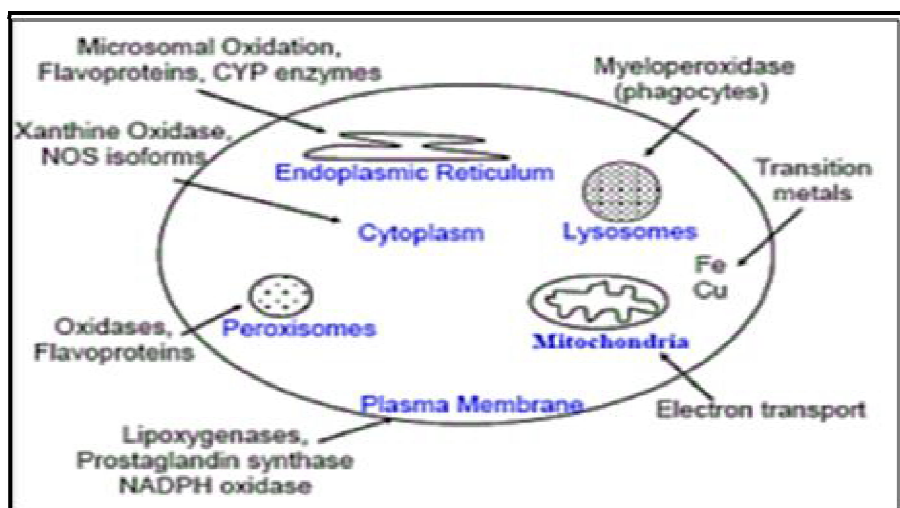
Les précurseurs des ROS, l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  peut provenir de plusieurs sources cellulaires. Il est formé après réduction de l'oxygène  $O_2$  par un électron et en présence d'un cofacteur. Cet anion est très instable et peut traverser la membrane plasmique (**Mao and Paznausky, 1992**). Les différents enzymes permettant cette réaction sont :

- ✓ Les NADPH oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent  $O_2^{\cdot -}$  en utilisant NADH ou NADPH comme substrat.
- ✓ La xanthine-oxydase joue un rôle important dans la production des ROS (particulièrement  $O_2^{\cdot -}$  et  $H_2O_2$ ), lors de l'ischémie/reperfusion (**Belkheiri, 2010**).

Aussi les cyclo-oxygénases ou COX, les lipo-oxygénases, les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome  $P_{450}$ ) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (**Mao et Paznausky, 1992**).

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase capable d'utiliser l'oxygène pour produire de grandes quantités d'anion superoxyde dans la membrane cellulaire (**Mao et Paznausky, 1992**).

Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est elle aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthéases (ou NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production des radicaux libres oxygénés (**Mao et Paznausky, 1992**).



**Figure 09** : Source endogènes des espèces réactives (**Ben Aissa et Mebarkia, 2015**).

### 3.2. Exogène

Les facteurs environnementaux contribuent également à la formation d'entités radicalaires ou de ROS, ou dans les phénomènes d'irradiation UV, X, gamma, réaction photochimique. En outre, les champs électriques, des résidus de la fumée de cigarette, l'alcool ou même certains médicaments sont une source importante des radicaux libres par oxydation des composés au niveau du cytochrome P<sub>450</sub> (**Favier, 2003**).

### 4. Site de production des radicaux libres

Le principal site de production des radicaux libres est la membrane mitochondriale. En effet 95% de l'oxygène utilisé par la cellule est réduit en eau dans la mitochondrie en vue de la formation d'ATP. Cette réaction fait intervenir en particulier le coenzyme Q. Il peut se produire une fuite d'électrons au niveau de ce coenzyme par la NADH-coenzyme Q réductase, la coenzyme Q-cytochrome-C réductase et le cytochrome-C oxydase (**Jacques et André, 2008**).

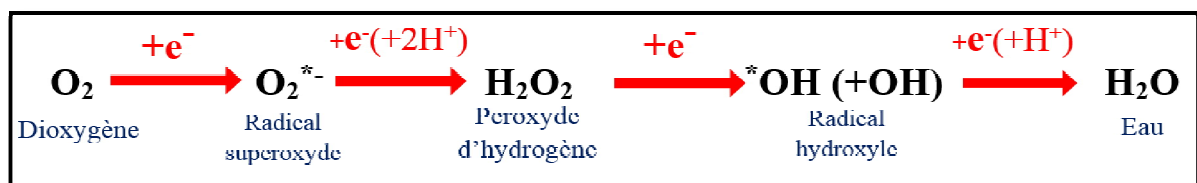
Elle aura pour conséquence la formation de radicaux libres qui dépend de l'oxygène. Ainsi 5% de l'oxygène qui transite au niveau de la mitochondrie devient de l'anion

superoxyde. Cela représente une quantité non négligeable de composés potentiellement toxiques produits quotidiennement au sein des cellules de l'organisme (**Jacques et André, 2008**).

## 5. Types des radicaux libres

### 5.1. Radicaux libres de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des molécules contenant de l'oxygène, mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de l'oxygène présent dans l'air (**Mac, 2007**). L'oxygène peut subir des étapes successives de réduction conduisant à la formation d'ERO (**Barouki et Morel, 2001**), par les électrons circulant à travers la chaîne des transporteurs d'électrons donne naissance à l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ). L'anion superoxyde ainsi formé se trouve rapidement transformé en  $H_2O_2$  par le superoxyde dismutase (SOD) qui de ce fait joue un rôle important dans la lutte contre le stress oxydant et dans la mesure où  $H_2O_2$  est moins réactif que  $O_2^{\bullet -}$  (**Haliwell et Gttridge, 1986**).

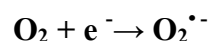


**Figure 10** : Réduction monovalente de l'oxygène (**Haliwell et Gttridge, 1986**).

#### 5.1.1. Radicaux superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ )

Les radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet -}$  sont des radicaux chargés négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron (**Haliwell et Gttridge, 1986**).

Ils sont peu réactifs par eux-mêmes, mais dont la toxicité provient du fait qu'ils donnent naissance à des composés plus réactifs (**Delattre, 2003**). Il est produit au cours de la respiration mitochondriale physiologique, environ 2% de l'oxygène utilisé par la chaîne respiratoire aboutit à la formation d'anion superoxyde à la suite de la réaction suivante :



La NADPH oxydase est également une source importante d'anion superoxyde (**Palier, 1991**).



### 5.1.2. Radicaux hydroxyle (OH<sup>•</sup>)

Le radical hydroxyle est un des oxydants les plus réactifs et le plus dangereux du système biologique réagit avec les lipides, polypeptides, protéines, et ADN, spécifiquement les deux bases azotiques la thymine et la guanine (Sayre et al., 2008). Il existe également d'autres radicaux libres hydroxyles représentés par les radiations ionisantes, le rayonnement ultraviolet et les ultrasons (Delattre, 2003).

### 5.1.3. Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Au niveau de la mitochondrie, sous l'action catalytique du superoxyde dismutase (SOD), le radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) est réduit en peroxyde d'hydrogène.



L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bien que n'étant pas un radical libre joue un rôle important dans le stress oxydant. Le peroxyde d'hydrogène, est un oxydant très puissante moins réactif que certains autres EROs qui provoque des dommages causés par oxydation aux macromolécules (Stief, 2000).

Le peroxyde d'hydrogène à faible concentration active la signalisation et pourrait être impliqué dans des réponses physiologiques comme le cycle de Krebs, la croissance, la régulation du calcium (Stief, 2000).

### 5.1.4. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes

De façon physiologique, les ERO existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Et contribuent à la synthèse de l'ADN, des hormones stéroïdes, des acides biliaires, des acides gras insaturés, aux réactions dépendantes de la vitamine B12, à la biosynthèse des mitochondries, Ils sont les médiateurs de multiples fonctions de signalisation (signaux redox) et de transcription essentielles pour le fonctionnement normal et la survie des cellules, ainsi que de la programmation de leur élimination. Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire (Ben Aissa et Mebarkia, 2015)

Elles servent dans la régulation de phénomène de l'apoptose. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'EOA pour percer la paroi membranaire de l'ovule (**Hare, 2004**).

## 5.2. Espèces réactives de l'azote

### 5.2.1. Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique) est un radical libre ubiquitaire synthétisé à partir de l'arginine grâce à l'action d'enzymes appelées NO synthases.

Le monoxyde d'azote est susceptible de réagir avec d'autres radicaux libres pour former des espèces oxydantes. Ainsi il est capable de réagir avec O<sub>2</sub> pour donner le peroxyde ONOO<sup>-</sup>, oxydant puissant vis-à-vis de nombreuses molécules biologiques (**Arora, 2002**).

### 5.2.2. Nitrique dioxyde (N O<sub>2</sub>)<sup>·</sup>

Formé à partir de la réaction du radical peroxyde avec NO. Le nitrique dioxyde est un puissant déclencheur de la peroxydation lipidique par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés (**Moncada, 1993**).

### 5.2.3. Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)

Le peroxyde ONOO<sup>-</sup> est un oxydant puissant résultant de la réaction du radical NO<sup>·</sup> avec le peroxyde (**Delattre jacques, 2003**)



### 5.2.4. Rôles physiologiques des espèces réactives de l'azote

Le NO<sup>·</sup> est un agent vasodilatateur qui intervient dans la relaxation des muscles lisses. Au niveau cardiaque, il peut modifier la contraction cardiaque en modulant les flux calciques. Le NO<sup>·</sup> intervient également dans les phénomènes de neurotransmission et les réactions inflammatoires en tant qu'agent cytotoxique (**Migdal et Serres, 2011**).

## 6. Conséquence moléculaire de stress oxydant

Les dommages induits par les ROS sont : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) (**Hulbert, 2005**).



## 6.1. Peroxydation lipidique

La Peroxydation lipidique a été définie comme la détérioration oxydative des acides gras poly insaturés (> 2 doubles liaisons) tels que les acides linoléique (C18 :2), linoléique (C18 :3), arachidonique (C20 :4). Elle comporte trois étapes l'initiation, la propagation et la terminaison (**Delattre, 2003**).

### 6.1.1. Initiation

L'attaque par un radical  $\text{OH}^\bullet$  du groupement méthylène ( $\text{CH}_2$ ) présent entre deux doubles liaisons d'acide gras polyinsaturés produit un radical carboné  $\text{R}^\bullet$  ( $\text{OH}^\bullet$  enlève un atome d'hydrogène du  $\text{CH}_2$  puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués), en présence d' $\text{O}_2$  le radical carboné est transformé en radical peroxyde  $\text{RO}_2^\bullet$  (**Martizez, 1995**).

### 6.1.2. Propagation

Le radical  $\text{RO}_2^\bullet$  enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical  $\text{R}^\bullet$  puis un radical  $\text{RO}_2^\bullet$  une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions ( $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ ), les hydro peroxydes ( $\text{ROOH}$ ) formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décompositions (**Martizez, 1995**). Qui représente les principaux marqueurs de la peroxydation lipidique (**Serafini et al., 2000**); le malondialdéhyde (MDA), l'isoprostane, les acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) qui sont les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (**Martizez, 1995**).

### 6.1.3. Terminaison

Cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydant dite 'briseur de chaîne' (**Martizez, 1995**). La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (**Martizez, 1995**).

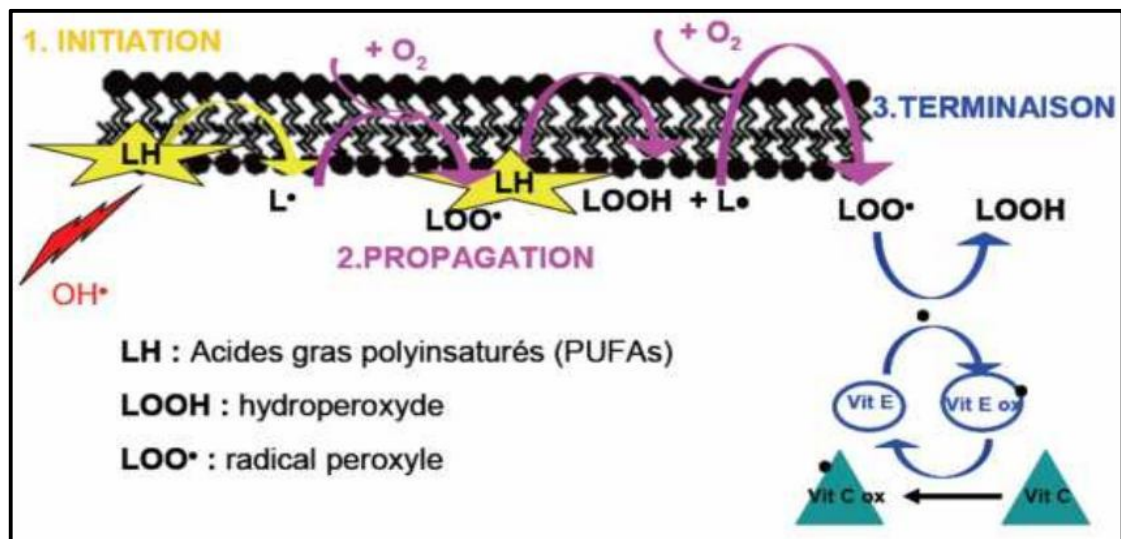


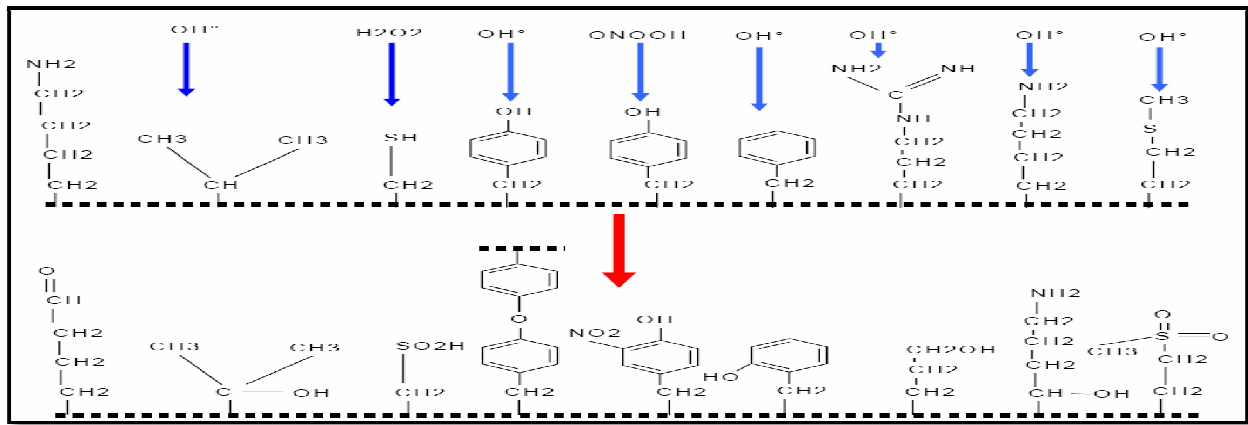
Figure 11 : Réactions de la peroxydation lipidique (Ben Aissa et Mebarkia, 2015).

## 6.2. Oxydation des protéines

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des ERO, soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne (Valko *et al.*, 2007). Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfohydryle (SH) (Favier *et al.*, 1995), notamment les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) (Valko *et al.*, 2007).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles sont rendues vulnérables à l'action des protéases et notamment du protéasome (Levine *et al.*, 1995)

Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier *et al.*, 1995).



**Figure 12 :** Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Valko *et al.*, 2007).

Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines (Ben Aissa et Mebarkia, 2015).

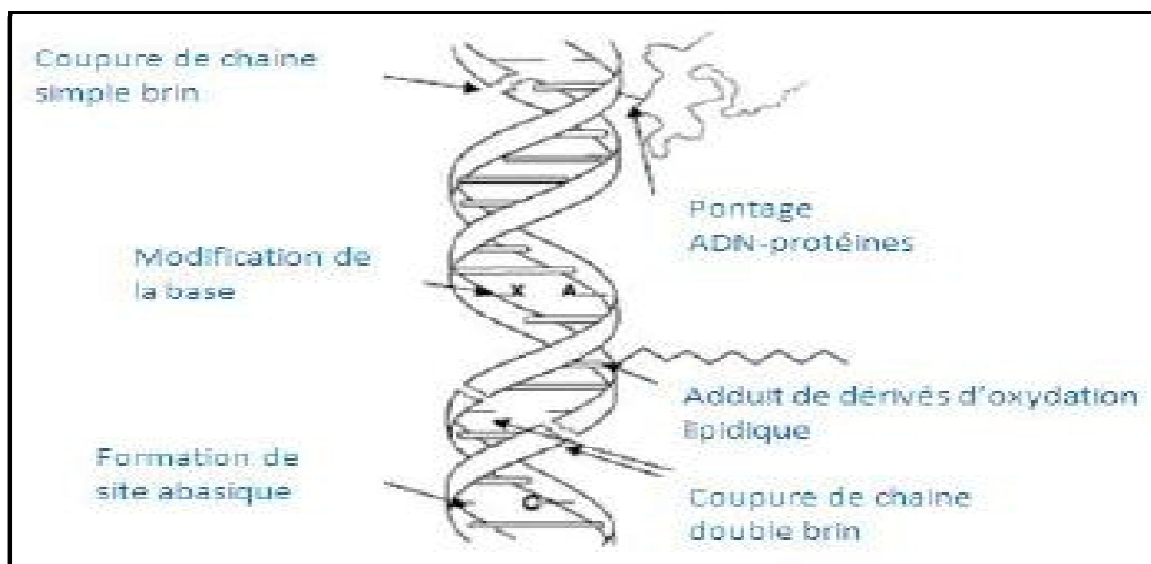
Les carbonyles protéinés sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés. L'histidine, la proline, l'arginine et la lysine. La formation de nitrotyrosines est due au peroxy-nitrite hautement toxique, produit par la réaction du monoxyde d'azote et du superoxyde (Ben Aissa et Mebarkia, 2015).

### 6.3. Dommages de l'ADN

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant (Garait, 2006).

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitroguanine, forme amidopyrimidine, 8 oxo adénine, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone. Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés (Favier, 2003).

L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), résultant des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine. Le rôle des nombreux métaux fixés à l'ADN, qui est un poly anion (Fe, Mg, Zn, Cu, Ni, Cd...), est crucial pour amplifier ou orienter le profil de ces lésions. Cette attaque de l'ADN est quotidienne (Favier, 2003).



**Figure 13** : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (Stevnsner et *al.*, 2002).

## 7. Les systèmes de défenses antioxydants

### 7.1. Définition

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydants.

Les antioxydants, « substances présentes en faible quantité capables de retarder ou de prévenir l'oxydation d'une substance oxydante » (Hozawa et *al.*, 2007).

### 7.2. Sources des antioxydants

On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine,

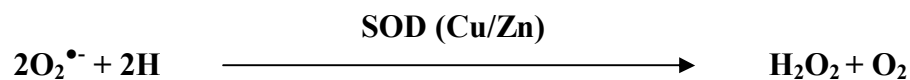
céruleoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Hozawa et al., 2007).

### 7.3. Systèmes antioxydants enzymatiques

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l' $O_2^{\bullet-}$  et du  $H_2O_2$  conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire. (Stevnsner, 2002).

#### 7.3.1. La uperoxyde dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases (SOD) sont les premières enzymes à intervenir dans la cascade des ROS. Ce sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène, selon la réaction suivante (Stevnsner, et al., 2002):



La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique. Tels que :

- ✓ Le cuivre et le zinc dans l'isoforme (Cu-Zn SOD) présent dans le cytosol, les chloroplastes, le noyau et l'apoplasme.
- ✓ Le fer dans l'isoforme (Fe SOD) présent au niveau des chloroplastes (Leyral et Viering, 2007).
- ✓ Le manganèse dans l'isoforme (Mn SOD) présent au niveau des mitochondries et des peroxysomes (Stevnsner et al., 2002).

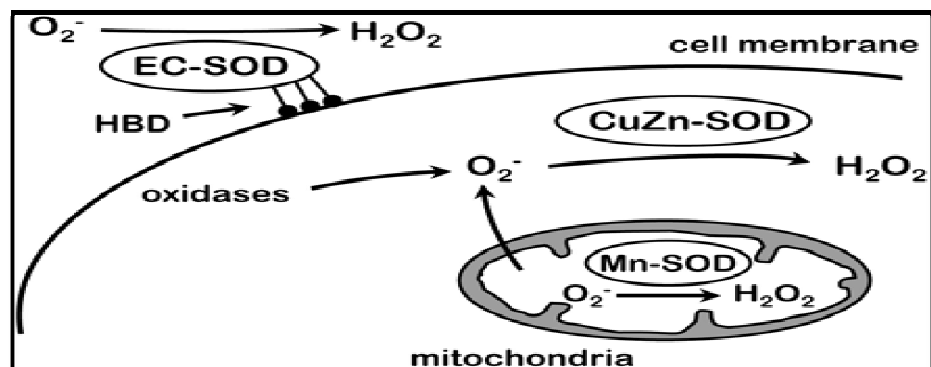
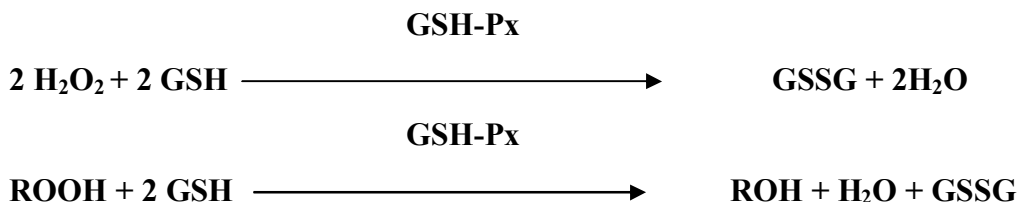


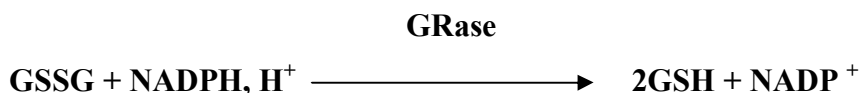
Figure 14: Les trois types de la SOD (Stevnsner T et al., 2002).

### 7.3.2. La glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase (GSH-Px) est une sélénoenzyme présente dans le sang, les membranes et le cytosol. En présence de glutathion réduit (GSH), elle réduit l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et les hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH).



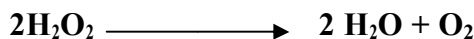
L'efficacité de la GSH-Px est liée à un flux constant de GSH, et elle est couplée à l'oxydation du glucose-6 phosphate en 6-phospho gluconate, source de  $\text{NADPH}_2$  qui est utilisé comme cofacteur par la glutathion réductase (GRase) pour régénérer le GSH :



La glutathion peroxydase (GSH-Px) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$ . Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique. (Stevnsner et *al.*, 2002).

### 7.3.3. La catalase (CAT)

La catalase est localisée dans les peroxysomes et les hématies ; c'est une enzyme tétramérique et capable d'éliminer  $\text{H}_2\text{O}_2$  selon la réaction suivante:



La CAT possède 4 sous unités comprenant chacune un atome de fer sous forme  $\text{Fe}^{3+}$ . Elle est majoritairement retrouvée dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales (Baudin, 2007).

C'est une enzyme qui possède un turnover important : une molécule de CAT peut convertir en une minute environ 6 millions des molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (Valko et *al.*, 2007).

## 7.4. Les systèmes antioxydants non-enzymatique

Les systèmes antioxydants non enzymatiques sont des nutriments naturellement apportés par l'alimentation ou par des composé endogènes. Ils peuvent avoir un rôle de «scavanger», c'est à dire qu'ils ont la capacité de piéger les entités oxydantes en captant leur électron libre et en formant ainsi des entités plus stable qui pourront être éliminées par d'autres systèmes antioxydants (**Lauwerys et al., 2007**).

### 7.4.1. Glutathion (GSH)

Il s'agit d'un tripeptide qui joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant. Le glutathion (GSH) peut interagir directement avec les espèces oxygénées activées mais il est principalement utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydés (**Jones, 2002**).

Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer, les autres propriétés anti-oxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et c, à partir de leur forme radicalaire (**Haleng et al., 2007**).

### 7.4.2. Vitamine C

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins.

La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des EOA. Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer (**Haleng et al., 2007**).

### 7.4.3. Coenzyme Q

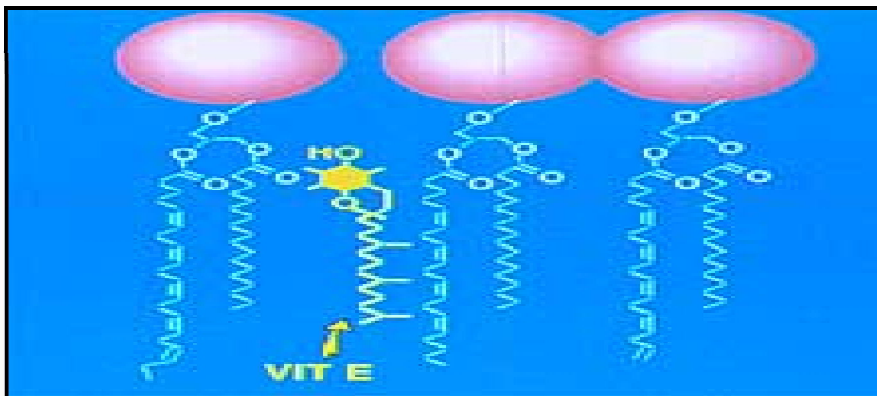
Le coenzyme Q est un composé hydrophobe qui se situe dans les membranes cellulaires. Il appartient à la chaîne de respiration mitochondriale et permet le transport

d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Il est également présent dans les lipoprotéines où il a un effet antioxydant : il inhibe la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxydes. Son effet antioxydant s'exerce aussi au niveau de l'ADN et des protéines, étant donné que le coenzyme Q est le seul antioxydant liposoluble endogène (**Esterbauer et al., 1992**).

Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (**Haleng, 2007**).

#### 7.4.4. Vitamine E ( $\alpha$ - tocophérol)

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols (alpha, beta, gamma, delta). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. De tous les tocophérols, ce sont l'alpha et le gamma qui possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes (**El-Sohemy et al., 2002**).



**Figure 15:** Insertion de la vitamine E au sein de la membrane lipidique. (**El-Sohemy et al., 2002**).

La vitamine E sera consommée en réponse à un stress oxydant. Une valeur de vitamine E inférieure à 7 – 8 mg/ml correspond à un risque modéré de déficience en cette vitamine dans l'alimentation. La vitamine E étant transportée par les lipides, sa concentration doit toujours être standardisée par rapport au cholestérol (rapport Vitamine E/Cholestérol) ou aux lipides totaux (**El-Sohemy et al., 2002**).



#### 7.4.5. Les caroténoïdes

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, mais seul un petit nombre d'entre eux se retrouvent dans le sang et les tissus animaux (**Haleng et al., 2007**).

Par dégradation, certains caroténoïdes comme le  $\beta$ - carotène sert de précurseurs à la vitamine A dont le rôle est primordial dans la perception visuelle. La plupart des caroténoïdes et vitamine A interagissent avec l'oxygène singulet et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras polyinsaturés (**Gey et al., 1993**). Parmi d'autres caroténoïdes intéressants pour leurs propriétés antioxydantes, citons également le lycopène présent dans la peau de la tomate, la lutéine, le  $\beta$ - cryptoxanthine, la zéaxanthine (**Rissanen et al., 2002**).

#### 7.4.6. Acide urique

Issu du catabolisme des purines, l'acide urique est soit éliminé dans les urines, soit excrété par la bile et l'intestin où il sera dégradé en allantoiné par l'uricase des bactéries coliques. L'acide urique est un puissant réducteur des radicaux libres : il réduit les radicaux peroxydes, hydroxydes et neutralise aussi l'anion superoxyde. L'acide urique représente 60 % de la capacité antioxydant plasmatique (**Esterbauer et al., 1992**).

L'acide urique augmente lors d'un stress oxydant, principalement lors de phénomènes d'ischémie – reperfusion (**Ernster and Daliner, 1995**).

#### 7.4.7. Les oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydants requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium (**Curien, 2001**).

## I. Matériel et méthodes

Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire de Toxicologie du département de biologie de l'université Larbi Tébessi de Tébessa.

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est un gastéropode pulmoné l'escargot petit gris '*Helix aspersa*' dont la position systématique selon (Bonnet et Vrillon, 1990) est la suivante:

Ce sont des mollusques gastéropodes de la sous-classe des pulmonés. Ces animaux sont dotés d'un "poumon" constitué par un épithélium vascularisé tapissant la cavité palléale dans laquelle l'air atmosphérique pénètre par un orifice appelé pneumostome (Coeurdassier, 2001). L'espèce *Helix aspersa* présente plusieurs sous espèces dont les principales sont *Helix aspersa aspersa*, *Helix aspersa elata* et *Helix aspersa maxima* selon (Bonnet et Vrillon, 1990).

##### 1.1.1. Morphologie d'*Helix aspersa*

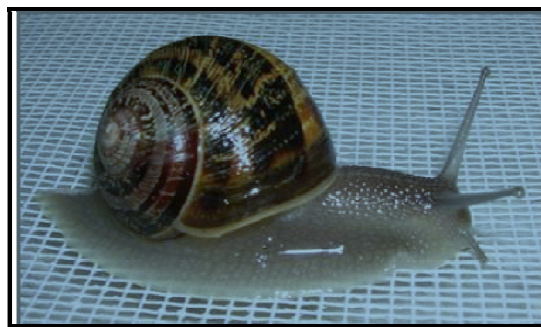
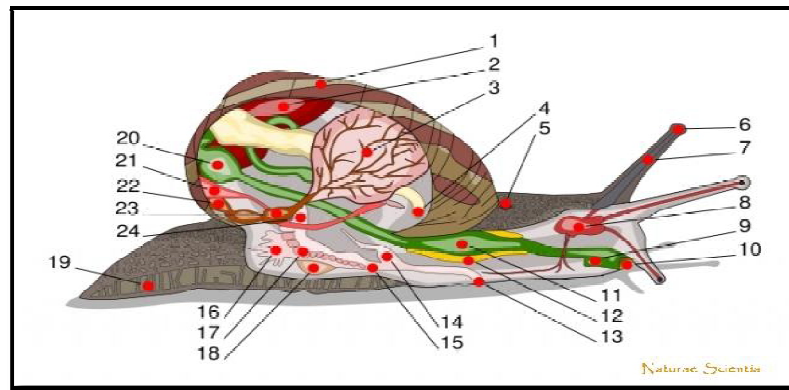


Figure 16 : Le petit gris (*Helix aspersa*) (Daguzan, 1981)

##### 1.1.2. Anatomie d'*Helix aspersa*

Le corps d'un escargot consiste en un pied unique, une tête et une masse viscérale enroulée placée dans la coquille, la (figure17) montre l'anatomie d'*Helix aspersa*.



**Figure 17 : Anatomie de l'escargot (www.naturae-scientia.com)**

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

### 1.1.3. L'espèce en milieu naturel

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

### 1.1.4. Rythme d'activité

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

### 1.1.5. Estivation et hibernation

Une absence prolongée d'humidité provoque l'estivation d'*Helix aspersa* (**Chevallier, 1992**). L'animal se fixe alors sur un support en fermant l'ouverture de sa coquille par un voile de mucus solidifié : l'épiphragme.

Il reprend son activité lorsque les conditions environnementales sont plus favorables. Lorsque la température moyenne devient inférieure à 15° C, les escargots se mettent en hibernation en se "collant" sur un support ou en s'enfouissant dans le sol ou la litière et secrètent un épiphragme d'hiver. Dans une atmosphère humide, le processus d'hibernation s'effectue en dessous de 5° C. Le raccourcissement de la durée de jour semble avoir également une action sur la mise en hibernation (**Bailey, 1981**).

#### 1.1.6. Croissance

Quatre phases de croissance ont été définies en fonction de la taille et de la masse des animaux mais aussi de leur différenciation sexuelle:

- ✓ Phase infantile durant laquelle le tractus génital est non différencié chez des animaux de 0,02 à 0,6 g,
- ✓ Phase juvénile relative à un tractus génital qui s'organise et à une gamétogenèse active. La masse est comprise entre 0,6 et 6,0 g.
- ✓ Phase de maturation sexuelle ou phase préadulte durant laquelle les glandes annexes femelles se développent. Elle concerne des escargots non bordés (absence d'épaississement du péristome) de plus de 6 g.
- ✓ La phase adulte à croissance nulle durant laquelle les animaux sont aptes à se reproduire, ils sont alors bordés et pèsent entre 6 et 14 g (**Gomot, 1997**).

En général, la croissance naturelle jusqu'au stade adulte s'étale sur deux ans si bien que les individus sont le plus souvent considérés comme sexuellement matures à partir du deuxième ou troisième été suivant leur naissance (**Chevallier, 1982**). Cette croissance se fait par pallier, au rythme des estivations et hibernations.

Les facteurs qui influencent la croissance sont la température, l'humidité ambiante, l'éclairement (longueur d'onde, intensité et photopériode) ainsi que la nature du sol et de la nourriture (**Gomot, 1997**). La durée de vie moyenne d'un escargot en milieu naturel est de 6 à 7 ans (**Gomot, 1995**).

#### 1.1.7. Reproduction

La période de reproduction commence au début du mois de mai et dure jusqu'à la mi-septembre. L'accouplement implique une fécondation réciproque par échange de spermatophores entre les deux partenaires. Cette règle n'est cependant pas absolue et certains

individus se comportent soit comme mâle soit comme femelle. L'autofécondation n'a été que très rarement constatée chez les escargots du genre *Helix* et jamais pour *Helix aspersa aspersa*. La durée entre l'accouplement et la ponte varie en fonction des conditions du milieu. En conditions optimales, elle est d'une dizaine des jours mais ce délai peut atteindre un voire deux mois suivant les conditions d'environnement (**Daguzan, 1981**) (**Zootechn et Chevallier, 1992**).

Pour pondre, l'escargot creuse une cavité de quelque centimètres de profondeur dans le sol, y dépose ses œufs puis rebouche le "nid de ponte". Le nombre moyen d'œufs par ponte varie de 80 à 130 pour des individus de différentes origines (**Madec, 1983**).

### 1.1.8. Choix du modèle biologique 'l'escargot terrestre *Helix aspersa*'

Pour déterminer les effets des nanoparticules étudiés, il est nécessaire de disposer de modèle biologique représentatif du milieu étudié. Au sens écologique général, un bio indicateur 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 bioaccumultrices.

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**).

## 1.2. Matériel chimique

Dans ce travail, nous avons utilisé le séléniure de cadmium (CdSe) à deux doses, de 1.2 µg/ml/g (DL<sub>50</sub>/3) et de 2.4 µg/ml/g de poids frais de l'escargot (**Jackson et al., 2012**).

## 2. Méthode d'élevage et traitement

Les escargots utilisés dans notre expérimentation sont des adultes, et leurs poids variés entre 7 g et 15 g, collecté de la région de Bekkaria (Tébessa).

### 2.1. Remise en activité des animaux avant les tests de toxicité (traitement à CdSe)

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



**Figure 18** : Nourriture d'*Helix aspersa* au laboratoire.

### 2.2. Conditions d'élevage

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

- Photopériodes de 18h de lumière/24 h
- Température ambiante.

Les escargots sont répartis dans des boîtes en plastique transparentes à raison de trois lots de dix escargots pour chaque traitement avec un couvercle perforé, les boîtes sont nettoyées régulièrement (tous les 2 jours).

### 2.3. Lotissement et traitement des animaux

Le traitement des escargots a été réalisé par injection dans le pied (*Intrapoda*) selon le poids corporel des escargots chaque deux jours (Iersel et al., 2014) et pendant 45 jours, nous avons préparé deux concentrations de la solution de CdSe: (1.2 et 2.4)  $\mu\text{g/ml/g}$ .

**Lots n°1** : Contient 10 escargots comme témoin : injection par l'eau distillée seulement.

**Lots n°2** : Contient 10 escargots pour le traitement par CdSe à dose de 1.2  $\mu\text{g/ml/g}$ .

**Lots n°3** : Contient 10 escargots pour le traitement par CdSe à dose de 2.4  $\mu\text{g/ml/g}$ .



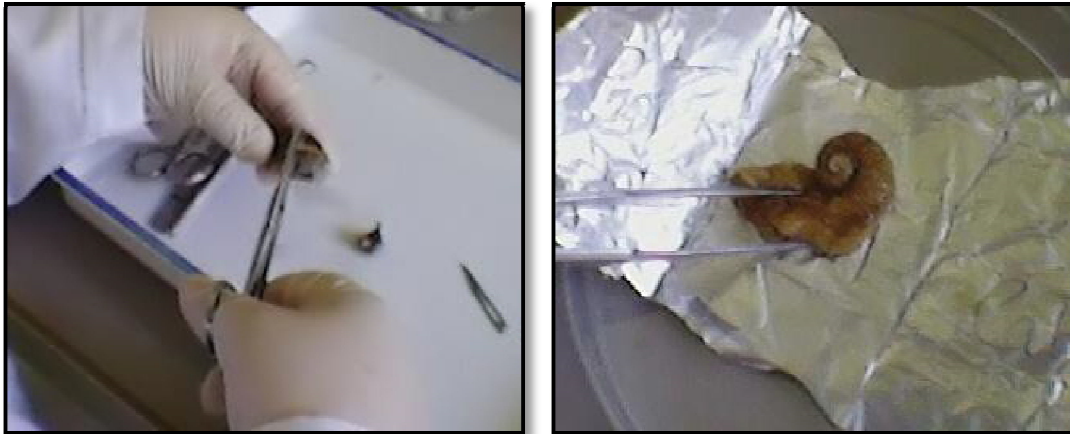
**Figure 19** : Traitement de l'escargot par l'injection.

### 2.4. Sacrifice des animaux et extraction d'hépatopancréas

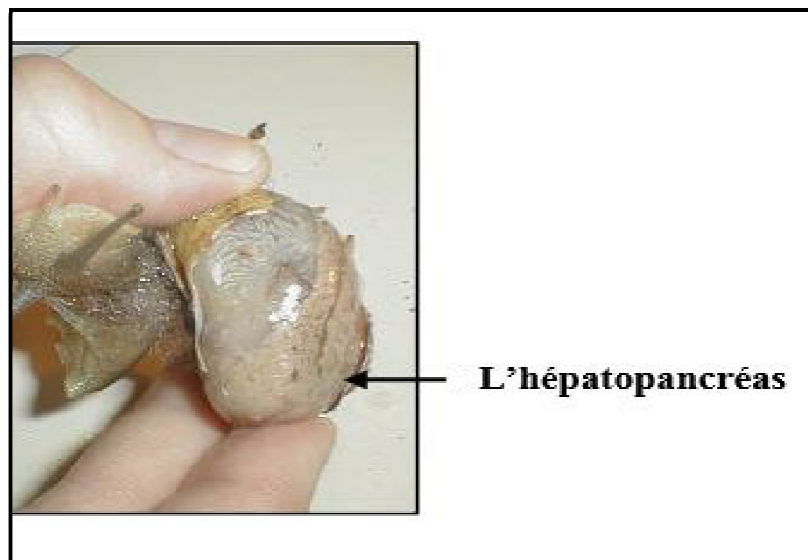
Après la période du traitement, les escargots sont mis à jeun pendant 48 heures afin que le contenu de leur tube digestif soit vide. Ceci évite d'éventuelles interférences entre les contaminants présents dans l'aliment ingéré et les quantités de contaminants réellement accumulées dans les tissus. Les boîtes où ils jeunent sont lavées à l'eau, pour éviter la ré-ingestion des fèces.

Les animaux sont ensuite sacrifiés par congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'hépatopancréas ont été excisés, lavés avec l'eau physiologique et conservés autre fois au  $-80^{\circ}\text{C}$  pour les analyses biochimiques et enzymatiques (Coeurdassier, 2001).





**Figure 20** : Sacrifice et dissection des animaux.



**Figure 21** : Prélèvement des organes (l'hépatopancréas).

### 3. Méthodes

#### 3.1. Biomarqueurs physiologiques

Les données morphométriques (détermination de la mortalité, diamètre la coquille), ont été collectées chez la totalité des individus témoins et traités examinés grâce aux méthodes décrites précédemment (**Bourbia-Ait Hamlet S. 2013**).



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 traitement. La mort d'un individu est généralement facile à déterminer : le pied flasque et jaunâtre est le plus souvent sorti de la coquille. 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.

➤ **Diamètre de coquille « D »**

Le diamètre de la coquille est mesuré à l'aide d'une Pied à coulisse modèle (Ohaus Analytical), de façon hebdomadaire, après le traitement par le CdSe (NPs). Les mesures sont toujours réalisées après le nettoyage de l'enceinte d'essai.

### 3.2. Paramètres métaboliques

L'analyse biochimique des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) a été effectuée sur l'hépatopancreas, selon la méthode de (**Shibko et al., 1967**).

#### 3.2.1. Extraction des métabolites

L'extraction des métabolites se fait par homogénéisation dans 1 ml d'acide trichloracétique ou TCA (20 %). Après une première centrifugation de la solution broyée (5000 trs/min à 4°C, pendant 10 min), le surnageant (I) obtenu sert au dosage des glucides totaux selon la méthode de (**Duchateau et Florkin, 1959**), tandis que le reste des tubes (culot I) est additionné du mélange en partie égale d'éther et de chloroforme et subie ensuite une seconde centrifugation (5000 trs/min à 4°C, pendant 10 min), qui donne un autre surnageant (II) destiné au dosage des lipides totaux (**Goldsworthy et al., 1972**). Alors que, le culot (II) sera dissout dans de la soude (0,1 N) et utilisé pour la quantification des protéines totales selon (**Bradford, 1976**).

### 3.2.1.1. Dosage des glucides

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de **(Duchateau et Florkin, 1959)**. Elle consiste à additionner à 100 µl du surnageant I, contenu dans un tube à essai, 4 ml du réactif d'anthrone et de chauffer le mélange à 80 °C pendant 10 mn, une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présente dans l'échantillon, et la lecture de l'absorbance est faite à une longueur d'onde de 620 nm. La préparation du réactif d'anthrone se fait comme suit: à 150 mg d'anthrone est ajouté 75 ml d'acide sulfurique concentré et 25 ml d'eau distillée, pour obtenir à la fin une solution limpide de couleur verte, utilisée après 4h d'obscurité. La quantité des glucides est calculée à partir de la gamme d'étalonnage, effectuée à partir d'une solution mère de glucose 1mg/1ml d'eau distillée (Annexes : Courbe01).

### 3.2.1.2. Dosage des lipides

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de **(Goldsworthy *et al.*, 1972)** en utilisant la vanilline comme réactif. Le dosage des lipides se fait sur des prises de 100 µl du surnageant II qui subissent une évaporation totale puis 1ml d'acide sulfurique concentré a été ajouté, les tubes sont ensuite agités et mises pendant 10 min dans un bain de sable à 100 °C. Après refroidissement, 200 µl de ce mélange est ajouté à 2,5 ml de la vanilline et après 30 mn d'obscurité, une coloration rose se développe. La densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Le réactif est préparé comme suit: faire dissoudre 0,38 g de vanilline dans 55 ml d'eau distillée et ajouter 195 ml d'acide orthophosphorique à 85%, ce réactif se conserve à l'obscurité. La quantité des lipides est calculée à partir de la droite de régression obtenue à partir de la gamme d'étalonnage, effectuée à partir d'une solution mère préparée de l'huile de tournesol (Annexes : Courbe 02).

### 3.2.1.3. Dosage des protéines

Le dosage de protéines totales est effectué selon la méthode de **(Bradford, 1976)** en ajoutant à 100µl du culot II, 4 ml de réactif du bleu brillant de commassie (BBC). La solution de BBC, se prépare comme suit: 100 mg de BBC est homogénéisée dans 50 ml d'éthanol, ensuite 100 ml d'acide orthophosphorique à 85% est additionné au mélange et ensuite compléter à 1000 ml avec l'eau distillée. Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (Annexes : Courbe 03).

### 3.3. Paramètres enzymatiques

#### 3.3.1. Dosage du glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé de **(Weckberker et Cory, 1988)**. 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 thiol (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm.

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$\text{GSH} = \frac{DO \times 1 \times 1.525}{131000 \times 0.8 \times 0.5 \text{mg de protéine}}$$

DO : Densité optique.

1 : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation. (0.8 ml homogénat + 0.2ml SSA).

1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1 ml Tris-EDTA + 0.025 ml DTNB).

131000 : Coefficient d'absorbance (contenant le groupement-SH à 412 nm).

0.8 : Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans 1 ml.

0.5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

La concentration de GSH est mesurée par rapport à 1 mg de protéine. C'est pour cela ce dosage doit être accompagné par le dosage des protéines.

#### 3.3.2. Dosage de glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de **(Flohe et Gunzler, 1984)** en utilisation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat.

-L'extraction de l'enzyme : homogénéisation par le tampon phosphate) pH 7.8.

- Centrifugation 10 min a 3000t/min.
- Récupération de surnageant (extrait enzymatique).
- 0.2 ml de surnageant +0.4 ml de GSH (glutathion forme réduite) a 0.1 MM (réaction enzymatique) + 0.2 ml TP a 0.067M (tampon d'extraction pH7.8).
- Préparer un blanc avec 0.4 ml de GSH +0.2 de TP (réaction non enzymatique), Incubation au bain marie à 25°c pendant 05 min.
- 0.2 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3MM) pour initier la réaction.
- Laisser agir 10 min.
- Arrêter la réaction par addition de 1 ml de TCA 1%(acide tri chloro-acétique).
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 min.
- Centrifuger durant 10 min a 3000t/min.
- 0.48 ml de surnageant et place dans une cuve+2.2 ml de Na<sub>2</sub>HP04 (0.32M) +0.32 ml de DNTB (1MM).
- Formation d'un composé colore, mesurer la densité optique à412 nm dans le 05 min.
- La détermination (calcule) de l'activité de la GPx se fait de la façon suivant :

-Activité de GSH consommée/min/gr de protéine.

-Blanc=0.04 micro mole de GSH réduit → DO<sub>b</sub>

-Extrait=0.04 micro mole de GSH réduit → DO<sub>e</sub>

Donc la concentration de GSH réduit qui sera oxydée (disparue)= DO<sub>e</sub>-DO<sub>b</sub>

$X = \frac{(DO_e - DO_b) \times 0.04}{DO_b}$  = quantité de GSH réduit disparue (oxydée) dans 0.2 extrait dans 1 ml.

L'activité de la GPx=la quantité de GSH réduit oxydée disparue×  $\frac{5}{[Protéine]}$

### 3.3.3. Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GST)

La mesure de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de (**Habig et al., 1974**), Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH).

L'homogénat est centrifugé à 14 000g pendant 30 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme. Une aliquote de 200 µl du surnageant est additionné de 1.2 ml de substrat (CDNB).

La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5mn à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée à la place du surnageant. L'activité spécifique de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante :

$$\text{GST (nmol GST/min/mg protéine)} = \frac{(\text{DO échant/min} - \text{DO blanc/min})}{9,6 \times \text{mg de protéine}}$$

Do : Densité optique de l'échantillon /min.

Do/min blanc : Densité optique du blanc /min.

9.6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm.

### 3.3.4. 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 dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à une longueur d'onde de 240 nm.

La réaction est déclenchée par l'addition d'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 :

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

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

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

ε : 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.

### 3.3.5. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le taux de malondialdéhyde (MDA) est quantifié selon la méthode de **(Draper et Hadley, 1990)**. Cette méthode est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm. Le taux du MDA est déterminé selon la formule suivante :

$$[[C]](n \text{ mol/mg protéine}) = \frac{DO.106}{\epsilon.L.X.Fd}$$

C: Concentration en n mole/mg de protéines.

DO : Densité optique lue à 530nm.

E : Coefficient d'extinction molaire du MDA =  $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.

X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).

Fd : Facteur de dilution = 0.2083.

## II. Résultats

Les résultats obtenus sont représentés sous la forme (moyenne  $\pm$  écart type moyenne), et pour mieux visualiser les résultats obtenus la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant Microsoft office Excel 2013.

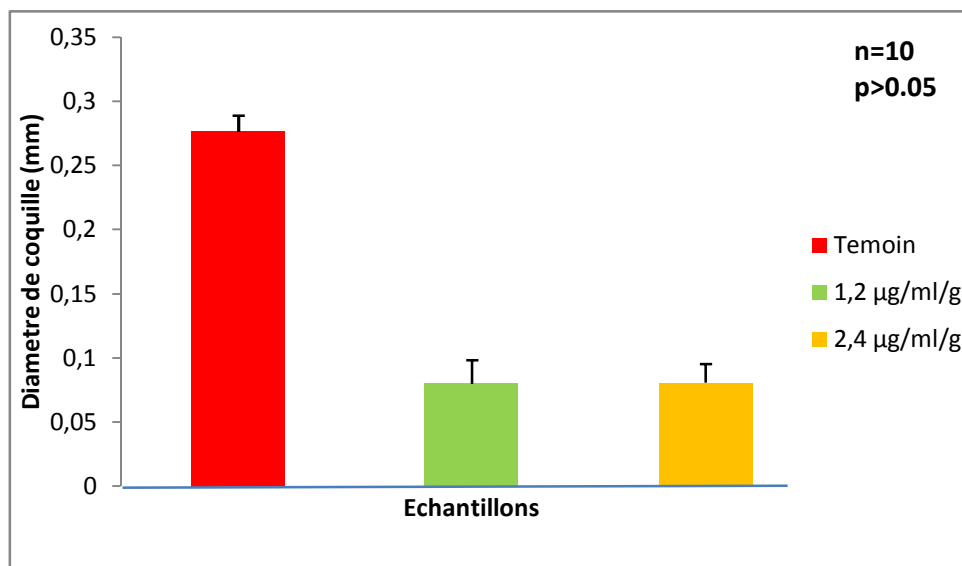
Ces moyennes sont comparées par des tests statistiques qui servent à comparer entre les échantillons (Témoin et traité) grâce au logiciel MINITAB (version 17.01).

### 1. Étude des paramètres morpho-physiologiques

#### 1.1. Effet de CdSe (NPs) sur l'évolution du diamètre (D) de la coquille des escargots

La figure (22) mise en évidence l'évolution du diamètre (D) de la coquille des escargots en fonction de la dose. Nous remarquons que chez les témoins, le diamètre (D) tend à augmenter, en revanche chez les traités par les concentrations (1.2 et 2.4  $\mu\text{g/ml/g}$ ) une diminution dose-dépendant.

L'analyse statistique montre une différence non significative entre le diamètre des coquille des témoins et des traités ( $p > 0.05$ )



**Figure 22:** Evolution du diamètre (D) de la coquille des escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p > 0.05$ ).

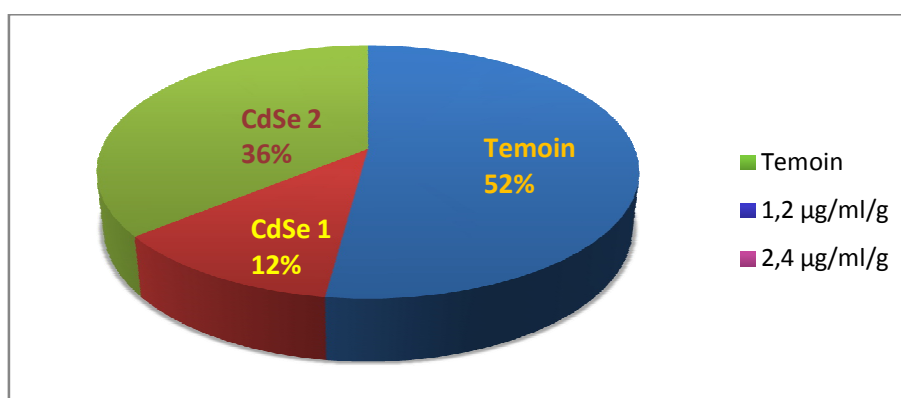
## 1.2. Effet de CdSe (NPs) sur la mortalité chez les escargots

Durant l'expérience, la mortalité était faible, avec seulement 4 individus sur 30 escargots adultes, ce qui représente 13.33%. La mortalité (Tableau 01) est survenue comme suit : 1 seule individus dans le groupe CdSe 1 durant la 3<sup>ème</sup> semaine de traitement, 2 individus durant la 5<sup>ème</sup> semaine et 1 dans la 6<sup>ème</sup> dans le groupe CdSe 2.

**Tableau 01** : Mortalité des escargots adultes durant les six semaines de traitement par CdSe (NPs).

	Début de l'expérience	1ère semaine	2ème semaine	3ème semaine	4ème semaine	5ème semaine	6ème semaine	Mortalité totale
<b>Témoin</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>CdSe (1.2 µg/ml/g)</b>	0	0	0	1	0	0	0	1
<b>CdSe (2.4 µg/ml/g)</b>	0	0	0	0	0	2	1	3
<b>Mortalité totale</b>	0	0	0	1	0	2	1	4

✓ La figure 23 explique le taux de mortalité en pourcentage.



**Figure 23:** Pourcentage de mortalité des escargots après traitement de dose (de 1.2 µg/ml/g et 2.4 µg/ml/g).



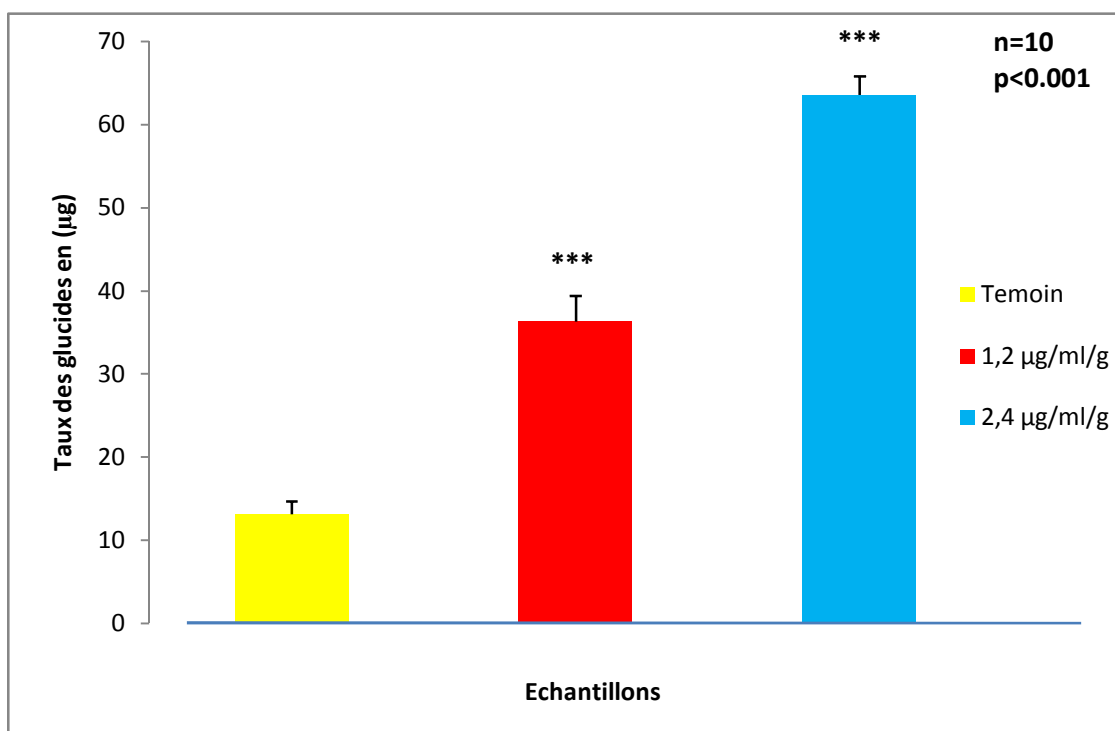
## 2. Étude des paramètres biochimiques et enzymatiques

### 2.1. Effet de CdSe (NPs) sur les paramètres biochimiques chez les escargots

#### 2.1.1. Effet de CdSe (NPs) sur le taux des glucides chez les escargots

Les variations des taux de glucides chez les escargots témoins et traités par CdSe (NPs) sont représentées dans la figure (24).

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une augmentation très hautement significative du taux de glucide ( $p < 0.001$ ) par rapport aux témoins.

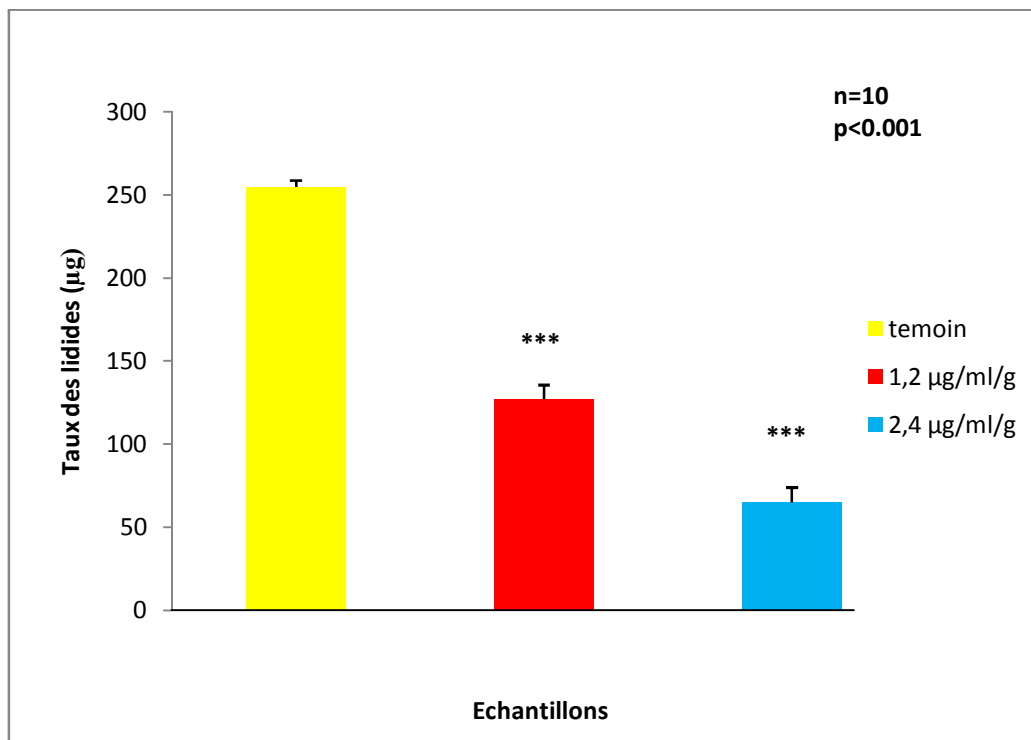


**Figure 24:** Variation de teneur en glucide (µg) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p < 0.001$ ).

### 2.1.2. Effet de CdSe (NPs) sur le taux des lipides chez les escargots

Les variations des taux de lipide chez les escargots témoins et traités par CdSe (NPs) sont représentées dans la figure (25).

Nos résultats signalent une diminution de taux de lipide d'une façon très hautement significative ( $p=0.000$ ) par rapport aux témoins.

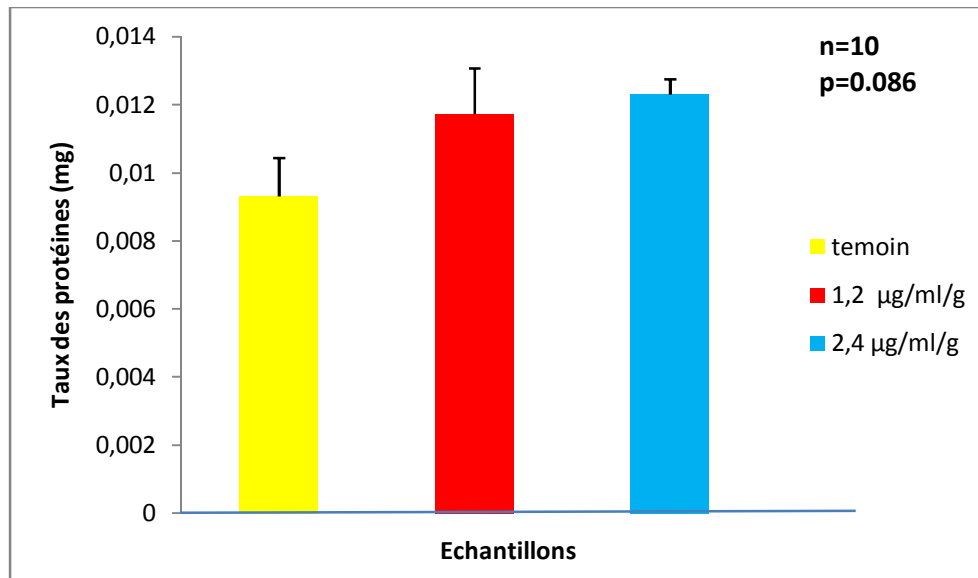


**Figure 25:** Variation de teneur en lipides ( $\mu\text{g}$ ) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p<0.001$ ).

### 2.1.3. Effet de CdSe (NPs) sur le taux des protéines chez les escargots

Les variations des taux de protéines chez les escargots témoins et traités par le CdSe sont représentées dans la figure (26).

Nous résultats illustre que le taux de protéines chez les escargots traités augmenté de façon non significatif comparais avec les témoins ( $p=0.086$ ).

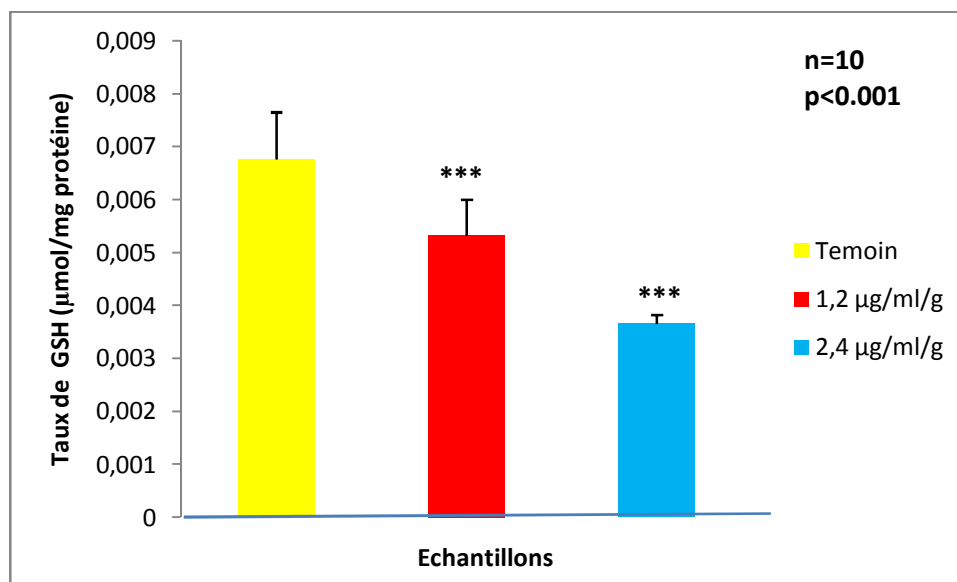


**Figure 26:** Variation de teneur en protéines (mg) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement.

## 2.2. Effet de CdSe (NPs) sur les paramètres non enzymatiques chez les escargots

### 2.2.1. Effet de CdSe sur le taux de GSH

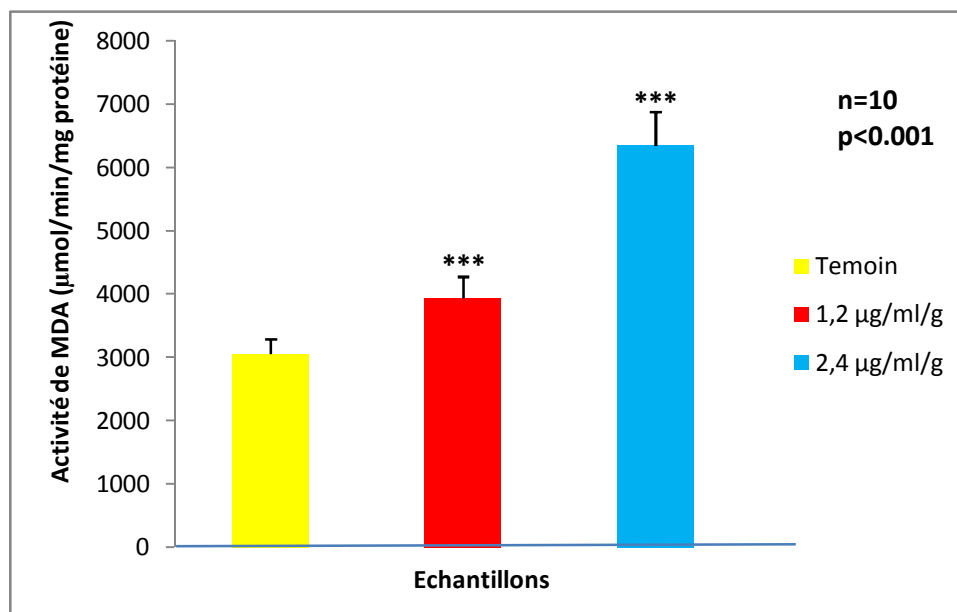
Les variations des taux de GSH observées chez les escargots témoins et traités par CdSe (NPs) sont représentées dans la figure (27). Nos résultats signalent une diminution de taux de GSH d'une façon très hautement significative ( $p=0.000$ ) par rapport aux témoins.



**Figure 27:** Taux de GSH ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protéine) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p<0.001$ ).

### 2.2.2. Effet de CdSe (NPs) sur la teneur de malondialdéhyde (MDA)

Figure (31) représente les variations MDA mesurée au niveau d'hétopancréas des escargots témoins et traités par CdSe (NPs) avec deux doses. Nos résultats montrent une augmentation de taux de MDA d'une façon très hautement significative ( $p=0.000$ ) par rapport aux témoins.



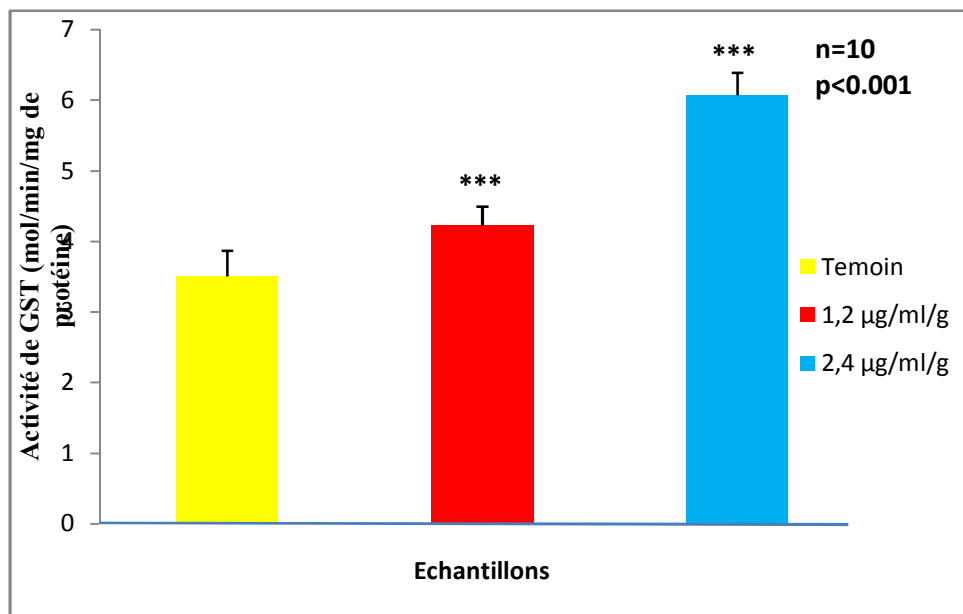
**Figure 31:** Activité de MDA ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protéine) des escargots témoins et traité après 45 jours de traitement ( $p<0.001$ ).

## 2.3. Effet de CdSe (NPs) sur les paramètres non enzymatiques chez les escargots

### 2.3.1. Effet de CdSe (NPs) sur les variations de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST).

La figure (29) montre l'effet de CdSe (NPs) sur le taux d'activité de GST des escargots témoins et traités avec deux doses par rapport aux témoins.

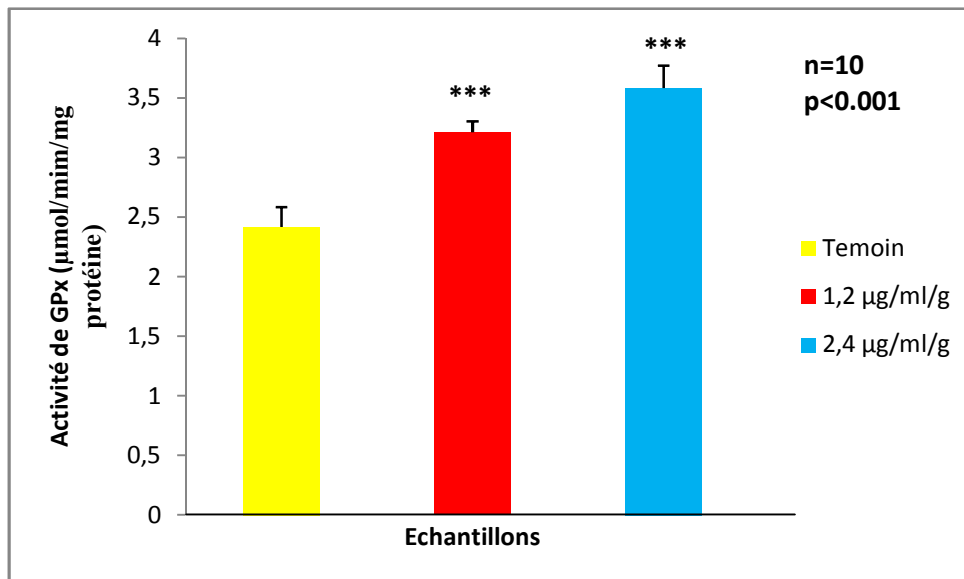
Nos résultats signalent une augmentation de taux de GST d'une façon très hautement significative ( $p=0.000$ ) par rapport aux témoins.



**Figure 29:** Activité de GST ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protéine) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p<0.001$ ).

### 2.3.2. Effet de CdSe (NPs) sur les variations de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

Figure (30) représente les variations de GPx mesurée au niveau de l'hétopancréas des escargots témoins et traités par CdSe (NPs) avec deux doses. Nous constatons qu'en présence de cette nanoparticule, le taux de GPx est augmenté d'une manière très hautement significatifs ( $p=0.000$ ) par rapport au témoin.

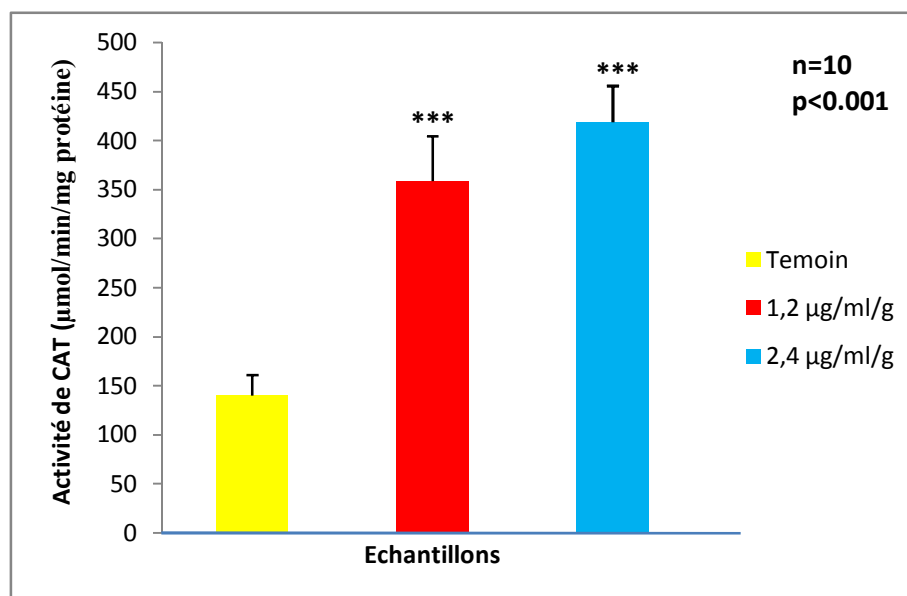


**Figure 30:** Activité de GPx en ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protéine) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p<0.001$ ).

### 2.3.3. Effet de CdSe (NPs) sur les variations de l'activité de catalase

Le suivi de l'activité catalase chez les escargots témoins et traités par CdSe (NPs) est représenté dans le figure (28).

La figure montre que cette activité est augmenté d'une façon très hautement significative ( $p=0.000$ ) par rapport aux témoins.



**Figure 28:** Activité de catalase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protéine) chez les escargots témoins et traités après 45 jours de traitement ( $p<0.001$ ).



## Discussion

Le développement des nanotechnologies et de leurs utilisations, entraîne une augmentation de la concentration des nanoparticules dans tous les compartiments environnementaux (air, eau et sol). Par conséquent, l'ensemble des espèces de la chaîne alimentaire, peut être exposé aux nanoparticules. L'accumulation de polluants dans le réseau trophique avait déjà été montrée (**Thoman, 1989**). Il est important d'évaluer le comportement des nanoparticules dans les populations d'organismes constituant les premiers maillons de la chaîne alimentaire (**Angélique, 2008**).

L'utilisation de l'escargot *Helix aspersa* comme un modèle d'étude de la toxicité des nanoparticules trouve ici un premier argument (**Scheifler, 2002**). L'escargot Petit Gris *Helix aspersa* connu pour ses capacités d'accumuler les polluants (Zn, Cu, Pb...) à des concentrations importantes dans ses tissus, ce mollusque gastropode pulmoné est exposé aux pollution du sol, des végétaux et de l'atmosphère et représente de ce fait un modèle intégrateur complémentaire des organismes souterrains comme les annélides ou les organismes à régime strictement herbivore ou détritivore peu être parce qu'il entre dans le régime alimentaire de l'homme, il est considéré comme l'un des maillons de la chaîne trophique. Il est la proie de nombreux prédateurs tel que les mammifères, les oiseaux etc., et peut donc être à l'origine de transferts des polluants (contaminants) (**Coeurdassier, 2001**).

Dans les écosystèmes terrestres, les gastropodes sont exposés aux différents types de contaminants par plusieurs voies d'exposition. Notre choix s'est porté sur ce modèle biologique car ils concentrent les métaux lourds dans leurs tissus et plus précisément sa glande digestive ou l'hépatopancréas qui est connue comme le siège principal de l'accumulation et de métabolisation des métaux lourds (**Hopkin, 1989**).

A l'échelle cellulaire et moléculaire, les nanoparticules sont réactives envers la cellule. Les conséquences de cette réactivité facilitent l'internalisation des nanoparticules à l'intérieur de la cellule et entraînent la formation des espèces réactives de l'oxygène (**Bras, 2007**).

Dans cette partie qui consiste à rechercher une éventuelle explication de nos résultats obtenus lors d'un traitement des escargots par le séléniure de cadmium (NPs) afin de rechercher ces effets nanotoxiques. Par l'investigation des paramètres morphophysique (diamètres de coquille et mortalité), paramètres biochimique (enzymatiques, non enzymatiques).

## 1. Effets des CdSe (NPs) sur les paramètres morphophysologiques chez *Helix aspersa*

### 1.1. Effet sur l'évolution du diamètre des coquilles

Pour connaître la croissance d'*Helix aspersa* en présence d'un polluant on étudie l'évolution de diamètre de coquille entre les témoins et les traités. Dans notre expérimentation nous notons une diminution de ce facteur en présence de CdSe, ces résultats vont dans le sens de ceux de (Grara et al., 2015) qui a mis en évidence une diminution de diamètre de la coquille des escargots *Helix aspersa* après exposition au ZnO à une concentration de 1000 µg/g à une durée de 21 jours.

Cette diminution à cause de la fraction de ses nanoparticules et la libérations de Cd qui possèdent une capacité de perturber d'une manière indirecte des processus physiologiques importants en entrant en compétition avec certains éléments essentiels tels que le calcium (Ca<sup>++</sup>) qui représente un composé important de la coquille (Molnár et al., 2004). 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).

### 1.2. Effet sur le taux de mortalité

Les pourcentages cumulatifs de mortalités des escargots traités par le CdSe pendant 06 semaines ont révélé que la mortalité augmente en fonction de l'augmentation de concentration avec 11.98%, 36% pour ceux traités respectivement par les concentrations (1.2 µg/ml/g, 2.4 µg/ml/g). Ces résultats sont en accord avec ceux de (Grara et al., 2015) qui ont mis en évidence qu'à des doses élevées de ZnO, le pourcentage cumulatif de mortalité est de 30% , 50% , pour ceux traités respectivement par les concentrations (5000 µg/g, 10000 µg/g), aussi cette augmentation est observé dans l'étude de (Kim et al., 2010) qui ont mis en évidence qu'à des doses de 5 et 10 mg/l de TiO<sub>2</sub> pour *Daphnia magna*.

## 2. Effet des CdSe (NPs) sur les métabolites (glucides, lipides et protéines)

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

### ✓ Les glucides

Les glucides sont des molécules organiques jouent un rôle plus importante dans la fabrication d'énergie. Ils possèdent un rôle de réserve énergétique dans le foie et les muscles (le glycogène) (Menaceur, 2015).

Nos résultats révèlent une augmentation très hautement significative de taux des glucides chez les escargots traités par rapport aux témoins, cette augmentation peut s'expliquer par l'effet inhibiteur de CdSe (NPs) sur l'activité enzymatique, lactate déshydrogénase iso enzyme, succinate déshydrogénase et  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase et l'interférence avec la chaîne de transport énergétique résultant une accumulation endocellulaire des glucides (Ahhammad et al., 1989; Kramer et al., 1986).

### ✓ Les protéines

Concernant le taux de protéines au niveau de l'hépatopancréas, nous notons une augmentation très hautement significative chez les escargots traités en comparaison avec les témoins, cette augmentation pourrait être due d'une part à l'induction de la synthèse des protéines de stress en rapport avec le phénomène de bioactivation/biotransformation et d'autre part par la peroxydation lipidique générée par les radicaux libres. Ces résultats sont en accord avec les travaux de (Grara, 2011 ; Atalia, 2009) réalisés sur l'escargot *Helix aspersa* suite à une exposition aux cadmium et les travaux de (Kohler et al., 1994) réalisé sur le gastéropode *D. reticulatum* exposé à des concentrations élevées de Cd, Zn, et Fe dans l'aliment à également induite une synthèse dose-dépendante de protéine de stress. Aussi les travaux de (Harabawy et Mosleh, 2014) qui montre que l'exposition de Cd, Cu, Zn, augmente le taux des protéines au niveau des foies chez les lapins.

### ✓ Les lipides

Concernant l'effet des (NP) CdSe sur la variation du taux de lipides totaux. Ainsi, selon (Aurousseau, 2002) les radicaux libres oxygénés sont à l'origine d'une dégradation des lipides à travers la  $\beta$  oxydation.

L'attaque radicalaire des membranes provoque des perturbations de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (Lawton et Donaldson, 1991). Le taux du MDA est considéré comme un biomarqueur spécifique (Del et al., 2005; Box et al., 2007; Nesto et al., 2007). Nos résultats mettent en évidence une diminution très hautement

significative du taux de lipide d'une manière dose-dépendante au niveau de l'hépatopancréas, parallèlement avec l'augmentation du taux de MDA illustrées par les travaux de **(Tedesco et al., 2010)** suite a une exposition aux 750 ppb de nanoparticule d'Or pendant 24 heures chez *Mytilus edulis*.

### 3. Effet sur les biomarqueurs non enzymatiques

Dans cette partie nous s'intéressons aux effets de CdSe (NPs) sur les paramètres non enzymatiques tels que le GSH et le MDA.

#### ➤ **Activité de glutathion (GSH)**

La GSH est la plus abondante qui maintien le statut de la cellule et de fournir la première ligne de la protection antioxydant contre le stress oxydatif. Cette étude montre que le séléniure de cadmium provoque une diminution des taux du GSH dans l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa*. Ces résultats sont en concorde avec les travaux de **(Suliman, 2015)** qui ont trouvés une diminution de taux de GSH au niveau des cellules épithélial des poumons humain lors de l'exposition à CdS (NPs). Aussi les travaux de **(Abdel-Halim et al., 2002)** qui montre que l'exposition de Cd a une concentration de 0.71 mg/kg diminue le taux de GSH au niveau d'hépatopancréas chez *Helix aspersa*.

#### ➤ **le taux de malondialdéhyde (MDA)**

Dans la présente étude, la toxicité de CdSe (NPs) sont à l'origine d'une augmentation du taux de MDA qui est l'aldéhyde actif principal de la peroxydation de l'acide gras polyinsaturé des membranes. Les ERO peuvent oxyder les lipides **(Ercal et al., 2001; Tweeddale, 2007)**.

La peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques **(Bebianno et al., 2005)** ou d'autres éléments contenant des lipides **(Al-Mutairi, 2007)**. Il s'ensuit une perte de la perméabilité et du potentiel de membrane, une inactivation des récepteurs et des enzymes membranaires **(Pampanin, 2005)**.

Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules. Ainsi, la peroxydation lipidique est une source endogène des dommages de l'ADN **(Marnett, 2002)**. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **(Wang, 2011)** sur les effets toxiques des NPs manufacturées sur la peroxydation des lipides chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*), qui on mit en évidence une augmentation du taux de MDA après exposition aux NPs d'oxyde de titane.

D'autre part les études de (Harris, 1992) montrent une surproduction du MDA chez les vers de terres traitées par l'oxyde de zinc et l'oxyde de titane (0.1, 0.5, 1 et 5 µg/g).

#### 4. Effets sur les biomarqueurs enzymatiques

Dans la seconde partie de notre travail nous nous sommes intéressés à la réponse enzymatique de l'organisme chez *Helix aspersa* face au stress par les NPs, Nous avons ciblé un certain nombre d'activités enzymatiques pouvant être modifiées et /ou perturbées lors d'une toxicité.

##### ➤ Activité de la Catalase (CAT)

Les enzymes antioxydants constituent le système de défense majeur contre les ROS cependant, les réponses varient selon les espèces, les enzymes, et les contaminants (Gasmi et Torchen, 2014). Parmi les enzymes impliquées dans les systèmes de détoxification, la catalase occupe une place de choix. En effet, cette enzyme apparait dans les premières lignes de défense contre les radicaux libres en catalysant sa décomposition en eau et oxygène. Dans notre étude on observe une augmentation très hautement significative du taux de l'activité de CAT, ces résultats s'accordent aux travaux de (Kavithal et al., 2013) qui ont trouvé une augmentation significative de l'activité de catalase dans l'hépatopancréas après une injection de nanoparticule de cadmium à 100 et 120 ppm/kg pendant 08 jours chez Mud Crab (*Scylla olivacea*).

Cette augmentation observe dans les travaux de (Ana et al., 2013) qui ont trouvé que l'activité CAT a augmenté lorsque les cellules de *M. sativa* ont été exposés a 100 nM de MPA-CdSe / ZnS QD, cette activation est empêché la suraccumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Des concentrations plus élevées de MPA-CdSe/ ZnS QD peuvent induire l'accumulation de ROS qui sont capables d'endommager la membrane plasmique, les mitochondries et le noyau (Santos et al., 2010).

##### ➤ Activité de la glutathion S-transférase (GST)

Concernant la glutathion S-transférase (GST), enzyme joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant ce que nous expliquent les résultats obtenus et le taux élevé d'une façon très hautement significative, même observation de (Hanane et al., 2012) qui ont montré une augmentation

de GST chez deux invertébrés *Nereis diversicolor* et *Scrobicularia plana* traité par nanoparticule de cadmium par rapport aux témoins.

➤ **Activité de glutathion peroxydase (GPx)**

La GPx est l'un des systèmes de défense antioxydant très puissant, il réduit l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et protège l'organisme contre l'effet cancéreux de cette substance (**Zhu et al., 2010**).

Les résultats obtenus ont révélé que les escargots traités par CdSe (NPs) sont subissent à une augmentation très hautement significative de l'activité de GPx, ces résultats en accord avec les travaux de (**Kavithal et al., 2013**) qui ont trouvé que la nanoparticule de cadmium à une dose de 100 et 120 ppm/kg à augmenté l'activité de GPx chez l'invertébré Mud Crab (*Scylla olivacea*). Par ailleurs, cet effet pourrait être dû à l'augmentation du stress oxydatif qui renforce l'activité des enzymes antioxydants chez les animaux (**Halliwell and Chirico, 1993**).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (**Zhu et al., 2010**) utilisant l'oxyde de titane (5 et 10 mg / L) sur *Daphnia magna*, qui montre une augmentation progressive de l'activité GPx en fonction de la concentration de NPs.

## Conclusion et perspectives

La production et l'utilisation des nanomatériaux est en plein essor, ce qui entraîne leur déversement dans l'environnement sous forme de nanoparticules. Les nanoparticules de séléniure de cadmium sont utilisées dans un grand nombre des applications du fait de leurs propriétés électroluminescence et d'absorption des UV. Les risques écotoxicologiques liés aux nanoparticules sur les organismes terrestres sont encore peu connus.

A cette fin, les gastéropodes terrestres sont été utilisés car ce sont des indicateurs de la qualité des écosystèmes terrestres, ils sont connus par leur pouvoir accumulateurs et peuvent répondre à la pollution d'une manière sensible et mesurable. Ils sont donc employés comme des sentinelles de la pollution environnementale dans les sols contaminés par des polluants métalliques et organiques.

Cette expérience présente un apport de recherche sur la toxicité de séléniure de cadmium (NPs) chez les gastéropodes. Cette toxicité se traduit par des altérations comportementales comme la diminution de croissance des coquilles et une progression légère de mortalité.

D'un autre côté, la composition biochimique de l'hépatopancréas est également affectée par les nanoparticules testées, avec une augmentation du taux des protéines, des glucides et une diminution du taux des lipides. En plus, une augmentation du taux de malondialdéhyde (MDA), glutathion peroxydase (GPx), glutathion -S-transférase (GST) et l'activité de catalase (CAT), mais le taux de glutathion (GSH) est diminuée dans l'hépatopancréas. Ses modifications sont probablement liées à une augmentation de la libération d'espèces réactives de l'oxygène en présence des nanoparticules.

Enfin, nous pouvons confirmer que la nanoparticule de CdSe induit des perturbations au niveau physiologiques et biochimiques.

En vue de l'importance des nanoparticules, il serait intéressant de pour suivre la recherche afin de bien connaître leur mécanisme d'action, car ce travail reste préliminaire et peu indicatif sur le mécanisme réel par lequel agit le CdSe (NPs).

Par conséquent, une étude ultérieure pourrait permettre le dosage de notre molécule pour cibler l'organe d'accumulation et connaître le mode d'action sur les différents systèmes. Il serait aussi intéressant de déterminer la capacité reproductrice, et renforcer d'avantage par une exploration histologique et surtout la ou les organes ciblent.



## Références bibliographiques

### *A*

**Abdel-Halim K., Abo El-Saad A., Talha M., Hussein A., Bakry N.** Oxidative stress on land snail *Helix aspersa* as a sentinel organism for ecotoxicological effects of urban pollution with heavy metals. Elsevier : 1131.

**Ahammad S., Jinna R., Desai A. 1989.** Protection against cadmium toxicity and enzyme inhibition by dithiotheritol. *Cell.Biochem. Funct.* 7:185-192.

**Aitken R., Creely K., Tran C. 2004.** Nanoparticles: An Occupational Hygiene Review, Institute of Occupational Medicine, Health and Safety Executive (HSE). UK. Research Report 274 : 113.

**Al-Mutairi D., Craik J., Batinic H., Benov L. 2007.** Induction of oxidative cell damage by photo - treatment with zincs meta N-methylpyridylporphyrin. *Free radical research.* 41 : 89-96.

**Ana R., Ana S., Anca M., Christopher M., Alma B., Abel O., Pedro F. 2013.** CdSe/ZnS Quantum Dots trigger DNA repair and antioxidant enzyme systems in *Medicago sativa* cells in suspension culture. licensee BioMed Central Ltd. (2):121.

**Angelique S. 2008.** Biological effects of manufactured nanoparticles : influence of their characteristics. *Life Sciences. Agro Paris Tech.* 15-19.

**Angélique D. 2008.** Effets biologiques des nanoparticules manufacturées influence de leur caractéristique. 5-18.

**Angelos M., Mkutala V., Torres C., Stoner J., Mohammed M., Oerannan K. 2005.** Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am J physiology heart circphysiol.* 290: 341-347.

**Anonyme. 2007.** Quels impacts sur l'homme et l'environnement?. INRIS. p : 7.

**Arora A., Sairam R., Srivastava G. 2002.** Oxidative stress and antioxidative system in plants-*Cur.Sci.* 82(10):122-144.

**Atailia A. 2009.** Effet des poussières métalliques d'origine industrielles sur un organisme animal bio indicateur / bioaccumulateur de pollution : *Helix aspersa*. Thèse Doctorat, Université Badji Mokhtar. Annaba. p : 45.

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

## **B**

**Bailey S. 1981.** Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. J. Comp. Physiol. 142 : 89-94.

**Barker G. 2001.** The Biology of Terrestrial Molluscs. CAB International, Oxon, Wallingford. UK. p : 567.

**Barouki R and Morel Y. 2001.** Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress : mechanisms and biological implications. Biochem Pharmacol. (61) : 511-6

**Baudin. 2007.** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. MTC. pp : 43-52.

**Bebiano M., Company R., Serafim A., Cosson R.P., Fiala-Medoni A. 2005.** Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. Aquat. Toxicol. 75. 354-373.

**Belkheiri N. 2010.** Dérivés phénoliques à activité antiathérogènes .Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle. Université de Paul Sabatier. Toulouse. France. p : 244.

**Ben Aissa L et Mebarkia S. 2015.** Etude de l'effet de Sélénium sur l'hépatotoxicité du Nickel chez les souris. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de MASTER En Toxicologie fondamentale. Université de Tébessa. pp : 17-19.

**Bioanal P et Poole F. 2003.** Owens «Introduction to Nanotechnology» Wiley, Interscience Eds. New Jersey. p32.

**Bonnet J et Vrillon. 1990.** L'escargot *Helix aspersa* biologie : élevage. Edition INRA. pp : 14-15.

**Bourbia-Ait Hamlet S. 2013.** Evaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme de DOCTORAT En Biologie animale. p: 58.

**Box A., Sureda A., Galgani F., Pons A., Deudero S. 2007.** Assessment of Environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* (146):531-539.

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

**Bras G.J. 2007.** Ectotoxicologie et méthodes d'investigation « les bio-indicateurs ». Isa et Université Catholique de Lille.p: 91

**Buzea C., Pacheco I., and Robbie K. 2007.** Nanomaterials and nanoparticles :sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4).pp : 17-71.

## C

**Carlson J. 2008.** Towards Predicting Nano-Biointeractions: An International Assessment of Nanotechnology Environment. *Health and Safety Research Needs. International Council on Nanotechnology.* (4) : 80.

**Chevallier H. 1982.** Facteurs de croissance chez des gastéropodes pulmonés terrestres paléarctiques en élevage. *Haliotis.* 12 : 29-46.

**Chiannil N., Ammouy N., Caillou B., Devissaguet J., Couvreur P. 1990.** Hepatic tissue distribution of doxorubicinloaded nanoparticles after i.v administration in reticulosarcoma M5076 metastasis-bearing mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 26 : 122-126.

**Claude O., Gilles L., Luc M., Yves C. 2006.** Les nanoparticules : connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et en sécurité du travail. *IRSST.* pp : 04-66.

**Coeurdassier M. 2001.** Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnia stagnalis* et *Lymnia palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques .Thèse de doctorat, université de franche comté. France. p281.

**Colvin V. 2003.** The Potential Environmental Impact of Engineered Nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21(10). pp: 1166-1170.

**Colvin V., Schlamp M., Alivisatos A. 1994.** Light-emitting diodes made from cadmium selenide nanocrystals and a semiconducting polymer. (370): 354.

**Curien H. 2001.** Dictionnaire des roches et minéraux. Ed. Albin Michel 18. Encyclopédia universalisé. 22. pp : 126-352.

## **D**

**Daguzan J. 1981.** Contribution à l'élevage de l'escargot petit-gris : *Helix aspersa* Müller (mollusque gastéropode pulmoné stylommatophore). *Ann. Zootechn.* 30 : 249-272.

**Delattre J. 2003.** Biochimie pathologique (Aspects moléculaire et cellulaire). France. p61.

**Delay M. et Frimmel F. 2012.** Nanoparticles in aquatic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 402: 583-592.

**Ding D., Moore X., Wang Z., Wang J. 2004.** Single-Crystal CdSe Nanosaws. p : 708.

**Draper H and Hadley M. 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol*, 186 : 241-431.

**Duchateau G et Florkin M. 1959.** La tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie.* 67(2): 306-314.

## *E*

**Eklund P., Ajayan P., Blackmon R., Hart A., Kong J., Pradhan B., Rao A., Rinzler A. 2007.** International Assessment of Research and Development of Carbon Nanotube Manufacturing and Applications. World Technology Evaluation Center. p: 138.

**El-Gendy K., Radwan M., Gada A. 2009.** In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. *Chemosphere*. 77 : 339-344.

**El-Soheby A., Baylin A., Spiegelman D., Ascherio A., Campos H. 2002.** Dietary and adipose tissue gamma-tocopherol and risk of myocardial infarction. *Epidemiology*. (13):216-230.

**Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N. 2001.** Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*. 1, 529-39.

**Ernster L and Daliner G. 1995.** Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *BBA*. (1271):195-204.

**Esterbauer H., Gebickl j., Puhl H., Jungens G. 1992.** The rôle of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* pp : 13-341.

## *F*

**Favier A. 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. pp : 108-115.

**Favier A., Cadet J., Kalaryanaman R., Fontecave M., Pierre J. 1995.** Analysis of Free Radicals in Biological Systems. Birkhauser. New-York. pp: 10-15.

**Florence A. 2014.** Génie des Produits et des Procédés Synthèse, stabilité et toxicité de quantum dots à coeur CdSe. Thèse pour l'obtention de thèse de DOCTORAT. L'Université de Lorraine Mention. pp : 41-42.

**François P. 2012.** Toxicité des nanoparticules métalliques chez différents modèles biologiques. Thèse de doctorat, Université du Québec à Montréal.

**Fränze O. 2006.** Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecological Indicators*. 6(1): 114-136.

**Furumoto K., Ogawara K., Yoshida M., Takakura Y., Hashida M., Higaki K., Kimura T. 2001.** Biliary excretion of polystyrene microspheres depends on the type of receptor-mediated uptake in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). General Subjects*. 1526 (2): 221-226.

## G

**Garait B. 2006.** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie). pp : 74-99. Thèse pour l'obtention de thèse de DOCTORAT. Université Joseph Fourier. Grenoble. France. pp : 74-99.

**Gasmi S. et Torchen M. 2014.** Effet opposé de Sélénium sur la toxicité de Zinc SUR LES paramètres biochimiques chez les lapins (*Oryctolagus cuniculus*). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de MASTER En Toxicologie fondamentale. Université de Tébessa.

**Gey K., Moser U., Jordan P., Stahelin H., Eichholzer M., Ludin E. 1993.** Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin. Nutr.* 57 : 787-797.

**Goldsworthy G., Mordue W., Guthkelch J. 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*. 18: 545-551.

**Gomot A. 1995.** Neurohormonal control of body and shell growth of the snail *Helix*. *Bull. Inst. Océanog. Monaco*. 14 :141-149.

**Gomot A. 1997.** Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 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.

**Grara N. 2011.** Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bio accumulateur (gastéropode *Helix aspersa* : cas des métaux. Mémoire de doctorat, Université Badji Mokhtar. Annaba : 120.

**Grara N., Bouloudenine M, Khaldi F, Zenir Z, Abdemadjid S. 2015.** Caractérisation Morphophysiological de la Toxicité du ZnO (Nanoparticule manufacturée) sur l'escargot l' *Helix aspersa* bio indicateur de pollution de l'environnement *Environ. Sci.* 6 (9) 2596-2603.

## *H*

**Habig W., Pabst M., Jakoby W. 1974.** Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22) : 7130-7139.

**Hagens W., Oomen A., Cassee, F., Sips, A. 2007.** What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Environ. Health Perspect.* 115 (3): 217-229.

**Haleng J., Fincemail J., Defraigne J., Charlier C., Chapelle J. 2007.** Le stress oxydant. *RQV Med Liège*. 62 (10) : 628-638.

**Haliwell B and Gutteridge M. 1986.** Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* pp: 501-514.

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

**Hanane P., Catherine M, Anna K. 2012.** Ecotoxicological Effects of Engineered Cadmium Nanoparticles through Biochemical and behavioral Responses in Two Marine Invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana* , UPPSALA: 1-33.

**Hansen S. 2009.** Regulation and Risk Assessment of Nanomaterials Too Little, Too Late?. Mémoire en vue d'obtention de la thèse de doctorat. Université technique du Danemark, p : 130.

**Harabawy A., Mosleh Y. 2014.** The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* *Ecotoxicology and Environmental Safety* 10 :4.2014.28-35.

**Hare J. 2004.** Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. pp: 2112-2114.

**Harris E. 1992.** Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb, J* 6. 2675-83.

**Hatch G. 2010.** Pollution and Oxidative stress in School children. India. *Pediatr.* pp : 233-239.

**Hett A. 2004.** Nanotechnology: Small matters, many unknowns. Swiss Reinsurance Company. p : 57.

**Hopkin S. 1989.** Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier Applied science, NY, USA. p 366.

**Hozawa A., Jacobs D., Steffes M. 2007.** Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction : the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA)/ Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) Study. *Clin Chem.* 53 : 1-9.

**Hulbert A. 2005.** On the importance of fatty acid composition of membranes. pp : 277-288.

## *I*

**Iersel V., Swart E., Nakadera Y., Van N., Koene J. 2014.** Effect of Male Accessory Gland Products on Egg Laying in Gastropod Molluscs. 88: 51698.

**Iglesias J and Castillejo J. 1999.** Field observations on feeding of the land snail *Helix aspersa* Müller. *J. Moll. Stud.* (65): 411-423.



## J

**Jackson BP., Bugge D., Ranville J., Chen C., 2012.** Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. Environ Sci Tech. 46: 5550-5556.

**Jacques B et André R.** 2008. Biochimie métabolique. 2<sup>ème</sup> édition. France.p : 121.

**Jaeschke H. 1995.** Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 209. pp: 104-111.

**Jones D., Mody V., Carlson J. 2002.** Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. Free Rad Biol Med 33:1290-1300.

## K

**Kavithal R., Deepa R., Sivagnanam S., Padmaja1., M. 2013.** Cadmium Nanoparticle Induced Histological and Biochemical changes in Hepatopancreas of Mud Crab *Scylla olivacea*, Journal of Academia and Industrial Research. (2) :205-209.

**Kim K., Klaine S., Cho J., Kim S., Kim S. 2010.** Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles according to size fraction. Sci Total Environ. 408(10): 2268-72.

**Kohler H., Rahman B., Rahman H. 1994.** Assessment of stress situations in the grey garden slug *Deroceras reticulatum* caused by heavy metal intoxication : Semi quantification of the 70 KD Stress protein (hsp70).Verh.Dtsch.Zool.Des ;87,328-329.

**Kohler M and Fritzsche W. 2004.** Nanotechnology, An Introduction to nanostructuring techniques. Wiley-VCH. p : 272.

**Kramer H., Gonick H., Lu E. 1986.** In vitro inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase by trace metals: Relation to renal and cardiovascular damage.Nephron.44:329-336.

## *L*

**Lauwerys R., Vincent H., Dominique L. 2007.** Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles. Ed. Masson. pp : 204-224.

**Lawton L and Donaldson W. 1991.** Lead induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. Biological Trace Element Research, 28, 83-97.

**Levine R., Garland D., Oliver C., Amici A., Climent I., Lenz, A.G. 2000.** The evolution of free radicals and oxidative stress. Am j med. 108: 652-659.

**Leyral G., Viering E. 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. Ed. Doin éditeurs. pp: 267-268.

**Little E., Archeski R., Flerov B., Koslovskay V.1990.** Behavioural indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. Environ. Contam. Toxicol. 19 : 380-385.

## *M*

**Mac L. 2007.** Advances in sports and exercise science series: Nutrition and Sport: Antioxidants and free radicals .pp: 203.

**Madec L.1983.** Importance des conditions climatiques et de l'origine des individus pour la reproduction de l'escargot petit-gris en élevage sous bâtiment contrôlé. Session ITAVI. p12

**Mao G and Paznausky H. 1992.** Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. 305 (3): 6-233.

**Marnett L, 2002.** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology. pp.181-222.

**Martizez M. 1995.** Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. 77. pp: 147-161.

**Maynard A and Kuempel E. 2005.** Airborne nanostructured particles and occupational health. Journal of Nanoparticle Research, (7):587-614.

**Maynard A., Baron P., Foley M., Shvedova A., Kisin E., Castranova V. 2004.** Exposure to Carbon Nanotube Material: Aerosol Release During the Handling of Unrefined Single- Walled Carbon Nanotube Material. Part A. Journal of Toxicology and Environmental Health, 67 (1) : 87-107.

**Menaceur N .2015.** Effet du carbofuran sur quelques paramètres biologiques chez un gastéropode « *Helix aspersa* ». Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de MASTER En Toxicologie fondamentale. Université de Tébessa. p 40.

**Meneghini R. 1997.** Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. Free Radic. Biol. Med. 23, p.783-792.

**Michalet X., Pinaud F., Bentolila L., Tsay J., Doose S., Li J., Sundaresan G., Wu A., Gambhir S., Weiss S. 2005.** Quantum Dots for Live Cells, in vivo Imaging and diagnostics. Science. pp : 538-544.

**Migdal C and Serres M. 2011.** Reactive oxygen species and oxidative stress. Med. Sci. Paris 27(4) :405-412.

**Moncada S. 1993.** The L-arginine- nitric oxide Pathway. 329 (27): 2002-2012.

**Monteiro N et Inman A. 2006.** Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. pp : 1070-1078.

**Murray C., Norris D., Bawendi M. 1993.** Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. (115): 8706.

## *N*

**Navarro E., BaunA., Behra R., Hartmann N., Filser J., Miao A., Quigg E., Santschi P., Sigg L. 2008.** Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi, Ecotoxicology. 17: 372-386.

**Nesto N., Romano S., Moschino V., Mauri M., Da Ros L. 2007.** Bioaccumulation and Biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. Mar. Pollut. Bull. (55) :84-469.

## O

**Oberdörster G. 2005.** Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*. 2- 8.

**Ostiguy C., Soucy B., Lapointe G., Woods C., Ménard L., Trottier M. 2008.** Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules. Série Études et recherches, Rapport IRSST. Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail. Montréal. 2<sup>e</sup> édition. p120.

## P

**Palier M. 1991.** Reactive oxygen Species and rat renal epithelial Cells during hypoxia and reoxygenation. *Kidney*. pp: 1041-1049.

**Pampanin D., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C. 2005.** Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). 50. 154-1557.

**Park H., Kim J., Chin B., Kim Y., Park O. 2004.** *Nanotechnology*, 15 :1217.

**Peters A., Wichmann H., Tuch T., Heinrich J., Heyder J. 1997.** Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles, *Am J Respir Crit Care Med*. 155(4): 1376-1383.

**Punita S and Kedar S. 2012.** Synthesis of CdSe nanoparticles by solvothermal route: Structural, optical and spectroscopic properties. pp : 1-3.

## R

**Radi F. Beckman, J.S Busch K.N and Freeman B.A. 1991.** Peroxynitrite oxidation of sulhydryls .the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide *J.Biol.Chem*. 266:4244-4250.

**Regoli F and Principato G. 1995.** Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31 :143-164.

**Rissanen T., Voutilainen S., Nyysönen K., Salonen R., Kaplan G., Salonen J. 2003.** Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr.* 77:133-8.

**Roney C., Kulkarni P., Arora V., Antich P., Bonte F., Wu A., Manohar S., Liang H., Kulkarni A., Sung H., Sairam M., Aminabhavi T. 2005.** Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release.* 108 (3): 193-214.

## S

**Sander V., Elferra M., Swart., Yumi N., Nico M., Van S. 2014.** Effect of Male Accessory Gland Products on Egg Laying in Gastropod Molluscs (88): 51698.

**Sano N., Wang H., Alexandrou I., Chhowalla M., Teo KBK., Amaratunga G. 2002.** Properties of carbon onions produced by an arc discharge in water. *Journal of Applied Physics.* 92 (5) : 2783-2788.

**Santos A., Miguel A., Tomaz L., Malhó R., Maycock C., Patto C., Fevereiro P., Oliva A. 2010.** The impact of CdSe/ZnS quantum dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture. *J Nanobiotechnol.*8: 08-10.

**Sayre L., Moneira P., Smith M., Perry G. 2008.** Métal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Annist super Sanita.* 41(2): 143-164.

**Scheifler R. 2002.** Evaluation de la biodisponibilité et des transferts de polluants métalliques et organiques dans les réseaux trophique "sol-plante-invertébrés". Thèse de doctorat. Université de Franche-Comté, Besançon, France. p 196.

**Serafini M., Laranjinha J., Almeida L., Maiani G. 2000.** Inhibition of Human LDL lipid peroxidation by phenol-rich and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Nutr biochem.*11: 585-590.

**Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyek C., Newhall A., 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.

**Smith C., Shaw J., Handy D. 2007.** Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic toxicology*. 82(2): 949-109.

**Stevnsner T., Tharslund T., De souza-pinto N., Boher V. 2002.** Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. pp:1189-1196.

**Stevnsner T., Tharslund T., Desouza N., Boher V. 2002.** Mitochondrial repair of 8 oxoguanine and changes with aging. *Exp. Gerontol*. 37:1189-1196.

**Stief T. 2000.** The blood fibrinolysis/deep-Sea analogy : a hypothesis on the cell signals singlet oxygen/ photons as natural anti-hormones. *Thrombosis*. (99): 1-20.

**Suliman A. 2015.** Cadmium sulfide nanoparticle induces oxidative stress and pro-inflammatory effects in human lung adenocarcinoma epithelial cells. *Grossv Mark*. (97):619-633.

**Sullivan C. 2007.** Quantum dots: inorganic materials efficiently power flatpanel displays. *Laser Focus World*. p : 43-65.

## *T*

**Tansil N and Gao Z. 2006.** Optical detection of nanoparticle-enhanced human papilloma virus genotyping microarrays. *Nanotoday*. pp. 1- 28.

**Tedesco S., Doyle H., Blasco J., Redmond G., Sheehan D. 2010.** Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol*.100: 178-186.

**Thoman R. 1989.** Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environmental Science and Technology* 23. 699-707.

**Tweeddale H., Kondo M., Gebicki J. 2007.** Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals. *Archives of biochemistry and biophysics*. 459. 151-8.

## V

**Valko M., Leibfrilz D., Mancol j., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser j. 2007.** Free radicals and antioxidants in norFmal physiological functions and human disease. *Biocell.* 39 : 44-84.

**Viala A et Botta A.** Toxicologie. 2<sup>e</sup> édition. Lavoisier. pp : 1036-1054.

## W

**Wang J., Zhu X., Zhang X., Zhao Z., Liu H., George R., Wilson-Rawls J., Chang Y., Chen Y. 2011.** Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO<sub>2</sub>nanoparticles. *Chemosphere.* 83.461-467.

**Weckberker G and Cory G. 1988.** Ribonucléotide reductase activity abd growth of glutathione depleted mouse leukemial 1210 cells in vitro. *Cacer letters.* 40 : 257-264.

## Y

**Yang L., and Watts D. 2005.** Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol Lett.* 158 (2): 122-132.

## Z

**Zhang J., Wang X., Xiao M., Qu L., Peng X. 2002.** Lattice contraction in free-standing CdSe nanocrystals: 2076-2078.

**Zhao Y., Meng H., Chen Z., Zhao F., Chai Z. 2007.** Biological Activities of Nanomaterials/ Nanoparticles, In *Nanotoxicology, Interactions of Nanomaterials with Biological Systems* American Scientific Publishers: 1-28.

**Zhu Y., Chang Y., Chen Y .S. 2010.** Toxicity and bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*.88-91.

**Références Webographiques**

.www.techno-science.net

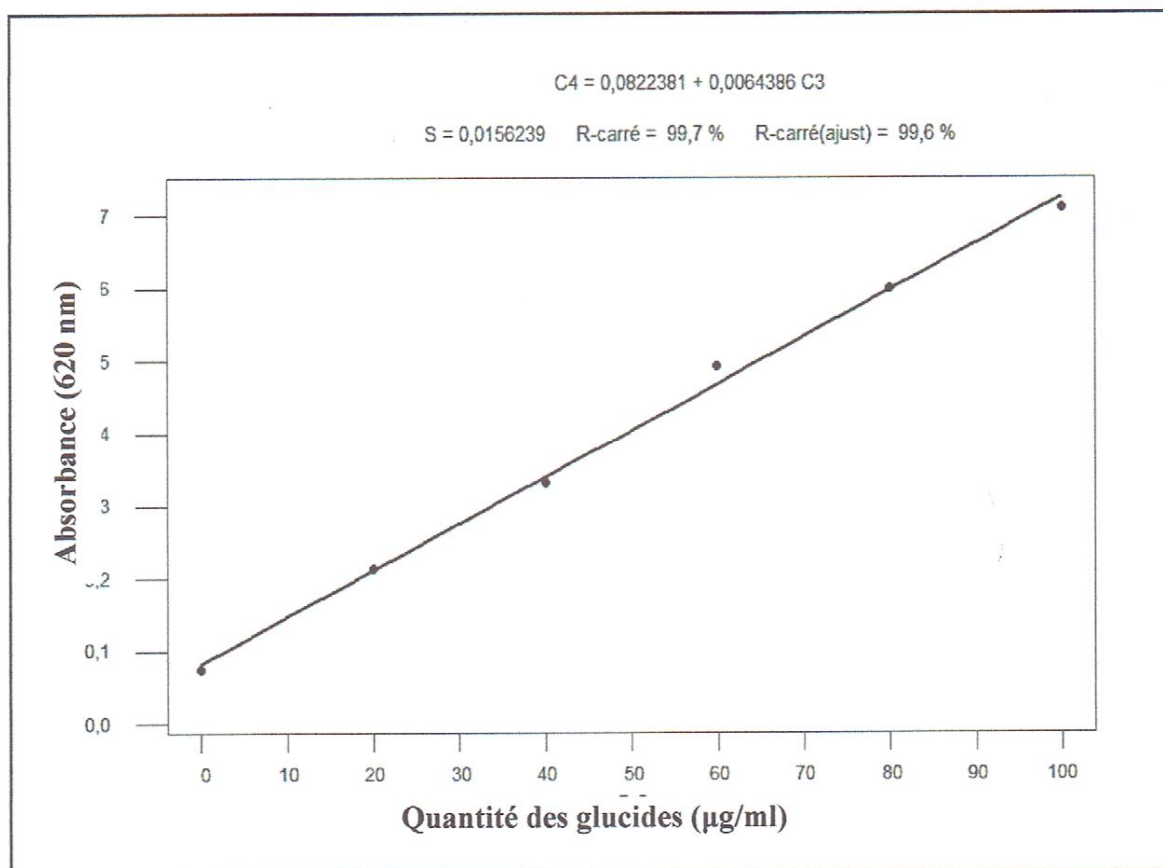
.www.naturae-scientia.com



## 1. Courbe d'étalonnage pour dosage des glucides au niveau d'hépatopancréas

**Tableau 01** : Réalisation de la gamme d'étalonnage pour dosage des glucides

Solutions	Tubes					
	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

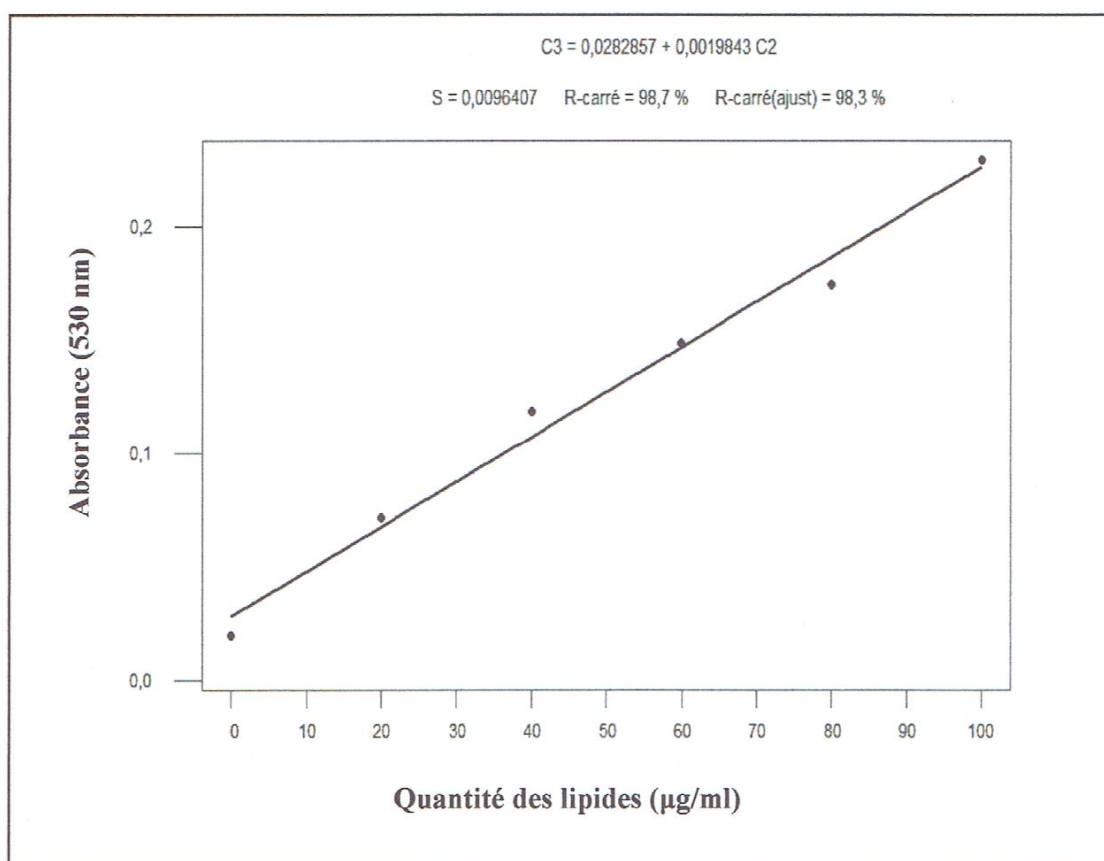


**Figure 01**: La courbe d'étalonnage pour dosage des glucides.

## 2. Courbe d'étalonnage pour dosage des lipides au niveau d'hépatopancréas

**Tableau 02** : Réalisation de la gamme d'étalonnage pour dosage des lipides.

Solutions	Tubes					
	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipide (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant éther/chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif SPV (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

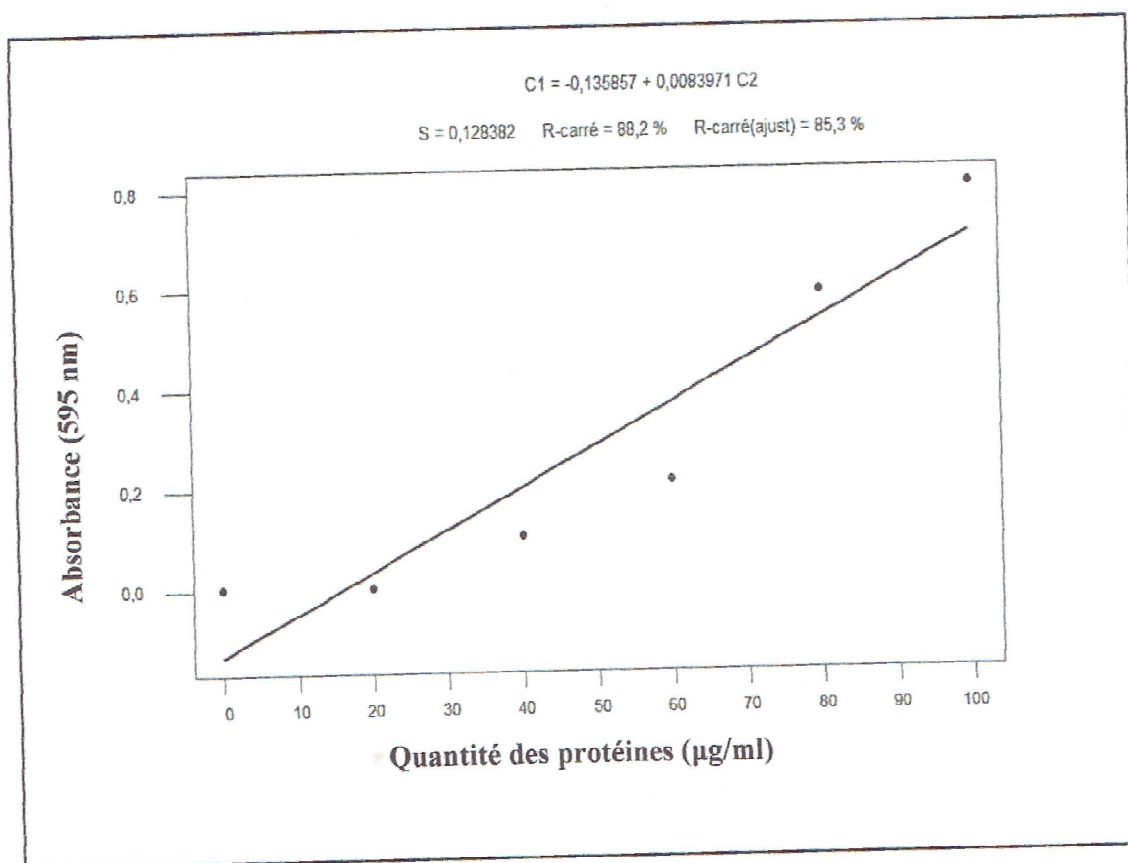


**Figure 02** : La courbe d'étalonnage pour dosage des lipides.

### 3. Courbe d'étalonnage pour dosage des protéines au niveau d'hépatopancréas

**Tableau 02** : Réalisation de la gamme d'étalonnage pour dosage des protéines.

Solutions	Tubes					
	1	2	3	4	5	6
Solution mère lipide (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant éther/chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif SPV (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5



**Figure 03** : La courbe d'étalonnage pour dosage des protéines.

Tableau :

Tableau périodique des éléments

CLASSIFICATION PÉRIODIQUE DES ÉLÉMENTS																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<b>K</b>	Hydrogène 1 <b>H</b> 1,0079		État physique, à 20 °C, de l'élément à l'état de corps pur : <b>X</b> : solide <b>X</b> : liquide <b>X</b> : gaz <b>X</b> : élément artificiel															Hélium 2 <b>He</b> 4,0026
<b>L</b>	Lithium 3 <b>Li</b> 6,941	Béryllium 4 <b>Be</b> 9,0122	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px dashed red; padding: 2px;">                     Nom  <math>Z X M</math>                      Symbole                      Masse molaire atomique                      (en g.mol<sup>-1</sup>)                 </div> </div>															<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;">                     Colonne 1 (sauf l'hydrogène) : alcalins                      Colonne 2 : alcalino-terreux                      Colonne 16 : chalcogènes                      Colonne 17 : halogènes                      Colonne 18 : gaz nobles                 </div> <div style="width: 48%;">                     Bore 5 <b>B</b> 10,811 Carbone 6 <b>C</b> 12,011 Azote 7 <b>N</b> 14,007 Oxygène 8 <b>O</b> 15,999 Fluor 9 <b>F</b> 18,998 Néon 10 <b>Ne</b> 20,180                 </div> </div>
<b>M</b>	Sodium 11 <b>Na</b> 22,990	Magnésium 12 <b>Mg</b> 24,305	Scandium 21 <b>Sc</b> 44,956 Titane 22 <b>Ti</b> 47,867 Vanadium 23 <b>V</b> 50,942 Chrome 24 <b>Cr</b> 51,996 Manganèse 25 <b>Mn</b> 54,938 Fer 26 <b>Fe</b> 55,845 Cobalt 27 <b>Co</b> 58,933 Nickel 28 <b>Ni</b> 58,693 Cuivre 29 <b>Cu</b> 63,546 Zinc 30 <b>Zn</b> 65,409 Gallium 31 <b>Ga</b> 69,723 Germanium 32 <b>Ge</b> 72,64 Arsenic 33 <b>As</b> 74,922 Sélénium 34 <b>Se</b> 78,96 Brome 35 <b>Br</b> 79,904 Krypton 36 <b>Kr</b> 83,798															Aluminium 13 <b>Al</b> 26,982 Silicium 14 <b>Si</b> 28,086 Phosphore 15 <b>P</b> 30,974 Soufre 16 <b>S</b> 32,066 Chlore 17 <b>Cl</b> 35,453 Argon 18 <b>Ar</b> 39,948
<b>N</b>	Potassium 19 <b>K</b> 39,098	Calcium 20 <b>Ca</b> 40,078	Yttrium 39 <b>Y</b> 88,906 Zirconium 40 <b>Zr</b> 91,224 Niobium 41 <b>Nb</b> 92,906 Molybdène 42 <b>Mo</b> 95,94 Technétium 43 <b>Tc</b> (97,9) Ruthénium 44 <b>Ru</b> 101,07 Rhodium 45 <b>Rh</b> 102,91 Palladium 46 <b>Pd</b> 106,42 Argent 47 <b>Ag</b> 107,87 Cadmium 48 <b>Cd</b> 112,41 Indium 49 <b>In</b> 114,82 Étain 50 <b>Sn</b> 118,71 Antimoine 51 <b>Sb</b> 121,76 Tellure 52 <b>Te</b> 127,60 Iode 53 <b>I</b> 126,90 Xénon 54 <b>Xe</b> 131,29 Radon 86 <b>Rn</b> (222)															
<b>O</b>	Rubidium 37 <b>Rb</b> 85,468	Strontium 38 <b>Sr</b> 87,62	Hafnium 72 <b>Hf</b> 178,49 Tantalum 73 <b>Ta</b> 180,95 Tungstène 74 <b>W</b> 183,84 Rhenium 75 <b>Re</b> 186,21 Osmium 76 <b>Os</b> 190,23 Iridium 77 <b>Ir</b> 192,22 Platine 78 <b>Pt</b> 195,08 Or 79 <b>Au</b> 196,97 Mercure 80 <b>Hg</b> 200,59 Thallium 81 <b>Tl</b> 204,38 Plomb 82 <b>Pb</b> 207,2 Bismuth 83 <b>Bi</b> 208,98 Polonium 84 <b>Po</b> (209) Astatine 85 <b>At</b> (210)															
<b>P</b>	Césium 55 <b>Cs</b> 132,91	Baryum 56 <b>Ba</b> 137,33	Francium 87 <b>Fr</b> (223) Radium 88 <b>Ra</b> (226) Actinide Ac à Lr Rutherfordium 104 <b>Rf</b> (261) Dubnium 105 <b>Dub</b> (262) Seaborgium 106 <b>Sg</b> (266) Bohrium 107 <b>Bh</b> (264) Hassium 108 <b>Hs</b> (277) Meitnerium 109 <b>Mt</b> (268) Darmstadtium 110 <b>Ds</b> (271) Ununium 111 <b>Uu</b> (272) Ununbium 112 <b>Uub</b> (285) Ununquadium 114 <b>Uuq</b> (289)															
<b>Q</b>			Lanthane 57 <b>La</b> 138,91 Cérium 58 <b>Ce</b> 140,12 Praseodyme 59 <b>Pr</b> 140,91 Néodyme 60 <b>Nd</b> 144,24 Prométhium 61 <b>Pm</b> (145) Samarium 62 <b>Sm</b> 150,36 Europium 63 <b>Eu</b> 151,96 Gadolinium 64 <b>Gd</b> 157,25 Terbium 65 <b>Tb</b> 158,93 Dysprosium 66 <b>Dy</b> 162,50 Holmium 67 <b>Ho</b> 164,93 Erbium 68 <b>Er</b> 167,26 Thulium 69 <b>Tm</b> 168,93 Ytterbium 70 <b>Yb</b> 173,04 Lutétium 71 <b>Lu</b> 174,97 Actinium 89 <b>Ac</b> (227) Thorium 90 <b>Th</b> 232,04 Protactinium 91 <b>Pa</b> 231,04 Uranium 92 <b>U</b> 238,03 Neptunium 93 <b>Np</b> (237) Plutonium 94 <b>Pu</b> (244) Américium 95 <b>Am</b> (243) Curium 96 <b>Cm</b> (247) Berkélium 97 <b>Bk</b> (247) Californium 98 <b>Cf</b> (251) Einsteinium 99 <b>Es</b> (252) Fermium 100 <b>Fm</b> (257) Mendelevium 101 <b>Md</b> (258) Nobelium 102 <b>Nb</b> (259) Lawrencium 103 <b>Lr</b> (262)															