



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique



Université 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 : Sciences Biologiques

Option : Toxicologie

### Thème

**Étude du stress oxydatif généré par les nanoparticules  
chez *Helix aspersa* :  
Cas du dioxyde de titane**

Présenté par  
BELGACEM Oumaima  
CHAREF Marwa

Devant le Jury

Dr. BOUZERAA H.	M.C.B	Université de Tébessa	Président
Dr. AMAMRA R.	M.C.B	Université de Tébessa	Rapporteur
Dr. BENHAMLAOUI K.	M.C.B	Université de Tébessa	Examineur

Date de soutenance : 26/05/2018

Note :

Mention :

Année Universitaire 2017/2018



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique



Université 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 : Sciences Biologiques

Option : Toxicologie

### Thème

**Étude du stress oxydatif généré par les nanoparticules  
chez *Helix aspersa* :  
Cas du dioxyde de titane**

Présenté par  
BELGACEM Oumaima  
CHAREF Marwa

Devant le Jury

Dr. BOUZERAA H.	M.C.B	Université de Tébessa	Président
Dr. AMAMRA R.	M.C.B	Université de Tébessa	Rapporteur
Dr. BENHAMLAOUI K.	M.C.B	Université de Tébessa	Examineur

Date de soutenance : 26/05/2018

Note :

Mention :

Année Universitaire 2017/2018



# Résumé

La présente étude porte sur l'évaluation des effets toxiques potentiels des nanoparticules du dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur un organisme bio-accumulateur /bio-indicateur de pollution : *Helix aspersa*.

L'exposition aux concentrations croissantes de TiO<sub>2</sub>, à savoir, 100, 500, 1000 et 2000 µg/g a mis en évidence des perturbations physiologique et biochimique illustrées par une diminution significative du poids de l'hépatopancréas et une augmentation dose dépendante et hautement significative de la teneur des protéines totales.

Le suivi des bio-marqueurs montre une déplétion dose dépendante et hautement significative du taux de glutathion (GSH) parallèlement à une intensification de l'activité glutathion-S-transférase (GST).

L'ensemble des résultats obtenus indique le déclenchement du système de détoxification afin de faire face au stress oxydatif occasionné.

**Mots clés** : Nanoparticules, TiO<sub>2</sub>, *Helix aspersa*, Stress Oxydant, Bio-marqueurs, Hépatopancréas.

# Abstract

The present study focuses on the assessment of the toxicity of nanoparticle: titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) on a bio-accumulator / bio-indicator of pollution: *Helix aspersa*.

Exposure to increasing concentrations of TiO<sub>2</sub>, that is, 100, 500, 1000 et 2000 µg/g has highlighted physiological and biochemical disturbances illustrated by a significant decrease in the weight of hepatopancreas and a dose dependent and highly significant increase in total protein levels.

Regarding biomarker, our results shows a highly significant and dependent dose depletion in glutathione (GSH) level, in parallel to an intensification of glutathione-S-transferase (GST) activity.

The obtained results indicate the triggering of the detoxification system to cope with the oxidative stress caused.

**Keywords:** Nanoparticles, TiO<sub>2</sub>, *Helix aspersa*, Oxidative Stress, Biomarkers, Hepatopancreas.

# ملخص

تركز هذه الدراسة على تقييم التأثيرات السمية المحتملة لجزيئات نانوية من ثاني أكسيد تيتانيوم (TiO<sub>2</sub>) على كائنات عضوية مخزنة والبيئة على تلوث محيط: *Helix aspersa*. تم تعريف العينات تركيزات متزايدة من جزيئات ثاني أكسيد تيتانيوم وهي 100، 1000، 200، 2000 ميكروغرام/غرام) ما سلط الضوء على اضطرابات فيزيولوجية وبيوكيميائية تتجسد في انخفاض كبير في وزن البنكرياس الكبدي مع زيادة معتبرة حسب جرعة على مستوى بروتين كلي.

اتباع مؤشرات حيوية أظهر انخفاض بنسبة معتبرة اعتمادا على جرعة على مستوى GSH بالإضافة إلى تفاعل في GST.

مجموع نتائج متحصل عليها تدل على انطلاق نظام إزالة سموم من أجل التعامل مع الاجهاد تأكسدي ناجم.

الكلمات مفتاحية: جزيئات نانوية، ثاني أكسيد تيتانيوم، *Helix aspersa*، الاجهاد تأكسدي، مؤشرات حيوية، بنكرياس كبدي.

## *Remerciements*

*Cet humble travail a été réalisé au Laboratoire de Toxicologie de l'Université de Tébessa.*

*Toute notre reconnaissance pour le Dr. Bouzeraa H. d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à notre encadreur Dr. AMAMRA R, pour nous avoir accompagnées dans la réalisation de ce travail. Son aide nous a été plus que bénéfique : Grâce à elle, à ses conseils, à son attention et à sa disponibilité, ce travail a pu être réalisé. Nous la remercions, également, pour son écoute et sa compréhension, et espérons être à la hauteur de sa confiance.*

*Nous exprimons toute notre gratitude, au Dr. Benhamlaoui K, pour l'intérêt qu'elle a accordé à notre travail, en étant membre du Jury.*

*Nous ne cesserons jamais d'être reconnaissantes à l'égard de toutes les personnes qui nous ont apporté de l'aide...*





## Dédicace

*Dans ce bas monde, il n'y a pas plus cher que nos parents, Puisse Dieu leur accorder santé et longue vie.*

*Je dédie ce travail à mes proches et amis en reconnaissance aux efforts qu'ils ont consentis, sans relâche et avec grande générosité.*

*À mon encadreur AMAMRA Rima pour m'avoir aidé tout au long de ce cursus.*

*Merci de m'avoir poussé vers l'avant et encouragé à chaque fois que ma volonté flanchait ...*

*Ce travail voit enfin le jour, et me permettra sans nul doute de construire mon avenir...*

Oumaima



## *Dédicace*

*Mes remerciements vont d'abord à Dieu*

*Je dédie ce modeste travail à mon papa, le soleil de ma vie le bon cœur, le meilleur père, je te remercie pour tous les efforts que tu as fournis pour moi.*

*Papa merci*

*A ma maman Farida*

*Si tu es savais combien je t'aime, tu comprendras que sans toi je ne pourrais vivre ...*

*A mon encadreur Dr. AMAMRA R.*

*A mes chers frères Abderrazak, Mohamed, Oussama, Yassine et Ayoub*

*A mes très chères sœurs Salima et Afef qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans les moments difficiles.*

*A ma fidèle Binôme famille grands et petits.*

*A mes très chers amis Samira, Loubna, Saida, Assia, Soraya, Chalbia, Amina, Wanessa, Khadija, Sarra,*

*Hamza et Dhikra.*

*A tous mes collègues de promotion*

*Master 2 Toxicologie, Oumäïma*

*A tous les membres de ma famille*

*Marwaa*

# Table des matières

- Résumé
- Abstract
- ملخص
- Remerciements
- Dédicace
- Liste des tableaux
- Liste des figures
- Liste des symboles
- Table des matières

## CHAPITRE I INTRODUCTION GÉNÉRALE ET OBJECTIF DU TRAVAIL

1.	Nanomatériaux : Quels sont les enjeux, les origines et les impacts environnementaux et sanitaires ?	03
1.1.	Enjeux	03
1.2.	Origines et classification	04
1.3.	Risques sur L'environnement et l'Homme	05
1.3.1.	Risques sur l'environnement	05
1.3.2.	Risque sur l'Homme	06
2.	Dioxyde de Titane (TiO <sub>2</sub> )	08
2.1.	Toxicologie	08
2.2.	Ecotoxicité	09
3.	Stress oxydatif	10
4.	Utilisation des gastéropodes dans la bio-indication	11
5.	Objectif du travail	12

## CHAPITRE II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.	Matériel biologique	13
1.1.	Anatomie d' <i>Helix aspersa</i>	13
1.2.	Reproduction	14
1.3.	Rythme de vie de l'escargot	15
1.4.	Hibernation et estivation	16
1.4.1.	Estivation	16
1.4.2.	Hibernation	16
1.5.	Longévité	16
2.	Matériel chimique	17
3.	Méthodes	18

3.1.	Conditions d'élevage	18
3.2.	Mode de traitement	18
3.3.	Dissection et prélèvement de l'hépatopancréas	19
4.	Paramètres étudiés	20
4.1.	Paramètre physiologique	20
4.1.1.	Poids de l'hépatopancréas	20
4.2.	Paramètre biochimique	20
4.2.1.	Détermination du taux des protéines totales	20
4.3.	Biomarqueurs	21
4.3.1.	Détermination du taux de glutathion (GSH)	21
4.3.2.	Mesure de l'activité glutathion-S-transférase (GST)	24
5.	Etude statistique	25

### CHAPITRE III - RÉSULTATS

1.	Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur certains paramètres physiologiques.	26
1.1.	Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur l'évolution du poids moyen de l'hépatopancréas des escargots <i>Helix aspersa</i> après quatre semaines de traitement.	26
2.	Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur certains paramètres biochimiques.	27
2.1.	Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur l'évolution du taux des protéines totales au niveau de l'hépatopancréas des escargots <i>Helix aspersa</i> après quatre semaines de traitement.	27
3.	Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur certains biomarqueurs du stress oxydant.	28
3.1.	Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur l'évolution du taux de glutathion (GSH) au niveau de l'hépatopancréas des escargots <i>Helix aspersa</i> après quatre semaines de traitement.	28
3.2.	Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur la variation de l'activité glutathion-S-transférase (GST) au niveau de l'hépatopancréas des escargots <i>Helix aspersa</i> après quatre semaines de traitement.	29

### CHAPITRE IV – DISCUSSION

•	Conclusion	32
•	Perspectives	33

### CHAPITRE V – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

•	Références bibliographiques	
---	-----------------------------	--

## Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	<b>Tableau récapitulant les différentes applications du T.</b>	<b>08</b>
<b>02</b>	<b>Caractéristiques physicochimiques du dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>)</b>	<b>17</b>
<b>03</b>	<b>Répartition des concentrations croissantes du TiO<sub>2</sub></b>	<b>19</b>

## Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Différentes formes des nanoparticules (bâtonnets, sphères et formes branchée) prises au microscope électronique à transmission haute résolution	03
02	Contamination et devenir des nanoparticules dans l'environnement	04
03	Principaux effets des nanoparticules sur la santé humaine	07
04	Mécanisme d'action des nanoparticules	07
05	Domages cellulaires occasionnés par les ERO.	10
06	Différentes voies de contamination d' <i>Helix aspersa</i>	12
07	<i>Helix aspersa</i>	13
08	Schéma illustrant l'anatomie de l'escargot	14
09	L'accouplement chez <i>Helix aspersa</i>	15
10	Nanoparticule du dioxyde de titane (TiO <sub>2</sub> )	17
11	Elevage des escargots dans le laboratoire	18
12	Exposition des escargots à la nourriture contaminée	19
13	Dissection et prélèvement de l'hépatopancréas	20
14	Dosage des protéines	21
15	Dosage du glutathion	23
16	Mesure de l'activité GST.	25
17	Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur l'évolution du poids moyen de l'hépatopancréas des escargots <i>Helix aspersa</i>	26
18	Effet des concentrations croissantes de dioxyde du titane sur l'évolution du taux des protéines totales chez les escargots <i>Helix aspersa</i>	27
19	Effet des concentrations croissantes du dioxyde de titane sur l'évolution du taux de GSH chez les escargots <i>Helix aspersa</i>	28
20	Effet des concentrations croissantes du dioxyde de titane sur la variation de l'activité GST chez les escargots <i>Helix aspersa</i>	29

## Liste des symboles

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ASS</b>	Acide sulfosalicylique
<b>BBC</b>	Bleu brillant de Commassie
<b>BSA</b>	l'Albumine Sérum de Bœuf
<b>CDNB</b>	1-chloro-2-4 dinitrobenzène
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DTNB</b>	Acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine tétra-acétique
<b>ERO</b>	Espèce réactive oxygénée
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GST</b>	glutathion-S-transférase
<b>M</b>	Molarité (Mole)
<b>mg</b>	milligramme
<b>ml</b>	millilitre
<b>mn</b>	minute
<b>µg</b>	microgramme
<b>µl</b>	microlitre
<b>NaOH</b>	Sodium hydroxyde
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>NPs</b>	Nanoparticules
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>TCA</b>	Trichloracétique
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de titane

**Chapitre I**  
**Introduction générale**  
**et**  
**Objectif du travail**

# Chapitre I : Introduction générale et objectif du travail

Le domaine des nanotechnologies constitue un secteur en plein essor depuis une vingtaine d'années. L'intérêt porté aux nanomatériaux repose sur des propriétés inhérentes à leurs dimensions et à leurs formes. Ainsi, la modification de la taille et de la forme des matériaux confère une amélioration de leurs propriétés physiques, voire l'apparition de nouvelles propriétés non observées avec des matériaux de taille conventionnelle. Les nanomatériaux sont utilisés dans plusieurs domaines tels que l'informatique ou la téléphonie mobile, mais également dans les secteurs de la santé, de l'alimentation, du textile, de l'automobile, du bâtiment, du sport ou des produits cosmétiques (**Perreault, 2012**).

Ce domaine de science s'intéresse à plusieurs aspects des nano-objets (dont une dimension est inférieure à 100 nm) : synthèse, observation, manipulation, assemblage, étude et exploitation des phénomènes apparaissant à l'échelle nanométrique ou encore compréhension des interactions développées à cette échelle. Parmi les nano-objets les plus étudiés, on retrouve des nanoparticules de nombreux matériaux comme l'or, le silice, les oxydes métalliques (Exemple :  $\text{TiO}_2$ ) et les semi-conducteurs pour les cristaux quantiques (**Quignard, 2013**).

L'expansion et l'intensification des nanotechnologies, fait que de nouveaux produits contenant des nanomatériaux sont constamment mis sur le marché. Cependant, ce développement fulgurant augmente le risque d'exposition aux contaminants de taille nanométrique, ce qui comporte un risque non négligeable pour l'environnement et la santé. En effet, il est établi que 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, de ce fait, atteindre différents écosystèmes (**Delay et Frimmel, 2012**). De plus, l'étude du comportement de ces composés dans les différents compartiments environnementaux, de même, que leurs mécanismes d'action et leurs risques toxicologiques restent aussi bien mal cernée que compromettante.

C'est pour ces différentes raisons, qu'il est primordial d'accroître l'intérêt sur les études de bio-surveillances ou de bio-monitoring qui visent à évaluer la qualité de l'environnement en



# Chapitre I : Introduction générale et objectif du travail

caractérisant les éventuelles fluctuations morpho-physiologiques, métaboliques, biochimiques, comportementales et écologiques qui affectent la biocénose vivant dans cet environnement. Pour cela, différentes espèces bio-indicatrices et sensibles aux modifications environnementales sont utilisées : Ce sont de véritables outils de diagnostic offrant l'avantage de se prêter aisément aux expérimentations que requièrent les études toxicologiques.

L'escargot petit gris *Helix aspersa* est connu pour son pouvoir bio-accumulateur très importants aux niveaux des viscères. Il est exposé à des pollutions multiples (sols, végétaux et atmosphère) et représente, de ce fait, un modèle intégrateur complémentaire des organismes comme les annélides ou les organismes à régime strictement herbivore ou détritivore. Il est considéré, également, comme l'un des maillons de la chaîne trophique, et est la proie de nombreux prédateurs tels que les mammifères et les oiseaux. Il peut, donc, être à l'origine de transferts de polluants ou de contaminants (**Atailia, 2016**).

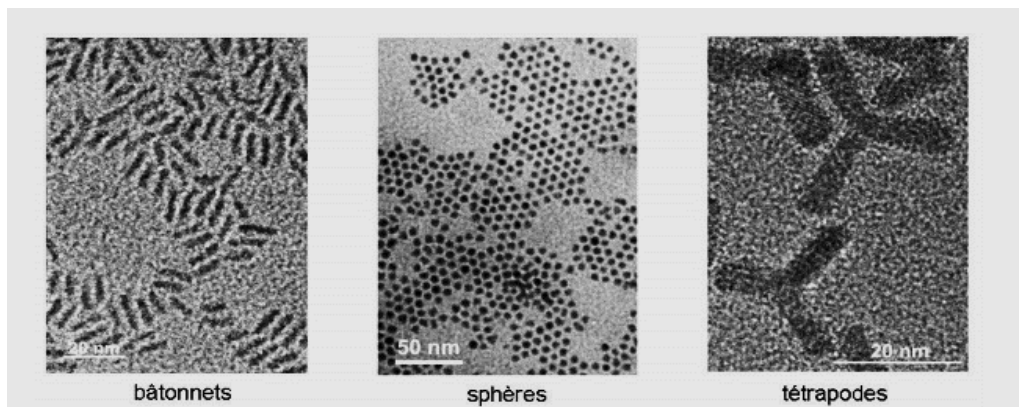
Notre travail a pour objectif d'étudier les effets toxiques potentiels induits par une nanoparticule manufacturée : le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) sur certains bio-marqueurs du stress oxydatif chez un organisme bioindicateur/bio-accumulateur : le gastéropode *Helix aspersa*.

## 1. Nanomatériaux : Quels sont les enjeux, les origines et les impacts environnementaux et sanitaires ?

Une nanoparticule est un assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes, formant un objet de taille nanométrique (1 à 100 nm). La plupart des nanoparticules sont des agrégats de petites molécules ou d'atomes (**Djehboub, 2010**).

Leur particularité réside dans le fait que la majorité des atomes qui les constituent se trouve en surface ce qui leur confère une surface d'échanges très importante : Il en découle des propriétés physico-chimiques particulières.

Elles se présentent, généralement, sous une forme sphérique mais peuvent, également, adopter d'autres formes géométriques comme des cubes, des bâtonnets, des octaèdres, des triangles, etc... (*Figure 01*) (**Protière, 2006**).



**Figure 01. Différentes formes (bâtonnets, sphères et formes branchées) prises au microscope électronique à transmission haute résolution**

**(Protière, 2006)**

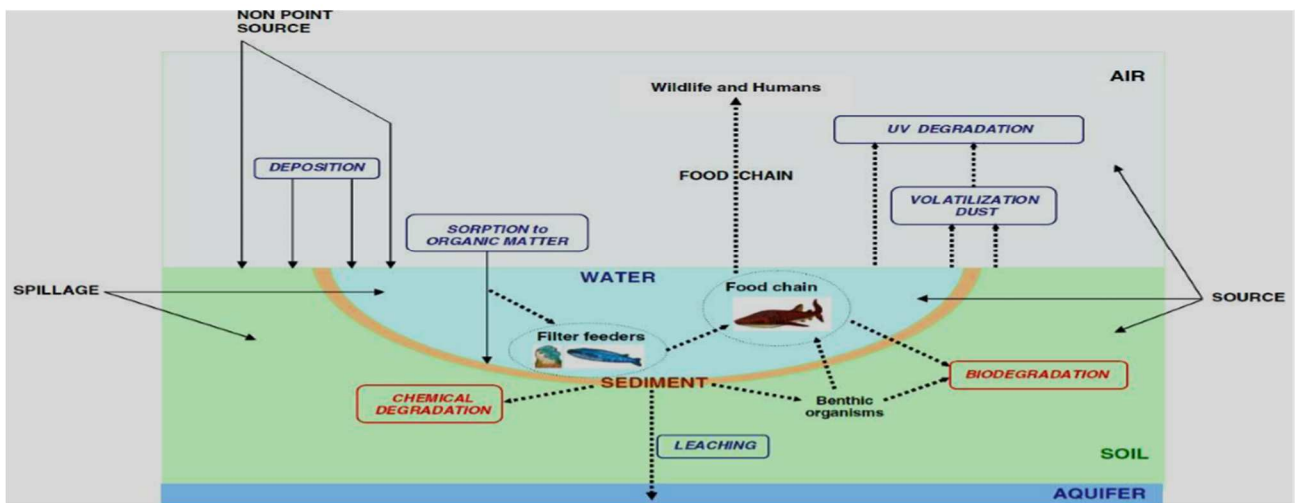
### 1.1. Enjeux

Du fait de leurs applications dans un grand nombre de secteurs, les nanotechnologies ont un important impact sur l'économie mondiale. En effet, les investissements des gouvernements et des entreprises deviennent de plus en plus importants car les nanoparticules permettent la création de produits innovants et l'amélioration des propriétés de produits déjà existants. Elles impliquent aussi une création d'emplois que la Commission Européenne a chiffrés à environ 10% de tout l'emploi consacré aux manufactures industrielles à l'échelle

# Chapitre I : Introduction générale et objectif du travail

mondiale pour 2014. En outre, les estimations faites par la BBC Research en 2010, montrent un accroissement d'environ 14,50 % l'année, pour la période allant de 2009 à 2015 (**Gaffet et al., 2016**)

Comme pour toute nouvelle technologie, le développement n'est pas sans risques pour la santé et l'environnement, raison pour laquelle, depuis quelques années, les scientifiques ont commencé à réaliser un plus grand nombre d'études sur la toxicité de ces composés (**Quinones et al., 2009**).



*Figure 02. Contamination et devenir des nanoparticules dans l'environnement (Giamberini, 2013)*

## 1.2. Origines et classification

Les nanoparticules sont présentes de manière ubiquitaire et sont généralement désignées sous le terme de « particules ultrafines » (**Buzea et al., 2007**). On distingue trois types de nanoparticules en fonction de leur provenance (**Donaldson et Poland, 2009**) :

- Les nanoparticules d'origine naturelle (issues des éruptions volcaniques, des aérosols marins, de l'érosion des sols et des feux de forêts) (**Jankowsda et Lukaszewsda, 2013**).
- Les nanoparticules d'origine anthropogénique non-intentionnelles issues des procédés chauds tels que le soudage ou encore de la combustion des moteurs (**Jankowsda et Lukaszewsda, 2013**).

# Chapitre I : Introduction générale et objectif du travail

- Les nanoparticules d'origine anthropogénique intentionnelle ou nanoparticules manufacturées (**Jankowsda et Lukaszewsda, 2013**).

Les nanoparticules peuvent être classées selon le fait qu'elles soient organiques ou inorganiques. En effet, de nombreux polymères organiques courants peuvent être produits dans des dimensions nanométriques. De même, plusieurs de ces polymères organiques sont 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. Certaines nanofibres organiques biodégradables pourraient être utilisées en médecine pour la réingénierie tissulaire, la régénération osseuse ou encore pour contrôler le relargage de médicaments (**Roco, 2009;Mamberger et Kvamme, 2008** ).

## 1.3. Risques sur L'environnement et l'Homme

### 1.3.1. Risques sur l'environnement

Pour évaluer l'impact des nanoparticules sur l'environnement, il faut dans un premier temps déterminer les quantités de nanoparticules qui sont rejetées dans l'environnement, les localiser (air, eau, sol), et déterminer leurs lieux d'accumulation préférentiels, ainsi que leurs conditions de persistance ou de dégradation. On pourra ensuite chercher à déterminer l'écotoxicité des nanoparticules (**Afsset, 2006**).

Les organismes vivants, au contact de l'air, du sol ou de l'eau peuvent être exposés aux substances chimiques présentes dans l'environnement, et en particulier aux nanoparticules. La taille et la structure des nanoparticules sont deux paramètres déterminants pour évaluer l'impact sur l'environnement. En effet, la taille influence la capacité de la particule à passer d'un milieu à un autre. Ensuite, la structure cristalline permet de déterminer la réactivité chimique (**Afsset, 2006**).

Par volatilisation de poussière, les nanoparticules se retrouvent dans l'air et peuvent contaminer la flore et la faune (au sol), puis ensuite la chaîne alimentaire et enfin l'Homme et la vie sauvage (**Afsset, 2006**).

Le sol peut lui être contaminé par déposition, déversement accidentel ou injection pour traitement pour ensuite atteindre la flore et la faune puis remonter jusqu'à l'Homme et la vie sauvage (**Afsset, 2006**).

# Chapitre I : Introduction générale et objectif du travail

La contamination des milieux solides et aquatiques par les métaux, provoque l'accumulation de ces derniers dans les plantes, via un transfert sol-plante et chez les humains et les animaux, à travers la chaîne alimentaire (**Khan et al., 2008**). L'accumulation des métaux sous forme nanométrique chez les humains et les animaux induit des mutations au niveau de l'ADN, en donnant naissance à différents types de cancers (**Yang et al., 2005**), ainsi qu'un retard dans la croissance et une inhibition des métabolismes cellulaires. (**Schröder et al., 2009**).

Le risque majeur des nanoparticules métalliques est leurs persistances pour une longue durée. Par exemple, la silice est retenue dans le sol de 150 à 5000 ans et garde une concentration élevée pour plus de 150 ans dans le sol après contamination (**Yang et al., 2005**). L'effet commun de toutes les nanoparticules métalliques est la production des espèces réactives d'oxygène (**Zhang et al., 2009**).

## 1.3.2. Risque sur l'Homme

L'Homme peut entrer en contact avec les nanoparticules de trois façons : en les touchant (voie cutanée), en les ingérant (voie digestive) ou en les respirant (voie respiratoire). Cette dernière est probablement la plus conséquente et donc la plus étudiée (**Win and Feng, 2005; Hillyer et Albrecht, 2001**).

Les nanomatériaux peuvent franchir des barrières cellulaires, telles que la peau, c'est le cas de ceux que l'on peut trouver dans les crèmes solaires. Les barrières cellulaires seront plus ou moins faciles à franchir en fonction de l'environnement dans lequel la personne se trouve (taux d'humidité, température, pression, etc.) ainsi que l'état dans lequel se trouve sa peau (**Ostiguy et al., 2006**).

La voie respiratoire est la voie privilégiée en exposition directe ; certains nanomatériaux par leurs propriétés physiques (nanotubes de carbone) peuvent, s'ils sont inhalés, pénétrer en profondeur dans les poumons (**Hillyer et Albrecht, 2001**).

La voie indirecte d'exposition aux nanomatériaux est la voie digestive. Il est possible d'être confronté aux nanomatériaux lorsque l'on mange ou l'on boit des aliments contaminés (**Ostiguy et al., 2006**).

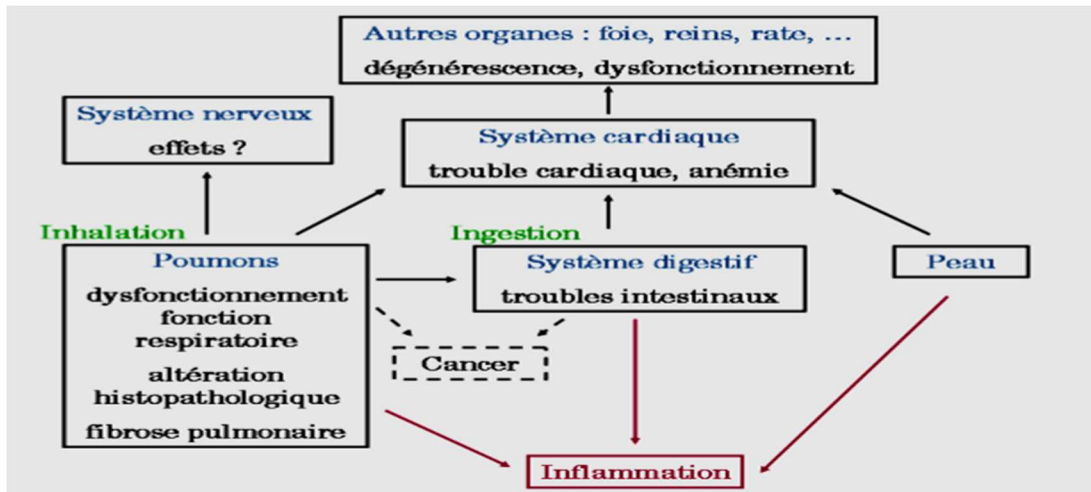


Figure 03. Principaux effets des nanoparticules sur la santé humaine (Ostiguy *et al.*, 2008)

Il s'agit d'une description non exhaustive des effets de toutes les nanoparticules confondues, qui a été établie sur des études in-vivo sur des rongeurs. (Ostiguy *et al.*, 2008).

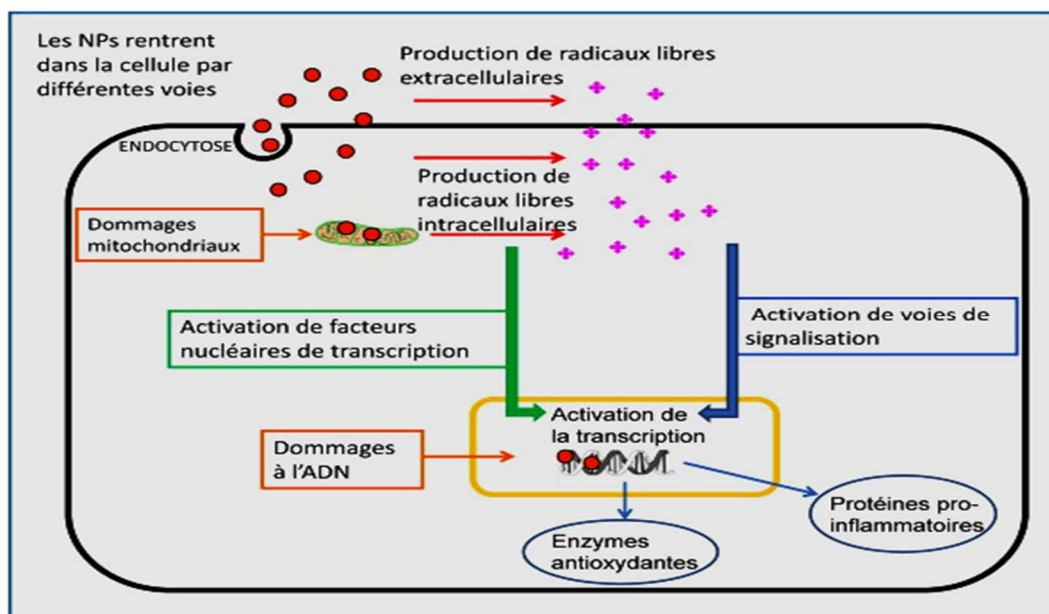


Figure 04. Mécanisme d'action des nanoparticules (Francelyne *et al.*, 2013)

# Chapitre I : Introduction générale et objectif du travail

## 2. Dioxyde de Titane (TiO<sub>2</sub>)

Le titane est le neuvième élément le plus abondant dans la croûte terrestre devant l'hydrogène et derrière le magnésium. Il est majoritairement retrouvé sous sa forme oxydée dans des minerais mixtes tels que l'ilménite (FeTiO<sub>3</sub>), la pérovskite (CaTiO<sub>3</sub>) ou bien la titanite (CaTiSiO<sub>5</sub>) (**Sugimoto *et al.*, 2003**).

Le TiO<sub>2</sub> peut, également, être extrait des différents minerais par des traitements de l'acide sulfurique produisant le sulfate de titanyle (TiOSO<sub>4</sub>). Ce composé peut, ensuite, être hydrolysé et déshydraté pour donner du TiO<sub>2</sub> (**Sugimoto *et al.*, 2003**).

Le dioxyde de titane est utilisé sous forme de poudre micrométrique depuis de nombreuses années (début des années 1920) pour ses propriétés opacifiante et blanchissante. Il représente environ 70 % de la production mondiale de pigments devant le noir de carbone et l'oxyde de fer. Depuis le début des années 1990, il est également utilisé sous forme de poudre nanométrique, notamment, pour ses capacités d'absorption des rayons ultraviolets (**Jargot *et al.*, 2013**). Les applications du dioxyde de titane sont résumées dans le tableau ci-après :

**Tableau 01. Tableau récapitulatif des différentes applications du TiO<sub>2</sub> (Bouhadoun, 2015)**

Domaine	Applications	Propriétés
<b>Environnement</b>	Papier peint, peinture, enduits, rideaux, abat-jour de fenêtre, ciment, vitres, tuiles. murs de tunnel, lampes de tunnels, murs insonorisés, purificateur d'air, désinfection des eaux usagées	Autonettoyant, antibactérien purification de l'air et purification de l'eau
<b>Médical</b>	Carrelage, murs des salles d'opérations	Antibactérien Stérilisation Autonettoyant
<b>Énergie</b>	Cellules solaires, production d'hydrogène	Conversion de l'énergie solaire, hydrolyse de l'eau

### 2.1. Toxicologie

Le dioxyde de titane a été longtemps considéré comme une matière inerte, peu toxique, souvent classée parmi les poussières réputées sans effet spécifique. Ses innombrables caractéristiques physico-chimiques, telles que, la taille des particules, le degré d'agglomération/agrégation, la structure cristalline et les caractéristiques de surface font

# Chapitre I : Introduction générale et objectif du travail

apparaître de nouvelles propriétés qui peuvent modifier l'activité biologique, et de ce fait, donner des profils toxicologiques qui peuvent s'avérer sensiblement différents (**Jargot *et al.*, 2013**).

Les données disponibles concernant les effets génotoxique, cancérigène et reprotoxique induits par les particules de  $\text{TiO}_2$  sont très hétérogènes. Elles portent essentiellement sur les formes nanométriques du xénobiotique. Cependant, les résultats sont difficiles à interpréter car ils sont fortement influencés par les conditions expérimentales, le type de lignée cellulaire ou de modèle biologique, le type de particules (taille et/ou surface spécifique, forme cristalline, présence ou absence d'enrobage...) et la voie d'exposition (**Jargot *et al.*, 2013**).

Par ailleurs, les poussières de  $\text{TiO}_2$ , sous forme micrométrique, sont sources d'irritation oculaire et des voies respiratoires. Sous forme nanométrique, des effets inflammatoires semblent possibles (**Sayes *et al.*, 2006**). Comme dit auparavant, les effets de ces substances sur l'organisme sont mal connus mais les principaux risques liés à leur petite taille sont : l'accumulation au niveau alvéolaire après inhalation, le passage dans la circulation sanguine avec cheminement dans tout l'organisme et les réactions inflammatoires (**Kahli, 2015**).

## 2.2. Ecotoxicité

L'écotoxicité des formes nanométriques est à ce jour mal connue : La plupart des études n'ont été réalisées qu'en laboratoire sur des animaux et quelques plantes car ces produits ne sont diffusés dans l'environnement que depuis peu de temps (**Baalousha *et al.*, 2011; Villem *et al.*, 2008**).

Les propriétés physico-chimiques et la mobilité des NP de  $\text{TiO}_2$  dans l'environnement peuvent modifier leur biodisponibilité et leur toxicité potentielle. Il est donc crucial, d'évaluer le risque que ces xénobiotiques présentent pour l'Homme et la qualité des écosystèmes terrestres et aquatiques tout en évaluant leurs capacités de diffusion dans l'environnement (**Kahli, 2015**).

En avril 2017, un communiqué officiel conclut, après analyse et consultation de nombreux travaux, qu'il existe maintenant des preuves concernant le risque sérieux pour la santé de l'environnement et de l'Homme (**Tager, 2017**). Effectivement, la généralisation de l'utilisation de ces composés dans de très nombreux usages industriels à travers le monde et



# Chapitre I : Introduction générale et objectif du travail

leur libération à partir de déchets ou lors d'accidents peut conduire à une contamination importante de l'environnement, notamment, dans les écosystèmes aquatiques qui sont l'exutoire naturel du ruissellement des égouts et des rejets de nombreux effluents industriels (Silva et Pathiratne, 2016).

## 3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre dans le rapport pro-oxydants/antioxydants ; Il en résulte une génération incontrôlée de radicaux libres susceptibles d'entraîner des dommages oxydatifs aux molécules biologiques, à savoir, les lipides, les protéines, les glucides ainsi que les acides nucléiques (Abele *et al*, 2011).

Trois grandes voies d'approches peuvent être utilisées dans l'évaluation du stress oxydant (Gismondi, 2012) :

- L'estimation de la production des ROS.
- L'estimation des capacités de défenses (statut antioxydant).
- L'estimation des changements biochimiques spécifiques créés par l'attaque des radicaux libres sur les principales cibles moléculaires (protéines, lipides et acides nucléiques).

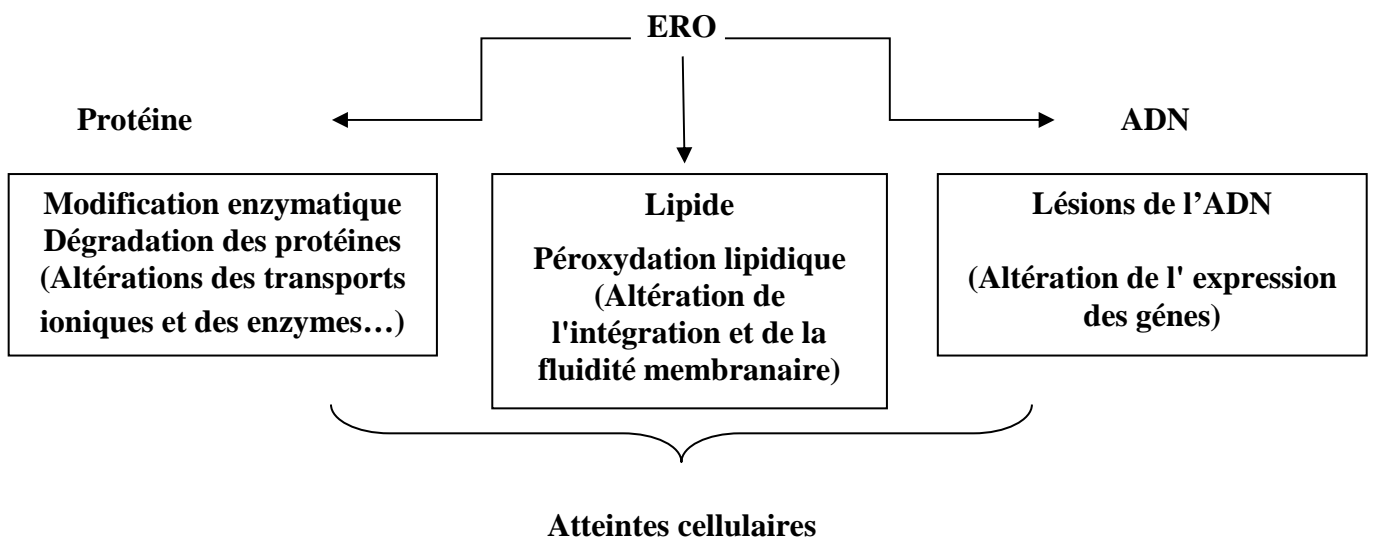


Figure 05. Dommages cellulaires occasionnés par les ERO.

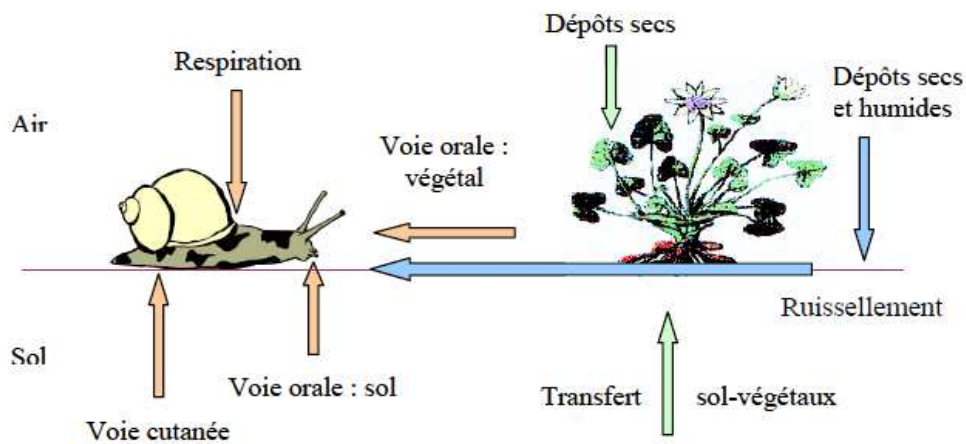
## 4. Utilisation des gastéropodes dans la bio-indication

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, 2003**). Les critères qualifiant une espèce de bio-indicateur sont, généralement, les suivants :

- ✓ elle doit être suffisamment répandue et abondante sur le territoire concerné et si possible, facilement détectable.
- ✓ elle doit être la 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...).

Enormément de travaux se sont intéressés en milieu terrestre à la faune du sol, notamment, aux escargots (Mollusques, Gastéropodes, Pulmonés), car ils remplissent les critères requis précédemment développés et sont reconnus comme des indicateurs écologiques pertinents. En effet, ces organismes offrent l'avantage de :

- représenter une biomasse significative au sein de la communauté des invertébrés des sols (**Dallinger et al., 2001**).
- occuper une situation privilégiée à l'interface sol-plante-atmosphère, et d'intégrer des sources et des voies de contaminations multiples (**Barker., 2001**).
- posséder des capacités de bioaccumulation importantes pour de nombreux polluants métalliques (**Grara et al., 2016**), et organiques (**Belhaouchett, 2014; Bourabia, 2013**).
- présenter des réponses physiologiques (inhibition de croissance et de reproduction, mortalité) et biochimiques quand ils sont exposés aux contaminants (**Aitalia, 2016; Boucena, 2016**).
- constituer un élément des réseaux trophiques qui contribue au transfert des polluants du sol et/ou des plants aux prédateurs (**Beeby, 1985**).



**Figure 06. Différentes voies de contamination d'*Helix aspersa* (Gomot et Pihan, 1997)**

## 5. Objectif du travail

Notre travail de recherche a pour objectif d'évaluer la toxicité potentielle de molécules nanométriques : le  $\text{TiO}_2$  en utilisant un organisme bio-accumulateur/bio-indicateur de pollution, le gastéropode terrestre : *Helix aspersa*, à travers le suivi de certains bio-marqueurs du stress oxydatif.

L'intérêt de mener cette étude est motivé par la large utilisation du  $\text{TiO}_2$  dans plusieurs domaines de la vie quotidienne (peintures, céramique, papeterie, alimentation et produits d'hygiène), ce qui augmente la fréquence de sa répartition et de sa dissémination dans tous les compartiments de l'environnement.

## Chapitre II

### Matériel et Méthodes

## Chapitre II - Matériel et Méthodes

Notre travail a été effectué au niveau du Laboratoire de Toxicologie du Département de Biologie, Université Larbi Tébessi -Tébessa-.

### 1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est un gastéropode pulmoné terrestre : l'escargot *Helix aspersa* connu sous le nom de petit gris.

Selon **Bonnet et Vrillo (1990)**, sa position systématique est la suivante :

- **Règne** : Animalia
- **Embranchement** : Mollusca
- **Classe** : Gastropoda
- **Ordre** : Stylommatophora
- **Famille** : Helicidae
- **Genre** : *Helix*
- **Espèce** : *aspersa*
- **Sous-espèce** : *aspersa*

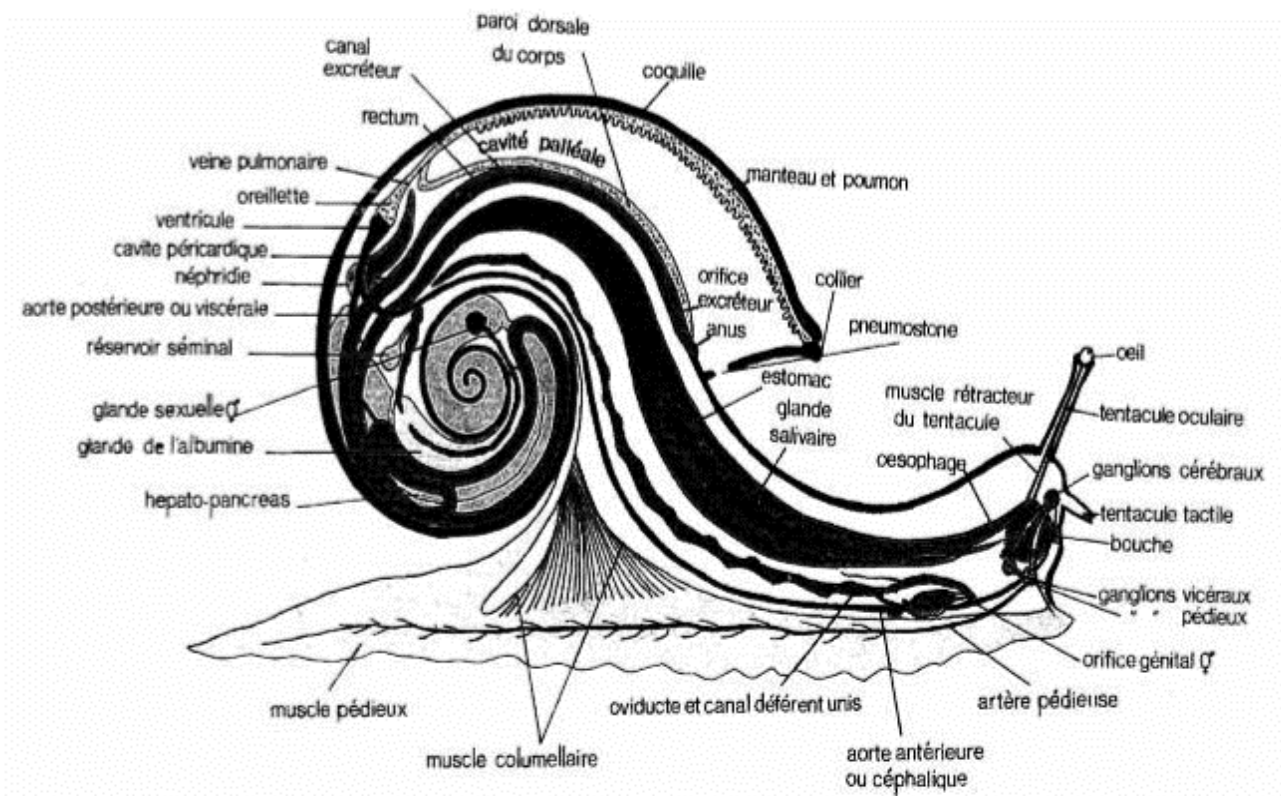


*Figure 07. Helix aspersa (Gbaiocco, 2009)*

Le petit gris est également nommé *Cornu aspersum* ou *Criptomphalus aspersus* dans la nomenclature récente (**Barker, 2001**).

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

Le corps d'un escargot consiste en un pied unique, une tête et une masse viscérale enroulée et placée dans la coquille. Le schéma qui suit illustre clairement l'anatomie générale de l'animal (Fig.08)



**Figure 08. Schéma illustrant l'anatomie de l'escargot**  
(Cazin, 2014)

### 1.2. Reproduction

L'escargot est un animal hermaphrodite, c'est-à-dire, mâle et femelle à la fois. Toute fois, pour se reproduire, l'accouplement est obligatoire, l'autofécondation n'étant pas possible. L'accouplement peut durer plusieurs heures (10 à 12 heures). La ponte aura lieu 15 à 30 jours après l'accouplement: L'escargot creuse un nid dans la terre de 4 à 5 cm de profondeur et la durée de la ponte est comprise entre 12 et 48 heures. Elle aboutit à la mise de 80 à 140 œufs pour le petit-gris, parfois plus, pour le gros-gris (Pirame *et al.*, 2003).

La durée de l'incubation et de l'éclosion est comprise entre 15 et 30 jours, suivant les conditions climatiques, les jeunes vont rester 2 à 5 jours avant de sortir à la surface pour se nourrir. Leur poids est de 0.02 à 0.04 g (Pirame *et al.*, 2003).

Le climat et la température ont une grande influence sur l'âge de maturité sexuelle de l'escargot.



Figure 09. L'accouplement chez *Helix aspersa*

(Dunster, 2007)

### 1.3. Rythme de vie de l'escargot

L'escargot possède deux rythmes d'activité : l'un journalier et l'autre saisonnier.

- ✚ **L'activité journalière** est en relation étroite avec la photopériode. Elle peut être inhibée par les conditions thermiques et hygrométriques défavorables. Dans les conditions optimales, l'escargot sort de sa coquille et devient actif dès la tombée de la nuit jusqu'au lever du jour, il en profite pour se nourrir (**Pirame et al., 2003**).

La phase d'inactivité est relative à une durée inférieure à 18 heures : durant cette phase, l'escargot est au repos et ne manifeste que peu d'activité locomotrice, sexuelle ou nutritionnelle (**Pirame et al., 2003**).

L'escargot est un animal nocturne : trois nuits d'activité sont suivies d'une nuit de repos. Son activité débute au printemps et s'achève en mois de novembre (hibernation).

- ✚ **L'activité saisonnière** est relative au fait que les escargots harmonisent leurs rythmes biologiques en fonction du rythme des saisons. Ils régulent leurs activités en se basant sur les éléments de l'environnement, en l'occurrence la longueur du jour (**Pirame et al., 2003**).

### 1.4. Hibernation et estivation

*Helix aspersa* n'est actif que lorsque l'humidité est suffisamment élevée. Dans le cas contraire, l'animal se rétracte à l'intérieur de sa coquille qu'il obture par un voile muqueux (courte inactivité) ou par un épiphragme, ce qui lui évite la déshydratation.

La photopériode et la température sont des variables saisonnières qui induisent les états d'inactivité : Hibernation et estivation sont, donc, des réponses à des stress environnementaux prévisibles (**Ansart et Vernon, 2003**).

#### 1.4.1. Estivation

C'est un rythme de vie demi-ralenti d'été : Ce comportement est observé dans des régions où l'été est particulièrement chaud et sec. L'animal se rétracte complètement à l'intérieur de sa coquille (operculé) dont l'ouverture est fermée ; par l'intermédiaire des matières muqueuses et calcaires secrétées par le mollusque lui-même. Durant l'estivation, la respiration et les mouvements cardiaques sont normaux mais il y a diminution rapide des réserves d'eau et des réserves énergétiques (**Pirame et al., 2003**).

#### 1.4.2. Hibernation

C'est un rythme ralenti d'hiver : durant la période hivernale, l'escargot entre en léthargie. Il secrète devant l'ouverture de sa coquille un rideau de mucus solidifié : l'épiphragme. L'animal vit sur ses réserves, en particulier sur le glycogène emmagasiné. Comme pour l'estivation, pendant l'hibernation tous les métabolismes sont ralentis. Au cours de cette phase, un escargot peut perdre jusqu'au 30% de son poids (perte en eau) (**Pirame et al., 2003**).

Au printemps les réserves perdues seront très rapidement récupérées (**Pirame et al., 2003**).

### 1.5. Longévité

*Helix aspersa* est adulte à deux ans mais peut vivre plus de cinq ans. Dans la nature, il dépasse rarement l'âge de trois (03) ans. Sa mort est souvent due à des prédateurs ou à des



## Chapitre II - Matériel et Méthodes

parasites. En captivité, sa longévité est bien plus longue et va de dix à quinze ans (Taylor, 1991).

### 2. Matériel chimique

Le matériel chimique utilisé dans cette expérimentation est la nanoparticule du dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ). Les nanoparticules nous ont été fournies par le Laboratoire de Chimie de l'Université Badji Mokhtar -Annaba-.



**Figure 10. Nanoparticule du dioxyde du titane ( $\text{TiO}_2$ )**

Les caractéristiques physico-chimiques du  $\text{TiO}_2$  sont regroupées dans le tableau ci-après

**Tableau 02. Caractéristiques physico-chimiques du dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ )**

Nom - Symbole	Dioxyde de titane
Formule brute	$\text{TiO}_2$
Température de fusion*	1 843 °C
Température d'ébullition*	2 972 °C
Masse molaire	79,866 g/mol
Densité	4,23 g/cm <sup>3</sup>
Apparence	poudre cristalline incolore à blanche
Masse volumique	3,9–4,3 g·cm <sup>-3</sup>
Système cristallin	Tétragonal (rutile)

### 3. Méthodes

#### 3.1. Condition d'élevage

Les escargots utilisés dans notre expérimentation sont des adultes, collectés dans la région de Bekkaria -Tébessa. Leur poids est d'environ  $11 \text{ g} \pm 1$ .



**Figure 11. Elevage des escargots dans le laboratoire**

L'élevage est effectué dans des boîtes en plastique transparentes couvertes avec du tulle (pour assurer l'oxygénation). L'humidité est maintenue à l'aide d'une éponge mouillée. La nourriture (farine de blé) est fournie dans des boîtes de Pétri.

Les essais sont réalisés dans les mêmes conditions environnementales, à savoir : Photopériodes 18h de lumière/24 h, température  $20 \pm 2^\circ \text{ C}$  et hygrométrie : 80 % à 95%. Les lots sont nettoyés régulièrement (un jour sur deux).

#### 3.2. Mode de traitement

Le traitement des animaux a été effectué par addition de concentrations croissantes de nanoparticule de  $\text{TiO}_2$  dans l'alimentation. Nous avons retenu 4 concentrations et un milieu témoin. Les escargots sont répartis en 5 lots, à raison de 5 escargots par lot (**Tableau 03**).

## Chapitre II - Matériel et Méthodes

**Tableau 3. Répartition des concentrations croissantes de TiO<sub>2</sub>**

	Lots	Nombre d'escargots/lot	Concentration en µg NP/ g d'aliment sec (farine de blé)
TiO <sub>2</sub>	Témoin	05	0
	Dose 1	05	100
	Dose 2	05	500
	Dose 3	05	1000
	Dose 4	05	2000



**Figure 12. Exposition des escargots à la nourriture contaminée**

### 3.3. Dissection et prélèvement de l'hépatopancréas

A la fin de la 4<sup>ème</sup> semaine de traitement, les escargots sont mis à jeun pendant 48 h pour vider leurs tubes digestifs.

Après la dissection, l'hépatopancréas est prélevé, pesé et divisé en 03 fragments :

- Un échantillon pour le dosage des métabolites (protéines totales).
- Un échantillon pour le dosage du glutathion (GSH).
- Un échantillon pour le dosage de la glutathion-S-transférase.



**Figure 13. Dissection et prélèvement de l'hépatopancreas**

#### **4. Paramètres étudiés**

##### **4.1. Paramètre physiologique**

###### **4.1.1. Poids de l'hépatopancreas**

Une fois les escargots disséqués, les hépatopancreas sont prélevés et pesés individuellement à l'aide d'une balance de précision. A la fin du traitement, le poids moyen de chaque lot est calculé et comparé à celui du témoin.

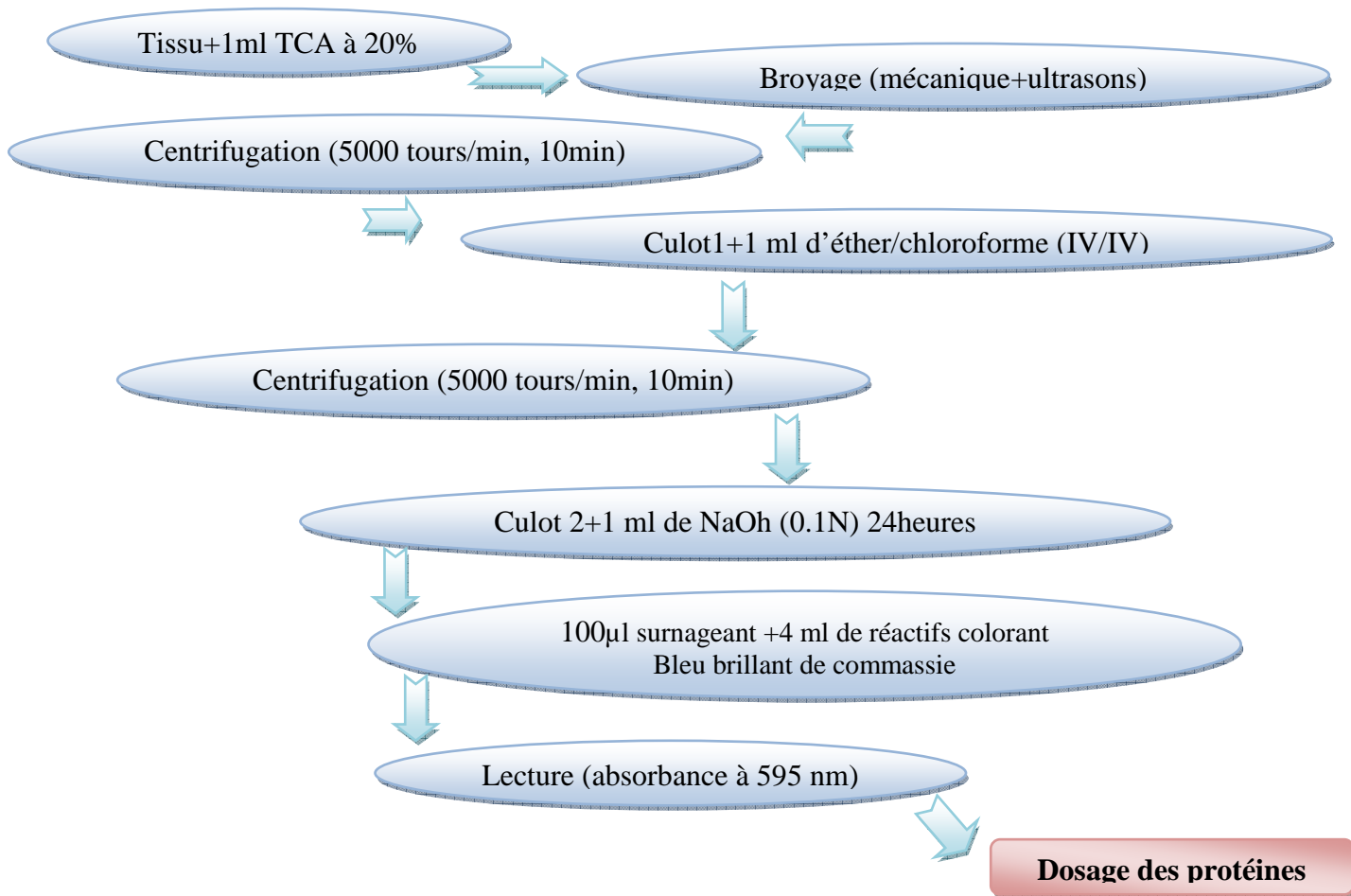
##### **4.2. Paramètre biochimique**

###### **4.2.1. Détermination du taux des protéines totales**

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de **Bradford (1976)**, qui consiste à additionner une fraction aliquote de 100  $\mu$ l du surnageant ou de la gamme étalon à 4 ml du réactifs colorant bleu brillant de commassie (BBC). La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre visible (JENWAY 6300).

La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une protéine standard, l'Albumine Sérum de Bœuf (BSA).

## Chapitre II - Matériel et Méthodes



**Figure 14. Dosage des protéines totales (Bradford, 1976)**

### 4.3. Biomarqueurs

#### 4.3.1. Détermination du taux de glutathion (GSH)

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

La lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 412 nm. Le taux du glutathion est quantifié selon la formule suivante :

$$\text{Taux du GSH} \quad = \quad \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13,1 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg de protéine}}$$

( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines)

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

**DO** : Densité Optique

**1** : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat).

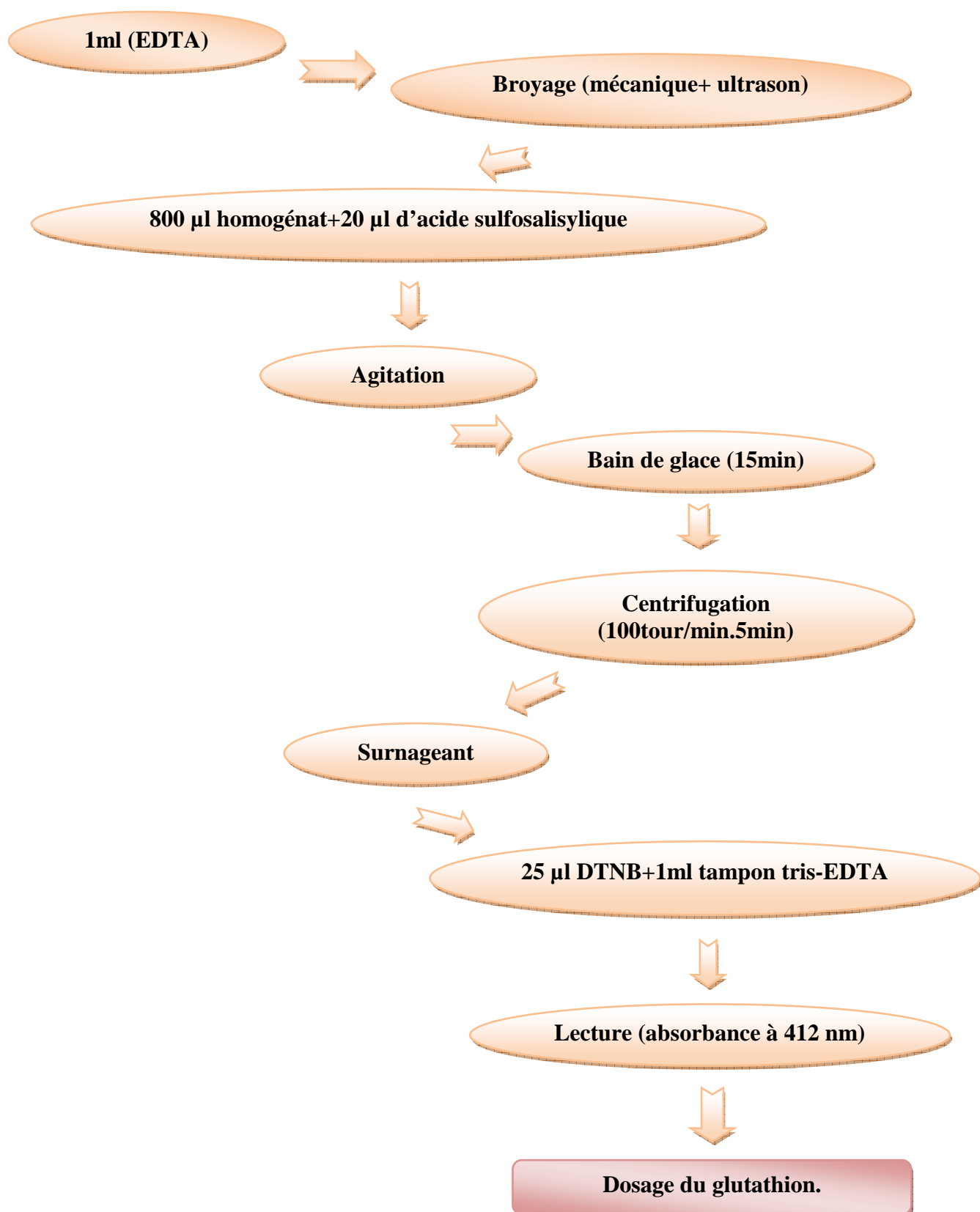
**1,525** : Volume total des solutions utilisées dans le GSH (0,025 ml DTNB + 0,5 ml surnageant + 1 ml Tris-EDTA).

**13,1** : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement  $-\text{SH}$  à 412 nm).

**0,8** : Volume de l'homogénat utilisé en ml.

**0,5** : Volume de surnageant utilisé en ml.

**Mg de protéine** : Quantité de protéines exprimée en mg



**Figure 15. Dosage du glutathion  
(Weckberker et Cory, 1998)**

### 4.3.2. Mesure de l'activité glutathion-S-transférase (GST)

Les GST sont des enzymes de métabolisation de la phase II, Elles catalysent la conjugaison du GSH à des xénobiotiques électrophiles ou devenus électrophiles après métabolisation afin de les rendre plus hydrosolubles et ainsi, les détoxiquer ou les éliminer.

La mesure de l'activité glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de [Habig *et al.*, (1974)]. Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH). La lecture de l'absorbance est faite à une longueur d'onde égale à 340 nm.

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

$$\text{GST } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta \text{DO} \times \text{V}}{\text{e} \times \text{d} \times \text{v} \times \text{mg de protéines}}$$

**$\Delta\text{DO}$**  : Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat

**$\text{V}$**  : Volume totale de la cuve (1400  $\mu\text{l}$ ).

**$\text{e}$**  : Coefficient d'extinction

**$\text{d}$**  : Epaisseur de la cuve.

**$\text{v}$**  : Volume du surnageant.

**Mg de protéines** : Quantité de protéines exprimée en mg.



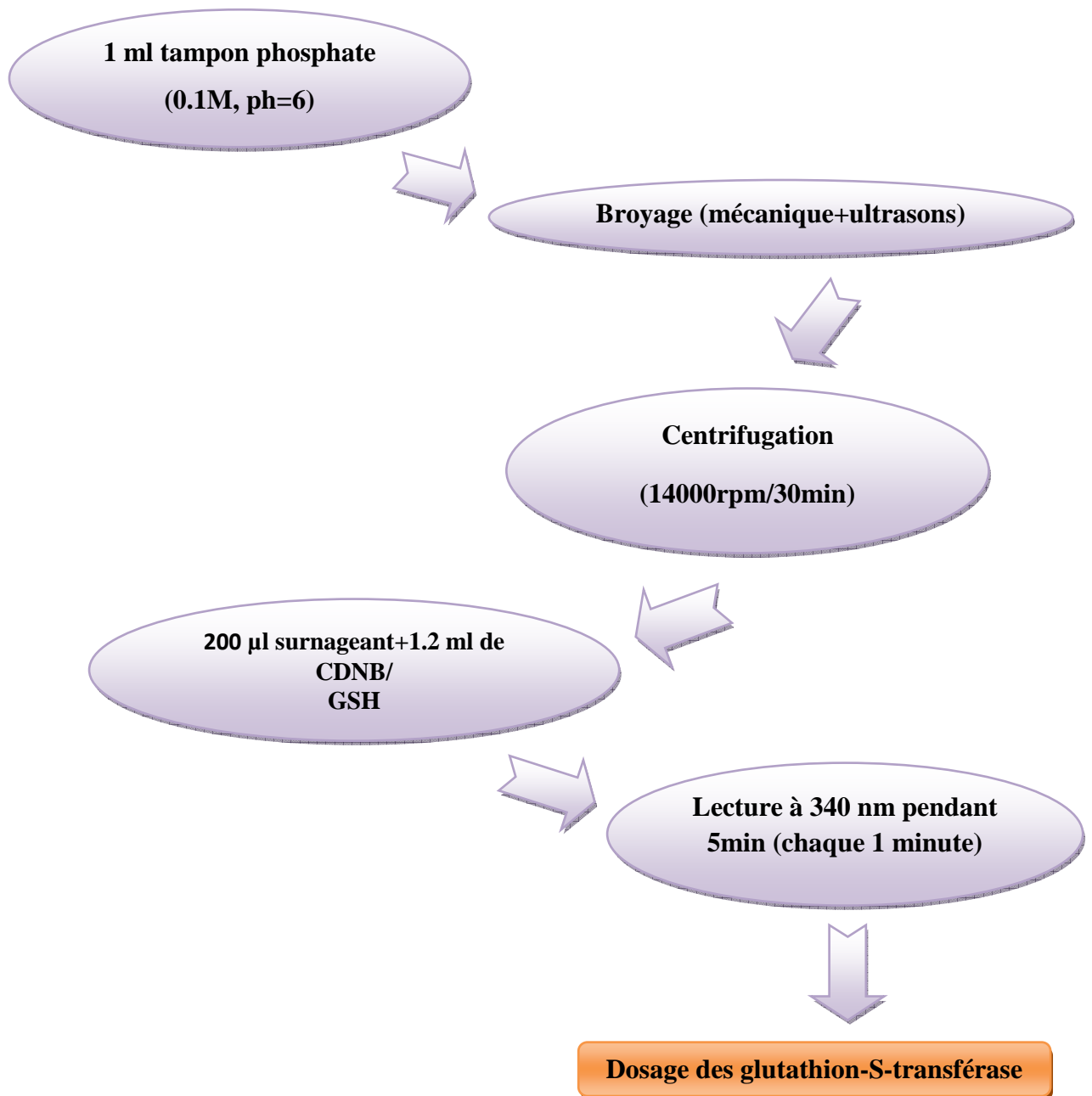


Figure 16. Dosage de la glutathion-S-transférase - (Habig *et al.*, 1974)

### 5. Etude statistique

L'analyse statistique des données est effectuée par le test de student qui sert à comparer entre deux échantillons (témoin et traité). Ce test est réalisé à l'aide d'un logiciel d'analyse des données : Minitab (Version 14.0) (Dagnelie, 1999).

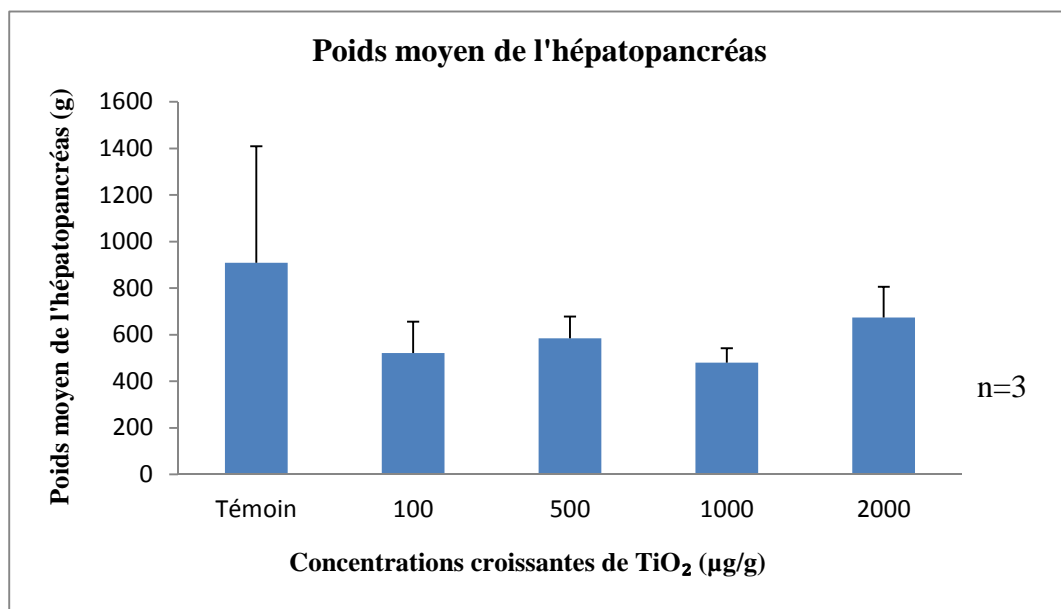
# Chapitre III

## Résultats

### 1. Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur certains paramètres physiologiques.

#### 1.1. Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur l'évolution du poids moyen de l'hépatopancréas chez les escargots *Helix aspersa* après quatre semaines de traitement.

La Figure (17) illustre les variations du poids moyen de l'hépatopancréas des escargots traités par les concentrations croissantes du  $\text{TiO}_2$  en fonction du temps.



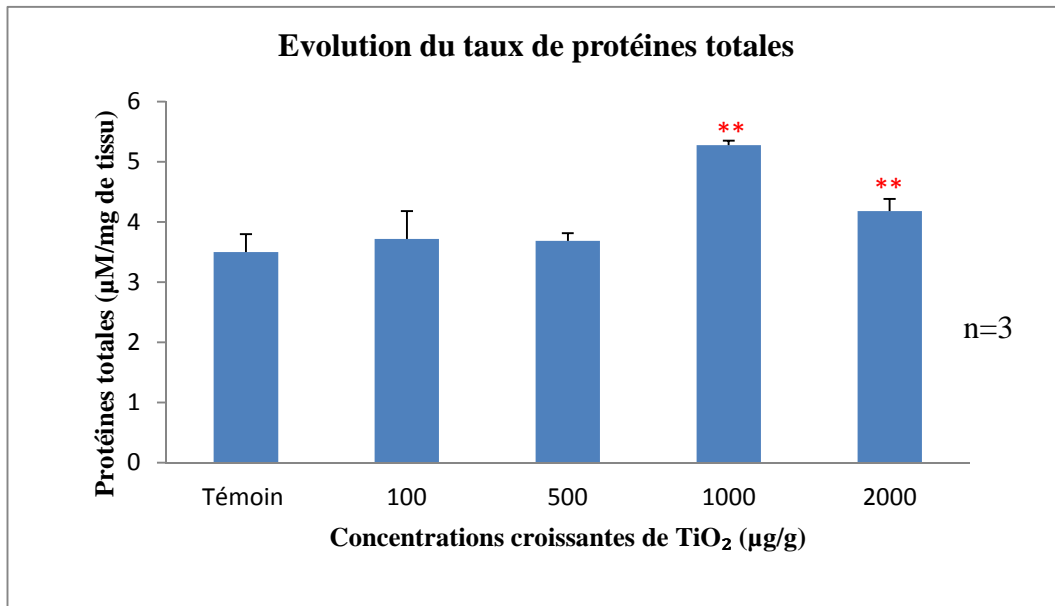
**Figure 17. Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur l'évolution du poids moyen de l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa***

Nous constatons une diminution dose dépendante et non significative ( $p > 0.05$ ) chez les escargots traités par les différentes concentrations (100, 500, 1000 et 2000  $\mu\text{g/g}$ ) par rapport aux escargots témoins. Ainsi pour les témoins, le poids de l'hépatopancréas est de 1,37 g, alors que pour les traités à la plus forte concentration, il est de 1,35 g.

### 2. Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur certains paramètres biochimiques.

#### 2.1. Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur l'évolution du taux des protéines totales au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots *Helix aspersa* après quatre semaines de traitement.

La Figure (18) illustre l'effet des concentrations croissantes du dioxyde de titane sur l'évolution du taux des protéines totales au niveau de l'hépatopancréas des escargots après quatre semaines de traitement.



**Figure 18. Effet des concentrations croissantes du dioxyde de titane sur l'évolution du taux de protéines totales chez les escargots *Helix aspersa***

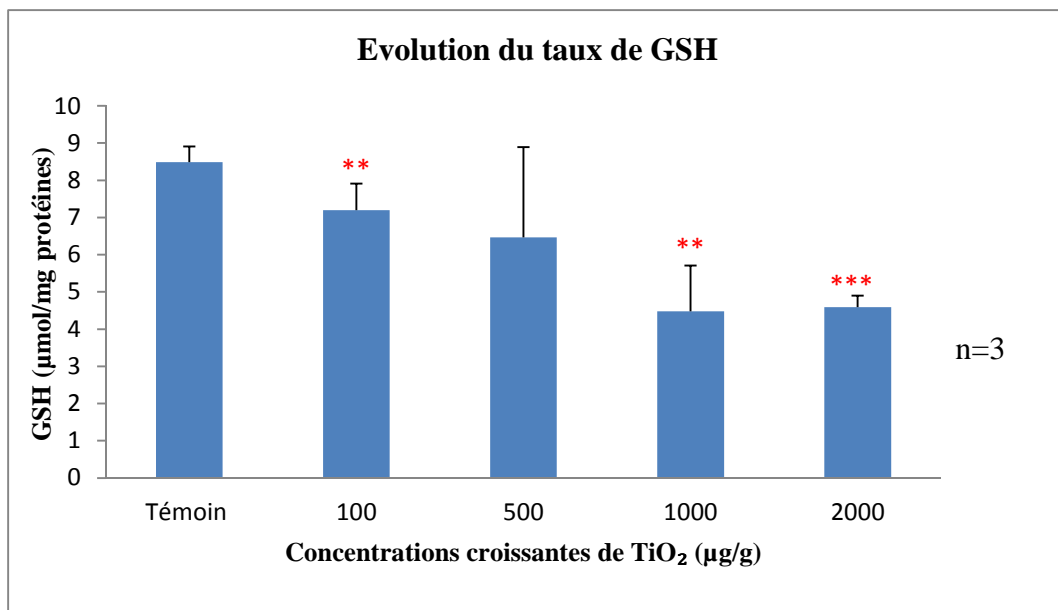
Nos résultats montrent une augmentation dose dépendante et non significative ( $p > 0.05$ ) chez les escargots traités par les concentrations 100 et 500 µg/g par rapport aux témoins.

Chez les escargots traités par les deux plus fortes concentrations (1000 et 2000 µg/g) cette augmentation est hautement significative ( $p \leq 0.01$ ). Ainsi, elle est de 0.817 (µM/mg de tissu) chez les traités par 1000 µg/g et de 0.822 (µg/mg de tissu) chez ceux traités par 2000 µg/g alors qu'elle est de 0.535 (µM/mg de tissu) chez les escargots témoins.

### 3. Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur certains bio-marqueurs.

#### 3.1. Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur l'évolution du taux de glutathion (GSH) au niveau de l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* après quatre semaines de traitement.

La Figure (19) montre l'effet des concentrations croissantes du dioxyde de titane sur l'évolution du taux de glutathion au niveau de l'hépatopancréas des escargots après quatre semaines de traitement.

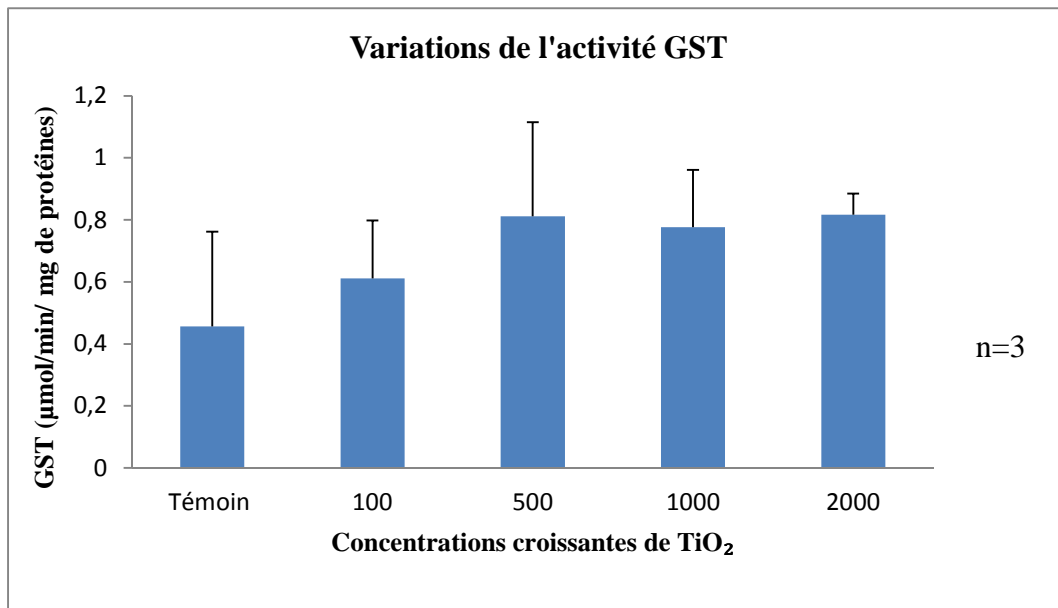


**Figure 19. Effet des concentrations croissantes du dioxyde de titane sur l'évolution du taux de GSH chez les escargots *Helix aspersa***

Nos résultats mettent en évidence une diminution dose dépendante et significative chez les escargots traités par les différentes concentrations croissantes de TiO<sub>2</sub> comparé aux témoins. En effet, cette diminution est hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) chez les traités par les concentrations 100 et 1000 µg/g, comparé aux témoins. Chez les escargots traités par la concentration 2000 µg/g, cette diminution est très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ).

### 3.2. Effet des concentrations croissantes du Dioxyde de Titane sur la variation de l'activité glutathion-S-transférase (GST) au niveau de l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* après quatre semaines de traitement.

La Figure (20) montre l'effet des concentrations croissantes du dioxyde de titane sur la variation de l'activité glutathion-S-transférase au niveau de l'hépatopancréas des escargots après quatre semaines de traitement.



**Figure 20. Effet des concentrations croissantes de dioxyde de titane sur la variation de l'activité GST chez les escargots *Helix aspersa***

Nos résultats illustrent une augmentation dose dépendante chez les escargots traités par les différentes concentrations comparativement aux témoins. Bien que la variation dans cette activité passe de 0.3787 µM/min/mg de protéines chez les escargots témoins à 0.4407 µM/min/mg de protéines chez ceux traités par la plus forte concentration, elle n'est pas significative.

# Chapitre IV

## Discussion

## Chapitre IV : Discussion

La production croissante de nanomatériaux a pour conséquence l'augmentation de leur libération et de leur dissémination dans l'environnement (**Khene et al., 2017**). Par ailleurs, Les mollusques gastéropodes sont des organismes sentinelles utilisés dans les programmes de surveillance de la contamination chimique des écosystèmes (**Regoli et al., 2006**). Ainsi, ils se distinguent par leur capacité de concentrer les substances polluantes (ex : les métaux, les nanoparticules) dans leurs tissus et constituent un maillon important dans le transfert des nanoparticules de la végétation vers les carnivores, qui est l'un des plus importants aspects de l'écotoxicologie (**Kahli, 2015 ; Notten et al. 2005**).

L'objectif de notre étude est l'évaluation de la toxicité potentielle de molécules nanométriques, à savoir, le TiO<sub>2</sub> en utilisant un organisme bio-accumulateur/ bioindicateur de pollution, le gastéropode terrestre : *Helix aspersa*, à travers le suivi de certains Biomarqueurs du stress oxydatif.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de la nanoparticule du dioxyde de titane sur l'évolution du poids moyen de la glande digestive : siège principal de la métabolisation et de la biotransformation des xénobiotiques, notamment, les nanoparticules. Nos résultats ont révélé une diminution dose dépendante chez les escargots traités par les différentes concentrations comparativement aux escargots témoins. En effet, ceci pourrait être dû à la variation des sécrétions des enzymes digestives (**Hames et Hopkins, 1989**). De plus, de nombreuses recherches ont mis en évidence le fait que dans un environnement pollué, l'animal se met dans un état de jeun prolongé pour éviter la nourriture contaminée (**Kahli, 2015 ; Alayat et Amamra, 2011 ; Grara et al., 2012; Atailia, 2009 ; Gimbert et al., 2008 ; Notten et al., 2006**).

Tout type de stress chimique peut provoquer une libération de radicaux libres dans l'organisme (**Aurousseau, 2002**). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (**Valko et al., 2007 ; Aurousseau, 2002**)

Dans notre travail, nous avons évalué, dans un second temps, le taux des protéines totales. Nos résultats ont mis en évidence une augmentation dose dépendante et significative, particulièrement chez les escargots exposés aux plus fortes concentrations du xénobiotique.



## Chapitre IV : Discussion

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **(Grara et al., 2016)** qui ont mis en évidence une augmentation de manière dose dépendante en présence de poussières métalliques. Il en est de même, en ce qui est des résultats trouvés par **Kahli (2015)**, concernant l'effet du TiO<sub>2</sub> sur *Helix aspersa*. L'augmentation du taux de protéines totales peut être expliquée par le déclenchement du processus de détoxification mis en jeu par un système de régulation qui se compose d'enzymes, des protéines et de molécules anti-oxydantes **(Nzengue, 2008)**.

Les fortes capacités d'accumulation des NPs chez les escargots sont liées à l'efficacité des systèmes de détoxification impliquant des structures de séquestrations telles les métallothionéines (MTs) et les granules **(Gimbert, 2006)**.

Les métallothionéines constituent une super famille de métalloprotéines de faible poids moléculaire riches en cystéine et responsables à la fois de la protection des cellules contre les NPs tels que le TiO<sub>2</sub> et le ZnO **(Park H et al., 2007)** et de la régulation homéostatique des métaux essentiels comme le cuivre et le zinc **(Dallinger et al., 2000 ; Gaetke et Chow, 2003)**, ont montré que le Cu, le Fe et le Ti sont des métaux de transition redox-actif pouvant interférer avec le métabolisme des protéines via la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui entraînent un stress oxydatif et provoquent des dommages cellulaires.

Par ailleurs, dans son étude porté sur le Cd, **Köhler et al ., (1998)** suggèrent que l'induction de la synthèse des structures de stockage (MTs et granules) est liée à la toxicocinétique c'est-à-dire que chez différentes espèces de gastéropodes, ce métal accumulé dans l'hépatopancréas est majoritairement fixé à des protéines cytosoliques qui montrent des propriétés proches des métallothionéines et dont la synthèse est induite par l'exposition des animaux à ce composé. De plus, l'exposition de la limace *D. reticulatum* à des concentrations élevées de Cd, de Pb et de Zn dans l'alimentation a, également, induit une augmentation dose dépendante des protéines de stress hsp70.

La présence d'un xénobiotique à des concentrations toxiques, induit l'activation des systèmes de protection cellulaires qui auront pour tâche le piégeage et /ou l'élimination des métabolites toxiques. Les enzymes du stress oxydatif interviennent par des réactions en chaîne afin d'empêcher les lésions cellulaires résultantes de l'attaque des radicaux libres et des hydroperoxydes **(Benbouzid, 2012)**.

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans le compartiment Intracellulaire. Outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau

## Chapitre IV : Discussion

dans la défense Anti radicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase (**Barillet, 2007**).

Nos résultats montrent une diminution de manière dose dépendante et significative. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Khen (2017)** qui stipule que cette déplétion est due à sa liaison ou conjugaison aux radicaux libres produits par la nanoparticule et/ ou par la liaison du GSH au métal. Les ETM et les particules ultrafines se caractérisent par leurs affinités avec les groupes thiol avec lesquelles ils forment des complexes (**Xiong et al., 2011, Fahmy et al., 2014**). **Chandran et al., (2005)** ont observé une diminution du taux de glutathion total (GSH) chez le gastéropode *Achatina fulica* traité au cadmium et au zinc.

La GST est une enzyme importante impliquée dans la catalyse de la conjugaison d'une variété de substrats électrophiles pour réduire le glutathion et protéger la cellule contre les effets des xénobiotiques (**Ferrari et al., 2007**)

Dans la présente étude, l'activité GST est fortement induite au niveau de l'hépatopancréas. Ce résultat est en accord avec celui de **Khene et al., (2017)** qui met en évidence une augmentation dose dépendante et significative au niveau de l'hépatopancréas et le rein d'*Helix aspersa* traités par le TiO<sub>2</sub>. Il en est de même pour les résultats de **Moneyrac et al., (2014)** dans leur étude concernant l'exposition du mollusque bivalve *Scrobicularia plana* à des particules métalliques ultrafines (Ag, Cd et ZnO). **Canesi et al. (2010)** ont, également, observé une induction de l'activité de cette enzyme dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* traitée avec différentes NP de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), de fluorine (C60) et de silice (SiO<sub>2</sub>).

Pour conclure, l'exposition des escargots *Helix aspersa* aux concentrations croissantes des nanoparticules du dioxyde de titane semble induire une hépatotoxicité traduite par des perturbations physiologique, métabolique et enzymatique.

En effet, ces perturbations se sont manifestées, d'une part, par une diminution du poids moyen de l'hépatopancréas et une augmentation du taux des protéines totales.

D'autre part, l'intensification de l'activité GST et la déplétion du taux de GSH enregistrées rendent compte de la survenue d'un stress oxydatif et l'activation du système de détoxification.

Afin de mieux étayer les résultats obtenus, il serait intéressant de :

- Suivre la variation de certaines enzymes comme la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), le superoxyde dismutase (SOD) et le lactate déshydrogénase (LDH).
- Évaluer le taux de malondialdéhyde (MDA), indice de peroxydation lipidique.
- Réaliser une étude histologique sur les organes *d'Helix aspersa* (hépatopancréas, Rein, poumon,...) afin de déterminer les éventuelles altérations pouvant être engendrées.
- Étudier la toxicité de ces nanoparticules sur les escargots juvéniles.

## Chapitre V

### Références Bibliographiques

## Chapitre V : Références bibliographiques

### A

- **Abele D, Vazquez Medina J P, Zenteno-Savin T., 2011.** Introduction to oxidative stress in aquatic ecosystem. In: Abele, D., Vazquez Medina, J.P., Zenteno-Savin (Eds.) oxidative stress in aquatic ecosystem. Wiley-Blackwell ; p.548.
- **AFSSET, 2006.** Les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement, Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, July 2006, Paris, 248 p.
- **Alayat A, Amamra R., 2011.** Evaluation de la toxicité potentielle de l'Aluminium sur un organisme animal bio accumulateur/bio indicateur : *Helix aspersa*. Université Badji Mokhtar Annaba, P33.
- **Ansart A. et Vernon P., 2003.** Cold hardiness in molluscs. *Acta Oecologica*, 24 : (95-102)
- **Aurousseau B. 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux : Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim.* 15(1). p. (67-82). Badji Mokhtar. Annaba. 74 p.
- **Atailia A, Berrebbah H, Boucenna M, Alayat A, Amamra R, Grara N, Djebbar M R., 2016.** Biomarkers Responses of Land Snails *Helix aspersa* Exposed to Chronic Metal Pollution under Field and Laboratory Conditions. *Nature Environment and Pollution Technology* ; 15(4) :( 1209-115.)
- **Atailia A., 2009.** Effet des poussières métalliques d'origine industrielles sur un organisme animal bio indicateur / bio-accumulateur de pollution : *Helix aspersa*. Mémoire de magister, Université Badji Mokhtar, Annaba. 45 pages.

### B

- **Barillet, S., 2007.** Toxicocinetique, toxicité chronique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*Danio rerio*). PhD Thesis, Paul Verlaine University at Metz. 476 p.
- **Barker G.M., 2001.** The Biology of Terrestrial Molluscs. CAB International. Oxon.
- **Baalousha., M. Lead, J.R. Ju-Nam Y., 2011** - Natural Colloids and Manufactured Nanoparticles in Aquatic and Terrestrial Systems *Treatise on Water Science*, Volume 3, Pages 89-(129).
- **Beeby A., 1985.** The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfer of lead through a polluted ecosystem. *Journal of Applied Ecology* 22. (267-275.)

## Chapitre V : Références bibliographiques

- **Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M. Djebbar M.R., 2012.** Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium sp.* with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicol. Environ. Chem.* 94(3) : (557-565.)
- **Belhaouchette N, 2014.** Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix aspersa* ». Université Badji Mokhtar Annaba, P94.
- **Bonnet J.G., Aupinel P. et Vrillon J. L. 1990.** L'escargot *Helix aspersa*, biologie-élevage ; Institut National de l'Agronomie, Paris, 124p
- **Boucenna M, Berrebbah H, Atilia A, Grara N, Djebbar M R, 2015.** Effects of Metal Dust on Functional Markers and Histology of Gland Digestive and Kidney of the Land Snails (*Helix aspersa*) in the North East of Algeria. *Global Veterinaria* ; 14 (2)-(: 189-198.)
- **Boucena M., 2016.** Etude de la toxicité des particules métalliques d'origine industrielle chez *Helix aspersa*. Evaluation nanotoxicologique du Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Thèse de doctorat Université Badji Mokhtar Annaba ; P192.
- **Bourbia-Ait Hamlet S., 2013.** Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Université Badji Mokhtar Annaba, P177.
- **Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:278-254.
- **Buzea C., Pacheco Blandino I.I., Robbie K., 2007.** Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*,

### C

- **Canesi L., Ciacci C., Betti M., Malatesta M., Gazzanelli G., Gallo G., 2010.** Growth factors stimulate the activity of key glycolytic enzymes in isolated digestive gland cells from mussels (*Mytilus galloprovincialis Lam*) through tyrosine kinase mediated signal transduction.
- **Chandran, R., Sivakumar, A., Sivakumar, A., Mohandass, S., and M. Aruchami., 2005.** Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod. *Achatina fulica*. *Comparative Biochemistry and physiology, Part C.*, 140: 422-426.DOI.

### D

- **Dallinger R., Berger B., Triebkorn R., Köhler H., 2001.** Soil biology and ecotoxicology. In: Barker, G.M. (Ed.). *The biology of terrestrial molluscs*. CAB International, Oxon, Wallingford, UK, 489-525.

## Chapitre V : Références bibliographiques

- **Dagnelie, P. and Bruxelles, De Boeck, 1999.** Statistiques théoriques et appliquées. Tome 2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Boeck and Larcier University. ISBN 978-2-8041-(6336-5).
- **Delay M., et Frimmel F., 2012.** Nanoparticles in aquatic systems. Anal. Bioanal. Chem. 402: 583-592
- **DJEGHBOUB WIDED, 2010.** « Nanoparticules d'or et d'argent déposées sur oxyde de cérium synthétisées sous irradiation. »
- **Donaldson K., Poland C.A., 2009.** Nanotoxicology: New insights into nanotubes. Nanotechnology 2009.

### F

- **Fahmy, S.R., F. Abdel-Ghaffar, F.A. Bakry and D.A. Sayed, 2014.** Ecotoxicological Effect of Sublethal Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles on Freshwater Snail *Biomphalaria alexandrina*. Arch Environ Contam Toxicol., 67(2) : -(192-202).
- **Ferrari, A., A., Venturino and P.M. Pechen de D'Angelo, 2007.** Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. Pest Biochem Physiol., 88:134-142.
- **Francelyne Marano, Rina Guadagnini ; 2013** Les nanoparticules dans l'alimentation : quels risques pour le consommateur ? [Cahiers de Nutrition et de Diététique Volume 48, Issue 3](#), pages 142-(150).
- **François P., 2012.** Toxicité des nanoparticules métalliques chez différents modèles biologiques. Thèse de doctorat. Université du Québec à Montréal.
- **Fränze O., 2003.** Bioindicators and environmental stress assessment. Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications, B.A. Market, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors (Amsterdam: Elsevier Science Ltd.), pp. 41-84.

### G

- **Gaffet E. et al., 2016.** Rapport de l'atelier de réflexion prospective (ARP) en nanotechnologies – ARP 4N/ANR (Nanotechnology Prospective Workshop Report, p. 118.
- **Gaetke L.M., and Chow C.K., 2003.** Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. Toxicology ; 189: 147-163.

## Chapitre V : Références bibliographiques

- **Gimbert .F ., Annette de Vau Fleury., Douay. F., Coeurdassier. M., Scheifler. R., Badot. P.M., 2008.** Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 70 138–(146).
- **Gomot A., et Pihan F., 1997.** Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*.38. 85-94.
- **Grara N., Boucenna M., Atailia A., Berrebbah H., Djebbar M.R., 2012.** Stress oxydatif des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-est algérien) chez l'escargot *Helix aspersa*. *Environnement. Risques & Santé*. 11(3) : (221229).
- **Grara N., Atailia A., Boucenna M, Berrebbah H., Djebbar M.R., 2016.** Etude biochimique et histopathologique de la toxicité des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord- Est Algérien) chez *Helix aspersa*. *Journal of Materials and Environmental Science* ; 7 (12) :( 4733-4741).
- **GIAMBERINI Laure, 2013.** Nanoparticules : de l'Homme aux écosystèmes « [CNRS](#) ».
- **Gismondi, E., Beisel, J. N. et Cossu-Leguille, C., 2012.** *Polymorphus minutus* affects antitoxic responses of *Gammarus roeseli* exposed to cadmium. *Plos One* 7, (e41475).

### H

- **Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974.** Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, (7130-7139).
- **Hames C.A.C. and Hopkins, S.P., 1989.** 'The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods', *J. Zool. (Lond.)* 217, (599–627).
- **Hillyer J.F. and Albrecht, R.M., 2001** Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci*, 90 (1927-1936).
- **Horvath E., et al., 2007.** Hydrothermal Conversion of Self-Assembled Titanate Nanotubes into Nanowires in a Revolving Autoclave. *Chemistry of Materials*, 19(4): p. (927-931).

### J

- **Jankowsda, E, Lukaszewsd, J.,** Potential exposure to silver nanoparticles. During. Spaying. Preparation for Air-Conditioning. Clearing. 2013.



## Chapitre V : Références bibliographiques

- **Jargot D, La Rocca B, Malard S, Robert S, Serre P, Simonnard A., avec les collaborations de Reynier, Ricaud M, et Witschger O., 2013.** Dioxyde de titane Fiche toxicologique n°291 [www.inrs.fr/fichetox](http://www.inrs.fr/fichetox) .

### K

- **Kahli H, 2015.** Evaluation du stress oxydatif induit par les nanoparticules chez *Helix aspersa* : Cas du dioxyde de titane. Université Badji Mokhtar Annaba, P53.

- **Khan, M. J., Drochner, W., Steingass, H., Islam, K. M. S., 2008.** Nutritive evaluation of some tree leaves from Bangladesh for feeding ruminant animals. Indian J. Anim. Sci., 78 (11): (1273-1277).

- **Khene et al., 2017.** Biomarkers of oxidative stress, lipid peroxidation and ROS production induced by TiO<sub>2</sub> microparticles on snails *Helix aspersa*, Vol. 27 issue 2, 2017, pp. (127-133).

- **Kiatkittipong, K., et al., 2010** Understanding Hydrothermal Titanate Nanoribbon Formation. Crystal Growth & Design., 10(8): p. (3618-3625).

- **Köhler H R, Belitz Beckwert H, Adam R, Rahman B, Trontelj P., 1998.** Validation of hsp70 stress gene expression as a marker of metal effects in *Deroceras*

### M

-**Mouneyrac, C., P.F. Buffet, L. Poirier, A. Zalouk- Vergnoux, M. Guibbolini, C.R. Faverny, D. Gilliland, D. Berhanu, A. Dybowska, A. Châtel, H. Perrein-Ettajni, J.F. Pan, H. Thomas-Guyon H, P.Reip and E. Valsami- Jones, 2014.**Fate and effects of metal-based nanoparticles in two invertebrates, the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* and the annelid polychaete *Hediste diversicolor*. Environ Sci and pollut Res Int., 21(13) : (7899-7912).

- **Mamberger JH, Kvamme EF., 2008.** The National Nanotechnology Initiative: Second Assessment and Recommendations of the National Nanotechnology Advisory Panel, Report of the President's Council of Advisors on Science and Technology, April 2008, 56 p.

- **Marigomez I., Kortabitarte M., Dussart G.B.J., 1998.** Tissue-level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34. (167–176). 12 décembre 2013.

- **Miriam QUIÑONES, Joanna MINKER, Miriam RUBIO., 2009.** Les nanoparticules et leurs déchets. [www.ineris.fr](http://www.ineris.fr).

## Chapitre V : Références bibliographiques

### N

- **Nzengue, 2008.** Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p.53

- **Notten M., Oosthoek A., Rozema J., Aerts R., 2006.** Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the land snail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. *Ecotoxicology* 15. (295- 304).

- **Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2005.** Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution* 138 ; (178-190).

### O

- **Ostiguy C., Soucy B., Lapointe G., Woods C., and Ménard L., 2008.** Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules. Technical report, IRSST – Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.

- **Ostiguy, C., Lapointe, G., Ménard, L., Cloutier, Y., Trottier, M., Boutin, M., Antoun, M., and Normand, C., 2006.** Les nanoparticules. Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et en sécurité du travail. Technical report, IRSST – Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.

### P

- **Park, H., Ahn, I.Y., Lee, H.E., Park, K.I., Hyun, S.H., 2008.** Response of antioxidant defensesystems to thermal stress in the Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Antarct.*

- **Pirame Sandrine, 2003.** Contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit gris (*Helix aspersa*) reproduction expérimentale, « thèse de doctorat, université Paul Sabatier de Toulouse ».

- **PROTIERE Myriam, 2006.** Synthèse de nano cristaux fluorescents de semi-conducteurs II-VI et III-V. Augmentation de l'échelle de synthèse » thèse de doctorat .université joseph Fourier Grenoble I.

### R

- **Roco MC., 2009.** National Nanotechnology Investment in the FY 2009 Budget Request, AAAS Report XXXIII, Research and development FY.

- **Regoli F., Gorbi S., Fattorini D., Tedesco S., Notti A., Machella N., Bocchetti R., Benedetti M., Piva F. 2006.** Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organisme for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution :An integrated approach. *Environmental Health Perspectives*. 114. p.63-(69).

## Chapitre V : Références bibliographiques

### S

- **Sandrine Quignard, 2013.** Comportement des nanoparticules de silice en milieu biologique : des cellules aux biomatériaux. Thèse de doctorat .Université pierre et marie curie. Page 01.
- **Sarah Bouhadoun, 2015** Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane par pyrolyse laser et leur application en photocatalyse « THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY, préparée à « Université Paris-Sud ».
- **Sayes C M., Wahi R., Saber NA., Soliman SA. 2006.** Oxidative stress induced by different pesticides in the land snails, *Helix aspersa*. Pakistan Journal of Biological Sciences; 8: 92-(6).
- **Schroeder, I. D., W. J. Sydeman., N.. Sarkar, S. A. Thompson, S. J. Bograd, and F. B. Schwing., 2009.** Winter pre-conditioning of seabird phenology in the California Current, Mar. Eco.l Prog.2009, Ser., 393, (211–223).
- **Silva P & Pathiratne A., 2016.** Assessing Potential Genotoxic Effects of Nano-Titanium Dioxide on Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*), in proceedings of the 17th Conference on Postgraduate Research, International Postgraduate Research Conference 2016, Faculty of Graduate Studies, and University of Kelaniya, Sri Lanka. p 145.
- **Sugimoto T., Zhou X., and Muramatsu A., 2003.** Synthesis of uniform anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles by gel-sol method: 3. Formation process and size control. Journal of Colloid and Interface Science, 2003. 259(1): p. 43-(52).

### T

- **Tager J., 2017.** Evidence mounts that nano-titanium dioxide in food may be harmful. Chain Reaction, (129), 29 Avril 2017.

### V

- Valko M., et al., 2007.** Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39, (44-84).
- **Villem Aruoja, Anne Kahru, Henri-Charles Dubourguier., 2008.** Toxicity of ZnO, TiO<sub>2</sub> and CuO nanoparticles to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*; Toxicology Letters, Volume 180, page S220.

### W

- **Weckberker G., Cory G., 1998.** Ribonucléotider eductase activity abdgrowth of glutathione depleted mouse leukemial 1210 cells in vitro. Cacer letters 40: (257-264).

## Chapitre V : Références bibliographiques

- **Win KY, Feng S-S., 2005.** Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2005.

### X

- **Xiong D., Fang T., Yu L., Sima X., and Zhu W., 2011.** Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci total Environ* 409: (144-1452).

### Y

- **Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M.E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M.F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R., Lu, B., 2005.** Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling, 2005.

### Z

- **Zhang Y, Moqtaderi Z, Rattner BP, Euskirchen G, Snyder M, Kadonaga JT, Liu XS, Struhl K.,2010.** Intrinsic histone-DNA interactions are not the major determinant of nucleosome positions in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 2010.

### • Sitographie

- **Cazin X., 2014.** Schéma de l'anatomie de l'escargot. Dans *Biologie et zootechnie du Petit-gris Helix aspersa* Müller. Consulté en ligne le : 03 juin 2014 à URL : [http://librairie.immateriel.fr/fr/read\\_book/9782738002471/e9782738002471\\_c\\_02](http://librairie.immateriel.fr/fr/read_book/9782738002471/e9782738002471_c_02)

- **Gbaiocco, 2009.** *H aspersa*. Dans Wikipédia. Consulté en ligne le : 03 juin 2014 à URL : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Helix\\_aspersa#mediaviewer/Fichier:Snails2.jpg](http://fr.wikipedia.org/wiki/Helix_aspersa#mediaviewer/Fichier:Snails2.jpg)

- **Dunster, 2007.** *Helix aspersa*. Wikipédia. Consulté en ligne le : 12 mars 2014 à URL : [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mollusc\\_garden\\_snails\\_20070712\\_0113.jpg#/media/File:Mollusc\\_garden\\_snails\\_20070712\\_0113.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mollusc_garden_snails_20070712_0113.jpg#/media/File:Mollusc_garden_snails_20070712_0113.jpg)



