



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi-Tébessa



Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Science Biologie

Spécialité: Toxicologie: Xénobiotiques et Risques Toxicologiques

Thème

Effet de deux molécules nanométriques sur les paramètres physiologiques des escargots « *Helix aspersa* »

Présenté par:

LALMI Sabrina

LAZREG Amel

Devant le jury:

ROUACHDIA Roukaya	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Président
BENAMMARA Amel	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Rapporteur
BOUADILA Soulef	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Examineur

Date de soutenance: 31 Mai 2016

Année universitaire: **2015/2016**

ملخص

الكائنات الحية التي تعيش في التربة، تخضع لتقلبات منتظمة للعوامل الغير حيوية، والتلوث الكيميائي للبيئة بسبب الأنشطة البشرية، وهكذا فالكائنات تخضع لضغوطات متعددة.

والهدف من هذا العمل دراسة تأثير SiO_2 و Fe_2O_3 ومزيجهما على نوع مستعمل كمؤشر

حيوي للتلوث الايكولوجي، الحلزون الترابي *Helix aspersa*، وقد تم دراسة هذه الآثار في

المختبر، من خلال نهج لتقييم تأثير المركبات المختارة ومزيجيهما على العوامل الفيزيو لوجية (وزن الحلزون، القوقعة، النسيج الرخو، البنكرياس الكبدي، وقطر القوقعة) والعوامل الأيضية على مستوى البنكرياس الكبدي (السكريات، البروتينات، الدسم).

النتائج المتحصل عليها تبين أنّ النقص المعتبر لقطر القوقعة راجع إلى تأثير Fe_2O_3 ، إذا

بالنسبة لـ: SiO_2 نلاحظ نقص متوسط وزن الحلزون وبعض من أعضائه (القوقعة، النسيج الرخو والبنكرياس الكبدي) أمّا بالنسبة لمزيجيهما المتمثل فلا يوجد أي تأثير معتبر للعوامل السابقة.

إضافة إلى هذا نلاحظ اضطرابات معتبرة على مستوى المركبات البيوكيميائية في البنكرياس

الكبدي لـ: *Helix aspersa* (كمية السكريات، كمية الدهون، كمية البروتينات الكلية) بعد العلاج

بـ: SiO_2 و Fe_2O_3 ومزيجهما.

الكلمات المفتاحية: *Helix aspersa*، أكسيد الحديد، سيليس، مزيج، البنكرياس الكبدي،

السكريات، الدهون، البروتينات.

Abstract

Organisms that live in soil are subjects to irregular vagaries of non vital factors, and chemical pollution due to human activities. This organism is subject multiple pressures.

The aim of this work is to study the effect of Fe_2O_3 and SiO_2 and there mixture on the type used as an indicator of the vital ecological pollution on the *Helix aspersa* snail. These effects have been researched in vitro study, through its approach to the evaluation of selected compounds and Their mixture on physiological factors (snail weight, snail shell, soft tissue, pancreas, liver, and shell diameter).It studies also the metabolic factors on pancreas liver (sugar, proteins, fat) the results shortfall in the snail shell diameter is due to the influence of Fe_2O_3 . As for SiO_2 , it notes a shortage in the average snail weight and some of its organs (shell, soft tissue, pancreas and liver). As for the replicate mixture outlook, the is no effect of the previously mentioned factors.

Add to this considering the biochemical level of the compounds in pancreas and liver, we notice disorder for *Helix aspersa* in (the amount of sugars, the amount of fat, the amount of total protein) after the treatment with Fe_2O_3 and SiO_2 mixture.

Résumé

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

Le but de ce travail était d'étudier les effets de deux nanoparticules d'oxyde de fer, d'oxyde de silice et de leurs mixtures sur une espèce bioindicatrice en écotoxicologie, l'escargot terrestre *Helix aspersa*. Leurs effets ont été étudiés par une approche ciblée au laboratoire, consistant à évaluer l'effet de ces molécules et de leurs mixtures sur les paramètres physiologique (poids des escargots, de la coquille, de tissu mou, de l'hépatopancréas et le diamètre D et L de la coquille) et les métabolites de l'hépatopancréas (glucide, protéine et lipide)

Les résultats obtenus montrent que la diminution significative du diamètre de la coquille est provoqué par les nanoparticules d'oxyde de fer, ainsi qu'une diminution du poids moyens des escargots et de certains de ces organes (coquille, tissu mou et hépatopancréas) est observée chez les traités par l'oxyde de silice, en effet les nanoparticules de la mixture semble n'a aucun effet significative sur les paramètres précédents.

De plus des perturbations significatives sont également notées dans la composition biochimique de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*(contenu en glucides totaux, en lipides totaux et en protéines totales) après traitement aux nanoparticules d'oxyde de fer, de la silice et de leurs mixtures.

Mots clés: *Helix aspersa*, Oxyde de fer, Silice, Mixtures, Hépatopancréas, Glucide, Lipide, Protéine.

Dédicace

*Louange à Dieu, qui ma donné la force pour accomplir ce modeste travail que
je dédie:*

*A mon père et ma mère, cause de mon existence et qui m'ont entourés de leur
amours pour que je me rende joyeuse et comblée et que jeu puisse m'épanouir
dans un bonheur ordent.*

A mes frères: Zidane, Elhouari

A mes sœurs: Soulef, Souhiala, Noure.

A mes ancles et tantes.

A mes cousins et cousines.

A mon binôme: Amel et sa famille

*A mes amies: Hana, Amel, Sabrine, Dalal, Imen, Linda, Dalila, Loubna, Sihame,
Soumia, Noual, Hanan, Amira, Hadda, avec les quelles je garde des souvenirs
inoubliable.*

A mes camarades de T.X.R.T.

Tout simplement a tous qui ayant un espace dans mon cœur.

Sabrina

Dédicace

A mes très chers parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur Soutien
tout Au long de mes études.

A mes chers frères et sœurs.

A tous Mes amies et mes collègues

Je dédie ce modeste travail.

Amel

Remerciement



Au terme de ce travail, qui est le fruit de toutes ces années d'études universitaires, nous remercions le dieu le tout puissant pour son aide et le courage qu'il nous a donné, pour surmonter les difficultés durant notre étude.

Nous avons l'honneur de remercier notre encadreur madame Mlle. Amel BENAMMARA pour son aide précieux qu'elle nous a fournis, ces conseils et ses orientations objectifs pendant notre travail.

Nous avons l'honneur de remercier Madame BOUADILA. Soulef et Madame Roukaya ROUACHDIA et Monsieur Rachid ROUBHI, et a tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Enfin, nous remercions infiniment nos collègues de T.X.R.T de promotion 2016.

Table des matières

Abstract	
Résumé	
Dédicace	
Remerciement	
Tables des matières	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des symboles	
Introduction	
Recherche bibliographique	
1. Les nanoparticules	03
1.1. Différents types des nanoparticules	03
1.1.1. Nanoparticules organiques	03
1.1.1.1. Les polymères organiques	03
1.1.1.2. Les nanoparticules d'inspiration biologique	04
1.1.2. Nanoparticules inorganiques	04
1.1.2.1. Les métaux	04
1.1.2.2. Les oxydes métalliques	04
1.1.2.3. Les points quantiques	05
1.2. Domaine d'utilisation des nanoparticules	05
1.3. Modes de production	07
1.3.1. L'approche ascendante (<i>bottom-up</i>)	07
1.3.2. L'approche descendante (<i>topdown</i>)	07
1.4. Les Effets des nanoparticules	07
1.4.1. Sur l'environnement	07
1.4.2. Sur l'Homme	08
1.4.2.1. Voies d'entrée dans l'organisme	08
1.4.2.2. Effet sur la santé humaine	10
2. Les nanoparticules d'oxyde métallique	10
2.1. Toxicité d'oxyde métallique	10

Table des matières

3. Nanoparticule d'oxyde de fer	11
3.1. Toxicité	12
3.1.1. Chez les Eucaryotes	12
3.1.2. Toxicité chez les Procaryotes	13
3.1.3. Toxicité chez les végétaux	13
4. Nanoparticule de silice	14
4.1. Toxicité de silice	14
5. Choix du modèle biologique	15
Partie expérimentale	
Matériel et Méthodes	16
1. Matériel	16
1.1. Matériel biologique	16
1.1.1. Morphologie d' <i>Helix aspesa</i> .	16
1.1.2. Anatomie de l'escargot	17
1.1.3. L'espèce en milieu naturel	17
1.1.4. Rythme d'activité	18
1.1.5. Estivation et hibernation	18
1.1.6. Croissance	18
1.1.7. Reproduction	19
1.2. Matériel chimique	19
2. Méthodes	20
2.1. Conditions d'élevage	20
2.2. Mode de traitement	20
2.3. Préparation et sacrifice des animaux	21
3. Paramètres étudiés	22
3.1. Paramètres physiologiques	22
3.2. Paramètres biochimiques	23
3.2.1. Dosage des métabolites	23
3.2.1.1. Extraction des métabolites	23
3.2.1.2. Dosage des protéines	24
3.2.1.3. Dosage des glucides	24

Table des matières

3.2.1.4. Dosage des lipides	25
4. Etude statistique	25
Résultats	26
1. Effets des nanoparticules sur les biomarqueurs physiologiques	26
1.1. Effet des nanoparticules (Fe ₂ O ₃ , de SiO ₂ et des mixtures) sur le poids moyen des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	26
1.2. Effet des nanoparticules (Fe ₂ O ₃ , de SiO ₂ et des mixtures) sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i>	28
1.2.1. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer	28
1.2.2. Effet des nanoparticules de l'oxyde de silice	28
1.2.3. Effet de la mixture des nanoparticules d'oxyde de fer et de silice	28
1.3. Effet des nanoparticules (Fe ₂ O ₃ , de SiO ₂ et des mixtures) sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i>	29
1.4. Effet des nanoparticules (Fe ₂ O ₃ , de SiO ₂ et des mixtures) sur le poids des tissus mous des escargots <i>Helix aspersa</i>	31
1.5. Effet des nanoparticules (Fe ₂ O ₃ , de SiO ₂ et des mixtures) sur le poids de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i>	32
1.6. Effet des nanoparticules (Fe ₂ O ₃ , de SiO ₂ et des mixtures) sur le poids moyen de l'hépatopancréas des escargots <i>Helix aspersa</i>	33
2. Analyses biochimiques	34
2.1. Dosage des métabolites au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Helix aspersa</i>	34
2.1.1. Taux de protéines	34
2.1.1.1. Effets sur le taux des protéines	34
2.1.2. Taux de glucides	37
2.1.2.1. Effets des nanoparticules (Fe ₂ O ₃ , de SiO ₂ et des mixtures) sur le taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas	37
2.1.3. Taux des lipides	40
2.1.3.1. Effets des nanoparticules (Fe ₂ O ₃ , de SiO ₂ et des mixtures) sur le taux des lipides au niveau de l'hépatopancréas	40
Discussion	41
1. Effets des nanoparticules (Fe ₂ O ₃ , de SiO ₂ et des mixtures) sur les biomarqueurs physiologiques chez <i>Helix aspersa</i>	41

Table des matières

1.1. Sur le poids des escargots	41
1.2. Sur les diamètres (D, L) de la coquille des escargots	42
1.3. Sur le poids du tissu mou et de la coquille des escargots	42
1.4. Sur le poids d'hépatopancréas	43
2. Effets des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur les biomarqueurs biochimiques (métabolites) chez <i>Helix aspersa</i>	43
2.1. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Helix aspersa</i>	43
2.2. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le taux des protéines au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Helix aspersa</i>	43
2.3. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le taux des lipides au niveau de l'hépatopancréas chez <i>Helix aspersa</i>	44
Conclusion & Perspectives	
Références bibliographique	

Liste des tableaux

N° Tableau	Titre	Page
01	Dosage des protéines: réalisation de la gamme d'étalonnage	24
02	Dosage des glucides: réalisation de la gamme d'étalonnage	24
03	Dosage des lipides: réalisation de la gamme d'étalonnage	25

Liste des figures

N° Figure	Titre	Page
01	Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques	03
02	Représentation schématique et visuelle d'un point quantique	05
03	Exemples de produits contenant des nanomatériaux	06
04	différentes utilisations des nanoparticules manufacturées dans les applications environnementales	07
05	Contamination et devenir des nanoparticules dans l'environnement	08
06	Différentes voies d'entrée des nanoparticules dans l'organisme	09
07	Cellules pulmonaires humaines après une exposition de trois jours à des nanoparticules d'oxyde de fer (F ₂ O ₃). Les cellules commencent à s'arrondir et à se détacher de leur support, un premier indice de sa cytotoxicité	12
08	Le petit gris (<i>Helix aspersa</i>)	16
09	Anatomie de l'escargot	17
10	Les nanoparticules manufacturées d'oxyde de fer en poudre	19
11	Les nanoparticules de silice en poudre	20
12	Exposition de l'escargot <i>Helix aspersa</i> à la nourriture contaminée	21
13	Dissection et prélèvement des organes (l'hépatopancréas)	21
14	Mesure des deux diamètres D et L de <i>Helix aspersa</i>	22
15	Principales étapes d'extraction des métabolites: protéines, glucides et lipides	23
16	Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'évolution du poids moyen des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	26
17	Effet des nanoparticules de silice sur l'évolution du poids moyen des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	27
18	Effet des nanoparticules de mixture (oxyde de silice + oxyde de fer) sur l'évolution du poids moyen de <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	27
19	Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	28
20	Effet des nanoparticules d'oxyde de silice sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	29

Liste des figures

21	Effet des nanoparticules de mixture (oxyde de fer + oxyde de silice) sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	29
22	Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	30
23	Effet des nanoparticules de la silice sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	30
24	Effet des nanoparticules de mixture (oxyde de fer + oxyde de silice) sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	31
25	Effets des nanoparticules d'oxyde de fer, de silice et de leurs mixtures sur le poids des tissus mous des escargots <i>Helix aspersa</i> après 04 semaines de traitements.	32
26	Effets des nanoparticules d'oxyde de fer, d'oxyde de silice et de leurs mixtures sur le poids de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> après 04 semaines de traitements.	33
27	Effets des nanoparticules d'oxyde de fer, d'oxyde de silice et de leurs mixtures sur le poids moyen de l'hépatopancréas des escargots <i>Helix aspersa</i> après 04 semaines de traitements.	33
28	Variation du taux des protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de fer administrées par ingestion	35
29	Variation du taux des protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules de silice administrées par ingestion	35
30	Variation du taux des protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules de mixtures administrées par ingestion	36
31	Variation du taux des glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de fer administrées par ingestion	37
32	Variation du taux des glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de	37

Liste des figures

	<i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de silice administrées par ingestion	
33	Variation du taux des glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules de la mixture d'oxyde de fer et de silice administrées par ingestion	38
34	Variation du taux de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules de la mixture d'oxyde de fer et de silice administrées par ingestion	39
35	Variation du taux de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules de silice administrées par ingestion	39
36	Variation du taux de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de fer administrées par ingestion.	40

Liste des symboles

ADN: Acide désoxyribonucléique.

Al₂O₃: Oxyde d'aluminium.

BBC: Bleu Brillant de Coomassie

BSA: Bovin Sérum Albumine

CL50: Concentration létale 50

E. coli: *Escherichia coli*

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

Fe₂O₃: Oxyde de fer

Fe₃O₄: Nano-magnétites de fer

G: Gramme

H: Heure

H₂O: Eau

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

IL-8: Interleukine 8

L: Litre

Mn: Minute

NADPH: Nicotinamide-adénine dinucléotide-phosphate réduit

NaOH: Oxyde de sodium

Nm: Nanomètre

NPs: Nanoparticules

ROS: Espèce réactive oxygène

Si: Silice

SiO₂: Oxyde de silice

TCA: Acide trichloroacétique

TiO₂: Oxyde de titane

V: Volume

ZnO: Oxyde de zinc

%: Pourcentage

°C: Degré *Celsius*

µg: Microgramme

µl: Microlitre

Introduction

Introduction

Les nanosciences et nanotechnologies, qui promettent des progrès remarquables dans de nombreux domaines comme la santé, les biotechnologies, l'énergie, l'électronique ou les technologies de l'information, font l'objet depuis quelques années d'un intérêt croissant, comme en témoignent les nombreux moyens humains et financiers mis en œuvre pour leur développement. Ce domaine de la science s'intéresse aux nano-objets (dont une dimension est inférieure à 100 nm) sous plusieurs aspects : 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 trouve des nanoparticules de nombreux matériaux comme l'or, le silice, les oxydes métalliques (par exemple TiO_2) et les semi-conducteurs pour les cristaux quantiques. Un des intérêts de ces nanoparticules est la possibilité de contrôler la forme, la taille, la composition lors de la synthèse et de modifier la surface pour les fonctionnaliser. De plus la dimension même des nanoparticules et la diversité de nanoparticules synthétisables en font des candidats intéressants pour les applications en bioanalyse et médecine (**Sandrine Q, 2013**).

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. Actuellement, les nanotechnologies sont en pleine expansion et de nouveaux produits contenant des nanomatériaux sont constamment mis sur le marché. 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 P, 2012**).

Les nanoparticules (NPs) métalliques sont très répandues à cause de la simplicité de leurs méthodes de synthèse et de la diversité de leurs applications. 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 leur procure des propriétés uniques qui peuvent 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 P, 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. E et al, 1990**).

Notre travail de recherche a pour objectif d'évaluer l'effet induite par les nanoparticules manufacturées d'oxyde de fer «Fe₂O₃», de silice «Si» et leur mixture sur les paramètres physiologiques et biochimiques (glucide, protéine, lipide) chez un gastéropode terrestres, l'escargot *Helix aspersa*.

Recherche bibliographiques

1. Les nanoparticules

Une nanoparticule est un assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes. Cette définition exclut donc les objets dont la plus petite dimension est comprise entre 100 et 1000 nm. A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines (Figure 01). La plupart des nanoparticules sont des agrégats de petites molécules ou d'atomes.

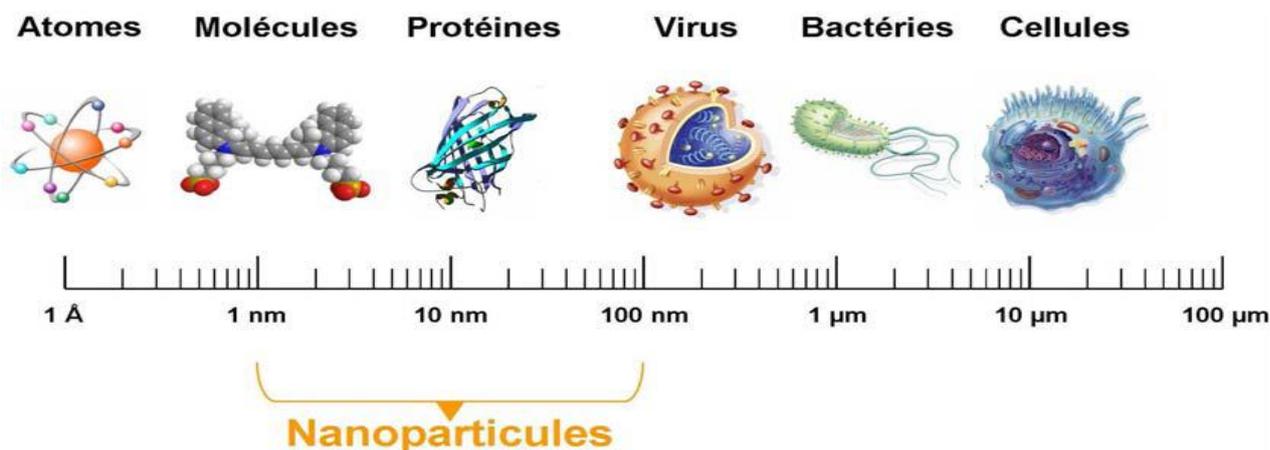


Figure 01: Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques. (Tomalia, 2004; Icon, 2008).

1.1. Différents types des nanoparticules

1.1.1. Nanoparticules organiques

1.1.1.1. Les polymères organiques

De nombreux polymères organiques courants peuvent être produits dans des dimensions nanométriques. Le chlorure de polyvinyle ou le latex ainsi produits, par exemple, peuvent être, dans certaines conditions, solubilisés ou modifiés chimiquement. Compte tenu qu'ils peuvent être conçus hydrophiles ou hydrophobes, leur utilisation peut être très diversifiée. Avec différents groupements réactifs de surface, on peut utiliser abondamment dans le domaine médical et biomédical comme moyen d'acheminer les médicaments, comme thérapies, pour des bio-essais ou encore comme agents de contraste en imagerie (Tomalia, 2004; Icon, 2008). Dans le passé, ils sont utilisés comme encre, comme agent de chélation métallique dans les résines échangeuses d'ions, dans les recouvrements, les cosmétiques ou encore comme modificateur de viscosité ou comme agent de réhabilitation environnementale (Icon, 2008).

1.1.1.2. Les 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 (**Icon, 2008; Hansen, 2009**).

1.1.2. Nanoparticules inorganiques

1.1.2.1. Les métaux

La majorité des métaux ont été ou peuvent être produits dans des dimensions nanométriques. Parmi ceux-ci, les NP d'or sont particulièrement étudiées et démontrent un spectre de résonance optique dans le visible qui est sensible aux conditions environnementales, à la taille et à la forme des NP. 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. L'argent nanométrique est aussi produit en bonne quantité et est utilisé surtout pour ses propriétés antimicrobiennes (**Icon, 2008; Hansen, 2009**). Le platine, le palladium et le rhodium nanométriques sont utilisés dans les convertisseurs catalytiques, le fer, le nickel et le cobalt comme catalyseurs notamment pour la synthèse de nanomatériaux carbonés, l'aluminium comme combustible, le fer comme métal dopant et le cuivre en électronique. Des nanofils métalliques d'or, de cuivre, de silicium, de cobalt, capables d'être conducteurs ou semi-conducteurs électriques, ont également été mis au point et pourraient être utilisés pour le transport des électrons en nanoélectronique. Enfin, d'autres nanofils ont été élaborés à base de différents métaux, oxydes, sulfures et nitrures. La composition du cœur des nanoparticules est très variée : il peut s'agir d'assemblages organiques ou inorganiques (**C. Kumar, 2006**).

1.1.2.2. Les oxydes métalliques

Plusieurs oxydes métalliques de dimensions nanométriques 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 tels quels ou enrobés, principalement dans le domaine de la rhéologie, des plastiques et du caoutchouc en tant qu'agents actifs et d'additifs (SiO_2), des crèmes solaires (TiO_2 , ZnO) et de pigments pour la peinture (TiO_2). D'autres oxydes métalliques sont également produits dont les oxydes de cérium, de fer, de cuivre, de zirconium, d'aluminium, de nickel, d'antimoine, de baryum, de manganèse de même que des nano-argiles (**Icon, 2008**).

1.1.2.3. Les points quantiques

Les 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 ou d'oxydes métalliques. Le nombre d'atomes des points quantiques peuvent varier de 1000 à 100 000 atomes (Aitken et al, 2004). 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. Plusieurs points quantiques sont modifiés afin d'en produire des vecteurs de médicaments, des outils diagnostics ou des piles solaires non-organiques (Akerman et al, 2002; Michalet et al, 2005).

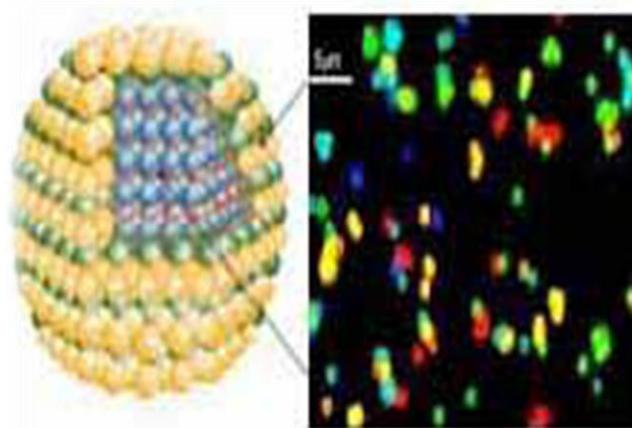


Figure 02: Représentation schématique et visuelle d'un point quantique (Aitken et al, 2004).

1.2. Domaine d'utilisation des nanoparticules

Les domaines d'usage potentiels des nanotechnologies sont très nombreux (Le Marois G, 2005). Les plus grandes utilisations industrielles actuelles sont liées à la fabrication des pneumatiques (oxyde de silicium) et pour la formulation des cosmétiques, avec une consommation dépassant 1000 tonnes par an (principalement d'oxyde de titane). Les autres usages actuels semblent ne pas dépasser chacun 10 tonnes par an, mais sont promis à une forte croissance. On peut donc s'attendre à un développement rapide de l'usage des nanoparticules dans un grand nombre d'industries, notamment dans l'agro-alimentaire, l'aéronautique, l'automobile, la chimie, la construction, la cosmétique, la défense, l'électronique, la production d'énergie, l'optique, la pharmacie, le textile, etc. (Le Marois G, 2005).



Figure 03: Exemples de produits contenant des nanomatériaux ((Lowry et al, 2004))

Dans le domaine environnemental, les nanoparticules manufacturées sont des objets prometteurs capables d'apporter des solutions à un grand nombre de problèmes comme la dépollution des eaux profondes (Lowry et al, 2004) et des sols (Wei-xian et al, 2003), le traitement des eaux de consommation (Ngomsik et al, 2005), le contrôle de la pollution (Riu et al, 2006) ou encore le recyclage des déchets. Dans ces applications, les nanoparticules sont utilisées en tant que membranes nanostructurées (Figure 04) et sous forme de suspensions liquides pour la dépollution des eaux profondes (Wei-Xian et al, 2003; Lowry et al, 2004). C'est le cas des nanoparticules de fer métallique qui sont injectées dans des aquifères situés en sous-sols de sites pollués américains (Gavaskar et al, 2005). Grâce à leurs propriétés catalytiques, elles convertissent certains contaminants organiques (composés chlorés, pesticides...) en composés non toxiques (Choe et al, 2000; Kanel et al, 2005; Liu et al, 2005). Les suspensions de nano-oxydes de fer sont également étudiées pour le traitement des eaux de surface et des effluents (Hu et al, 2005; Uheida et al, 2006).

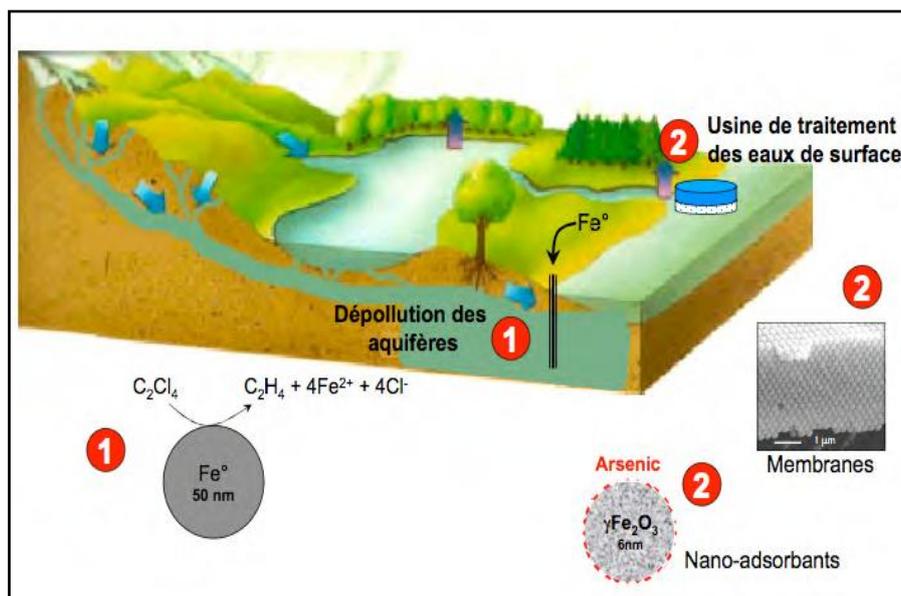


Figure 04: différentes utilisations des nanoparticules manufacturées dans les applications environnementales (Lowry et al, 2004).

1.3. Modes de production

Les NP peuvent être synthétisées selon différentes approches: essentiellement par la méthode ascendante ou la méthode descendante.

1.3.1. L'approche ascendante (bottom-up): les NP sont construites atome par atome ou molécule par molécule.

1.3.2. L'approche descendante (topdown): une grande structure est graduellement sous-dimensionnée, jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques après application de sollicitations mécaniques sévères, de chocs violents et de fortes déformations. (Bsi, 2005).

1.4. Les Effets des nanoparticules

1.4.1. Sur l'environnement

Comme toute substance chimique, les nanoparticules introduites dans l'environnement peuvent par divers processus (volatilisation, déposition, etc.) conduire à une contamination des différents compartiments tels que l'air, le sol, les eaux de surface et souterraines ce qui entraîne une exposition des organismes vivants (Afsset, 2006).

La connaissance des origines, de la composition, du comportement, des mécanismes de transfert ainsi que des transformations des nanoparticules dans l'environnement est essentielle pour évaluer les impacts environnementaux (figure 05).

Du fait de leur petite taille, ces particules sont très mobiles dans l'environnement et peuvent donc être transférées d'un milieu à l'autre. Leur structure cristalline détermine leur réactivité chimique. La connaissance de ces deux paramètres, taille et structure, est donc essentielle pour mener une évaluation de leur impact sur l'environnement (Afsset, 2006).

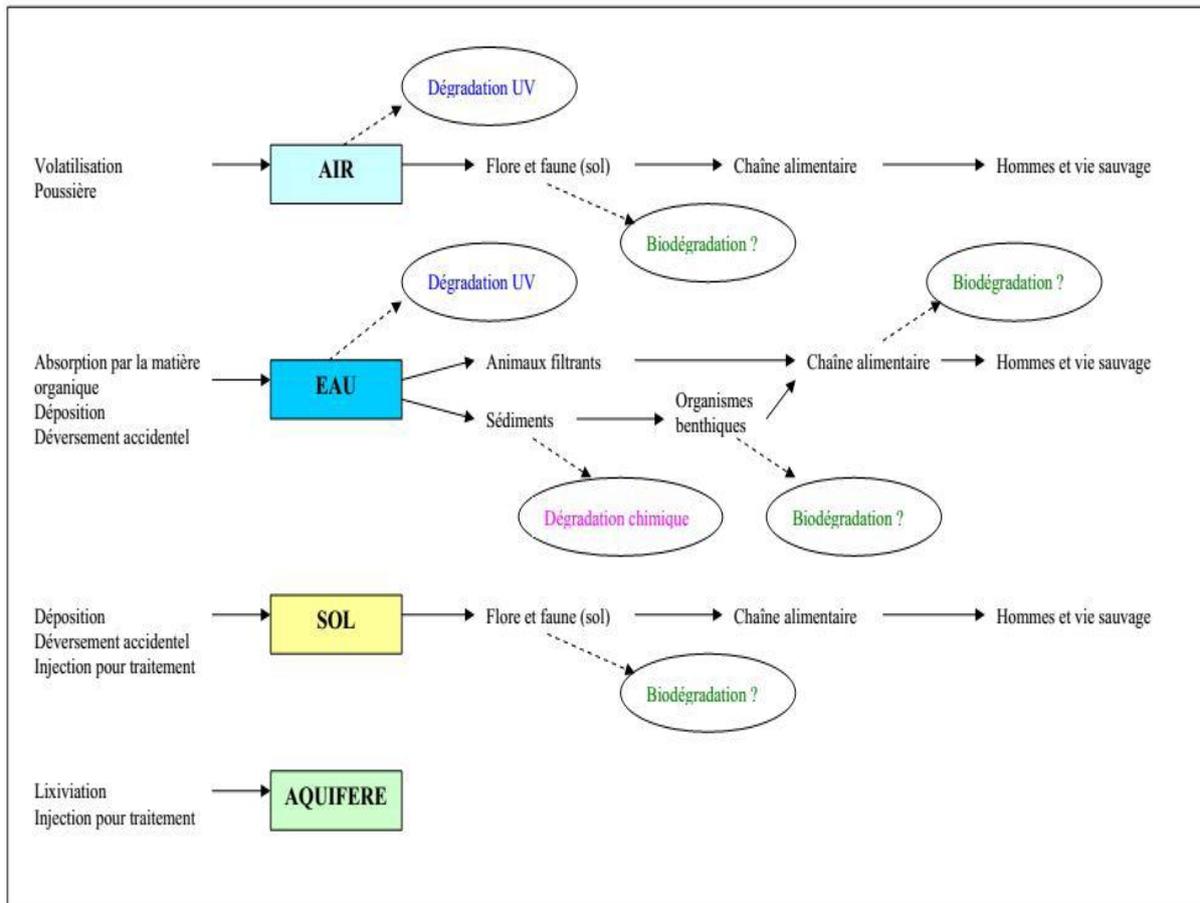


Figure 05: Contamination et devenir des nanoparticules dans l'environnement (Afsset, 2006).

1.4.2. Sur l'Homme

1.4.2.1. Voies d'entrée dans l'organisme

Actuellement, les connaissances sont très pauvres sur la mise en circulation des nanoparticules manufacturées dans l'environnement. Leur relargage peut s'effectuer sous forme de poussières ou de suspension liquide au moment de leur fabrication, par l'abrasion ou l'altération des structures qui les maintiennent (ex: usure mécanique), par la libération de préparation liquide ou visqueuse (ex: crème solaire appliquée sur la peau), par rejet d'effluents liquides ou gazeux par les installations de production ou de traitement. A ce jour, il n'existe ni préconisation ni suivi pour la prise en compte des risques que peuvent poser les déchets comportant des nanoparticules. Les données disponibles ne permettent plus d'estimer

la population qui pourra être potentiellement exposée durant la fabrication, la mise en œuvre et l'usage des nanoparticules.

Un rapport britannique estime qu'en 2015, 1500 fois plus de travailleurs qu'en 2004 seront exposés aux nanoparticules lors de leur production et de leurs utilisations industrielles (**Health & Safety Executive, 2004**). L'exposition des consommateurs va également croître rapidement, soit par une utilisation explicite de nanoparticules (ex : fluides magnétiques) soit par l'altération des matériaux incluant des nanoparticules sans que le consommateur soit averti (ex: crème solaire). Pourtant, il existe plusieurs voies d'entrée potentielle des nanoparticules manufacturées dans les organismes vivants. Le système respiratoire est généralement la première venant à l'esprit du fait de l'analogie avec les particules atmosphériques ultrafines. Mais d'autres voies d'exposition comme l'ingestion (système gastro-intestinal), la voie cutanée (système dermique) et les injections de nanoparticules dans la circulation sanguine sont également à prendre en considération compte tenu des modes d'utilisations des nanoparticules manufacturées (Figure 06). Chaque voie présente habituellement une barrière à cette pénétration (ex : la rate ou les reins).

Des études ont montré que les nanoparticules pouvaient franchir ces barrières de protection, se distribuer dans l'organisme et s'accumuler dans certains organes, principalement lors des expositions respiratoire ou digestive (**Oberdörster et al, 2005**).

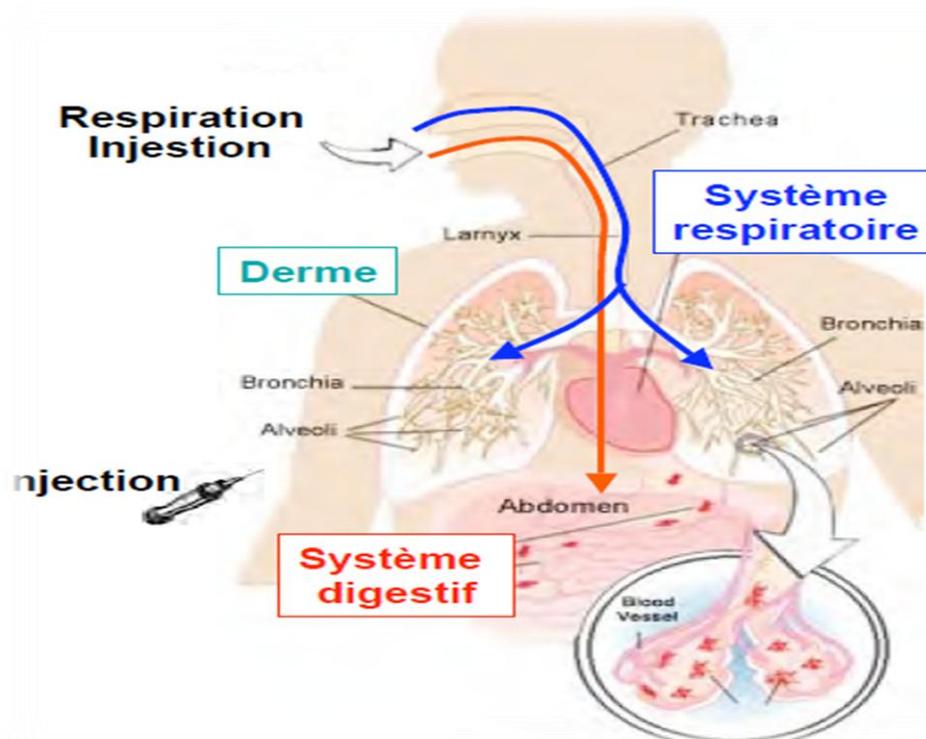


Figure 06 : Différentes voies d'entrée des nanoparticules dans l'organisme (**Oberdörster et al, 2005**).

1.4.2.2. Effet sur la santé humaine

Ne connaissant pas le degré d'exposition de l'homme aux nanoparticules, il est difficile de quantifier et de connaître la nature des effets sur la santé humaine. Cependant des effets sont à prévoir si on se fie aux données complémentaires obtenues par les études *in vivo* déjà réalisées et les études épidémiologiques sur l'impact des particules ultrafines de l'air sur la santé humaine. Ainsi plusieurs études montrent que de fortes concentrations en particules fines ont un impact à court terme sur l'état de santé en particulier en ce qui concerne les problèmes respiratoires et cardiovasculaires (**Peters et al, 1997**). Des études à plus long terme montrent que l'exposition à de fortes concentrations en particules fines peut conduire à une réduction de l'espérance de vie (**Brunekreef, 1997; Maynard et Maynard, 2002**). Les études *in vivo* permettent de déterminer les effets directs des nanoparticules. Cependant elles restent des études sur des modèles qui ne représentent pas forcément la réalité des effets sur l'homme (**Ostiguy et al, 2008**).

2. Les nanoparticules d'oxyde métallique

Il en existe de nombreuses natures des nanoparticules d'oxyde métallique, mais les plus courantes sont: les oxydes de titane (TiO_2), les oxydes de fer (Fe_2O_3), les oxydes de zinc (ZnO), les oxydes d'aluminium (Al_2O_3) et la silice (SiO_2). Nous nous intéresserons plus particulièrement dans notre travail aux nanoparticules Fe_2O_3 qui sont souvent utilisées dans différents domaines de recherches : cosmétologie, électronique, nano-médecine, remédiation environnementale (**Ludivine. C, 2013**).

2.1. Toxicité d'oxyde métallique

Les effets des nanoparticules d'oxyde métallique sur la viabilité cellulaire ont été décrits dans plusieurs études. Un effet cytotoxique est souvent constaté pour différentes nanoparticules testées sur différents modèles cellulaires (**Auffan et al, 2006; Gojova et al, 2007; Hussain et al, 2005; Sayes et al, 2006b; Soto et al, 2005; Wang et al, 2007**). L'intensité de ces effets dépend de plusieurs paramètres comme le modèle cellulaire (**Barlow et al, 2005; Gurr et al, 2005**), la nature des nanoparticules (**Peters et al, 2004; Soto et al, 2005**), leur taille (**Barlow et al, 2005; Gurr et al, 2005; Sayes et al, 2006b**) ou encore leur forme cristalline (**Sayes et al, 2006b**). Cependant à caractéristiques et modèles cellulaires égaux, certaines études sont contradictoires. C'est le cas des études de **Soto et al, (2005)** et **Wagner et al, (2007)** qui dans le premier cas montrent que les nanoparticules d' Al_2O_3 ont un effet cytotoxique prononcé ($\text{Cl}_{50}=5,5\mu\text{g.ml}^{-1}$) et dans le deuxième cas une perte de viabilité est seulement observée à partir de 3^{ème} jours et à $100\mu\text{g.ml}^{-1}$. Ainsi d'autres caractéristiques différentielles non déterminées sont probablement à l'origine de cette discordance.

Un des principaux effets notés suite à une exposition aux nanoparticules d'oxyde métallique est l'activation de facteurs pro inflammatoires comme l'interleukine 8 (IL-8) (**Gojova et al, 2007; Sayes et al, 2006b; Singh et al, 2007**). Ce sont des facteurs qui favorisent l'inflammation c'est-à-dire la réponse immunitaire. Ainsi ces nanoparticules ne sont pas inertes pour l'organisme. Cependant, là aussi des différences selon les caractéristiques et des contradictions entre études sont constatées puisque certaines études ne montrent pas de réponse pro inflammatoire (**Barlow et al, 2005; Peters et al, 2004; Wagner et al, 2007**).

Afin de connaître leur interaction avec les cellules et donc prévoir et comprendre leur mécanisme d'action, la localisation cellulaire des nanoparticules d'oxyde métallique a été étudiée. Quelle que soit la nature de l'oxyde, les nanoparticules sont uniquement localisées dans des vésicules qui sont probablement des vésicules d'endocytose (**Auffan et al, 2006; Gojova et al, 2007; Peters et al, 2004; Singh et al, 2006**). Aucune nanoparticule d'oxyde métallique n'a été retrouvée libre dans le cytoplasme, dans les organites ou dans le noyau. Ainsi il semblerait qu'un mécanisme indirect soit à l'origine de leur toxicité. En raison de leur activité catalytique reconnue, l'hypothèse de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) a été la première mise en avant. Elle a été vérifiée pour les nanoparticules de TiO₂ (**Singh et al, 2007; Gurr et al, 2005**).

Cette production d'ERO a été corrélée à des dommages membranaires et à des dommages oxydatifs de l'ADN (**Gurr et al, 2005**) et donc pourrait expliquer l'origine des autres dommages de l'ADN constatés comme les micronoyaux (**Rahman et al, 2002; Wagner et al, 2007**). Les mécanismes d'action et les conséquences à l'échelle cellulaire et moléculaire d'une exposition à des nanoparticules d'oxyde métallique, semblent donc dépendre de beaucoup de paramètres et demandent à être éclaircis.

3. Nanoparticule d'oxyde de fer

Bien que le fer soit un élément essentiel à la vie, une augmentation de sa concentration en milieu cellulaire peut générer la formation de ROS (**Aiberts et al, 1983**). Or, dans la plupart de leurs applications, les nanoparticules d'oxyde de fer sont en contact avec les cellules voire le milieu intracellulaire. Il est donc probable que les interactions nanoparticules d'oxyde de fer/cellules ne soient pas anodines. (**Berry et al, 2003; 2004**).

3.1. Toxicité

3.1.1. Chez les Eucaryotes

C'est notamment le cas des nanoparticules de magnétite dont la toxicité vis-à-vis des cellules humaines a été démontré (**Joulivet et al, 2002**). Les nanoparticules d'oxyde de fer utilisées à des fins biomédicales (**Gupta et al., 2005**) sont généralement fonctionnalisées en surface via le greffage de composés organiques (**Kim et al, 2005; Goetze et al, 2002; Lacava et al, 2002; Chunfu et al, 2004; Xu et al, 2010; Kim et al, 2005**). Cette couche organique limite les contacts directs entre le fer des nanoparticules et les composants cellulaires.

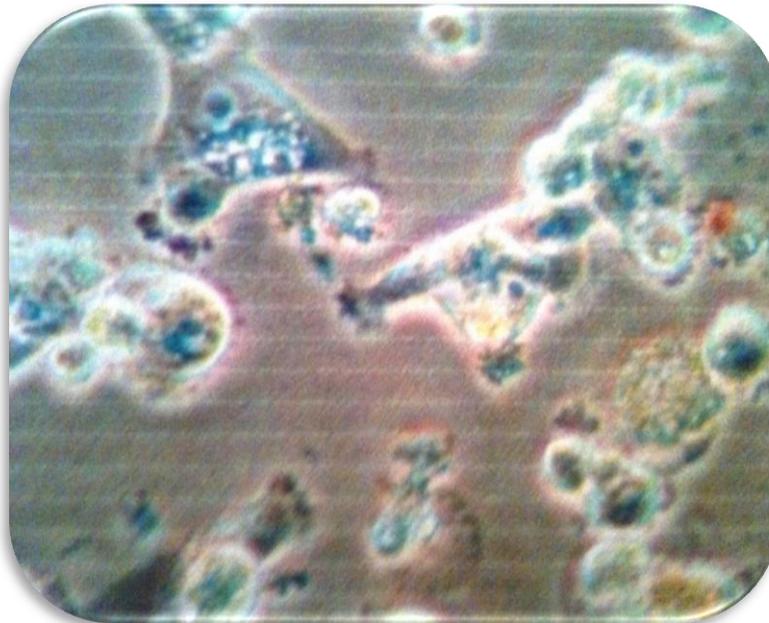


Figure 07: cellules pulmonaires humaines après une exposition de trois jours à des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_2O_3). Les cellules commencent à s'arrondir et à se détacher de leur support, un premier indice de sa cytotoxicité. (**Afsset, 2006**)

Chez les souris, l'injection intra péritonéale d'oxyde de fer, provoque une inflammation dans la cavité péritonéale, (**Lacava et al, 2002**). Aussi, l'injection intraveineuse de Fe_3O_4 provoque des effets génotoxique observés après une semaine chez la même espèce. Parallèlement, (**Kreuter et al, 2005**) ont démontré sur des rats, que des nanoparticules magnétiques étaient capables de délivrer des substances médicamenteuses directement dans des tumeurs cérébrales.

3.1.2. Toxicité chez les Procaryotes

Il est nécessaire de comprendre le mécanisme d'action des nanoparticules d'oxyde de fer contre les bactéries, mais à ce jour. Quelques études ont suggéré que la cause première de la fonction antibactérienne peut être de la perturbation de l'activité de la membrane cellulaire.

Une autre possibilité pourrait être l'induction d'espèces réactives de l'oxygène intercellulaires, notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un agent oxydant fort nocif pour les cellules bactériennes.

Des travaux ont montré une forte affinité entre les nanoparticules et la membrane externe d'*E. Coli*. L'adsorption des nanoparticules est certainement contrôlée par des attractions électro statistiques. Mais le résultat le plus intéressant concerne l'étroite relation existant entre la sensibilité à l'oxydation des nanoparticules à base de fer et leur cytotoxicité :

- ✓ **Les nano-maghémites (Fe III– forme oxydée):** sont chimiquement stables au contact d'*E.coli* et n'induisent aucune toxicité significative.
- ✓ **Les nano-magnétites (Fe II/Fe III– forme intermédiaire):** leur surface s'oxyde en maghémite au contact d'*E.coli* via une désorption du Fe II de leur structure. Une cytotoxicité apparaît à partir de 0.7 g/L de Fe_3O_4 .
- ✓ **Les Nzvi (Fe^o- forme réduite) :** elles sont entièrement oxydées en lépidocrocite (Fe III) et magnétite (Fe II /Fe III) dans l'eau et au contact d'*E. coli*. Dès l'introduction de 0.07 g/L de Fe^o 70% de cytotoxicité apparaît.

3.1.3. Toxicité chez les végétaux

Dans un deuxième temps, les études se sont plus focalisées sur les effets des nanomatériaux sur le métabolisme des végétaux.

Le principal critère étudié a été la photosynthèse (**Racuciu & Creanga, 2007; Racuciu et al, 2009; Lin et al, 2009**). Par exemple, des études menées sur divers végétaux (maïs, pavot, chélidoine, courgette) ont montré une diminution de la teneur en chlorophylle A et B après une exposition à des NPs de fer (Fe_2O_3 , Fe_3O_4) (**Racuciu & Creanga, 2007; Cotae & Creanga, 2005**).

D'autres études ont mis en évidence une perturbation du réseau de microtubules chez *Arabidopsisthaliana* après exposition à des NPs de TiO_2 (**Wang et al, 2011**) ou à des fullerènes (**Liu et al, 2010**). Ou encore une étude a montré que les grains de pollen exposés à des NPs de Pd (**Speranza et al, 2010**). Lorsque des citrouilles cultivées sur du sable sont exposées à des NPs de Fe_2O_3 (20nm), l'accumulation de NPs dans les plantules est faible mais significative.

4. Nanoparticule de silice

Les nanoparticules de silice constituent une catégorie particulièrement intéressante, principalement du fait de la biocompatibilité de ce matériau et de sa grande stabilité physico-chimique. Les techniques de synthèse actuelles permettent de contrôler efficacement la taille des nanoparticules de silice dans une grande gamme de tailles. Ce point est particulièrement important pour les applications *in vivo* qui nécessitent des objets de taille similaire aux biomolécules usuelles, c'est-à-dire généralement en dessous de 50 nm (**Knopp, D et al, 2009**).

Donc les nanoparticules de silice jouent un rôle essentiellement dans le diagnostic de maladies par des techniques de bio-imagerie *in vitro et in vivo*, qui permettent de détecter, et de photographier les cellules, tumeurs ou autres tissus biologiques. Les nanoparticules ont aussi des applications thérapeutiques, comme la vectorisation de principes actifs qui permet de diminuer les doses et les possibles effets secondaires, ou par l'action directe des nanoparticules telle que la thérapie ou la photochimiothérapie (**Wang, F et al, 2009**).

4.1. Toxicité de silice

Les particules de silice peuvent par exemple endommager la membrane par interaction des groupements silanol avec les ammoniums présents dans la membrane (**Depasse, 1977**), induire un stress oxydant, ou endommager l'ADN.

De nombreuses études indiquent qu'une exposition à des particules de silice induit un stress oxydant dans les cellules, résultat de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène et de la peroxydation des lipides de la membrane cellulaire (**Akhtar, 2010; Liu, 2010; Wang, 2009; Lin, 2006**). La production d'espèces réactives de l'oxygène est un processus qui se produit en milieu biologique par exemple par réduction enzymatique de l'oxygène. Ces réactions sont normalement contrôlées par une cascade de signaux et par des enzymes antioxydantes qui vont neutraliser l'excès d'espèces réactives. L'interaction des cellules avec des nanoparticules peut provoquer la formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène. Ceci peut se faire via l'interaction, au niveau de la membrane plasmique, des nanoparticules avec des enzymes comme les NADPH oxydases qui interviennent dans le stress oxydant. Les nanoparticules peuvent aussi interagir avec des organites source d'espèces réactives de l'oxygène comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique (**Unfried, 2007**). Enfin les nanoparticules peuvent avoir un effet néfaste sur le système antioxydant présent dans les cellules, en diminuant par exemple le niveau intracellulaire de glutathion, qui joue un rôle essentiel dans les mécanismes redox impliqués dans les mécanismes de défense contre le stress oxydatif.

Cet effet est progressif et dépend de la taille des particules ainsi que de la concentration à laquelle sont exposées les cellules. L'étude menée par Akhtar *et al.* Sur la toxicité de nanoparticules de silice dans des cellules épithéliales pulmonaires montre que, lorsqu'elles sont exposées aux nanoparticules, ces cellules conservent leur niveau de glutathion mais qu'il y a formation d'espèces réactives de l'oxygène (Akhtar, 2010). Cependant, il faut noter que les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène produits restent faibles comparés à d'autres matériaux connus pour induire un fort stress oxydant. Ces résultats peuvent varier puisqu'une autre équipe a mis en évidence la diminution du niveau de glutathion dans des cellules du rein suite à leur exposition à des nanoparticules de silice de 20 et 50 nm de diamètre à différentes concentrations. Par ailleurs, des niveaux assez élevés d'espèces réactives de l'oxygène ont été mesurés dans ces cellules après exposition aux nanoparticules ainsi qu'une peroxydation lipidique au niveau de la membrane (Wang, 2009)

5. Choix du modèle biologique: l'escargot terrestre *Helix aspersa*

Plus récemment on s'est intéressé en milieu terrestre à la faune du sol et notamment aux escargots (mollusques, Gastéropodes, Pulmonés), ils sont reconnus comme des indicateurs écologiques pertinents (Berger et Dallinger, 1993; Cortet *et al.*, 1999), car ils représentent une bio masse significative au sein de la communauté des invertébrées des sols (Dallinger *et al.*, 2001). Ils occupent une situation privilégiée à l'interface sol-plante-atmosphère, et ils intègrent des sources et voies de contaminations multiples (Barker, 2001).

Ils possèdent des capacités de bioaccumulation importantes pour de nombreux polluants métalliques (Viard *et al.*, 2004), et organiques. Ils présentent des réponses physiologiques (inhibition de croissance et de reproduction, mortalité) (Notten *et al.*, 2006) et biochimiques (Regoli *et al.*, 2006) quand ils sont exposés aux contaminants. Ils constituent un élément de réseaux trophique qui contribue au transfert des polluants du sol et /ou des plantes aux prédateurs (Beeby, 1985; Laskowski et Hopkin, 1995; Scheifler *et al.*, 2002). Le choix préférentiel de cette espèce est principalement lié à sa distribution mondiale, traduisant ses capacités d'adaptation à des biotopes des sols et des climats variés et à sa facilité d'élevage (Gomot, 1997).

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de toxicologie de département de biologie Université de Tébéssa, sur 180 escargots *Helix aspersa*

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

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

Règne: Animalia

Embranchement: Mollusca

Classe: Gasteropoda

Ordre: Stylommatophora

Famille: *Helicidae*

Genre: *Helix*

Espèce: *aspersa*

Sous-espèce: *aspersa* (**Barker, 2001**)

Les escargots du genre *Helix* appartiennent à la famille des Hélicidés qui comprend de nombreuses espèces européennes et méditerranéennes à l'exception notable de *Helix aspersa* qui a également colonisé les régions atlantiques et a été introduit hors de l'Europe.

L'espèce *Helix aspersa* présente plusieurs sous-espèces dont les principales sont *H. aspersa aspersa*, *Helix aspersa elata* et *Helix aspersa maxima* (**Bonnet et Vrillo, 1990**).

1.1.1. Morphologie d'*Helix aspersa*.

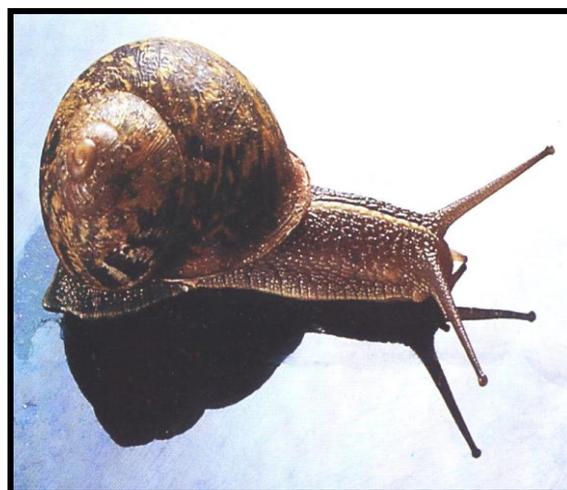


Figure 08: Le petit gris (*Helix aspersa*) (**Daguzan, 1981**)

1.1.2. Anatomie de l'escargot

Le corps d'un escargot consiste en un pied unique, une tête et une masse viscérale enroulée placée dans la coquille.

Le mouvement a lieu grâce à l'expansion et l'extraction de muscles dans le pied, des glandes de mucus sur le reste du corps protégeant l'escargot contre la perte d'eau. Deux paires de tentacules placées sur la tête. La paire supérieure porte les yeux. La coquille est sécrétée par un épais pli de peau, appelé le manteau, cette dernière est reliée au corps par un puissant muscle qui est attaché au columella, la contraction de ce muscle permet à l'escargot de se retirer dans sa coquille. À l'intérieur de la coquille, se trouve la cavité du manteau, qui contient le cœur, le rein et le poumon, la figure (09) montre l'anatomie d'*Helix aspersa*.

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 - 12. Glande salivaire
13. Orifice génital - 14. Pénis - 15. Vagin
16. Glande muqueuse - 17. oviduc - 18. Sac de dards
19. Pied - 20. Estomac - 21. Rein
22. Manteau - 23. Cœur - 24. Canal déférent

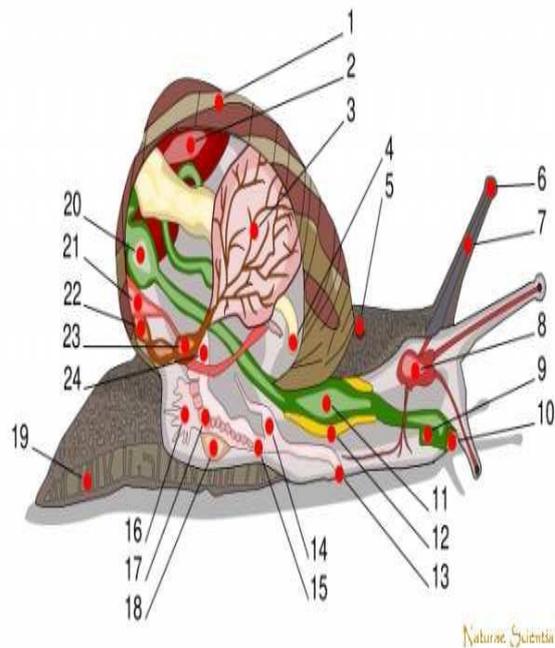


Figure 09 : Anatomie de l'escargot (Daguzan, 1981)

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

1.1.5. Estivation et hibernation

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

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 (**Gomot, 1997 b**):

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

En général, la croissance naturelle jusqu'au stade adulte s'étale sur deux ans si bien que les individus sont le plus souvent considérés comme sexuellement matures à partir du deuxième ou troisième été suivant leur naissance (**Chevallier, 1992**). Cette croissance se fait par 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 7ans (**Gomot et 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 *H. aspersa aspersa*. La durée entre l'accouplement et la ponte varie en fonction des conditions du milieu. En conditions optimales, elle est d'une dizaine de jours mais ce délai peut atteindre un voire deux mois suivant les conditions d'environnement. (**Daguzan, 1981; Chevallier, 1982**). Pour pondre, l'escargot creuse une cavité de quelques centimètres de profondeur dans le sol, y dépose ses œufs puis rebouche le "nid de ponte". Le nombre moyen d'œufs par ponte varie de 80 à 130 pour des individus de différentes origines (**Madec, 1983**).

1.2. Matériel chimique

Les matériels chimiques utilisé dans cette expérimentation est une préparation commerciale des nanoparticules à base d'oxyde de fer (Fe_2O_3) (figure 10) et la silice (figure11)



Figure 10: Les nanoparticules manufacturées d'oxyde de fer en poudre (**Gomot, 1997**).



Figure 11: Les nanoparticules de silice en poudre (Coeurdassier *et al*, 2001).

2. Méthodes

2.1. Conditions d'élevage

Les escargots utilisés dans notre expérimentation sont des juvéniles de poids moyen de $(0,84 \pm 0,50\text{g})$, collecté dans la région de Guelma (Nord - Est Algérien). Les escargots sont élevés dans des conditions d'environnement optimales suivantes: photopériode de 18h de lumière/24h, température $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Ils sont répartis dans des boîtes de plastiques transparents, recouvertes avec des tulles maintenues par des élastiques (pour l'oxygénation), et chaque boîte contient une éponge humide pour maintenir d'humidité, l'alimentation (farine de blé) est fournie dans des boîtes de pétrie. Les boîtes sont nettoyées régulièrement tous les trois jours (Gomot, 1997; Coeurdassier *et al*, 2001).

2.2. Mode de traitement

Le traitement des animaux a été effectué par addition des concentrations croissantes des nanoparticules d'oxyde de fer, de silice et de leurs mixtures dans l'alimentation. Nous avons retenu 5 concentrations: 500; 1000; 5000; 10000; 15000 $\mu\text{g/g}$ d'alimentation et un milieu témoin. Les escargots sont répartis en 18 lots de 10 escargots pour chaque traitement; ils sont individualisés en fonction de la matrice d'exposition à tester. On a retenue un traitement de 4 semaines par le Fe_2O_3 , par la SiO_2 et par la mixture ($\text{Fe}_2\text{O}_3+\text{SiO}_2$) (figure 11) (Coeurdassier, M, 2001). Dans tous les cas, la nourriture apportée est renouvelée, qu'elle soit contaminée ou non, tous les trois jours au moment du nettoyage des boîtes d'élevage. Ce nettoyage est fait, autant que possible, à heure fixe. Il comprend un lavage des parois des boîtes à l'eau distillée, un changement de l'éponge absorbante au fond des boîtes ou un ramassage des fèces des

escargots déposés sur le substrat. Ensuite, l'ensemble des récipients d'essai est humidifié à l'eau distillée.



Figure 12: Exposition de l'escargot *Helix aspersa* à la nourriture contaminée.

2.3. Préparation et sacrifice des animaux

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 artificielle, pour éviter la ré-ingestion des fèces. Les animaux sont ensuite sacrifiés par congélation à -20°C puis disséqués. Les coquilles sont enlevées, l'hépatopancréas été excisés, lavées avec l'eau physiologique (Coeurdassier. M., 2001).



Figure 13: Dissection et prélèvement des organes (l'hépatopancréas).

3. Paramètres étudiés

3.1. Paramètres physiologiques

Trois critères peuvent être utilisés:

- ✓ **Le poids frais de l'escargot (tissus mous+coquille):** Les escargots sont pesés individuellement avant le traitement et repartis en 18 lots de poids moyen de $0,85 \pm 0,50$ g. Le suivi de poids durant notre traitement se fait à l'aide d'une balance de précision chaque semaine (pendant 4 semaines). Ce critère est recommandé pour évaluer de façon hebdomadaire les effets de Fe_2O_3 , SiO_2 et de la mixture sur des escargots adultes de *H.aspersa*. Les pesées sont toujours réalisées avant le nettoyage de l'enceinte d'essai (**Gomot, 1997a**).
- ✓ **Le diamètre de coquille :** est mesuré avec un pied à coulisse (avec une précision de 10^{-1} mm). La mesure doit se faire délicatement pour éviter d'endommager le bord des coquilles des escargots, très fragile chez les animaux en croissance. Comme la masse fraîche, les mesures du diamètre de coquille permettent d'évaluer la croissance des animaux à tout moment. Ce paramètre permet de suivre la croissance des individus depuis le stade infantile jusqu'au stade adulte (**Chevallier, 1992**) (figure 14).

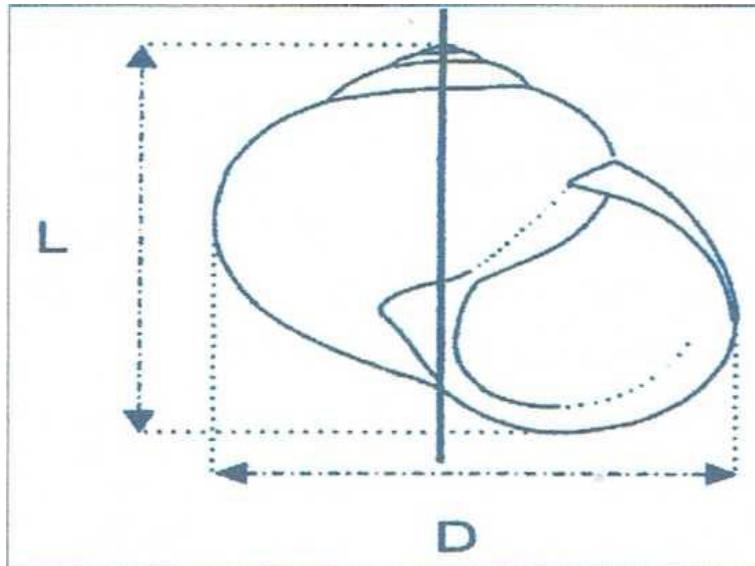


Figure 14: Mesure des deux diamètres D et L de *Helix aspersa* (**Coeurdassier, 2001**)

- ✓ Le **poids frais de la coquille**, des **tissus mous** et le **poids frais de glande digestive** peut être seulement effectué après le sacrifice des animaux à la fin de chaque période de traitement à l'aide d'une balance de précision (**Coeurdassier, 2001**).

3.2. Paramètres biochimiques

3.2.1. Dosage des métabolites

3.2.1.1. Extraction des métabolites

L'extraction des différents métabolites contenus dans l'hépatopancréas de l'escargot *Helix aspersa* prélevé après 4 semaines de traitement et conservés dans 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20%, a été réalisée selon le procédé de **Shibko et al.,(1966)**. Après un broyage et centrifugation (5000tours/mn pendant 10mn), le surnageant est récupéré et servira au dosage des glucides. Au culot I, on ajoute 1 ml d'un mélange éther/ chloroforme (V/V) et une deuxième centrifugation (5000 tours/mn pendant 10 mn) permet de récupérer le surnageant II qui permettra le dosage des lipides; le culot II sera ensuite repris dans 1 ml de NaOH (0,1N) pour l'estimation des protéines totales (Figure 15).

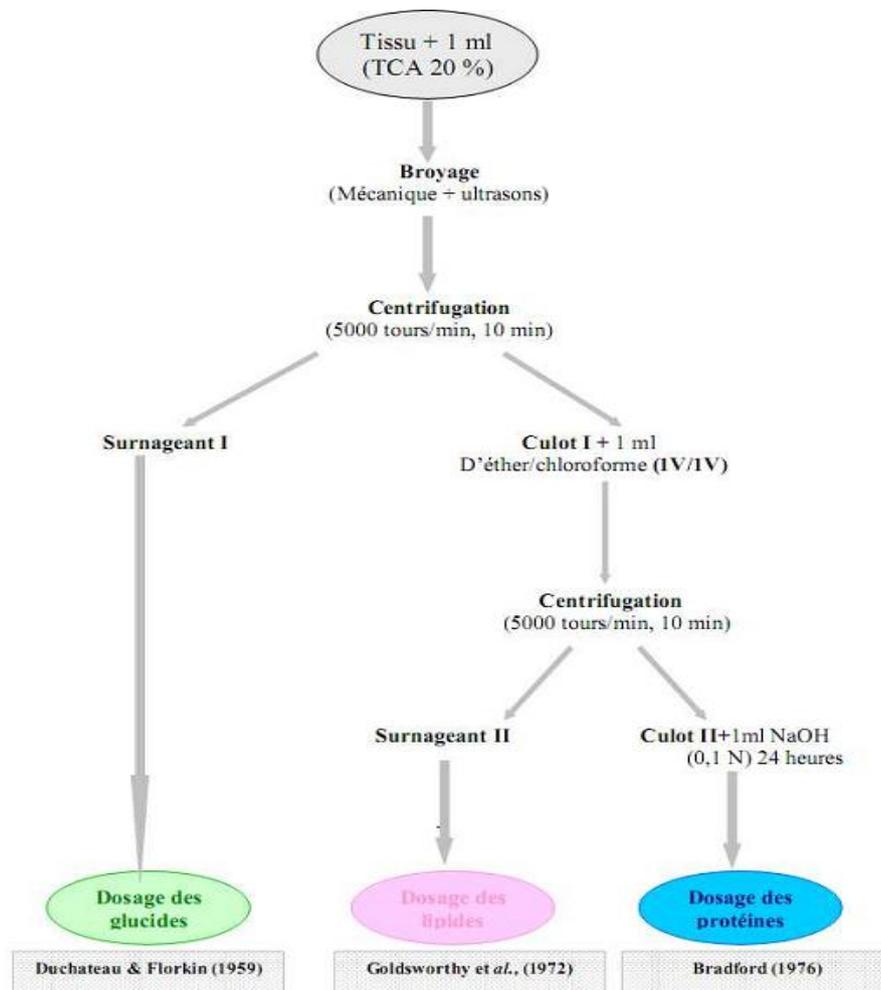


Figure 15: Principales étapes d'extraction des métabolites: protéines, glucides et lipides (Shibko et al, 1966).

3.2.1.2. Dosage des protéines

Les protéines contenues dans les gonades ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de coomassie G 250 (BBC) comme réactif (100mg de BBC+50ml d'éthanol. Agitation pendant deux heures + 100ml d'acide orthophosphorique + H₂O distillée q.s.p. 1000ml) et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard.

Le dosage des protéines a été effectué dans une fraction aliquote (100µl). Les absorbances ont été obtenues grâce à un spectrophotomètre et la lecture a été réalisée à une longueur d'onde de 595nm contre un blanc de gamme. (Tableau 01).

Tableau 01: Dosage des protéines: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
B.S.A (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

3.2.1.3. Dosage des glucides

Le dosage des glucides a été réalisé selon **Duchateau et Florkin (1959)**. Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150mg d'anthrone, 75ml d'acide sulfurique et 25ml d'eau distillée) et le glucose comme standard. La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution mère de glucose (1g/l).

Après l'addition du réactif, un chauffage au bain marie à 80°C pendant 10 mn permet l'obtention d'une coloration verte. Le dosage des glucides à été effectué dans une fraction aliquote (100µl).

Les absorbances ont été obtenues grâce à un spectrophotomètre et la lecture a été réalisée à une longueur d'onde de 620 nm contre un blanc de gamme. (Tableau 02).

Tableau 02: Dosage des glucides: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

3.2.1.4. Dosage des lipides

La concentration des lipides totaux a été estimée selon **Goldsworthy *et al.*, (1972)** utilisant le réactif sulfophosphanillinique (0,38 g de vanilline, 55ml d'eau distillée et 195ml d'acide orthophosphorique à 85%). La solution mère des lipides est préparée en utilisant l'huile de table (Cevital) selon la procédure suivante: 25mg d'huile de table pesés dans un tube eppendorf; cette quantité est ensuite reprise dans 10ml du mélange (éther / chloroforme) (1V/1V) (Tableau 03).

Tableau 03 : Dosage des lipides: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (μ l)	0	20	40	60	80	100
Solvant Ether/Chloroforme (μ l)	100	80	60	40	20	0
Vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Après évaporation des prises aliquotes de 100 μ l de surnageant II dans un bain à sec à 40°C, on additionne 1ml d'acide sulfurique concentré (96%), les tubes fermés sont agités et chauffés dans un bain à sec à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, on prélève 200 μ l de chaque tube auxquels on ajoute 2,5 ml de réactif sulfophosphanillinique et on agite. Après 30 minutes à l'obscurité, le complexe se colore en rose. La densité optique est lue dans un spectrophotomètre (Jenway 6300) à une longueur d'onde de 530 nm.

4. Etude statistique

L'analyse statistique des données est effectuée par le test de student qui sert à comparer entre deux échantillons (Témoin et traite). Ce test est réalisé à l'aide d'un logiciel d'analyse des données: Minitab (Version 13.31).

Résultats

1. Effets des nanoparticules sur les biomarqueurs physiologiques

1.1. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le poids moyen des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps

La figure (16) met en évidence l'évolution du poids moyen des escargots juvéniles sous l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer en fonction du temps. Nous remarquons que chez les témoins et les traités par les concentrations (500 $\mu\text{g/g}$, 1000 $\mu\text{g/g}$), le poids moyen tend à augmenter de manière non significative ($p>0.05$) durant les quatre semaines de traitement. En revanche, chez les traités par les concentrations (5000 $\mu\text{g/g}$, 10000 $\mu\text{g/g}$, 15000 $\mu\text{g/g}$), une diminution non significative ($p>0.05$) est mise en évidence dès la troisième semaine de traitement.

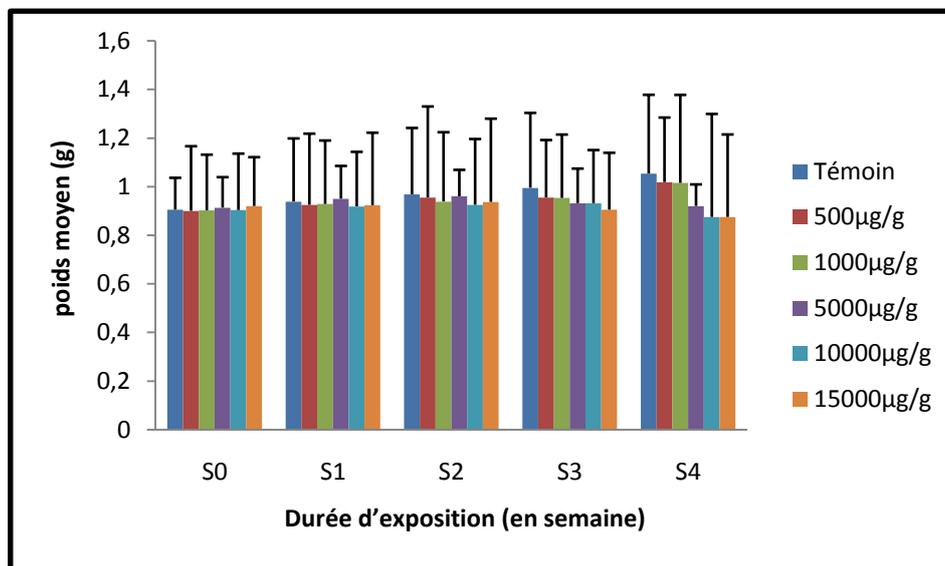


Figure 16 : Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'évolution du poids moyen des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

Aucune différence significative ($P>0,05$)

D'un autre côté le traitement des escargots par les nanoparticules d'oxyde de silice (figure 17) montre une augmentation non significative du poids moyen des escargots témoins et traités par les différentes concentrations durant les trois semaines de traitement. A la quatrième semaine d'exposition, nous constatons une augmentation non significative du poids moyen touche les escargots témoins et traités par les concentrations (500 $\mu\text{g/g}$, 1000 $\mu\text{g/g}$), une diminution non significative du poids moyen chez les escargots traités par les concentrations (5000 $\mu\text{g/g}$, 10000 $\mu\text{g/g}$) qui devient significative à la concentration (15000 $\mu\text{g/g}$) par rapport aux témoins.

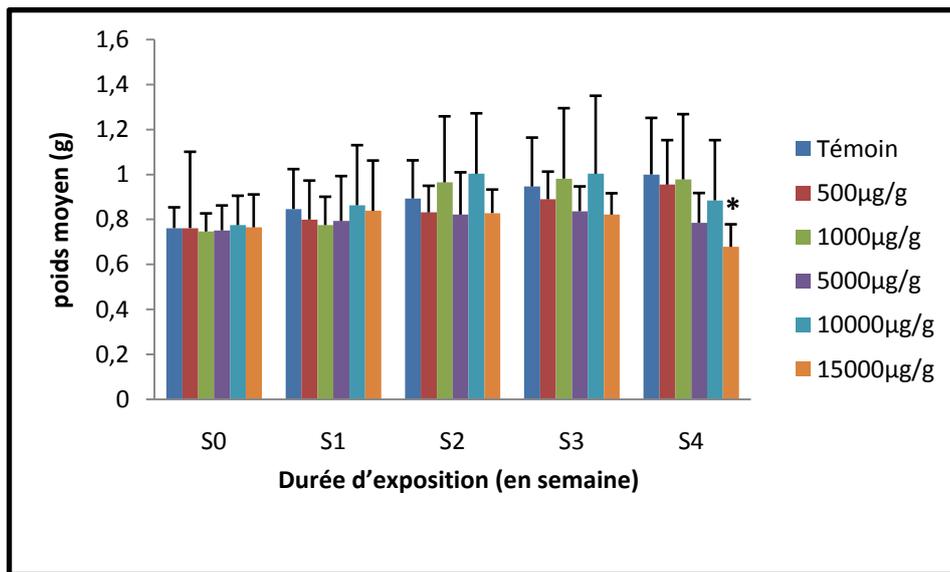


Figure 17: Effet des nanoparticules de silice sur l'évolution du poids moyen des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

Aucune différence significative ($P > 0,05$)

Enfin, le poids moyen des escargots traités aux mixtures (Fig. 18) montre une diminution non significative ($p > 0,05$) à partir de la troisième semaine de traitement chez les traités par les concentrations (1000µg/g, 5000µg/g, 10000µg/g, 15000µg/g) par rapport aux escargots témoins.

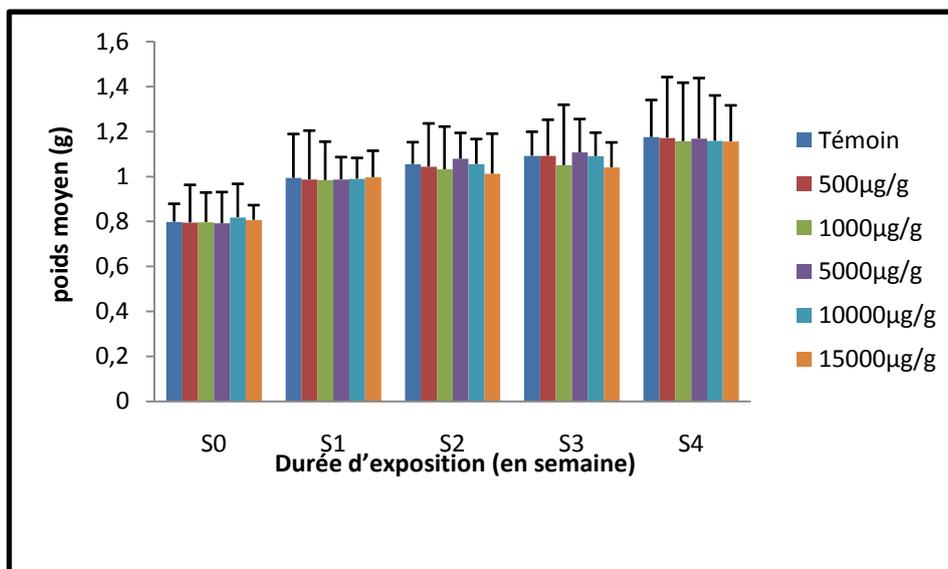


Figure 18: Effet des nanoparticules de mixture (oxyde de silice + oxyde de fer) sur l'évolution du poids moyen de *Helix aspersa* en fonction du temps.

Aucune différence significative ($P > 0,05$)

1.2. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots *Helix aspersa*

1.2.1. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer

La figure (19) met en évidence l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps. Chez les traités par les différentes concentrations, nous constatons une diminution non significative ($p > 0.05$) du diamètre D de la coquille dès la première semaine d'exposition, cette diminution devient significative ($p \leq 0.05$) à la troisième et à la quatrième semaine chez les traités par la concentration (15000 $\mu\text{g/g}$) par rapport aux témoins et hautement significative ($p \leq 0.01$) chez les traités par la concentration (10000 $\mu\text{g/g}$) à la quatrième semaine de traitement.

1.2.2. Effet des nanoparticules de l'oxyde de silice

La figure (20) illustre l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots *Helix aspersa* en présence des nanoparticules d'oxyde de silice. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas une différence significative ($p > 0.05$) entre le diamètre D des témoins et traités par différentes concentrations dès la première semaine.

1.2.3. Effet de la mixture des nanoparticules d'oxyde de fer et de silice

L'évolution du diamètre D de la coquille des escargots traités aux mixtures (Figure 21) montre une variation non significative ($p > 0.05$) pour les traités par les différentes concentrations par rapport à celui des escargots témoins pendant 28 jours de traitement.

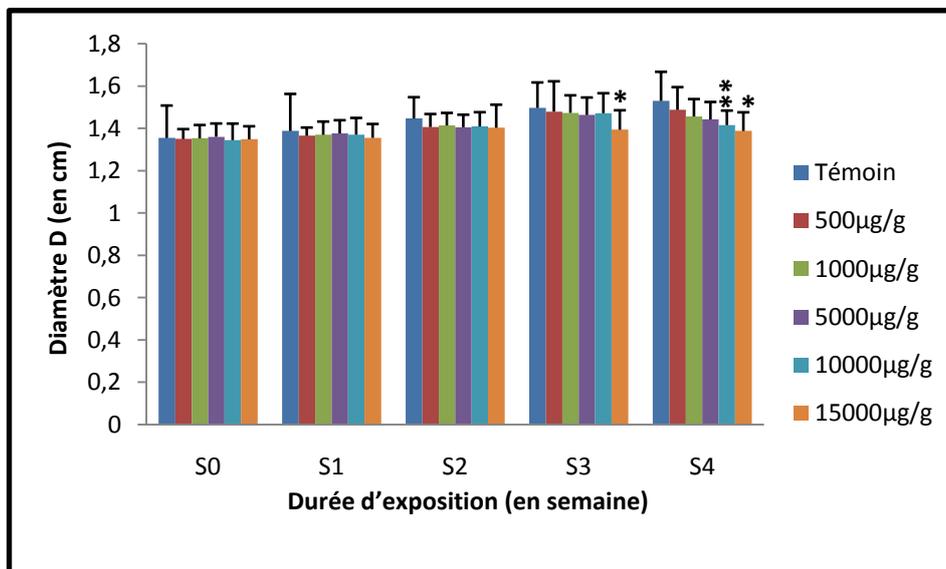


Figure 19: Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

*différence significative ($P < 0,05$) ** différence hautement significative ($p < 0,01$)

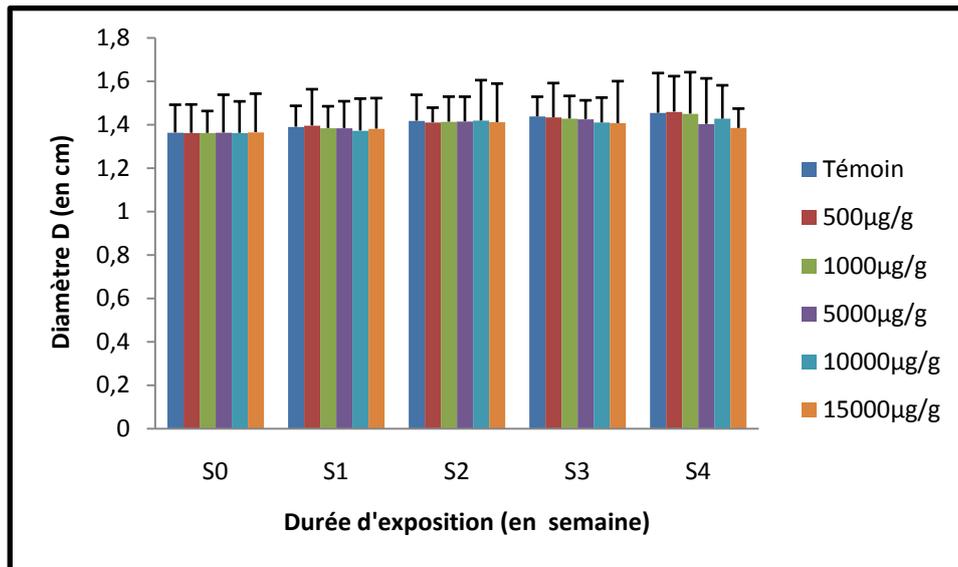


Figure 20: Effet des nanoparticules d'oxyde de silice sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

Aucune différence significative ($P > 0,05$)

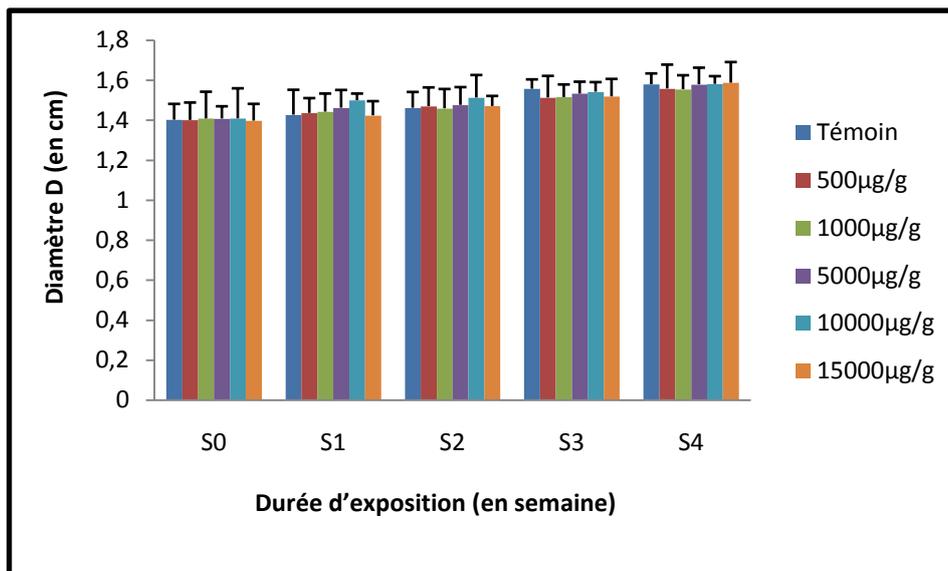


Figure 21: Effet des nanoparticules de mixture (oxyde de fer + oxyde de silice) sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

Aucune différence significative ($p > 0,05$)

1.3. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots *Helix aspersa*

Les effets des nanoparticules d'oxyde de fer, de la silice et de leurs mixtures sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps (figure 22, 23, 24) montre une diminution significative ($p \leq 0,05$) chez les traités par les

nanoparticules d'oxyde de fer aux concentrations (5000µg/g, 10000µg/g, 15000µg/g) durant la quatrième semaine de traitement par rapport aux témoins.

Par contre chez les traités par l'oxyde de silice et la mixture nous notons une différence non significative ($p>0.05$) entre le diamètre L des témoins et des traités par les différentes concentrations.

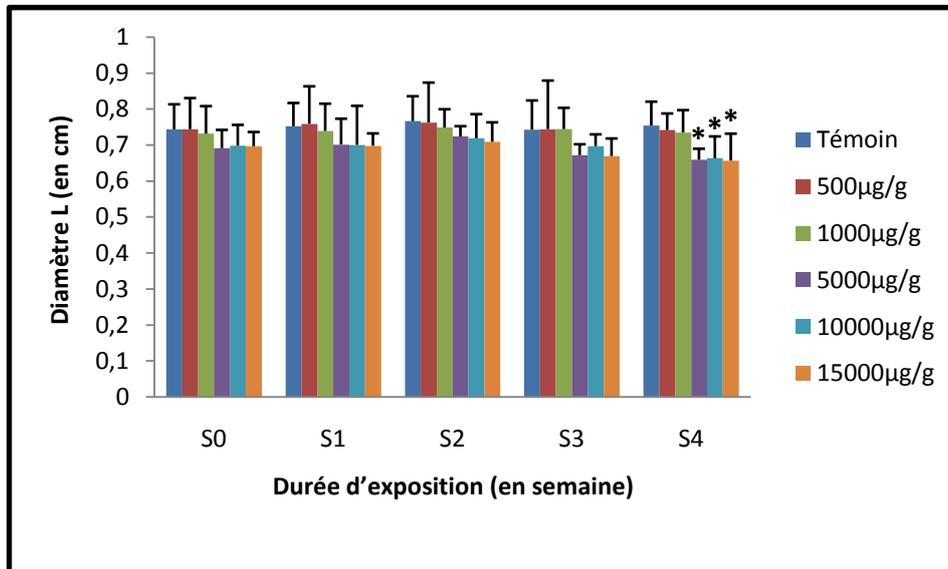


Figure 22: Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

*différence significative ($P<0,05$).

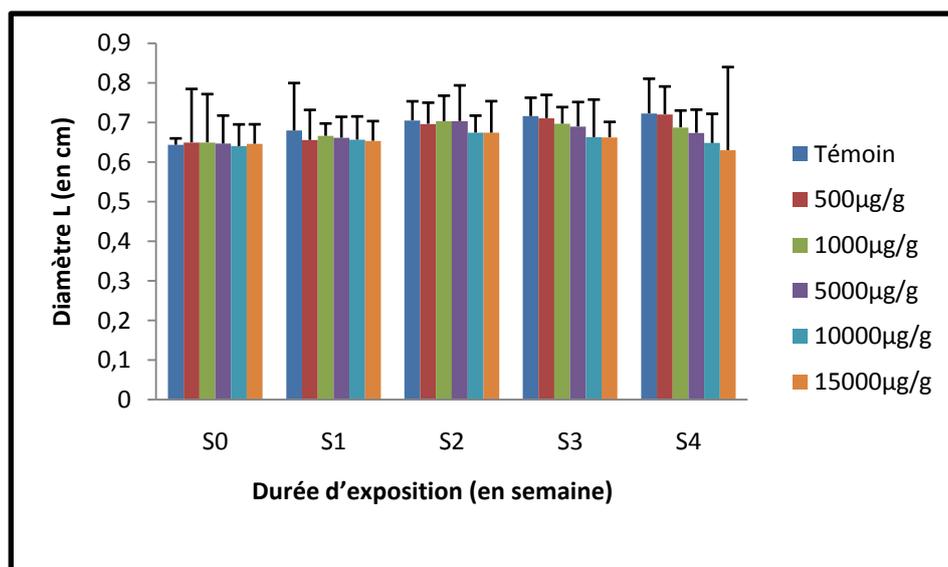


Figure 23: Effet des nanoparticules de la silice sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps

Aucune différence significative ($P>0,05$).

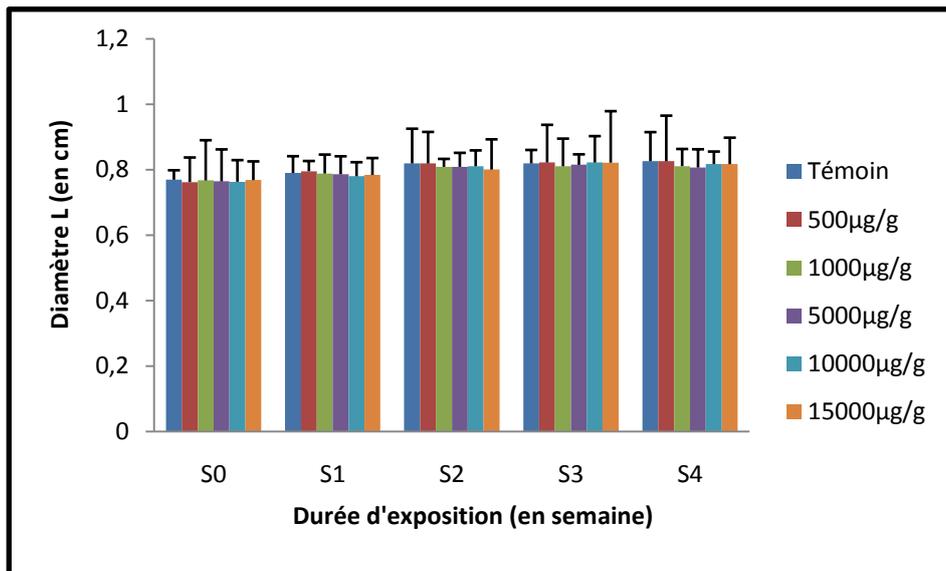


Figure 24: Effet des nanoparticules de mixture (oxyde de fer + oxyde de silice) sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps. Aucune différence significative ($P > 0,05$).

1.4. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le poids des tissus mous des escargots *Helix aspersa*

La figure (25) illustre les effets des nanoparticules d'oxyde de fer, d'oxyde de silice et de leurs mixtures sur le poids des tissus mous des escargots *Helix aspersa*. Nous constatons une diminution non significative ($p > 0,05$) chez les traités par les concentrations (500µg/g, 1000 µg/g, 5000µg/g, 10000 µg/g) cette variation devient, significative ($p \leq 0,05$) à la concentration (15000 µg/g) chez les traités par les nanoparticules d'oxyde de silice par rapport à celui des escargots témoins.

Par contre, les effets de la mixture et des nanoparticules d'oxyde de fer sur le poids des tissus mous des escargots *Helix aspersa* varient de façon non significative ($p > 0,05$) chez les traités par différentes concentrations par rapport à celui des escargots témoins.

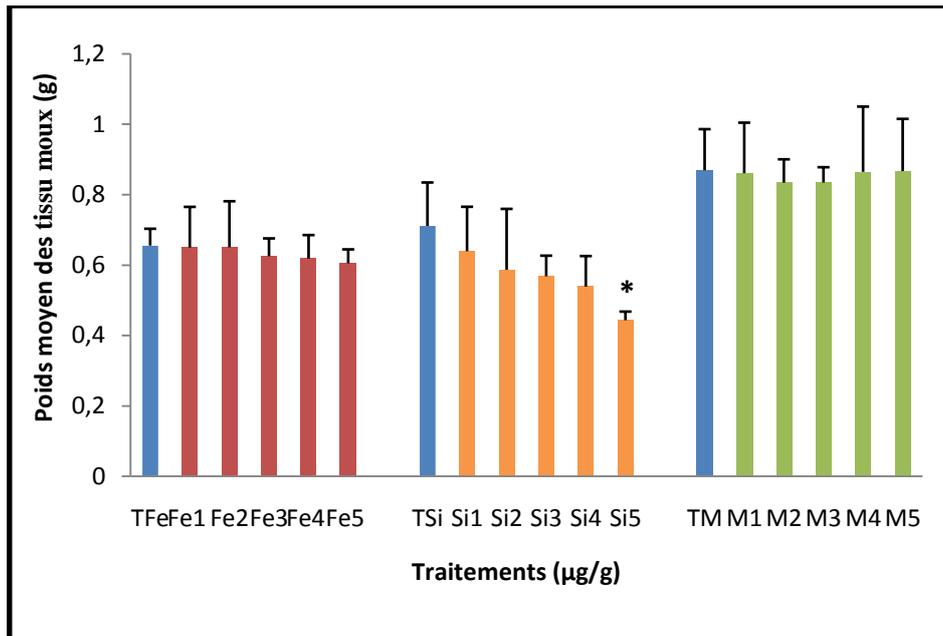


Figure 25: Effets des nanoparticules d'oxyde de fer, de silice et de leurs mixtures sur le poids des tissus mous des escargots *Helix aspersa* après 04 semaines de traitements.

* différence significative ($p < 0,05$).

1.5. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le poids de la coquille des escargots *Helix aspersa*

Le poids moyen de la coquille (Figure. 26) diminue d'une façon non significative chez les traités par les concentrations (500 µg/g, 1000 µg/g, 5000 µg/g et 10000 µg/g), cette diminution devient significative ($p \leq 0,05$) chez les traités par la concentration (15000 µg/g) des nanoparticules d'oxyde de silice par rapport aux témoins.

Par contre, l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer et de la mixture sur le poids moyen de la coquille varie d'une façon non significative ($p > 0,05$) chez les traités par différentes concentrations par rapport à celui des escargots témoins.

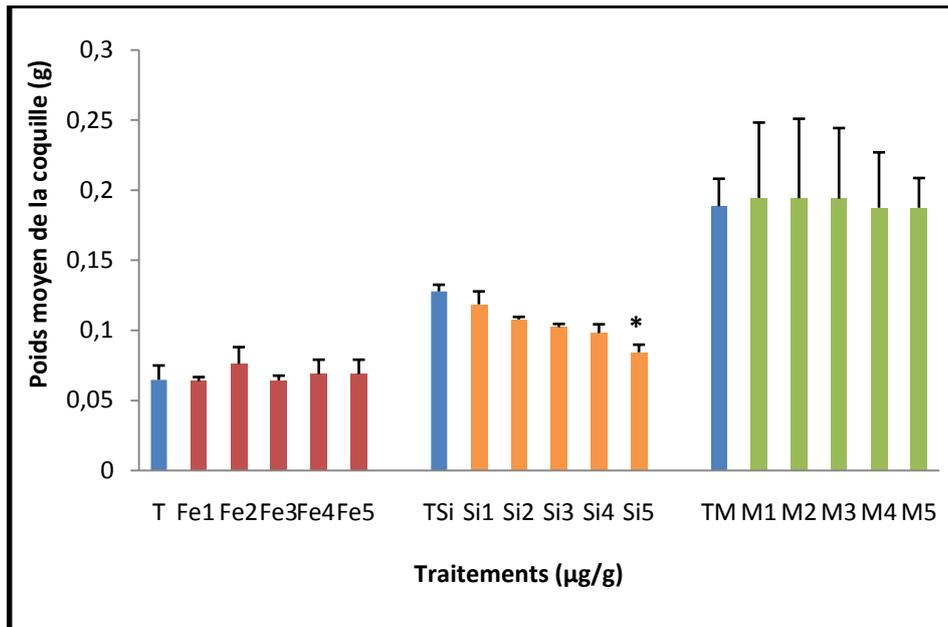


Figure 26: Effets des nanoparticules d’oxyde de fer, d’oxyde de silice et de leurs mixtures sur le poids de la coquille des escargots *Helix aspersa* après 04 semaines de traitements.

* différence significative ($p < 0,05$).

1.6. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le poids moyen de l’hépatopancréas des escargots *Helix aspersa*

La Figure (27) illustre les variations du poids moyen de l’hépatopancréas des escargots traités par les nanoparticules d’oxyde de fer, d’oxyde de silice et de leurs mixtures. Nous constatons qu’il n’y a pas une différence significative ($p > 0.05$) chez les traités par différentes concentrations par rapport à celui des escargots témoins.

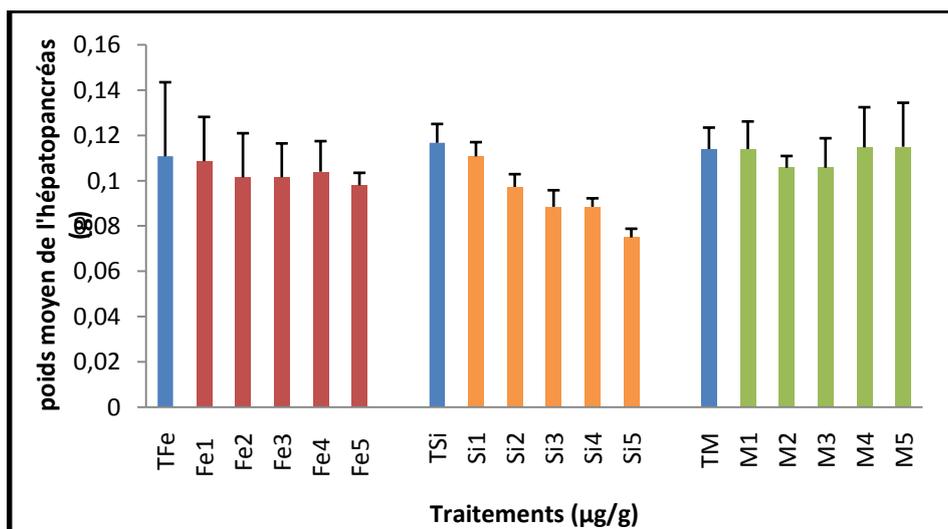


Figure 27: Effets des nanoparticules d’oxyde de fer, d’oxyde de silice et de leurs mixtures sur le poids moyen de l’hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* après 04 semaines de traitements. Aucune différence significative ($P > 0,05$).

2. Analyses biochimiques

2.1. Dosage des métabolites au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa*

Le taux des protéines, des glucides et des lipides a été déterminé dans l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*. La quantification de ces métabolites a été effectuée à partir d'une courbe de référence correspondant à chaque métabolite (Annexe 01, 02, 03, 04, 05 et 06).

2.1.1. Taux de protéines

L'équation de la droite de régression a été déterminée comme suit :

$$y = 0,03486 + 0,0120214x$$

Avec un coefficient de détermination: $R^2 = 98,94\%$

2.1.1.1. Effets sur le taux des protéines

- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de fer:** Les effets des nanoparticules d'oxyde de fer sur le contenu en protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) sont présentés dans la figure (28). Elle montre que la teneur en protéines augmente de façon non significative ($p > 0.05$) pour les concentrations $500\mu\text{g}/\text{g}$, $1000\mu\text{g}/\text{g}$, $5000\mu\text{g}/\text{g}$, $10000\mu\text{g}/\text{g}$. Cependant, ces teneurs augmentent de façon significative ($p \leq 0.05$) pour la concentration $15000\mu\text{g}/\text{g}$ dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.
- ✓ **Effet des nanoparticules de la silice:** Les effets des nanoparticules de la silice sur le contenu en protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) sont illustrés dans la figure (29). Elle montre que la teneur en protéines modifiée de façon non significative ($p > 0.05$) pour les concentrations ($500\mu\text{g}/\text{g}$, $1000\mu\text{g}/\text{g}$, $5000\mu\text{g}/\text{g}$, $10000\mu\text{g}/\text{g}$). Cependant, ces teneurs sont significativement ($p \leq 0.05$) diminuées pour la concentration $15000\mu\text{g}/\text{g}$ dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.
- ✓ **Effet de la mixture des nanoparticules d'oxyde de fer et de silice:** Les effets de la mixture sur le contenu en protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) sont illustrés dans la figure (30). Nous constatons une augmentation significative ($p \leq 0.05$) du taux des protéines à la concentration ($500\mu\text{g}/\text{g}$), Cependant ces valeurs deviennent très hautement significative ($p \leq 0.001$) à la concentration ($5000\mu\text{g}/\text{g}$) et hautement significative ($p \leq 0.01$) à la concentration ($15000\mu\text{g}/\text{g}$) dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.

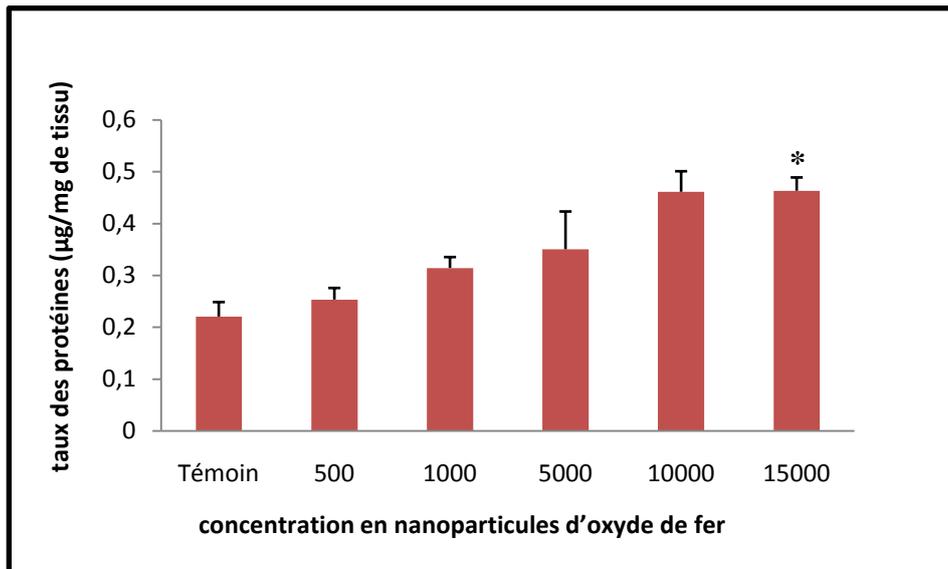


Figure 28: Variation du taux des protéines totales (µg/mg de tissu) dans l'hépatopancreas d'*Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de fer administrées par ingestion.

*différence significative (P< 0,05)

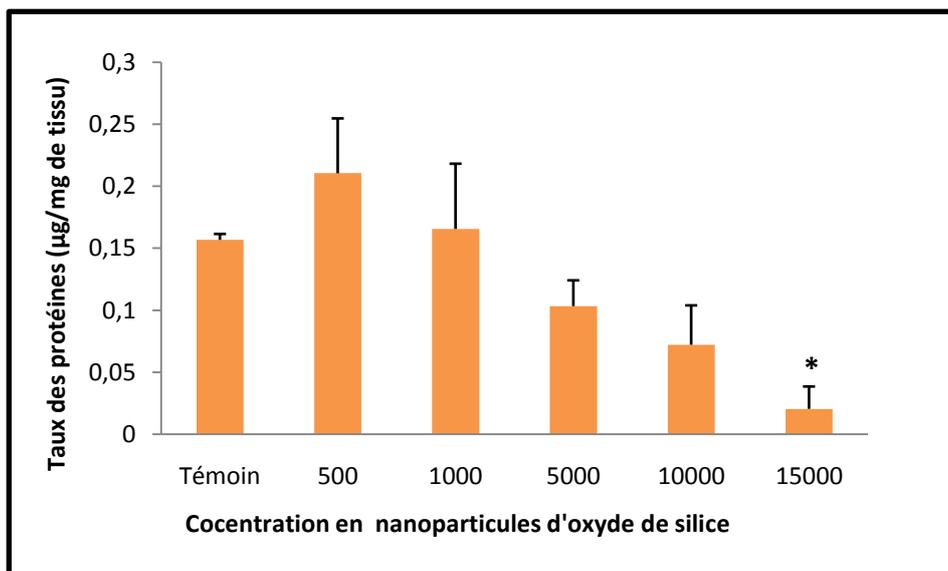


Figure 29: Variation du taux des protéines totales (µg/mg de tissu) dans l'hépatopancreas de *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules de silice administrées par ingestion.

*différence significative (P< 0,05)

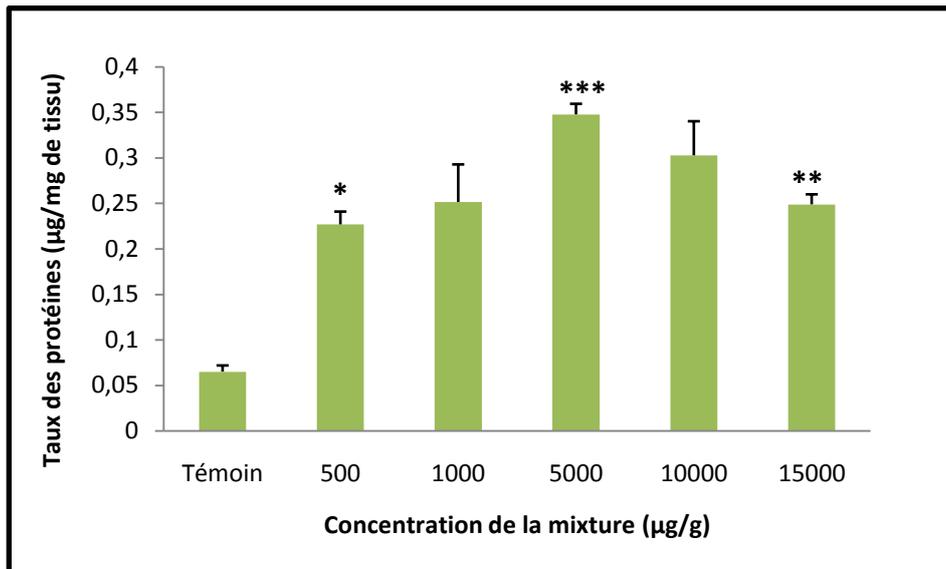


Figure 30: Variation du taux des protéines totales (µg/mg de tissu) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules de mixtures administrées par ingestion. *différence significative ($P < 0,05$) ** différence hautement significative ($p < 0,01$)
*** très hautement significative ($p < 0,001$).

2.1.2. Taux de glucides

L'équation de la droite de régression a été déterminée comme suit:

$$y = 0,0108286 + 0,0005614 x$$

Avec un coefficient de détermination : $R^2 = 85,5\%$

2.1.2.1. Effets des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas

- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de fer:** Les nanoparticules d'oxyde de fer appliqué par ingestion augmentent le taux des glucides de l'hépatopancréas de manière hautement significative ($p \leq 0,01$) (Figure 31) aux concentrations (500µg/g et 1000µg/g) et de façon significative à la concentration (5000µg/g). Ensuite, le taux en glucides diminue de façon significative ($p \leq 0,05$) à la concentration (10000µg/g) et de façon non significative ($p \geq 0,05$) à la concentration (15000µg/g) dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.
- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de silice:** Le traitement aux nanoparticules d'oxyde de silice diminue le contenu en glucides de façon non significative ($p > 0,05$) aux concentrations (500µg/g et 1000µg/g) (Fig. 32). Cependant, ces teneurs sont significativement ($p \leq 0,05$) diminuées aux concentrations (5000µg/g, 10000µg/g, 15000µg/g) dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.

- ✓ **Effet des mélanges des nanoparticules d'oxyde de fer et de silice:** La mixture appliquée par ingestion modifie de manière non significative ($p > 0.05$) le contenu en glucides totaux de l'hépatopancréas des escargots traités par différentes concentrations par rapport aux témoins (Fig. 33).

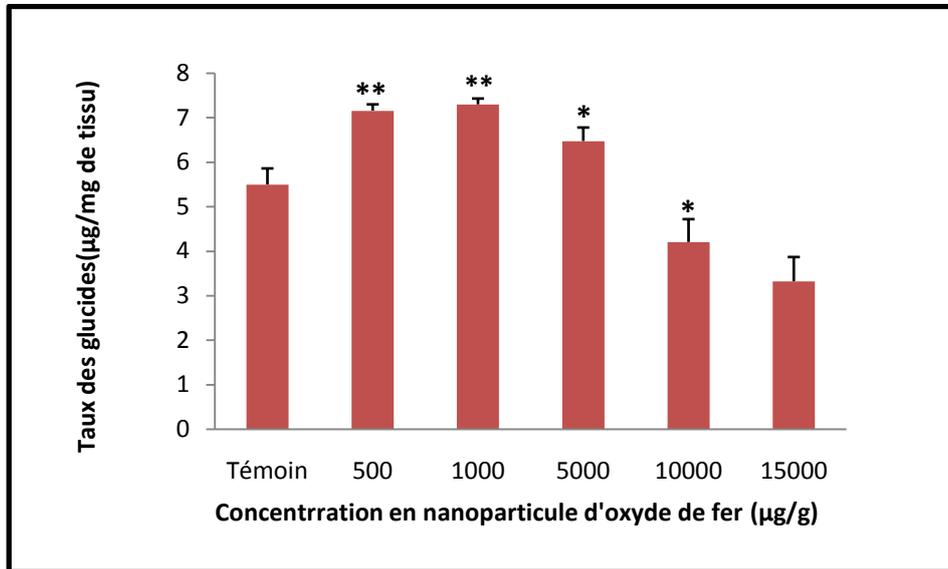


Figure 31: Variation du taux des glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de fer administrées par ingestion. *différence significative ($P < 0,05$) ** différence hautement significative ($p < 0,01$)

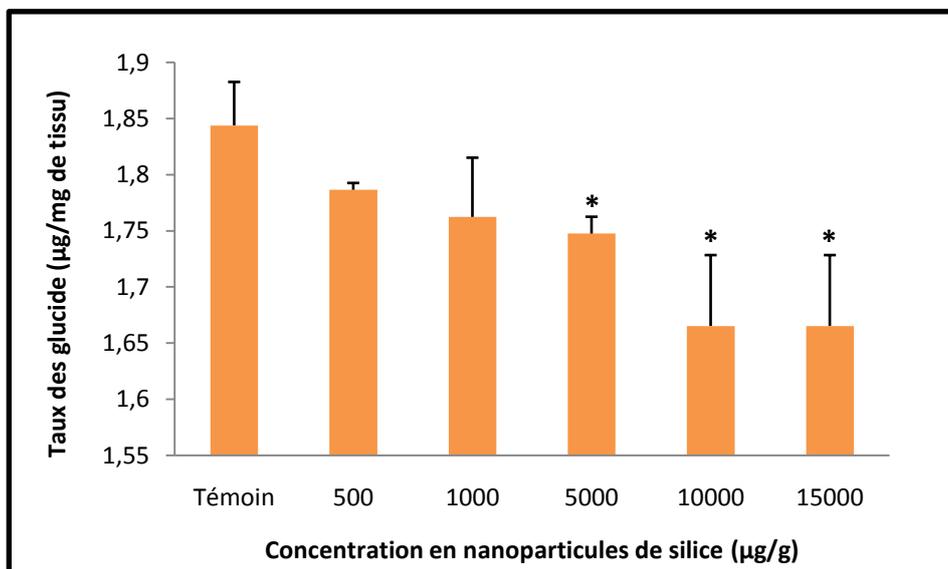


Figure 32: Variation du taux des glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de silice administrées par ingestion. *différence significative ($P < 0,05$).

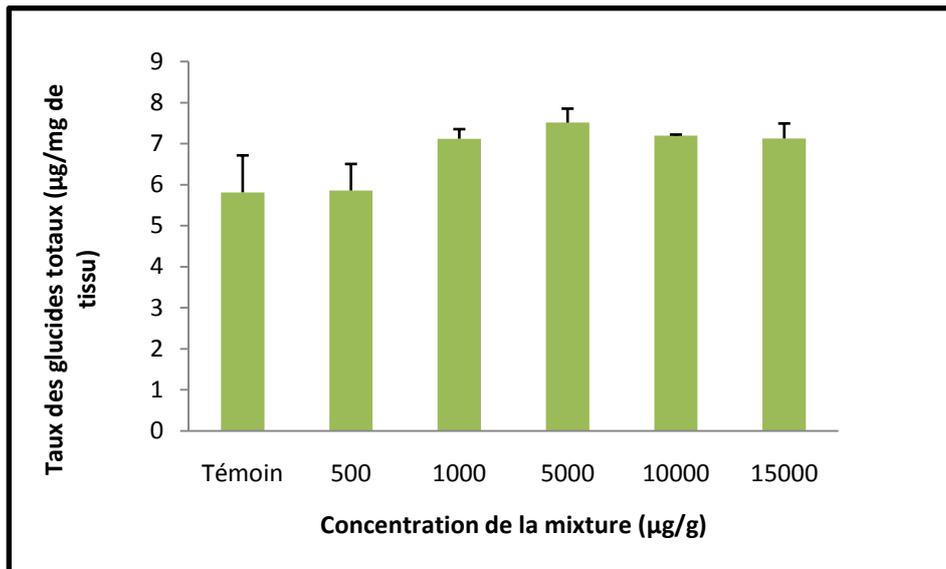


Figure 33: Variation du taux des glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules de la mixture d'oxyde de fer et de silice administrées par ingestion. Aucune différence significative ($P > 0,05$).

2.1.3. Taux des lipides

L'équation de la droite de régression a été déterminée comme suit:

$$y = 0,0066048 + 0,0010536x$$

Avec un coefficient de détermination : $R^2 = 88,9\%$

2.1.3.1. Effets des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le taux des lipides au niveau de l'hépatopancréas

- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de fer:** Les nanoparticules d'oxyde de fer réduit de façon non significative ($p > 0,05$) le contenu en lipides aux concentrations (500 $\mu\text{g}/\text{g}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{g}$, 5000 $\mu\text{g}/\text{g}$ et 10000 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Fig. 34). Cependant, ces teneurs sont diminuées de façon hautement significative ($p \leq 0,01$) à la concentration (15000 $\mu\text{g}/\text{g}$) dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.
- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de silice:** Les nanoparticules d'oxyde de silice diminue le contenu en lipides de façon non significative ($p > 0,05$) aux concentrations (500 $\mu\text{g}/\text{g}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{g}$, 5000 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Fig. 35). Cependant, ces teneurs sont significativement ($p \leq 0,05$) diminuées aux concentrations 10000 $\mu\text{g}/\text{g}$ et 15000 $\mu\text{g}/\text{g}$ dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.
- ✓ **Effet des mixtures des nanoparticules d'oxyde de fer et d'oxyde de silice:** La mixture des nanoparticules d'oxyde de fer et d'oxyde de silice appliquée par ingestion diminue de manière non significative ($p > 0,05$) (Figure 36) le contenu en lipides totaux dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins.

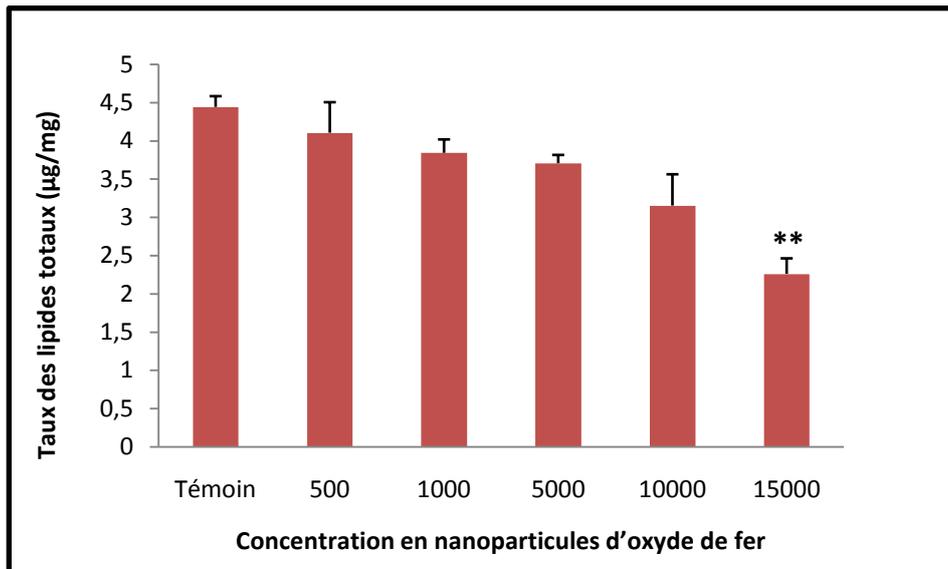


Figure 34: Variation du taux de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancreas de *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de fer administrées par ingestion. ** différence hautement significative ($p < 0,01$).

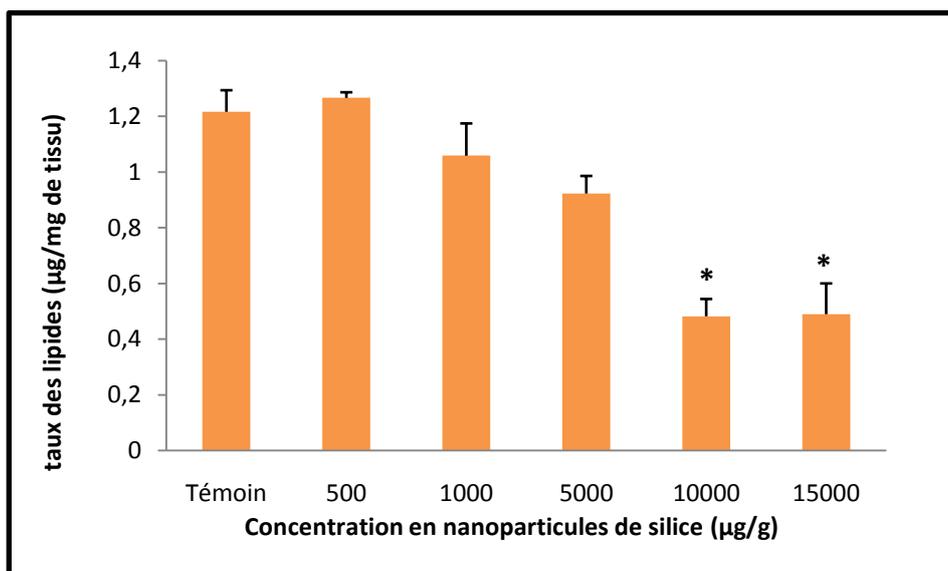


Figure 35: Variation du taux de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancreas de *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules de silice administrées par ingestion. *différence significative ($P < 0,05$)

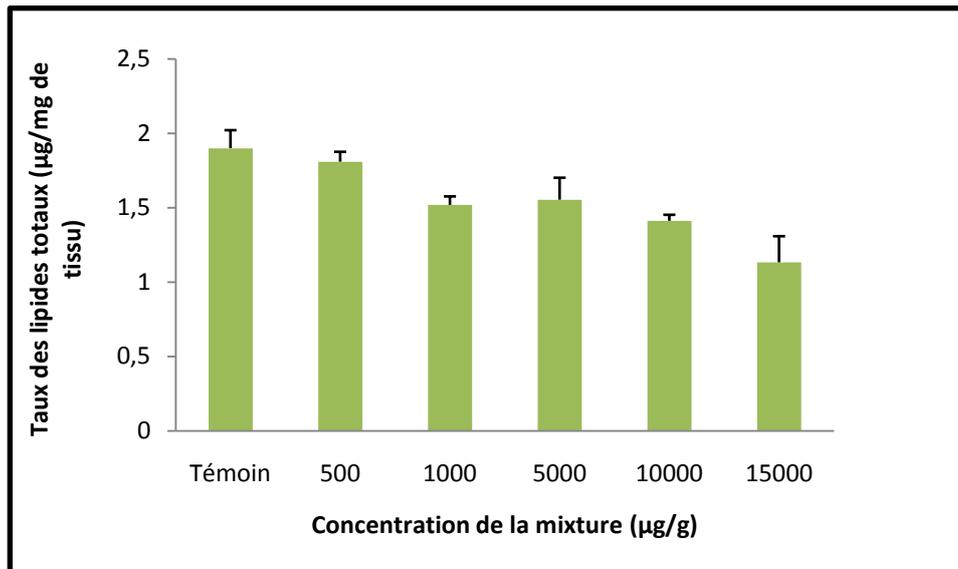


Figure 36: Variation du taux de lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules de la mixture d'oxyde de fer et de silice administrées par ingestion.
Aucune différence significative ($P > 0,05$).

Discussions

Discussion

Les nanoparticules peuvent se retrouver dans tous les compartiments environnementaux (eau, sol et air). Par conséquent, l'ensemble des espèces de la Chaîne alimentaire, peut être exposé aux nanoparticules. L'accumulation des polluants anthropogéniques dans le réseau trophique avait déjà été montrée (**Thomann, 1989**), il est important d'évaluer le comportement des nanoparticules manufacturées dans les populations d'organismes constituant les premiers maillons de la chaîne alimentaire (**Angélique, 2008**).

Toutes les études sur les bioindicateurs, convergent vers l'idée que les espèces *Helix* sont d'excellents modèles biologiques pour toutes les études toxicologiques et pour la compréhension des mécanismes d'action des xénobiotiques in situ. C'est dans ce contexte que se situe notre travail.

Dans cet étude nous nous sommes intéressés à l'effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur les paramètres physiologiques et biochimiques des escargots. Ainsi l'exposition des escargots à des concentrations croissantes des nanoparticules (500, 1000, 5000, 10000 et 15000 $\mu\text{g/g}$) en fonction du temps par ingestion apparaissent assez sensibles à ses deux nanoparticules aux conditions de laboratoire.

1. Effets des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur les biomarqueurs physiologiques chez *Helix aspersa*

1.1. Sur le poids des escargots

Dans notre étude, nous avons notés en premier lieu une réduction du poids des escargots traités par les nanoparticules de (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) en comparaison avec les témoins. En effet, des études montrent que la répulsion de la nourriture, inhibition de synthèse d'une hormone de croissance essentielle à la croissance des escargots et donc au jeune prolongé des escargots. Nos résultats sont en accord avec **Coeurdassier et al, (2001)** ont observé une diminution dose-dépendante de la croissance et de la survie des escargots induite par le diméthoate, et l'exposition par la voie épithéliale induit la plus forte toxicité.

Ainsi, **Viard et al, (2004)** ont fait des constatations similaires en présence d'une contamination en plomb: c'est l'extrême concentration en plomb dans le sol, détectée par les escargots, qui limite leur taux de consommation et donc inhibe partiellement leur croissance. En plus, **Swaleh et Ezzughayyar, (2000)** ont montré, chez *Helix engaddensis*, que si pendant quatre semaines, les escargots réduisaient ou refusaient totalement de se nourrir avec une nourriture contaminée en cuivre et cadmium, dès qu'ils disposaient de nourriture saine la cinquième et la sixième semaine, les escargots intoxiqués au cadmium continuaient de refuser

la nourriture. Mais à l'opposé, les escargots intoxiqués au cuivre ont tout de suite recommencé à se nourrir normalement et ont rattrapé leur poids normal. Il apparaît donc évident que, selon le contaminant considéré, le refus de se nourrir provient d'un phénomène soit de toxicité soit de répulsion (**Swaileh et Ezzughayyar, 2001**).

Nous avons notés aussi une augmentation de la masse corporelle chez les escargots traités par les différentes concentrations des nanoparticules de mixtures ($\text{Fe}_2\text{O}_3 + \text{SiO}_2$) en comparaison avec les témoins ce qui constitue un premier indice de toxicité. On peut expliquer ces résultats par l'accumulation des nanoparticules ($\text{Fe}_2\text{O}_3 + \text{SiO}_2$) au niveau du poids total, ces résultats sont en accord avec les travaux de **Madoz-Escande, (2006)** qui a travaillé sur l'effet de Cd sur *Helix aspersa* qui a trouvé une augmentation du poids pendant une exposition de 21 jours.

1.2. Sur les diamètres (D, L) de la coquille des escargots

Concernant l'évolution des deux diamètres (D, L) de la coquille, nous notons une diminution significative dose-dépendante de ce facteur en présence des nanoparticules d'oxyde de fer a la quatrième semaine et non significative en présence d'oxyde de silice et de mixture en comparaison avec les témoins, ces résultats. Vont dans le sens de ceux de **Coeurdassieret al, (2001)**, qui a mis en évidence une perturbation des diamètres de la coquille des escargots après exposition au diméthoate (pesticide à base d'organophosphorés). Et ceux de (**Grara et al, 2012 a**) qui ont mis en évidence une diminution du poids de la coquille en présence des poussières métalliques.

1.3. Sur le poids du tissu mou et de la coquille des escargots

Nous avons mise en évidence dans notre travaille une diminution significative du poids des tissus mous et de la coquille en présence des nanoparticules d'oxydes de silice et une diminution non significative en présence de l'oxyde de fer et de la mixture en comparaison avec les témoins ceci peut être expliqué par la compétition entre les ions calcium et les ions des nanoparticules. Nos résultats sont en accord avec **Gimbert et al, (2008)** ont démontré une diminution de 30% de la masse de la coquille des escargots exposés à un sol artificiel contaminé par le cadmium. Aussi **Coeurdassieret al, (2001)** montre une inhibition du poids des tissus mous des escargots après exposition au diméthoate.

1.4. Sur le poids d'hépatopancréas

Dans notre travail nous avons noté une perturbation du poids de l'hépatopancréas en comparaison avec les témoins à cause de la présence des nanoparticules dans ce dernier. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Marigomez et al., (1998)** ont montré une réduction de 50% du poids de la glande digestive des lingots en présence des xénobiotiques. Ainsi qu'avec ceux de **(Grara et al., 2012 a)** qui ont mis en évidence une diminution du poids d'hépatopancréas en présence des poussières métalliques.

2. Effets des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur les biomarqueurs biochimiques (métabolites) chez *Helix aspersa*

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

Dans cette étude nous avons choisi de suivre le taux des glucides, protéines et des lipides au niveau de l'hépatopancréas des escargots.

2.1. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa*

Concernant le taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas, nous notons dans notre travail une diminution chez les escargots traités par les nanoparticules d'oxyde de fer et de la silice en comparaison avec les témoins, cette diminution à cause de la déplétion du taux de glycogène dans les tissus hépatique de l'escargot. Ces résultats sont en accord avec les travaux d'**El-Wakil et Radwan (1991). Padmaja et Rao (1994)** ont d'ailleurs suggérés que la diminution du taux de glycogène dans les tissus de l'escargot d'eau douce *Bellamyadissimilis* (Müller), exposé à l'Endosulfan, le Méthyl parathion, le Quinalphos et le Nuvan peut être due à l'utilisation du glycogène pour générer l'énergie nécessaire pour faire face à l'hypoxie provoquée par ces nanoparticules. La déplétion en glycogène des tissus hépatiques peut être également interprétée comme une réponse non spécifique au stress chimique avec cependant des conséquences sur la mobilisation à long terme des réserves énergétiques et ainsi sur la sensibilité au stress et la susceptibilité des individus aux maladies (**Schwaiger et al, 1997**).

Concernant aux taux des glucides chez les escargots traités par les mixtures, nous notons des modifications non significatives. En fait, il n'existe pas vraiment de règle générale qui permet d'expliquer ou de prédire la toxicité associée à un mélange donné de produits chimiques. Ainsi, les mixtures des nanoparticules semblent n'avoir aucun effet sur le

métabolisme des glucides. Ceci peut être expliqué par plusieurs hypothèses comme l'augmentation des réserves énergétiques, ou par des changements structuraux ou de perméabilité des membranes cellulaires. Nos résultats sont en accord avec (Carpay *et al*, 2000).

2.2. Effet des nanoparticules (Fe_2O_3 , de SiO_2 et des mixtures) sur le taux des protéines au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa*

Dans notre travail, nous avons mis en évidence que le taux des protéines dans l'hépatopancréas augmente d'une manière dose –dépendante en présence des nanoparticules d'oxyde de fer en comparaison avec les témoins, cette augmentation pourrait être due à l'induction de la synthèse d'enzymes de détoxification et de métabolisation sous l'effet du stress oxydative produit par l'application d'oxyde de fer ces résultats vont dans le même sens que ceux de (Peccini *et al*, 1994; Masaya *et al*, 2002) qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins). Dans le même ordre d'idées Sbartaï *et al*, (2009), ont montré que les manifestations toxiques du bifénazate (acaricide) sur la paramécie, ont été accompagnées par une induction dose dépendante de la synthèse protéique chez les paramécies.

Par contre, le taux des protéines dans l'hépatopancréas diminuée d'une manière dose –dépendante en présence des nanoparticules de silice (Si) par rapport aux témoins à cause d'un déséquilibre entre le taux de synthèse et de dégradation protéique au cours d'un stress oxydative. Nos résultats sont accord avec Padmaja *et Rao*, 1994. Pendant les périodes de stress chronique, ils constituent aussi une autre source d'énergie. Dans des conditions de stress, les escargots ont besoin de plus d'énergie pour détoxifier la substance toxique. Lorsque les escargots ont une quantité limitée de glucides et de lipides, la source d'énergie alternative pour répondre à la demande accrue d'énergie est les protéines (Moussard, 1999), ainsi que les travaux d'El Gohary *et Genena*, (2011) et Al-Fahmie, (2012) qui ont mis en évidence une diminution du taux de protéines totales lors de l'exposition des escargots terrestres à certains polluants y compris les ETM et les molluscicides. Dans le même contexte, El-Shenawy *et al*, (2012) mentionnent un faible taux de protéines totales au niveau de la glande digestive des escargots *Eobaniavermiculata* collectés au niveau des sites pollués par les ETM.

De plus, la diminution des réserves en protéines solubles de l'hépatopancreas des escargots peut être due en partie au stress résultant de l'effet de nanoparticule testé, comme l'a déjà suggéré **El-Wakil et Radwan, (1991)**.

Dans notre travail, nous avons mis en évidence que le taux des protéines dans l'hépatopancreas augmentée significativement aux mixtures de nanoparticule d'oxyde de fer et de silice peuvent s'expliquer par une forte induction de protéines spécifiques aux mixtures sous l'effet du stress chimique. D'ailleurs, les mêmes constatations ont été faites auparavant par **Lagadic et al, (1997)** sous l'effet des contaminants chez les invertébrés.

2.3. Effet des nanoparticules (Fe₂O₃, de SiO₂ et des mixtures) sur le taux des lipides au niveau de l'hépatopancreas chez *Helix aspersa*

Les résultats concernant l'évolution du taux de lipides dans l'hépatopancreas mettent en évidence une diminution du taux des lipides chez les escargots traités comparativement aux témoins. Selon **Aurousseau B, (2002)** les radicaux oxygénés libres sont toxique via la dégradation des lipides, De plus les métaux comme le Cuivre et le Fer ont été largement utilisés comme agents initiateurs de l'oxydation des lipides (**Nzengue Y, 2008**). Ces résultats vont dans le même sens que ceux de (**Padmaja J.R et Rao M.B, 1994**) qui ont mis en évidence une diminution des taux de lipides dans les tissus de *B.dissimilis* exposés aux pesticides. Le même effet a été montré par les travaux de (**Bourbia S, 2013**) après l'application d'insecticides commerciaux à base de thiaméthoxam (0, 25, 50, 100 et 200 mg/L) sur *Helixa spersa* après six semaines de traitement.

Ainsi que, les travaux de **Grara et al, (2012c)**, ont mis en évidence une baisse significative du taux des lipides au niveau des deux organes étudiés. Ceci peut être dû à l'attaque radicalaire des membranes qui a pour conséquence des perturbations de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (**Lawton et Donaldson, 1991**). De plus, **Halliwell et Chirico, (1993)** indiquent que les effets spécifiques d'une attaque radicalaire se manifestent à l'échelle cellulaire par une peroxydation lipidique induisant des perturbations prononcées du fonctionnement cellulaire.

La diminution dose-dépendante du taux des lipides après exposition de *Helix aspersa* aux mixtures de nanoparticule d'oxyde de fer et de silice peut être due au stress chimique causé par les composés testés. En effet, **Eissa et al, (2002)** ont rapporté que l'effet nocif de composés chimiques pourrait être attribué à l'augmentation de l'utilisation de l'énergie et/ou à l'altération des organites des cellules (des escargots traités) et qu'ils peuvent interférer avec la synthèse des protéines.

Conclusion et perspectives

Conclusion

La production de nanoparticules (NPs) est réalisée à une échelle industrielle et connaît une croissance exponentielle depuis quelques années. Une récente prise de conscience a permis de montrer la nécessité d'études approfondies de leurs propriétés, en particulier en raison des effets biologiques qu'elles peuvent induire. En effet, l'accélération de l'utilisation de nanoparticules, pour leurs propriétés uniques, dans des produits de différents domaines industriels (médecine, électronique, cosmétique...) pourrait être associée à des effets indésirables et encore méconnus à ce jour.

A cette fin, l'escargot *Helix aspersa* est largement présent dans les écosystèmes terrestres, c'est un mollusque, qui peut nous renseigner sur la qualité de l'écosystème dans lequel il vit, il est exposé à la pollution par plusieurs voies d'exposition qui impliquent l'ingestion d'aliments souillés ainsi que le contact et l'absorption par l'épithélium du pied depuis des surfaces contaminées. Nous avons choisi d'évaluer la toxicité potentielle de nanoparticules (oxyde de fer, de silice et de leurs mixtures) sur *l'Helix aspersa*. En effet, l'escargot étant un bioindicateur/bioaccumulateur majeur de la pollution environnementale. Cette sensibilité d'*Helix aspersa* est manifestée en premier lieu par une perturbation dans le développement des paramètres physiologiques (diminution du poids des escargots ainsi que celui de leurs organes...). D'un autre côté, les résultats des paramètres biochimiques de l'hépatopancréas montrent que le traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer et la mixture induit une augmentation des protéines et des glucides ainsi qu'une diminution des lipides, par contre les nanoparticules d'oxyde de silice provoquent une réduction du taux des métabolites hépatopancréatique.

Enfin, les nanoparticules métalliques d'oxyde de fer et d'oxyde de silice induisent des perturbations au niveau physiologiques et biochimiques.

Perspectives

En vue de compléter notre travail il serait important d'étudiées :

- L'histologie.
- La toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer, d'oxyde de silice et de leur mixture sur les œufs des escargots.
- Dosage des métaux lourds par l'absorption atomiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **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. Juillet 2006. Paris. 248 p.
2. **Aiberts B., Johnos A., Lewis Jea. 1983.** The extracellular matrix of the animals. In *Molecular Biology of the cell*. 4th edition. New York: Garland Science, 692-713.
3. **Aitken RJ., Creely KS., Tran CL. 2004.** Nanoparticles: An Occupational Hygiene Review. Institute of Occupational Medicine. Health and Safety Executive (HSE). UK. Research Report 274. 113 p.
4. **Akerman ME., Chan WCW., Laakkonen P., Bhatia SN., Ruoslasti K. 2002.** Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 99 (20): 12617-21. Page d'accueil visionnée le 9/06/2005.
5. **Akhtar M.J., Ahamed M., Kumar S., Siddiqui H., Patil G., Ashquin M., Ahmad I. 2010.** *Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells.* *Toxicology*. 276. 95-102.
6. **Angélique S.D. 2008.** Effets biologiques des nanoparticules manufacturée influence de leur caractéristique. 5-18.
7. **Auffan M., Decome L., Rose J., Orsiere T., Meo M. D., Briois V., Chaneac C., Olivi L., Berge-Lefranc L., Botta A., Wiesner M. R., and Bottero J. Y. 2006.** In vitro interactions between dmsa-oated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environ Sci Technol*, 40(14). 4367-4373.
8. **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.
9. **Bailey S.E.R. 1981.** Circannual and circadian rythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *J. Comp. Physiol.* 142. p. 89-94.
10. **Barker G.M. 2001.** *The Biology of Terrestrial Molluscs.* CAB International. Oxon. Wallingford. UK. 567 pages.
11. **Barlow P.G., Clouter-Baker A., Donaldson K., Maccallum J. & Stone V. 2005.** Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. *Part Fiber Toxicol.* 2. 11.

12. **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.
13. **Berger B., Dallinger R.1993.**Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental monitoring assessment.25.p.65-84.
14. **Berry C.C., Wells S., Charles S., Aitchison G. and Curtis A.S.C. 2003.** Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*.24 (25).4551-4557.
15. **Bonnet, J. C., Vrillon, J. L. 1990.** L'escargot *Helix aspersa* biologie-élevage. Edition INRA.14-15.
16. **Bourbia S. 2013.** Évaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateurs de la pollution des sols *Helix aspersa*. Mémoire de doctorat, Université Badji Mokhtar. Annaba. 58 pages
17. **Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principe of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:278-254.
18. **Brunekreef B. 1997.** Air pollution and life expectancy: is there a relation? *Occup Environ Med*.54(11).781-784.
19. **BSI. 2005.** Vocabulary nanoparticles.British Standards. PAS 71: 2005. 26 p.
20. **C. Kumar. 2006.** Biological and Pharmaceutical Nanomaterials. Nanotechnologies for life science. Ed. C. Kumar. Vol 2.Wiley-VCH Verlag. Weinheim.
21. **Carpy S.A., Kobel W., Doe J. 2000.** Health risk of low-dose pesticides mixtures: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. 3(1): 1-25.
22. **Chevallier H. 1982.** Facteurs de croissance chez des gasteropodes pulmones terrestres palearctiques en élevage. *Haliotis* 12, 29-46.
23. **Chevallier H. 1992.** L'élevage des Escargots. Production et Préparation du Petit-Gris. 2ème édition. Edition du point vétérinaire. Maison-Alfort.
24. **Choe S., Chang Y.-Y., Hwang K.-Y. And Khim J. 2000.** Kinetics of reductive denitrification by nanoscale zero-valent iron. *Chemosphere*. 41(8): 1307.
25. **Chunfu Z., Jinquan C., Duanzhi Y., Yongxian W., Yanlin F., Jiaju T.2004.** Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. *Applied Radiation and Isotopes*. 61(6): 1255.

26. **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 France comté. France.281p.
27. **Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M. 2001.** The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: Effects of dimethoate on survival, growth. and acetylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 (9): 1951-1957.
28. **Cotae V., Creanga L. 2005.** LHC II system sensitivity to magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 289.459-462.
29. **Daguzan J. 1981.** Contribution à l'élevage de l'escargot petit-gris : *Helix aspersa* Müller (mollusque gastéropode pulmoné stylommatophore). I. Reproduction et éclosion des jeunes en bâtiment et en conditions thermohygro-métriques contrôlées. *Ann. Zootechn.*30. p.249-272.
30. **Dallinger R., Berger B., Triebkom R., Kohler H. 2001.** Soil biology and ecotoxicology. The biology to terrestrial mollusc. CAB International. Oxon. Wallingford, UK . 489-525.
31. **Depasse J. 1977.** Comparison between two hypothesis about the physicochemical basis of the toxicity of silica. *J. Colloid Interface Sci.* 60. 414-415.
32. **Duchateau G., Florkin. 1959.** Fortreahalosemie of insects and its signification. *Arch. Insect. Physiol. Biochem* 67: 306-314.
33. **Eissa S.H., Rizk E.T., Abou-Shafey A.E., Mona M.H., Atlum A. 2002.** Toxicological effect on *Euphorbia peplus* water suspension on heamocytes of the fresh water snails, *Biomphalaria alexandrina* and *Lanistes carinatus*. *Proc LCBS*. 2: 417-447.
34. **El-Wakil H.B., Radwan M.A. 1991.** Biochemical studies on the terrestrial snail *Eobania vermiculata* (Müller) and *Thebapisana* ((Müller) treated with some pesticides. *Journal of Environmental Science Health*. B34: 47-60.
35. **Forbes V.A., Forbes T.L., Rivière J.-L. 1997.** Écotoxicologie: théorie et applications. Editions Quae.Paris. 424 p.
36. **François P. 2012.** Toxicité des nanoparticules métalliques chez différents modèles biologiques. Thèse de doctorat. Université du Québec à Montréal.

37. **Gavaskar A., Tatar L. and Condit W. 2005.** Cost and performance report: nanoscale zero-valent iron technologies for source remediation. CR-05-007-ENV. Naval facilities engineering command. Port Hueneme.
38. **Gimbert F., Mench M., Coeurdassier C., Badot P.-M. de Vaufleury A. 2008.** Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field. *Environmental Pollution*. 152: 736-745.
39. **Goetze T., Gansau C., Buske N., Roeder M., Gornert P. and Bahr M. 2002.** Biocompatible magnetic core/shell nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 252: 399.
40. **Gojova A., Guo B., Kota R. S., Rutledge J. C., Kennedy I. M., and Barakat A. I. 2007.** Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles : effect of particle composition. *Environ Health Perspect*. 115 (3).403-409.
41. **Goldsworthy G.J., Mordue W., and Guthkelch J. 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol* 18 (3): 545.
42. **Gomot A. 1997 a.** Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 33. 209-216.
43. **Gomot A. 1997.** Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme. *Bull. Acad. Natle.Méd*. 181.p.59-75.
44. **Gomot A., Gomot L. 1995.** Neurohormonal control of body and shell growth of the snail *Helix*. *Bull. Inst. Océanog. Monaco*. 14. p.141-149.
45. **Gomot A., Gomot L., Boukraa S., Bruckert S. 1989.** Influence of soil on the growth on the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of absorption route for the stimulating factors. *J. Moll. Stud*. 55. p.1-7.
46. **Gomot A.1997b.** Double labelling of neural grafts for identification of sites mediating growth in snails. *Biol. Cell*. 89. 133-140.
47. **Grara N., Boucenna M., Atailia A., Berrebbah H., Djebar M.R. 2012.** Stress oxydatif des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-Est algérien) chez l'escargot *Helix aspersa*. *Environnement. Risques & Santé*. 11(3): 221-229.
48. **Gupta A.K. and Gupta M. 2005.** Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 26 (18): 3995.

49. **Gurr J.-R., Wang A. S. S., Chen C.-H., and Jan K.-Y. 2005.** Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*. 213(1-2). 66-73.
50. **Halliwell, B., and Chirico, S., 1993.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition* 57, 715S-724S; discussion 724 S-725 S.
51. **Health and Safety Executive. 2004b.** *Health effects of particles produced for nanotechnologies*. HSE Hazard assessment document EH75/6. Sudbury.Suffolk. G.-B. HSE. 37 p. Page d'accueil visionnée le 7/01/2005.
52. **Hu J., Chen G. and Lo I.M.C. 2005.** Removal and recovery of Cr (VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. *Water Research*. 39(18): 4528.
53. **Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., and Schlager J.J. 2005.** In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol in Vitro*.19 (7). 975-983.
54. **ICON. 2008.** Towards Predicting Nano-Biointeractions: An International Assessment of Nanotechnology Environment. Health and Safety Research Needs. *International Council on Nanotechnology*. Number 4. May 1. 2008.80 p.
55. **Iglesias J., Castillejo J. 1999.** Field observations on feeding of the land snail *Helix aspersa* Müller. *J. Moll. Stud.* 65. p.411-423.
56. **Jolivet J.P., Tronc E., and Chanéac C. 2002.** Synthesis of iron oxide-based magnetic nanomaterials and composites. *Comptes Rendus Chimie*. 5(10). 659-664.
57. **Kanel S.R., Manning B., Charlet L. and Choi H. 2005.** Removal of Arsenic (III) from Groundwater by Nanoscale Zero-Valent Iron. *Environmental Science & Technologie*. 39(5): 1291-1298.
58. **Knopp D., Tang D., Niessner R., *Anal. Chim. Acta.* 2009, 647 (1), 14-30.**
59. **Kreuter J. 2005.** Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *International Congress Series*.1277: 85.
60. **Lacava L.M., Lacava Z.G.M., Azevedo R.B., Chaves S.B., Garcia V.A.P., Silva O., Pelegrini F., Buske N., Gansau C., Da Silva M.F. and Morais P.C. 2002.** Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*.252. 367.
61. **Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie. Collection Écologie. Masson. Paris.419 p.

- 62. Laskowski R., Hopkin P. 1995 b.** Accumulation of Zn. Cu. Pb. and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*) : Implication for Predators . Environmental Pollution. 91. p.289-297.
- 63. Lawton L.J., Donaldson W.E. 1991.**Lead- induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxydation. Biol. Trace Elem. Res. 28 :93-97.
- 64. Le Marois G. 2005.** Plan «nanomatériaux» - 10 propositions d'actions concrètes. Derian PJ. Avant-propos. Rapport DGE/SIMAP/ITVM. Paris : Ministère chargé de l'Industrie.
- 65. Lin C., Fugetsu B., Su Y. B., and Watari F. 2009.** Studies on toxicity of multi-waled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *Journal of Hazardous Materials* 170(3-3). 578-583.
- 66. Lin W., Huang Y-W., Zhou X-D., Ma Y. 2006.** *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. Toxicology and Applied Pharmacology. 217. 252-259.
- 67. Little E.E, Archeski R.D., Flerov B.A. & Koslovskay V.I.1990.**Bihavioural indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Environ. Contam. Toxicol.*19: 380-385.
- 68. Liu X., Sun J. 2010.** *Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-! B pathways.* Biomaterials. 31. 8198-8209.
- 69. Liu Y., Choi H., Dionysiou D.And Lowry G.V. 2005.** Trichloroethene Hydrodechlorination in Water by Highly Disordered Monometallic Nanoiron. *Chemistry of Materials.* 17(21): 5315.
- 70. Lowry G.V. and Johnson K.M. 2004.**Congener-Specific Dechlorination of Dissolved PCBs by Microscale and Nanoscale Zerovalent Iron in a Water/Methanol Solution. *Environmental Science & Technologie.* 38(19): 5208-5216.
- 71. Ludivine C. 2013.**Caractérisation et toxicité de nanoparticules manufacturées de fer chez *Physcomitrellapatens* (Hedw. Bruch &Schimp.) et sur cellules épithéliales bronchiques humaines (HBEC) : vers une utilisation en biosurveillance d'aérocontaminants nanoparticulaires.
- 72. Madec, L., 1983.** Importance des conditions climatiques et de l'origine des individus pour la reproduction de l'escargot petit-gris en élevage sous bâtiment contrôlé. Session ITAVI, Rennes.

- 73. 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.
- 74. Masaya M., Yoshinobu H., Ai Y., Maki K. and Yasuo O. 2002.** Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury. *Journal of Phycology.* 38(5) : 983.
- 75. Maynard A., Maynard R. 2002.** A derived association between ambient aerosol surface area and excess mortality using historic time series data, *Atmospheric Environment.*36. 5561-5567.
- 76. McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M., Yu H. 2000.** Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 19: 2085-2092.
- 77. Michalet X., Pinaud FF., Bentolila LA., Tsay JM., Doose S., Li JJ., Sundaresan G., Wu AM., Gambhir SS., Weiss S.2005.** Quantum Dots for Live Cells. in Vivo Imaging. and Diagnostics. *Science.* 307 (5709): 538 – 544.
- 78. Moussard C. 1999.** La biochimie. Biochimie structurale et métabolique. Médecine. Pharmacie. Sciences. De Boek&Larciers.a. Bruxelles. 294 p.
- 79. Ngomsik A.-F., Bee A., Draye M., Cote G. and Cabuil V. 2005.** Magnetic nano- and microparticles for metal removal and environmental applications: a review. *Comptes Rendus Chimie.* 8(6-7): 963.
- 80. Notten M.J.M., Oosthoek A.J.P., Rozema J., Aerts R. 2006.** Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the landsnail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves.*Ecotoxicology.*15. P.295-304.
- 81. Nzenque Y. 2008.** Comparaison des mécanismes de toxicité redox du Cadmium .du cuivre et du zinc : place du métallo thionines et de P53. Thèse de doctorat.Université JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1. France .299 p.
- 82. Oberdörster G., Oberdörster E. and Oberdörster J. 2005.** Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives.* 113(7).
- 83. Ostiguy C., Soucy B., Lapointe G., Woods C., and Ménard L. 2008.** les effets sur la santé reliant aux nanoparticules. Technical report. IRSST-Intitut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.
- 84. Padmaja J.R., Rao M.B. 1994.** Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues

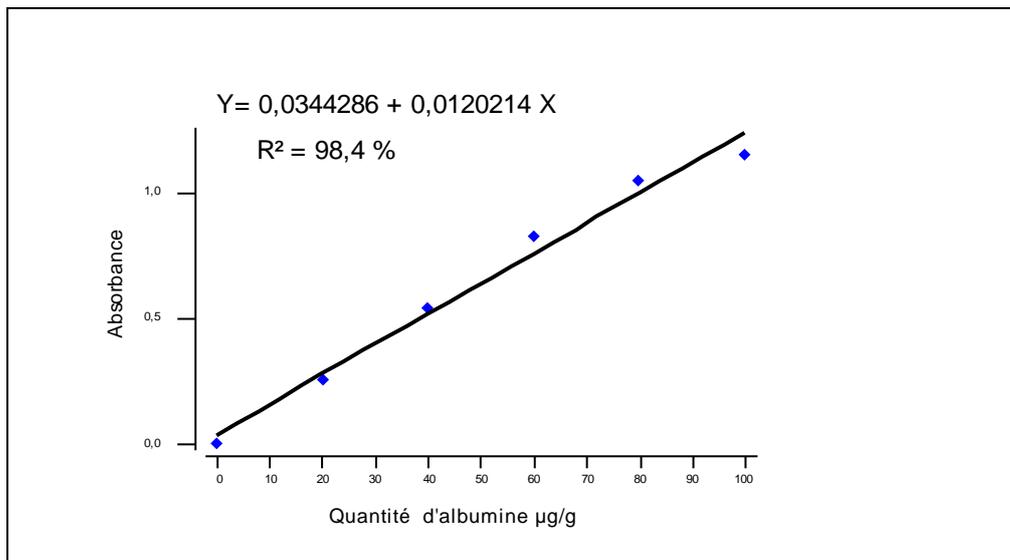
- of the freshwater snail, *Bellammyadissimillis* (Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53: 142-148.
- 85. Peccinni E., Staudenmann W., Albergoni, V., Gabrieli R.D. and James P. 1994:** Purification and primary structure of metallothionins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. *European Journal of Biochemistry*. 226.p.853-859.
- 86. Peters A., Wichmann H. E., Tuch T., Heinrich J., and Heyder J. 1997.** Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med*. 155(4). 1376-1383.
- 87. Peters K., Unger R. E., Kirkpatrick C. J., Gatti A. M., and Monari E. 2004.** Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability. Proliferation and inflammation. *J Mater Sci Mater Med*. 15(4). 321-325.
- 88. Racuciu M., & Creanga D. 2007.** Cytogenetic changes induced by aqueous ferrofluids in agricultural plants. *Journal of Magnetism and Magnetic Material*. 311(1). 288-290.
- 89. Racuciu M., & Creanga D., & Olteanu Z. 2009.** Water Based Magnetic Fluid Impact on Young Plants Growing. *Romain Reports in Physics*. 61(2). 259-268.
- 90. Rahman Q., Lohani M., Dopp E., Pemsel H., Jonas L., Weiss D.G. et al. (2002).** Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in syrian hamster embryo fibroblasts. *Environmental Health Perspectives* 110: 797-800.
- 91. Références bibliographique**
- 92. 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.
- 93. 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.
- 94. Says C. M., Liang F., Hudson J.L., Mendez J., Guo W., Beach J. M., Moore V. C., Doyle C. D., West J. L., Billups W. E., Ausman K. D., and Colvin V. L. 2006.** Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicol Lett*. 161 (2). 135-142.
- 95. Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi, R., Sbartai H., Smaghe G. and Djebbar M.R. 2009.** Behavior of *Paramecium* sp. treated with bifentazate with special emphasis

- on respiratory metabolism. protein and generation time. American-Eurasian J. Toxicol. Sci. 1.p.13-18.
- 96. Scheifler R., Gomot-de Vaufleury A., Toussaint M.L., Badot P.M. 2002.** Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* 48. P.571-579.
- 97. Schwaiger J., Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Triebkorn R. 1997.** The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6: 75-86.
- 98. Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyneck C., Newhall, A., and Freidman L. 1966.** A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt. Biochem.* 19. 415-428.
- 99. Singh S., Shi T., Duffin R., Albrecht C., Van Berlo D., Höhr D., Fubini B., Martra G., Fenoglio I., Borm P. J. A., and Schins R. P. F. 2007.** Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 222(2). 141-151.
- 100. Soto K. F., Carrasco A., Powell T. G., Garza K. M., and Murr L. E. 2005.** Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research.* 7. 145-169.
- 101. Speranza A., Leopold K., Maier M., Taddi A. R. & Scocianti V. 2010.** Pd-nanoparticles cause increased toxicity to kiwifruit pollen compared to soluble Pd (II). *Environmental Pollution.* 158(3). 873-882.
- 102. Swaileh K.M., Ezzughayyar A. 2000.** Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 47: 253-260.
- 103. Swaileh K.M., Ezzughayyar A. 2001.** Dose-dependent effects of dietary Pb and Zn on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 50: 9-14.
- 104. Thoman R.V. 1989.** Bioaccumulation model of organic-chemical distribution in aquatic food chains. *Environmental Science and Technologie* 23. 699-707.

- 105. Tomalia DA. 2004.** Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. *Aldrichimica Acta* 37 (2): 39-57. Page d'accueil visionnée le 8/06/2005.
- 106. Uheida A., Salazar-Alvarez G., Bjorkman E., Yu Z. and Muhammed M. 2006.** Fe₃O₄ and [gamma]-Fe₂O₃ nanoparticles for the adsorption of Co²⁺ from aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*. In Press. Corrected Proof.
- 107. Unfried K., Albrecht C., Klotz L-O., Von Mikecz A., Grether-Beck S., Schins R.P.F. 2007.** *Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms*. *Nanotoxicology*. 1. 52-71.
- 108. Viard B., Maul A., Pihan J.-C. 2004.** Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination. *Journal of Environmental Monitoring*. 6: 103-107.
- 109. Wagner A. J., Bleckmann C. A., Murdock R. C., Schrand A. M., Schlager J. J., and Hussain S. M. 2007.** Cellular interaction of different forms of aluminum nanoparticles in rat alveolar macrophages. *J Phys Chem B*. 111 (25). 7353-7359.
- 110. Wang F., Gao F., Lan M., Yuan H., Huang Y., Liu J. 2009.** *Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells*. *Tox. In vitro*. 23. 808-815.
- 111. Wang F., Liu X., Chem. Soc. Rev. 2009.** 38 (4). 976-989.
- 112. Wang H. H., Kou X. M., Pei Z. G., Xiao J. Q., Shan X. Q. & Xing B. S. 2011.** Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology*. 5 (1). 30-42.
- 113. Wang J., Chen DR., Pui DYH., 2007.** Modeling of filtration efficiency of nanoparticles in standard filter media. *Journal of Nanoparticle Research*. 9: 109-115.
- 114. Wei-xian Z. 2003.** Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. *J. Nanoparticle Research*. V5 (3): 323.
- 115. Xu M., Deng G. F., Liu S. S., Chen S., Cui D., Yang L. M. & Wang Q. Q. 2010.** Free cadmium ions released from CdTe-based nanoparticles and their cytotoxicity on *Phaeodactylum tricornutum*. *Metallomics*, 2(7). 469-473.

Annexes

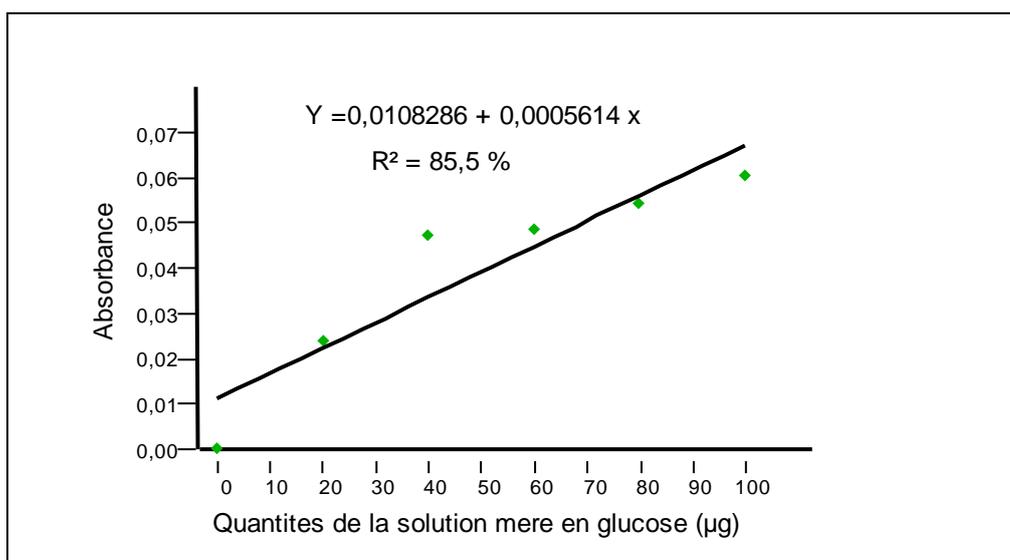
Annexe 01: Droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (μg) (R^2 : coefficient de détermination).



Annexe 02: Dosage des protéines : résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage

Quantité de BSA (μg)	0	20	40	60	80	100
Absorbance (DO)	0	0,254	0,540	0,822	1,045	1,152

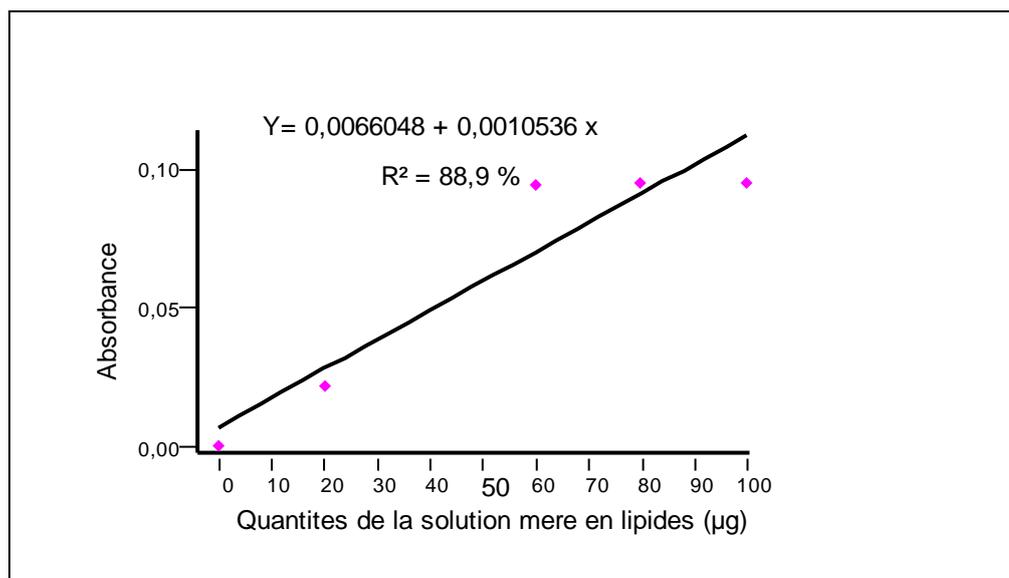
Annexe 03: Droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité en glucose (μg) (R^2 : coefficient de détermination).



Annexe 04 : Dosage des glucides: résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

Quantité de glucose (µg)	0	20	40	60	80	100
Absorbance (DO)	0	0,0237	0,0470	0,0486	0,0540	0,0601

Annexe 05 : Droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité des lipides standard (µg) (R^2 : coefficient de détermination).



Annexe 06: Dosage des lipides : résultats des densités optiques de la gamme d'étalonnage.

Quantité de lipides (µg)	0	20	40	60	80	100
Absorbance (DO)	0	0,0216	0,0505	0,0933	0,0948	0,0949