



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de Larbi Tébessi –Tébessa-

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

Département de Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Pharmaco-Toxicologie

Thème :

L'effet d'oxyde de Zinc « nanoparticules » sur une espèce de mollusque « Helix aspersa »

Présenté par :

BOUKHELFA Marwa

ACHOUR Wided

Devant le jury :

Dr. AMAMRA Rima	M.C.B	Université de TEBESSA	Présidente
Mme. BOUADILA Soulef	M.A.A	Université de TEBESSA	Rapporteuse
Mme. BNAMARA Amel	M.A.A	Université de TEBESSA	Examinatrice

Date de soutenance : 27/05/2018

Note :

Mention :



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à Joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Achour Wided

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : Biologie Appliquée

N° de carte d'étudiant : 12/4097767/2012

Année universitaire : 2017/2018

Domaine : Science de la nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : pharmacotoxicologie

Intitulé du mémoire : l'effet d'oxyde de zinc «nanoparticules»
sur une espèce de mollusque «Helix aspersa»

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : 06/06/2018

Signature de l'étudiant(e) :

2018 جوان 06

سرفه نجاح
دون اطارى



RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Boukhelifa Marwa

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : Biologie Appliquée

N° de carte d'étudiant : 40.1440.12012

Année universitaire : 2017/2018

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : pharmacotoxicologie

Intitulé du mémoire : l'effet d'oxyde de Zinc « nanoparticule »

sur une espèce de mollusque « Helix aspersa »

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

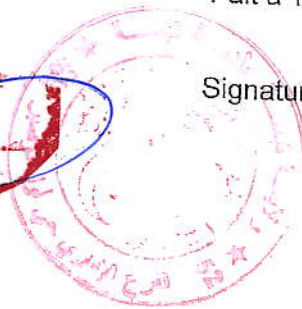
L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

2018 جوان 06

Fait à Tébessa, le : 06/06/2018

Signature administrative (blue ink)



Signature de l'étudiant(e) :

Signature of the student (black ink)



REMERCIEMENT

A notre Créateur ALLAH:

Qui nous a donné la vie et la grâce d'étudier. Que ton Nom soit loué

A notre encadreuse madame BOUADILA SOULFEL :

Vous avez fait un grand honneur d'avoir accepté de diriger ce travail et vous avez fait preuve de beaucoup de disponibilité.

Votre compétence et votre gentillesse ont contribué à la réalisation de ce travail. Votre dévouement à votre profession, votre rigueur scientifique et votre modestie forcent notre admiration.

Qu'il nous soit permis de vous remercier très chaleureusement et de vous témoigner toute notre gratitude.

A nos parents :

Vous nous avez donné les moyens d'en être la aujourd'hui.

Simplement merci du plus profond de nos cœurs.

Aux membres de jury

Mme AMAMRA d'avoir accepté de présider notre jury

Mme BEN AMARA d'avoir accepté d'examiner notre travail sans oublier son soutien moral et ses conseils durant notre travail expérimental

A toutes les personnes qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail, et tous ce qui nous a apporté l'aide durant notre cursus que nous ne pouvant citer individuellement.

Dédicace

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

*A mon père :TAHER et ma mère :YASMINA, 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: ABDELJALIL et ABDELAZIZ

A mes sœurs: RANIA et IMEN

A mes ancles et tantes

BRAHIM ,AMARA

Et aussi Hamida et Naima

A mes cousins et cousines.

A :ABDELMOUAIZ ET ROKIA

A mon binôme: MARWA

Amon amie : IMEN

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

WIDED

Dédicace

Je dédie humblement ce travail :

A celle qui est et qui sera un symbole de courage et qui m'a non seulement accompagné durant toutes les étapes de ma vie, mais aussi guidé et encouragé et n'a lésiné sur aucun moyen. Celle à qui je dois tout, même ma vie, mon adorable mère ELAKRI.

A celui qui m'a toujours aidé et soutenu tout au long de mon parcours, mon cher père MOHAMMED.

Merci d'avoir contribué à ma réussite.

A mes chers et adorable frères et sœurs qui m'ont assisté dans les moments difficiles et m'ont pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles....

Je vous souhaite un avenir radieux et plein de gloire et de bonheur et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

Je le dédie aussi à :

- RADHA

- NOUR

- RAYD

Sans oublier tous les enseignants qui ont contribué à ma formation, tous cycles confondus, je leur serai éternellement reconnaissant.

A toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail.

A ceux qui m'ont aidé même par un sourire ...

BOURHALFA MAROUA

Résumé

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la toxicité d'une nanoparticule métallique le ZnO sur un organisme bio-accumulateur et bio-indicateur de pollution de l'environnement *Helix aspersa*

Différents paramètres physiologiques (poids moyen des escargots, poids de la coquille, poids du tissu mou, longueur et diamètre de la coquille, mortalité), biochimiques (protéines totales, lipides et glucides totaux) au niveau de l'hépatopancréas et du rein sont mesurés après 28 jours de traitement.

La toxicité du ZnO est déterminée chez l'escargot *Helix aspersa* grâce à un biotest réalisé en laboratoire sur des animaux exposés à des concentrations de la farine croissantes de ZnO (500 µg/g, 1000 µg/g, 5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g). Les premiers résultats montrent que la présence des nanoparticules métalliques à base de ZnO provoquait des perturbations physiologiques concernant le poids de la coquille, poids du tissu mou, longueur et diamètre de la coquille, mortalité) particulièrement chez les traités aux fortes concentrations. Parallèlement les modifications métaboliques indiquent une augmentation significative à hautement significative du taux de protéines, et une diminution significative à hautement significative du taux des lipides et glucides (dose dépendante) au niveau de l'hépatopancréas et du rein

Mots clés : Toxicité, oxyde de zinc, *Helix aspersa*, bio-indicateur, hépatopancréas, rein, protéines, lipides, glucides

Abstract

In this study we are interested in the evaluation of the toxicity of a metallic nanoparticle ZnO on a bioaccumulator and bioindicator of environmental pollution *Helix aspersa*

Different physiological parameters (weight of snails, weight of shell, weight of soft tissues, length and diameter of shell, mortality), biochemical (total proteins, lipids and carbohydrates total) at the hepatopancreas and kidney levels are measured after 28 days of treatment.

The toxicity of ZnO is determined in *Helix aspersa* snails by laboratory biotest in animals exposed to increasing concentrations of flour of ZnO (500 µg/g, 1000 µg/g, 5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g).

The first results show that the presence of ZnO based metal nanoparticles caused physiological disturbances concerning the weight of the shell, tissue weight, length and diameter of the shell, mortality; especially at high concentrations. At the same time, the metabolic changes indicate an increase in the proteins content, and a decrease in the level of lipids and carbohydrates (dose-dependent) at the level of the hepatopancreas and the kidney.

Key words: Toxicity, zinc oxide, *Helix aspersa*, bioindicator, hepatopancreas, kidney, proteins, lipids, carbohydrates.

في هذه الدراسة نحن مهتمون بتقييم سمية جسيمات متناهية الصغر من معدن أكسيد الزنك ZnO على كائن حي Bio-accumulateur ومؤشر التلوث البيئي *Helix aspersa* Bio-indicateur

هناك معايير فسيولوجية مختلفة (متوسط الوزن للقوقاع ، وزن القشرة ، وزن الأنسجة الرخوة ، طول الصدفة وقطرها ، معدل الوفيات) ، البيوكيميائية (البروتينات الكلية ، الدهون ، الكربوهيدرات الكلية) في الكبد والكلى تقاس بعد 28 يوما من العلاج

يتم تحديد سمية ZnO في الحلزون *Helix aspersa* بواسطة اختبار احيائي و التي أجريت على الحيوانات المختبرة التي عرضت لمستويات متزايدة من أكسيد الزنك (500 ميكروغرام / غرام ، 1000 ميكروغرام / غرام ، 5000 ميكروغرام / غرام ، 10000 ميكروغرام / غرام ، 15000 ميكروغرام / غرام). أظهرت النتائج الأولى أن وجود الجسيمات الثانوية المعدنية القائمة المكونة من أكسيد الزنك تسببت في اضطرابات فسيولوجية تتعلق بوزن الصدفة ووزن الأنسجة وطول الصدفة وقطرها والوفيات ، خاصة في الحيوانات المعالجة بتركيز عالية . في الوقت نفسه ، تشير التغيرات الأيضية إلى زيادة في محتوى البروتين ، وانخفاض في مستوى الدهون والكربوهيدرات (باختلاف الجرعات) على مستوى الكبد و الكلى.

الكلمات المفتاحية: السمية ، أكسيد الزنك ، *Helix aspersa* ، ومؤشر التلوث البيئي ، الكبد ، الكلى ، البروتينات ، الدهون ، الكربوهيدرات

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Tables des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des symboles

Introduction

Table des matières

Synthèse bibliographique

1. Définitions.....	1
1.1. Les nanoparticules.....	1
1.2. La nanobiologie.....	2
1.3. La nanotoxicologie.....	2
2. Effets biologiques possibles des NPs.....	2
3. Les voies d'exposition humaine aux nanoparticules.....	3
4. Les utilisations des nanoparticules.....	3
5. Les différents types de nanoparticules.....	4
5.1. Les nanoparticules naturelles.....	4
5.2. Les nanoparticules produites par l'homme.....	4
5.3. Les nanoparticules produites par l'homme de façon intentionnelle (ou nanoparticules manufacturées).....	5
6. les nanoparticules d'oxyde de zinc.....	7
6.1. Définition.....	7
6.2. Caractéristiques d'oxyde de zinc.....	7
6.3. Utilisation d'oxyde de zinc.....	7
6.4. Pathogenèse et mode d'action d'oxyde de zinc.....	8
7. Stress oxydant.....	9
7.1. Définition du stress oxydant.....	9
7.2. Les radicaux libres.....	9
7.4. Sources des espèces réactives de l'oxygène :.....	10

7.5. Les espèces oxygénées activées :.....	10
7.6. Rôle des espèces réactives de l'oxygène.....	11
8. Systèmes de défense anti-oxydants	12
8.1.Systèmes de défense enzymatiques.....	13
8.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	14
9. Stress oxydant pathologique et physiologique.....	17

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes.....	18
1.Matériel.....	18
1.1 . Matériel biologique.....	18
1.1.1 . Zoologie.....	19
1.1.1.1 . Description morphologique.....	19
1.1.1.2 . Description anatomique.....	20
1.1.2 . Déplacement.....	20
1.1.3 . Alimentation.....	22
1.1.4 . Longévité.....	23
1.1.5 . Hibernation et estivation.....	23
1.1.6 . Reproduction et cycle biologique.....	24
1.1.7 . Rythme d'activité.....	25
1.2..Matériel chimique.....	25
2.Methode.....	26
2.1 . Condition d'élevage	26
2.2. Exposition d'Helix aspersa à la nourriture.....	26
2.3. Mode de traitement.....	27
2.4. Préparation et sacrifice des animaux	27
3. Paramètres étudiés.....	28
3.1. Paramètres physiologiques.....	28
3.1.1 . Le poids frais de l'escargot (tissus mous+coquille).....	28

3.1.2 . Le diamètre de coquille	28
3.1.3 .Le poids frais de la coquille, des tissus mous.....	30
3.1.4 .Mortalité.....	30
3.2.Paramètres biochimiques.....	30
3.2.1..Dosage des métabolites.....	30
3.2.1.1 . Extraction des métabolites.....	30
3.2.1.2 . Dosage des protéines.....	32
3.2.1.3 Dosage des glucides	32
3.2.1.4 .Dosage des lipides	32
4. Etude statistique	32
Résultats.....	33
1.Effets des nanoparticules sur les biomarqueurs physiologiques.....	33
1.1.Effets des nanoparticules de ZnO sur le poids moyen des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.....	33
1.2. Effet des nanoparticules de ZnO sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> :	34
1.3.Effet des nanoparticules de ZnO sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i>	35
1.4. Effet des nanoparticules de ZnO sur l'évolution du poids moyen de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i>	35
1.5. Effet des nanoparticules de ZnO sur l'évolution du poids moyen de la tissu moux des escargots <i>Helix aspersa</i>	36
1.6. Effet des nanoparticules de ZnO sur la mortalité des escargots <i>Helix aspersa</i>	37
2.Analyses biochimiques.....	38
2.1. Dosage des métabolites au niveau de l'hépatopancréas et les reins chez les escargots <i>Helix aspersa</i>	38
2.1.1. Effet sur le taux des protéines.....	38
2.1.2. Effets sur le taux des glucides.....	38
2.1.3. Effets sur le taux des lipides.....	42

Discussion.....45

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

N° Tableau	Titre	Page
01	Exemples de champs d'application en fonction du type de nanoparticule	6
02	Dosage des protéines: réalisation de la gamme d'étalonnage	56
03	Dosage des glucides: réalisation de la gamme d'étalonnage	58
04	Dosage des lipides : réalisation de la gamme d'étalonnage	59

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure		
01	Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres.	10
02	Réseau des antioxydants	13
03	Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène	17
04	L'escargot <i>Helix aspersa</i>	18
05	Morphologie externe de l'escargot	19
06	Schéma en coupe de l'anatomie d'un escargot	20
07	Schéma de l'anatomie de l'escargot	21
08	Ondes de contraction sur la face ventrale des pieds d'escargots	22
09	Schéma du fonctionnement de la <i>radula</i>	22
10	Escargot en hibernation avec son épiphragme	24
11	Accouplement de Petits-Gris	25
12	Nanoparticules d'oxyde de zinc en poudre	25
13	L'élevage des escargots <i>Helix aspersa</i> dans laboratoire	26
14	Sacrifice des escargots <i>Helix aspersa</i> et prélèvement des organes	28
15	Mesure des deux diamètres D et L de <i>Helix aspersa</i>	29
16	Mesure des deux diamètres D et L de <i>Helix aspersa</i>	29
17	Mesure de poids frais de la coquille et tissus mous de <i>Helix aspersa</i> dans laboratoire	30

18	Principales étapes d'extraction des métabolites: protéines, glucides et lipides	31
19	Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'évolution du poids moyen des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	33
20	Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	34
21	Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	35
22	Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'évolution du poids moyen de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	36
23	Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'évolution du poids moyen du tissu mou des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	37
24	Pourcentage cumulatif de mortalité des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction des concentrations croissantes de ZnO.	38
25	Variation du taux des protéines totales en ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc.	39
26	Variation du taux des protéines totales en ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc.	40
27	Variation du taux des glucides en ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc.	41
28	Variation du taux des glucides en ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc	42
29	Variation du taux des lipides totaux en ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc	43

30	Variation du taux des lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i> après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zin	44
-----------	---	----

Liste des symboles

ADN	Acide désoxyribonucléique.
%	Pourcentage.
°C	Degré <i>Celsius</i> .
µg	Microgramme.
B.S.A	Bovin Serum Albumine
BBC	Bleu Brillant de Coomassie.
Cu	Cuivre
DO	Densité optique
ERO	Espèce réactive oxygénées
Fe	Fer
Fe²⁺	Fer ferreux
Fe³⁺	Fer ferrique
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
ZnO	Oxyde de zinc
mg	milli gramme.
min	minute
nm	Nano-mètre
NPs	Nanoparticules
O₂	Oxygène moléculaire

O₂^{·-}	Anion superoxyde
OH[·]	Radical hydroxyle
ROS	Espèce réactive oxygénées.
TiO₂	Oxyde de titane
Zn	Zinc

Introduction

Introduction

Les nanotechnologies constituent un champ de recherche multidisciplinaire impliquant l'utilisation de nouveaux dispositifs permettant d'étudier la matière au niveau moléculaire ou supramoléculaire : les échelles caractéristiques des nanotechnologies vont de 1 à 100 nanomètres (nm). À ces échelles, la matière acquiert des propriétés inattendues et souvent différentes de celles des mêmes matériaux à l'échelle micro- ou macroscopique : il convient de les considérer comme de nouveaux composés chimiques dont les caractéristiques et les toxicités sont différentes. (Chuto ;2010)

Les nanoparticules (NP) sont des structures composées de quelques centaines à quelques milliers d'atomes. Du fait de leur taille (1 à 100 nanomètres), les propriétés physiques et chimiques de ces nano-objets sont différentes de celles des matériaux classiques. Leur champ de développement est extrêmement vaste et inclut la recherche médicale : on peut différencier deux grands groupes, les NP organiques (système micellaire, NP à base de polymères, nanotubes de carbone, fullerènes) et les NP inorganiques (quantum dots, NP d'oxyde de fer magnétique, sondes Raman). La polyvalence de ces NP est grande car elles peuvent être conçues et modelées pour servir de vecteurs de médicaments (thérapeutique), de sondes d'imagerie (diagnostique), voire les deux à la fois (théranostique). (Chuto ; 2010)

Le modèle central de cette étude est l'escargot Petit Gris *Helix aspersa*, connu pour ses capacités à accumuler les ETM à des concentrations importantes dans ses tissus Herbivores et détritivores, ce mollusque gastéropode pulmoné est exposé aux pollutions des sols, des végétaux et de l'atmosphère et représente de ce fait un modèle intégrateur complémentaire des organismes souterrains comme les annélides ou les organismes à régime strictement herbivore ou détritivore. Peut-être parce qu'il entre dans le régime alimentaire de l'homme, il est considéré comme l'un de des maillons de la chaîne trophique. Il est la proie de nombreux prédateurs tels que les mammifères, les oiseaux ...etc. Et peut donc être à l'origine de transferts des polluants (contaminants). (Grara ; 2012).

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets induits par une nanoparticule manufacturée d'oxyde de zinc (ZnO) administrée par voie orale, sur les paramètres physiologiques et biochimiques (glucide, protéine, lipide) chez un organisme bio-accumulateur, le gastéropode terrestre *Helix aspersa*.

Synthèse Bibliographique

1. Définitions

La nanotechnologie regroupe l'ensemble des savoir-faire permettant d'observer, de manipuler, de fabriquer, de modifier, de façonner la matière jusqu'à des dimensions voisines du nanomètre (**Florin et al, 2008**) Leurs applications biomédicales pour la recherche in vitro et in vivo chez l'animal apportent de nouveaux outils extrêmement utiles pour la compréhension des phénomènes biologiques et le développement de nouvelles méthodes thérapeutiques et diagnostiques

1.1. Les nanoparticules

Une nanoparticule est définie comme étant une particule dont au moins une direction de l'espace a une dimension inférieure à 100 nm. (**Lanone et al, 2010**)

Les nanoparticules présentent donc des surfaces d'échanges (surface spécifique) très importantes, de plusieurs centaines de mètres carrés par gramme de particule. Cette surface d'échange très importante confère aux nanoparticules des propriétés physiques et chimiques particulières qui peuvent entraîner des effets biologiques propres, qui restent encore largement incompris, si elles rentrent en contact avec le vivant. La réactivité de surface des nanoparticules, qui augmente alors que décroît la taille de la particule, laisse prévoir qu'elles auront une activité biologique plus importante, à masse comparable, que les particules plus grosses. Cela peut être favorable et être utilisé dans des approches thérapeutiques (transporteurs de médicaments pour leur capacité à franchir les barrières biologiques). Cela peut être au contraire défavorable et engendrer une toxicité associée à leur capacité à générer un stress oxydant et à se disperser dans l'organisme. (**Lanone et al ;2010**)

1.2. La nanobiologie

La nanobiologie est une des branches de recherche de la nanoscience et regroupe les chimistes, biologistes, médecins et pharmaciens. Une revue exhaustive des différents types de nanoparticules (NP) et de leurs applications étant impossibles, seules les principales NP utilisées en médecine *in vitro* et en imagerie cellulaire *in vivo* et *in vitro*, ainsi que leur stade de développement clinique, seront décrites. La polyvalence de ces NP est grande car elles peuvent être conçues et modelées pour servir comme vecteurs de substances (thérapeutique), de sondes d'imagerie (diagnostique), voire les deux à la fois (théranostique). (Chuto *et al*, 2010)

1.3. La nanotoxicologie

discipline nouvelle, visant à évaluer précisément les dangers liés aux nanotechnologies, ne semble pas obéir aux mêmes règles que la toxicologie classique. La caractérisation physico-chimique des NPs est une étape fondamentale pour l'évaluation de leur toxicité. En effet, la variation de taille, de spéciation, de phase, peut modifier leur pharmacocinétique et influencer leur toxicité. (Greco *et al*, 2015)

2. Effets biologiques possibles des NPs

Après leur entrée dans l'organisme, les voies de translocation et de distribution des NPs aux organes cibles, leurs effets toxiques et leurs voies d'excrétion dépendent notamment de leur taille, de leur forme, de leur état d'oxydation et des phénomènes d'adsorption à leur surface. Pour un même type de NP, l'effet peut également varier si la taille ou l'état d'oxydation change. Après passage des barrières biologiques, les NPs peuvent atteindre des organes cibles et exercer leur toxicité.

Plusieurs mécanismes de toxicité sont avancés :

-génétoxicité par interaction directe des NPs avec l'ADN ou les organites cellulaires intervenant dans le cycle cellulaire, ou de manière indirecte par modification de la balance redox entraînant la formation de radicaux libres à l'origine de lésions à l'ADN ou altérant les mécanismes de réparation à l'ADN.

-cytotoxicité liée à une inflammation chronique entretenue par la production d'espèces réactives de l'oxygène après endocytose/phagocytose des NPs. (**Greco et al, 2015**)

3. Les voies d'exposition humaine aux nanoparticules

L'homme est donc multi-exposé dans son quotidien aux NPs. Les voies d'exposition principales sont les voies respiratoire , digestive , et transcutanée . Avec l'émergence de la nanomédecine , la voie sanguine représenté également une porte d'entrée des NPs dans l'organisme .

La production de NPs engendre également une exposition professionnelle, principalement pulmonaire. L'exposition professionnelle est en augmentation à la fois dans le secteur industriel (augmentation de la production et de l'utilisation des NPs dans différents procédés de fabrication) et dans le secteur de la recherche

En médecine, l'utilisation des NPs offre de nombreux espoirs tant sur le plan diagnostique que thérapeutique, en particulier dans les maladies chroniques inflammatoires et les cancers. Les NPs pourraient être utilisées comme agents de contraste en radiologie et sont à l'étude comme vecteur permettant de cibler spécifiquement les pathogènes intracellulaires viraux ou bactériens

En effet, la voie d'exposition, les modes de translocation et de dispersion des NPs aux différents organes cibles, ainsi que leur clairance sont autant de données indispensables dans leur évaluation toxicologique. (**Greco et al.2015**)

4. Les utilisations des nanoparticules

La taille nanométrique, le ratio surface/volume élevé des NPs, la complexité chimique, la nature et l'expansion des faces minéralogiques leur confèrent des propriétés magnétiques, de résistance mécanique, de réactivité chimique, de conductivité thermique qui permettent de nombreuses applications dans des domaines très variés. Les domaines du textile, des cosmétiques, de l'alimentation, de l'imagerie médicale, de la vectorisation de médicament, de l'environnement, de l'électronique, de la chimie, du bâtiment. . . font

appel aux nanotechnologies . Quelques exemples d'applications sont regroupés dans le Tableau . (**Greco et al, 2015**)

5. Les différents types de nanoparticules

5.1. Les nanoparticules naturelles

Un grand nombre de nanoparticules d'origine naturelle sont présentes dans l'environnement (poussières émises par combustion ou par les volcans, produites par érosion). Parmi elles, on note les imogolites et allophanes, nanoparticules naturelles qui se présentent sous la forme de tubes (imogolites) ou une forme décrite comme sphérique mais dont la structure reste imprécise (allophanes). Les imogolites et allophanes sont des aluminosilicates structurés à courte distance résultant de l'altération de verres et de cendres volcaniques. (**Lanone et al ,2010**)

5.2. Les nanoparticules produites par l'homme

Dans cette catégorie nous retrouvons les particules atmosphériques « ultrafines » (PUF). L'exposition humaine à des PUF est devenue au cours des dernières années une question importante de santé publique, mise en lumière par l'analyse de la composition des particules atmosphériques et de leurs effets biologiques . En milieu urbain, les PUF peuvent être formées de plus de 80 % de suies fines (inférieur à 1 µm) et ultrafines provenant de la combustion des carburants fossiles .

Ces particules, émises notamment par les véhicules Diesel, les véhicules à essence et les chauffages urbains, ont rapidement été suspectées être à l'origine de la morbidité et de la mortalité cardiorespiratoires observées dans les études épidémiologiques sur les effets à court terme de la pollution atmosphérique . (**Lanone et al ,2010**)

Elles seraient principalement à l'origine de réponses inflammatoires pouvant aggraver des pathologies pulmonaires telles que l'asthme Elles auraient également un effet prothrombotique et pourraient être à l'origine d'athérosclérose et de pathologies cardiovasculaires. (**Lanone et al ,2010**)

5.3. Les nanoparticules produites par l'homme de façon intentionnelle (ou nanoparticules manufacturées)

Le développement récent des nanotechnologies, regroupement de l'ensemble des techniques visant à concevoir, caractériser et produire des matériaux à l'échelle du nanomètre, a commencé à élargir les sources de nanoparticules avec la production accrue de nanomatériaux manufacturés, dont des nanoparticules manufacturées (NPM). En raison des propriétés nouvelles des matériaux ainsi produits, les nanotechnologies connaissent un essor particulièrement important depuis ces dernières années à l'échelle internationale, où l'on observe un investissement grandissant de la part de pays de plus en plus nombreux. (**Lanone et al ,2010**)

Des différences existent entre les PUF et NPM, les premières ayant généralement une assez large distribution de taille et une composition chimique complexe alors que les secondes ont souvent une distribution étroite et une composition chimique définie.

Très schématiquement, il existe des NPM métalliques (dioxyde de titane et de zinc, par exemple) et des NPM carbonées. Parmi celles-ci, les nanotubes de carbone occupent une importance. Il existe principalement deux catégories de nanotubes de carbone : les single-wall carbon nanotubes (SWCNT) composés d'un seul feuillet de graphène et les multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) constitués de plusieurs feuillets emboîtés les uns dans les autres comme des poupées russes. (**Lanone et al ,2010**)

Outre des utilisations industrielles, l'emploi des nanotubes de carbone en médecine est une perspective intéressante. Ils pourraient servir par exemple pour le transport et la délivrance d'agents médicamenteux à l'intérieur des cellules. Les nanotubes de carbone très attractifs posent des questions sur leur potentielle de toxicité, leurs effets secondaires à long terme ou encore leur biodégradabilité . Ces questions constituent un champ de recherche en plein développement..

(**Lanone et al ,2010**)

Tableau 1 : Exemples de champs d’application en fonction du type de nanoparticule
(Greco *et al*, 2015)

Champ d’application	Type de NPs	Propriétés
Transports Revêtements Energie Vectorisation de médicaments Imagerie	Nanotubes de carbone	Résistance mécanique (60 fois supérieure aux meilleurs aciers) Légèreté Dissipation électrostatique
Industrie électronique Cosmétique : crèmes solaires, laques Peintures	Fullerènes NPs dioxyde de titane	Supraconductivité Filtre UV Photocatalytique
Pots d’échappement catalytiques – Accélération des réactions chimiques dans l’industrie (oxydation du monoxyde de carbone)	NPs d’or	Catalytique
Textiles à usage clinique Pansements Traitement de surfaces	NPs d’argent	Antibactérien
Additif dans les carburants diesel Dépollution des eaux usées et des sols	NPs de dioxyde de cérium NPs de fer, NPs d’aluminium	Catalytiques Membrane « filtrantes », nano-adsorbants
Additif alimentaire Pneumatiques	NPs de silices amorphes	Antiagglomérant Modificateur de viscosité
Revêtements voitures, produits d’entretien ménagers	NPs de silice, d’aluminium, zirconium NPs-PLGA,	Propriétés antiabrasives et antiadhésives Enrobage biocompatible et biodégradable
Nanomédecine : vecteurs d’antibiotique pour pathogènes intracellulaires, imagerie et ciblage tumoral	NPs superparamagnetic iron oxyde	Propriété magnétique Passage des barrières biologiques

6. les nanoparticules d'oxyde de zinc

6.1. Définition

L'oxyde de zinc (ZnO) est un matériau binaire, semi-conducteur à large gap direct (3,3 eV) qui a la propriété d'avoir une très forte énergie de liaison des excitons. Cela en fait un matériau d'avenir pour les dispositifs optoélectroniques.

De plus, les objets nanométriques unidimensionnels tel que les nanofils ont connu un attrait considérable grâce à grand potentiel pour les études fondamentales ainsi que des applications pour des nanodispositifs. Un nanolaser fonctionnant à température ambiante a déjà été démontré . Le fort ratio surface/volume des nanofils leur permet de croître sans contrainte sur des substrats bon marché désaccordés en maille tel que le substrat Si .

Enfin, leur large surface permet la génération d'une nouvelle classe de dispositifs ultra sensibles tels que des capteurs chimiques ou biologiques (Gwénolé et al, 2012)

6.2. Caractéristiques d'oxyde de zinc

Les nanoparticules d'oxyde de zinc ont reçu une attention accrue en raison de ses propriétés telles que la taille des cristaux, l'orientation et la morphologie, le degré d'agglomération, la densité du cristal et chimique, ce qui le rend apte à être utilisé avec succès dans une large gamme d'applications comme la libération contrôlée des médicaments, des cosmétiques et l'industrie des instruments médicaux, biocapteurs, des capteurs de gaz, les cellules solaires, photodétecteurs , des catalyseurs, des électrodes transparentes, diodes électroluminescentes (DEL), varistances, transistors . La méthode polyol permet l'obtention facile et à faible coût de l'oxyde de zinc ayant une taille réduite. (Serdaru et al ,2015)

6.3. Utilisation d'oxyde de zinc

L'effet du ZnO dans l'épithélialisation de la peau et ses propriétés bactériostatiques le recommandent comme pansement pour les blessures. Il peut être utilisé dans le traitement de divers dermatites, blessures ouvertes et comme anti-inflammatoires. L'activité antibactérienne de ZnO peut dépendre de la taille des nanoparticules et de la présence de lumière UV ou visible . Les applications principales de ZnO est celle qui est basée sur sa capacité d'absorber le rayonnement UV. Dernièrement, un intérêt particulier pour le traitement du cancer s'est tourné

vers des nanoparticules d'oxyde de zinc, principalement en raison de leurs propriétés physiques et chimiques. Plusieurs études ont suggéré une augmentation de la cytotoxicité in vitro de l'oxyde de zinc de taille nanométrique à plusieurs types de cancer, y compris le gliome, le cancer du sein, cancer de l'os, le cancer du côlon et la leucémie . . (Serdaru et al ,2015)

6.4. Pathogenèse et mode d'action d'oxyde de zinc

La nature de l'oxyde de zinc joue un rôle important .L'activité de ZnO dépend de son pouvoir catalytique :les oxydes fraîchement préparés possèdent un pouvoir catalytique élevé (activité pyrogène)et produisent la fièvre .Le ZnO commercial a perdu ce pouvoir et ne provoque pas la fièvre. Ce qui explique la difficulté à reproduire cette pathologie en expérimentation animale .Le pouvoir catalytique et l'induction de la fièvre dépendent plus de la capacité d'adsorption du CO par les fumées métalliques que de la concentration en fumées.

Puisque les fumées métalliques sans capacité d'adsorption vis-à-vis du CO ne produisent pas de fièvre, mais seulement une leucocytose. (**Philippe et al , 1991**)

Il semble que les fumées de ZnO ne libèrent pas de pyrogène à partir du tractus respiratoire , mais à partir des leucocytes. Ceci semble confirmé par OHMOTO(1974) :l'action pyrogénique peut être obtenue par administration intraveineuse des fumées avec une bonne relation dose – réponse .L'oxyde de zinc finement divisé pénètre rapidement dans les infiltrats de leucocytes polymorphonucléaires au niveau des capillaires alvéolaires, libérant alors un pyrogène endogène. L'oxyde de zinc n'agit donc pas directement sur les centres nerveux de la thermorégulation.

(**Philippe et al , 1991**)

7. Stress oxydant

7.1. Définition du stress oxydant

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires. Dans un souci de prévention, il conviendra donc de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydant chez un individu afin d'apporter les corrections nécessaires pour optimiser nos défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs induits par les EOA au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides. (Haleng *et al* ,2007)

7.2 .Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. (Valéry *et al* , 2007)

Le métabolisme cellulaire produit, à l'état physiologique, plusieurs variétés de RLO. Dans certaines conditions pathologiques, ces RLO peuvent être modulés qualitativement et quantitativement. Tous les RLO ne sont pas extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. (Valéry *et al* , 2007)

Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l' $O_2^{\bullet-}$ constitue la première forme radicalaire capable d'agresser les composantes cellulaires et matricielles. Parmi les fonctions pro-inflammatoires de l' $O_2^{\bullet-}$, on peut noter l'agression des cellules endothéliales, l'augmentation de la perméabilité microvasculaire et le recrutement des polynucléaires neutrophiles (PNN) sur les sites inflammatoires. (Valéry *et al* , 2007)

Synthèse bibliographique

Il est également un précurseur d'autres espèces radicalaires plus réactives comme le radical HO^\bullet formé par l'interaction de $\text{O}_2^{\bullet-}$ avec les ions métalliques libres (fer ou cuivre). En situation physiologique, la concentration libre de ces ions métalliques est particulièrement basse, car ils sont séquestrés par des protéines spécialisées comme la ferritine, de sorte que cette réaction n'a pas lieu. En revanche, ils sont libérés en situation pro-inflammatoire. Par ailleurs, $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut former du ONOO^- par combinaison avec le NO modifiant en plus la biodisponibilité de ce dernier. Parmi les RLO, le H_2O_2 peut diffuser dans le cytoplasme et traverser les membranes. (Valéry et al, 2007)

7.4. Sources des espèces réactives de l'oxygène :

Les sources métaboliques produisant les RLO sont nombreuses : chaîne respiratoire mitochondriale, cytochromes P-450, activité de la NADPH oxydase, myéloperoxydase, NO synthase, xanthine oxydase. (Valéry et al, 2007)

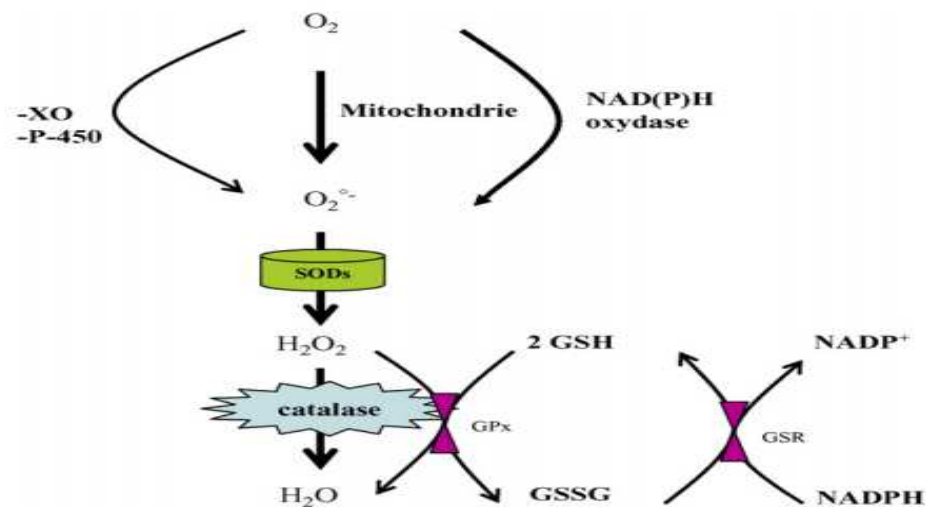


Figure 1. Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres.

GSH : glutathion ; GSSG : glutathion oxydé ; GSR : glutathion réductase ; XO : xantine oxydase.

(Valéry et al ; 2007)

7.5. Les espèces oxygénées activées :

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP (Adenosine DiPhosphate) en ATP (Adenosine TriPhosphate). Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des EOA. Celles-ci sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), ou le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (1O_2). Dans cette chimie particulière, les métaux de transition, comme le Fe^{2+} et le Cu^{2+} , agissent comme catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle. (Haleng et al, 2007)

7.6. Rôle des espèces réactives de l'oxygène

Le rôle des EOA est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'EOA pour percer la paroi membranaire de l'ovule. (Haleng et al, 2007)

Le monoxyde d'azote radicalaire ou NO^{\bullet} est un composé important; il est notamment synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la

L-arginine. C'est une molécule labile très diffusible, dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme (maintien du tonus vasculaire, neurotransmission, fonctionnement rénal ...). Toutefois, le NO^{\bullet} peut former avec l'anion superoxyde le peroxyde d'azote ($HOONO$), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques. Formés en trop grande quantité, les

EOA deviennent «pathologiques» en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion. (Haleng et al ,2007)

En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies. (Haleng et al ,2007)

8. Systèmes de défense anti-oxydants :

Les systèmes de défense anti-oxydants comportent :

- Des enzymes, telles que la superoxyde dismutase , la catalase , la peroxydase , capables d'éliminer de façon catalytique des radicaux libres et d'autres «espèces réactives»
- Des protéines, (transferrine, haptoglobine métallothionéine), qui diminuent la disponibilité des pro-oxydants tels que les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} , Cu^{2+}/Cu^+
- Des protéines comme les protéines de choc thermique , protégeant les biomolécules contre les agressions , notamment les oxydations
- Des composés de basse masse moléculaire (glutathion, α -tocophérol, acide ascorbique ; bilirubine , acide urique), capables de piéger les radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote

La composition en anti-oxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires , et les et les mécanismes de protection sont différents dans les milieux intra- et extracellulaires .notons dès à présent que, les systèmes de défense n'assurant pas une protection complète , l'organisme doit disposer de systèmes de réparation afin d'éliminer les molécules endommagés.

(Bonnefont et al , biochimie pathologique,1987)

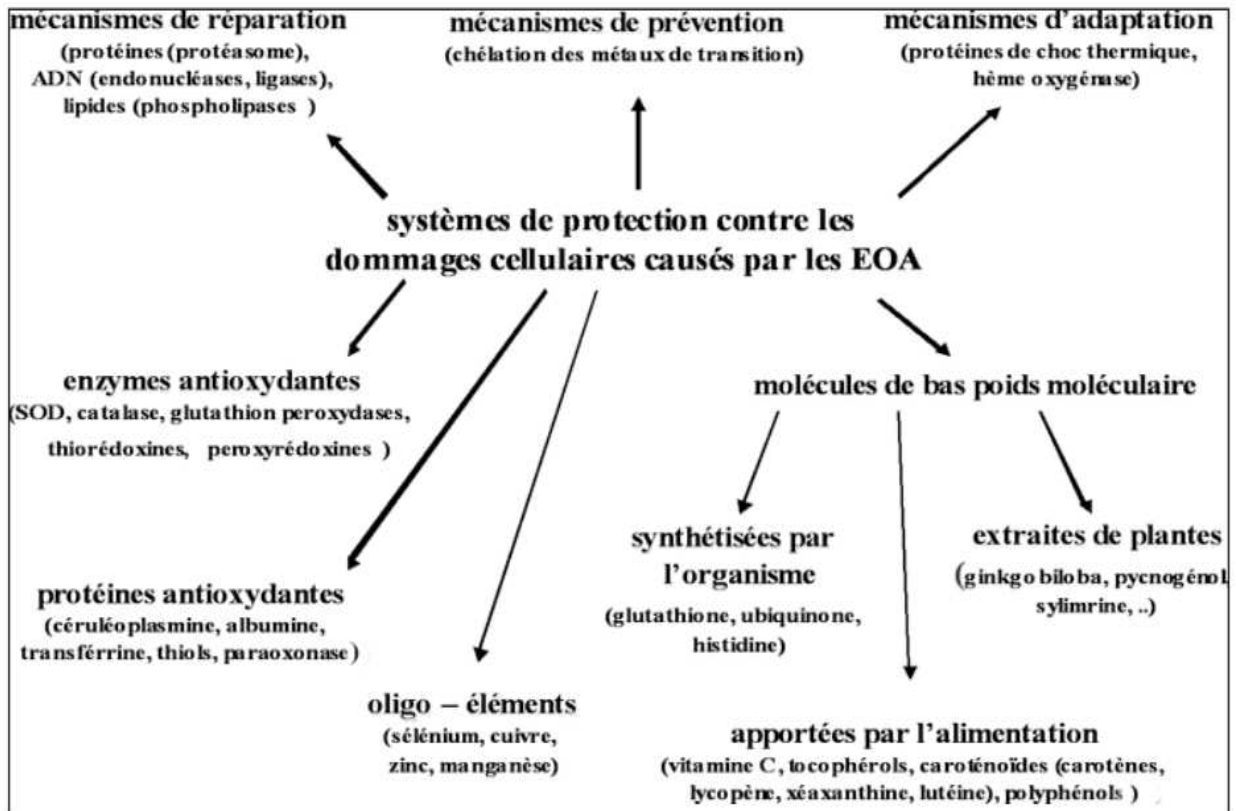


Figure 2 : Réseau des antioxydants (DEFRAIGNE et al, 2008)

8.1. Systèmes de défense enzymatiques

8.1.1. Les superoxyde dismutases (SOD)

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Chez l'homme, on décrit 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD1 cytosolique, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le système antioxydant majeur de la paroi artérielle : son expression et sa sécrétion sont augmentées par les facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II) et diminuées par l'homocystéine. (Haleng et al, 2007)

8.1.2. Les glutathion peroxydases (GPxs)

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium, elle est donc un bon reflet de cette carence. Toutefois, pour un apport adéquat en sélénium, les teneurs en GPx atteignent un plateau. Le dosage en GPx ne peut donc être utilisé comme marqueur d'une intoxication en sélénium. Cependant, sa synthèse étant rénale et hépatique, d'autres facteurs tels que l'insuffisance rénale ou la cytolyse hépatique peuvent modifier sa concentration. (Haleng et al, 2007)

8.1.3. Le système thiorédoxine

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares. L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique. (Haleng et al, 2007)

8.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

8.2.1. Le glutathion et les protéines-thiols

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intra-cellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer. Les autres propriétés antioxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire. L'apport recommandé journalier est d'environ 300 mg (agrumes). La plupart des protéines dont l'albumine

contiennent des groupements « thiols » qui possèdent des propriétés réductrices et piègent facilement les espèces oxygénées activées. (Haleng *et al*, 2007)

8.2.2. La vitamine C

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des EOA (HO^\bullet ou $\text{O}_2^{\bullet-}$). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer. (Haleng *et al*, 2007)

8.2.3. L'acide urique

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux (OH^\bullet , ROO^\bullet , $\text{NOO}^\bullet\dots$). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C). Les propriétés antioxydantes de l'urate *in vivo* peuvent être appréciées indirectement par le fait qu'un produit de réaction de l'urate avec les EOA, l'allantoïne, est présent à des taux élevés lors d'un stress oxydant. (Haleng *et al*, 2007)

8.2.4. La bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Composé non hydrosoluble, elle se lie à l'albumine dans un rapport stœchiométrique 1/1, ce qui empêche sa pénétration dans des tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine est capable de piéger ROO^\bullet et l'oxygène singulet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires. (Haleng *et al*, 2007)

8.2.5. Les polyphénols

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre. (Haleng *et al*, 2007)

8.2.6. Les oligo-éléments

- **Le sélénium** : Le sélénium n'est pas un anti-oxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx. La dose journalière recommandée est de 50-70 µg/jour. Les aliments riches en sélénium sont, notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail...
- **Le cuivre** : A concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD, la cytochrome C oxydase, la dopamine β-hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'EOA (réactions de Fenton) et peut – lorsque sa concentration est élevée devenir pro-oxydant. Les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 2,5 mg. Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle, le foie de veau.
- **Le zinc** : Le zinc joue un rôle de cofacteur pour de nombreux enzymes et intervient ainsi dans de nombreuses fonctions comme le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines, le fonctionnement de l'anhydrase carbonique. Comme le cuivre, le zinc est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège également les groupements thiols des protéines et il peut inhiber les réactions de formation d'EOA induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre. Le rapport Cu / Zn, (normalement inférieur à 1,5) sera un excellent indicateur de l'état de stress oxydant d'un individu. Les aliments les plus

riches en zinc sont les viandes et les poissons, les céréales complètes et les légumes secs; les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 20 mg. (Haleng *et al* ,2007)

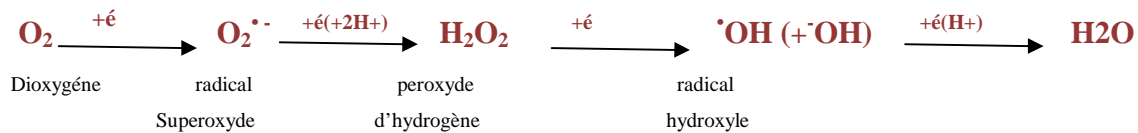


Figure 3 : Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène . (Monique *et al* ,2003)

9. Stress oxydant pathologique et physiologique

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue d'EOA, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante . La pollution, le tabagisme, une consommation excessive d'alcool, la prise de pilule contraceptive, l'exposition immodérée au soleil ou à des radiations sans protection suffisante, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont, par exemple, autant de sources de production d'EOA. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydante. Si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de pathologies diverses. Un stress oxydant «pathologique» est ainsi potentiellement impliqué dans de nombreuses affections (plus de 200 ont été recensées) ou dans le développement de complications associées à celles-ci (e.g. diabète). A titre d'exemple, l'oxydation des lipides est un facteur favorisant la survenue de maladies cardiovasculaires tandis que celle de l'ADN se retrouve dans diverses étapes qui conduisent au développement de cancers. (Defraing *et al* , 2008)

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de toxicologie de département de biologie Université de Tébessa, sur 42 escargots adultes *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 al, 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 *Helix aspersa aspersa*, *Helix aspersa elata* et *Helix aspersa maxima* (**Bonnet et al, 1990**).



Figure 4 : L'escargot *Helix aspersa*

1.1.1 . Zoologie

Helix aspersa aspersa est une sous-espèce circumméditerranéenne ubiquiste dont le polymorphisme se traduit par une variation de la taille, de la coloration, de la forme, de l'épaisseur et de la sculpture de la coquille. La coloration et le système de bandes de la coquille sont d'origine génétique mais le biotope a peut-être une action secondaire sur leur variation. Ce polymorphisme a donné apparemment, en grande partie, à la race sa potentialité d'adaptation et d'acclimation (Chevallier, 1977).

1.1.1.1 . Description morphologique

L'escargot Petit-Gris *Helix aspersa aspersa* est un mollusque sourd et quasiment aveugle mais ses tentacules sont équipés de deux épithéliums olfactifs très puissants. Simplement en balançant ses tentacules pour détecter les odeurs qui l'entourent, l'escargot peut repérer une cible à plus d'une centaine de mètres. Il est adulte à deux ans mais peut vivre plus de cinq ans. 99% de l'activité de l'escargot, y compris ses "repas", a lieu de nuit avec un pic de 2 à 3 heures après la tombée de la nuit. La fraîcheur nocturne et la rosée facilitent ses déplacements (Chase, 1986).

Cet auteur indique que le Petit-Gris mesure entre 2,8 et 3,5 cm pour un poids adulte compris entre 7 et 15 g. Il porte une coquille calcaire à motifs variables mais le plus souvent brune rayée de noir. Sa spirale tourne généralement dans le sens des aiguilles d'une montre. La coquille d'*Helix aspersa* est gris jaunâtre souvent ornée de 1 à 5 bandes interrompues, brun violacé.

Deux grandes parties sont distinguées : le pied et les viscères (Figure 5). Les viscères correspondent aux organes situés à l'intérieur de la coquille et comprennent le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge également dans le pied. Le pied comporte essentiellement la sole pédieuse, musculeuse, la partie antérieure du tube digestif et le système nerveux. (Kerney *et al.*, 2006)

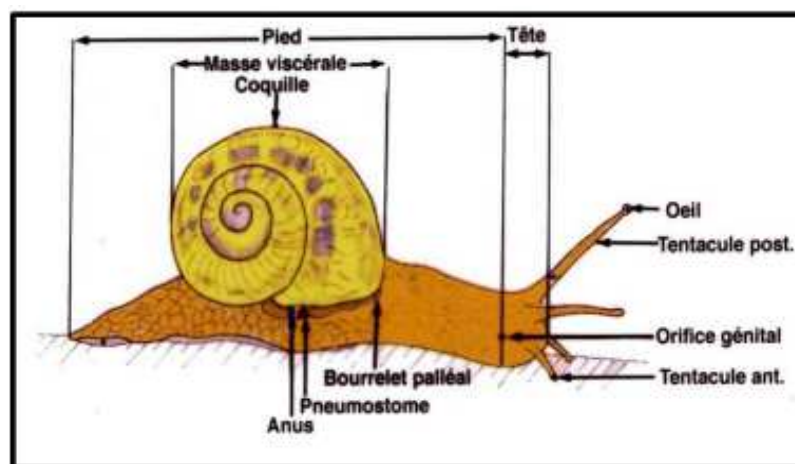


Figure 5 :Morphologie externe de l'escargot (Kerney *et al.*, 2006).

1.1.1.2 . Description anatomique

Le corps d'un escargot consiste en un pied unique, une tête et une masse viscérale enroulée qui est placée dans la coquille. Le mouvement a lieu grâce à l'expansion et l'extraction de muscles dans le pied. Des glandes placées dans la partie antérieure du pied sécrètent le mucus. Il y a aussi des glandes de mucus sur le reste du corps protégeant l'escargot contre la perte d'eau. Deux paires de tentacules sont placées sur la tête. La paire supérieure porte les yeux. La coquille est sécrétée par un épais pli de peau, appelé le manteau. La coquille est reliée au corps par un puissant muscle qui est attaché à la columelle (ou axe d'enroulement des coquilles de mollusques gastéropodes). Il a des "ramifications" à la tête et aux tentacules. 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 (Figure 6).

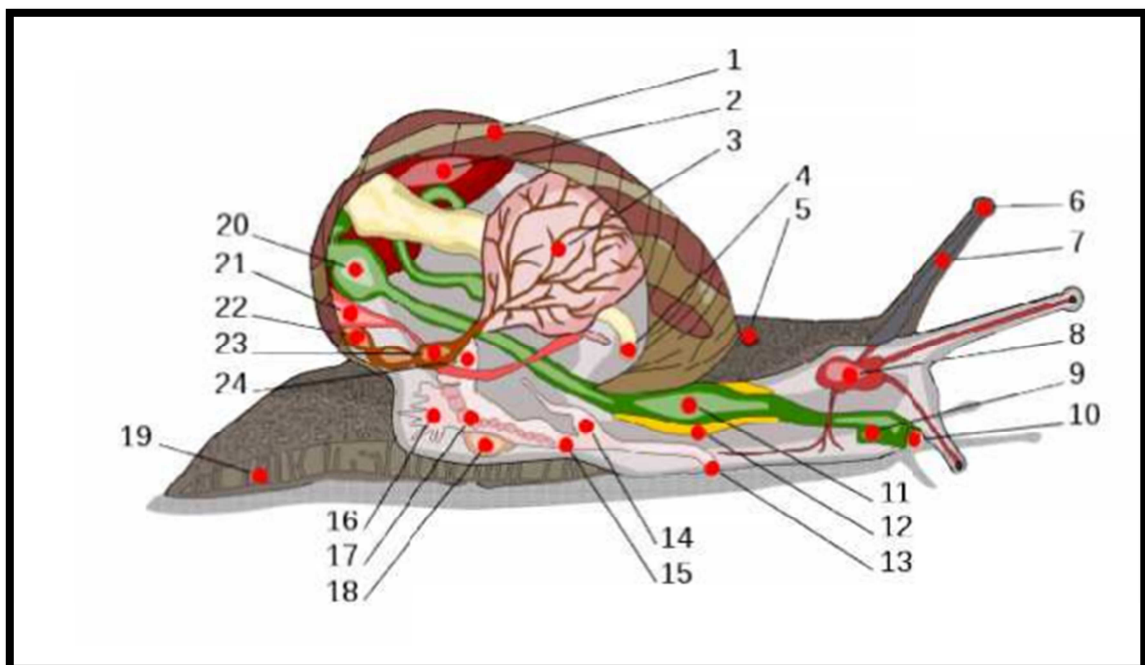


Figure 6 : Schéma en coupe de l'anatomie d'un escargot (Quibik, 2007).

- 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: Oviducte. 18: Sac de dards.
19: Pied. 20: Estomac. 21 : Rein. 22: Manteau. 23: Cœur. 24: Canal déférent

1.1.2 . Déplacement

Helix aspersa se déplace, seulement vers l'avant, grâce à son pied, qui est en fait un gigantesque muscle qui se contracte et s'allonge alternativement. Sa vitesse moyenne pour un adulte est d' 1 mm/s soit 3,6 m/h. L'escargot arrive à déplacer 170 fois son poids, autrement dit un escargot qui pèse 10 g par exemple peut déplacer un poids d'environ 1,5 kg.

Ses glandes sécrètent différents types de mucus la « bave » contenant de nombreux composés (allantoïne, collagène, élastine) qui lui permettent à la fois d'avancer plus facilement en glissant sur les obstacles et de se fixer même verticalement sur certaines parois.

Le mucus sert aussi à se débarrasser de certaines substances, comme les métaux lourds, et entre aussi dans la composition de la coquille. Le mucus est épais, il durcit et sèche au contact de l'air en laissant une traînée brillante à la lumière (**Figure 7**). Les mucus sont différentes sécrétions visqueuses et translucides, produites par divers organismes, et chez ceux-ci par diverses organes ou muqueuses. Les escargots produisent des mucus externes ayant des fonctions de protection et parfois de facilité de déplacement, voire de communication. (**Pol, 2001**).



Figure 7 : Ondes de contraction sur la face ventrale des pieds d'escargots (**Pol, 2001**).

1.1.3 . Alimentation

Helix aspersa aspersa, à l'image de tous les escargots, s'alimente grâce à une langue dentée nommée *radula* formée de 1 500 à 2 500 dents. Sa langue est 16 fois couverte d'aspérités très dures, disposées en rangées régulières, comme la râpe du menuisier (**Figure 8**). La bouche a une langue appelée *radula*. Au dessus de la bouche, il y a une arête dure et la nourriture est écrasée entre la *radula* et cette arête (**Beazley, 2000**)

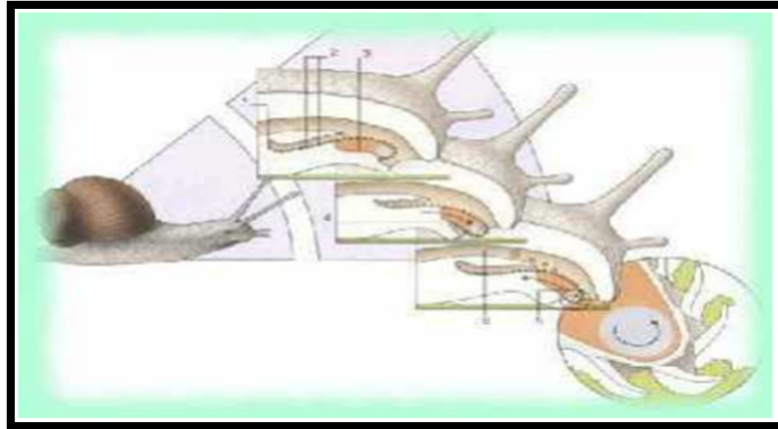


Figure 8: Schéma du fonctionnement de la *radula* (**Gireaud, 2008**).

1 : Langue râpeuse. 2: Minuscules dents. 3: Cartilage. 4: Sortie de la *radula*.
5: Les minuscules dents sont retirées. 6: Les particules de nourriture sont avalées.

Helix aspersa aspersa est phytophage (phyllophage et succivore), carpophage (ou frugivore), détritivore et parfois cannibale. Il peut s'attaquer aux plantes cultivées des jardins, causant parfois de gros dégâts aux récoltes. Il héberge dans son intestin une flore bactérienne qui participe à la digestion des végétaux. Les bactéries se maintiennent en vie durant l'estivation ou l'hibernation, en se nourrissant du mucus qui est sécrété par l'épithélium intestinal (**Charrier et al,2006**).

1.1.4 . Longévité

Helix aspersa est adulte à deux (02) ans mais peut vivre plus de cinq (05) ans. Dans la nature, il dépasse rarement l'âge de trois (03) ans. Sa mort est souvent due à des prédateurs ou à des parasites. En captivité, sa longévité est bien plus longue et va de 10 à 15 ans. Certains individus ont vécu plus de trente (30) ans (**Taylor, 1883**).

1.1.5 . Hibernation et estivation

Helix aspersa, escargot terrestre, n'est actif que lorsque l'humidité est suffisamment élevée. Dans le cas contraire, l'animal se rétracte à l'intérieur de sa coquille qu'il obture par un voile muqueux (courte inactivité) ou par un *épiphragme*, ce qui lui évite la déshydratation. La photopériode et la température sont des variables saisonnières qui induisent les états d'inactivité. Hibernation et estivation sont donc des réponses à des *stress* environnementaux prévisibles (**Bailey et al, 1981**)

La photopériode est le principal facteur qui déclenche l'activité ou l'inactivité des escargots, selon qu'ils sont soumis à des régimes lumineux mimant des jours longs (plus de 15 h de lumière) ou courts. La connaissance de ce phénomène est primordiale pour une exploitation rationnelle de l'animal, permettant ainsi, en jouant sur les durées d'éclairement journalier, de stimuler la croissance et la reproduction ou, au contraire, l'entrée en hibernation (**Le Guhennec et al, 1985**)

L'*épiphragme* est un bouchon de mucus, plus ou moins imprégné de calcaire, qui durcit en séchant (**Figure 9**).



Figure 9 : Escargot en hibernation avec son épiphragme (Grobe, 2006)

1.1.6 . Reproduction et cycle biologique

La période de reproduction commence au début du mois de mai et dure jusqu'à la miseptembre. 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 et al , 1981). 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).

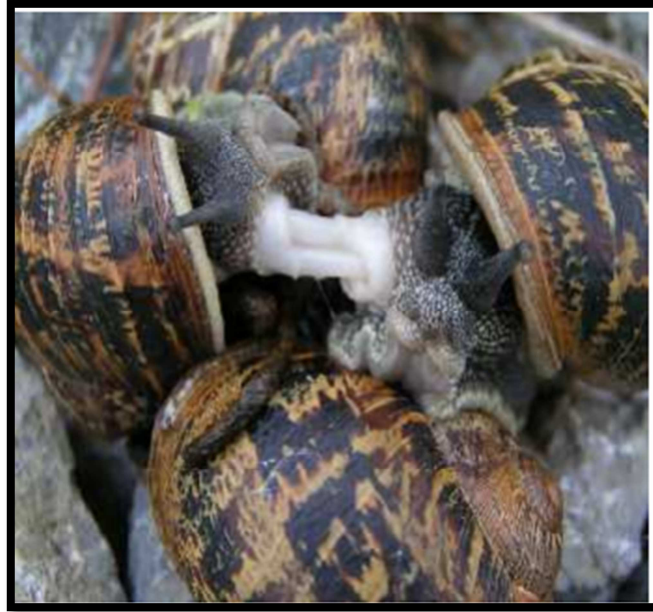


Figure 10 : Accouplement de Petits-Gris (**Buron-Mousseau, 2014**).

1.1.7 .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.

1.2 .Matériel chimique

Le matériel chimique utilisé dans cette expérimentation est une préparation commerciale de nanoparticules a base d'oxyde de zinc de couleur blanche. (**Figure12**)

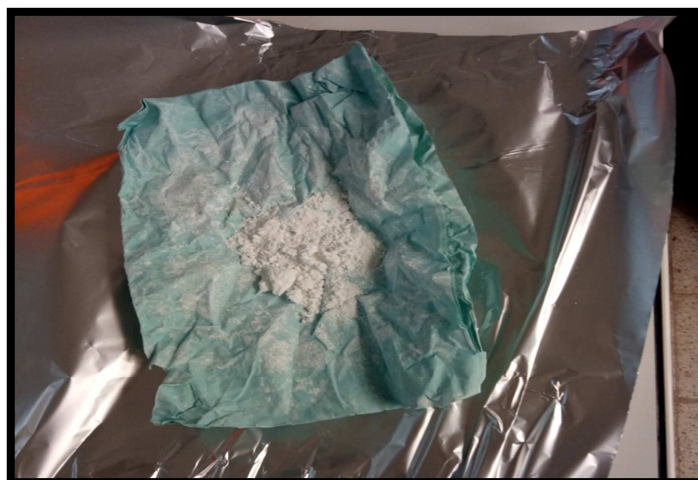


Figure 11 : Nanoparticules d'oxyde de zinc en poudre

2 . Méthodes

2.1 . Condition d'élevage

Tous les essais sur *Helix aspersa* , adultes, de poids moyen sont réalisés dans les mêmes conditions environnementales que celles décrites pour l'élevage :

- photopériodes 18 h de lumière /24 h, Eclairage par des tubes néon de type « lumière de jour »
- Température $20 \pm 2^\circ \text{C}$
- Hygrométrie : 80% à 95%

Les escargots sont réparties dans des boîtes de plastiques transparentes (23.5 X 16.5 X 10.5 cm) avec couvercle perforé , et chaque boîte contient une éponge mouillée pour maintenir l'humidité , l'alimentation est fournie dans des boîtes de pétrie .Les boîtes sont nettoyées régulièrement tous les 3 jours (Gomot *et al* ,1997).



Figure 12 : L'élevage des escargots *Helix aspersa* dans laboratoire.

2.2 . Exposition d'*Helix aspersa* à la nourriture

La « farine de blé » est utilisée dans toutes les expériences d'intoxication des escargots par la nourriture. La contamination est réalisée le jour précédant la mise en

route des expérimentations Les nanoparticules de ZnO sont ajoutées à la farine sous forme d'une fine poudre. Dans tous les cas, la nourriture est ensuite homogénéisée manuellement. La nourriture ainsi contaminée est conditionnée dans des boîtes en plastique ou dans des bêchers en verre puis conservées à -20°C à l'obscurité ou à 20°C afin de limiter la dégradation du produit ; les aliquotes sont décongelés 1 à 2 heures avant d'être apportés aux animaux selon la méthode de (Coeurdassier , 2001).

2.3 . Mode de traitement

Le traitement des animaux a été effectué par addition des concentrations croissantes des nanoparticules d'oxyde de Zinc 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 6 lots de 7 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 ZnO (Coeurdassier , 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 boites d'élevage. Ce nettoyage est fait, autant que possible, à heure fixe. Il comprend un lavage des parois des boites à l'eau distillée, un changement de l'éponge absorbante au fond des boites ou un ramassage des fèces des escargots déposés sur le substrat. Ensuite, l'ensemble des récipients d'essai est humidifié à l'eau distillée.

2.4 . 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 boites 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 et les reins été excisés, lavées avec l'eau physiologique (Coeurdassier. M., 2001).



Figure 13 : Dissection des escargots *Helix aspersa* et prélèvement des organes

3 . Paramètres étudiés

3.1 . Paramètres physiologiques :

3.1.1 . Le poids frais de l'escargot (tissus mous+coquille)

Les escargots sont pesés individuellement avant le traitement .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 ZnO sur des escargots adultes de *Helix .aspersa*. Les pesées sont toujours réalisées avant le nettoyage de l'enceinte d'essai (**Gomot, 1997**).

3.1.2 . Le diamètre de coquille :

est mesuré avec un pied à coulisse (avec une précision de 10-1mm). 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**)

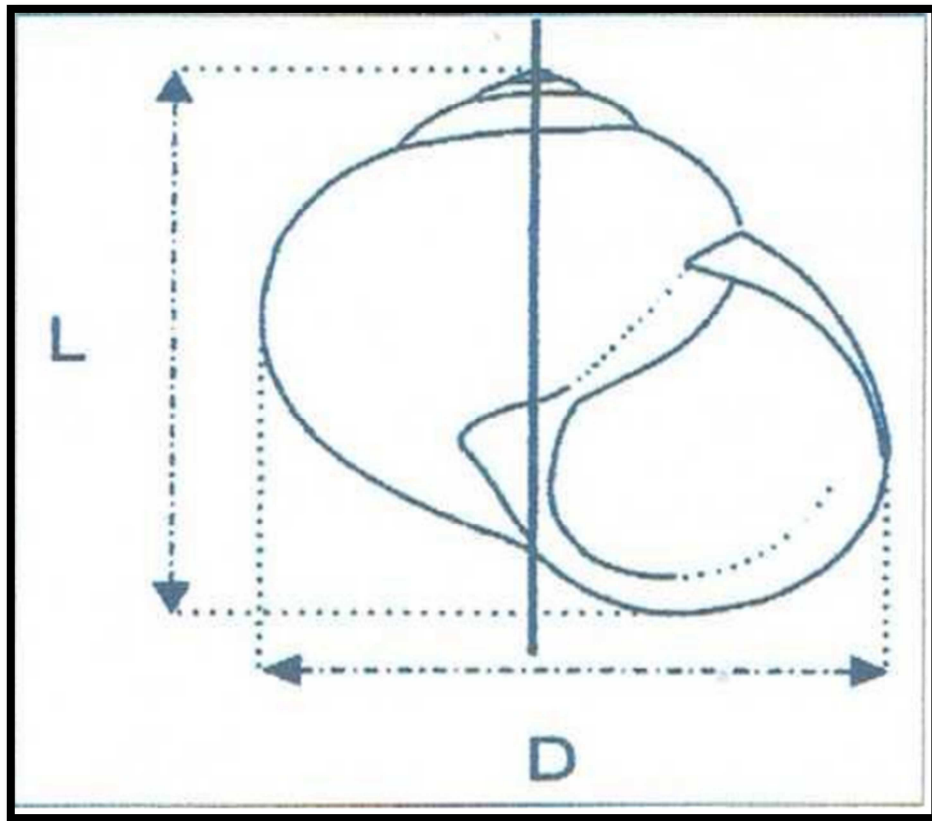


Figure 14 : Mesure des deux diamètres D et L de *Helix aspersa* (Coeurdassier, 2001).

3.1.3 .Le poids frais de la coquille, des tissus mous

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).

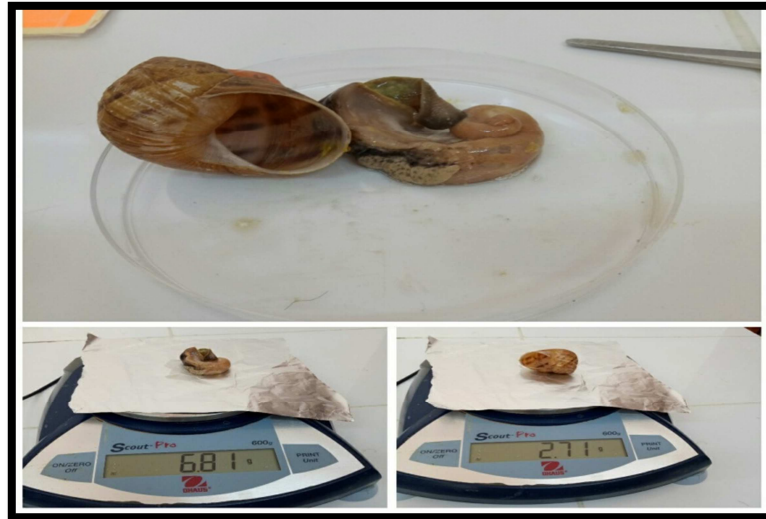


Figure15 : Mesure de poids frais de la coquille et tissus mous de *Helix aspersa* dans laboratoire (photo personnel)

3.1.4 .Mortalité

La mort d'un individu est généralement facile à déterminer : le pied flasque et jaunâtre est le plus souvent sorti de la coquille. La sole pédieuse n'adhère à aucune surface. Le corps luisant et très visqueux indique que la liquéfaction des tissus est en cours. L'odeur nauséabonde que dégage l'escargot est également un indicateur. En cas de doute, le pied est stimulé à l'aide d'une aiguille ou d'une paire de pinces brucelles. L'absence de réaction permet de conclure à la mort de l'individu (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.

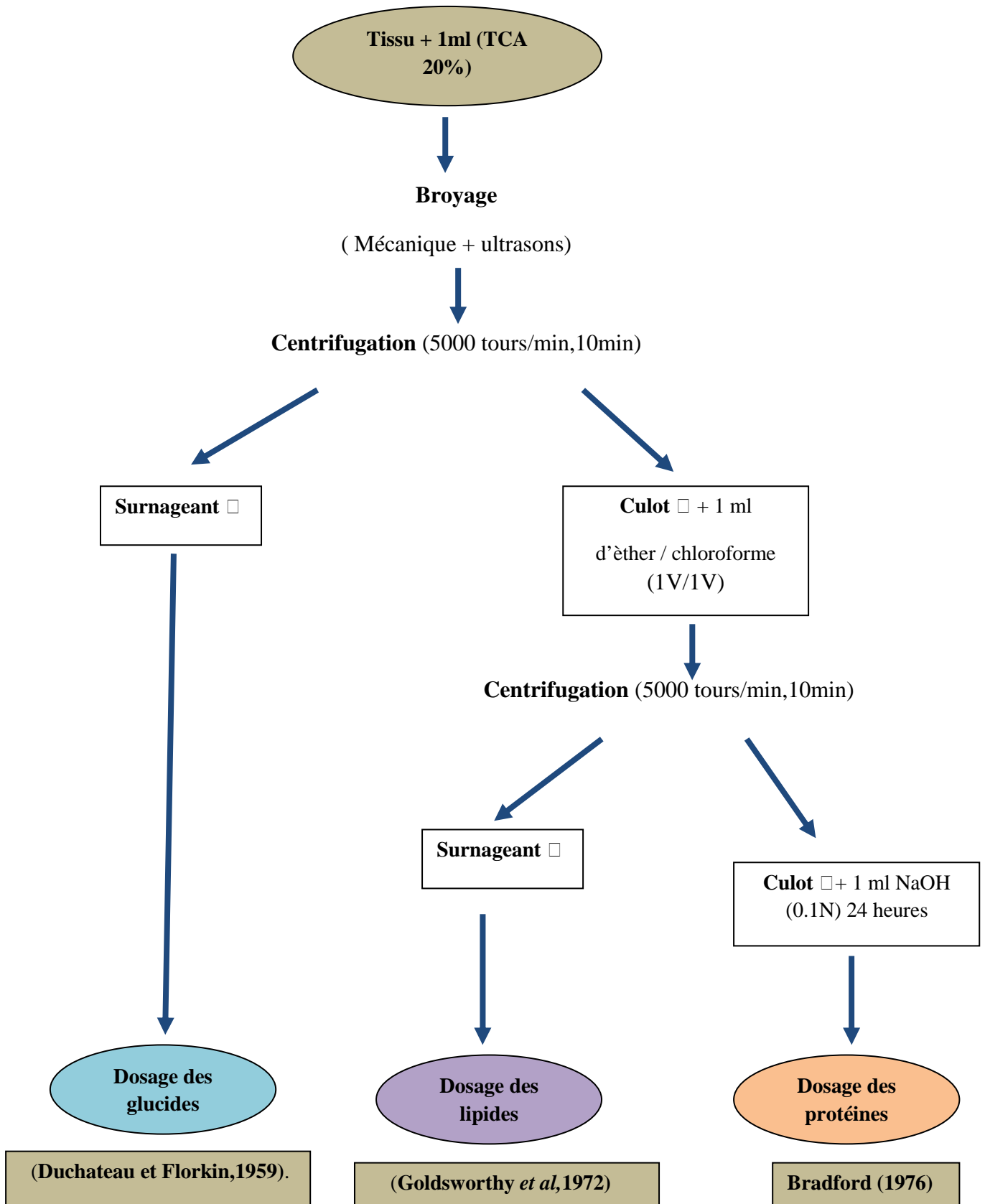


Figure 16 : Principales étapes d'extraction des métabolites: protéines, glucides et lipides (Shibko et al, 1966).

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.

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 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 620 nm contre un blanc de gamme.

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)

Après évaporation des prises aliquotes de 100µl 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 200µl de chaque tube auxquels on ajoute 2,5 ml de réactif sulfo-phospho-vanillinique 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 T 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 17.3.1).

Résultat

Résultats

1.Effets des nanoparticules sur les biomarqueurs physiologiques

1.1. Effet des nanoparticules de ZnO sur le poids moyen des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps

La figure (19) montre une diminution du poids moyen des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO en fonction du temps par rapport aux témoins. Cette diminution est bien illustrée durant la troisième semaine de traitement chez les escargots traités par la dose (15000 μ g/g).

Le test T de student donne des différences significatives ($p \leq 0.05$) pour les concentrations (500 μ g/g, 5000 μ g/g), et des différences non significatives ($p > 0.05$) pour les concentrations (1000 μ g/g, 10000 μ g/g), ainsi que des différences hautement significatives ($p < 0,01$) chez les traités par la concentration (15000 μ g/g) par rapport aux escargots témoins.

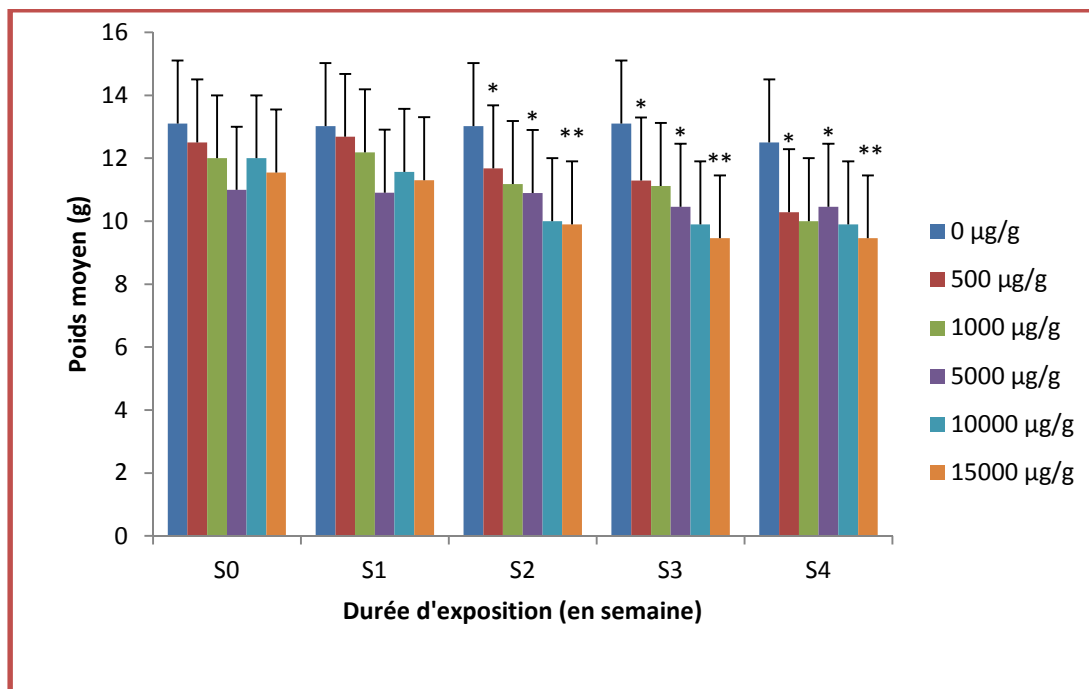


Figure 19: Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'évolution du poids moyen des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

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

1.2. Effet des nanoparticules de ZnO sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots *Helix aspersa* :

La figure (20) montre une légère diminution du diamètre D de la coquille des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO en fonction du temps. Cette diminution est plus remarquable chez les escargots traités par la dose (15000µg/g) durant la deuxième semaine de traitement.

Le test T de student donne des différences non significatives ($p>0.05$) pour les différentes concentrations chez les traités par rapport aux témoins.

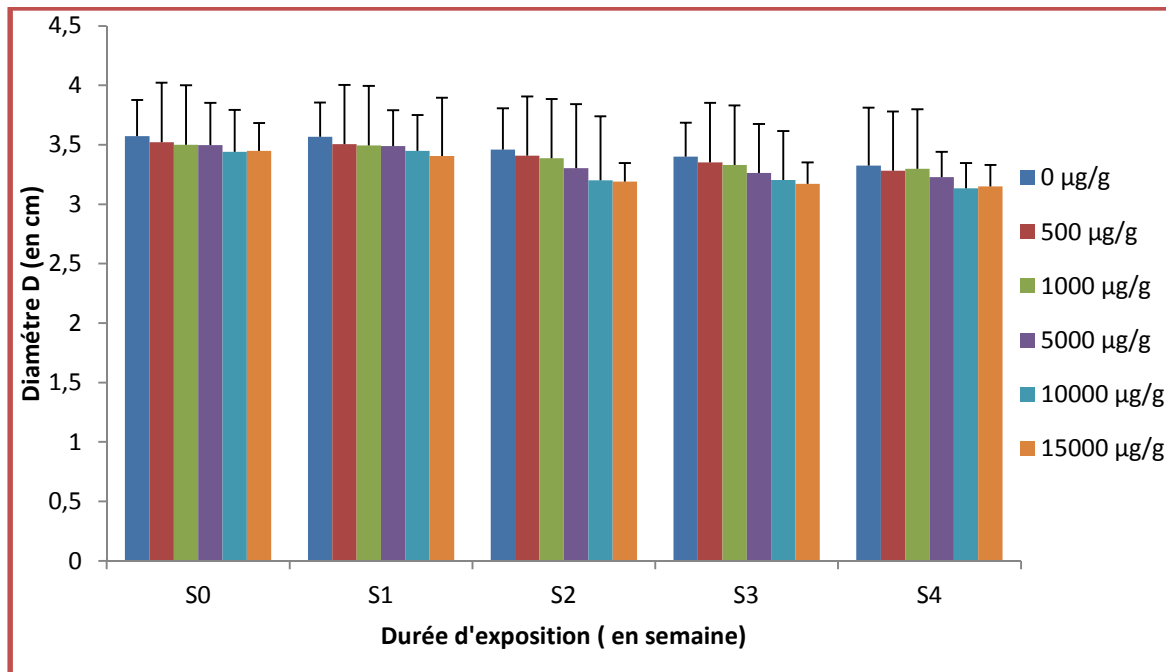


Figure 20 : Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

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

1.3.Effet des nanoparticules de ZnO sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots *Helix aspersa*

La figure (21) montre une diminution du diamètre L de la coquille des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO par rapport aux témoins en fonction du temps. Cette diminution est plus importante durant la deuxième semaine de traitement surtout chez les escargots traités par la dose 500µg/g.

Le test T de student donne des différences non significatives ($p>0.05$) du diamètre L de la coquille pour les différentes concentrations chez les traités par rapport aux témoins.

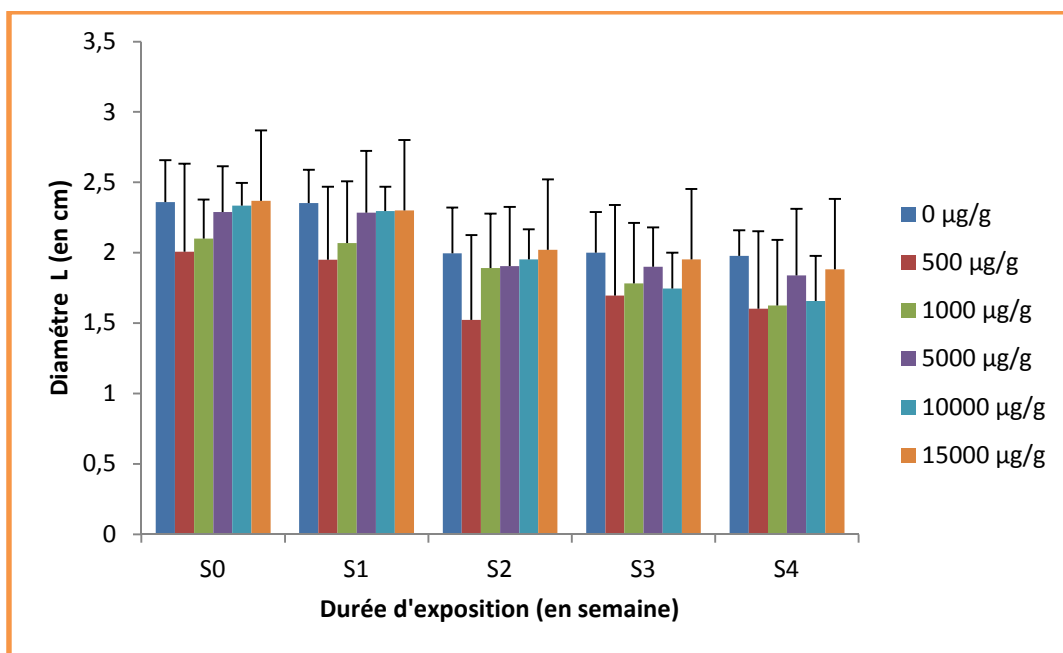


Figure 21: Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'évolution du diamètre L de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

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

1.4. Effet des nanoparticules de ZnO sur l'évolution du poids moyen de la coquille des escargots *Helix aspersa*

La figure (22) montre une diminution du poids moyen de la coquille des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO en fonction de temps par rapport aux témoins Cette dernière est bien illustrée chez les escargots traités par la dose (15000µg/g).

Le test T de student montre des différences non significatives ($p > 0.05$) pour les concentrations (500µg/g ,1000µg/g ,5000µg/g et 10000 µg/g) et des différences très hautement significatives ($p \leq 0.001$) pour la concentration (15000µg/g) des escargots traités par rapport aux témoins après 28 jours de traitement.

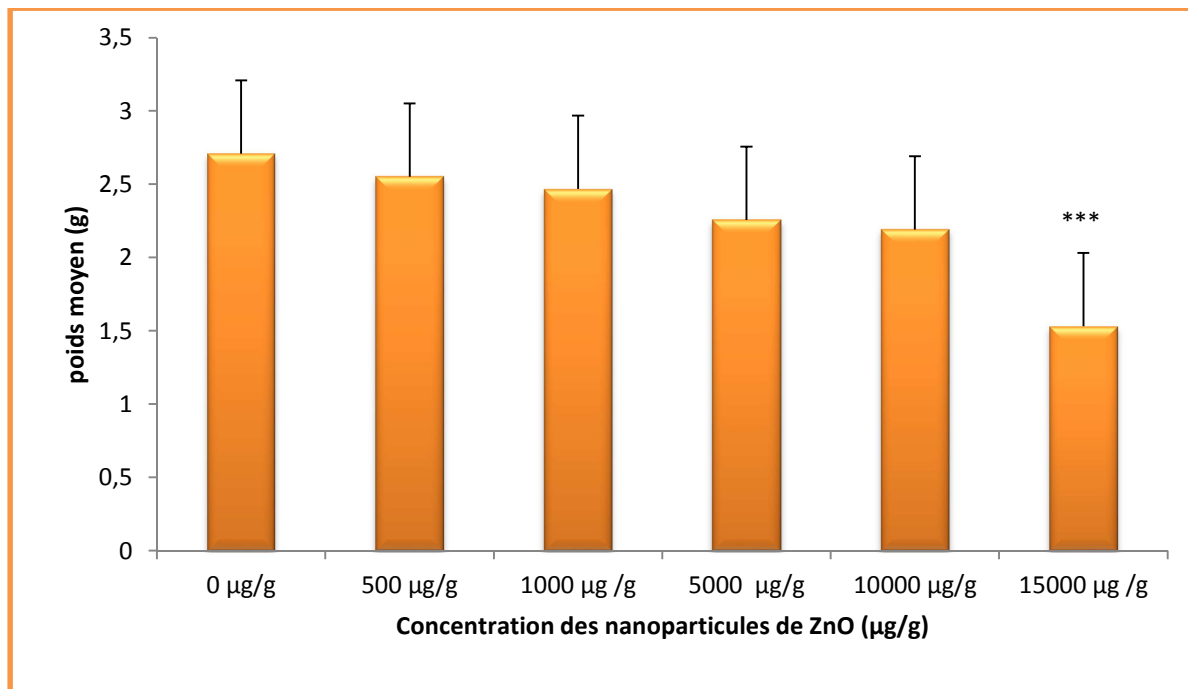


Figure 22 : Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'évolution du poids moyen de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

différence*** très hautement significative ($p < 0,001$).

1.5. Effet des nanoparticules de ZnO sur l'évolution du poids moyen de la tissu mou des escargots *Helix aspersa*

La figure (23) montre une diminution du poids moyen du tissu mou des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO en fonction du temps par rapport aux témoins, cette diminution est plus importante surtout chez les escargots traités par la dernière concentration.

Le test T de student donne des différences non significatives ($p > 0.05$) pour les concentrations (500 $\mu\text{g/g}$, 1000 $\mu\text{g/g}$, 5000 $\mu\text{g/g}$ et 10000 $\mu\text{g/g}$) et des différences très hautement significatives ($p \leq 0.001$) pour la concentration (15000 $\mu\text{g/g}$) des escargots traités par rapport aux témoins après 28 jours de traitement.

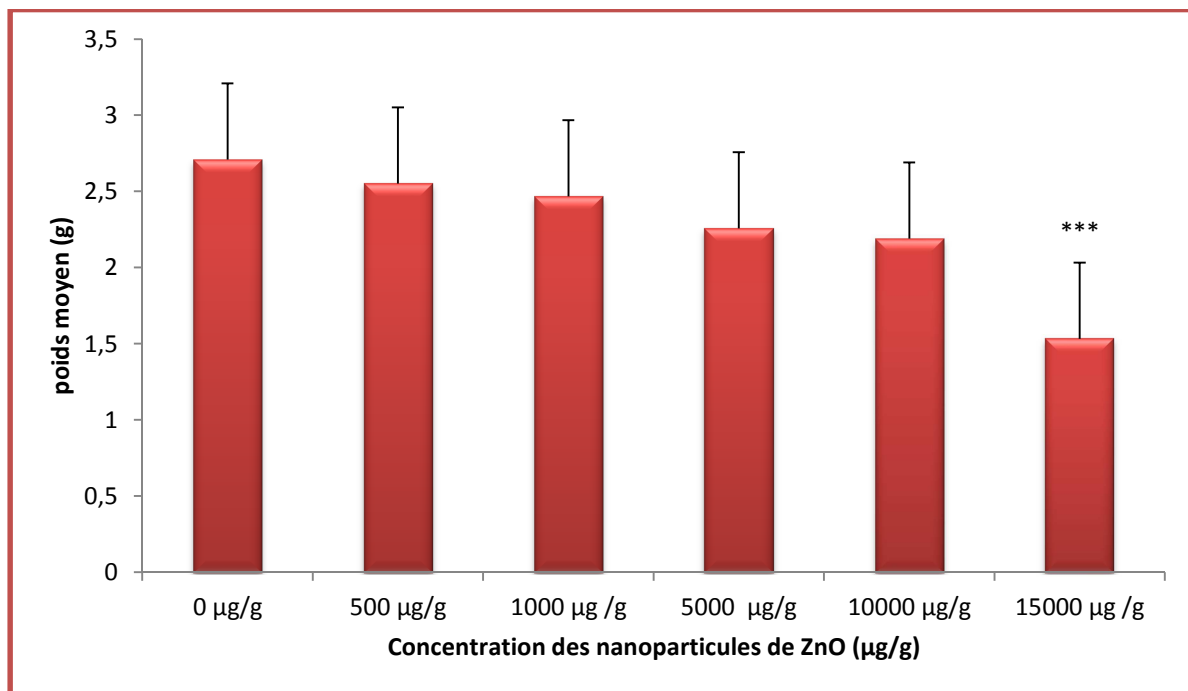


Figure 23: Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'évolution du poids moyen du tissu mou des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

différence*** très hautement significative ($p < 0,001$).

1.6. Effet des nanoparticules de ZnO sur la mortalité des escargots *Helix aspersa*

La figure (24) montre les pourcentages cumulatifs de mortalité des escargots traités par les différentes doses de ZnO pendant quatre semaines de traitement. Cette mortalité augmente avec l'augmentation de la concentration de ZnO avec les pourcentages suivants : 28.57% ,28.57% ,57.14% de mortalité chez les escargots traités respectivement par les concentrations (5000µg/g ,10000µg/g et 150000 µg/g).

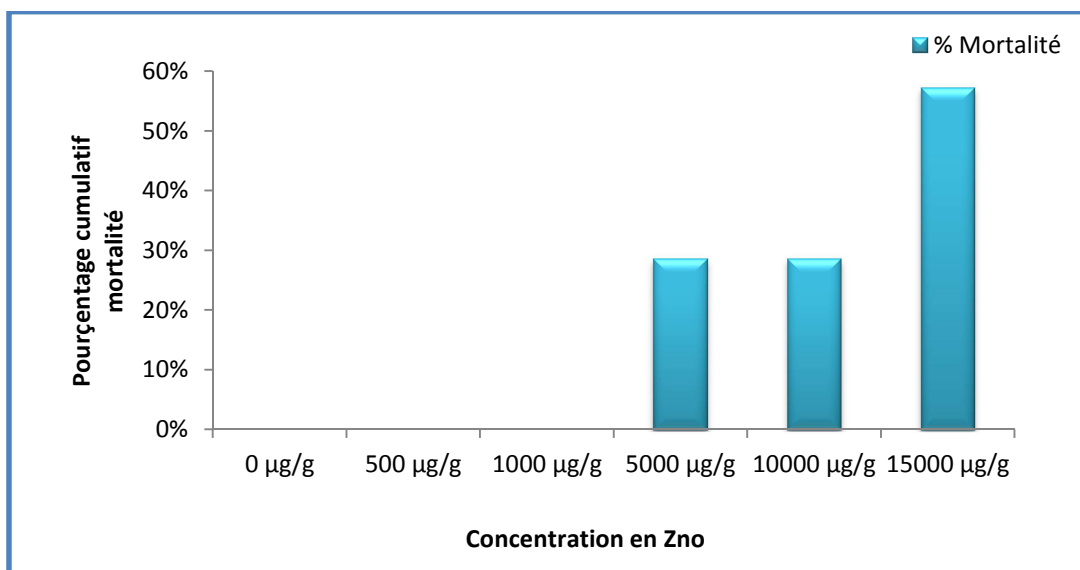


Figure 24 : Pourcentage cumulatif de mortalité des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissante de ZnO.

2. Analyses biochimiques

2.1. Dosage des métabolites au niveau de l'hépatopancréas et les reins chez les escargots *Helix aspersa*

Le taux des protéines, des glucides et des lipides a été déterminé dans l'hépatopancréas et les reins d'*Helix aspersa*. La quantification de ces métabolites a été effectuée à partir d'une courbe de référence correspondant à chaque métabolite (Annexes).

2.1.1. Effet sur le taux des protéines

- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur le taux des protéines au niveau de l'hépatopancréas :** La figure (25) montre une augmentation du taux de protéine totale au niveau de l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO par rapport aux témoins, cette augmentation est bien illustrée chez les escargots traités par la dose 5000µg/g.

Le test T de student donne des différences significatives ($p \leq 0.05$) pour les concentrations (500µg/g, 1000µg/g et 15000µg/g) et des différences hautement significatives ($p \leq 0.01$) pour la concentration (5000µg/g, 10000 µg/g) dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins après quatre de traitement.

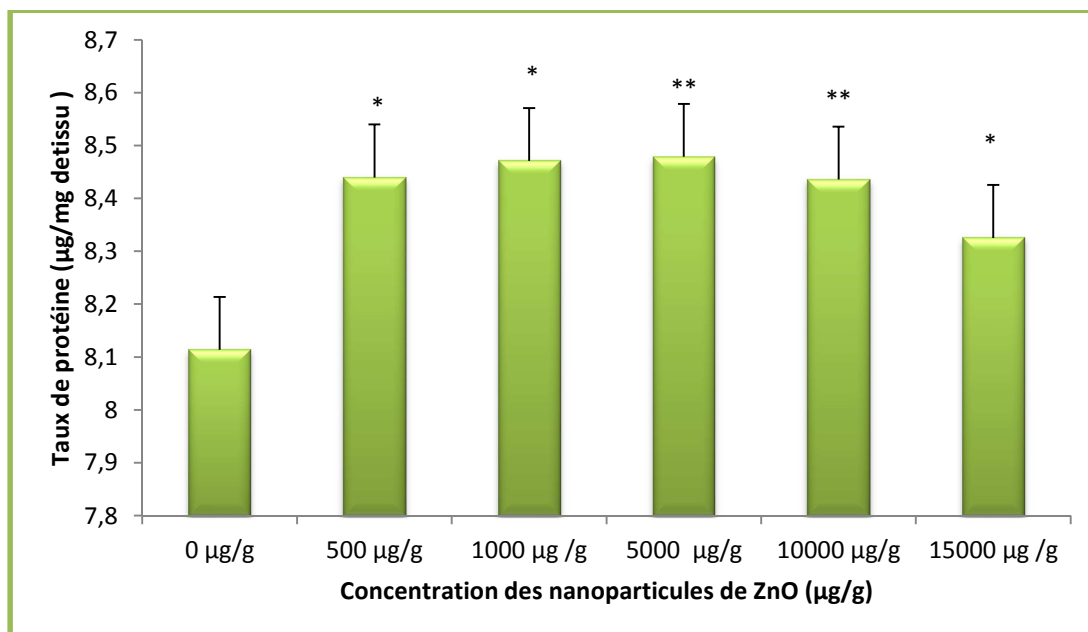


Figure 25: Variation du taux des protéines totales en (µg/mg de tissu) au niveau du l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc.

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

- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur le taux des protéines au niveau du rein :** La figure (26) montre une augmentation des taux de protéines totales au niveau des reins des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO par rapport aux témoins, cette augmentation est plus remarquable chez les escargots traités par la dose 15000 μ g/g.

Le test T de student montre des différences non significatives ($p > 0.05$) pour les concentrations (500 μ g/g, 1000 μ g/g, 5000 μ g/g, 10000 μ g/g) et des différences hautement significatives ($p \leq 0.01$) pour la concentration (15000 μ g/g) au niveau des reins des escargots traités par rapport aux témoins après quatre semaines de traitement.

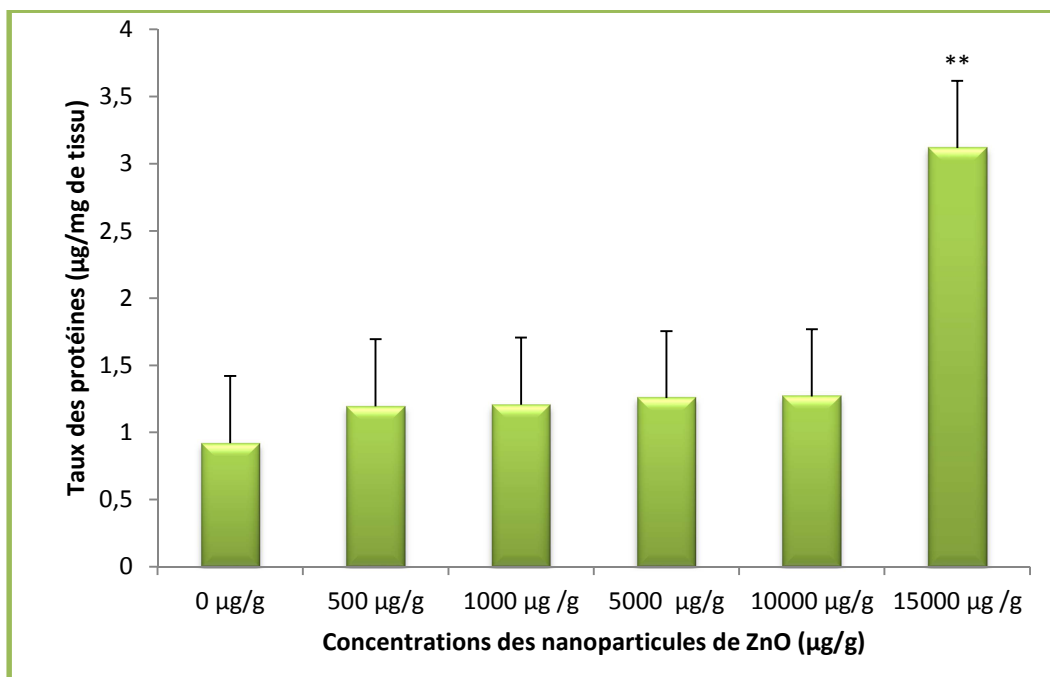


Figure 26: Variation du taux des protéines totales en (μ g/mg de tissu) au niveau du rein d'*Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc.

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

2.1.2. Effets sur le taux des glucides

- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur le taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas:** La figure (27) montre une diminution du taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO par rapport aux témoins, Cette diminution est plus remarquable chez les escargots traités par la dose 15000µg/g d'oxyde de zinc .

Le test T de student donne des différences non significatives ($p > 0.05$) pour les concentrations (500µg/g, 1000µg/g). et des différences significatives ($p \leq 0.05$) pour les concentrations (5000µg/g et 10000µg/g, 15000µg/g) dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins après quatre semaines de traitement.

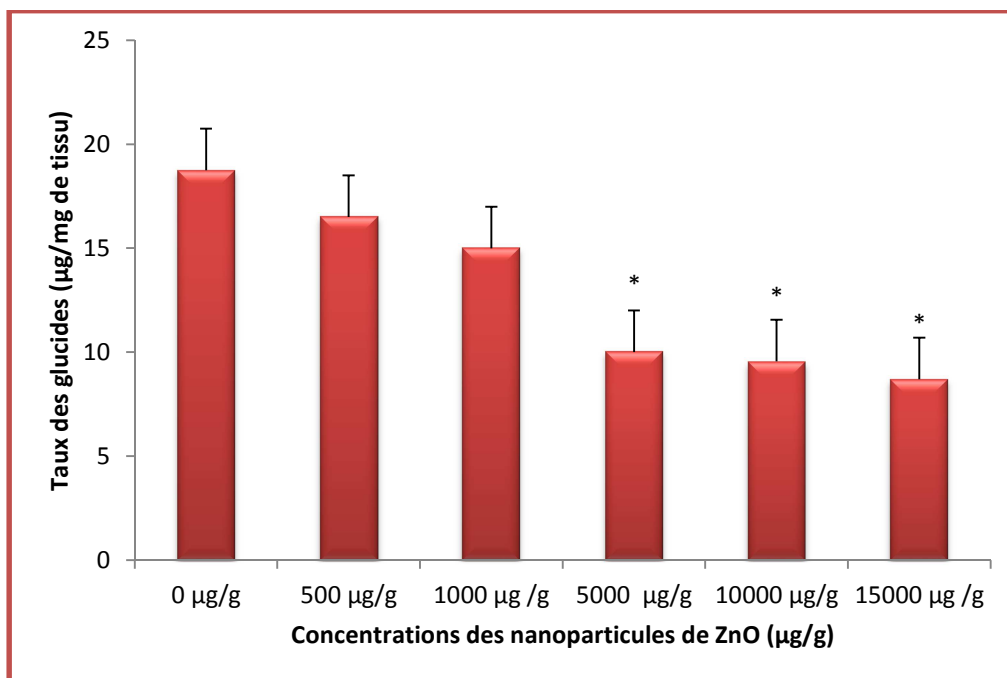


Figure 27: Variation du taux des glucides en (µg/mg de tissu) au niveau de l'hépatopancréas d' *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc. différence* significative ($P < 0,05$) .

- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur le taux des glucides au niveau des reins :** La figure (28) montre une diminution du taux des glucides au niveau des reins des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO par rapport aux témoins, cette diminution est bien illustrée chez les escargots traités par la dose 15000 μ g/g d'oxyde de zinc.

Le test T de student donne des différences non significatives ($p > 0.05$) pour les concentrations (500 μ g/g, 1000 μ g/g) et des différences significatives ($p \leq 0.05$) pour les concentrations (5000 μ g/g et 10000 μ g/g), ainsi que des différences hautement significatives ($p \leq 0.01$) pour la concentration (15000 μ g/g) au niveau des reins des escargots traités par rapport aux témoins après quatre semaines de traitement.

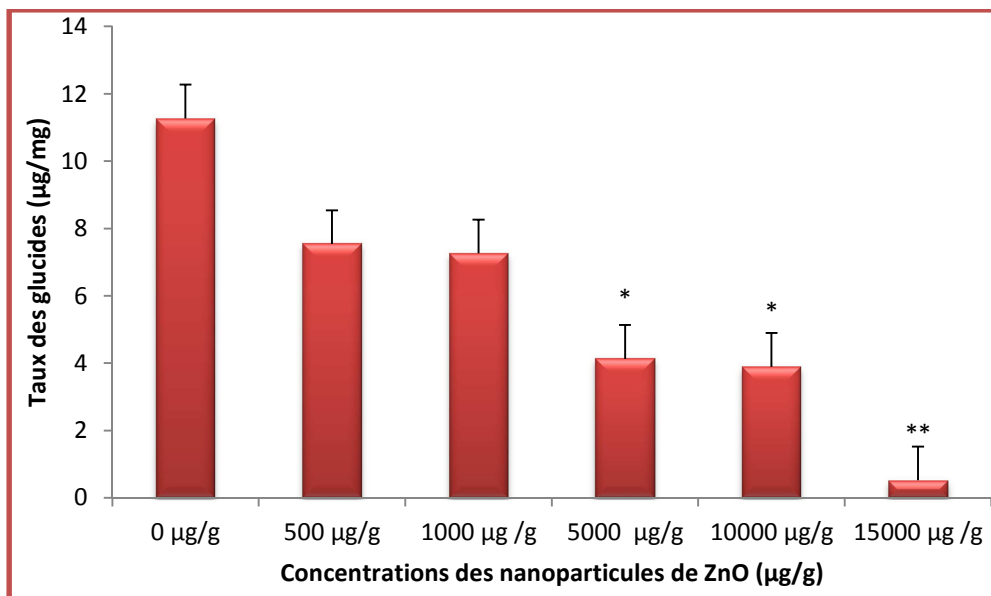


Figure 28 : Variation du taux des glucides en (μ g/mg de tissu) au niveau du rein d'*Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc
*différence significative ($P < 0,05$) ** différence hautement significative ($p < 0,01$)

2.1.3. Effets sur le taux des lipides

- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur le taux des lipides au niveau de l'hépatopancréas:** La figure (29) montre une diminution du taux des lipides au niveau de l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO par rapport aux témoins, cette diminution est plus remarquable chez les escargots traités par la dose 15000 µg/g d'oxyde de zinc.

Le test T de student donne des différences non significatives ($p > 0.05$) pour les concentrations (500µg/g ,1000 µg/g ,5000 µg/g,10000 µg/g,15000 µg/g) dans l'hépatopancréas des escargots traités par rapport aux témoins après quatre semaines de traitement.

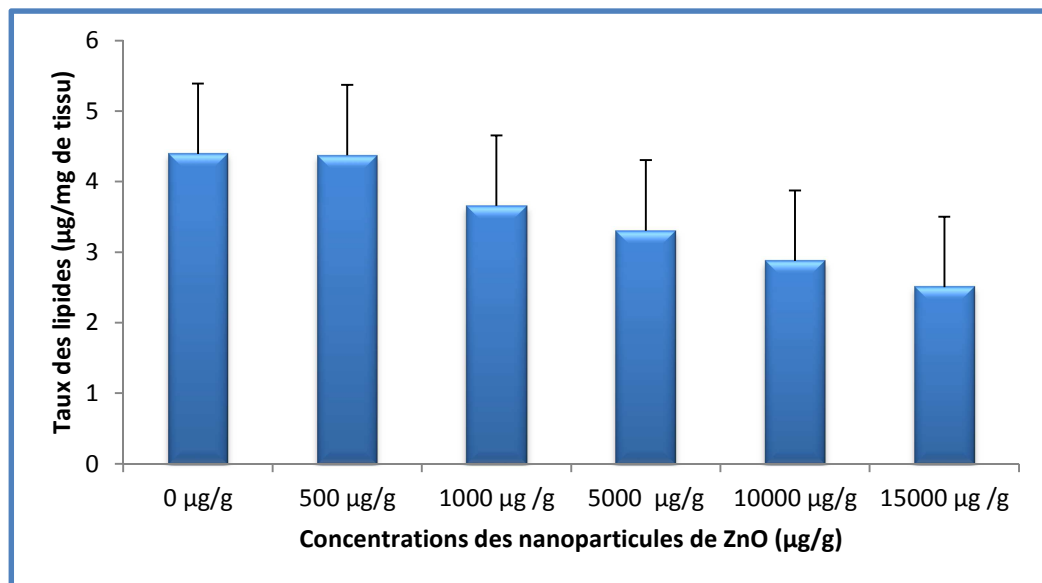


Figure 29: Variation du taux des lipides totaux en (µg/mg de tissu) au niveau de l'hépatopancréas d' *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc

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

- ✓ **Effet des nanoparticules d'oxyde de zinc sur le taux des lipides au niveau du rein :** La figure (30) montre une diminution du taux des lipides au niveau des reins des escargots *Helix aspersa* traités par les différentes doses de ZnO par rapport aux témoins, cette diminution est bien illustrée chez les escargots traités par la dose 15000 µg/g d'oxyde de zinc.

Le test T de student donne des différences non significatives ($p > 0.05$) pour les concentrations (500 µg/g, 1000 µg/g, 5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g) au niveau des reins des escargots traités par rapport aux témoins après quatre semaines de traitement.

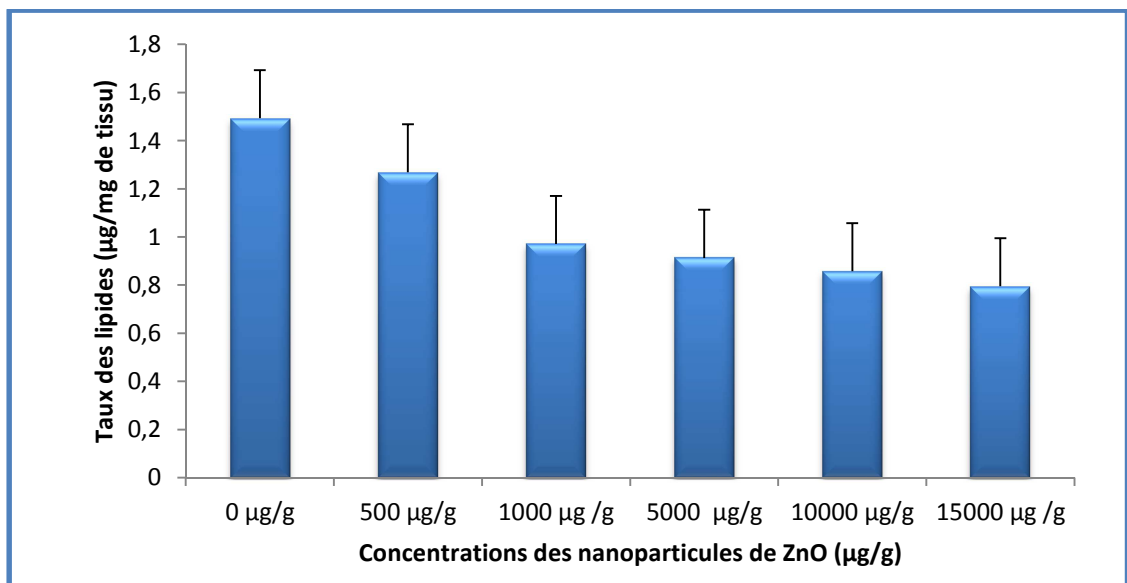


Figure 30: Variation du taux des lipides totaux (µg/mg de tissu) au niveau du rein d' *Helix aspersa* après 4 semaines de traitement aux nanoparticules d'oxyde de zinc

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

Discussion

Discussion

Les nanoparticules sont très étudiées actuellement. L'évaluation de leurs risques et de leurs bénéfices s'avère être nécessaire.

Les connaissances actuelles des effets toxiques des nanoparticules sont relativement limitées et les niveaux d'expositions ne sont pas bien déterminés. Il est difficile d'identifier la toxicité, la bioaccumulation, la biodégradation ou la biopersistence des différents types de nanoparticules. Les nanoparticules insolubles ou peu solubles sont les plus préoccupantes et plusieurs études ont démontré que certaines peuvent franchir les différentes barrières de protection des organismes vivants.

Cette technologie d'avenir bénéficie d'un développement exponentiel. Les efforts consacrés à l'étude des effets potentiels sur la santé sont insuffisants aujourd'hui. Les effets toxiques issus de l'expérimentation animale, de même que les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules justifient, sur la base du principe de précaution, de prendre toutes les mesures utiles pour limiter l'exposition et protéger la santé des personnes potentiellement exposées. (Florin ,et al 2008)

Les gastéropodes terrestres (escargots et limaces) présentent un important pouvoir bio-accumulateur de métaux. Ces organismes capables de survivre sur des sites contaminés en métaux sont ainsi, considéré comme des concentrateurs efficaces de métaux traces des habitats terrestres pollués. Cette résistance résulte de leur capacité de retenir et d'inactiver les métaux toxiques soit par compartimentation intracellulaire et excrétion, soit par liaison avec des protéines dont les métallothionéines permettent leur stockage durant de longues périodes (Grara , et al 2015).

Les bioindicateurs de pollution environnementale, ont fait l'objet des nombreux travaux chez les gastéropodes particulièrement. Ainsi ces espèces sont sensibles aux variations physicochimiques de leur milieu, notamment la température, (Bride et al, 1993), les fréquences électromagnétiques (Regoli et al,2005) et à toute forme de pollution urbaine, mais ils sont également sensibles vis-à-vis des xénobiotiques variés tels que les hydrocarbures ou encore les éléments traces métalliques (Manzl et al,2004). Plusieurs études récentes suggèrent que certains aspects de la toxicité des éléments traces métalliques , en particulier les effets chroniques et sublétaux, dépendent plus de la vitesse à laquelle un ETM entre dans l'organisme que des concentrations internes (Rainbow,2002 . van Straalen et al, 2005 . Rainbow, 2006).

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 pourquoi notre choix s'est porté sur ce modèle biologique, ces gastéropodes pulmonés sont des indicateurs écologiques pertinents de la pollution métallique et organique de l'écosystème terrestre (**Dallinger et al., 1993**).

C'est dans ce contexte que se situe notre travail.

Concernant le poids des escargots; dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'effet d'oxyde de zinc sur l'évolution du poids. Ainsi dans notre travail, l'exposition des escargots à des concentrations croissantes d'oxyde de zinc en fonction du temps a mis en évidence une diminution importante du poids chez les escargots traités par les différentes concentrations d'oxyde de zinc, ce qui constitue un premier indice de toxicité, et pourrait être dû à la variation des sécrétions d'enzymes digestives (**Hames et al ;1989**). Ainsi que cette perte de poids peut être expliquée par la diminution de la consommation alimentaire que nous avons constatée particulièrement chez les animaux traités par rapport aux témoins (**Belhaouchet;2013**). Notre résultat est en accord avec les travaux de (**Grara et al.;2015**) concernant l'effet des nanoparticule de ZnO sur *Helix aspersa* et de (**Boucenna;2010**) qui a étudié la toxicité des poussières métalliques sur *Helix aspersa*.

Concernant l'évolution des deux diamètres de la coquille, nous notons une diminution dose-dépendante des deux diamètre (D,L) en présence de ZnO. Ceci constitue un indice révélateur de la croissance des individus (**Besnaci;2015**) au cours de taitement,

Ces résultats vont dans le sens de ceux de (**Grara;2015**) concernant l'effet des nanoparticule de ZnO sur *Helix aspersa* et de (**Bourbia;2013**) qui a étudié la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Ainsi que (**Schuytema et al;1994**) montre que La réduction du diamètre coquillère des escargots traités avec l'Aminocarbe, le Méthyl parathion et le Paraquat est lié à la nature et à la dose du pesticide administré. et aussi (**Coeurdassier et 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).

Concernant le poids de la coquille et du tissus mous, nous notons une diminution aux concentrations croissantes d'oxyde de zinc en fonction du temps, cette diminution pourrait être dû par l'inhibition de la synthèse d'une hormone de croissance, comme le suggère (**Gimbert et al;2006**). Ce ci peut être expliqué par la compétition entre les ions Calcium et les ions Zn^{+2} libéré (**Grara et al., 2015**). Ces résultats confirment l'importance du suivi des paramètres physiologiques dans l'évaluation de la contamination d'un milieu. Ceci est confirmé par (**Gimbert et al;2008**) qui ont démontré une diminution de 30% de la masse de la coquille des escargots exposés à un sol artificiel contaminé par le cadmium. D'autres travaux confortent nos résultats ceux de (**Grara et al., 2015**) qui ont mis en évidence une diminution du poids de la coquille en présence des poussières métalliques. Aussi (**Coeurdassier et al;2001**) montre une inhibition du poids des tissus mous des escargots après exposition au diméthoate.

Les pourcentages cumulatif de la mortalité des escargots traités par ZnO pendant quatre semaines ont révélé que le pourcentage de mortalités augmente avec l'augmentation de la concentration de ZnO avec 28.57% ,28.57% ,57.14% de mortalité par ceux traités respectivement par les concentrations (5000µg/g ,10000µg/g et 150000 µg/g), En effet, la mortalité des escargots dépend de l'espèce et sa sensibilité vis-à-vis des substances testées, on peut expliquer cela par la forte résistance du système de détoxification qui joue ici un rôle majeur d'élimination et de réparation des dégâts induits par la pénétration de ces molécules. La durée de traitement aussi influence la survie sans oublier la concentration du xénobiotiques et la voie de penetration (**Besnaci;2015**). Ces résultats vont dans le sens de ceux de (**Grara;2015**) qui ont mis en évidence qu'à des doses élevées, le pourcentage cumulatif de mortalité est augmentéLa mortalité des escargots observée dans notre étude (38.09%). Nos résultats ne sont pas accord avec l'expérience de (**Schuytema et al;1994**) qui a montré (13%) après exposition des escargots *Helix aspersa* à 5mg/Kg de carbaryl pendant 14 jours. Cependant, les mêmes auteurs n'ont pas montré d'effets létaux chez la même espèce d'escargots exposés *via* l'alimentation jusqu'à des concentrations de 5000 mg kg-1 après ingestion de glyphosate. En effet, la mortalité des escargots dépend de l'espèce testée et de sa sensibilité vis-à-vis des substances testées, et aussi avec (**Bourbia ;2013**) qui a montré qu'il y a (9.61 %) de mortalité des escargots *Helix aspersa* dans leur étude sur evaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*.

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

La structure des protéines ainsi que leur fonction peut être altérée par les ROS produites soit par le métabolisme cellulaire ou par des oxydants exogènes. La modification oxydative des groupements sulf -hydyles des protéines peut être un processus à deux facettes: elle pourrait conduire à une altération de la fonction des protéines ou, selon l'état redox des résidus cystéine, comme elle pourrait activer des voies spécifiques impliquées dans la régulation des fonctions clés cellulaires (**Bourbia, 2013**)

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 zinc par rapport des témoins. L'augmentation croissante du taux des protéines totales s'expliquerait par le fait que la présence d'xénobiotique à l'intérieur de la cellule stimule la synthèse protéique dont les enzymes et rend compte de la capacité des escargots à la métabolisation / détoxification (**Selmi ; 2018**). Ainsi que (**Cui et al., 2010**) montre que cette augmentation pourrait être considéré comme un biomarqueur précoce de l'exposition aux contaminants chimiques. Les protéines sont principalement impliquées dans l'architecture de la cellule; les protéines peuvent également lier les toxines et jouer le rôle des protéines de transport.

Nos résultats abondent dans le même sens que les travaux (**Bourbia,2013**) qui confirment une augmentation du taux de protéines totales chez les escargots *Helix aspersa* traités aux mixtures de pesticides

Pour le taux des protéines au niveau du rein augmente sous l'effet des nanoparticules d'oxyde de zinc.Nos résultats sont accord avec (**Boucenna,2010**) qui a montré l'augmentation du taux protéines totales au niveau du rein en présence de particules métalliques.

Concernant le taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas et les reins, nous notons dans notre travail une diminution chez les escargots traités par les nanoparticules d'oxyde de zinc en comparaison avec les témoins, cette diminution serait due à l'oxydation des glucides en présence des ions métalliques conduisant à la libération d'aldéhydes et de peroxyde d'hydrogène (**Nzengue;2008**). Nos résultats sont en accord avec les travaux (**El-Wakil et Radwan;1991**) qui ont d'ailleurs suggérés que la diminution du taux de glycogène dans les tissus de l'escargot d'eau douce *Bellamyadissimilis* (Müller), exposé à des pesticides (l'Endosulfan, le Méthyl parathion, le Quinalphos et le Nuvan méthyliques) peut être due à l'utilisation du glycogène pour régénérer 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**).Aussi nos résultats sont accord avec (**Boucenna,2010**) qui a noté que le taux des glucides diminue en présence de poussière métalliques au niveau de l'hépatopancréas et du rein .

Les résultats concernant l'évolution du taux de lipides dans l'hépatopancréas et les reins mettent en évidence une diminution du taux des lipides chez les escargots traités comparativement aux témoins. Ceci constitue que les radicaux libres oxygénés sont à l'origine d'une dégradation des lipides, à travers la β oxydation (**Aurousseau,2002**), De plus les métaux comme le Cuivre et le Fer ont été largement utilisés comme des agents initiateurs de l'oxydation des lipides (**Nzengue;2008**). Ces résultats vont dans le même sens que ceux de (**Padmaja et al ;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 le travail de (**Boucenna, 2010**) qui a noté que le taux des lipides diminue en présence de poussière métalliques au niveau de l'hépatopancréas et du rein .

Conclusion et perspectives

Conclusion

Dans ce contexte que se situe notre travail qui consiste en la mise en évidence de la toxicité d'oxyde de zinc sur un organisme bioaccumulateur et bioindicateur de pollution de l'environnement *Helix aspersa* pour la préservation de la santé de l'Homme.

L'étude de la réponse biologique des organismes vivants aux polluants chimiques présents dans l'environnement terrestre représente un outil de diagnostic qui n'est pas destiné à dupliquer ou remplacer la surveillance chimique, mais qui doit être intégré dans les programmes de surveillance de l'environnement. Complémentaires des analyses chimiques, ces indicateurs biologiques peuvent jouer le rôle de systèmes d'alarme précoces d'une contamination.

Dans les écosystèmes terrestres, les gastéropodes sont exposés aux différents types de contaminants par plusieurs voies d'exposition. Pour notre travail et concernant les polluants nanométriques métalliques à base de ZnO, nous montrons que la voie digestive contribue pour une part très importante, à l'absorption de ces molécules.

La réponse des constituants métaboliques n'est pas suffisante pour évaluer l'impact d'un métal ou d'un pesticide sur l'escargot *Helix aspersa*, en outre, il est important d'étudier d'autres bio marqueurs plus sensibles et plus spécifiques aux polluants. Ainsi, l'étude de la réponse de quelques bio marqueurs de stress environnemental est évaluée chez *Helix aspersa*.

Au terme de ce Travail, nous pouvons conclure que l'espèce *Helix aspersa* est sensible à la présence des nanoparticules métalliques à base de ZnO, nous avons pu confirmer la qualité exceptionnelle d'*Helix aspersa* en tant qu'organisme bio-accumulateur/ bio-indicateur et ce à travers, toutes les modifications physiologiques et biochimiques qu'on a enregistré.

En fin, la présente étude toxicologique a permis de mettre en évidence d'une part des perturbations physiologiques, biochimiques et des atteintes tissulaires et d'autre part une activation des bio marqueurs protégeant ainsi ces cellules par le déclenchement du système de détoxification. Enfin, un phénomène d'adaptation d'*Helix aspersa* au xénobiotique utilisé est mis en évidence protégeant ainsi l'animal en assurant sa survie à travers la bioaccumulation des nanoparticules.

Au terme de ce Travail, nous pouvons conclure que l'espèce *Helix aspersa* est sensible à la présence des nanoparticules métalliques à base de ZnO

Perspectives

Vue l'importance de ces résultats, il serait intéressant de poursuivre la recherche, en prenant en considération les recommandations suivantes :

- De réaliser une étude histologique des organes d'*Helix aspersa* (hépatopancréas, rein..)
- Doser d'autres paramètres du stress oxydant (MDA ,SOD,GST,CAT,GPX...).
- Déterminer le taux de ZnO au niveau des organes moux et la coquille d'*Helix aspersa* par l'absorption atomique .
- De réaliser une étude comportementale des nanoparticules de ZnO chez les escargots *Helix aspersa*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **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.
- **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.
- **Bailey S.E.R. 1981.** Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. J. Comp. Physiol. 142. p. 89-94
- **Barker, G.M., 2001.** The Biology of Terrestrial Molluscs. CAB International, Oxon, Wallingford, UK, 567 p.
- **Benoit, P., Mamy, L., Rossard, V., Latrille, E., Bessac, F., Patureau, D., Barriuso, E., Bedos, C., Xavierlouchart, Martin-Laurent, F., Miegé, C., Laurent, F. Et Carpentier, P. 2011.** Typologie Des Contaminants Organiques : Vers Un Outil Opérationnel Permettant D'aboutir A La Définition Et Au Choix De Micropolluants Représentatifs « Modèles » Pour Des Etudes En Ecotoxicologie.. 4ème Séminaire d'Ecotoxicologie. St Lager
- **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.
- **Besnaci, S. 2015.** Evaluation de la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer « Fe₂O₃ » sur un bioindicateur de pollution terrestre : *Helix aspersa*. Annaba. 50 pages.
- **Bonnet J.C., Aupinel P. et Vrillon, J.L. 1990.** L'escargot *Helix aspersa*, biologie, élevage. Du labo au terrain. INRA. pp. 1 -5.
- **Bonnet, J. C., Vrillon, J. L. 1990.** L'escargot *Helix aspersa* biologie-élevage. Edition INRA. 14-15.
- **Bouaricha, H. 2013.** Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium* sp.). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 55p.
- **Boucenna, M. 2010.** Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les aciéries 1 et 2 du complexe sidérurgique d'EL-Hadjar sur un modèle bioaccumulateur *Helix aspersa*. Mémoire de magister, Université Badji Mokhtar, Annaba. 74 p.
- **Bourbia S. 2013.** Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Mémoire de doctorat, Université Badji Mokhtar. Annaba. 58 pages
- **Chevalier, N. 2004.** Thèse De Doctorat, Université De Joseph Fourier.
- **Chevallier H. 1977.** La variabilité de l'escargot Petit-gris *Helix aspersa* Müller, Bull. Mus. Nat. Hist. Nat., 3^o sér. 448, Zoologie 3 11: pp. 425-442.
- **Chevallier H. 1982.** Facteurs de croissance chez des gasteropodes pulmonés terrestres paléarctiques en élevage. Haliotis 12, 29-46.

- **Chevallier H. 1992.** L'élevage des Escargots. Production et Préparation du Petit-Gris. 2ème édition. Edition du point vétérinaire. Maison-Alfort.
- **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.
- **Chevallier H. 1982.** Facteurs de croissance chez des gasteropodes pulmones terrestres palearctiques en elevage. Haliotis 12, 29-46.
- **Chevallier H. 1992.** L'élevage des escargots. Production et préparation du Petit-gris. Edit. Du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, 144 pages.
- **Chuto G ,P. Chaumet-Riffaud , et le Groupe Oncologie de la Société française de médecine nucléaire et imagerie moléculaire (SFMN).2010.** Les nanoparticules. Médecine Nucléaire 34 (2010) 370 –376.
- **Coeurdassier M. Saint-Denis M., gomot-de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M., 2001.** Is te cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails, Ecotoxicology and Environemntal Safety 53,425-431.
- **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 thermohygométriques contrôlées. Ann. Zootechn.30. p.249-272.
- **Dallinger, R., Berger, B., Triebkorn-Köhler, R., Köhler, H. 2001.** Soil Biology And Ecotoxicology, In: Barker, G.M. (Ed.), The Biology Of Terrestrial Molluscs. CABI, Wallingford, Pp. 489–525.
- **Defraing J.O , PINCIMAL.2008.**stress oxydant et antioxydants mythes et réalités.p.10-19
- **Duchateau, G & Florkin. 1959.** For treahalosemie of insects and *its* signification. Arch. Insect. Physiol. Biochem, 67, 306-314.
- **EL –wakil , H.B .,Radwan ,M.A., 1991.** Biochemical studies on the terrestrial snail, Eobania vermicula (Muller) treated with some pesticides , J.Environ .sci .Health ,B 26, 479-489 .
- **Florin Prosie, François-Xavier Lesage, Frédéric Deschamps.2008.** Nanoparticules : structures, utilisations et effets sur la santé
- **Gimbert F., Mench M., Coeurdassier C., Badot P.-M. de Vaufleury A. 2008.** Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field. *Environmental Pollution*. 152: 736-745.
- **Gimbert, F., De Vaufleury, A., Douay, F., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Badot, P.-M. 2008.** Longterm Responses Of Snails Exposed To Cadmium-Contaminated Soils In A Partial Life-Cycle Experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 138–146
- **Gimbert, F., De Vaufleury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Badot, P.-M. 2006.** Modelling Chronic Exposure To Contaminated Soil: A Toxicokinetic Approach With The Terrestrial Snail *Helix Aspersa*. *Environ. Int.* 32, 866–875.
- **Goldsworthy, G.J., Mordue, W., Guthkelch, J. 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol*, 18 (3), 545.

Références Bibliographiques

- **Gomot A. 1997 a.** Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33. 209-216.
- **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.
- **Grara, N. 2011.** Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gasteropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux .Thèse de doctorat de l' université de Annaba.120 ,91 pages.
- **Grara, N., Boucenna, M., Atailia, A., Berrebbah, H. & Djebbar, M.R. 2012.** Stress oxydatif des poussières métalliques du Complexe Sidérurgique d'Annaba (Nord-Est algérien) chez l'escargot *Helix aspersa*. *Environnement, Risques & Sante*, 11(3): 221 - 229.
- **Grara, N., Bouloudenine, M., Khaldi, F., Zenir, Z., Abdemadjid, S., J. Mater. 2015.** *Environ. Sci.* 6 (9) 2596-2603.
- **Greco ,F.,B. Courbière , J. Rose , T. Orsière , I. Sari-Minodier , J.-Y. Bottero , M. Auffan , J. Perrin .2015.** Toxicity of nanoparticles on reproduction. *Revue de la littérature*
- **Gwénolé JACOPIN, Lorenzo RIGUTTI, Maria TCHERNYCHEVA ;2012.** Origine du fort contraste de polarisation de la photoluminescence dans les nanofils ZnO. Université Paris Sud 11 Laboratoire IEF – UMR 8622 CNRS
- **Haleng, J .Pincimal,J,O . Defraing.C.Charlier.J.P.Chapelle.2007.**le stress oxydant.p 628-638
- **Hopkin S.P. 1993.** In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. In: Calow P (Ed). *Handbook of ecotoxicology*. Blackwell, Oxford, p. 397-427
- **Huang, L., Li, D. Q., Lin, Y. J., Wei, M., Evans, D. G. & Duan X. 2005.** *Journal Of Inorganic Biochemistry* 99(5) 986-993.
- **Ismert, M., Guillemain, C., Oster, T. & Bagrel, D. 2000.** Phase I and phase enzyme activities in snail (*Helix aspersa*): sensitivity to atmospheric contamination by naphthalene. 17th International Symposium On Polycyclic Aromatic Compounds, Bordeaux, France.
- **Kerney M., Cameron R. et Bertrand A. 2006.** A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe. Delachaux et Niestlé SA, Paris, 2006, 288 p.
- **Lanone S , Boczkowski J ,2010.** Les sources de nanoparticules. *Revue française d'allergologie* 50 (2010) 211–213.
- **Laskowski R. et Hopkin S.P. 1996.** Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental safety* 34,59-69.
- **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.
- **Monoque Gardes_Albert, DOMINIQUE Bonnefont-Rousselot,Zohreh Abedinzadeh et Daniel jore.2003,**Espèces réactives de l'oxygène

- **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.
- **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.
- **Rainbow P.S. 2002.** Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? Environ Pollut, 120:497-507.
- **Rainbow, P.S., Poirier, L., Smith, B.D., Brix, K.V., Luoma, S.N., 2006.** Trophic transfer of trace metals: subcellular compartmentalization in a polychaete and assimilation by a decapod crustacean. Marine Ecology Progress Series, 308, 91–100.
- **Regoli, F., Gorbi, S., Machella, N., Tedesco, S., Benedetti, M., Bocchetti, R., et al., 2005.** Prooxidant effects of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EM) in the land snail *Helix aspersa*. Free Radic Biol & Med 39: 1620–1628.
- **Schuytema G.S., Nebeker A.V., Griffis W.L., 1994.** Effects of dietary exposure to forest pesticides on the brown garden snail *Helix aspersa* Muller. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 26 (1): 23-28.
- **Schwaiger J., 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.
- **Serdaru Ioana Sandra ,Vasile Bogdan Stefan , Nicora Adrian Ionut ,2015.** Synthesis and Characterization of ZnO Nanoparticle . Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, University Politehnica of Bucharest,1-7 Polizu street, Bucharest, 011061, Romania
- **Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnynek, C. A., Newhall, A.R., Freidman L. 1966.** A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, Lipid and Glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytic Biochemistry*. 19: 415-429.
- **Sies, H. (1991)** Oxidative Stress: Introduction. In: Sies, H., Ed., Oxidative Stress: Oxidant and Antioxidants, Academic Press, San Diego, 15-22.
- **Valéry Afonso, Romuald Champy, Dragoslav Mitrovic, Pascal Collin, Abderrahim Lomri ,2007.** Radicaux libres dérivés de l' oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme* 74 : 636–643

Annexes

Annexe (01)

Tableau 2 : 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

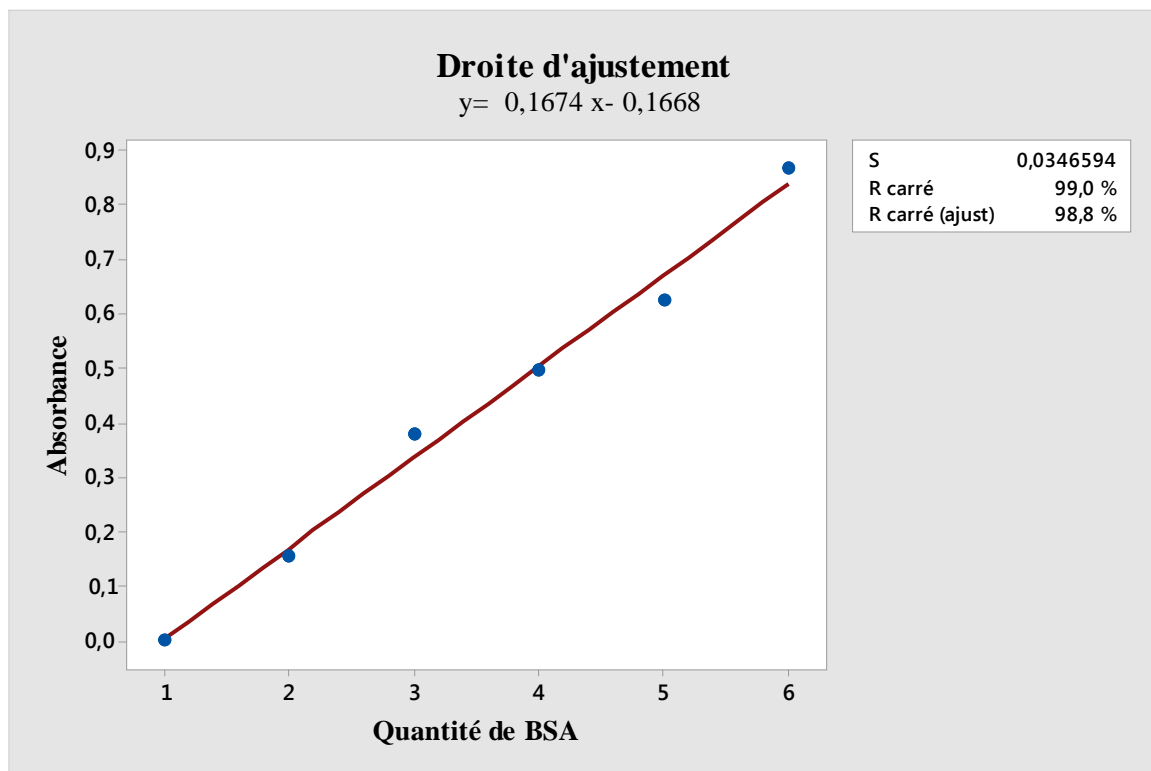


Figure31 : Droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (μg) (R^2 : coefficient de détermination) « pour l'hépatopancréas »

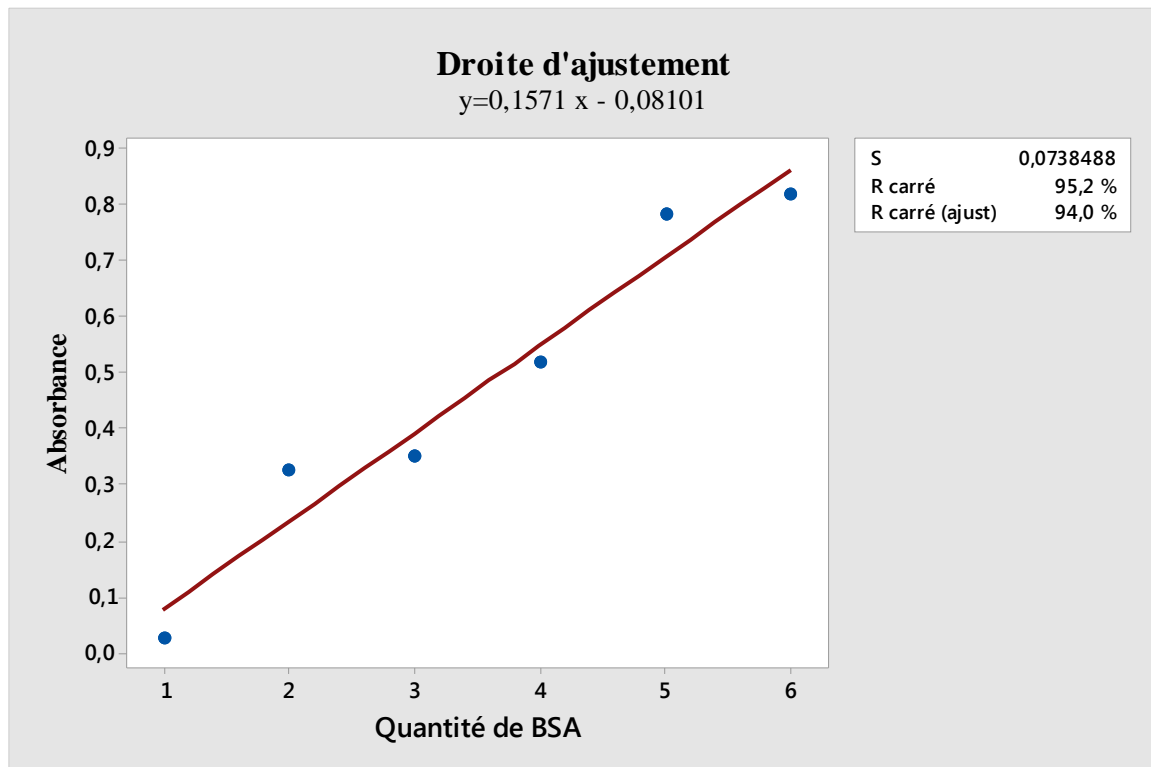


Figure32 : Droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (μg) (R^2 : coefficient de détermination) « pour les reins »

Annexe (02)

Tableau 3 : 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

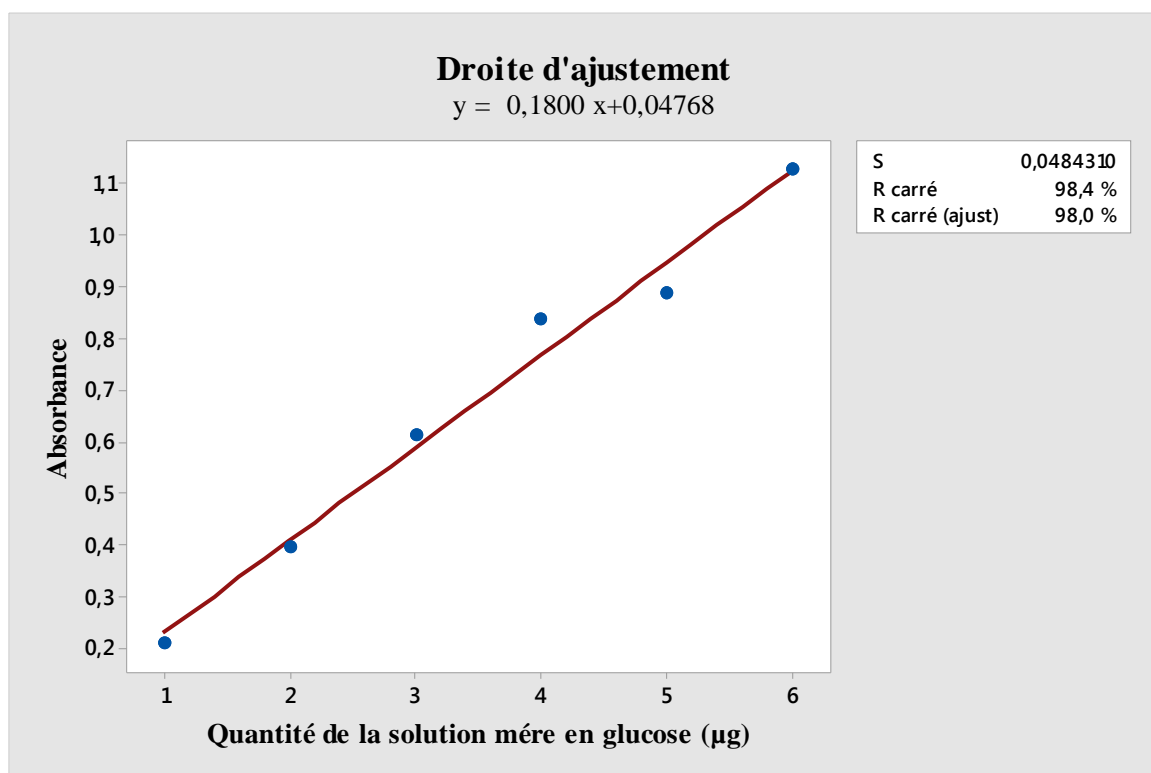


Figure 33 : Droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité en glucose (µg) (R^2 : coefficient de détermination) pour « l'hépatopancréas et reins »

Annexe (03)

Tableau 4 : Dosage des lipides: réalisation de la gamme d'étalonnage

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

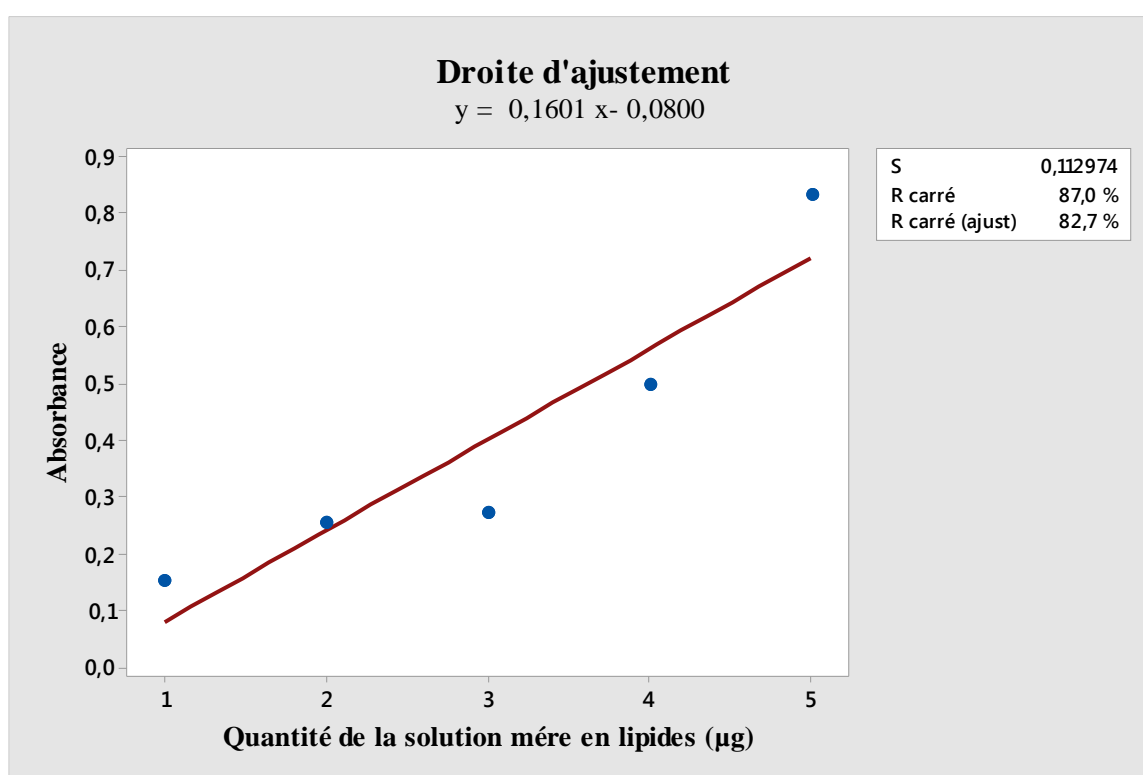


Figure 34: Droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité des lipides standard (μg) (R^2 : coefficient de détermination) pour « l'hépatopancréas et reins »