



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tebessi –Tebessa-
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée
Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie



Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD
En : Sciences biologiques
Option : Toxicologie cellulaire

Par : **Melle. Salmi Aya**

Intitulée :

Étude de la toxicité d'une pollution mixte de séléniure de Cadmium et de Novaluron sur *Helix aspersa*

Devant le jury :

M. Djabri Belgacem	Prof	Université de Tébessa	Président
M. Rouabhi Rachid	Prof	Université de Tébessa	Rapporteur
M. Arab Karim	Prof	Université USTHB	Examinateur
M. Menaceur Fouad	MCA	Université de Tébessa	Examinateur
Mm. Yahiaoui Karima	MCA	Université USTHB	Examinatrice

Date de soutenance : 08 / 01 / 2018

Remerciement

Un grand Merci à (aux)...

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

*Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de biologie moléculaire et molécules bioactives de l'Université de Tébessa dirigé par le Professeur **DJABRI Belgacem**. Je tiens à le remercier pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.*

*De simples remerciements ne sont pas suffisants pour exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de thèse : **Pr. ROUABHI Rachid**. A la fierté et à la chance d'avoir été votre thésard. Merci*

*Je tiens à remercier **Pr. ARAB Karim** à l'Université de Boumerdes pour avoir accepté de juger ce travail et participer à ce jury en qualité d'examineur.*

*Ces mêmes remerciements s'adressent à **Mme YAHIAOUI Karima**, Maitre de Conférences à l'Université de Boumerdes, et **M. MENACEUR Foued**, Maitre de Conférences à l'Université de Tébessa, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.*

Merci à l'ensemble de ce jury pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail mais aussi pour avoir fait le déplacement pour m'encourager à le soutenir et faire partager vos conseils et vos réflexions sur ce travail.

*Je tiens également à remercier **Dr. Boussekine Samira**, Chef de Département de Biologie appliquée à l'université de Tébessa, pour son soutien, ses orientations au cours de ma formation.*

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

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

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

Merci à toutes et à tous !

Dédicace

Je dédie ce mémoire

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

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

À mes sœurs MERVAT et SOUHA

À l'homme de ma vie, mon fiancé : WALID

À toute la famille : Abderrahmen, Salmi et Kemache

À ma très chère amie Nadjiba et sa famille

À tous mes collègues de service CWTS de Tébessa

À tous ceux qui m'aiment

De près ou de loin

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة يتمثل في تقييم سمية مشتركة بين ملوثين اثنين، مبيد حشري Novaluron (1.2- 2.4 ميكروغرام/غ) و نوع من المعادن المتناهية الصغر CdSe-NP (3.6- 7.2 ميكروغرام/غ) و خلأطهما (مزيج 1: 1.2 + 3.6 - مزيج 2: 2.4 + 7.2) على نموذج من النظام البيئي الحزون *Helix aspersa*

المعلمات الفسيولوجية المختلفة (وزن القواقع ، وزن البنكرياس الكبدي، طول الصدفة وقطرها)، والكيميائية الحيوية (مجموع البروتينات والدهون الكلية والكربوهيدرات)، مؤشرات الاكسدة (CAT، GST، GSH، MDA، GPx)، العلامات البيولوجية العصبية (AChE)، كذلك تورم ونفاذية الميتوكوندريا ، تم قياسهم بعد 90 يوما من العلاج.

وأظهر Novaluron و CdSe-NP و خلأطهما آثارا مثبطة في التركيزات المرتفعة على السلوك الحركي و على التغذية عند كبار الحزون. و مع ذلك في الحالات القصوى و في وجود تراكيز عالية من هذه المركبات قد يكون التثبيط في زيادة الوزن بسبب الامتناع عن الأكل لفترة طويلة، الملوثان يقللان أيضا من متوسط الوزن الطازج للبنكرياس الكبدي و القواقع بعد 90 يوم من العلاج. نفس التأثير لقطر وطول الصدفة.

وأظهرت نتائج بحثنا أيضا، اضطرابات معتبرة في التركيب البيوكيميائي (كمية السكريات، كمية الدهون، كمية البروتينات الكلية) بعد العلاج. على مسار آخر كشفت المؤشرات الحيوية تقلبات كبيرة للملوثات تتجلى في تحريض CAT، GST، GPX، وانخفاض GSH، AChE، أثبتنا أيضا تحريض الاكسدة أكدته زيادة في مستويات MDA

سمحت لنا عزل الميتوكوندريا من بنكرياس كبدي لإثبات تثبيط التنفس الخلوي وتحريض نفاذية الميتوكوندريا، بالإضافة إلى تعطيل إنزيمات الميتوكوندريا.

الكلمات المفتاحية: سمية، مبيد حشري Novaluron، معدن صغير الحجم CdSe-NP، حزون *Helix aspersa*، خليط، سلوك، اجهاد تأكسدي، تنفس خلوي، نفاذية الميتوكوندريا، تورم الميتوكوندريا.

Abstract

In this study we were interested in assessing the mixed toxicity of two pollutants, a Novaluron insecticide (1.2 – 2.4 ul/g), a CdSe-NP metallic nanoparticle (3.6 – 7.2 ug/g) and their mixture (M1 : 1.2 + 3.6 – M2 : 2.4 + 7.2) on a terrestrial ecosystem model, the *Helix aspersa* snail.

Different physiological parameters (mean fresh weight of snails, weight of hepatopancreas, shell weight, length and shell diameter), Biochemicals (total proteins, lipids and total carbohydrates), oxidative stress biomarkers (CAT, GST, GSH, MDA, GPx), neurotoxicity biomarker (AChE), swelling and mitochondrial permeability are measured after 90 days of treatment.

CdSe-NP, Novaluron and their mixtures showed inhibitory effects at the highest concentrations, on the locomotor and nutritive behavior of the adults of the *Helix aspersa* snail. Similarly, in extreme cases, in the presence of high concentrations of these compounds, the inhibition of weight gain could be due to the repulsion of the food. The two pollutants and their mixtures also reduce the average fresh weight of the hepatopancreas and that of the shell after 90 days of treatment, the same effect for the diameter and the length of the shell.

Significant disturbances are also noted in the biochemical composition of *Helix aspersa* hepatopancreas (content of total carbohydrates, total lipids and total proteins) after treatment with CdSe-NP, Novaluron and their mixtures.

On the other hand, biomarker monitoring revealed large fluctuations in the doses of the two pollutants, which were manifested by an induction of CAT, GST, GPX activities, a decrease in GSH levels, And the activity of AChE. We also demonstrated the induction of an oxidative stress confirmed by an increase in MDA.

The isolation of the mitochondria of the hepatopancreas allowed us to demonstrate an inhibition of cellular respiration and an induction of the mitochondrial permeability, in addition to a perturbation of the mitochondrial enzymes.

Key words: Toxicity, CdSe-NP, Novaluron, *Helix aspersa*, Mixture, behavior, physiology, Stress Oxidant, cellular respiration, mitochondrial permeability, mitochondrial swelling.

Résumé

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la toxicité mixte de deux polluants, un insecticide le Novaluron (1.2 - 2.4 µg/g), une nanoparticule métallique le CdSe-NP (3.6 – 7.2 µg/g) et leurs mixtures (M1 : 1.2 + 3.6 – M2 : 2.4 + 7.2) sur un modèle d'écosystème terrestre l'escargot *Helix aspersa*.

Différents paramètres physiologiques (poids frais moyen des escargots, poids de l'hépatopancréas, poids de la coquille, longueur et diamètre de la coquille), biochimiques (protéines totales, lipides et glucides totaux), les biomarqueurs de stress oxydant (CAT, GST, GSH, MDA, GPx), le biomarqueur de la neurotoxicité (AChE), ainsi le gonflement et la perméabilité mitochondriale sont mesurés après 90 jours de traitement.

Le CdSe-NP, le Novaluron et leurs mixtures ont montré des effets inhibiteurs aux plus fortes concentrations, sur le comportement locomoteur et nutritif des adultes de l'escargot *Helix aspersa*. Pareillement, dans les cas extrêmes, en présence de fortes concentrations de ces composés, l'inhibition de la prise de poids, pourrait être due à la répulsion de la nourriture. Les deux polluants et leurs mixtures réduisent également le poids frais moyen de l'hépatopancréas et celui de la coquille après 90 jours de traitement, le même effet pour le diamètre et la longueur de la coquille.

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

Sur un autre plan le suivi des biomarqueurs a révélé d'importantes fluctuations doses dépendantes pour les deux polluants, qui se sont manifestées par une induction des activités CAT, GST, GPX, une diminution des taux de GSH et de l'activité de l'AChE. Nous avons également mis en évidence l'induction d'un stress oxydatif confirmé par une augmentation du taux de MDA.

L'isolement des mitochondries de l'hépatopancréas nous a permis de mettre en évidence une inhibition de la respiration cellulaire et une induction de la perméabilité mitochondriale, en plus d'une perturbation des enzymes mitochondriales.

Mots clés : Toxicité, CdSe-NP, Novaluron, *Helix aspersa*, Mixture, comportement, physiologie, Stress Oxydant, respiration cellulaire, perméabilité mitochondriale, gonflement mitochondriale.

Liste des figures

Figures	Titre	page
01	Modèles pour le transport de la chitine au niveau de la membrane plasmique	05
02	Formules chimiques de plusieurs insecticides appartenant à la famille des benzoylurées	06
03	Formules chimiques de plusieurs insecticides appartenant à la famille des diacylhydrazines et de l'ecdysone	07
04	Utilisations des nanocristaux de cadmium	16
05	Toxicocinétique et toxicodynamiques des NPs	18
06	(a) Vue schématique d'un nanocristal de CdSe. (b) Image de microscopie électronique haute résolution d'un nanocristal de CdSe	19
07	Escargot sub-adulte <i>Helix aspersa</i>	24
08	Accouplement d' <i>Helix aspersa</i>	26
09	Morphologie externe de l'escargot	32
10	Injection des escargots <i>Helix aspersa</i>	33
11	Mesure des deux diamètres D et L de <i>Helix aspersa</i>	34
12	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	35
13	Effet des différents traitements sur la nourriture des escargots	36
14	Effet des différents traitements sur la couleur de pied des escargots	36
15	Effet des différents traitements sur le déplacement des escargots	37
16	Evolution poids corporelle (GP) chez les escargots témoins et traités après 90 jours de traitement	37
17	Evolution de gain du poids corporelle (GP) chez les escargots témoins et traités après 90 jours de traitement	38
18	Évolution du poids moyen de l'hépatopancréas des escargots traités pendant 12 semaines	39
19	Effets du CdSe, de Novaluron et de leurs mixtures sur le poids frais moyen coquillère des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> après 90 jours de traitements	40
20	Evolution de diamètre de la coquille chez les escargots témoins et traités pendant 90 jours de traitement	40
21	Evolution de longueur de la coquille chez les escargots témoins et traités pendant 90 jours de traitement	41
22	Principales étapes d'extraction des métabolites: protéines, glucides et lipides	46
23	Taux des protéines totales dans l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i>	54
24	Taux des lipides totaux dans l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i>	55
25	Taux des glucides totaux dans l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i>	56
26	Taux des GSH dans l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i>	56
27	L'activité de GST dans l'hépatopancréas chez les escargots témoins (T) et traités ; par le Sélénium de cadmium (CdSe), le Novaluron (Nov), et à la combinaison (CdSe/Nov)	57

Liste des figures

28	Variation de taux de MDA dans l'hépatopancréas chez les escargots témoins (T) et traités ; par le Séléniure de cadmium (CdSe), le Novaluron (Nov), et à la combinaison (CdSe/Nov)	58
29	L'activité de CAT dans l'hépatopancréas chez les escargots témoins (T) et traités ; par le Séléniure de cadmium (CdSe), le Novaluron (Nov), et à la combinaison (CdSe/Nov)	59
30	L'activité de GPx dans l'hépatopancréas chez les escargots témoins (T) et traités ; par le Séléniure de cadmium (CdSe), le Novaluron (Nov), et à la combinaison (CdSe/Nov)	60
31	Effets du CdSe, du Novaluron et de la mixture CdSe/Novaluron sur l'activité spécifique de l'ACHe ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez <i>Helix aspersa</i> après 12 semaines de traitement	60
32	Effet de CdSe, de Novaluron et de mixture sur la respiration mitochondriale (nmol/sec) après 90 jours de traitement	71
33	Effet de CdSe, de Novaluron et de mixture sur le gonflement mitochondriale ($\text{DO}_{540\text{ nm}}$) après 90 jours de traitement	72
34	Effet de CdSe, de Novaluron et de mixture sur la perméabilité mitochondriale ($\text{DO}_{540\text{ nm}}$) après 90 jours de traitement	72
35	Effets du CdSe, du Novaluron et de mixture sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées à partir des hépatopancréas.	73
36	Effets du CdSe, du Novaluron et de mixture sur l'activité enzymatique GST des mitochondries isolées à partir des hépatopancréas	74
37	Effets du CdSe, du Novaluron et de mixture sur le taux de GSH des mitochondries isolées à partir des hépatopancréas	74
38	Effets du CdSe, du Novaluron et de mixture sur le taux de MDA des mitochondries isolées à partir des hépatopancréas	75
39	Effets du CdSe, du Novaluron et de mixture sur l'activité enzymatique GPx des mitochondries isolées à partir des hépatopancréas	76

Liste des tableaux

N°	Titre	page
01	Propriétés physico-chimiques du Novaluron	13
02	Propriétés physico-chimiques de Séléniure de Cadmium	20
03	Les doses utilisées dans la mixture (CdSe + Novaluron)	29

Liste des abréviations

AchE : Acétylcholinestérase

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Argent

ATP : Adenosine triphosphate

CAT : Catalase

CE50 : Concentration efficace qui entraîne 50 % de l'effet maximum

CeO2 : dioxyde de ceryum

Cd : Cadmium

CDNB : 1-Chloro2, 4 di nitrobenzène

CdO : Oxyde de Cadmium

CdSe : Cadmium-sélénium

CdS : Sulfure de Cadmium

CdTe : Cadmium-tellure

Cu : Cuivre

CuO : Oxyde de Cuivre

D : Diamètre

DDE : Dichlorodiphényldichloroéthylène

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DL50 : Dose létale 50

DO : Densité optique

DTNB : Acide 5,5- dithio-bis-2-dinitrobenzoïque

EcR : Ecdysteroid receptor

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

EM : Eléments métalliques

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

eV : Electronvolt

FeCl2 : Chlorure de fer

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion disulfure

GST : Glutathion-S- transférase

H : Hauteur

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HAPs : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCl : Chlorure d'hydrogène
IGR : Insect Growth Regulators
IgA : Immunoglobulines de type A
IgE : Immunoglobulines de type E
IgG : Immunoglobulines de type G
ISO: International Organization for Standardization
JH : Hormones juvéniles
MDA : Malondialdéhyde
Mg : Magnésium
MgCl : Chlorure de Magnésium
MnCl₂ : Chlorure de manganèse (II)
NMs : Nanomatériaux
NOEC : concentration n'induisant pas d'effet
NPs : Nanoparticule
OA : Acide oléique
OPs : Organophosphorés
Pb : Plomb
PC : Phosphatidylcholine
PCB : Polychlorobiphényle
pH : Potentiel hydrogène
PEG : Polyéthylène glycol
PTPM : Pore de transition mitochondriale
QD : Quantum dots
SO₂ : Dioxyde de soufre
SOD : Superoxyde dismutase
SSA : Acide sulfosalicylique
TBA : Thiobarbiturique
TiO₂ : Dioxyde de titane
TNB : Acide 5-thio-2- nitrobenzoïque
TCA : Acide trichloroacétique
UV : Ultra violet

Liste des abréviations

USP : Ultra spiracle

Zn : Zinc

ZnO : Oxyde de zinc

ZnS : Sulfure de Zinc

Introduction générale1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les insecticides4

1.1-Les perturbateurs des processus de croissance et de développement4

1.1.1. Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine4

1.1.2. Les perturbateurs hormonaux.....6

1.2- Impact des insecticides sur la santé.....8

1.2.1. Effets sur le système endocrinien et la reproduction.....8

1.2.2. Effets cancérigènes.....9

1.2.3. Effets sur le système immunitaire.....10

1.2.4. Effets neurologiques et comportementaux.....10

1.3- Impact des insecticides sur les écosystèmes11

1.3.1- Organismes terrestres.....12

1.3.2- Organismes aquatiques.....12

1.4- Novaluron.....13

1.4.1- propriétés physicochimiques.....13

1.4.2- Mécanisme d'action.....14

1.4.3- Métabolisme chez les animaux.....14

1.4.4- Toxicité aigüe.....14

1.4.5- Toxicité chronique15

1-4-6- Effet de Novaluron sur les organismes biologiques.....15

2- les nanoparticules de cadmium.....15

2.1- Définition.....16

2.2- Caractéristiques.....16

2.3- Utilisation.....17

2.4- Effet sur les organismes biologiques.....17

2.5- Le séléniure de cadmium (CdSe)	18
2.5.1. Définition.....	19
2.5.2. Propriétés physicochimiques.....	20
2.5.3. Application	20
2.5.4. Synthèse.....	21
2.5.5. Effet sur la santé humaine.....	21
2.5.5.1- Toxicocinétique.....	21
2.5.5.2- Effet selon les voies d'exposition	22
3- Modèle biologique (<i>Helix aspersa</i>).....	24
3.1- Biologie.....	25
3.2- Ecologie.....	25
3.3- Intérêt de l'utilisation en écotoxicologie.....	25
3.4- Reproduction et ponte	26
3.5- Devenir des éléments métalliques dans les invertébrés.....	27

Chapitre II : Choix stratégiques et démarche expérimentale

1. Choix du modèle biologique.....	28
2. Objectifs détaillés et justification de la démarche expérimentale	28
3. Choix des concentrations.....	29
4. Choix de mode de traitement par injection	29
5. Choix des paramètres biologiques	29
6. Choix des marqueurs de contamination	30
7. Choix de l'organe.....	30

Chapitre III : Etude physiologique et comportementale

1- Matériel et méthodes.....	31
1-1- Matériel biologique.....	31
1-2- Matériel chimique.....	32
1-3- Méthodes	33

1-3-1- Méthode de traitement.....	33
1-3-2- Effets comportementaux.....	33
1-3-3- mesures des paramètres physiologiques.....	34
1-4- Analyse statistique	34
2- Résultats	36
2-1- Effet sur le comportement	36
2-2- Effet sur les paramètres physiologiques.....	37
2.2.1. Le poids frais moyen des escargots.....	37
2.2.2. Le poids frais moyen de l'hépatopancréas.....	38
2.2.3. Le poids frais moyen de la coquille.....	39
2-2-4- Le diamètre de coquille.....	40
2-2-5- La longueur de coquille.....	41
3- Discussion.....	42
3-1- Réponses comportementales.....	42
3-2- Réponses physiologiques.....	43
4- Conclusion.....	44

Chapitre IV : Etude de stress oxydatif

1- Extraction et dosage des métabolites.....	45
2- Analyse du stress oxydant.....	46
2.1- Dosage de la peroxydation lipidique (MDA).....	47
2.2- Mesure du Glutathion (GSH et GSSG)	48
2.3- Dosage des activités enzymatiques : CAT, GPx et GST	49
2.3.1 Glutathion Peroxydase.....	49
2.3.2 Catalase.....	50
2.3.3 Glutathion-S-Transférase.....	51
2.4- La neurotoxicité (AchE).....	52
3- Analyses statistique	53
4- Résultats.....	54

4-1- Effet du traitement par le séléniure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur les métabolites de l'hépatopancréas.....	54
4-1-1-Effet sur le taux des protéines d'hépatopancréas.....	54
4-1-2- Effet sur le taux des lipides d'hépatopancréas.....	55
4-1-3- Effet sur le taux des glucides d'hépatopancréas.....	55
4-2- Effet du traitement par le séléniure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur le taux de GSH de l'hépatopancréas.	56
4-3- Effet du traitement par le séléniure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur l'activité de GST de l'hépatopancréas.....	57
4-4-Effet du traitement par le séléniure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur le taux de MDA de l'hépatopancréas.....	57
4-5- Effet du traitement par le séléniure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur l'activité de CAT de l'hépatopancréas.....	58
4-6- Effet du traitement par le séléniure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur l'activité de GPx.....	59
4-7- Effet du traitement par le séléniure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur l'activité acétylcholinestérase (AChE).....	60
5- Discussion.....	61
5-1- Effet de CdSe, de Novaluron et de la mixture sur les métabolites.....	61
5-2- Effet de CdSe, de Novaluron et de la mixture sur les biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques de stress oxydant.....	63
5-3- Effet de CdSe, de Novaluron et de la mixture sur le biomarqueur de la neurotoxicité.....	66
6- Conclusion.....	68

Chapitre V : Etude subcellulaire

1- Isolement des mitochondries.....	69
2- Mesure de la respiration mitochondriale.....	69
3- Mesure du gonflement des mitochondries.....	70

4- Estimation de la perméabilité mitochondriale.....	70
5- Mesure des activités enzymatiques et non enzymatiques mitochondriales.....	70
6- Résultats.....	71
6-1- Mesure de la consommation d'oxygène chez les mitochondries.....	71
6-2- Variation du volume des mitochondries traitées par le CdSe, le Novaluron et le mixture.....	71
6-3- Estimation de la perméabilité des mitochondries.....	72
6-4- Suivi des activités enzymatiques et non enzymatiques mitochondriales.....	73
6-4-1- Activité Catalase.....	73
6-4-2- Activité GST.....	73
6-4-3- Taux de GSH.....	74
6-4-4- Taux de MDA.....	75
6-4-5- Activité de GPx.....	75
7- Discussion.....	76
Conclusion général et perspectives.....	79
Références Bibliographiques.....	81



Introduction générale

Introduction générale

Les micropolluants présents dans l'environnement ont des origines très variées. Leur devenir environnemental ainsi que leur impact potentiel sur les différents écosystèmes sont très dépendants de leurs interactions avec le milieu environnant. Les principaux micropolluants impliqués dans les phénomènes de pollutions chimiques sont les métaux (exemples: Cuivre, Zinc, Plomb, Cadmium), les métalloïdes (exemples: Arsenic, Sélénium), les molécules organiques (exemples: Pesticides, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques - HAP(s), Polychlorobiphényles - PCB(s) et certains toxiques minéraux (Cyanure) (**Aurélie, 2004**).

L'utilisation des pesticides est un problème majeur de santé publique, tuant au moins 250 à 370,000 personnes chaque année (**Bocquené et al., 2005 ; Eddleston et al., 2012**).

La plupart des pesticides sont des molécules organiques de synthèse dont les propriétés toxiques permettent de lutter contre les organismes nuisibles. D'un point de vue réglementaire, on distingue les produits utilisés principalement pour la protection des végétaux, que l'on appelle produits phytosanitaires (directive 91/414/CE), des autres produits que l'on appelle biocides (définis notamment dans la directive 98/8/CE) utilisés dans toutes sortes d'activités autres qu'agricoles.

En 1959, Richard Feynman, Prix Nobel de Physique 1965, a émis l'hypothèse qu'il devrait être possible de travailler au niveau atomique et il a décrit un monde dans lequel on pourrait manipuler les atomes un à un et construire ainsi des structures cohérentes de très petites tailles. Cette vision d'avant-garde s'est concrétisée avec l'apparition des nanotechnologies qui peuvent être définies comme l'ensemble des techniques permettant la manipulation de la matière au niveau atomique et moléculaire. Elles consistent à concevoir et manipuler des structures qui ne dépassent pas 500 nm dans au moins une de leurs dimensions auxquelles a été donné le nom générique de « nanoparticules » (NPs) (**Eidi, 2011**).

L'utilisation des nanoparticules (NPs) métalliques en nanotechnologie entraîne un risque de contamination de l'environnement qui est difficile à évaluer en raison du manque de connaissance toxicologique sur les NPs. La compréhension des mécanismes de toxicité des NPs peut favoriser leur utilisation sécuritaire (**Perreault, 2012**).

L'utilisation des nanoparticules de cadmium a soulevé d'importantes préoccupations en termes de toxicité et de sécurité, car les nanomatériaux les plus populaires, CdSe et CdTe, tant en termes d'études de développement que d'utilisations, contiennent des éléments hautement toxiques et cancérigènes. Notons que ces préoccupations sont à prendre en compte à la fois à court terme dans des contextes comme la bioimagerie où l'intégrité du matériel biologique exposé aux nanoparticules peut être compromise, mais aussi à plus longue échéance si l'on considère des aspects liés à la gestion des déchets (**Perreault, 2012**).

Cependant, l'utilisation croissante de ce type de matériaux soulève aujourd'hui des questions de santé publique. En effet, les interactions des nanoparticules avec les systèmes biologiques, et leur toxicité potentielle, sont à l'heure actuelle mal connues. Le risque sanitaire associé reste de ce fait difficile à évaluer. De plus, l'utilisation industrielle de nanoparticules entraîne également la production de déchets dont la libération dans l'environnement pourrait s'avérer difficile à contrôler, et dont les conséquences sont pour l'instant mal connues (**Triboulet, 2013**).

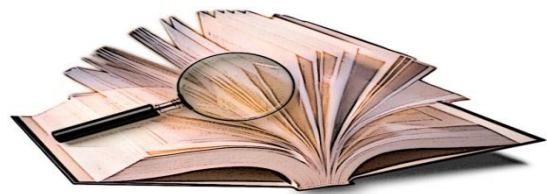
Des études de plus en plus nombreuses sont ainsi réalisées afin de mieux comprendre et mieux maîtriser les propriétés, le comportement et les risques liés aux nanoparticules. Celles-ci visent notamment à évaluer la toxicité de nanoparticules de nature variée sur différents modèles in vivo ou in vitro. La majorité des études réalisées in vitro se limitent cependant à des données qualitatives, démontrant que la plupart des nanoparticules métalliques induisent une augmentation du taux de mortalité cellulaire, associée principalement à des dommages à l'ADN, et à une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Mais les mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité des nanoparticules métalliques restent à élucider (**Triboulet, 2013**).

Par ailleurs, malgré le nombre grandissant de travaux sur la toxicité des nanoparticules, il reste difficile de statuer de façon définitive sur celle-ci du fait de l'importante diversité non seulement des modèles d'études mais aussi des procédés utilisés pour la production des nanoparticules, des modes d'exposition des cellules ou de l'organisme, ou encore de l'analyse des données. Il apparaît ici important que le choix de ces différents paramètres soit adapté au type de nanoparticules étudié, notamment à leur nature chimique, aux conditions d'exposition possibles et aux cellules cibles envisagées. Par exemple, des nanoparticules susceptibles d'être libérées sous forme de nanopoudres dans l'air ambiant

nécessiteront préférentiellement des études toxicologiques sur des modèles cellulaires de l'appareil respiratoire ou de la Peau (**Triboulet, 2013**).

L'objectif général de cette étude est d'évaluer les effets d'un pesticide, d'une nanoparticule métallique et de leurs mixtures grâce à l'utilisation d'un modèle bioindicateur présent dans les écosystèmes terrestres, l'escargot *Helix aspersa*. Pour y répondre, ce manuscrit est organisé en cinq grandes parties :

- ❖ la première partie synthétise les connaissances sur le devenir et les effets des insecticides en général, et d'insecticide étudié en particulier. Nous allons aussi présenter quelques notions sur les nanoparticules de cadmium et spécialement le séléniure de cadmium, ainsi que sur le modèle biologique utilisé en évaluation du risque.
- ❖ Dans la deuxième partie, nous avons présenté une justification de la stratégie expérimentale.
- ❖ La troisième partie est consacrée à l'examen des aspects comportementaux et morphométriques (poids frais moyen des escargots, de la coquille et de l'hépatopancréas).
- ❖ La quatrième partie est consacrée à la détermination de la composition biochimique de l'hépatopancréas (protéines, glucides et lipides), aux dosages des biomarqueurs enzymatiques (activités spécifiques de l'acétylcholinestérase, la glutathion S-transférase, glutathion peroxydase et la catalase), et non enzymatiques (le taux de glutathion et MDA).
- ❖ la cinquième partie présente une étude subcellulaire (gonflement et perméabilité mitochondriale, respiration cellulaire et dosage de quelques enzymes de stress oxydant dans les mitochondries isolées de l'hépatopancréas).
- ❖ Enfin, la conclusion générale discute la relation entre les résultats présentés dans les parties précédentes, fait le bilan de la contribution apportée par cette étude à la recherche en toxicologie et en écotoxicologie. Les perspectives envisagées dans la continuité de ces travaux sont également présentées.



Chapitre I : Synthèse bibliographique

1- Les insecticides

Les insecticides sont des substances qui permettent l'élimination des arthropodes. Ils peuvent être utilisés contre les larves et/ou les œufs (larvicides) ou encore contre les adultes. Ils doivent être nocifs vis à vis des insectes ravageurs mais aussi relativement inoffensifs pour les organismes non cibles.

1.1- Les perturbateurs des processus de croissance et de développement chez l'insecte

Ces insecticides ayant un rôle sur la croissance et le développement de l'insecte sont souvent utilisés en cas d'échec d'autres familles d'insecticides. Chez le moustique en particulier, après l'apparition de résistance aux pyréthriinoïdes et aux organophosphates, des insecticides de ce type ont été utilisés (**Belinato *et al.*, 2013**). Ils agissent en tant que régulateurs de croissance des insectes (IGR, Insect Growth Regulators). Les IGRs ont été classés en 2 groupes, le premier correspond aux inhibiteurs de la synthèse de la chitine qui intervient dans la formation de la cuticule et le deuxième correspond à des substances qui perturbent l'action des hormones spécifiques des insectes (hormones juvéniles et ecdysone) (**Tunaz et Uygun, 2004**).

1.1.1- Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine

La chitine est un biopolymère très répandu dans la nature qui est produit par les insectes en particulier. Elle est le composant majeur de la cuticule qui constitue l'exosquelette chez les insectes. La chitine est également présente dans la matrice péritrophique, couche protectrice de l'intestin moyen des insectes contre l'attaque de pathogènes ou de toxines (**Merzendorfer et Zimoch, 2003**). La chitine est un polymère linéaire composé de N-acétyl-glucosamines. La biosynthèse de ce polymère fait intervenir plusieurs enzymes pour convertir différents sucres (glucose, tréhalose) en UPD-N-acétyl-glucosamine (**Merzendorfer, 2011**). La dernière étape est synthétisée par une enzyme très importante, la chitine synthase.

Ce mécanisme requiert l'UPD-N-acétyl-glucosamine comme substrat et la présence de cations divalents comme le Mg^{2+} (**Merzendorfer, 2006**). La chitine est transportée à travers la membrane plasmique dans le domaine extracellulaire par un processus méconnu. Deux hypothèses ont été proposées (**Merzendorfer et Zimoch, 2003**). Dans la première hypothèse, des vésicules endoplasmiques transportent la chitine synthase au niveau de la membrane plasmique. Suite à la fusion des vésicules avec la membrane, la chitine synthase est activée et

produit les polymères de chitine dans le domaine extracellulaire (**Figure 1A**). La deuxième hypothèse propose que la chitine soit synthétisée et accumulée à l'intérieur des vésicules endoplasmiques par la chitine synthase. Les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer les polymères de chitine quand cela est nécessaire (**Figure 1B**). Une fois dans le domaine extracellulaire, les polymères s'assemblent ensuite de manière spontanée pour former des microfibrilles de diamètre et de longueur variables.

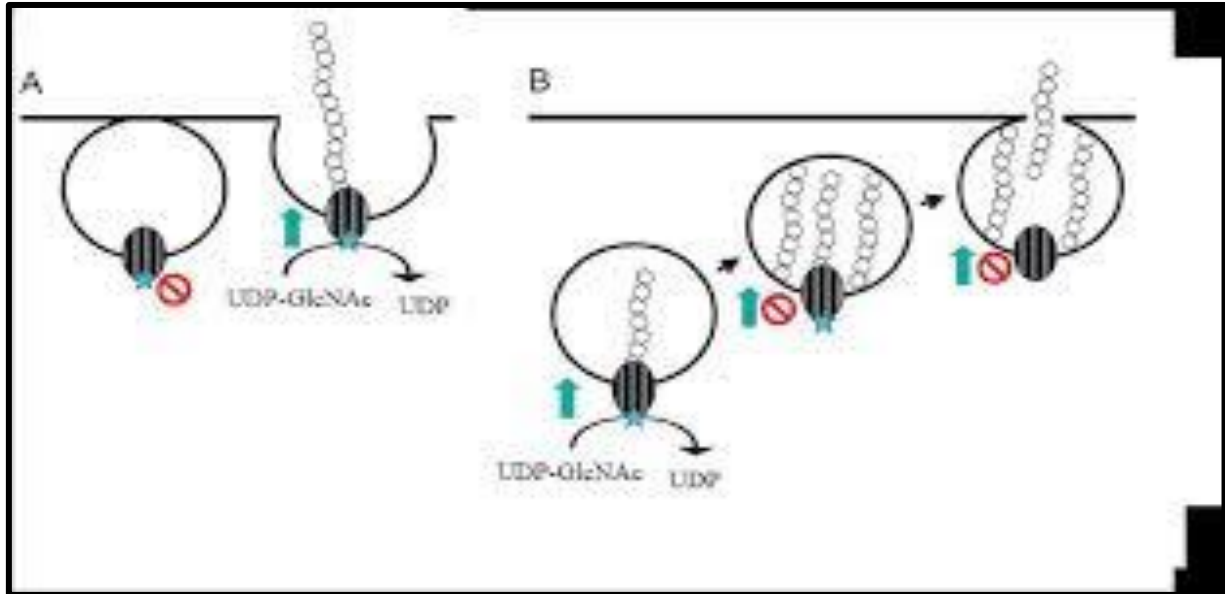


Figure 1: Modèles pour le transport de la chitine au niveau de la membrane plasmique
(Merzendorfer, 2006)

La synthèse de la chitine est un processus crucial pour la croissance et le développement de l'insecte. En effet, elle est le constituant majoritaire de la cuticule que l'insecte remplace régulièrement à travers le phénomène de mue. L'inhibition de la synthèse de la chitine induit des perturbations dans la formation de la cuticule et la mue avorte. C'est pourquoi des inhibiteurs de la synthèse de la chitine ont été développés en tant qu'insecticides comme les benzoylurées (**Figure 2**). Cependant, le mécanisme d'action de ces insecticides reste inconnu. Ils n'agiraient pas sur la chitine synthase directement mais plutôt sur le transport de la chitine via les vésicules endoplasmiques ou le transport à travers la membrane plasmique (**Merzendorfer, 2006**). Ces insecticides ont une faible persistance dans l'environnement et ils sont presque sans danger pour les organismes non cibles. Ces insecticides restent utilisés dans le domaine de l'arboriculture, la sylviculture et la santé publique pour l'élimination des moustiques vecteurs de maladies humaines. Les benzoylurées représentent 3% du marché mondial (**Sparks, 2013**).

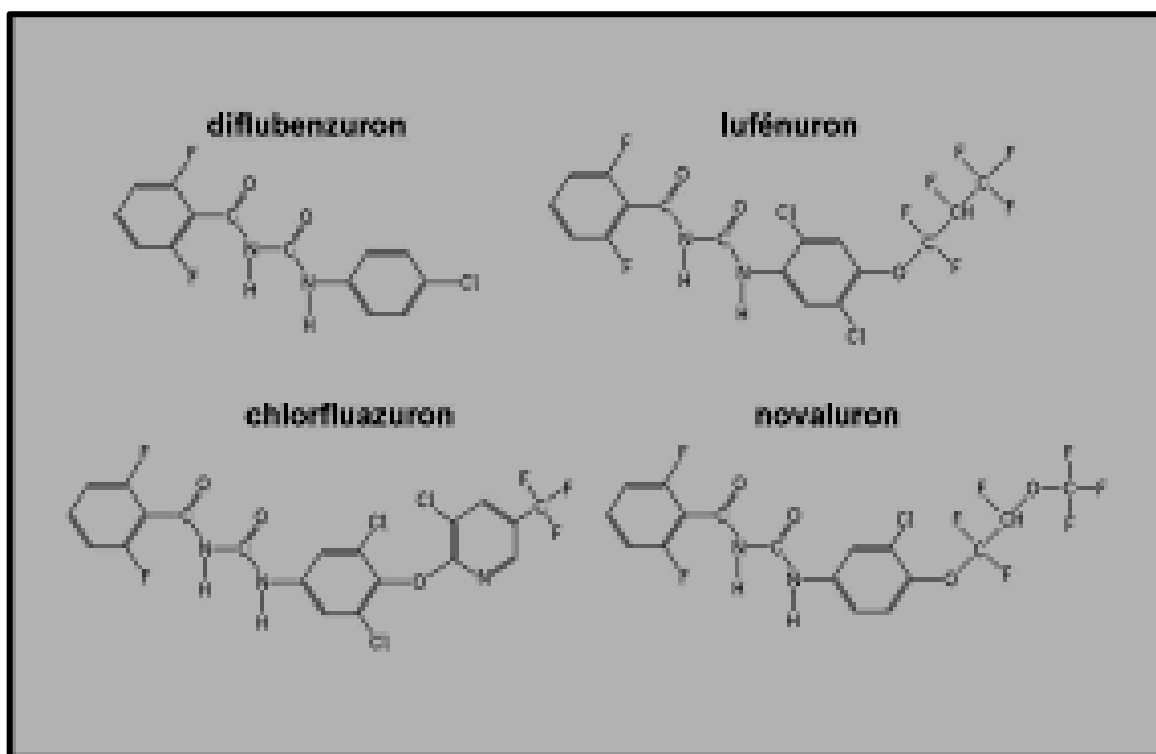


Figure 2: Formules chimiques de plusieurs insecticides appartenant à la famille des benzoylurées (Sparks, 2013).

1.1.2- Les perturbateurs hormonaux

Chez les insectes, le développement est rythmé par des processus de mues. Les mues de croissance permettent à la larve d'augmenter sa taille alors que les mues de métamorphose induisent de nombreux changements morphologiques aboutissant à l'imago. Ces différentes étapes sont régulées par deux hormones principales: l'ecdysone, hormone stéroïdienne de mue (active sous forme de 20-hydroxyecdysone, 20E) et les hormones juvéniles (JH) (Dhadialla *et al.*, 1998). Au niveau moléculaire, la cible de la 20E est un récepteur nucléaire, un hétérodimère composé de EcR (ecdysteroid receptor) et de USP (ultra spiracle). Ces deux protéines font partie de la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et présentent un domaine de liaison à l'ADN. Le complexe 20E-récepteur va ensuite se lier à l'ADN au niveau de sites spécifiques et jouer le rôle de facteur de transcription pour des gènes cibles impliqués dans les processus de mues (Dubrovsky, 2005). Ce processus démarre avec l'augmentation de la quantité de la 20E. Chez la drosophile, cette hormone est sécrétée par les glandes prothoraciques au niveau du cerveau de la larve. Suite à l'augmentation de la 20E, la larve arrête de se nourrir. L'ancienne cuticule se détache des cellules de l'épiderme (l'apolyse) et crée un espace qui se remplit de liquide exuvial contenant des enzymes chitinolytiques

inactives. Sous l'influence de la 20E, les cellules de l'épiderme s'organisent pour produire massivement les constituants de la nouvelle cuticule. Une fois que la quantité de 20E diminue, les enzymes chitinolytiques sont activées pour digérer une partie de l'ancienne cuticule. Le liquide exuvial est ensuite réabsorbé suivi d'une libération de l'hormone d'éclosion permettant l'exuviation. Le déclenchement des mues est donc dû à une augmentation de 20E. Si cette hormone agit en synergie avec les hormones juvéniles, une mue larvaire sera déclenchée.

Durant le dernier stade larvaire, une action de la 20E en absence d'hormones juvéniles va permettre l'induction non plus de mues larvaires mais de mue de métamorphose. Ces processus de croissance et de développement sont très bien coordonnés principalement par la 20E et les hormones juvéniles. Une perturbation dans l'homéostasie d'une de ces hormones peut avoir des conséquences dramatiques pour l'insecte.

Ainsi des analogues d'hormones spécifiques des insectes ont été utilisés comme insecticides pour le contrôle des nuisibles en agriculture. La famille la plus importante correspond aux diacylhydrazines, agonistes d'ecdystéroïdes (**Figure 3**).

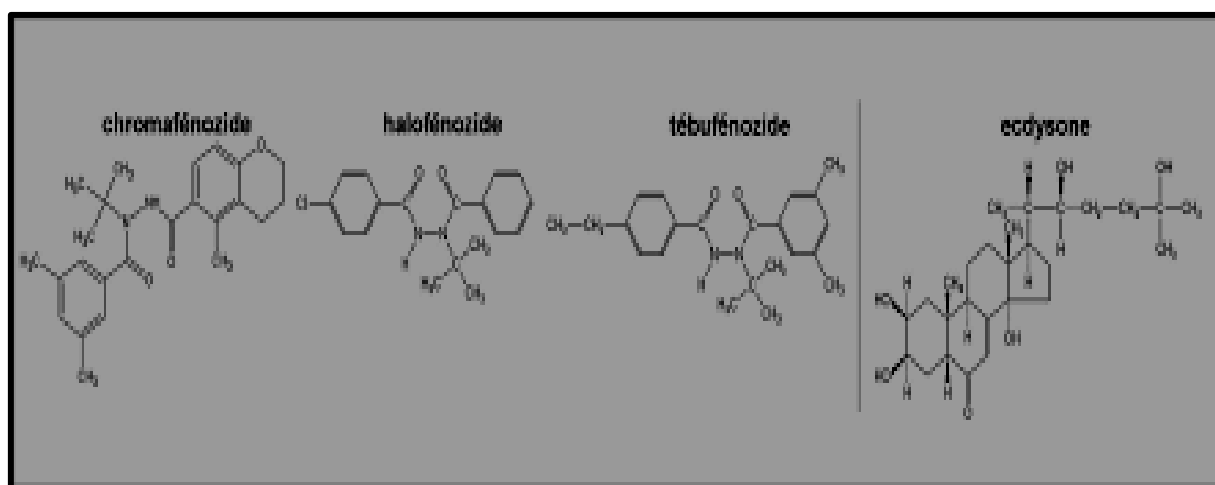


Figure 3: Formules chimiques de plusieurs insecticides appartenant à la famille des diacylhydrazines et de l'ecdysone (**Fahrbach et al., 2012**).

Découverts par Rohm et Haas dans les années 1980, ces composants provoquent une mue prématurée chez les insectes cibles, qui conduit à la mort de la larve. Ces produits sont donc désignés comme accélérateurs de mues (**Fahrbach et al., 2012**). L'avantage de ces insecticides réside dans leur spécificité d'action. Par exemple, le tebufénozide est toxique pour les lépidoptères mais très faiblement toxique pour les autres espèces comme les

coléoptères, les diptères, les pollinisateurs comme l'abeille ainsi que les mammifères (**Dhadialla et al., 1998**). Ils ont également une faible rémanence dans l'environnement. D'autres études ont permis le développement de nouveaux insecticides comme le tétrahydroquinoline pour lutter spécifiquement contre les moustiques (**Fahrbach et al., 2012**). Ces insecticides sont principalement utilisés dans l'arboriculture et la viticulture. Cependant ces insecticides ont une action plus lente que les neurotoxiques, ce qui provoque des pertes plus importantes dans les cultures utilisant ces insecticides. Les diacylhydrazines représentent 1% du marché mondial des insecticides (**Sparks, 2013**).

1.2- Impact des insecticides sur la santé

L'homme est également exposé aux insecticides par son environnement, son alimentation et ses activités professionnelles ou privées. L'homme est donc en contact avec de nombreux composés chimiques au cours de sa vie. Il est donc important d'évaluer les risques liés à cette exposition et l'impact sur la santé humaine. Le développement de certaines maladies a pu être associé à une exposition aux insecticides, comme le développement de certains cancers, l'apparition d'allergies, de troubles neurologiques ou encore la perturbation de la reproduction sont les effets les plus courants (**Mnif et al., 2011**).

1.2.1. Effets sur le système endocrinien et la reproduction

Certains insecticides (DDT, métoxychlore, cyperméthrine, dieldrine, endosulfan) sont des perturbateurs endocriniens et peuvent être à l'origine d'effets délétères chez l'homme en particulier sur la reproduction. De nombreux perturbateurs endocriniens agissent via les récepteurs aux œstrogènes et les récepteurs aux androgènes provoquant une perturbation de l'homéostasie œstrogènes/androgènes importante pour le fonctionnement normal des processus impliqués dans la reproduction (**Marques-Pinto et Carvalho, 2013**). Des études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation entre l'exposition aux pesticides et une incidence plus importante de certaines anomalies du système reproducteur masculin comme une réduction de la qualité du sperme (spermatogenèse affectée), une cryptochidie (incapacité d'un testicule d'atteindre le scrotum), une hypospadias (ouverture de l'urètre au niveau de la face inférieure du pénis) et du cancer des testicules (**Nordkap et al., 2012**). Une étude menée en Inde sur 117 adolescents âgés de 10 à 19 ans suggère que l'exposition à l'endosulfan (organochloré) induit un retard de la maturité sexuelle et une perturbation de la synthèse des hormones sexuelles (**Saiyed et al., 2003**). L'incidence des malformations du système

reproducteur masculin (hypospadias et cryptorchidie) à la naissance est plus importante dans des zones d'agriculture intensive (**Carbone et al., 2006**). Le fœtus, le nourrisson et l'enfant sont particulièrement sensibles aux perturbateurs endocriniens (**Mnif et al., 2011**).

L'exposition de la mère à ces composés durant la grossesse et l'allaitement peut induire chez l'enfant des effets sur les fonctions de reproduction et du système nerveux et des malformations congénitales (**Ribas-Fito et al., 2006; Mnif et al., 2011**). Par exemple, l'exposition prénatale au DDT et à ses métabolites est associée à un retard dans le développement neuronal chez le nourrisson (**Eskenazi et al., 2006**).

1.2.2. Effets cancérogènes

L'exposition aux pesticides peut jouer un rôle dans l'apparition des cancers chez l'homme en particulier chez des populations exposées de manière importante comme les agriculteurs (**Bassil et al., 2007; Alavanja et al., 2013**). Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence une association positive entre l'exposition aux pesticides et certains cancers comme les cancers du sein, de la prostate, des reins, des poumons, du cerveau mais également des leucémies, des myélomes et des lymphomes non hodgkiniens (**Freeman et al., 2005 ; Bassil et al., 2007; Cohn et al., 2007; Band et al., 2011; Alavanja et al., 2013**). Certaines études montrent une corrélation possible entre l'exposition aux pesticides et l'augmentation du risque de développer un cancer de la prostate (**Mullins et Loeb, 2012**). Une étude épidémiologique a été menée sur des individus atteints d'un cancer de la prostate ou des individus atteints d'un autre type de cancer. Ils ont mis en évidence une association entre le risque de développer un cancer de la prostate et une exposition à certains insecticides comme le DDT, le lindane (organochlorés) mais aussi le malathion, le diazinon (organophosphorés) et le carbaryl (carbamate) (**Band et al., 2011**). Une autre étude épidémiologique a montré une incidence plus élevée du cancer de la prostate chez les agriculteurs comparé à la population générale. De plus, une exposition aux pesticides conduit à une augmentation importante du risque de développer un cancer de la prostate chez des individus ayant des antécédents familiaux pour ce cancer. Des études ont été menées pour déterminer si l'exposition aux pesticides en particulier aux insecticides organochlorés pouvait avoir un rôle dans l'étiologie du cancer du sein (**Alavanja et al., 2013**). L'exposition au DDT augmente le risque de développer un cancer du sein si les femmes ont été exposées avant l'âge de 14 ans suggérant un effet sur le long terme de cet insecticide (**Cohn et al., 2007**). Une étude menée en Iowa et en Californie, a mis en évidence une association entre l'exposition au

diazinon et le cancer des poumons ainsi que les leucémies chez des professionnels utilisant des pesticides (**Freeman et al., 2005**). L'exposition aux insecticides pendant l'enfance peut également augmenter le risque de développer des leucémies chez l'enfant (**Turner et al., 2011**).

1.2.3. Effets sur le système immunitaire

Les pesticides sont aussi capables de perturber le système immunitaire. Cependant, les études épidémiologiques concernent l'exposition aux pesticides surtout chez les enfants (exposition durant, la grossesse, l'allaitement et l'enfance) (**Gascon et al., 2013**). Une étude menée sur 584 femmes enceintes en Espagne a mis en évidence une association entre l'exposition prénatale au DDE (métabolite du DDT) et le développement d'infections respiratoires chez le nourrisson durant la première année de sa vie (**Sunyer et al., 2010**). Glynn et ses collaborateurs ont suggéré qu'une exposition postnatale au DDE pouvait également augmenter le risque d'infections respiratoires chez le nourrisson (**Glynn et al., 2008**). Chez l'adulte, l'exposition chronique aux pesticides peut être impliquée dans le développement de maladies respiratoires comme la bronchite chronique et l'asthme en particulier dans le cas d'une exposition professionnelle aux pesticides (**Salameh et al., 2006a, 2006b**).

D'autre part, des études ont permis de mettre en évidence une réponse humorale après l'exposition aux pesticides. L'augmentation des IgE dans le cordon ombilical est associée à une augmentation de la quantité de pesticides en particulier les organochlorés dans le placenta de nouveau-nés, ce qui suggère une sensibilisation allergique chez les individus exposés aux pesticides (**Reichrtová et al., 1999**). Chez des enfants âgés de 7 à 10 ans, une augmentation des IgE dans les basophiles, des IgA et IgG est également associée aux pesticides en particulier le DDE (**Karmaus et al., 2005**).

1.2.4. Effets neurologiques et comportementaux

Actuellement, la majorité des insecticides présents sur le marché sont des neurotoxiques et une exposition chronique à certains de ces composés peut conduire à l'apparition de troubles neurologiques (**Burns et al., 2013**). Le développement du système nerveux est sensible aux toxines présentes dans l'environnement. L'exposition durant les stades précoces peut conduire à l'apparition de certaines pathologies comme l'autisme, la dyslexie, un retard mental, une perte de la concentration, une hyperactivité (**Hass, 2006**).

L'exposition prénatale aux organophosphorés induirait un retard de développement neuronal chez le nourrisson. De plus, une enzyme (paraoxonase 1) impliquée dans le métabolisme de ces pesticides serait un facteur de risque important dans l'apparition de ces troubles neurologiques (**Engel et al., 2011**). Rauh et ses collaborateurs suggèrent que l'exposition au chlorpyrifos (insecticide organophosphoré) durant la période prénatale pourrait induire un déficit intellectuel et une perturbation de la mémoire de travail chez des enfants âgés de 7 ans (**Rauh et al., 2011**). L'exposition prénatal au DDT peut également perturber les fonctions cognitives en particulier chez les filles âgées de 4 ans (**Ribas-Fito et al., 2006**). Chez l'adulte, l'exposition chronique aux pesticides peut également conduire à des désordres neurologiques en particulier des troubles neurodégénératifs comme la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer (**Parron et al., 2011; Thany et al., 2013**).

Une autre étude épidémiologique réalisée en Espagne entre 1999 et 2005 a mis en évidence une augmentation significative du risque de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose en plaques et du suicide chez des populations vivant dans des zones où l'utilisation de pesticides est importante. De plus, le risque est plus important chez les hommes pour certains troubles neurologiques comme les neuropathies périphériques, la dépression ou le suicide (**Parron et al., 2011**). En effet, un taux important de suicides est également retrouvé chez les agriculteurs comparés à la population générale. Des études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation avec une exposition aux organophosphorés soit par empoisonnement ou par exposition chronique avec des désordres affectifs (dépression, anxiété) pouvant conduire au suicide (**London et al., 2012**).

L'exposition aux pesticides peut donc conduire à des effets néfastes sur la santé humaine. Cependant, il reste difficile de déterminer l'impact de chaque pesticide car l'homme est en contact avec de nombreux composés qui peuvent interagir entre eux et l'effet de synergie peut être à l'origine de l'effet indésirable. De plus, il est difficile de quantifier une exposition aux pesticides chez l'homme (produits utilisés, temps d'exposition, chronique ou aiguë) et les études épidémiologiques sont réalisées dans différents types d'environnement.

1.3- Impact des insecticides sur les écosystèmes

Après épandage et dispersion dans l'environnement, les insecticides, même partiellement dégradés et/ou dissociés des adjuvants présents dans les formulations commerciales, peuvent affecter négativement des organismes vivants qui n'étaient pas ciblés

au départ. Ces effets concernent tous les compartiments du vivant, des microorganismes aux mammifères, quel que soit leur habitat (terrestre ou aquatique).

1.3.1- Organismes terrestres

Quel que soit le mode d'application (traitement sur sol nu ou application foliaire), l'exposition des organismes du sol aux insecticides est inévitable. Des espèces non cibles peuvent ainsi recevoir, selon les cas, la totalité ou une fraction (celle non retenue par le couvert végétal) de la dose appliquée. Les insectes volants sont exposés aux insecticides au moment de l'épandage, par contact avec les surfaces traitées, par ingestions d'aliments contaminés ou par inhalation (**Voltz et al., 2005**). Pour ces organismes, l'impact direct des insecticides provient généralement des propriétés neurotoxiques de certaines molécules (pyréthrinoïdes notamment) (**Sommer et al., 2001**). Le déclin des populations d'abeilles, plus connu sous le nom de syndrome d'effondrement, observé partout dans le monde a été lié à l'utilisation de néonicotinoïdes (**van der Sluijs et al., 2013; Laycock et al., 2014**) bien que les causes de ce déclin semblent être multifactorielles (**EFSA, 2014**). L'ingestion d'aliments contaminés constitue souvent la voie principale d'exposition des vertébrés terrestres, du fait de la tendance des animaux à quitter les parcelles lors des traitements (**Voltz et al., 2005**). La raréfaction des sources de nourriture, et l'aversion gustative induite par la présence d'insecticide sur des aliments qui sont ensuite délaissés (dégoût qui se maintient même longtemps après que l'insecticide a disparu), sont des causes avancées pour expliquer le déclin des populations d'oiseaux insectivores dans les zones traitées avec des organochlorés, des carbamates ou des organophosphorés (**Nicolaus et Lee, 1999; Genghini et al., 2006; Nocera et al., 2012**).

1.3.2- Organismes aquatiques

Bien que généralement non intentionnelle, la contamination des milieux aquatiques peut avoir des effets notables sur les organismes qui y vivent. Ces effets peuvent être directs, ou indirects, voire les deux à la fois. Du fait de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité et polarité). Certaines molécules insecticides peuvent également être quantifiées, leur présence (le plus souvent fugace) résultant de pics de concentration d'après traitement. Il a été démontré *in situ* que certains insecticides (lindane, parathion, fenvalerate) peuvent avoir des effets extrêmement toxiques (disparition de certaines espèces pendant plus d'un an après exposition à un pic de concentration de 6 µg. L⁻¹ pendant 1h) sur les invertébrés aquatiques (**Liess et Schulz, 1999; Schulz et Liess, 1999**). Concernant les vertébrés, les poissons sont affectés par des perturbations du système endocrinien (inversion de sexe, malformations des

organes sexuels et altérations des fonctions reproductrices) occasionnées généralement par les molécules de la famille des organochlorés (DDT, endosulfan) (Baatrup et Junge, 2001; Hemmer *et al.*, 2001) et certaines triazines (Hayes *et al.*, 2011). Par ailleurs, les amphibiens subissent également les effets des insecticides perturbateurs endocriniens (Hayes *et al.*, 2006).

1-4- Le Novaluron

Le Novaluron est un nouveau produit chimique de pesticides appartenant à la classe d'insecticides appelés régulateurs de croissance des insectes (IGR).

Le Novaluron est une molécule qui agit comme inhibiteur de régulateur de croissance. Elle inhibe la formation de cuticule et provoque la mort durant la mue (U.S. EPA, 2009). Étant un inhibiteur de régulateur de croissance des insectes, il est logique de penser que les individus au stade adulte seront moins affectés par ce pesticide.

1.4.1. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques du Novaluron sont illustrées dans le tableau (01).

Tableau 1 : propriétés physico-chimiques du Novaluron (Cutler *et al.*, 2005)

Propriétés physico-chimiques	
Nom commun	Novaluron
Nom chimique	N-[3-chloro-4-(1,1,2-trifluoro-2-trifluoromethoxyethoxy)phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea.
Formule empirique	C17 H9 Cl F8N2 O4
Famille chimique	benzoylphénylurée.
Poids moléculaire	492,7 g/mol.
T° de Fusion	176 à 179 C°
Solubilité dans l'eau	3 µg/l
Photolyse	139 jours.

1.4.2. Mécanisme d'action

Le Novaluron appartient aux inhibiteurs de synthèse de la chitine, qui inhibe la formation de la chitine au stade larvaire pour plusieurs insectes (lépidoptères, coléoptères, homoptères, et diptères) (Tom lin, 1997), il agit par ingestion ou par contact (Stephen, 2005), causant ainsi un dépôt anormale de l'endocuticule avec un échec de la mue, et aussi une incompatibilité avec les ennemis naturels a été signalé (Culter *et al.*, 2006).

Le Novaluron a une puissante activité insecticide sur des importants insectes ravageurs de culture (Culter *et al.*, 2005), et une très faible toxicité pour les mammifères, oiseaux, et vers de terre (Ishaaya et Horowitz, 1998). Mais hautement toxique pour certains crustacées (WHO, 2005).

1.4.3. Métabolisme chez les animaux

Le métabolisme du Novaluron uniformément radio marqué dans l'anneau difluorophenyl et séparément dans l'anneau chlorophenyl a été étudiée chez les chèvres, la plupart de la radioactivité a été éliminée dans les fèces, 52% de la dose administrées pour la (chlorophenyl 14C)- Novaluron et 72% pour la (chlorophenyl 14C)- Novaluron.

Le métabolite, l'acide 2,6-difluorobenzoïque a été trouvé dans les reins (TRR 5,1%) et 1-(3-chloro-4-(1,1,2- méthoxyéthoxytrifluoro-2-trifluoro) phenyl) urée a été identifié dans le foie, TRR a 7,3 % (0,025 mg/kg). Dans les fèces, 3-chloro-4-(1, 1,2-trifluoro-2-trifluoro aniline), le Novaluron ne subit qu'un métabolisme mineur chez les chèvres et ce le métabolisme limité et compatible avec un clivage de la liaison d'urée de benzoyl (Corden, 1999).

1-4-4- Toxicité aiguë

Le Novaluron de qualité technique est faiblement toxique par voie orale et cutanée, de même que par inhalation. Il est peu ou pas irritant pour les yeux et la peau et il n'est pas considéré comme un sensibilisant cutané. Cependant, la préparation commerciale PC Rimon 7.5WDG, contenant 7,3 % de concentré de qualité technique, est considérée comme peu toxique par les voies orale et cutanée, très peu irritante pour la peau, corrosive pour les yeux, et n'est pas considérée comme un sensibilisant cutané.

1-4-5- Toxicité chronique

Les études à long terme, tant chez le rat que chez la souris, n'ont révélé aucun signe d'oncogénicité attribuable au traitement, et ce, quelle que soit la dose administrée. Les effets observés chez l'une et/ou l'autre espèce étaient présence d'anémie hémolytique et les effets secondaires d'agression oxydative et de réponse régénérative comprenant la tuméfaction et la congestion de la rate et une érythropoïèse et une hémosidérose extramédullaire, une augmentation du poids du foie et une diminution du poids des surrénales. Selon les données de la base, la durée de l'exposition ne semble pas influencer sur la toxicité. Le Novaluron n'est pas toxique pour la reproduction et le développement.

1-4-6- Effet de Novaluron sur les organismes biologiques

Le novaluron et son principal produit de dégradation, le 275-352I sont extrêmement toxiques chez les invertébrés aquatiques. Les CE50 - 48 h varient de 0,31 µg/l à 1,85 µg/l chez *Daphnia magna*. Ces produits sont hautement toxiques chez les poissons d'eau douce avec des CL50 - 96 h variant de 510 µg/l à plus de 950 µg/l chez la truite arc-en-ciel. Le coefficient de partage octanol-eau (4,3) indique que le Novaluron possède un risque élevé de bioaccumulation dans les tissus des organismes aquatiques. Ceci a d'ailleurs été confirmé par des études de bioconcentration.

Le Novaluron est faiblement toxique chez les oiseaux exposés par voie orale à une dose unique avec une DL50 supérieure à 2 000 mg / kg p.c. chez le canard colvert et le colin de Virginie.

Cet insecticide est faiblement toxique chez les abeilles avec une DL50 supérieure à 100 µg/abeille.

2- les nanoparticules de cadmium

Les nanoparticules (NPs) métalliques sont très répandues à cause de la simplicité de leurs méthodes de synthèse et de la diversité de leurs applications. La toxicité des NPs métalliques a été montrée chez plusieurs organismes, cependant plusieurs questions fondamentales demeurent quant à leurs effets sur les systèmes biologiques. Leur taille à l'échelle nanométrique leur procure des propriétés uniques qui peuvent entraîner des effets toxiques nouveaux et différents qui ne sont pas encore élucidés. Pour permettre un développement responsable et sécuritaire des nanotechnologies utilisant des NPs métalliques,

une meilleure compréhension des mécanismes de toxicité des NPs métalliques au niveau cellulaire est donc requise.

2.1- Définition des nanoparticules de cadmium (points quantiques)

Le cadmium (Cd) est un métal trace relativement rare qui n'existe pas à l'état natif. C'est un élément mineur constituant divers minerais de métaux non ferreux, s'associant souvent au Zn, au plomb ou au mercure. La concentration moyenne de Cd dans la lithosphère a été estimée à 0,098 mg/kg (**Heinrichs, 1980**).

Le Cd peut être dispersé dans l'atmosphère par entraînement de particules provenant du sol et par les éruptions volcaniques. Les activités industrielles telles que le raffinage des métaux non ferreux, la combustion du charbon et des produits pétroliers, les incinérateurs d'ordures ménagères et la métallurgie de l'acier peuvent constituer les principales sources de rejets atmosphériques.

Le cadmium a de multiples utilisations, notamment dans les écrans de télévision, les barres de contrôles des réacteurs nucléaires, les colorants (émail, glaçure). Il entre aussi dans la composition de nombreux alliages à bas point de fusion (soudures, brasures) et sert à la fabrication de certaines batteries d'accumulateurs (piles rechargeables). Mais ses principales concernent les revêtements anticorrosion (appliqués en couche mince sur l'acier par cadmiage, le cadmium protégeant contre la corrosion, en particulier saline) ou encore la fabrication de pigments de couleurs (jaune et rouge).

2.2- caractéristiques des nanoparticules de cadmium

Les points quantiques (quantum dots : QD) constituent les principaux nanomatériaux métalliques à base de cadmium. Ce sont des semi-conducteurs confinés dans les trois dimensions spatiales, leurs caractéristiques sont étroitement liées à la taille et à la forme du cristal. Actuellement, les QDs les plus disponibles dans le commerce sont ceux composés de cadmium comme le cadmium-tellure (CdTe) et le cadmium-sélénium (CdSe) (**Lim et al., 2003**).

Les noyaux des QDs semi-conducteurs réactifs sont entourés par une enveloppe, tel que la silice ou d'une couche de ZnS qui les protègent de l'oxydation et améliore leur rendement photo-lumineux (**Dabbousi et al., 1997 ; Sass, 2007**). Les noyaux sont produits à partir d'une réaction de formation de germes de métal à haute température.

2.3- Utilisation des nanoparticules de cadmium

Les QDs à base de cadmium sont utilisés dans les transistors, les cellules solaires, l'optique, la spectrométrie et l'imagerie des rayons X et gamma, et les diodes. Ils sont également utilisés en imagerie médicale en raison de leur caractère fluorescent. Ils deviennent un outil standard de laboratoire pour étudier le comportement moléculaire de cellules vivantes ou marquer certaines cellules (**Figure 04**). Leur fluorescence, leur stabilité et la facilité avec laquelle on peut les modifier chimiquement ont incité les chercheurs à explorer leur usage comme agents d'imagerie médicale et pour désigner des tumeurs (**Lovrić et al., 2005**).

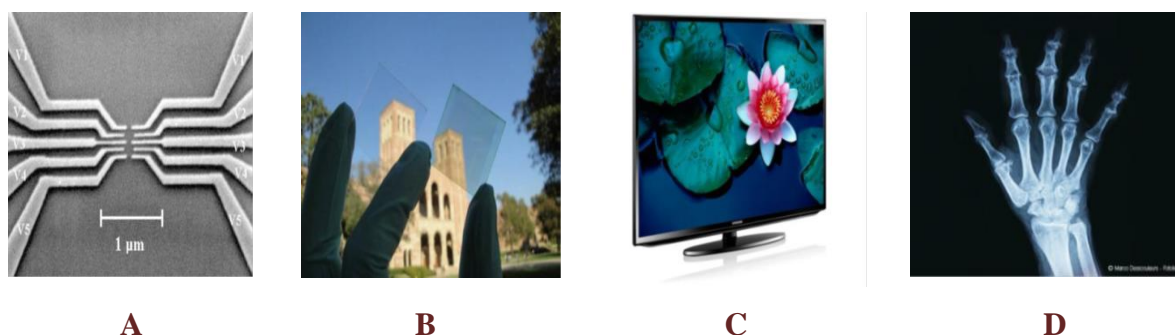


Figure 4. Utilisations des nanocristaux de cadmium; a. micro-transistor, b. cellules solaires, c. écran LED avec des nanocristaux ; d. imagerie médicale (rayons X) (**Lovrić et al., 2005**).

2.4. Effets des nanoparticules de cadmium sur les organismes biologiques

L'impact potentiel toxique des NMs peut être attribué à plusieurs facteurs comme la forme, la composition chimique et la petite taille des particules (**Hardman et al., 2006 ; Casals et al., 2008**) Ajouté à ces facteurs, les nanocristaux de cadmium peuvent présenter d'avantage d'impacts en raison de la toxicité du cadmium. Il a été démontré que les QDs à base de CdTe peuvent traverser les membranes des cellules des mammifères (**Maysinger et al., 2007**)

Les points quantiques de cadmium induisent des atteintes cytotoxiques et provoquent un stress oxydant lors d'études in vitro (**Choi et al., 2007; Lee et al., 2009**). L'injection de points quantiques à base de Cd/Se/Te provoque chez la souris une hépatotoxicité et un stress oxydant (**Lin et al., 2011**). Chez les organismes aquatiques, les nanocristaux de cadmium peuvent provoquer des effets toxiques ; par exemple l'exposition des moules d'eau douce *Elliption complanata* aux QDs de Cd présentait des effets immunotoxiques et conduisait à un

stress oxydant et des altérations de l'ADN après 24h à des concentrations comprises entre 1,6 et 8 mg/L (Gagné *et al.*, 2008a).

Chez la truite arc-en-ciel au niveau des hépatocytes, les QDs de CdTe s'accumulent dans les tissus et induisent les métallothionéines, biomarqueur des mécanismes de détoxification (Gagné *et al.*, 2008b).

Chez les épinoches, il a été démontré que l'exposition aux QDs de CdS (5 à 500 µg/L) provoquait des pathologies hépatiques et altérait la reproduction (Sanders *et al.*, 2008) L'exposition du poisson zèbre par voie alimentaire aux nanoparticules de sulfure de cadmium (8 et 50 nm) provoque des atteintes génomiques et module l'expression de certains gènes et perturbe la respiration mitochondriale (Ladhar *et al.*, 2013).

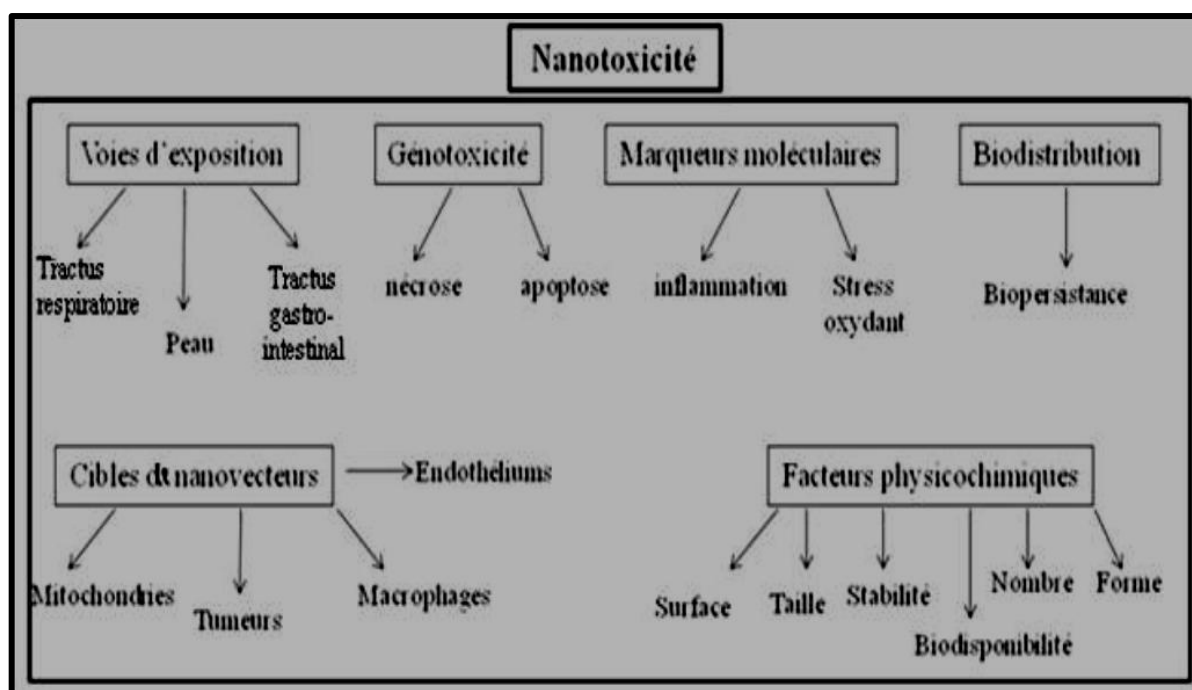


Figure 5. Toxicocinétique et toxicodynamiques des NPs (modifié d'après Vega-Villa, 2008)

2.5. Le sélénure de cadmium (CdSe)

Les nanocristaux semi conducteur sont des objets de taille comprise entre 1 et 100 nm et formé de quelques dizaines de milliers d'atomes arrangés selon un ordre cristallin. Ils sont réalisés par synthèse chimique (Chevalier, 2004) en mélangeant dans une solution les éléments (par exemple des atomes de cadmium et sélénium) qui composent le matériau semiconducteur. A des températures de quelque centaine de degrés, les différents éléments s'assemblent pour démarrer la nucléation et la croissance du matériau.

A cette échelle de taille intermédiaire entre l'échelle atomique et macroscopique, les charges électroniques sont confinées à l'intérieur du nanocristal de manière analogue aux particules dans une boîte. Cet effet de confinement quantique entraîne une modification fondamentale de la structure électronique par rapport à celle du matériau massif.

2.5.1. Définition

Le séléniure de cadmium (CdSe) appartient aux semi-conducteurs II-VI « c'est à dire qu'il est constitué d'un élément de la colonne II de la classification périodique de Mendeleïev et d'un élément de la colonne VI ». ayant un gap direct égale à 1.73 eV (Fasoli *et al.*, 2007), un coefficient d'absorption élevé et une photosensibilité élevée (Waldau *et al.*, 1988).

Avec quelques additifs, CdSe peut trouver des applications dans beaucoup de dispositifs peu coûteux, tels que les diodes électroluminescentes (Matsumura *et al.*, 2002), piles solaires (Frese *et al.*, 1982), détecteurs photoélectriques (Hernandez *et al.*, 2004), photographie d'électro (Uthana, 1981), et des lasers (Klude *et al.*, 2002).

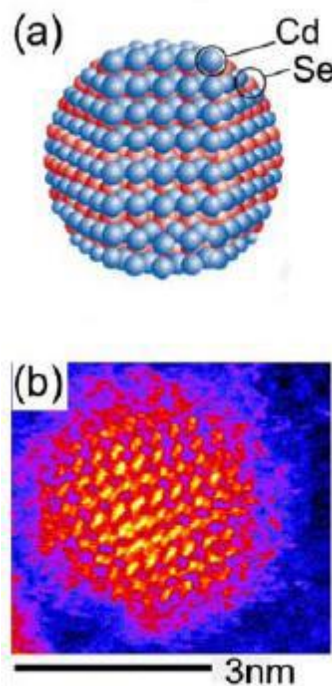


Figure 6. (a) Vue schématique d'un nanocristal de CdSe.

(b) Image de microscopie électronique haute résolution d'un nanocristal de CdSe

(Berciaud, 2006)

2.5.2. Propriétés physico-chimiques

Les études montrées que la morphologie de la nanoparticule de CdSe est pas uniforme et contient de nombreux petits NPs irréguliers, et moyenne de leur taille des particules est d'environ 15 nm (Zhang *et al.*, 2002).

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques de Séléniure de Cadmium (Guo *et al.*, 2003).

Propriétés physico-chimiques	
Etat physique	solide
Formule	CdSe
Poids moléculaire	112.41
Point/intervalle de fusion	320.9 °C
Point/intervalle d'ébullition	765 °C
Densité	donnée non disponible
Pression de vapeur	1.33 hPa dans 394 °C
Vitesse d'évaporation	donnée non disponible
Densité de vapeur	donnée non disponible
Solubilité	insoluble
Point d'éclair	indéterminé
Température d'auto-inflammabilité	indéterminé

2.5.3. Applications des nanocristaux (CdSe)

L'application des nanocristaux semi-conducteurs II-VI la plus développée à l'heure actuelle est celle du marquage fluorescent d'objets biologiques (Pellegrino *et al.*, 2005).

Les nanocristaux peuvent ainsi remplacer les fluorophores organiques (phycocérythrine, cyanine, Alexafluor,.....) notamment grâce à leur stabilité augmentée jusqu'à plusieurs jours (Guo *et al.*, 2003), et à leur couleur d'émission pure permettant l'utilisation simultanée de plusieurs types de nanocristaux de taille différentes pour visualiser par exemple plusieurs parties d'une cellule (Gao *et al.*, 2004).

Suivant les biomolécules auxquelles ils sont conjugués, les nanocristaux se fixent sur les membranes cellulaires et on cible des composants du cytoplasme ou du noyau à l'intérieur de la cellule. Les nanocristaux peuvent être utilisés pour l'imagerie in-vitro (**Bruchez JR et al., 1998 ; Chan et Nie, 1998 ; Wu et al., 2003 ; Parak et al., 2005**) où in-vivo (**Dubertret et al., 2003**) de métaux lourds.

2.5.4. Synthèse des QDs de CdSe

Il existe plusieurs méthodes pour obtenir les nanoparticules de CdSe. La synthèse des nanocristaux de CdSe a été faite par des techniques chimiques standards à l'air libre. Un mélange de CdO (1,8 mmole, 0,2311 g), acide oléique (OA, 6,0 mmole) et diphényl'éther (8 ml) a été chauffé jusqu'à 180°C pendant 2 heures. Ensuite, une solution de 3,2 g de sélénium TOP, qui contient 0,32 g, 4,0 mmole de sélénium, a été injectée très rapidement dans cette solution chaude.

La synthèse a été effectuée sous flux de N₂OA un temps de réaction donné (1 h), un aliquote a été sorti du flacon de réaction par une petite seringue et a été rapidement transféré dans une 1/2 mole avec du chloroforme. Le refroidissement rapide de l'aliquote chaud par le chloroforme froid a stoppé la croissance des nanocristaux.

Les nanocristaux de CdSe obtenus par cette technique ont une forme sphérique. De plus, il a été trouvé que des nanocristaux de CdSe ayant une forme de tétrapode pouvaient être obtenus en suivant la même procédure que celle décrite précédemment en ajoutant 0,2 mmole en plus de MnCl₂, FeCl₂ et HCl (solution aqueuse de 37%), respectivement, au mélange de CdO, OA et diphényl'éther avant de chauffer (**Phuong, 2005**).

2.5.5- Effet sur la santé humaine

2.5.5.1- Toxicocinétique

A) Absorption

Les points quantiques sont utilisés comme sondes fluorescentes dans l'imagerie médicale diagnostique et en thérapeutique, en raison de leurs propriétés optiques et de leur capacité à établir des liens covalents avec des peptides, des anticorps, des acides nucléiques ou avec d'autres molécules de faible poids. Chan et Nie en 1998, cités par Smith *et al.*, (2004), ont été les premiers à démontrer in vivo que des puits quantiques de CdSe / ZnS enrobés

d'acide mercaptoacétique pouvaient se lier à la transferrine sanguine. Ce complexe fluorescent était sélectivement absorbé par des cellules cancéreuses (**Smith et al., 2004**).

B) Distribution

** L'exposition par inhalation : Aucune donnée

** L'exposition cutanée : Aucune donnée

** L'exposition par ingestion : Aucune donnée

** L'exposition par d'autres voies : Dans une étude par voie intraveineuse chez la souris, (**Akerman et al., 2002**) rapportent que la nature de l'enrobage de puits quantiques de CdSe pouvait modifier la distribution de ces nanomatériaux dans les tissus et organes. Il s'est avéré que l'enrobage avec le PEG diminuait d'environ 95 % la captation par le foie et la rate et prolongeait la demi-vie sanguine des puits quantiques. D'autres types d'enrobages peptidiques augmentaient la distribution dans les poumons ou dans les tumeurs du sein qui ont été induites lors de l'expérience. Les auteurs notent l'absence de puits quantiques dans la peau recouvrant le site tumoral, dans le cerveau et dans les reins des animaux.

C) **Métabolisme** : Aucune donnée.

D) **Excrétion** : Aucune donnée

2.5.5.2- Les effets selon les voies d'exposition (administration)

** L'exposition par inhalation : Aucune donnée

** L'exposition cutanée : Aucune donnée

** L'exposition par ingestion : Aucune donnée

** L'exposition par d'autres voies :

- Les effets sur les organes : Aucune donnée
- Les effets immunologiques et allergiques : Aucune donnée
- Les effets sur la reproduction : Aucune donnée
- Les effets sur le développement : **Dubertret et al. (2002)** ont injecté des puits quantiques de (CdSe) enrobés de n-poly (éthylène glycol) phosphatidyléthanolamine (PEG-PE) et phosphatidylcholine (PC) dans des cellules embryonnaires de la

grenouille *Xenopus*. Ils concluent à l'absence de toxicité significative pour le développement embryonnaire.

- Les effets génotoxiques : Aucune donnée
- Les effets cancérogènes : Aucune donnée.
- Les effets cellulaires et humoraux : Dans une étude *in vitro*, **Derfus *et al.* (2004)** ont évalué la cytotoxicité des puits quantiques de CdSe. La viabilité des hépatocytes incubés dans une solution contenant les puits quantiques diminuait en fonction de la concentration ($0,0625 < 0,25 < 1$ mg/mL) et diminuait davantage si les puits quantiques avaient été soumis à des rayonnements ultraviolets (UV) pendant des durées de 1, 2 et 4 heures. Les puits quantiques qui avaient été exposés aux UV pendant 8 heures réduisaient la viabilité cellulaire de façon importante et comparable pour les trois concentrations (6 % de cellules viables). Les auteurs concluent à une cytotoxicité significative de puits quantiques de CdSe, secondaire à une oxydation de leur surface et à la libération d'ions Cd²⁺, reconnus cancérogènes pour l'homme.

Kirchner *et al.* (2005) ont mis en évidence la cytotoxicité de solutions de nanocristaux de CdSe sur des cellules tumorales et sur des fibroblastes humains. Cet effet était plus important si l'enrobage des nanocristaux était fait d'acide mercaptopropionique, enrobage instable, alors que des enrobages plus stables (PEG-silice) réduisaient la toxicité aux concentrations utilisées. Des enrobages de phosphosilicate augmentaient l'effet, produisant des ions Cd²⁺ à l'intérieur même de la cellule. Il faut noter que des nanoparticules inertes d'or enrobées de polymères avaient aussi un effet cytotoxique comparable à celui des nanoparticules de CdSe. Les auteurs concluent que l'effet toxique peut être lié à l'effet direct des particules par précipitation sur les cellules et non seulement à la production d'ions Cd²⁺.

Shiohara *et al.* (2004) ont étudié *in vitro* la cytotoxicité de puits quantiques de CdSe enrobés d'acide mercaptoundécanoïque et d'albumine de sérum de moutons. Ils ont produit trois formes de puits quantiques qui différaient selon leur photoluminescence. Des cellules rénales de primates, des hépatocytes humains et des cellules de cancer du col utérin ont été exposés à 0, 0,05, 0,1 et 0,2 mg/mL pendant 24 heures. Les auteurs observent une diminution de la viabilité des 3 lignées cellulaires à des concentrations de 0,1 et 0,2 mg/mL, qui augmentaient avec la concentration.

Green et Howman (2005) ont effectué une expérience in vitro où ils ont incubé de l'ADN à doubles brins en torsade dans une solution de sélénure de cadmium encapsulée dans du sulfite de zinc fonctionnalisé avec de la biotine en surface.

Des rayonnements ultraviolets (UV) ont aussi été utilisés. Les résultats de cette étude démontrent que les puits quantiques altéraient l'ADN par la production de radicaux libres de SO₂ résultant de l'oxydation du ZnS. La proportion d'altérations de l'ADN variait en fonction de la présence (56 %) ou de l'absence (29 %) d'UV.

3. Modèle biologique étudié : l'escargot *Helix aspersa*

L'escargot, encore appelé limaçon ou colimaçon est un mollusque gastéropode pulmoné du genre *Helix*.

En 1980, les connaissances sur l'escargot petit-gris (*Helix aspersa* Müller) étaient très rudimentaires. Des études avaient été réalisées sur son anatomie, la structure et le fonctionnement de la gonade et du tractus génital, le fonctionnement du rein et, enfin, les physiologies nerveuses et cardiaques. Par contre, un peu de recherches avaient été effectuées dans le domaine de l'écologie et de l'écophysiologie de cette espèce (**Bonnet J.C et al., 1990**).

L'escargot *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* O.F. **Müller, 1774**) communément appelé petit-gris, est un mollusque gastéropode pulmoné qui fait partie de l'ordre de stylommatophores, de la famille des helicidae.



Figure 7. Escargot *Helix aspersa* (photo personnel)

3.1. Biologie

Il possède une coquille dextre (qui s'enroule de gauche à droite), de couleur brun-jaune avec un diamètre moyen de 30 mm. Le corps de l'escargot est composé de deux parties distinctes : le pied et les viscères. Le pied lui permet de se déplacer avec un mouvement de glisse aidé par l'émission d'un mucus qui réduit la friction avec les surfaces rugueuses. Il comporte le système nerveux, la partie antérieure du tube digestif, la sole pédieuse et musculuse. Les viscères sont constitués des organes présents dans le tortillon à l'intérieur de la coquille à savoir : le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge jusque dans le pied.

3.2. Ecologie de l'escargot

Le petit-gris est une espèce ubiquiste, originaire des pays méditerranéens et de la façade atlantique française, très répandue en Europe et dans le monde. *H. aspersa* est assez rare dans les champs et les prairies, et préfère fréquenter la périphérie des zones cultivées, les lisières de forêts, voire les milieux forestiers (Kerney et Cameron, 2006). Il a un régime alimentaire non spécialisé composé de plantes (herbacées, graminées, légumes de culture, lichens, certaines céréales, champignons) (Barker, 2001 ; Chevalier *et al.*, 2001). L'escargot mastique ses aliments à l'aide d'une langue râpeuse appelée radula. Le sol fait également partie de son alimentation, et constitue un apport en calcium indispensable à la formation de sa coquille et influençant sa croissance (Gomot *et al.*, 1989 ; Dallinger *et al.*, 2001)

Hélix aspersa est surtout actif la nuit et en période humide. Les jours trop secs, il entre en estivation en se fixant contre une paroi et en obturant sa coquille d'un voile blanchâtre, l'épiphragme. A partir du mois d'octobre en Europe, l'escargot hiberne en s'enfouissant dans le sol ou en s'abritant des les interstices des murs. Sa coquille est alors obturée par un épiphragme épais. Il reprend généralement son activité au printemps quand les températures avoisinent les 12 - 14°C (Marasco et Murciano, 2003 ; Kerney et Cameron, 2006).

3.3. Intérêts de l'utilisation de l'escargot en écotoxicologie

Les stades juvéniles et adultes d'*H. aspersa* sont utilisés dans de nombreuses études écotoxicologiques. En effet, de par leur place au sein de l'écosystème terrestre, les escargots sont capables d'intégrer des sources multiples de contamination (sol, atmosphère, végétaux)

par diverses voies : digestifs, respiratoire et/ou cutanée. Les capacités de résistance et d'accumulation des métaux ont été démontrées chez ces escargots (Scheifler *et al.*, 2002a,b).

Les petit-gris sont des bioindicateurs d'exposition et d'effets de polluants métalliques (Gomot, 1997 ; Coeurdassier *et al.*, 2000, 2002 ; Scheifler *et al.*, 2002a,b ; Fritsch *et al.*, 2011) ou organiques (Coeurdassier *et al.*, 2002b, 2011 ; de Vaufleury *et al.*, 2006 ; Regoli *et al.*, 2006).

Un bioessai évaluant les effets des substances chimiques et des matrices contaminées sur la survie et la croissance d'*H. aspersa* juvéniles a été standardisé (ISO 15952:2006).

Helix aspersa a également permis de suivre les transferts des divers polluants (organiques, métalliques, radionucléides) dans des chaînes trophiques (Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2000 ; Scheifler *et al.*, 2002b, 2003, 2006 ; Scheifler, 2002 ; Hispard *et al.*, 2008), ou encore d'évaluer les cinétiques de transfert milieu-escargot (Gimbert *et al.*, 2006, 2008) (Sandrine *et al.*, 2003).

3.4. Reproduction et ponte

Helix aspersa est hermaphrodite : une seule gonade produit les spermatozoïdes et les ovules qui atteignent l'orifice génital par des conduits séparés. Le processus de l'accouplement est complexe, il peut avoir lieu plusieurs fois avant la ponte. Les 2 escargots se positionnent tête-bêche pour échanger leurs spermatozoïdes. Le temps d'accouplement est variable et peut durer plus de 12 heures (Figure 08).



Figure 8. Accouplement d'*Helix aspersa* (photo personnel)

La fécondation a lieu au niveau de la chambre de fertilisation, une quinzaine de jours après l'accouplement. Les ovocytes fécondés sont entourés d'albumen (secrété par la glande à albumen), qui constitue les réserves nutritives pour le développement embryonnaire, puis d'une coque calcaire. Pour pondre, l'escargot creuse avec sa tête une cavité de 2-4 cm de profondeur dans le sol, et y dépose une ponte constituée en moyenne d'une centaine d'œufs. La ponte peut durer jusqu'à 36 heures. A une température de 18-20°C, les œufs vont se développer en 12 à 15 jours avant d'éclore. Ensuite les jeunes éclos remontent ensuite en surface, ce qui prend 4 à 5 jours supplémentaires avant de pouvoir les apercevoir (**Lecalve, 1989**).

3-5- Devenir des éléments métalliques dans les invertébrés

La majorité des invertébrés terrestres, dont les gastéropodes, absorbent les EM essentiels ou toxiques par la nourriture et une absorption via l'épithélium digestif, ou par la peau (**Marigomez et al., 1998; Scheifler et al., 2003**). Une fois les différentes barrières biologiques passées (épithélium cutané et digestif), les éléments métalliques circulent dans l'organisme grâce à l'hémolymphe et sont distribués entre les différents organes où ils peuvent être stockés. Les hémocytes jouent un rôle important dans le métabolisme des métaux et leur distribution dans les différents tissus (**Cheng et Sullivan, 1984**) grâce à leur faculté de phagocytose des corps étrangers (**Marigomez et al., 1998**).

Le transfert des éléments métalliques, au travers des membranes plasmiques cellulaires, s'effectue majoritairement par diffusion passive ou par des mécanismes nécessitant de l'énergie comme le transport par des protéines membranaires, spécifiques ou non, ou par endocytose des molécules.



Chapitre II : Choix stratégique et démarche expérimentale

Cette partie vise à présenter les principaux choix ayant guidé l'élaboration du programme de recherche mis en place dans cette thèse.

1- Choix du modèle biologique

Les gastéropodes terrestres, parmi d'autres espèces, répondent parfaitement aux critères définis par Phillips pour qu'un organisme soit considéré comme un bioindicateur :

- présent dans les aires polluées et tolérance importante aux variations de l'environnement.
- facile à élever et à transférer.
- organisme sédentaire, à large répartition géographique.
- espèce abondante et facile à récolter.
- durée de vie assez longue.
- taille suffisante pour analyses in toto ou par organe.

Les mollusques gastéropodes comme les escargots terrestres sont utilisés dans les études écotoxicologiques et sont considérés comme de bons bioindicateurs de pollution notamment par les métaux (Boucenna, 2010) et les HAPs (Barker, 2001; Dallinger *et al.*, 2001; Beeby et Richmond, 2002 ; Regoli *et al.*, 2006). Ces consommateurs primaires occupent une place particulière dans l'écosystème à l'interface sol-air-végétation (Belhaouchet *et al.*, 2012).

2- Objectifs détaillés et justification de la démarche expérimentale

L'objectif général de cette étude est d'évaluer la pollution mixte d'un pesticide (Novaluron) et d'une nanoparticule de cadmium (CdSe), grâce à l'utilisation d'un modèle bioindicateur présent dans les écosystèmes terrestres, l'escargot *Helix aspersa*. La première partie de ce travail a consisté d'étudier l'effet de Novaluron, de CdSe et de la combinaison Nov/CdSe sur le comportement et les paramètres morphophysologiques de *Helix aspersa*. Dans la deuxième partie, nous avons essayé d'identifier des biomarqueurs sensibles au Novaluron, au CdSe et à la mixture de Nov/CdSe quelque soient la durée d'exposition et la concentration utilisée. L'originalité de cette partie consiste à l'utilisation des réponses d'expression génique représentatives de différents mécanismes (fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, stress oxydant et détoxification) comme outils pour mettre en évidence les impacts de cette pollution mixte sur l'escargot *Helix aspersa*.

3- Choix des concentrations

Dans l'expérience d'exposition sub-chronique des escargots au CdSe, au Nov et au Nov/CdSe, nous avons choisi d'utiliser deux concentrations pendant 90 jours.

- Le Novaluron : Le Novaluron a été utilisé sous forme de préparation commerciale. Nous avons choisi deux doses (1.2 et 2.4 ul/g) inférieurs à la dose létale 50 OÙ il a été déterminé par la NOEC chez les invertébrés terrestres de 235 à 1843 mg/kg.
- Le CdSe : selon les études toxicologiques et écotoxicologiques traitant les nanoparticules métalliques, nous avons choisi la dose (3.6 ug/g) (**Jackson *et al.*, 2012**), et une autre dose de notre choix où elle est plus grande que la première dose (7.2 ug/g).
- La mixture : Les mixtures ont été testées aux concentrations citées ci-dessus

Tableau 3 : Les doses utilisées dans la mixture (CdSe + Novaluron)

Mixturity	Désignation	Concentration en CdSe et Novaluron
Mixturity 1 :	M1	3.6ug/g de CdSe + 1.2ul/g de Novaluron
Mixturity 2 :	M2	7.2ug/g de CdSe + 2.4ul/g de Novaluron

4- Choix de mode de traitement par injection

Nous avons choisi l'injection des escargot à l'aide d'un microseringue, selon l'étude de (**Burton R.F *et al.*, 1987**), qui ont été injectés les escargots *Hélix aspersa* à travers le côté du pied avec des aliquotes de 1 M de MgCl, qui sont suffisantes pour provoquer une relaxation complète.

5- Choix des paramètres biologiques

Il existe très peu d'informations dans la littérature concernant les réponses biologiques au niveau sub-cellulaire suite à une contamination par le CdSe et le Novaluron chez les invertébrés. Plusieurs auteurs proposent le stress oxydant comme le mécanisme clé de la toxicité. Les facteurs stressants à l'origine du risque sont de natures multiples, parmi ces facteurs de stress, les contaminations d'origine anthropique, telles que les métaux lourds et les pesticides. Nous avons donc décidé de vérifier si ces facteurs identifiés pour le CdSe et le Novaluron peuvent témoigner d'une toxicité mixte chez les escargots.

De même, nous nous sommes étudiés les impacts de Novaluron et du CdSe sur les mitochondries. Ces organites ont un rôle primordial, puisque l'énergie fournie par les molécules organiques est récupérée sous forme d'ATP (énergie utilisable par les cellules) dans la mitochondrie, la source principale d'énergie pour la cellule eucaryote, par le processus de phosphorylation oxydative. Ils interviennent aussi dans des processus critiques pour les cellules comme la génération du stress oxydant ou la mort cellulaire programmée. Les différentes études ainsi que le rôle important qu'occupent les mitochondries au sein des cellules ont conforté notre choix de suivre les impacts de ces deux polluants sur ce paramètre biologique.

6- Choix des marqueurs de contamination

Au cours de ces travaux de thèse, comme les concentrations utilisées en Novaluron étaient très inférieures aux doses létales, l'utilisation des marqueurs sensibles s'est avérée judicieuse.

Les changements comportementaux et physiologiques sont les premiers signes de perturbations dues à un stress. Les biomarqueurs de stress ont été choisis dans notre étude en raison de leur temps de réponse rapide et de leur sensibilité (**He et al., 2011**) mais aussi parce qu'ils permettent de caractériser et de mieux comprendre les modes d'actions toxiques d'un contaminant. Afin de mieux caractériser le stress oxydant, nous avons étudié les activités enzymatiques et non enzymatiques de divers antioxydants (CAT, GSH, GPX, GST), aussi l'activité de l'AchE (bioindicateur de neurotoxicité).

7- Choix de l'organe

Un organe majeur a été utilisé dans ce travail de thèse :

L'hépatopancréas : joue un rôle dans la digestion et l'absorption de diverses molécules organiques. De plus, c'est un site de stockage des métaux et de détoxification (**Sterling et al., 2007**). En effet, cet organe est un site important d'accumulation du Cd chez les crustacés (**Wang et al., 2001**). L'hépatopancréas est le siège où se déroule de multiples réactions oxydatives et en conséquence un site où la génération des radicaux libres pourra être considérable dans le cas d'une contamination métallique (**Borkovic et al., 2008**).



Chapitre III : Etude physiologique et comportementale

Introduction et objectif d'étude

Le nombre et la diversité des contaminants organiques (pesticides, HAP, PCB, médicaments,...) potentiellement présents dans l'environnement est une réalité à laquelle sont confrontées les recherches portant sur le devenir et les impacts de ces substances. Selon les estimations, entre 30 000 et 100 000 substances sont concernées, il est donc impossible de les étudier au cas par cas (**Benoit *et al.*, 2011**)

Les produits manufacturés représentent un très gros marché de production et de vente évalué à 2.4 trillions de dollars, elles sont utilisées à grande échelle dans tous les domaines (biologie, médecine, ingénierie, optique, électronique, mécanique, chimie, pharmacologie, cosmétique (**Hardman, 2006 ; Paul and Lyons, 2008**). Cependant peu d'information sont connues sur le destin des nanoparticules, leur comportement, les voies d'exposition et de relargage dans le milieu (**Simonet et Valcarcel, 2009**). Malheureusement, il n'existe pas encore de réglementations concernant l'usage de ces nouveaux matériaux (**Audry, 2011**)

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

1- Matériel et méthodes

1-1- Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est un gastéropode pulmoné - l'escargot petit gris : *Helix aspersa*.

L'escargot *Helix aspersa* communément appelé Petit-Gris, est un mollusque gastéropode pulmoné appartenant à l'ordre des stylommatophores, famille des helicidae, sous-famille des helicinae (**Beaumont et Cassier, 1998**).

Sa coquille, dextre, est de couleur brun-jaunâtre avec un diamètre variant de 20 à 35mm et une hauteur de 25 à 40mm. Deux grandes parties sont distinguées : le pied et les viscères (**Figure 9**). 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, musculuse, la partie antérieure du tube digestif et le système nerveux.

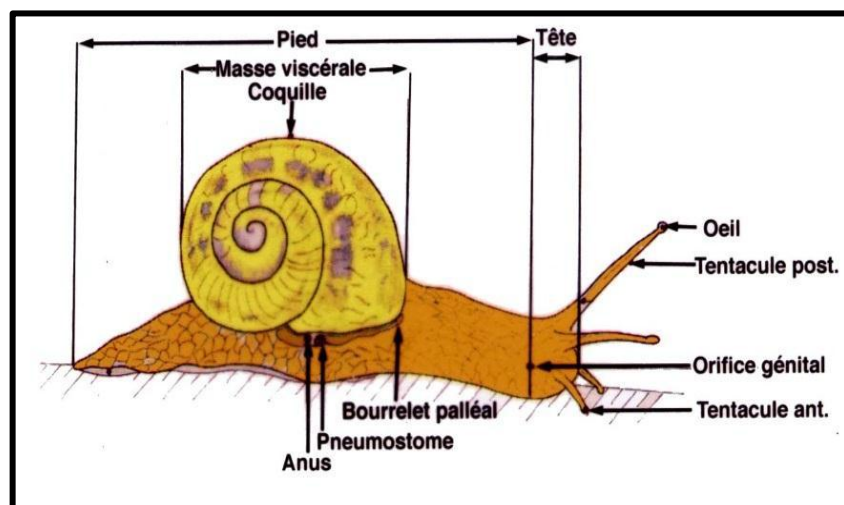


Figure 9. Morphologie externe de l'escargot (Kerney *et al.*, 2006).

Les escargots *Helix aspersa* (adultes), sont collectés au niveau de la région de Bekkaria de la wilaya de Tebessa. Ils sont élevés dans les conditions de laboratoire contrôlées avec une photopériode de 18h de lumière/24h, une température de 20°C, une humidité de 80 à 95% et nourris à la farine de blé dans des boîtes de polystyrène transparentes et perforées, avec une éponge humide pour maintenir l'humidité.

1-2 Matériel chimique

Le matériel chimique utilisé est présenté par :

- le Novaluron (C₁₇ H₉ Cl F₈ N₂ O₄), qui est une molécule chimique appartenant à la classe des inhibiteurs de la synthèse de la chitine et à la famille des benzoylphenylurées.
- Le séléniure de cadmium (CdSe) qui est un composé de cadmium et de sélénium.

1-3- Méthodes

1-3-1- Méthode de traitement

La toxicité par injection de Novaluron et de CdSe sur les escargots *Helix aspersa* est évaluée en utilisant la méthode de (Van Iersel, S *et al.*, 2014) qui utilise un escargot d'eau douce simultanément hermaphrodite, le grand escargot *Lymnaea stagnalis*, comme organisme modèle pour étudier les effets du liquide séminal sur la reproduction des gastropodes. Ils ont fait l'anesthésie des escargots par l'injection de MgCl.

Pour chaque traitement nous avons choisi 10 animaux, les solutions préparées sont délicatement injectées une fois par deux jours sur la côté du pied de l'escargot en utilisant une microseringue. Les animaux témoins sont injecté par l'eau.



Figure 10. Injection des escargots *Helix aspersa* (photo personnel)

1-3-2- Effets comportementaux

Au cours de l'exposition aux différents traitements, nous avons également cherché à caractériser les effets de Novaluron, de CdSe et de la combinaison Nov/CdSe sur les comportements plus ou moins perturbés d'*Helix aspersa*. A partir de notre observations, certains comportements peuvent être observés, comme se nourrir normalement ou fuir la nourriture, ou en fonction de l'activité des animaux et de leur position spatiale dans l'enceinte d'essai : par exemple, actif ou inactif en position haute ou sur les supports, nous pouvons aussi noter s'il y a des changements de la couleur et du mouvement. Tous ces signes peuvent être observés à l'œil nu.

1-3-3- Mesures des paramètres physiologiques

Plusieurs paramètres biométriques sont considérés, à savoir :

- Le poids frais de l'escargot (tissus mous + coquille) est pesé chaque deux jour avant le traitement (pendant 12 semaines) à l'aide d'une balance afin d'évaluer de façon quotidienne les effets de novaluron, de CdSe et de leurs mixture sur les escargots *Helix aspersa*.
- Le poids frais de la coquille, le poids frais de la glande digestive sont pesés uniquement après sacrifice des animaux à la fin de chaque période de traitement à l'aide de la même balance utilisée précédemment (Coeurdassier, 2001).
- Le diamètre et la longueur de coquille est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse chaque semaine (pendant 12 semaine) de façon hebdomadaire, la mesure doit se faire délicatement pour éviter d'endommager le bord des coquilles des escargots. (Chevallier, 1992)

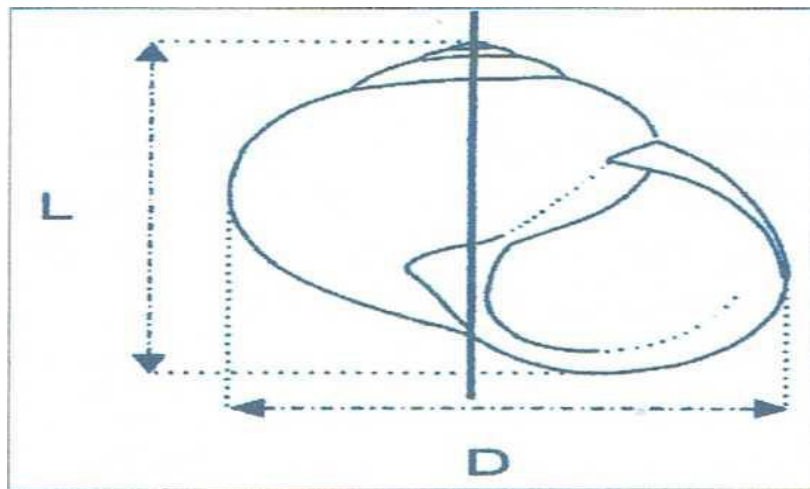


Figure 11. Mesure des deux diamètres D et L de *Helix aspersa* (Coeurdassier, 2001)

1-4- Analyse statistique

Les moyennes \pm déviation standard (DS), avec un niveau significatif de $p \leq 0.05$, sont calculées pour chaque groupe d'expérience, et pour mieux visualiser les résultats obtenus, la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant Microsoft office Excel 2013. Ces moyennes sont comparées par des tests statistiques qui servent à comparer entre les échantillons (Témoin et traité) grâce au logiciel MINITAB (version 17.01).

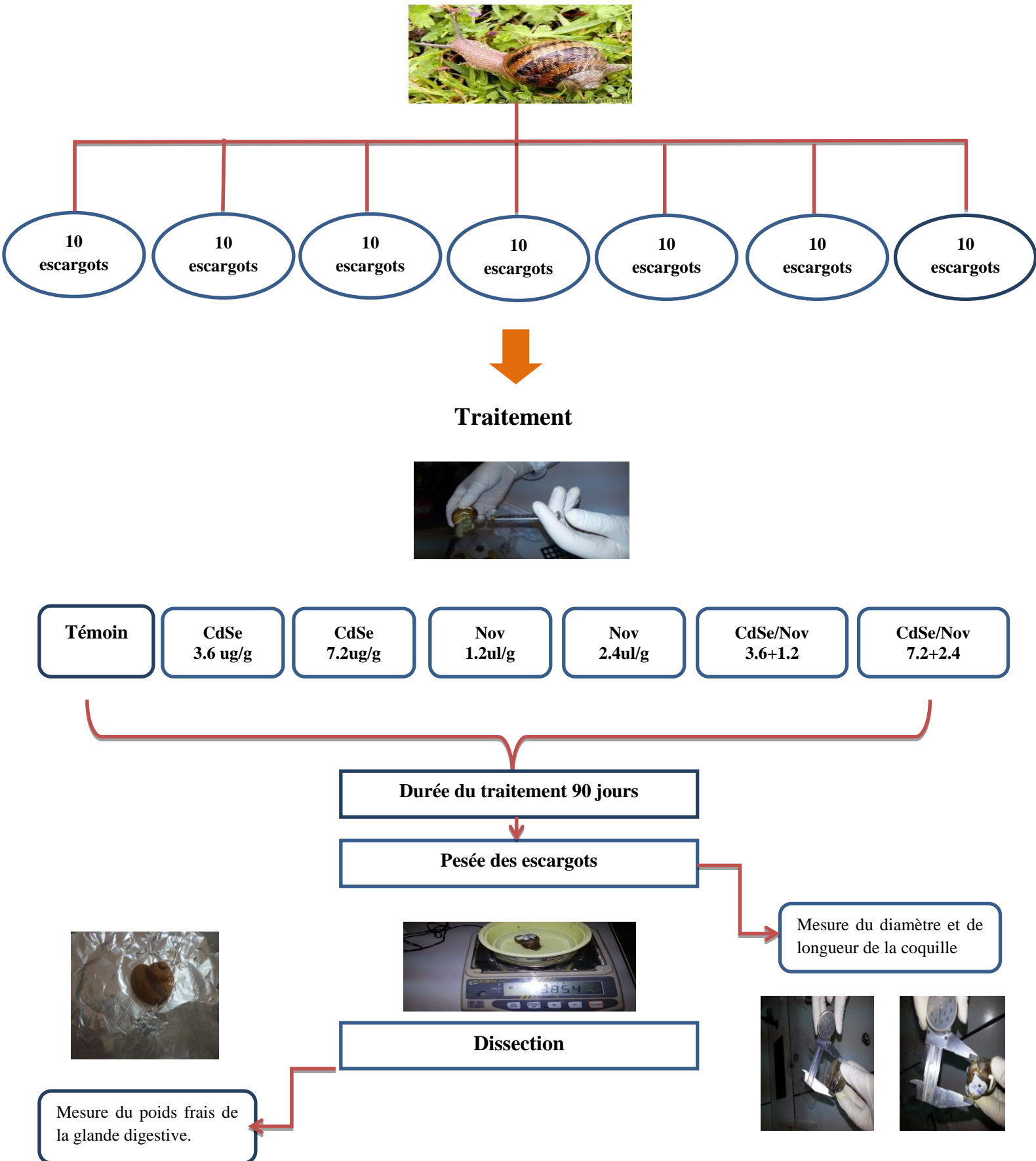


Figure 12. Schéma récapitulatif du protocole expérimental

2- Résultats

2-1- Effet sur le comportement

Les escargots exposés au Novaluron, CdSe et Nov/CdSe à deux doses ont montré une série de symptômes :

- **Diminution le taux de prise de nourriture** : les escargots traités par le Novaluron, par le CdSe et par la combinaison CdSe/ Nov ne sont plus attirés par la nourriture de façon dose-dépendante comparé aux escargots témoins, A la concentration élevée de CdSe (7.2 ug/g), de Nov (2.4 ul/g) et de combinaison CdSe/Nov (7.2 + 2.4), les escargots passent la plupart de leur temps au sommet des boîtes sans montrer aucune activité locomotrice et nutritionnelle après la première semaine d'exposition. Tandis qu'aux concentrations plus faibles de CdSe (3.6 ug/g), de Nov (1.2 ul/g) et de combinaison CdSe/Nov (3.6 + 1.2), la plupart des animaux ont montré une activité similaire à celle des escargots témoins pendant la période expérimentale.



Figure 13. Effet des différents traitements sur la nourriture des escargots

(Photo personnel)

- **Changement de la couleur de pied**: A la fin de la période de traitement, la couleur de pied des escargots traitée par le CdSe, par le Novaluron et par la mixture CdSe/Nov devient pâle, et nous avons remarqué qu'il y a une diminution de la dispersion des pigments noirs chez les escargots traitées par rapport aux escargots témoins.



Figure 14. Effet des différents traitements sur la couleur de pied des escargots

(Photo personnel)

- **perturbation de l'orientation** : la toxicité par le CdSe, le Novaluron et la combinaison CdSe/Nov peut perturber l'orientation et la capacité de déplacement des escargots, voici ce que nous avons observé en particulier chez les escargots traités par la mixture.



Figure 15. Effet des différents traitements sur le déplacement des escargots
(Photo personnel)

2-2- Effet sur les paramètres physiologiques

2.2.1. Le poids frais moyen des escargots

La Figure (16) met en évidence l'évolution du poids moyen des escargots en fonction du temps.

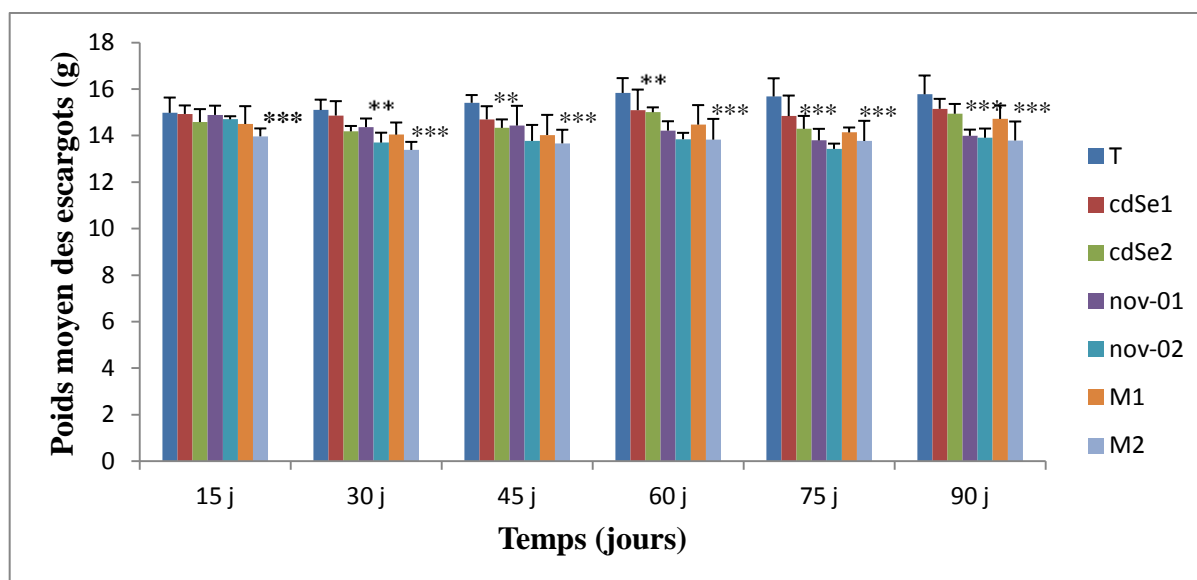


Figure 16. Evolution poids corporelle (GP) chez les escargots témoins et traités après 90 jours de traitement

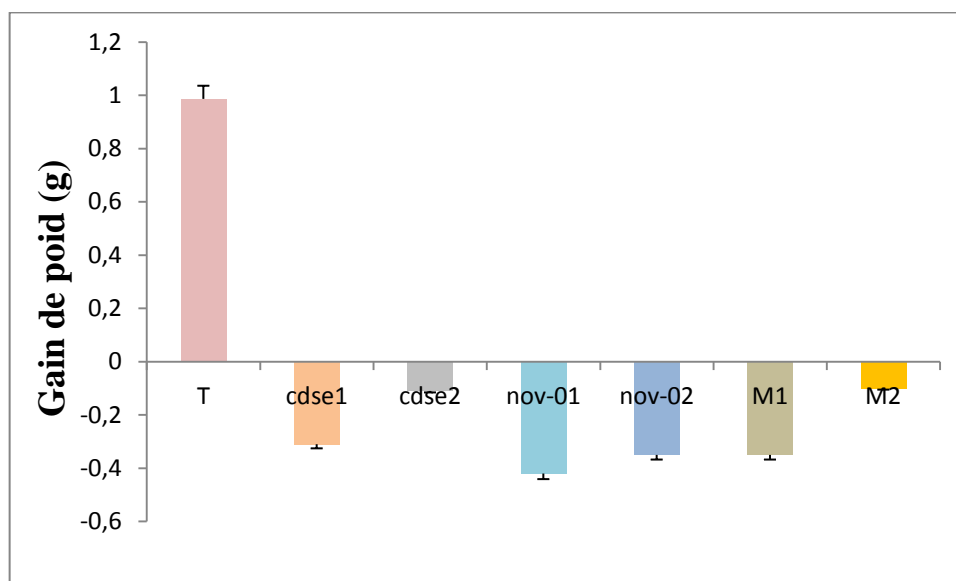


Figure 17. Evolution de gain du poids corporelle (GP) chez les escargots témoins et traités après 90 jours de traitement.

GPfi : Gain (poids corporel finale de dernière jour- poids corporel initiale de première jour)

A la fin de l'expérience, le poids frais moyen des escargots traités avait tendance à diminuer d'une façon dose dépendante, Nous constatons que le poids moyen des escargots ne semble pas affecté par le CdSe et par le Novaluron à deux doses pendant les deux premières semaines. A partir de la troisième et quatrième semaine, nous remarquons une légère diminution du poids des escargots traités. Nous avons mis en évidence une diminution très hautement significative ($p \leq 0.001$) du poids moyen des escargots traités par le CdSe et par le Novaluron dans le dernier mois de traitement.

Enfin, le poids frais moyen des escargots traités aux mixtures montre une diminution très hautement significative ($p \leq 0.001$) à partir de la première semaine d'exposition.

2.2.2- Le poids frais moyen de l'hépatopancréas

La Figure (18) illustre les variations du poids de l'hépatopancréas en présence de CdSe, de Nov et de la mixture CdSe/Nov.

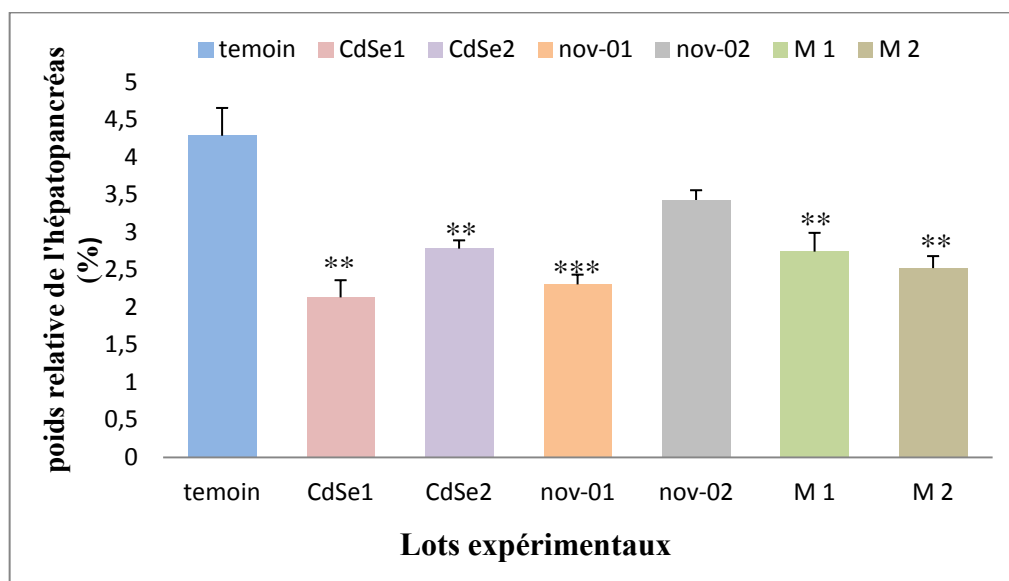


Figure 18. Évolution du poids moyen de l'hépatopancréas des escargots traités pendant 12 semaines

Le poids frais moyen de l'hépatopancréas diminue d'une façon très significative ($p \leq 0.01$) à partir de la plus faible concentration pour les escargots traités par le CdSe et par la mixture.

L'évolution de ce poids par exposition des escargots au Novaluron montre une diminution non significative ($p > 0.05$) à 2.4 ul/g et très hautement significative ($p \leq 0.001$) à 1.2 ul/g par rapport à celui des escargots témoins. Les M1 et M2 réduisent très significativement ($p \leq 0.01$) le poids frais moyen de l'hépatopancréas. Cette diminution est une diminution dose dépendante.

2.2.3. Le poids frais moyen de la coquille

Le poids frais moyen de la coquille (Figure 19) diminue d'une façon hautement significative ($p \leq 0.001$) à partir de la plus faible concentration pour les escargots traités par la mixture CdSe/Nov.

L'évolution de ce poids par exposition des escargots au CdSe et au Novaluron montre une diminution très significative ($p \leq 0.01$) et non significative ($p > 0.05$) à deux doses par rapport à celui des escargots témoins, Cette diminution est une diminution dose dépendante.

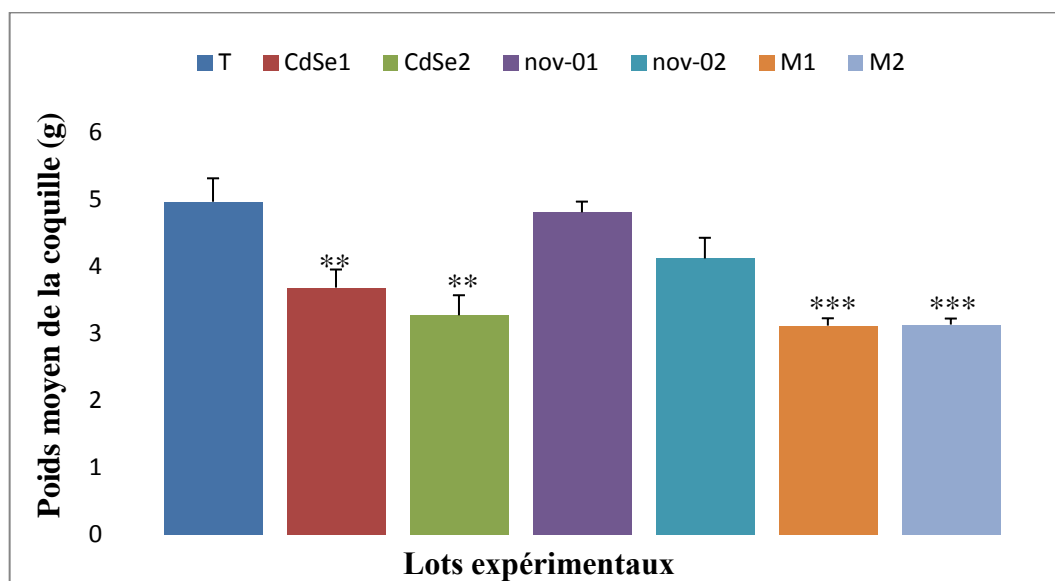


Figure 19. Effets du CdSe , de Novaluron et de leurs mixtures sur le poids frais moyen coquillère des adultes de l'escargot *Helix aspersa* après 90 jours de traitements.

2-2-4- Le diamètre de coquille

La figure (20) illustre l'évolution du diamètre D de la coquille des escargots *Helix aspersa* en présence de CdSe, de Novaluron et de combinaison CdSe/Nov.

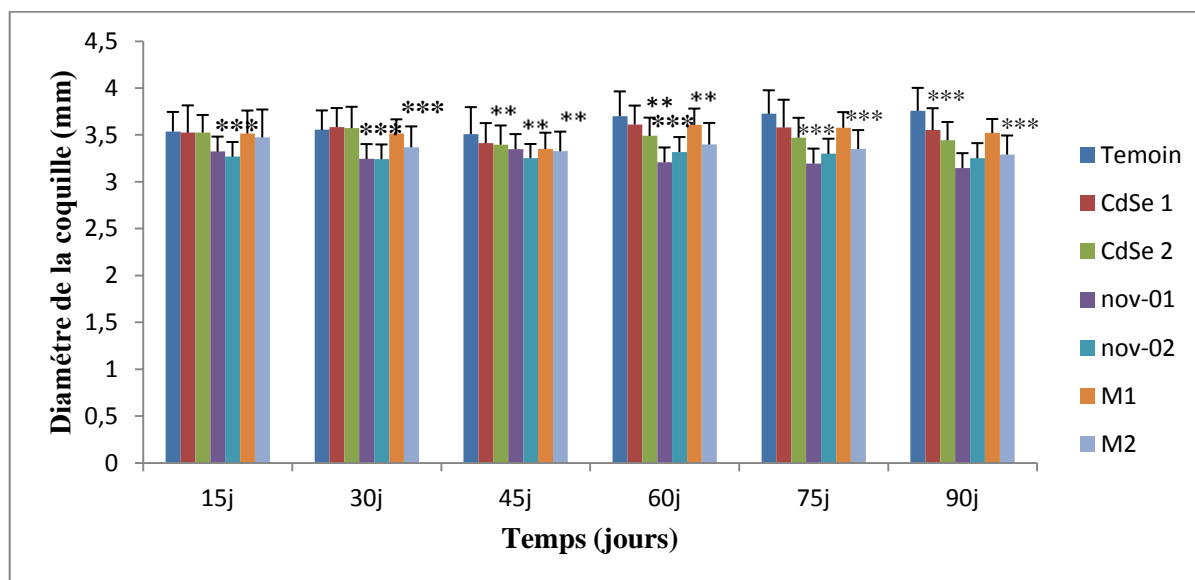


Figure 20. Evolution de diamètre de la coquille chez les escargots témoins et traités pendant 90 jours de traitement

Chez les escargots traités par le CdSe à deux doses (3.6 et 7.2) ug/g, nous constatons une diminution non significative ($p > 0.05$) du diamètre D de la coquille dès le premier mois

d'exposition, cette diminution devient significative ($p \leq 0.05$) au deuxième mois et très hautement significative ($p \leq 0.001$) au troisième mois de traitement.

Par contre chez les traités par le Novaluron et la mixture, nous notons une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) entre le diamètre D des témoins et des traités par les deux concentrations durant les trois mois de traitement.

2.2.5. La longueur de coquille

L'évolution de la longueur L de la coquille des escargots traités par le CdSe, le Novaluron et la mixture (Figure 21) montre une diminution très hautement significative ($p \leq 0.001$) par rapport à celui des escargots témoins pendant 90 jours de traitement. Nous remarquons que la diminution de ce paramètre est dose dépendante à partir de deuxième mois.

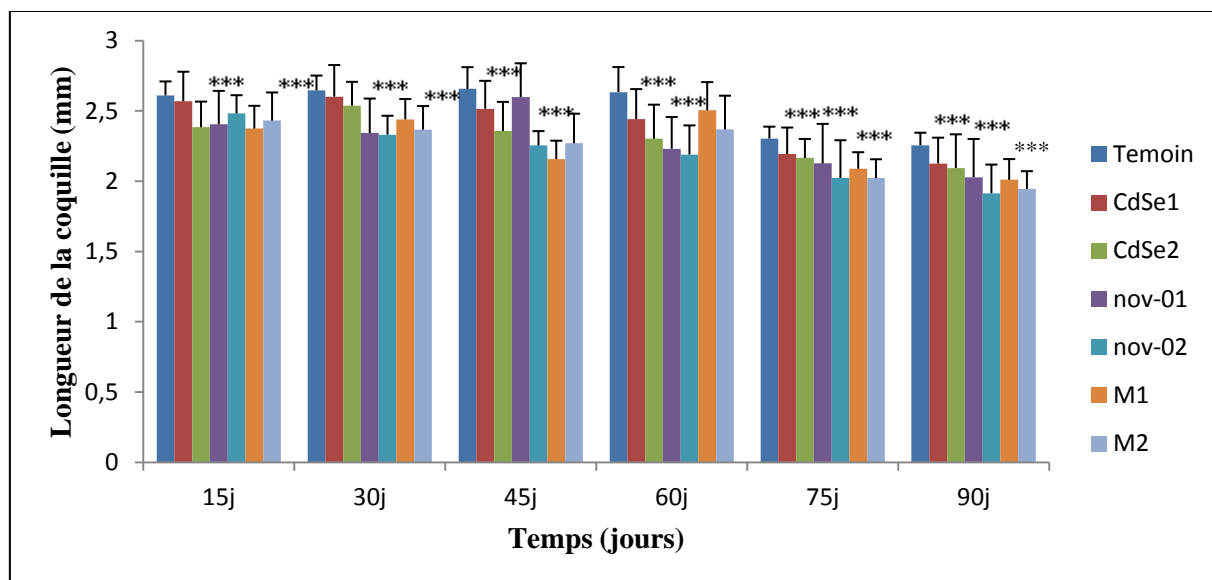


Figure 21. Evolution de longueur de la coquille chez les escargots témoins et traités pendant 90 jours de traitement

3- Discussion

L'utilisation des invertébrés pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes a une longue histoire dans les milieux aquatiques et terrestres. Les Gastéropodes Pulmonés sont des indicateurs écologiques pertinents de la pollution métallique et organique de l'écosystème terrestre. Les biomarqueurs constituent un outil biologique naturel qui peut signaler la pollution d'un milieu ainsi que la biodisponibilité des substances toxiques (**Hamdi-Ourfella et al., 2014**). L'escargot Petit Gris *Helix aspersa*, connu pour ses capacités à accumuler les polluants à des concentrations importantes dans ses tissus (**Grara et al., 2015**).

3-1- Réponses comportementales

Dans notre étude, nous avons notées des modifications de comportement chez les escargots traitées par le CdSe, par le Novaluron et par la mixture CdSe/Novaluron. **Reddy et Fingerman (1995)** ont étudié un impact physiologique du Cd conduisant à un changement de couleur chez le crabe *Ucapugilator* après 48h d'exposition à 10 mg/L de Cd (forte dose) par voie directe. Ces auteurs ont démontré que la diminution de la dispersion des pigments noirs dans les mélanophores (cellules contenant les pigments noirs) était significative suite à cette contamination. Apparemment, ce métal n'affecte pas directement les mélanophores, mais agit sur le processus neuroendocrinien qui contrôle le phénomène de dispersion (**Al kadissi, 2012**).

Le CdSe, le Novaluron et la mixture CdSe/Novaluron peuvent altérer le comportement des organismes. Une étude a montré que le Cd diminue le taux de prise de nourriture de *Gammaruspulex* (après 168h, diminution de 30% à 7.5 µg/L et de 36% à 15 µg/L). Il diminue aussi sa locomotion (après 120h, diminution de 20% à 7.5 µg/L et de 31% à 15 µg/L ; après 168h, diminution de 38% et de 39 % à 7.5 et 15 µg/L respectivement) et sa ventilation (après 120h l'effet sur l'hypoventilation est significatif à 15 µg/L ; après 168h la même réponse est observée dans les deux cas de contamination) (**Felten et al., 2008**). Des études ont aussi montré que le Cd est capable de perturber l'orientation et la capacité de nage de *Neomysisinteger* (**Roast et al., 2000**) et de diminuer la vitesse de locomotion des crevettes *Hippolyte inermis* (**Untersteiner et al., 2005**). **Bourbia (2013)** a trouvé des effets inhibiteurs du thiaméthoxam, de la téfluthrine et de leurs mixtures aux plus fortes concentrations, sur le comportement locomoteur et nutritif des adultes de l'escargot *Helix aspersa*. Des effets

léthargiques d'OPs dont le diméthoate ont été observés notamment chez les juvéniles ainsi que chez les adultes d'*Helix aspersa* (Coeurdassier *et al.*, 2001).

Il faut mentionner que le comportement des animaux est de plus en plus utilisé comme une mesure d'exposition sub-létale aux contaminants toxiques (Felten *et al.*, 2008 ; Al kadissi, 2012).

3-2- Réponses physiologiques

Dans notre travail nous avons choisi comme modèle biologique *Helix aspersa* et nous avons noté en premier lieu une diminution de la masse corporelle chez les animaux traités par les différentes concentrations de CdSe, de Novaluron et de leur mixture ce qui constitue un premier indice de toxicité. Ce résultat est en accord avec les travaux de (Grara *et al.*, 2015) qui ont étudié l'effet des nanoparticule de ZnO sur *Helix aspersa*. Ainsi, les deux insecticides (la thiaméthoxam, la téfluthrin) et leurs mixtures inhibent la prise de poids des escargots à partir de la troisième semaine de traitement (Bourbia, 2013). Aussi Coeurdassier *et al.* (2001) ont observé une diminution dose-dépendante de la croissance et de la survie des escargots induite par le diméthoate. Dans la même optique, Gomot-de Vaufleury et Bispo (2000) sont observés une forte inhibition de la croissance des escargots *Helix aspersa* contaminé par le pentachlorophénol, le trichlorophénol et le naphtalène. Dans le même ordre d'idées Bouaricha (2013) a étudié la toxicité du biopesticide l'Emamectine benzoate sur les escargots *Helix aspersa*, et a également mis en évidence une diminution du poids frais des escargots. Aussi Belhaouchet (2013) a étudié la toxicité de Spinosad sur les escargots *Helix aspersa* et a trouvé une diminution du poids frais des escargots. 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.

Pal *et al.*, (2007) avance que la toxicité des nanoparticules est dus à leurs forme, d'autres études ont révélé que la toxicité des nano-objets était en fonction de la taille ou de l'état d'agglomération (Huang *et al.*, 2005). D'autres études suggèrent un effet de la dissolution des nanoparticules, notamment pour les CdSe. La toxicité proviendrait de la libération des ions de Cd.

Dans notre travail nous avons noté une perturbation du poids de l'hépatopancréas en comparaison avec les témoins à cause de la présence des différents polluants dans ce dernier. Ces résultats sont en accord avec ceux de Marigomez *et al.*, (1998) qui ont montré une

réduction de 50% du poids de la glande digestive des lingots en présence des xénobiotiques. Ainsi qu'avec ceux de (Grara *et al.*, 2012) qui ont mis en évidence une diminution du poids d'hépatopancréas en présence des poussières métalliques.

Concernant le poids de la coquille, nous notons une diminution dose – dépendante en présence de CdSe, de Novaluron et de mixture. Les ions de Cd peuvent également perturber de manière indirecte des processus physiologiques importants en entrant en compétition avec certains éléments essentiels tels que le calcium (Ca) (Molnár *et al.*, 2004). En effet, le Ca joue un rôle important dans le développement du corps entier des escargots et en particulier celui de la coquille. L'influence de ces interactions a été évoquée pour expliquer les inhibitions de croissance des escargots exposés aux sols artificiels contaminés par du Cd (Gomot, 1997). 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 (Grara *et al.*, 2015). Ces résultats confirment l'importance du suivi des paramètres physiologiques dans l'évaluation de la contamination d'un milieu.

Concernant l'évolution des deux diamètres de la coquille, nous notons une diminution dose - dépendante de ce facteur en présence de CdSe , de Novaluron et du mixture. Ces résultats vont dans le sens de ceux de (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) (Grara *et al.*, 2015).

4- Conclusion

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



Chapitre IV : Etude de stress oxydatif

Objectif du travail

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.

L'objectif principal de ce chapitre est la mise en évidence de la toxicité des deux xénobiotiques et de leurs mixture a travers le suivi de l'activité de certaines biomarqueurs enzymatiques (CAT, GST, GPx) et non enzymatiques (GSH et MDA), ces enzymes intervenant dans la métabolisation des xénobiotiques

1-Extraction et dosage des métabolites

Après la dissection, l'extraction (Figure22) des différents métabolites (protéines totales, glucides totaux et lipides totaux) a été réalisée selon le procédé de **Schibko *et al.* (1966)** sur un fragment (100 mg) de l'hépatopancréas prélevé et conservé dans 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20 %. Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes de 100 µL. Tous les dosages sont exprimés en µg/mg de tissu analysé.

La teneur en protéines totales de l'hépatopancréas a été quantifiée selon la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise le bleu brillant de coomassie (G250) comme réactif et l'albumine de sérum de boeuf comme standard. La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm.

Le dosage des glucides totaux de l'hépatopancréas est réalisé selon **Duchateau & Florkin (1959)**. Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif et une solution mère de glucose (1g/L) comme standard. La lecture des absorbances est réalisée à 620 nm.

Le dosage des lipides de la glande digestive est effectué selon la méthode de **Goldsworthy *et al.* (1972)** utilisant la vanilline comme réactif et une solution mère de lipides comme standard. Les absorbances sont obtenues, après 30 mn d'obscurité, à une longueur d'onde de 530 nm.

Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes de 100 µl et les taux des différents métabolites de l'hépatopancréas ont été quantifiés grâce aux équations des droites de régression déterminées à partir des courbes de références.

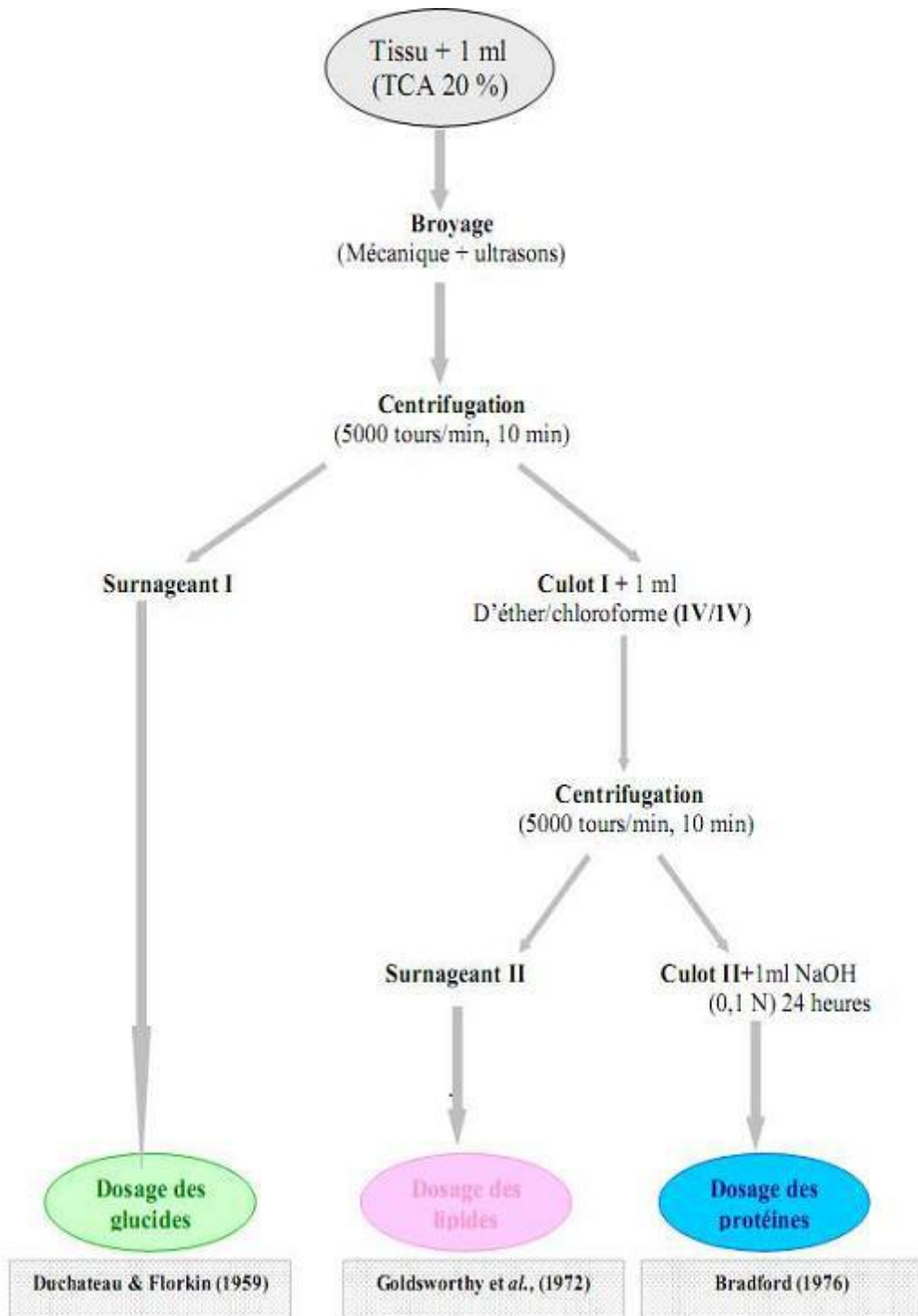


Figure 22. Principales étapes d'extraction des métabolites: protéines, glucides et lipides (Shibko et al, 1966).

2- Analyse du stress oxydant

Les têtes des adultes de l'escargot *Hélix aspersa* des séries témoins et traitées aux deux xénobiotiques et à leurs mixtures ont fait l'objet d'un dosage de l'activité de

l'acétylcholinestérase (AChE). L'hépatopancréas excisé du reste de la masse viscérale a servi au dosage du glutathion (GSH), aux dosages des activités de la glutathion S-transférase (GST), de la glutathion peroxydase (GPx) et de la catalase (CAT).

Tous les dosages ont été menés sur des échantillons biologiques prélevés après 12 semaines d'exposition aux différents traitements. Par ailleurs, la concentration en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminée suivant la méthode de **Bradford (1976)**, afin de pouvoir calculer les différentes activités spécifiques.

2.1- Dosage de la peroxydation lipidique (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA), produit terminale de la dégradation des lipides et dont la teneur est en relation étroite avec les dégradations de la membrane cellulaire, permet de montrer l'effet d'une pénétration d'un xénobiotique dans l'organisme. Ce paramètre constitue un indicateur précoce d'une agression toxique et par conséquent il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydant (**Funes *et al.*, 2006 ; Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2007**).

a- Principe :

Le malondialdéhyde (MDA) est dosé selon la méthode de **Draper & Hadley (1990)** basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm.

b- Mode opératoire :

Le protocole expérimental est le suivant:

- Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 150 µl de la solution TBS (tris 50mM, NaCl150mM pH7.4).
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)
- Vortexer et centrifuger à 1000 tour/min pendant 10min.
- Prélever 400 µl du surnageant.
- Ajouter 80 µl du HCL 0.6 M.
- Ajouter 320 µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes

c- Calcul de la concentration de MDA

L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formée donnant ainsi une évaluation précise de lipides peroxydés.

La concentration de MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = E.C.L$) : $DO \cdot 10^6$

$$[C] \text{ (umol/mg protéine)} = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot X \cdot Fd}$$

C : Concentration en nmoles/mg de protéines ; DO : Densité optique lue à 530nm

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

L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm

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

Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

2.2- Mesure du Glutathion (GSH et GSSG)

a- Principe

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé de **Weckbeker et Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Elleman) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalicylique 0.25%) afin de protéger les groupements-SH du glutathion.

b- Mode opératoire

- Les échantillons (200mg de tissu) sont mis individuellement en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0.2M. Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine.
- Une fois préparé, l'homogénat est déprotéinisé ; 0.8 ml de ce dernier auquel on ajoute 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0.25%.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifugé pendant 5min à 1000 t/min.
- Prélever 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml de tampon tris-HCL+EDTA (0.02M), PH=9.6.
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M dissous dans le méthanol absolu.
- Laisser pendant 5min à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance (A) à 412nm.

c-Calcul de la concentration de GSH

La concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$[\text{GSH}] = \frac{\text{DOX1} \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \text{ mg de ptoteine}}$$

DO : Densité1 optique.

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

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

13100 : Coefficient d absorbance (contenant le groupement-SH à412 nm).

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

0.5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

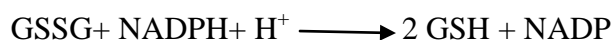
2.3- Dosage des activités enzymatiques : CAT, GPx et GST

2.3.1 Glutathion Peroxydase

a- Principe

L'activité de GSH-Px est mesurée par la technique de **Flock et Gunzler (1984)** modifiée utilisant le H₂O₂ comme substrat. La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de l'acide 5,5- dithio-bis-2-dinitrobenzoïque (DTNB), le groupe sulfhydryl (-SH) du glutathion réagit spontanément avec le DTNB et forme un composé jaune, l'acide 5-thio-2- nitrobenzoïque (TNB)

La glutathion réductase catalyse la réaction suivante :



La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de 5,5- dithio-bis-2-dinitrobenzoïque (DTNB) :



Le TNB absorbe à 412 nm et permet de quantifier l'activité de glutathion réductase. Ainsi, pour chaque molécule de GSH formée, il y aura formation d'une molécule de TNB.

b- Mode opératoire

- L'extraction de l'enzyme : homogénéisation par le tampon phosphate) pH7.8.
- Centrifugation 10 min a 3000t/min.

- Récupération de surnageant (extrait enzymatique).
- 0.2 ml de surnageant +0.4 ml de GSH (glutathion forme réduite) a 0.1 MM (réaction enzymatique) + 0.2 ml TP a 0.067M (tampon d'extraction pH7.8).
- Préparer un blanc avec 0.4 ml de GSH +0.2 de TP (réaction non enzymatique), Incubation au bain marie à 25°C pendant 05 min.
- 0.2 ml d'H2O2 (1.3MM) pour initier la réaction.
- Laisser agir 10 min.
- Arrêter la réaction par addition de 1 ml de TCA 1%(acide tri chloro-acétique).
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 min.
- Centrifuger durant 10 min a 3000t/min.
- 0.48 ml de surnageant et place dans une cuve+2.2 ml de Na2HPO4 (0.32M) +0.32 ml de DNTB (1MM).
- Formation d'un composé colore, mesurer la densité optique à 412 nm dans le 05 min.

C- calcule de l'activité de GPx

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se réalise par:

- Activité de GSH consommée/min/gr de protéine.
- Blanc=0.04 micro mole de GSH réduit → DO_b
- Extrait=0.04 micro mole de GSH réduit → DO_e

Donc la concentration de GSH réduit qui sera oxydée (disparue)= DO_e-DO_b

$$X = \frac{(\text{DO}_e - \text{DO}_b) \times 0.04}{\text{DO}_b} = \text{quantité de GSH réduit disparue (oxydée)}.$$

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

2.3.2. Catalase

a- principe :

La catalase est une enzyme qui participe à la défense contre les dérivés toxiques de l'oxygène en dégradant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en dioxygène suivant la réaction



La disparition du peroxyde de l'hydrogène peut être mesurée en spectrophotométrie

b- Mode opératoire :

L'activité de la catalase (CAT) est mesurée a 240 nm a l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde

d'hydrogène (H₂ O₂) pendant 1 min à un intervalle de 15 seconde, en faisant réagir dans 780 µl (100mM) de tampon phosphate pH 7.4, 200 µl d'H O (500mM) sur 20 µl de l'homogénat.

C- Calcul de l'activité de la Catalase :

L'activité de la catalase est exprimé en umol de H₂O₂ hydrolysées /min/mg de protéine

$$\text{Activité de Catalase} = \frac{\Delta A.Vt}{\varepsilon.\Delta t.L.Ve.P}$$

ε : Coefficient d'extinction linéique molaire en. µM⁻¹. cm⁻¹

ΔA : pente de la droite de régression (variation de la densité optique en fonction du temps).

Vt : Volume total du mélange réactionnel en ml.

Ve : Volume de l'extrait enzymatique en ml.

L : Largeur de la cuve de mesure en cm.

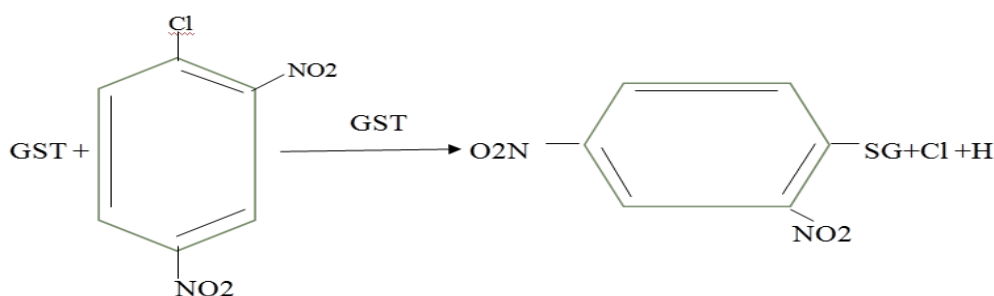
P : Teneur en protéines en mg

T : temps de lecture en min.

2.3.3 Glutathion-S-Transférase

a- Principe :

La mesure de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al. (1974)**, Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2, 4 di nitrobenzène) en d'un cofacteur le glutathion (GST), la conjugaison entraine la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyle 2-4Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :



b- Mode opératoire

La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST .Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0.1M, pH6).L'homogénat est centrifugé à 14000 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200µl du surnageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM) [20.26 mg CDNB, 153.65mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0.1M, Ph 6)]. La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15

secondes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

C- Calcul de l'activité de GST

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (umol/min/mg de proteïne)} = \frac{(\text{DO échant/ min} - \text{DO blanc/min})}{9.6 \times \text{mg de protéine}}$$

- Do : Densité optique de l'échantillon /min.
- Do/min blanc : Densité optique du blanc /min
- 9.6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm

2.4- La neurotoxicité (AChE)

Dans les jonctions inter-neuronales ou neuromusculaires, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui permet la transmission de l'influx nerveux. Libéré dans l'espace synaptique, ce neurotransmetteur se fixe sur les récepteurs cholinergiques au niveau de la membrane post-synaptique. L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur entraîne une dépolarisation membranaire à l'origine du potentiel d'action. L'acétylcholinestérase est l'enzyme qui dégrade par hydrolyse ce médiateur chimique afin de stopper rapidement la stimulation du récepteur (**Bocquené et Galgani, 1997**).

Les pesticides et les métaux lourds sont les principaux contaminants de l'environnement qui inhibent l'activité acétylcholinestérase (**Reinecke et al., 2007**).

a- Principe

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

b- Mode opératoire

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

Le dosage de l'activité AChE est réalisé sur une fraction aliquote de 100 µl auquel on ajoute 100 µl de DTNB et 1 ml de tampon Tris (0.1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes, et afin

d'épuiser la réaction spontanée, 100 µl de substrat acétylthiocholine₃ sont ajoutés. La lecture des absorbances a lieu toutes les 4 mn pendant 20 mn à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc, où 100 µl de solution détergente remplacent la source d'enzyme.

c- Calcul de l'activité de l'AChE

L'activité AChE est calculée selon la formule suivante:

$$x = \frac{\Delta DO/\text{min}}{13600} \times \frac{Vt}{Vh} / \text{mg prot}$$

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

ΔDO : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat

1.36×10^4 : coefficient d'extinction molaire du DTNB (uM-1 cm-1)

Vh : volume de l'homogénat (100 µL)

Vt : volume totale de la cuve (1 300 µL)

mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg.

3- Analyses statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne de dix répétitions (\pm l'écart type), et pour mieux visualiser les résultats obtenus la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant l'office Excel 2017. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du l'Office Excel version 2017, et le minitab® 17.

4- Résultats

4-1- Effet du traitement par le séléniure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur les métabolites de l'hépatopancréas.

4-1-1-Effet sur le taux des Protéines d'hépatopancréas

La figure (23) représente les variations du taux des protéines totales au niveau de la glande digestive chez les escargots témoins et traités

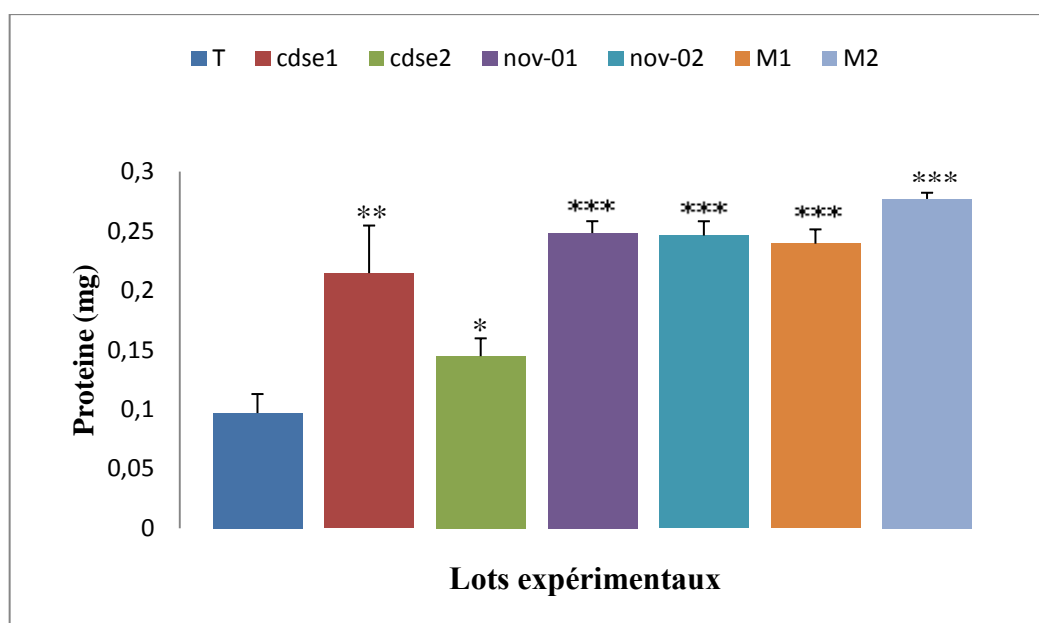


Figure 23. Taux des protéines totales dans l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) de taux de protéines de la glande digestive chez les escargots traités par le Novaluron et par la mixture par rapport au groupe témoin. Les deux concentrations de mixture CdSe/Novaluron tendent à augmenter de manière dose-dépendante. Pour les escargots traités par le CdSe à deux doses, il ya une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) et une augmentation significative ($p \leq 0.05$).

4-1-2- Effet sur le taux des lipides d'hépatopancréas

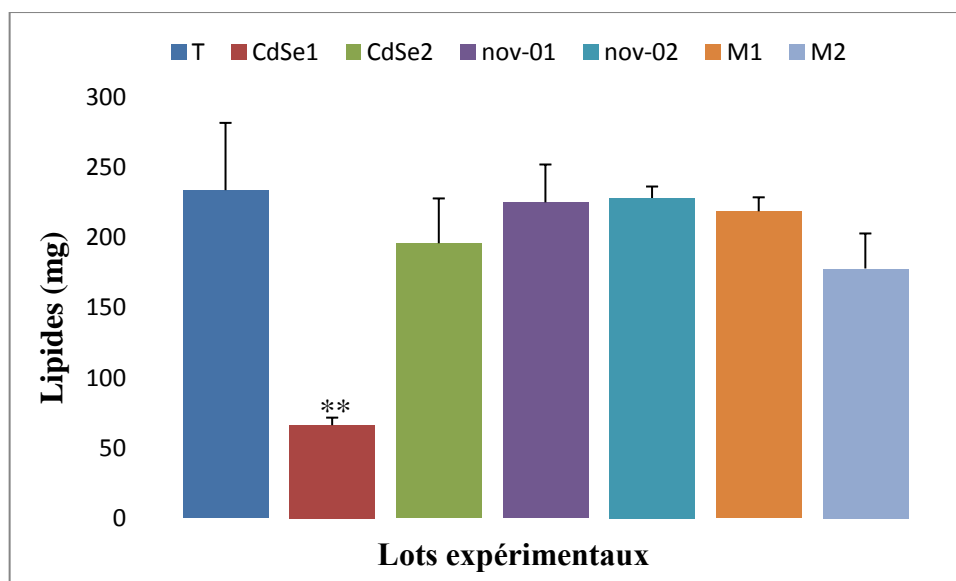


Figure 24. Taux des lipides totaux dans l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*

La figure (24) illustre les variations de taux de lipides en présence de concentrations croissantes de CdSe, de Novaluron et de mixture CdSe/Nov. Nous remarquons que le Novaluron et la mixture CdSe/Nov réduit de façon non significative ($p > 0.05$) le contenu en lipides aux deux doses. Cependant, une diminution très significative ($p \leq 0.01$) du taux des lipides est constatée aux CdSe (3.6 $\mu\text{g/g}$).

4-1-3- Effet sur le taux des glucides d'hépatopancréas

Les variations du taux des glucides totales au niveau de la glande digestive chez les escargots témoins et traités sont représentées dans la figure (25)

Nos résultats mettent en évidence une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) du taux de glucides chez les escargots traités par les différentes concentrations de CdSe, de Novaluron et de mixture CdSe/Nov par rapport aux témoins. Cette augmentation est dose-dépendante pour les escargots traités par le novaluron et dose indépendante pour les traités par le CdSe et la mixture CdSe/Nov.

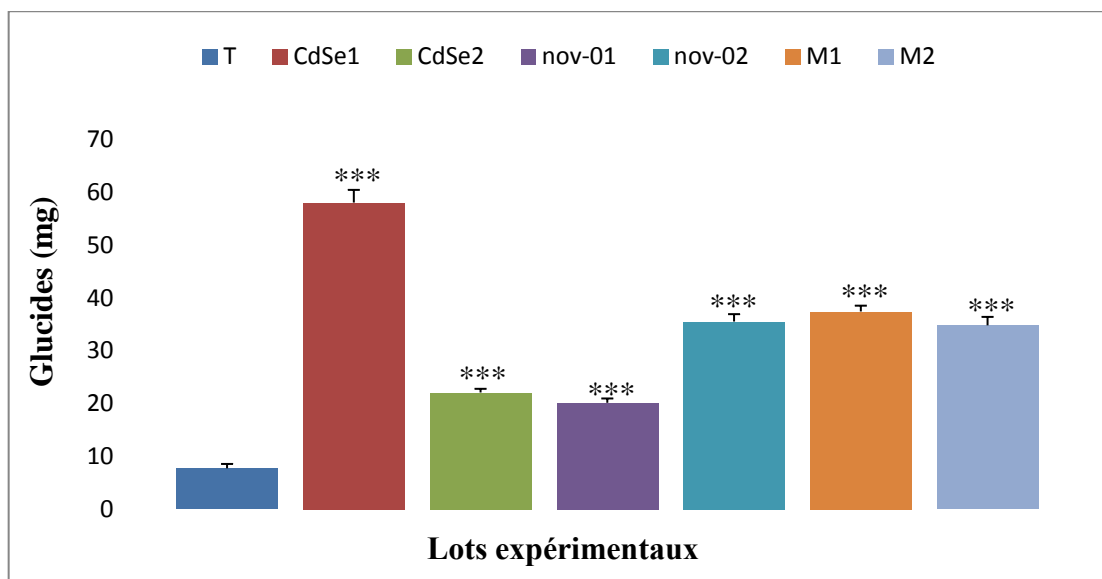


Figure 25. Taux des glucides totaux dans l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*

4-2- Effet du traitement par le sélénure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur le taux de GSH de l'hépatopancréas.

La figure (26) illustre les variations du taux de GSH au niveau de la glande digestive chez les escargots témoins et traités

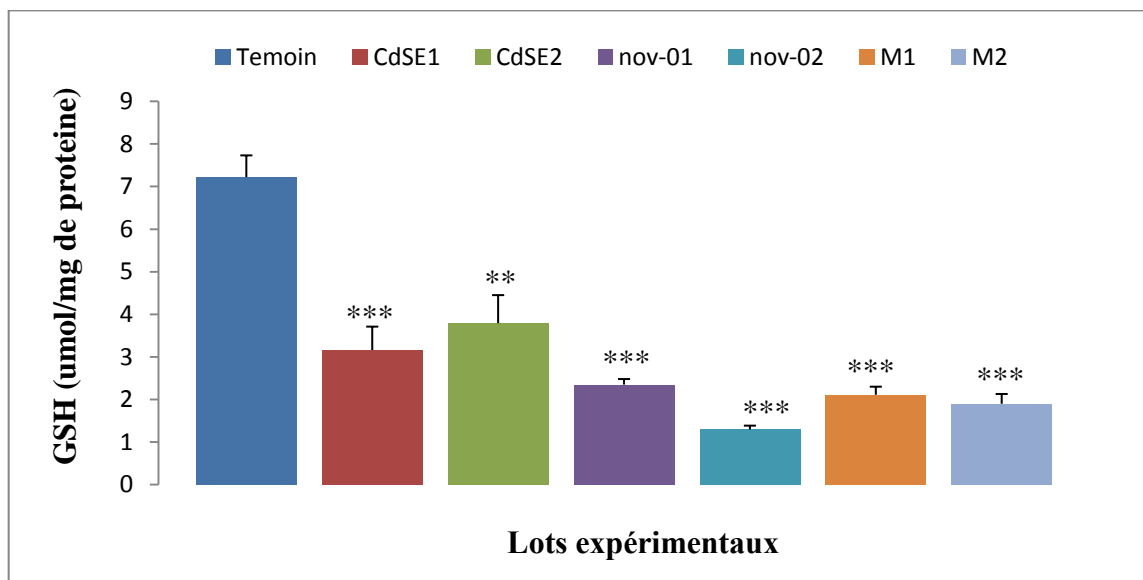


Figure 26. Taux des GSH dans l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*

Au niveau de la glande digestive et en présence de CdSe, de Novaluron et de mixture CdSe/Nov, nous constatons que le taux de GSH diminue d'une manière dose dépendante et très hautement significative ($p \leq 0.001$) particulièrement pour le Novaluron et la mixture de

CdSe/ Novaluron à deux doses. Contrairement, nous remarquons qu'il y a une diminution dose indépendante pour les deux doses de CdSe.

4-3- Effet du traitement par le sélénure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur l'activité de GST de l'hépatopancréas.

L'activité de GST au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots témoins et traités par CdSe, Novaluron et la mixture CdSe/ Novaluron est illustrée dans la figure (27).

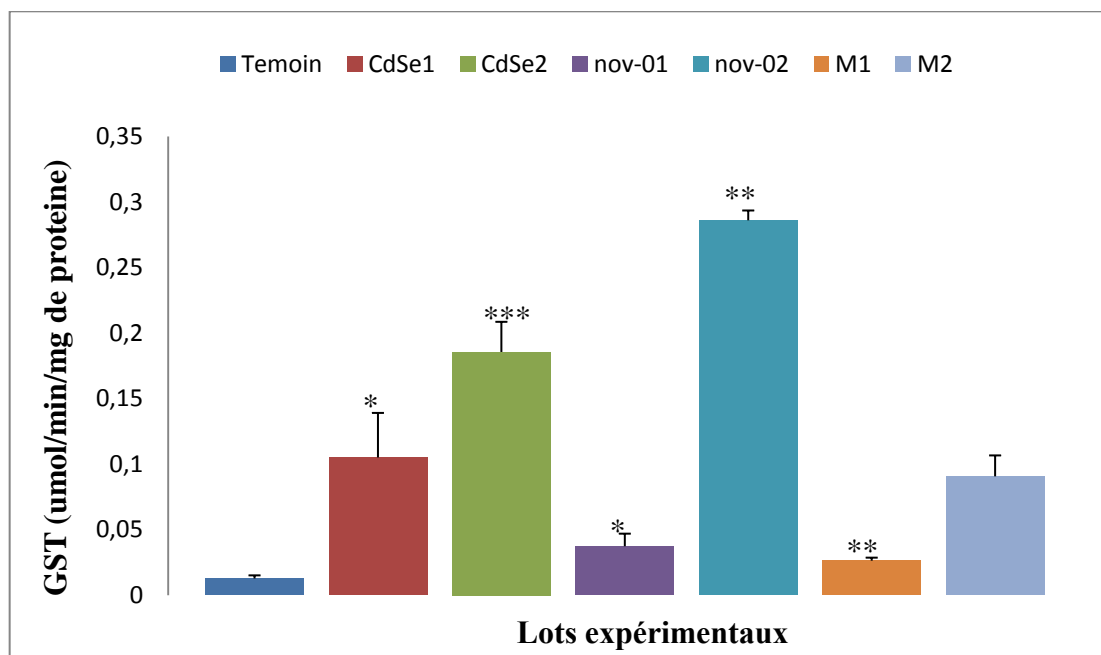


Figure 27. L'activité de GST dans l'hépatopancréas chez les escargots témoins (T) et traités ; par le Sélénure de cadmium (CdSe), le Novaluron (Nov), et à la combinaison (CdSe/Nov)

Les traitements aux CdSe (3.6 ug/g), aux Novaluron (1.2 ul/g) augmentent de manière significative ($p \leq 0.05$) l'activité de GST par rapport à celui des escargots témoins. Nous observons une stimulation très significative ($p \leq 0.01$) pour les traités par le Novaluron à 2.4 ul/g et la mixture à (3.6+ 1.2).

4-4-Effet du traitement par le sélénure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur le taux de MDA de l'hépatopancréas.

Les variations de taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots témoins et traités par CdSe, Novaluron et la combinaison CdSe/ Novaluron sont illustrées dans la figure (28).

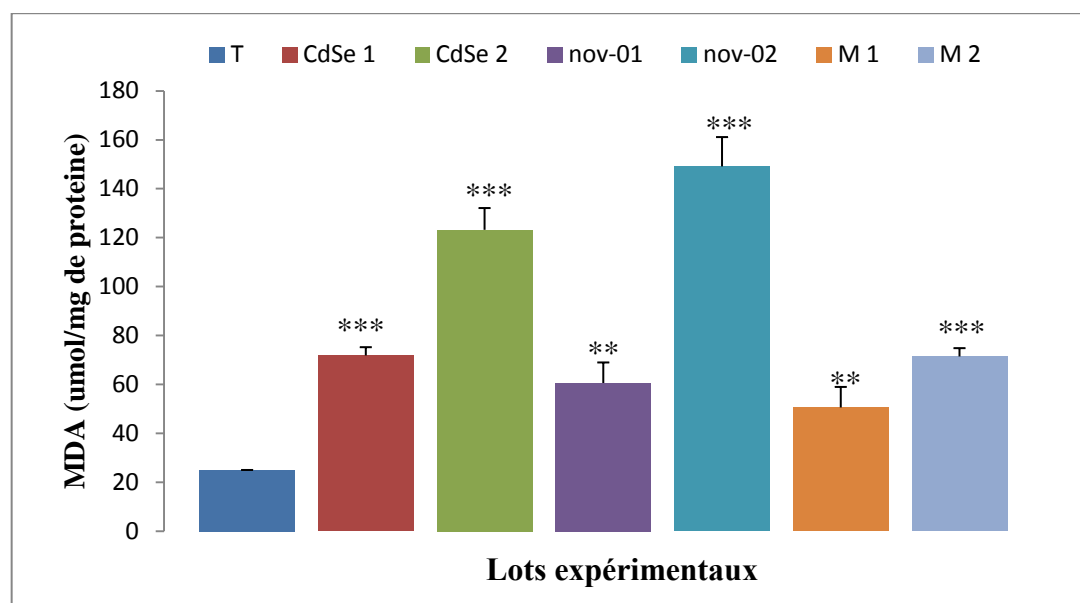


Figure 28. Variation de taux de MDA dans l'hépatopancréas chez les escargots témoins (T) et traités ; par le Sélénure de cadmium (CdSe), le Novaluron (Nov), et à la combinaison (CdSe/Nov)

Nos résultats montrent une augmentation très significative ($P \leq 0.01$) de taux de MDA des escargots traités par Novaluron à (1.2) ul/g et la mixture à (3.6+1.2) comparant aux escargots témoins. Le traitement des escargots par le CdSe à deux doses (3.6 et 7.2) ug/g et par la mixture à (7.2 +2.4) entraîne une augmentation très hautement significative ($P \leq 0.001$) de la teneur en MDA dans l'hépatopancréas en comparaison avec le groupe témoin.

4-5- Effet du traitement par le sélénure de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur l'activité de CAT de l'hépatopancréas.

La figure (29) représente l'activité de Catalase au niveau de la glande digestive chez les escargots témoins et traités.

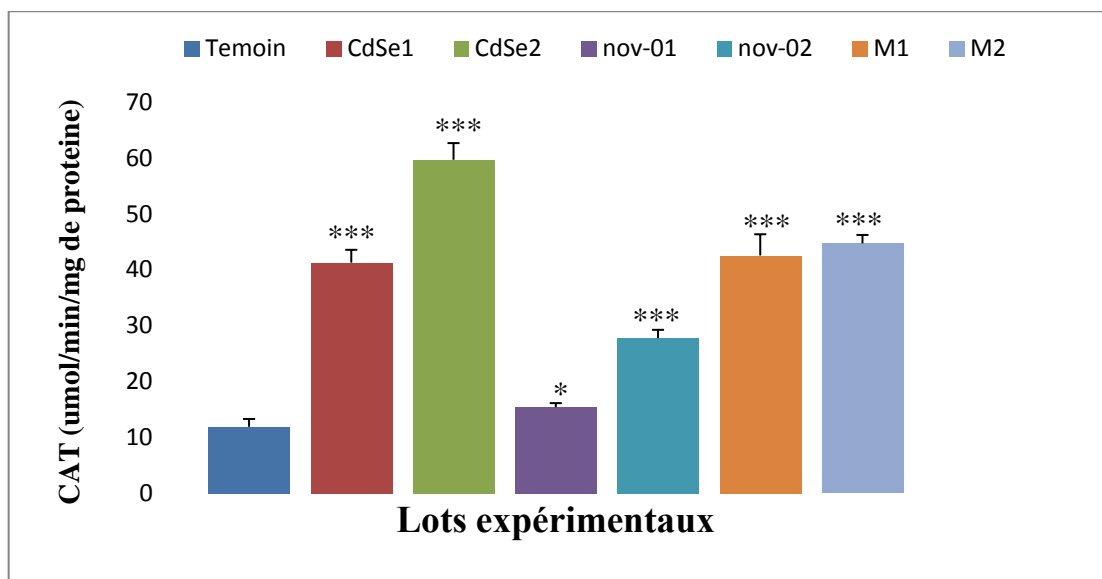


Figure 29. L'activité de CAT dans l'hépatopancreas chez les escargots témoins (T) et traités ; par le Sélénium de cadmium (CdSe), le Novaluron (Nov), et à la combinaison (CdSe/Nov)

Nous constatons au niveau de la glande digestive cette activité tend à augmenter d'une manière dose dépendante et très hautement significatif ($P \leq 0.001$) chez les escargots traités par rapport aux témoins, sauf qu'à la présence de Novaluron à 1.2 ul/g, nous remarquons que l'activité de CAT est augmenté de façon significative ($p \leq 0.05$) par rapport aux témoins.

4-6- Effet du traitement par le sélénium de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur l'activité de GPx

La figure (30) illustre l'évolution de l'activité GPx chez les escargots témoins et traités avec des concentrations croissantes de CdSe, de Novaluron et de la mixture CdSe/Nov.

Nous remarquons que l'activité glutathion peroxydase (GPx) a augmenté chez les escargots traités comparé à celui des témoins. L'étude statistique révèle qu'il n'y pas une différence significative ($P \geq 0.05$) entre les témoins et les traités par le CdSe à deux doses (3.6 et 7.2) ug/g.

Par contre il y a une différence très hautement significative ($P \leq 0.001$) entre les témoins et les traités par le Novaluron et la mixture pour les deux doses.

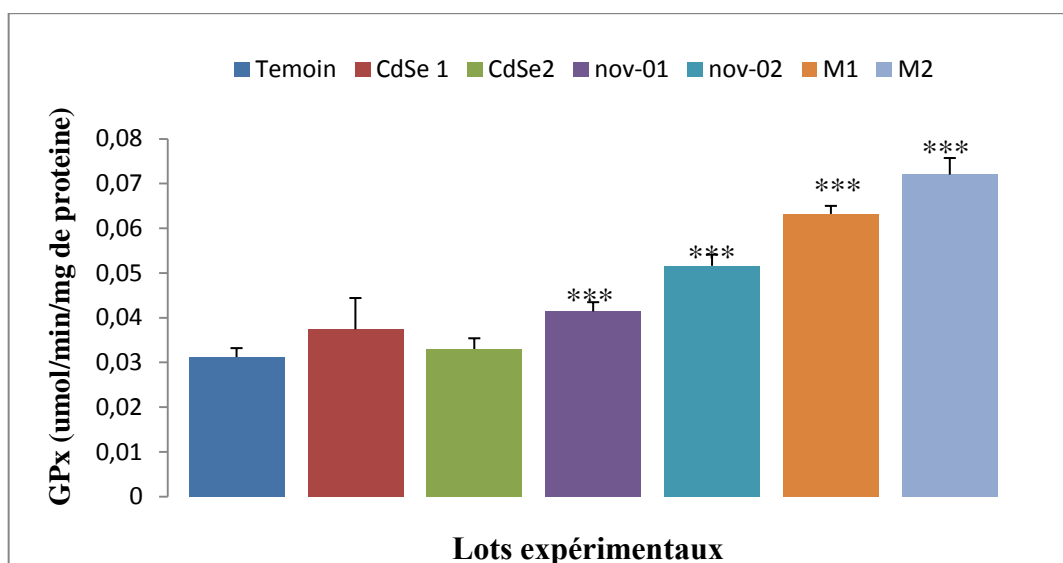


Figure 30. L'activité de GPx dans l'hépatopancréas chez les escargots témoins (T) et traités ; par le Sélénium de cadmium (CdSe), le Novaluron (Nov), et à la combinaison (CdSe/Nov)

4-7- Effets du traitement par le sélénium de cadmium, le Novaluron et leur mixture sur l'activité acétylcholinestérase (AChE)

L'activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez les adultes de *Helix aspersa*, témoins et traités par injection au CdSe, au Novaluron et à la mixture est représentée dans la figure (31). Une diminution très hautement significative ($P \leq 0.001$) de l'activité de l'enzyme est enregistrée aux différentes concentrations avec un effet dose-dépendant.

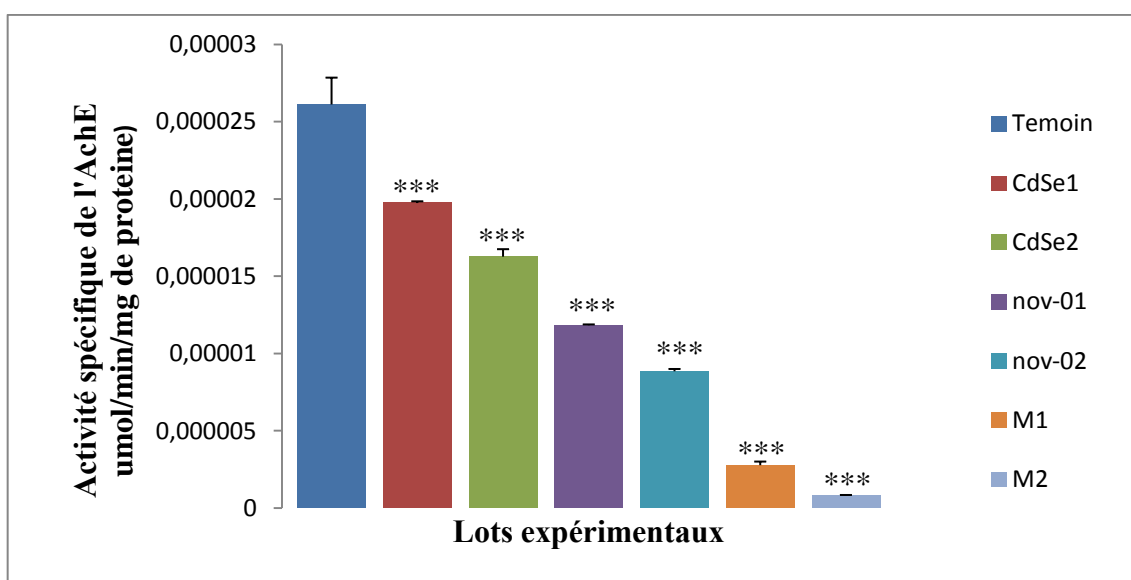


Figure 31. Effets du CdSe, du Novaluron et de la mixture CdSe/Novaluron sur l'activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) chez *Helix aspersa* après 12 semaines de traitement.

5- Discussion

Le but de cette étude est de comprendre comment ces escargots s'adaptent à la toxicité de leur environnement, et si leur activité antioxydante fait partie des mécanismes physiologiques spécifiques intervenant dans l'interaction organisme-environnement. La production d'espèces réactives de l'oxygène étant considérée comme un facteur clé de la réponse adaptative ou de la réaction à un événement toxique, il s'agit de savoir si celle-ci est caractérisée par une augmentation des défenses antioxydantes, c'est-à-dire de connaître le statut antioxydant des animaux.

Dans les écosystèmes terrestres, les gastropodes sont exposés aux différents types de contaminants par plusieurs voies d'exposition qui impliquent l'ingestion d'aliments et de sols contaminés, le contact et l'absorption par l'épithélium du pied depuis des surfaces contaminées et l'inhalation de substances toxiques. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur ce modèle biologique car ils concentrent les métaux lourds et les pesticides dans leurs tissus et plus précisément sa glande digestive ou l'hépatopancréas (**Hopkin, 1989**)

Les facteurs pouvant entraîner une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène sont variés et peuvent être d'origine biotique (pathogènes, compétition, etc.) ou abiotique (stress hydrique, hyalin, anoxique, thermique, chimique). **El-Gendy et al. (2009)** ont montré chez l'escargot *Thebapisana* que l'exposition à un pesticide à base de cuivre entraînait la production d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que l'augmentation de la production de défenses antioxydantes. Les xénobiotiques (métaux lourds, pesticides) sont ainsi une des causes majeures de stress oxydant.

Grace à la présence d'antioxydants, il existe un équilibre physiologique subtil entre la production et l'élimination des ERO. C'est ainsi que plusieurs auteurs proposent le stress oxydant comme le mécanisme clé de la toxicité.

La toxicité de certains puits quantiques pourrait être liée à la libération d'ions cytotoxiques, à des mécanismes oxydatifs (**Kirchner et al., 2005**) et à d'autres phénomènes moins bien élucidés (**Shiohara et al., 2004**).

5-1- Effet de CdSe, de Novaluron et de la mixture sur les métabolites

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 -hydryles 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 une augmentation du taux de protéines au niveau de la glande digestive chez les escargots traités par le CdSe, le Novaluron et la mixture. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Bouaricha (2013)**, il a montré que les manifestations toxiques de l'Emamectine Benzoate (biopesticide), sur l'escargot *Helix aspersa* et les paramécies, ont été accompagnées par une induction dose dépendante de la synthèse protéique. Ainsi **Radwan et al. (2010)** ont trouvées une forte augmentation de teneur en protéines totale au niveau de la glande digestive à la suite du traitement de l'escargot *Vermiculata eobania* par un carbamate. **Peccini et al. (1994)** ; **Massaya et al. (2002)** qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins). 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.

Djehader, (2014) a étudié l'effet toxique du novaluron à l'égard du moustique *Culex pipiens*. La toxicité de cet inhibiteur de la synthèse de la chitine se manifeste contre cette espèce par des perturbations au niveau du développement larvaire ainsi qu'au niveau de la reproduction des adultes. Les effets de cette molécule sont peut être liés d'une part à son mode d'action sur la chitine comme cible principale, et d'autre part sur la perturbation quantitative des différents éléments métaboliques étudiés (glucides, lipide et protéine).

Les résultats concernant l'évolution du taux de lipides dans l'hépatopancréas mettent en évidence une diminution du taux des lipides chez les escargots traités par le CdSe, le Novaluron et la mixture comparativement aux témoins. Le même effet a été montré par les travaux de **Bourbia, (2013)** après l'application d'insecticides commerciaux à base de thiaméthoxam (0-25 50-100 et 200 mg/L) sur *Helix aspersa* après six semaines de traitement.

Il en est de même pour **Grara, (2011)** qui a mis en évidence une forte perturbation du taux des protéines, lipides et glucides chez des escargots traités par des métaux lourds. Nos résultats sont en parfait accord avec cités ci-dessus puisque nous avons mis en évidence une perturbation du taux de tous les métabolites (diminution du taux de lipides et augmentation de celui des protéines et glucides).

Ce phénomène pourrait être considéré comme un biomarqueur précoce de l'exposition aux polluants chimiques. Partant du principe que tout type de stress chimique peut provoquer une libération de radicaux libres dans l'organisme (Aurousseau, 2002), une altération des composants cellulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement. Tous les composants cellulaires peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN, et donc les membranes dans leur ensemble (Haliwell et Chirico, 1993).

5-2- Effet de CdSe, de Novaluron et de la mixture sur les biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques de stress oxydant

Le glutathion réduit (GSH) joue un rôle multifactoriel dans le mécanisme de défense antioxydante. C'est un piègeur direct des radicaux libres, un cosubstrat nécessaire pour l'activité GPx et la GST. Par conséquent, les changements dans l'état redox du GSH peuvent être considérés comme un indicateur particulièrement sensible du stress oxydant.

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une implication de système de détoxification à travers une augmentation de l'activité GST et une diminution du taux de GSH chez les escargots traités par le CdSe, le Novaluron et la mixture. L'augmentation de l'activité GST et la diminution du taux de GSH sont dus au fait que le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales, El Gendy *et al.* (2009) a mis en évidence une diminution dose dépendante du taux de GSH au niveau de la glande digestive parallèlement à une induction de l'activité GST chez les escargots traités par des pesticides à base de cuivre. Il en est de même concernant les travaux de Salama *et al.* (2005), qui a testé trois pesticides, le paraquatdichloride, le carbofuran et le chlorpyforios sur l'escargot terrestre *Helix aspersa*. De plus, la stimulation de l'activité de la GST a été observée par Won *et al.* (2011) chez l'Annélide polychète *Perinereis nuntia* après exposition au Cd. Les travaux d'Atailia (2009) et Boucenna (2010) ont mis en évidence l'implication du système GSH/GST chez des escargots *Helix aspersa* traités avec des xénobiotiques terrestres (poussières métallique). L'activité de GST est augmentée dans la glande digestive après exposition des escargots *Helix aspersa* au HAP (Ismert, 2000). Radwan *et al.* (1992) ont mis en évidence une induction de l'activité GST après exposition du gastéropode terrestre (*Thebapisana*) à un pesticide (Carbamate) mais aussi chez l'espèce *Helix aspersa* exposé aux insecticides (Radwan & Mohamed, 2013). Benbouzid (2012) a mis en évidence le déclenchement d'une batterie de processus enzymatiques telles que la stimulation de l'activité CAT et GST connus pour leur rôle dans la détoxification ainsi qu'une augmentation du taux de

protéines totales sous l'effet d'une famille d'acaricides sur les protistes ciliées. Ces résultats ont été confirmés lors de nos expérimentations, puisque nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité GST au niveau de l'hépatopancréas ainsi qu'une diminution du taux de GSH confirmant ainsi l'implication du système de détoxification.

L'activité GST enregistrée tout au long de notre travail pourrait s'expliquer par le fait qu'aux faibles concentrations, il y a déclenchement des systèmes de détoxification qui pour la plus part sont formés d'enzymes. Ceci permet ainsi à la cellule de tolérer puis de s'adapter aux xénobiotiques.

Pain-Devin, S., et al (2013) ont étudié l'effet de trois nanoparticules (nAg, nTiO₂, nCeO₂) sur deux modèles des invertébrés aquatiques (*Dreissena polymorpha* et *Gammarus*), ils ont réduit les concentrations d'exposition de 1000 µg/L (nTiO₂) à 0,5 µg/L (nAg) et augmenté la durée d'exposition de 24h à 21 jours (nCeO₂). Une grande batterie de biomarqueurs a été utilisée pour évaluer les impacts de l'exposition, comme par exemple les défenses lysosomales et antioxydantes (catalase, GPx, MDA). Ils ont montré quelques effets sur certains paramètres évalués, comme par exemple une augmentation de l'activité anti-oxydante, leurs résultats ont démontré clairement l'effet néfaste des nanoparticules aux plus faibles concentrations.

Le MDA est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générées dans certaines conditions de stress, en particulier avec des contaminants organiques (HAP, PCB, pesticides) et inorganiques (métaux de transition).

Le taux de malondialdéhyde (MDA) est souvent utilisé comme un indicateur de la peroxydation lipidique des membranes. En effet, selon **Bebianno et al. (2005)** et **Al-Mutairi et al. (2007)** l'augmentation du taux de Malondialdéhyde indique une peroxydation lipidique, cette dernière est suivie de changements et d'une dégradation des structures membranaires, Il s'ensuit une perte des récepteurs et des enzymes de la membrane (**Pampanin et al., 2005**). L'augmentation du taux de MDA pourrait être due à la génération de radicaux d'oxygène libre toxiques. **Bouaricha (2013)** a étudié la toxicité du biopesticide à base d'Emamectine benzoate sur l'escargot terrestre *Helix aspersa*, elle a trouvé une augmentation dose dépendante de MDA au niveau de l'hépatopancréas. Ainsi, **Belhaouchet (2013)** a mis en évidence des teneurs très hautement significatives de MDA au niveau de la glande digestive

chez *Helix aspersa* traités par le Spinosad. **Zeriri et al. (2012)** ont mis en évidence une induction du taux de MDA chez les verres de terre exposés à un pesticide (le Métomyl). **Dutta et al. (2012)** ont montré une élévation des niveaux de malondialdéhyde, sous-produit de la peroxydation des lipides, corrélée à une production d'EROs par les nanoparticules d'oxyde de zinc placées sous illumination. De plus **Siwela et al. (2010)** ont mis en évidence une augmentation significative du taux du MDA chez l'escargot marin *Lymnaea natalensis* exposé à des polluants environnementaux.

La catalase est une enzyme héminique, responsable de la détoxification des quantités significatives de peroxydes d'hydrogènes (H_2O_2). La catalase est un antioxydant enzymatique largement distribué dans tous les tissus animaux, et sa plus forte activité se trouve dans le foie.

L'augmentation de l'activité de la catalase peut présenter une réponse adaptative au stress oxydatif entraîné par les pesticides et les métaux. La destruction de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la SOD et la CAT améliore la toxicité induite par le Novaluron, le CdSe et la mixture de la même façon que par des substances capables de piéger le radical hydroxyle ($\bullet OH$). **Sbartai (2013)** a mis en évidence une augmentation de l'activité CAT chez les paramécies traitées par le Bifenazate et l'Indoxacarbe. Des résultats similaires ont été observés par **Salama et al. (2005)**, chez le gastéropode *Helix aspersa* après exposition au méthomyl et au chlorpyrifos.

De nombreuses études ont montré des changements de l'activité de la CAT lors de l'exposition au Cd. **Verlecar et al. (2008)** signalent que les métaux lourds (Cd, Cu, Pb, et Zn) peuvent induire une augmentation de l'activité CAT chez les Bivalves. Une augmentation de la CAT a été observée dans les tissus de *Pernaviridis* exposé au cadmium, cuivre, zinc et au plomb (**Rajkumar & John Milton, 2011**)

La CAT est considéré comme une enzyme présentant une réponse claire et rapide de la contamination par les xénobiotiques. Elle joue un rôle dans la protection de l'organisme contre les dommages du stress oxydant et constitue avec la SOD la première ligne de défense (**Ribera et al, 2001**).

Une augmentation progressive dans le taux de GPx a été observée chez les escargots traités en comparaison avec les témoins. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Zhu , (2010)** utilisant l'oxyde de titane (5 et 10 mg / L) sur *Daphnia magna*, qui montre une

augmentation progressive de l'activité GPx en fonction de la concentration de NPs. les mêmes effets ont été observé chez l'*Helix pomatia* traités par le Cu (100 μ M), ceci serait dû au mécanisme de défense primaire contre les espèces réactives de l'oxygène «ERO» qui catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en H₂O dans les cellules de l'hépatopancréas (Halliwell et Chirico, 1993)

5-3- Effet de CdSe, de Novaluron et de la mixture sur le biomarqueur de la neurotoxicité

L'AChE présente chez les vertébrés un polymorphisme moléculaire important, polymorphisme qui résulte de différentes associations de la même sous-unité catalytique mais aussi de la nature de l'ancrage de l'enzyme aux structures synaptiques. Par contre chez les invertébrés, seules les formes globulaires composées de monomères, dimères et trimères de l'unité catalytique ont été identifiées. L'inhibition de cette enzyme par de nombreux neurotoxiques entraîne une accumulation du médiateur chimique, l'acétylcholine, dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux, conduisant à la mort de l'individu (Bocquené, 1996). La mesure de son inhibition constitue un marqueur dont l'expression traduit spécifiquement l'exposition des organismes à différents contaminants et notamment certains produits phytosanitaires et certains métaux lourds.

Dans notre travail, l'activité de l'AchE diminue progressivement suite à l'exposition des escargots aux différentes concentrations du Novaluron, du CdSe et de la mixture. Des travaux appuient nos résultats, notamment ceux de Coeurdassier *et al.*, (2005) ; Salama *et al.*, (2005) ; Radwan *et al.*, (2008) ; Bouaricha, (2013) qui ont mis en évidence une inhibition de l'activité AchE après exposition du gastéropode terrestre aux pesticides.

Nous avons pu montrer que le traitement par des concentrations croissantes de Novaluron, de CdSe et de la mixture inhibe d'une manière dose-dépendante l'activité Acétylcholinestérase. L'inhibition de l'acétylcholinestérase conduit à l'accumulation d'acétylcholine (ACh) au niveau des synapses cholinergiques à des niveaux toxiques conduisant à une sur-stimulation des récepteurs muscariniques et nicotiniqes. Ce "syndrome cholinergique» comprend les signes et symptômes tels que des troubles du comportement chez les escargots accompagné d'une inhibition de leurs croissance (Bouaricha, 2013)

Ces résultats sont confirmés par les travaux de Wang *et al.* (2009) qui ont montré que différents types de NP pouvaient présenter des propriétés neurotoxiques et proposent d'utiliser l'AchE comme biomarqueur pour les NP. Des effets neurotoxiques attestés par

l'inhibition de l'AChE ont été démontrés uniquement après 15 jours d'exposition chez *M. galloprovincialis* exposées à des CuO NP (Gomes *et al.*, 2011). Zhao *et al.* (2011) ont montré une inhibition de l'activité du cholinestérase lors de l'exposition de juvéniles de carpes *Cyprinus carpio* à des CuO NP, et suggèrent également leur pouvoir neurotoxique potentiel

Des études *in vitro* et *in vivo* menées sur des mammifères, des poissons ou des invertébrés ont signalé une inhibition de l'AChE par des métaux, parmi lesquels le cadmium (Schmidt & Ibrahim, 1994).

Trielli *et al.* (2006) ont constaté une inhibition progressive de l'activité AChE sous l'effet de composés organophosphorés sur des protistes terrestres *Colpoda inflata*. Cette inhibition a été attribuée par les auteurs à des phénomènes d'oxydation (notamment les groupements thiols) et à la formation de ponts disulfures en réponse à la libération de radicaux libres au moment de l'irradiation.

Les travaux de Coeurdassier *et al.* (2001), ont mis en évidence une diminution de l'activité AChE chez les escargots en présence d'organophosphorés le Diméthoate. Récemment, Belhaouchet (2012) a mis en évidence une forte inhibition de l'activité AChE chez l'escargot *Helix aspersa* traité par un biopesticide le Spinosad. Il a été démontré par l'étude de (Radwan et Salama, 1999) que certains pesticides carbamates tels que le méthomyl et le thiodicarbe été de puissants inhibiteurs de l'activité acétylcholinestérase chez l'escargot. Bourbia (2013) montrent que le thiaméthoxam, la téfluthrine et leurs mixtures inhibent significativement l'activité spécifique de l'AChE chez *Helix aspersa*. Coeurdassier *et al.* (2001) ont également démontré que l'activité AChE est inhibée après l'exposition des escargots *Helix aspersa* au diméthoate.

6- Conclusion

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

Nos résultats révèlent une corrélation entre l'induction du système de détoxification et la neurotoxicité des molécules testées. En effet, il semblerait que le CdSe et le Novaluron sont neurotoxiques (inhibition de l'AChE) et induisent de manière significative la GST, le GPx et la CAT et diminuent de façon significative le taux de GSH.



Chapitre V : Etude subcellulaire

Objectif du travail

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés particulièrement à l'effet du Novaluron, de CdSe et de leur mixture sur les mitochondries isolées des hépatopancréas. Pour cela, les effets des deux xénobiotiques et la combinaison à deux concentrations ont été évalués d'une part sur la vitesse d'oxydation et le gonflement mitochondriale. D'autre part sur l'activité enzymatique mitochondriale.

1- Isolement des mitochondries

a. Principe

La procédure d'isolement des mitochondries a été effectuée selon la méthode de **Kristal *et al.* (1996)**. Il est basé sur préparation d'un homogénat suivie d'une centrifugation différentielle.

b. Réactifs

Tampon d'isolement

- ✓ 210 mM mannitol
- ✓ 70 mM sucrose
- ✓ 1 mM Tris-Hcl pH 7.5
- ✓ 1 mM EDTA pH 7.5

c. Protocole

- Préparer l'homogénat à partir 500 mg de tissu dans 4 ml de tampon d'isolement.
- Transférer l'homogénat dans un tube à centrifuger de plusieurs centrifugations différentielle à 4°C.
- Jeter le surnageant et récupérer le culot qui contient essentiellement les mitochondries pures.
- Laver les mitochondries deux fois par le tampon de respiration.
- Remettre le culot dans 1 ml de tampon d'isolation.
- Ensuite la lecture spectrophotomérique à la longueur d'onde 540 nm.

2- Mesure de la respiration mitochondriale

a- Principe :

La respiration a été estimée en utilisant un Oxygraph (Hansatech) à l'aide d'une électrode à oxygène selon la méthode décrite par **Rouabhi *et al.* (2006, 2009)**.

b- Réactifs

Tampon de respiration

- ✓ 0,5 M de mannitol
- ✓ 0,05% d'albumine de sérum bovin
- ✓ 5 mM MgCl₂
- ✓ 10 mM tampon phosphate à pH 7,3

c- Protocole

Les mesures de consommation d'oxygène des mitochondries isolées ont été réalisées par simple addition d'organelles (0,2 mg / ml mitochondries).

3- Mesure du gonflement des mitochondries

Les mesures du gonflement des mitochondries sont effectuées à 25 ° C avec un spectrophotomètre (Jenway, modèle UV6300) à la longueur d'ondes $\lambda = 540$ nm. La réaction est déclenchée par l'addition de mitochondries (0,2 à 0,5 mg de protéines pour un volume final de 3 ml).

4- Estimation de la perméabilité mitochondriale

Selon la méthode de **Kristal *et al.* (1996)**, nous avons procédé à l'estimation de la perméabilité mitochondriale basée sur le taux de traverser de Ca⁺⁺ suivi par une augmentation de la taille des mitochondries détectées à la longueur d'onde de 540 nm durant 2 min et chaque 15 secondes.

5- Mesure des activités enzymatiques et non enzymatique mitochondriales

L'activité de la catalase a été déterminée dans l'hépatopancréas colorimétriquement selon **Cakmak & Horst (1991)**, La vitesse de disparition de H₂O₂ est suivie en observant le taux de diminution de l'absorbance à 240 nm. La mesure de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig *et al.* (1974)** suite à la formation de 1-glutathion-2,4-dinitrobenzène résultant de la conjugaison entre le substrat (1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) avec du glutathion réduit. La réduction du glutathion a été déterminée par spectrophotométrie, selon la méthode de **Weckbecker et Cory (1988)**. Le MDA peut être détectée par une réaction colorimétrique avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le MDA est analysé selon la méthode **d'Esterbauer *et al.* (1992)**. L'activité de la glutathion peroxydase a été évaluée par la méthode de **Flohe et Günzler (1984)** en utilisant H₂O₂ comme substrat.

6- Résultats

6-1-Mesure de la consommation d'oxygène chez les mitochondries

La figure (32) mis en évidence l'évolution de la consommation d'oxygène chez les escargots *Helix aspersa* en présence de CdSe, de Novaluron et de la mixture CdSe/Nov après 90 jours de traitement.

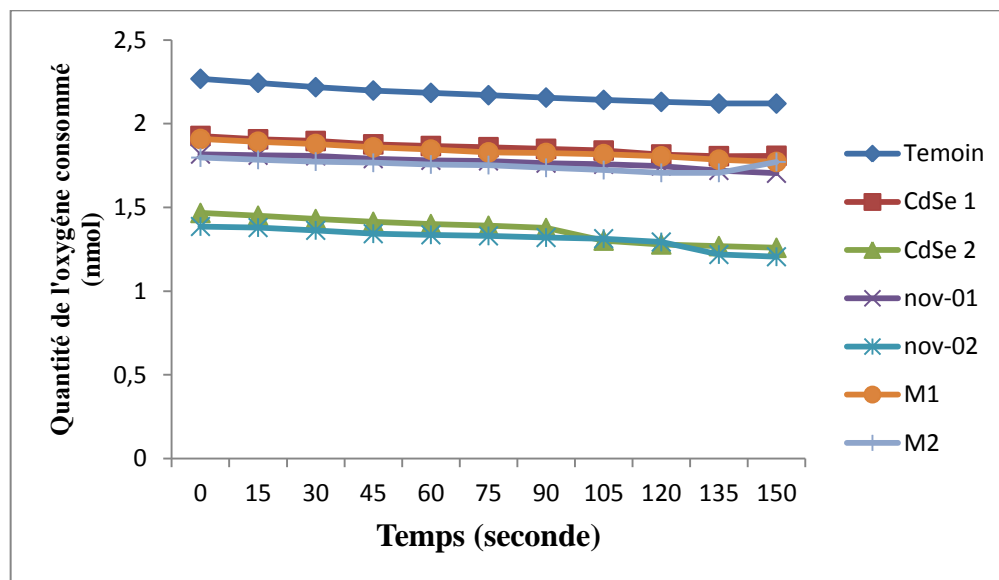


Figure 32. Effet de CdSe, de Novaluron et de mixture sur la respiration mitochondriale (nmol/sec) après 90 jours de traitement

Nos résultats illustrent une diminution de consommation de l'oxygène pour les escargots traités par rapport aux témoins. Nous constatons un ralentissement du métabolisme respiratoire en particulier chez les escargots traités par CdSe à (7.2 ug/g) et Novaluron à (2.4 ul/g).

6-2- Variation du volume des mitochondries traitées par le CdSe, le Novaluron et la mixture

La figure (33) illustre l'évolution du volume mitochondrial des escargots témoins et traités avec des concentrations croissantes de CdSe, de Novaluron et de mixture.

Nos résultats mettent en évidence une diminution dose-dépendante du volume des mitochondries traitées. Cette diminution est progressive et très hautement significative ($P \leq 0.001$) chez les escargots traités par CdSe à (7.2 ug/g) et par la mixture CdSe/Nov.

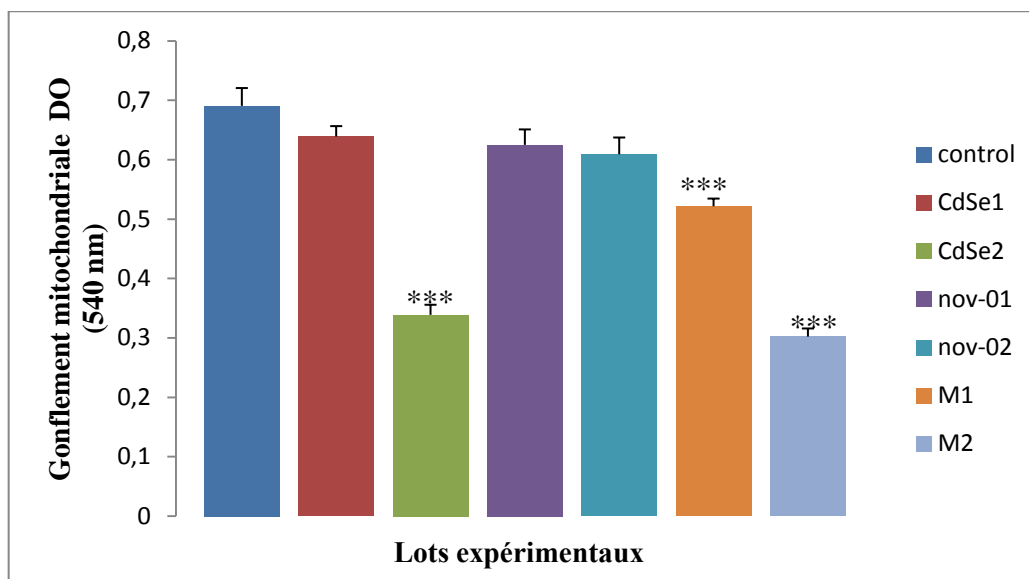


Figure 33. Effet de CdSe, de Novaluron et de mixture sur le gonflement mitochondriale ($DO_{540\text{ nm}}$) après 90 jours de traitement

6-3- Estimation de la perméabilité des mitochondries

La figure (34) illustre les variations dans la perméabilité des mitochondries des hépatopancreas chez les escargots témoins et traités. Nos résultats révèlent qu'après 15 secondes, une augmentation de la taille des mitochondries traités par le CdSe, le Novaluron et la mixture, ce qui signifie une grande perméabilité.

Après 30 secondes, on note une stabilité de volume de mitochondries chez les différents traités.

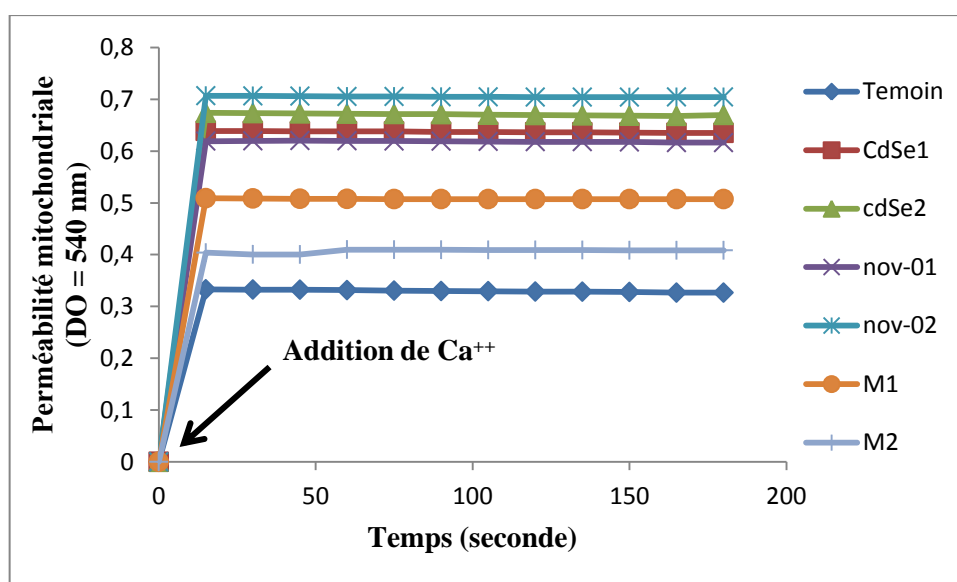


Figure 34. Effet de CdSe, de Novaluron et de mixture sur la perméabilité mitochondriale ($DO_{540\text{ nm}}$) après 90 jours de traitement

6-4- Suivi des activités enzymatiques et non enzymatiques mitochondriales

6-4-1- Activité Catalase

La figure (35) met en évidence l'évolution de l'activité Catalase chez les mitochondries témoins et traitées avec des concentrations croissantes de CdSe, de Novaluron et de mixture CdSe/Nov. Nos résultats montrent une augmentation dose-indépendante et très significative ($P \leq 0.01$) de l'activité de catalase en fonction du temps chez les escargots traités par le CdSe et le Novaluron. Ainsi cette activité enzymatique est significative ($P \leq 0.05$) chez les traités par la mixture pour les deux doses.

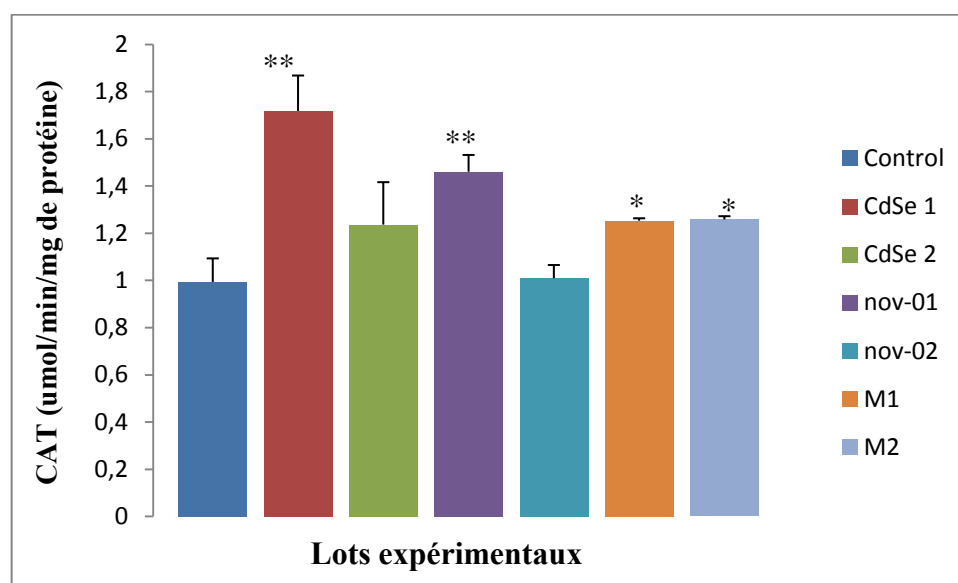


Figure 35. Effets du CdSe, du Novaluron et de mixture sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées à partir des hépatopancréas.

6-4-2- Activité GST

La figure (36) met en évidence l'évolution de l'activité de GST chez les mitochondries témoins et traitées avec des concentrations croissantes de CdSe, de Novaluron et de mixture CdSe/Nov. Nos résultats montrent une augmentation dose-dépendante et très hautement significative ($P \leq 0.001$) de l'activité de GST en fonction du temps chez les escargots traités par le CdSe et le Novaluron à deux concentrations, tandis qu'il y a une augmentation dose indépendante pour les traités par la combinaison CdSe/Nov.

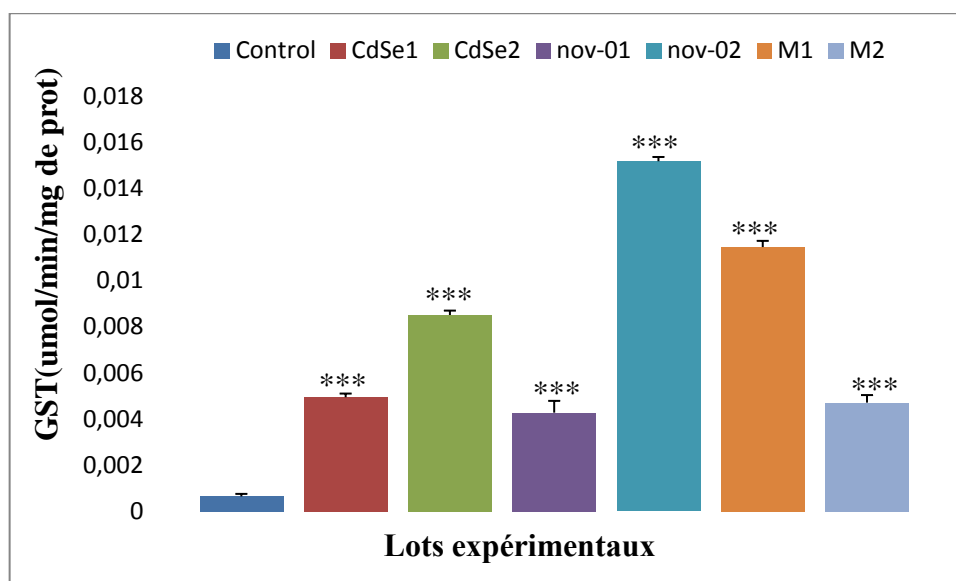


Figure 36. Effets du CdSe, du Novaluron et de mixture sur l'activité enzymatique GST des mitochondries isolées à partir des hépatopancréas

6-4-3- Taux de GSH

Le traitement des escargots par le CdSe, le Novaluron et la mixture pendant 90 jours résulte 'une diminution dose dépendante de la teneur en glutathion dans les mitochondries des hépatopancréas chez les escargots traités par le CdSe et le Novaluron à deux doses. Contrairement pour les traités par la mixture, nous constatons qu'il ya une diminution dose indépendante et très significative ($P \leq 0.01$).

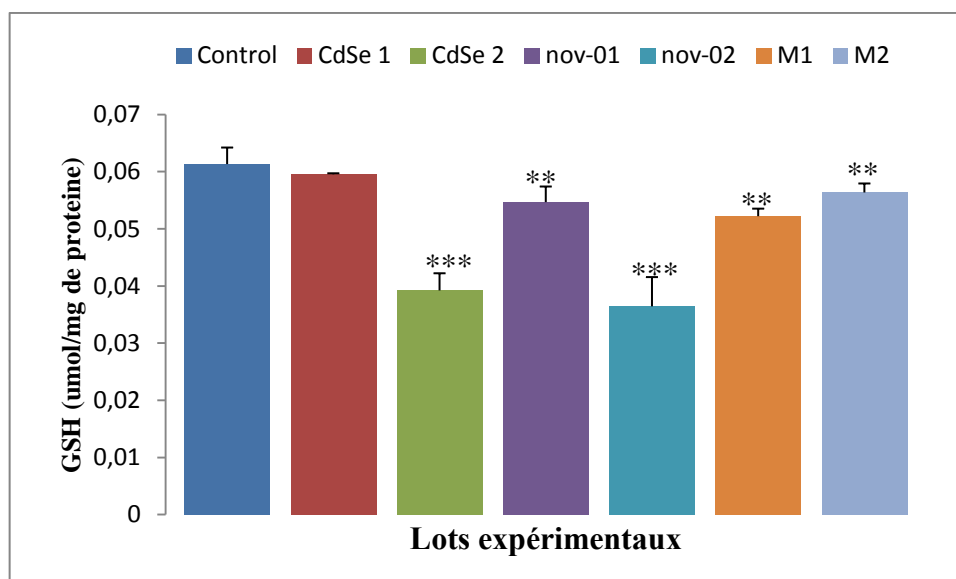


Figure 37. Effets du CdSe, du Novaluron et de mixture sur le taux de GSH des mitochondries isolées à partir des hépatopancréas

6-4-4- Taux de MDA

La figure (38) montre l'effet de CdSe, de Novaluron et de mixture à deux doses sur la peroxydation lipidique dans les cellules de la glande digestive selon l'estimation du niveau de MDA. La dose de CdSe (3.6 ug/g) , de Novaluron (2.4 ul/g) et la dose de CdSe/Nov (7.2 + 2.4) provoquent une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du taux de MDA par rapport aux témoins. Cette augmentation est dose indépendante pour les traités par le CdSe, le Novaluron et la mixture.

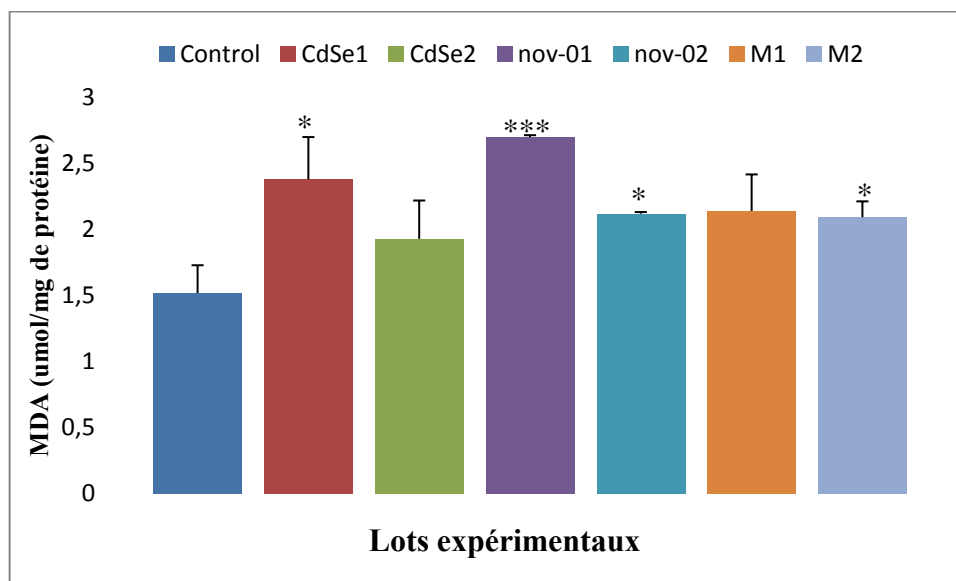


Figure 38. Effets du CdSe, du Novaluron et de mixture sur le taux de MDA des mitochondries isolées à partir des hépatopancréas

6-4-5- Activité de GPx

La figure (39) met en évidence l'évolution de l'activité de GPx chez les mitochondries témoins et traitées avec des concentrations croissantes de CdSe, de Novaluron et de mixture CdSe/Nov. Nos résultats montrent une diminution dose-dépendante de l'activité de GPx en fonction du temps chez les escargots traités par le CdSe et le Novaluron à deux concentrations, tandis qu'il y a une diminution dose indépendante pour les traités par la mixture CdSe/Nov.

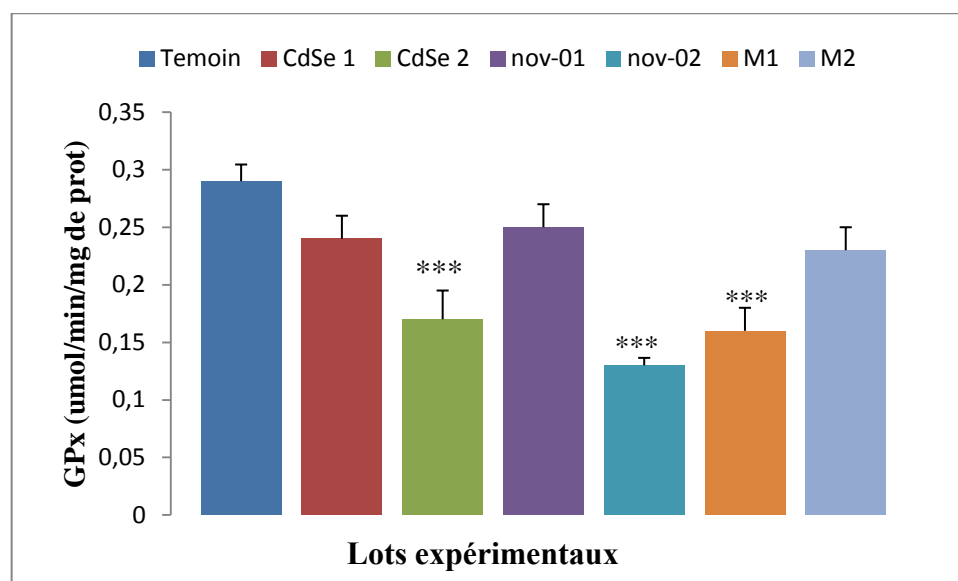


Figure 39. Effets du CdSe, du Novaluron et de mixture sur l'activité enzymatique GPx des mitochondries isolées à partir des hépatopancreas

7- Discussion

La mitochondrie est le site de la respiration cellulaire, de la phosphorylation oxydative et de la production d'ATP (principale source d'énergie pour la cellule) (**McBride et al., 2006**).

Le Cd peut inhiber plusieurs enzymes participant aux processus de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Ivanina et al., 2008; Garceau et al., 2010**). Il peut se lier aux groupements thiols des molécules mitochondriales critiques et inactiver ainsi les enzymes. **Wang et al. (2004)** ont montré que les complexes II et III sont plus sensibles à l'inhibition du Cd que les autres. De plus, l'inactivation des groupements thiols peut générer un stress oxydant, une dépolarisation (diminution du potentiel membranaire) et une perméabilité membranaire conduisant à un dysfonctionnement de la mitochondrie. L'altération du potentiel membranaire et le découplage de la phosphorylation oxydative par le Cd conduisent à une diminution de la synthèse de l'ATP. Ceci peut être suivi par l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (**Pinot et al., 2000**). Ces pores sont des canaux (complexes protéique) au niveau de la membrane mitochondriale dont l'ouverture libère dans le cytosol plusieurs facteurs pro-apoptotiques à l'origine de la mort cellulaire (**Berson, 2005**).

En effet, la respiration cellulaire par mesure de l'oxygène dissous dans le milieu est un excellent indicateur du fonctionnement de système respiratoire mitochondriale et un bon outil d'évaluation de la cytotoxicité.

Devant l'absence de données concernant l'effet du CdSe sur le métabolisme respiratoire, les travaux concernant cet aspect, ont mis en évidence une inhibition de la respiration cellulaire en présence de xénobiotiques par la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale. **Azzouz (2012)** a montré que l'étude polarographique en présence d'Amistar Xtra et du Glyphosate, a mis en évidence un effet inhibiteur de l'activité respiratoire, C'est ainsi que **Chagra et al. (2009)** a mis en évidence la perturbation de la photophosphorylation oxydative chez des mitochondries isolées de *Solanum tuberosum* traités par le cadmium. D'un autre côté, **Sbartai et al. (2009)** et **Benbouzide et al. (2012)** ont également montré une inhibition de la respiration des paramécies en présence de Bifenazate et Phosphoramidate. Tous ces travaux sont en accord avec nos résultats en effet nous avons mis en évidence une inhibition du métabolisme respiratoire des escargots particulièrement aux fortes concentrations du CdSe. Ces résultats suggèrent la libération de radicaux libres au niveau mitochondrial.

L'autre paramètre aussi intéressant que nous avons jugé utile de mesurer est : le gonflement des mitochondries. Ce gonflement peut être expliqué par la stimulation de la perméabilité membranaire des mitochondries traitées car certains médicaments sont capables d'entraîner une ouverture des PTPM (**Berson et al., 2006 ; Labbe et al., 2008**). La Troglitazone et l'Alpidem ,peuvent également induire une ouverture de ces pores. La conséquence principale de l'ouverture des PTPM est la mort cellulaire par apoptose, ou par nécrose, en fonction du nombre de mitochondries impliquées. **Chagra et al., (2009)** ont observé un gonflement mitochondrial suite au traitement par le Cadmium chez les mitochondries isolées de pommes de terre. **Kon (2004)** suggère que le mécanisme de transition de perméabilité mitochondriale pourrait être un des mécanismes fondamentaux impliqués dans les altérations de la chaîne respiratoire en condition d'intoxication au Paracétamol. Nos résultats sont en parfait accord avec ces travaux puisque nous avons également mis en évidence un gonflement mitochondrial chez les mitochondries traitées avec le CdSe, le Novaluron et la combinaison CdSe/Nov.

Dans les conditions physiologiques, l'oxygène produit en permanence au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées activées (EOA) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. Ces EOA, dont font partie les radicaux libres, sont dotées de propriétés

oxydantes et peuvent entraîner l'oxydation des macromolécules telles que les lipides et les protéines.

Ce travail est consacré à l'évaluation de la toxicité potentielle de CdSe à travers le suivi de l'évolution de certains biomarqueurs de la toxicité tels que le glutathion (GSH), l'activité GST, l'activité catalase et le taux de malondialdéhyde (MDA) au niveau d'hépatopancréas mitochondriale. La chaîne respiratoire mitochondriale produit en permanence des espèces oxygénées réactives à partir d'une fuite d'électrons en amont du complexe IV. Ces électrons s'associent à l'oxygène pour constituer des Superoxydes puis secondairement du Peroxyde d'hydrogène. Le GSH, la GPX et la CAT se chargent de piéger ces espèces réactives de l'oxygène au sein de la mitochondrie.

Nos résultats ont montré une forte activité enzymatique antioxydante reflétée par une augmentation des activités de catalase et de GST connues pour leur rôle dans la détoxification des radicaux libres, parallèlement à la diminution de GSH qui est également un excellent biomarqueur de toxicité. Le même s'applique au taux de Malondialdehyde (MDA), dont l'augmentation explique la peroxydation lipidique. **Chandran et al. (2005)** ont mis en évidence une augmentation significative du taux du (MDA) chez le gastéropode *Achatina fulica* après exposition au Cd et Zn.

Des expériences d'exposition à des TiO₂ NP chez l'invertébrée terrestre *Poercellioscaber* ont révélé des effets sublétaux tel qu'une induction de la catalase CAT (**Drobne et al., 2009**). Nos résultats sont en parfait accord avec ceux de **Buffet et al. (2011)** qui ont observé une induction de CAT chez le bivalve *S.plana* et l'annélide *H.diversicolor* exposé à des CuO NP. La CAT a également induite chez *S.plana* exposés à des AU NP (**Pan et al., 2012**) ; **Kim et al. (2010)** ont également observé une induction de CAT chez *D.magna* exposées à des TiO₂ NP.

Ces réactions antioxydantes, enzymatiques et non enzymatiques fournissent à la cellule un état d'équilibre et une protection contre les espèces réactives oxydées (**Van Acker et Bast, 1993**). Une augmentation de l'activité de la CAT et de la GST est observée dans la glande digestive du moule, *M. galloprovincialis*, exposée 24 h à NP TiO₂ (**Canesi et al., 2010**). Nos résultats ont montré une augmentation de l'activité de la GST et de l'activité de la CAT chez les escargots traités avec des nanoparticules de CdSe, de Novaluron et de leur mixture démontrant ainsi le déclenchement de mécanismes de défense enzymatique.



Conclusion générale et perspectives

Conclusion

Dans ce contexte que se situe notre travail qui consiste en la mise en évidence de la toxicité mixte de deux polluants: le Novaluron et le CdSe-NP sur un modèle biologique d'écosystème terrestre considéré également comme bioindicateur de la pollution; à savoir l'escargot *Helix aspersa*.

Notre travail s'est fixé trois objectifs : dans un premier temps rechercher la toxicité potentielle des deux xénobiotiques à l'échelle cellulaire, puis étudier l'influence des variations physicochimiques du milieu sur leur toxicité et enfin mettre en évidence une toxicité chez un organite subcellulaire particulièrement connu pour son rôle dans la production de radicaux et dans l'initiation du phénomène de l'apoptose.

Dans la première partie, Les polluants testés et leurs mixtures entraînent des altérations comportementales, comme la diminution de l'activité et de la prise alimentaire aux plus fortes concentrations. Ces altérations comportementales sont accompagnées par une réduction significative des paramètres physiologiques tels que le poids frais moyen des escargots, le poids frais moyen de l'hépatopancréas, le poids frais moyen de la coquille, le diamètre et la longueur de la coquille.

Dans la deuxième partie, la composition biochimique de l'hépatopancréas est également affectée par les différents traitements, avec une forte perturbation des différents métabolites cellulaires dont les protéines, les glucides et les lipides.

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

Dans la troisième partie, L'isolement des mitochondries a été la consécration de ce travail. L'effet du CdSe-NP, de Novaluron et de leur mixture sur ces organites a mis en évidence un effet toxique à travers l'inhibition de la quantité consommée de l'oxygène chez les mitochondries isolées et l'induction de la perméabilité mitochondriale. De plus à ce niveau d'organisation cellulaire, nous avons également mis en évidence une perturbation de l'activité CAT, GST et GPx des enzymes connues pour leur rôle dans le piégeage des ROS.

Perspectives

- ✚ Compléter l'étude subcellulaire pour éventuellement pouvoir proposer de nouveaux biomarqueurs d'exposition comme la SOD, les LDH.
- ✚ Quantification des cytochromes.
- ✚ Evaluation des caspases et autres protéines de l'apoptose.
- ✚ Etude histopathologique.
- ✚ Approfondir les essais au niveau de l'hémolymphe des escargots.
- ✚ Etudier la toxicité d'une pollution mixte sur les œufs des escargots et des juvéniles.



Références bibliographiques

A

- **Acker, V., Koymans, L.M.H. & Bast, A. 1993.** Molecular pharmacological importance of vitamin E, structural aspects of NADP. *Free radical. Biol. Med.* **5**, 311-328.
- **Åkerman, M.E., Chan, W.C.W., Laakkonen, P., Bhatia, S.N et Ruoslahti, E. 2002.** Nanocrystal targeting *in vivo*. Proceeding of the national academy of Sciences of the United States of America. **99** (20), 12617-12621.
- **Alavanja, M.C., Ross, M.K., Bonner, M.R. 2013.** Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA: a cancer journal for clinicians.* **63**(2),120-42.
- **Al Kadissi, S. 2012.** Comparaison De La Réponse (En Termes D'accumulation, D'impacts Cellulaires Et Génétiques) De L'écrevisse *Procambarus Clarkii* Après Exposition A Un Polluant Métallique (Cadmium) Et Un Polluant Radiologique (Uranium 238 Et 233) . Thèse De Doctorat. Université Brdeaux.
- **Al-Mutairi, D. A., Craik, J.D., Batinic-Haberle, I., Benov, L T. 2007.** Induction of oxidative cell damage by photo - treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. *Free radical research.* **41**, 89-96.
- **Audry, B. 2011.** Immunotoxicité Des Nanoparticules De Cds, Cdte Et d'Ag Sur Des Espèces Modèles. Thèse Pour L'obtention Du Grade De Philosophiaedocteur En Biologie. Université Du Québec. Institut Armand-Frappier. Pp1-2.
- **Aurélié, D. 2004.** Caractérisation Des Risques Induits Par Les Activites Agricoles Sur Les Ecosystemes Aquatiques. Unité Mixte De Recherche N° 5569. Centre De Montpellier. P 269.
- **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.
- **Azzouz, Z. 2012** .Etude des effets toxiques d'un fongicide(Amistar Xtra) et d'un herbicide(Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*.doctorat de l'université d'Annaba.141,p84.
- **Atailia, A. 2009.**Effet des poussières métalliques d'origine industrielles sur un organisme animal bio indicateur / bioaccumulateur de pollution : *Helix aspersa*. Thèse Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. 45 p.

B

- **Baatrup, E et Junge, M .2001.** Antiandrogenic Pesticides Disrupt Sexual Characteristics In The Adult Male Guppy (*Poecilia Reticulata*). *Environmental Health Perspectives* **109**: 1063-1070
- **Badot, P.-M. 2002b.** Effects Of Dimethoate On Snail B-Esterase And Growth As A Function Of Dose, Time And Exposure Route In A Laboratory Bioassay. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* **7**, 138–150.
- **Band, P.R., Abanto, Z., Bert, J., Lang, B., Fang, R., Gallagher, R.P., Le, N.D. 2011.** Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia farmers. *The Prostate* **71**, 168–183.
- **Baratli, Y. 2015.** Study of the toxicity of iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) in the rat, mitochondrial analyzes and oxidative stress. Doctoral thesis. University of Strasbourg and University of Carthage.
- **Barker, G.M. 2001.** *The Biology Of Terrestrial Mollusks.* Wallingford U.K, C.A.B International.
- **Bassil, K.L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D.C., Kaur, J.S., Kerr, K.J. 2007.** Cancer health effects of pesticides Systematic review. *Canadian Family Physician* **53**, 1704–1711.
- **Beaumont, A et Cassier, P. 1998.** Travaux pratiques de biologie animale. Zoologie Embryologie Histologie, Dunod, Paris. 502p.
- **Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A. 2005.** Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathy-modiolusazoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* **75**, p.354–373.
- **Beeby, A & Richmond, L. 2002.** Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators*, **1**(4): 261-270.
- **Belhaouchet, N., Djebbar, M.R., Meksem, L., Grara, N., Zeriri, I. & Berrebbah, H. 2012.** Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide : The Spinosad on an alternat model : *Helix aspersa*. *Journal of Applied Sciences Research*, **8**(8): 4199-4206.
- **Belinato, T.A., Martins, A.J., Lima, J.B.P., Valle, D. 2013.** Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* laboratory conditions. *Parasit Vectors* **6**, 83.

- **Bellavere et Gorbi. 1981.** A comparative analysis of acute toxicity of chromium, copper and cadmium to *Daphnia magna*, *Biomphalaria glabrata*, and *Brachydaniorerio*, *Environmental Technology Letters*, 2, 119128.
- **Benbouzib, H. 2012.** Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliés. Thèse de doctorat de l'université d'Annaba. p 87
- **Bénédicte VIARD - LA ROCCA. 2004.** Mise Au Point Et Validation, Sur Sites Contamines, (Etm-Hap) D'un Test De Biosurveillance En Microcosme : Croissance Et Bioaccumulation Par Le Gasteropode Terrestre Hélix AspersaAspersa. These De Doctorat. Universite De Metz.P 64.
- **Benoit, P., Mamy, L., Rossard, V., Latrille, E., Bessac, F., Patureau, D., Barriuso, E., Bedos, C., Xavierlouchart, Martin-Laurent, F., Miege , 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
- **Berciaud, S. 2006.** Thèse De Doctorat, Université De BORDEAUX 1.
- **Berson, A., Cazanave, S., Descatoire, V., Tinel, M., Grodet, A., Wolf, C. 2006.** The antiinflammatory drug, nimesulide (4-nitro-2- phoxymethane-sulfoanilide), un couples mitochondria and induces mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells: protection by albumin. *J Pharmacol Exp Ther*;318:444-54.
- **Berson, A. 2005.** Hépatotoxicité médicamenteuse par atteinte mitochondriale. Mini-revue, *Hépatogastro* 12, 191-198.
- **Bigorgne, E. 2011.** Ecotoxicity of nanoparticles and by-products of alteration of titanium dioxide on the earthworm, *Eisenia fetida*.). Doctorate thesis. Paul Verlaine-Metz University. P2.
- **Bocquené, G Et Franco, A. 2005.** Pesticide Contamination Of The Coast Line Of Martinique. Original Research Article *Marine Pollution Bulletin*, Volume 51, Issues 5-7: 612-619.
- **Bocquené, G. 1996.** L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. *Thèse de Doctorat, Ecole Pratique des Hautes Etudes*. 250 p.
- **Bocquené, G., Galgani, F & Walker, C.H. 1997.** Les cholinesterases, biomarqueurs de neurotoxicité. In: *Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris. pp. 209-240.

- **Boucenna, M .2010.** Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les aciéries 1et 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 mixtures de pesticides sur un bioindicateurs de la pollution des sols *Helix aspersa*. Mémoire de doctorat, Université Badji Mokhtar. Annaba. 58 pages.
- **Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254
- **Buffet, P.E., O.F. Tankoua., J.F. Pan., D. Berhanu., C. Herrenknecht., L.Poirier., C.Amirad-Triquet., J.C.Amirad., J.B.Berard., C.Risso., M.Guibbolini., M.I.Roméo., P.Reip., E.Valsami-Jones and C.Mouneyrac. 2011.** Behavioural and Biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia Plana* and *HedisteDiversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*. 84(1): 166-174.
- **Bonnet, J.C., Aupine, P et Vrillon, J.L.1990.** L'escargot *Helix aspersa* : Biologie-Élevage. INRA. Paris. P 09.
- **Borkovi , S.S., Pavlovi , S.Z., Kovac evi , T.B., S tajn, A.S., Petrovi , V.M., Saic i , Z.S. 2008.** Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 147, 122-128.
- **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.
- **Boulassel, A. 2014.** Evaluation of the toxicity of two drugs: Paracetamol and Ibuprofen, on a cellular model: *Paramecium tetraurelia*. Test on the subcellular scale. Doctorate thesis. Université Badji Mokhtar de Annaba.
- **Bruchez, J.r., Morronne, P., Gin, S., Weiss, A. P. 1998.** *Alivisatos science*, 281(5385) ,2013-2016.
- **Burns, C.J., McIntosh, L.J., Mink, P.J., Jurek, A.M., Li, A.A. 2013.** Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 16, 127–283.

- **Burton, R.F., Shirley M. Morrwn And Douglas, A.M. 1987.** Some effects of injected magnesium chloride in the snail, helix asperm: narcosis, magnesium distribution and responses to infused potassium. *Comp.Biochem. Physiol.* Vol. 86A, No. I, Pp. 113-L 16. Printed In Great Britain

C

- **Cakmak, I. & Horst, W.J. 1991.** Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum* **83**, 463-468.
- **Canesi, L.R., Fabbri, G., Gallo, D., Vallotto, A., Marcomini and G. Pojana. 2010.** Biomarkers in *MytilusGalloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano TiO₂ , Nano SiO₂). *Aquatic toxicology*. 100 (2): 168-177.
- **Carbone, P., Giordano, F., Nori, F., Mantovani, A., Taruscio, D., Lauria, L., Figa- Talamanca, I. 2006.** Cryptorchidism and hypospadias in the Sicilian district of Ragusa and the use of pesticides. *Reproductive toxicology* 22, 8–12.
- **Casals, E., Vázquez-Campos, S., Bastús, NG., Puntos, V. 2008.** Distribution And Potential Toxicity Of Engineered Inorganic Nanoparticles And Carbon Nanostructures In Biological Systems. *Trends Anal Chem* 27: 672–683.
- **Chagra, A., Djebbar, M. R., Rouabhi, R. & Berrebbah, H. 2009.** Cadmium Induced Changes in Metabolic Function of Mitochondrial Isolated from Potato Tissue (*Solanum tuberosum* L.). *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **5 (1)**, 35-39.
- **Chan, W.C.W., Nie, S. 1998.** *Science*, 281(5385), 2016-2018.
- **Cheng, T. C., Sullivan, J. T., 1984.** Effetes of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research*, **14**: 305-315.
- **Chevallier, H. 1992.** L'élevage Des Escargots. Production Et Préparation Du Petit-Gris. 2ème Edition. Edition Du Point Vétérinaire. Maison-Alfort.
- **Chevalier, L., Desbuquois, C., Le Lannic, J., Charrier, M. 2001.** Poaceae In The Natural Diet Of The Snail *Helix Aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata). *Comptes Rendus De l'Académie Des Sciences - Series III - Sciences De La Vie* 324(11), 979–987
- **Chevalier, N. 2004.** Thèse De Doctorat, Université De Joseph Fourier.

- **Choi, C.Y., An, K.W., Nelson, E.R., Habibi, H.R. 2007.** Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 145, 595-600.
- **Coeurdassier, M. 2001.** Utilisation De Mollusques Gastéropodes Pulmonés Terrestres (*Helix Aspersa*) Et Aquatiques (*Lymnia Stagnalis* Et *Lymnia Palustris*) Comme Indicateurs De Pollution Par Les Eléments Métalliques Et Les Xénobiotiques .Thèse De Doctorat. Université De France Comté. France.281p.
- **Coeurdassier, M., Saint-Denis, M., Gomot-de Vaufleury, A., Ribera, D & Badot, P.M. 2001.** The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environment. Toxicol. & Chem.*, 20, 1951-1957.
- **Coeurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A & Badot P.M. 2000.** Dosedependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in the land snail (*Helix aspersa aspersa*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(10): 2571-2578.
- **Coeurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A., Lovy, C & Badot, P.M. 2002.** Is the epithelial cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 425-431.
- **Cohn, B.A., Wolff, M.S., Cirillo, P.M., Sholtz, R.I. 2007.** DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environmental Health Perspectives* 115, 1406.
- **Corden, M. T. 1999.** C¹⁴ – « Rimon » Metabolism in the lactating goat. *Huntingdon life sciences ltd.*
- **Cutler, G.C., Scott-Dupree, C.D., Tolman, J., Harris, C.R. 2005.** Acute and sublethal toxicity of Novaluron, a novel chitine synthesis inhibitor, to *Leptinotarsa decemlineata* (Choleoptera chrysomelidae). *Journal of pest management sci.*61 : 1060-1068.
- **Cutler, G.C., Scott-Dupree, C.D., Tolman, J., Harris, C.R. 2006.** Toxicity of Novaluron to the non-target predatory bug *Posidus maculiventris* (Heteroptera : Pentatomidae). *Biological control.* 38 : 196-204.

D

- **Dabbousi, B.O., Rodriguezviejo, J., Mikulec, F.V., Heine, J.R., Mattoussi, H., Ober, R., Jensen, K.F., Bawendi, M.G. 1997.** (Cdse)Zns Core-Shell Quantum Dots: Synthesis And Characterization Of A Size Series Of Highly Luminescent Nanocrystallites. *J Physchem B* 101:9463–9475
- **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.
- **Derfus, A.M., Chan, W.C.W., Bhatia, S.N. 2004.** Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots, *Nano Lett.* 4 : 11-18.
- **De Vaufleury, A., Coeurdassier, M., Pandard, P., Scheifler, R., Lovy, C., Crini, N., Badot, P.M. 2006.** How terrestrial snails can be used in risk assesement of soils. *Environmental toxicology and chemistry* 25, 797-806.
- **Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., Le, D.P. 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 545–569.
- **Djeghder, N. 2014.** Impact d'un régulateur de croissance des insectes, Novaluron sur *Culex pipiens*, aspects : développemental, structural et hormonal. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba. pp 50.
- **Draper, H.H et Hadley, M. 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol*, 186, 241-431.
- **Drobne, D., Jemec, A., Pipan Tkalec, Z. 2009.** *In vivo* screening to determine hazards of nanoparticles: Nanosized TiO₂. *Environmental Pollution* 157, 1157-1164.
- **Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D.J., Noireaux, V., Brivanlou, A.H., Libchaber, A. 2002.** In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 298 (5599) : 1759-62.
- **Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D.J., Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaberin. 2003.** *Science*, 298(5599),1759-1762.
- **Dubrovsy, E.B. 2005.** Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol. Metab.*16, 6–11.
- **Duchateau, G & Florkin. 1959.** For trehalosemie of insects and *its* signification. *Arch. Insect. Physiol. Biochem*, 67, 306-314.

E

- **Eddleston, M., Jonathan, M., Street., Ian Self., Adrian Thompson., Tim King., Nicola Williams., Gregorio Naredo., Kosaladissanayake., Ly-Meeyu., Franz Worek., Haraldjohn., Sionaghsmith., Horst Thiermann., John B., Harris., R. Eddie Clutton .2012.** A Role For Solvents In The Toxicity Of Agricultural Organophosphoruspesticides. Original Research Article Toxicology, Volume 294, Issues 2– 3: 94-103.
- **EFSA .2014.** Towards An Integrated Environmental Risk Assessment Of Multiple Stressors On Bees: Review Of Research Projects In Europe, Knowledge Gaps And Recommendations EFSA Journal [En Ligne] **12** (3) 102p [Http://Www.Efsa.Europa.Eu/En/Efsajournal/Pub/3594.Htm](http://Www.Efsa.Europa.Eu/En/Efsajournal/Pub/3594.Htm)
- **Eidi, H. 2011.** Cytotoxicité De Nanoparticules Polymériques, Vecteurs De Médicaments. THESE Présentée Et Soutenue Publiquement Pour L’obtention Du Titre De docteur de l’universite henri poincare. P 9.
- **El-Gendy, K.S., Aly, N.M., Mahmoud, F.H., Kenawy, A., El-Sebae, A.K.H. 2010.** The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 215-221.
- **El-Gendy, K.S., Radwan, M.A., Gad, A.F. 2009.** In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. *Chemosphere*. 77(3): 339-344.
- **Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*. 7: 88-95.
- **Engel, S.M., Wetmur, J., Chen, J., Zhu, C., Barr, D.B., Canfield, R.L., Wolff, M.S. 2011.** Prenatal exposure to organophosphates, paraoxonase 1, and cognitive development in childhood. *Environmental Health Perspectives* 119, 1182.
- **Eskenazi, B., Marks, A.R., Bradman, A., Fenster, L., Johnson, C., Barr, D.B., Jewell, N.P. 2006.** In utero exposure to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and neurodevelopment among young Mexican American children. *Pediatrics* 118, 233–241.

- Esterbaer, H., Gebicki, J., Puhl, H. & Jungens, G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.*13, 341.

F

- Fahrbach, S.E., Smaghe, G., Velarde, R.A. 2012. Insect nuclear receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 57, 83–106.
- Fasoli, A., Colli, A., Kudera, S., Mannab, L., Hofmann, S., Ducati, C., Robertson, J., Ferrari, A.C. 2007. *Physica E* 37 138–141.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O. 2008. Physiological And Behavioural Responses Of *Gammarus Pulex* (Crustacea: Amphipoda) Exposed To Cadmium. *Aquatic Toxicology* 86, 413-425.
- Flohe, L. & Gunzler, W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*105, 114-121.
- Freeman, L.E.B., Bonner, M.R., Blair, A., Hoppin, J.A., Sandler, D.P., Lubin, J.H., Dosemeci, M., Lynch, C.F., Knott, C., Alavanja, M.C. 2005. Cancer incidence among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study cohort exposed to diazinon. *American journal of epidemiology* 162, 1070–1079.
- Frese, K.W & Appl, J. 1982. *Phys. Lett.* 40, 275.
- Fritsch, C., Coeurdassier, M., Gimbert, F., Crini, N., Scheifler, R., De Vaufleury, A. 2011. Investigations Of Responses To Metal Pollution In Land Snail Populations (*Cantareusaspersus* And *Cepaeanemoralis*) From A Smelter-Impacted Area. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 20, 739–759.
- Funes, V., Alhama, J., Navas, J.I., Lopez-Barea, J., Peinado, J. 2006. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollux species from the Spanish South Atlantic littoaral. *Environ Pollut* 139: 214-223.

G

- Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Fournier, M., Gagnon, C., Sauvé, S., Blaise, C. 2008a. Ecotoxicity Of Cdte Quantum Dots To Freshwater Mussels: Impacts On Immune System, Oxidative Stress And Genotoxicity. *Aquattoxicol* 86:333–340

- **Gagné, F., Maysinger, D., André, C., Blaise, C. 2008b.** Cytotoxicity Of Aged Cadmium-Telluride Quantum Dots To Rainbow Trout Hepatocytes. *Nanotoxicology* 2:113–120.
- **Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung, L.W.K., Nie, S. 2004.** *Nature Biotechnol*, 22(8) 969-976.
- **Garceau, N., Pichaud, N. & Couture, P. 2010.** Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aqua. Toxicol.* **98**, 107-112.
- **Gascon, M., Morales, E., Sunyer, J., Vrijheid, M. 2013.** Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: a systematic review. *Environment international* 52, 51–65.
- **Genghini, M., Gellini, S., Gustin, M. 2006.** Organic And Integrated Agriculture: The Effects On Bird Communities In Orchard Farms In Northern Italy. *Biodiversity And Conservation* **15**: 3077-3094
- **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.
- **Glynn, A., Thuvander, A., Aune, M., Johannisson, A., Darnerud, P.O., Ronquist, G., Cnattingius, S. 2008.** Immune cell counts and risks of respiratory infections among infants exposed pre- and postnatally to organochlorine compounds: a prospective study. *Environ Health* 7, 62.
- **Goldsworthy, G.J., Mordue, W., Guthkelch, J. 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol*, 18 (3), 545.
- **Gomes, T., J.P.Pinheiro, I.Cancio, C.G.Pereira, C.Cardoso and M.J.Bebianno. 2011.** Effects of copper nanoparticles exposure in the Mussel *MytilusGalloprovincialis*. *Environmental science and technology*. 45(1): 9356-9362.
- **Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., Bruckert, S. 1989.** Influence Of Soil On The Growth Of The Land Snail *Helix Aspersa*. An Experimental Study Of The Absorption Route For The Stimulating Factors. *J. Molluscanstud.* 55, 1–7
- **Gomot, A. 1997.** Effects Of Heavy Metals On The Development Of Snails: Heavy Metal Pollution Bioindicators For Human Health. *Bull. Acad. Natl. Med.* 181, 59–75

- **Gomot, A., *Bull. Acad. Natle.Méd . 1997.* 181. 59-75.**
- **Gomot-de Vaufleury, A & Pihan, F. 2000.** Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere*, 40(3): 275–284.
- **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.**
- **Green, M et Howman, E. 2005,** Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking, *Chemical Communications*, 121-123.
- **Guimard, N.** Utilisation de l'escargot en therapeutique : Du Limaçon A L'ha Marqueur De Tissus Métastatiques. *Histoire De La Pharmacie 6e Année.* P3.
- **Guo, W., Li, J.J., Wang, Y.A., Peng, X. 2003.** *Chem. Mater*, 15 (16), 3125-3133.

H

- **Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974.** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry.* 249: 7130-7139
- **Halliwell and Chirico S. 1993.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition.* 57, p.715-724
- **Hamdi-Ourfella, A. N., Soltani, N., *J. Mater. 2014.* Environ. Sci. 5 (S2) 2527-2533.**
- **Hardman, R. 2006.** A Toxicologic Review Of Quantum Dots: Toxicity Depends On Physicochemical And Environmental Factors. *Environ Health Persp* 114:165–172
- **Hardman, R. 2006.** A Toxicologic Review Of Quantum Dots : Toxicity Depends On Physicochemical And Environmental Factors. *Environmental Health Perspective.* 114(2) : 165-172.

- **Hass, U. 2006.** The need for developmental neurotoxicity studies in risk assessment for developmental toxicity. *Reproductive Toxicology* 22, 148–156.
- **Hayes, T.B., Anderson, L.L., Beasley, V.R., De Solla, S.R., Iguchi, T., Ingraham, H., Kestemont, P., Kniewald, J., Kniewald, Z., Langlois, V.S, Luque, E.H., Mccoy, K.A., Munoz-De-Toro, M., Oka, T., Oliveira, C.A., Orton, F., Ruby, S., Suzawa, M., Tavera-Mendoza, L.E., Trudeau, V.L., Victor-Costa, A.B., Willingham E .2011.** Demasculinization And Feminization Of Male Gonads By Atrazine: Consistent Effects Across Vertebrate Classes. *Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology* 127: 64-73
- **Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haefele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, VP., Marjuoa, Y., Parker, J., Tsui, M .2006.** Pesticide Mixtures, Endocrine Disruption, And Amphibian Declines: Are We Underestimating The Impact? *Environmental Health Perspectives* 114: 40-50.
- **He, X., Nie, X., Wang, Z., Cheng, Z., Li, K., Li, G., Hung Wong, M., Liang, X., Tsui, M.T.K. 2011.** Assessment of typical pollutants in waterborne by combining active biomonitoring and integrated biomarkers response. *Chemosphere* 84, 1422-1431.
- **Hemmer, M.J., Hemmer, B.L., Bowman, C.J., Kroll, K.J., Folmar, L.C., Marcovich, D., Høglund, M.D., Denslow, N.D .2001.** Effects Of P-Nonylphenol, Methoxychlor, And Endosulfan On Vitellogenin Induction And Expression In Sheepshead Minnow (*Cyprinodon Variegatus*). *Environmental Toxicology And Chemistry* 20: 336-343
- **Heinrichs, H., Schulz-Dobrick, B., Wedepohl, K.H. 1980.** Terrestrial Geochemistry Of Cd, Bi, Ti, Pb, Zn And Rb. *Geochimcosmochim Acta* 44: 1519-1532.
- **Hernandez, C.F., Suh, D.J., Kipple, N., Marder, R., Appl, J. 2004.** *Phys. Lett* 85, 534.
- **Hispard, F., Schuler, D., de Vauflery, A., Scheifler, R., Badot, P.-M., Dallinger, R. 2008.** Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1533–1542.
- **Hopkin, S.P. 1989.** Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. *Elsevier Applied science*, NY, USA. 366 p.

- **Huang, L., Li, D. Q., Lin, Y. J., Wei, M., Evans, D. G. & Duan X. 2005.** Journal Of Inorganic Biochemistry 99(5) 986-993.

I

- **Ishaaya, I and Horowitz, A.R. 1998.** Insecticides with novel modes of action: an overview. Ed Springer. pp: 1-24.
- **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.
- **Ivanina, A.V., Habinck, E. & Sokolova, I.M. 2008.** Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*Gmelin (*Bivalvia: Ostreidae*). Comparative Biochemistry and Physiology – C.Toxicol. Pharmacol.**148**, 72-79.

J

- **Jackson, B.P., Bugge, D., Ranville, J., Chen, C. 2012.** Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. Environ Sci Tech. 46: 5550-5556.
- **Jasso-Chavez et al. 2010.** Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*.Aquat. Toxicol.**100**, 329-338.

K

- **Karmaus, W., Brooks, K.R., Nebe, T., Witten, J., Obi-Osius, N., Kruse, H. 2005.** Immune function biomarkers in children exposed to lead and organochlorine compounds: a crosssectional study. *Environ Health* 4, 5.
- **Kauffer, F.A. 2014.** Synthèse, stabilité et toxicité de quantum dots à cœur CdSe. Thèse pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lorraine. P 102
- **Kerney, M & Cameron, R.A.D. 2006.** A Field Guide To The Land Snails Of Britain And North-West Europe,French Ed. Delachaux Et Niestlé SA, Paris
- **Kim, K.T., Klaine, S.J., Cho, J., Kim, S.H and S.D.Kim. 2010.** Oxidative stress responses of *Daphnia Magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. Science of the total environment. 408(10): 2268-2272.

- **Kirchner, C., Liedl, T., Kudera, S., Pellegrino, T., Munoz Javier, A., Gaub, HE., Stolzle, S., Fertig, N., Parak, W.J. 2005.** Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles Nano Lett 5 (2) : 331-8.
- **Klude, M., Passow, T., Heinke, H., Hommel, D. 2002.** Phys. Status Solidi B. 229, 1029.
- **Kristal, B.S., Park, B.K. & Yu, B.P. 1996.** 4-hydroxynonéal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J. Biol. Chem.* **271**, 6033-6038.

L

- **Labbe, G., Pessayre, D., Fromenty, B. 2008.** Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol*;22:335-53.
- **Labrot, F. R., D, Saint-Denis M, Narbonne JF. 1996b.** In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, 1, :21-28.
- **Ladhar, C., Geffroy, B., Cambier, S., Treguer-Delapierre, M., Durand, E., Brèthes, D., Bourdineaud, J.P. 2014.** Impact Of Dietary Cadmium Sulphide Nanoparticles On Danioreriozebrafish At Very Low Contamination Pressure. *Nanotoxicology*: 8: 676-85.
- **Ladhar-Chaabouni, R., Gargouri, R., Hamza-Chaffai, A. 2007.** effects of Cadmium on some biomarkers in the clam ruditapes decussates: metallothionein quantification by using two techniques. *Inter J Environ Pollu* 30: 593-601.
- **Laycock, I., Cotterell, K.C., O'Shea-Wheller, T.A., Cresswell, J.E. 2014.** Effects Of The Neonicotinoid Pesticide Thiamethoxam At Field-Realistic Levels On Microcolonies Of Bombus Terrestris Worker Bumble Bees. *Ecotoxicology And Environmental Safety* **100**: 153-158
- **Lecalve, D., 1989.** Influence Of Incubations Conditions Of Eggs On The 1st 6 Weeks Of The Growth Of Snails Helix Aspersa Muller (Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). *Bull. Soc. Zool. Fr. Evol. Zool.* 114, 101–110.
- **Lee, J., Ji, K., Kim, J., Park, C., Hee Lim, K., Hyun Yoon, T et Choi, K. 2009.** Acute toxicity of two CdSe/ZnSe quantum dots with different surface coating in

Daphnia magna under various light conditions. *Environmental Toxicology*. 25 : 593-600.

- **Letellier, C.** Capacité antioxydant chez les hélicidés : variations intraspécifiques et interspécifiques. Master 2 EFCE. UMR 6553, équipe S.C.A.
- **Liess, M., Schulz, R .1999.** Linking Insecticide Contamination And Population Response In An Agricultural Stream. *Environmental Toxicology And Chemistry* **18**: 1948-1955
- **Lim, Y.T., Kim, S., Nakayama, A., Stott, N.E., Bawendi, M.G., Frangioni, J.V. 2003.** Selection Of Quantum Dot Wavelengths For Biomedical Assays And Imaging. *Mol Imaging* 2:50-64.
- **Lin, C.H., Yang, M.H., Chang, L.W., Yang, C.S., Chang, H., Chang, W.H., Tsai, M.H., Wang, C.J., Lin, P. 2011.** Cd/Se/Te-Based Quantum Dot 705 Modulated Redox Homeostasis With Hepatotoxicity In Mice. *Nanotoxicology* 5:650-653.
- **London, L., Beseler, C., Bouchard, M.F., Bellinger, D.C., Colosio, C., Grandjean, P., Harari, R., Kootbodien, T., Kromhout, H., Little, F. 2012.** Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. *Neurotoxicology* 33, 887–896.
- **Lovrić, J., Cho, S.J., Winnik, F.M., Maysinger, D. 2005.** Unmodified Cadmium Telluride Quantum Dots Induce Reactive Oxygen Species Formation Leading To Multiple Organelle Damage And Cell Death. *Chembiol* 12:1227–1234.

M

- **Marasco, F et Murciano, C. 2003.** Les Escargots. Editions De Vecchi, Paris
- **Marigomez, I., Kortabitarte, M., Dussart, G.B.J. 1998.** Tissue-level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34. 167–176.
- **Marques-Pinto, A., Carvalho, D. 2013.** Human infertility: are endocrine disruptors to blame? *Endocrine connections* 2, R15–R29.
- **Massaya, M., Yoshinbu, H., Ai, Y., Maki & Yasuo O. 2002.** Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlation with susceptibility to mercury. *Journal of phycology*, 38(5): 983 - 990.
- **Matsumura, N., Endo, H., Saraie, J. 2002.** *Phys. Statussolidi B.* 229, 1039.

- **Maysinger, D., Lovric, J., Eisenberg, A., Savica, R. 2007.** Fate Of Micelles And Quantum Dots In Cells. *Eur J Pharm Biopharm* 65:270–281.
- **McBride, H.M., Neuspiel, M. &Wasiak, S. 2006.** Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.*16(14), R551-R560.
- **Merzendorfer, H., Zimoch, L. 2003.** Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393–4412.
- **Merzendorfer, H. 2006.** Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 176, 1–15.
- **Merzendorfer, H. 2011.** The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 759–769.
- **Mnif, W., Hassine, A.I.H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., Roig, B. 2011.** Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *International journal of environmental research and public health* 8, 2265–2303.
- **Molnár, G., Salánki, J., Kiss, T., Brain Res. 2004.** 1008. 205-211.
- **Müller, O.F. 1774.** *Vermium terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succincta historia. Volumen alterum.* - pp. I-XXXVI [= 1-36], 1-214, [1-10]. *Havnia & Lipsia.* Heineck et Faber, p. 59.
- **Mullins, J.K., Loeb, S. 2012.** Environmental exposures and prostate cancer, in: *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* pp. 216–219.

N

- **Nicolaus, L.K & Lee, H.S. 1999.** Low Acute Exposure To Organophosphate Produces Long-Term Changes In Bird Feeding Behavior. *Ecological Applications* **9**: 1039-1049
- **Nocera, J.J., Blais, J.M., Beresford, D.V., Finity, L.K., Grooms, C., Kimpe, L.E., Kyser, K., Michelutti, N., Reudink, M.W., Smol, J.P. 2012.** Historical Pesticide Applications Coincided With An Altered Diet Of Aerially Foraging Insectivorous Chimney Swifts. *Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences* **279**: 3114-3120.
- **Nordkap, L., Joensen, U.N., Blomberg Jensen, M., Jørgensen, N. 2012.** Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. *Molecular and cellular endocrinology* 355, 221–230.

P

- **Pain-Devin , S., Garaud , M., Couleau ,N., Andreï, J., Bennisroune , A., Cossu-Leguille, C., Felten , V., Pagnout , C., Giambérini, L. 2013.** Nanoparticules : Comment Evaluer Leurs Effets Potentiels Sur Les Milieux Aquatiques ?. Colloque De La Société D'écotoxicologie Fondamentale Et Appliquée. 3 et 4 juillet – Thionville.
- **Pal, S., Tak, Y. K. & Song, J. M. 2007.** Applied And Environmental Microbiology 73(6) 1712-1720
- **Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C. 2005.** Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venic Lagoon (Italy).Mar.Pollut. Bull, 50, 1548-15557.
- **Pan, J.F., P.E.Buffet, L.Poirier, C.Amirad-Triquet, D.Gilliland, Y.Joubert, P.Pilet, M.Guibbolini, C.Risso de Faverney, M.Roméo, E.Valsami-Jones and C.Mouneyrac. 2012.** Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate : the Tellinid clam *Scorbicularia Plana*. Environmental pollution. 168:37-43
- **Parak, W.J., Pellegrino, T., Plank, C. 2005.** Labelling of cells with quantum dots Nanotechnol, 16(2), R9-R25.
- **Parrón, T., Requena, M., Hernández, A.F., Alarcón, R., 2011.** Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and applied pharmacology* 256, 379–385.
- **Paul, J And Lyons, L. 2008.** Nanotechnology : The Next Challenge For Organics. Journal Of Organic Systems. 3(1) : 1-22.
- **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.
- **Pellegrino, T., Kudera, S., Liedl, T., Munoz Javier, A., Manna, L., Parak, W.J. 2005.** On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications.Small 1(1), 48-63.

- **Perreault, F. 2012.** Toxicité Des Nanoparticules Métalliques Chez Différents Modèles Biologiques. Thèse Présentée Comme Exigence Partielle Du Doctorat En Sciences De L'environnement. Université Du Québec A Montréal.
- **Phuong Nguyen. 2005.** Confinements non usuels dans les boîtes quantiques semiconductrices. Thèse De Doctorat, Université Paris VI.
- **Pinot, F., Kreps, S.E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., Polla, B.S. 2000.** Cadmium in the environment: Sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Reviews on Environmental Health* 15, 299-323.

R

- **Radwan, M.A., El-Gendy, K.S., Gad, A.F. 2010.** Biomarkers of oxidative stress in the landsnail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*. 79 (1): 40-46.
- **Radwan, M.A., Salama, A.K. 1999.** Thiodicarb biotransformation to methyl, toxicities and acetylcholinesterase inhibition in the land snail, *Helix aspersa* (Muller). *The Journal of Pest Control and Environmental Science*. 7: 59-70.
- **Radwan, M.A., EL-Wakil, H.B. & Osman, K.A., 1992.** Toxicity and biochemical impact of certain oxime carbamate pesticides against terrestrial snail, *Theba pisana* (Muller). *J. Environ. Sci. Health.*, **27 (6)**: 759-773.
- **Radwan, M.A. & Mohamed, M.S. 2013.** Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environm. Saf.*, **95**: 91-97.
- **Rajkumar, J. S. I & John Milton, M.C. 2011.** Biochemical changes induced by cadmium, copper, lead and zinc exposure to *Perna viridis* under long term toxicity test. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **2 (3)** : 50-59.
- **Rauh, V., Arunajadai, S., Horton, M., Perera, F., Hoepner, L., Barr, D.B., Whyatt, R. 2011.** Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environmental health perspectives* 119, 1196.
- **Reddy, P.S., Fingerman, M. 1995.** Effect Of Cadmium Chloride On Physiological Color Changes Of The Fiddler Crab, *Uca Pugilator*. *Ecotoxicology And Environmental Safety* 31, 69-75.

- **Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F. 2006.** Use Of The Land Snail *Helix Aspersa* As Sentinel Organism For Monitoring Ecotoxicologic Effects Of Urban Pollution: An Integrated Approach. *Environ. Health Perspect.* 114, 63–69
- **Reichrtová, E., Ciznár, P., Prachar, V., Palkovicová, L., Veningerová, M. 1999.** Cord serum immunoglobulin E related to the environmental contamination of human placentas with organochlorine compounds. *Environ. Health Perspect.* 107, 895–899.
- **Reinecke, S.A & Reinecke A.J. 2007.** Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 66: 92-101.
- **Ribas-Fitó, N., Torrent, M., Carrizo, D., Muñoz-Ortiz, L., Júlvez, J., Grimalt, J.O., Sunyer, J. 2006.** In utero exposure to background concentrations of DDT and cognitive functioning among preschoolers. *American journal of epidemiology* 164, 955–962.
- **Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B. 2000.** Mysids And Trace Metals: Disruption Of Swimming As A Behavioural Indicator Of Environmental Contamination. *Marine Environmental Research* 50, 107-112
- **Rouabhi, R., Djebbar, H. & Djebbar, M.R. 2006.** Toxicity evaluation of flucycloxuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium sp.* *Afr. J. Biotechnol.*5(1), 045-048.
- **Rouabhi, R., Djebbar, H. & Djebbar, M.R. 2009.** Toxic Effects of Combined Molecule from Novaluron and Diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. *Am-Euras. J. Toxicol. Sci.*1(2), 74-80.
- **Rouabhi, R., Djebbar-Berrebah, H & Djebbar, M.R. 2006.** Toxic Effect of a Pesticide, Diflubenzuron on Freshwater Macroinvertebrate (*Tetrahymena pyriformis*). *Chinese J. Appl. Environ. Biol.*12(4), 514-517.

S

- **Salama, A.K., Osman, K.A., Saber, N.A., Soliman, S.A. 2005.** Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 8: 92-96.

- **Salameh, P., Waked, M., Baldi, I., Brochard, P., Saleh, B.A. 2006a.** Respiratory diseases and pesticide exposure: a case-control study in Lebanon. *J Epidemiol Community Health* 60, 256–261.
- **Salameh, P.R., Waked, M., Baldi, I., Brochard, P., Saleh, B.A. 2006b.** Chronic bronchitis and pesticide exposure: a case-control study in Lebanon. *Eur. J. Epidemiol.* 21, 681–688.
- **Sanders, M.B., Sebire, M., Sturve, J., Christian, P., Katsiadaki, I., Lyons, B.P., Sheahan, D., Weeks, J.M., Feist, S.W. 2008.** Exposure Of Sticklebacks (*Gasterosteusaculeatus*) To Cadmium Sulfide Nanoparticles: Biological Effects And The Importance Of Experimental Design. *Mar Environ Res* 66:161-163
- **Sandrine, Sylvie Et Luisette Pirame. 2003.** Contribution A L'étude De La Pathologie Estivale De L'escargot Petit-Gris (*Helixaspersa*) : Reproduction Expérimentale. *Ecolenationalevétérinaire*. Toulouse. Pp 15-25.
- **Sass, J. 2007.** Nanotechnology's Invisible Threat: Small Science Big Consequences. NRDC Issue Paper. Natural Resources Defense Council, New York, NY, USA.
- **Saiyed, H., Dewan, A., Bhatnagar, V., Shenoy, U., Shenoy, R., Rajmohan, H., Patel, K., Kashyap, R., Kulkarni, P., Rajan, B. 2003.** Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environmental Health Perspectives* 111, 1958.
- **Sbartai, I et al. 2009.** Behavior of *Paramecium sp.* treated with bifenazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci*1,13-18.
- **Scheifler, R., Gomot-De Vaufleury, A., Badot, P.-M. 2002a.** Transfer Of Cadmium From Plant Leaves And Vegetable Flour To The Snail *Helix Aspersa*: Bioaccumulation And Effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 148–153.
- **Scheifler, R., Gomot-De Vaufleury, A., Toussaint, M.L., Badot, P.-M. 2002b.** Transfer And Effects Of Cadmium In An Experimental Food Chain Involving The Snail *Helix Aspersa* And The Predatory Carabid Beetle *Chrysocarabussplendens*. *Chemosphere* 48, 571–579.
- **Schmidt, G. H. & Ibrahim, N. M. M. 1994.** Heavy metalscontent (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) in various body parts: impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adultes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 29: 149-164.

- **Schulz, R., Liess, M. 1999.** A Field Study Of The Effects Of Agriculturally Derived Insecticide Input On Stream Macroinvertebrate Dynamics. *Aquatic Toxicology* **46**: 155-176
- **Schulz, R & Liess M. 1995.** Chronic Effects Of Low Insecticide Concentrations On Fresh-Water Caddisfly Larvae. *Hydrobiologia* **299**: 103-113
- **Shiohara, A., Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K., Yamamoto, K. 2004.** On the cytotoxicity caused by quantum dots. *MicrobiolImmunol* 48 (9) : 669-75.
- **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.
- **Simonet, B And Valcarcel, M. 2009.** Monitoring Nanoparticles In The Environment. *Analytical And Bioanalyticalchemistry*. 393(1) : 17-21
- **Siwela, A. H., Nyathi, C. B., Naik, Y. S. 2010.** A comparison of metal levels and antioxidant enzymes in freshwater snails, *Lymnaeanatalensis*, exposed to sediment and water collected from Wright Dam and Lower Mguza Dam, Bulawayo, Zimbabwe. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 73(7): 1728-32.
- **Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, G.H., Hagen, T.M. 2004.** Lipoic acid as a potentiel therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr.med.Chem*, 11 : 1135-1146.
- **Sommer, C., Jensen, KMV., Jespersen, J.B. 2001.** Topical Treatment Of Calves With Synthetic Pyrethroids: Effects On The Non-Target Dung Fly *Neomyia Cornicina* (Diptera : Muscidae). *Bulletin Of Entomological Research* **91**: 131-137.
- **Sparks, T.C., 2013.** Insecticide discovery: An evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 8–17.
- **Stephen, F. 2005.** Novaluron. Health effects division. US Environmental protection Agency. pp : 797-871.
- **Sterling, K.M., Mandal, P.K., Roggenbeck, B.A., Ahearn, S.E., Gerencser, G.A., Ahearn, G.A. 2007.** Heavy metal detoxification in crustacean epithelial lysosomes: Role of anions in the compartmentalization process. *Journal of Experimental Biology* 210, 3484-3493.
- **Sunyer, J., Garcia-Esteban, R., Alvarez, M., Guxens, M., Goñi, F., Basterrechea, M., Vrijheid, M., Guerra, S., Antó, J.M. 2010.** DDE in mothers' blood during

pregnancy and lower respiratory tract infections in their infants. *Epidemiology* 21, 729–735.

T

- **Thany, S.T., Reynier, P., Lenaers G. 2013.** Neurotoxicité des pesticides: quel impact sur les maladies neurodégénératives? *Med Sci.* 29, 273-278
- **Tom lin, C. D.S. 1997.** Novaluron. Ed Bristish crop protection council. pp : 888-889.
- **Triboulet, S. 2013.** Etude Des Effets De Deux Types De Nanoparticules Métalliques Sur Des Macrophages Murins Par Une Approche Protéomique. THÈSE Pour Obtenir Le Grade De DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE. France. P 25.
- **Tunaz, H & Uygun, N. 2004.** Insect growth regulators for insect pest control. *Turk J Agric For* 28, 377–387.
- **Turner, M.C., Wigle, D.T., Krewski, D. 2011.** Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Ciência & Saúde Coletiva* 16, 1915–1931.

U

- **Untersteiner, H., Gretschel, G., Puchner, T., Napetschnig, S., Kaiser, H. 2005.** Monitoring Behavioral Responses To The Heavy Metal Cadmium In The Marine Shrimp *Hippolyte Inermisleach* (Crustacea: Decapoda) With Video Imaging. *Zoological Studies* 44, 71-80.
- **U. S. EPA. 2009.** Office Of Prevention, Pesticides And Toxic Substances, United States. 2001 B. Pesticide Factsheet. Novaluron, 4 P. En Ligne [Www.Epa.Gov/Opprdo01/factsheets/Novalmon.Pdf](http://www.epa.gov/opprdo01/factsheets/Novalmon.pdf), Consulté : Novembre 2009.
- **Uthana, S., Reddy, P. J. 1981.** *Phys. Status Solidi A*.65, 269.

V

- **Van Der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J-M., Belzunces, L.P. 2013.** Neonicotinoids, Bee Disorders And The Sustainability Of Pollinator Services. *Current Opinion In Environmental Sustainability* 5: 293-305

- **Van Iersel, S., Swart, E. M., Nakadera, Y., Van Straalen, N. M., Koene, J. M. 2014.** Effect Of Male Accessory Gland Products On Egg Laying In Gastropod Molluscs. *J. Vis. Exp.* (88), E51698, Doi:10.3791/51698.
- **Verlecar, X.N., Jena, K.B & Chainy, G.B.N. 2008.** Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures, *Chemos.*, **71**: 1977-1985.
- **Vega-Villa, K.R et al. 2008.** Clinical Toxicities Of Nanocarrier Systems. *Adv Drug Delivrev.* 60(8): P. 929-38.
- **Voltz, M., Alix, A., Barriuso Benito, E., Bedos, C., Bonicelli, B., Caquet, T., Dubus, I., Gascuel, C., Gril, J-J. 2005.** Devenir Et Transfert Des Pesticides Dans L'environnement Et Impacts Biologiques Pesticides, Agriculture Et Environnement. Réduire L'utilisation Des Pesticides Et En Limiter Les Impacts Environnementaux 219pp.

W

- **Wang, L., Yang, X., Wang, Q., Wang, D.-X. 2001.** The accumulation of Cd²⁺ and the effect of EST in five tissues and organs of *Eriocheir sinensis*. *Acta Zoologica Sinica.* 47, 96-100.
- **Wang, Z., Zhao, J., Li, F., Gao, D and Xing, B. 2009.** Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere.*77(1): 67-73.
- **Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S. & Rao, K.M.K. 2004.** Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biol. Med.*36, 1434-1443.
- **Waldau, R.J., Stucheli, N., Braun, M., Steiner, M.L., Bucher, E., Tenne, R., Flaisher, H., Kerfin, W., Braun, R And Koschel, W . 1988.** *APPL. Phys.* 64, 2601.
- **Weckbecker G., Cory J.G., 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 1210 cells in vitro. *Cancer Letters.* 40: 257 264.
- **WHO. 2005.** Report of the eight WHOPES working group meeting. 10 p.
- **Wohlfahrt, J. 2008.** Développement D'un Indicateur D'exposition Des Eaux De Surface Aux Pertes De Pesticides A L'échelle Du Bassin Versant. Thèse De Doctorat. UMR Nancy-Université - INRA Agronomie Et Environnement Nancy-Colmar.

- **Won, E.J., Kim, R.O., Rhee, J.S., Park, G.S., Lee, J., Shin, K.H., Lee, Y.M. & Lee, J.S., 2011.** Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **154**: 82–92
- **Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K.N., Treadway, J.A., Peter, J. 2003.** LARSON, Nianfeng. GE, Frank. PEALE, Marcel P. BRUCHEZ, *Nature Biotechnol*, 21(1)41-46.

Z

- **Zhang J., Wang X., Xiao M., Qu L., Peng X. 2002.** Lattice contraction in freestanding CdSe nanocrystals: 2076-2078.
- **Zhao, J., Wang, Z., Liu, X., Xie, X., Zhang, K and Xing, B. 2011.** Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*CyprinusCarpio*) and their potential toxicity. *Journal of hazaradousmaterials*. 197(0): 304-310.
- **Zhu, Y., Chang, Y., Chen, Y .S. 2010.** Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*
- **Zeyons, O. 2008.** Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. Thèse de doctorat de l'université Paris VI - Pierre et Marie Curie. France. P13.

Annexes

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

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

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

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

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

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

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

Annexe 2 : Production scientifique (Publications et communications)

Publications internationales (1)

Salmi A., Rouabhi R., Toualbia N., Chnikher H., Taib C., Guesmi S & Boussekine S (2017). Subcellular Study of the Cadmium Selenide Nanoparticles (CdSe – NPs) Toxicity on a Terrestrial bioindicator Model *Helix aspersa*. *Toxicol. Environ. Health. Sci* , 9(2) : 135-140.

Communications internationales (3)

Salmi A., Rouabhi R., Toualbia N., Chnikher H., Taib C et Guesmi S. Etude subcellulaire de la toxicité de Séléniure de Cadmium (CdSe) sur un modèle d'écosystème terrestre *Helix aspersa*. Journées internationales de biotechnologie (JIB 2016) Tunisie. Sousse 18-22 Décembre 2016.

Salmi A., Rouabhi R., Toualbia N., Chnikher H., Taib C et Guesmi S. 6^{ème} Journées scientifiques de l'association tunisienne de toxicologie Tunisie. Tabarka 21-23 Janvier 2017.

Salmi A., Rouabhi R., Toualbia N., Chnikher H., Taib C et Boussekine S. Caractérisation morphophysiologique de la toxicité du Novaluron sur l'escargot *Helix aspersa*. 28^{ème} Journées internationales des sciences biologiques (ATSB) Tunisie. Hammamet 21-24 Mars 2017.

Salmi A., Toualbia N et Rouabhi R. Study of the toxicity of Cadmium Selenide Nanoparticles (CdSe – NPs) on a Terrestrial ecosystem Model *Helix aspersa*. The 1st Euro- Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI). Sousse. Tunisia. 22-25 Novembre 2017.

Communications nationales (2)

Salmi A., Rouabhi R., Toualbia N., Chnikher H., Taib C et Guesmi S. Etude de la toxicité de Novaluron sur un modèle bioindicateur *Helix aspersa*. Le premier séminaire national de Biologie, Santé et Stress Oxydant. Tebessa 09-10 Novembre 2016.

Salmi A., Rouabhi R., Toualbia N., Chnikher H., Taib C et Guesmi S. Etude de la toxicité de Séléniure de Cadmium (CdSe) sur un modèle bioindicateur *Helix aspersa*. Le premier colloque international en « Toxicologie et santé ». Guelma 28-29 Novembre 2016.

Subcellular Study of the Cadmium Selenide Nanoparticles (CdSe-NPs) Toxicity on a Terrestrial Bioindicator Model *Helix aspersa*

Aya Salmi¹, Rachid Rouabhi¹, Nadjiba Toualbia¹,
Chahinez Taib¹, Hadjer Chenikher¹, Salim Gasmri¹
& Samira Boussekine¹

¹Applied Biology Department, Tebessa University, 12000, Tebessa, Algeria

Correspondence and requests for materials should be addressed to R. Rouabhi (r_rouabhi@yahoo.fr)

Received 17 February 2017 / Received in revised form 29 March 2017
Accepted 4 April 2017

DOI 10.1007/s13530-017-0314-4

©The Korean Society of Environmental Risk Assessment and Health Science and Springer 2017

pISSN : 2005-9752 / eISSN : 2233-7784

Toxicol. Environ. Health. Sci. Vol. 9(2), 135-140, 2017

Abstract

Development of nanomaterials and their use on an industrial scale have been booming over the last decade. Indeed, the physicochemical properties of these materials allow their use for various applications, ranging from the manufacture of food products or cosmetics, to the development of tools for electronics or the biomedical sciences. The aim of this work was to study the effects of CdSe on the general redox state of hepatopancreas of the snail *Helix aspersa* and to evaluate the effect of this nanomaterial on mitochondrial swelling and respiration. Our results show an increase in the activity of the antioxidant enzymes of mitochondria (GST, Catalase, MDA) and a decrease in GSH and GPx level in mitochondrial hepatopancreas. Thus, we showed an increase in mitochondrial swelling with a decrease in respiratory level. Finally, our study suggested that mitochondrial dysfunction and oxidative stress were high in the digestive gland of snails treated with 3.6 and 7.2 $\mu\text{g/g/2day}$.

Keywords: CdSe, *Helix aspersa*, Redox state, Mitochondrial swelling, Respiration, GST, GSH, CAT, GPx

Introduction

Manufactured nanomaterials have new physicochem-

ical properties which allow their use in a large number of food or cosmetic products, the development of tools for electronics or the biomedical sciences¹. However, the increasing use of such materials raises today public health issues. Indeed, the interactions of nanoparticles with biological systems, and their potential toxicity, are at present poorly understood. The industrial use of nanoparticles also leads to the production of wastes whose release into the environment could prove difficult to control and whose consequences are for the moment not well known².

Recent development of nanotechnology will expand the sources of pollution with the increased production of manufactured nanomaterials. There are different sources of production of nanoparticles: natural sources (fires, volcanic eruption...), accidental sources (wood fires, vehicle exhaust, braking...) and industrial sources (nanoparticles manufactured by man)³.

More and more studies are being carried in order to better understand and better master the properties, behavior and risks related to nanoparticles. These include evaluating the toxicity of nanoparticles of varying nature on different models in vivo or in vitro. Most studies carried in vitro show that most metallic nanoparticles induce an increase in the rate of cellular mortality, associated mainly with DNA damage, and a production of reactive oxygen species (ROS).

Of all the types of nanomaterials available, our study was restricted to one type of nanoparticles namely cadmium nanoparticles (CdSe) for their importance in the current development of nanotechnologies.

Results

The results are expressed by the mean \pm (standard deviation) of n experiments. The differences are considered: significant when $P \leq 0.05$, very highly significant when $P \leq 0.001$, highly significant when $P \leq 0.01$.

Discussion

Mitochondria is the site of cellular respiration, oxidative phosphorylation and production of ATP (the

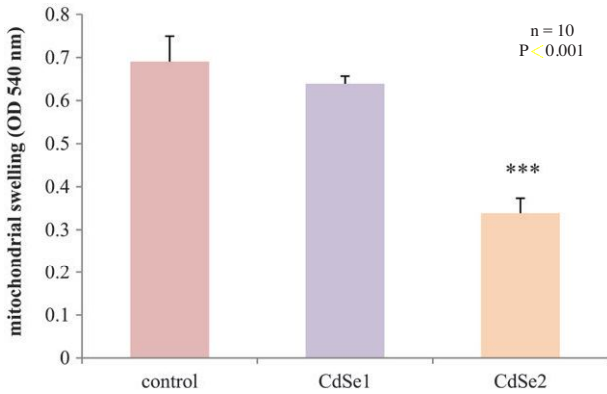


Figure 1. Effect of CdSe on *Helix aspersa* mitochondrial swelling (OD_{540nm}) after 90 days of treatment (P < 0.001).

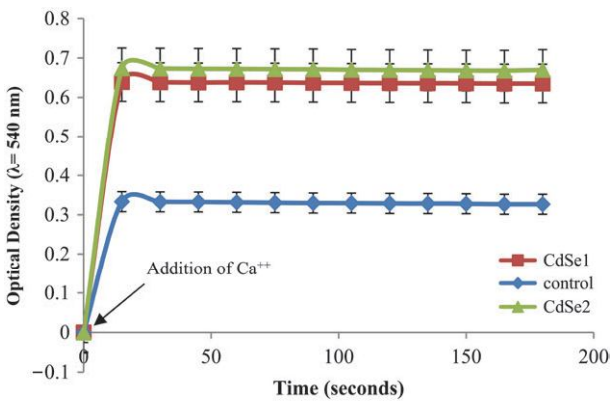


Figure 2. Effect of CdSe-NPs on mitochondrial permeability (OD: λ_{540nm}) after 90 days.

main energy source for the cell⁴.

In the absence of data on the effect of CdSe on respiratory metabolism, work on this aspect demonstrated an inhibition of cellular respiration in the presence of xenobiotics by perturbation of the mitochondrial respiratory chain.

Sbartai *et al.* (2009)⁵ and Benbouzide *et al.* (2012)⁶ showed inhibition of paramedic respiration in the presence of Bifenazate and Phosphoramidate. Jasso-Chavez *et al.* (2010)⁷ demonstrated a strong inhibition of mitochondrial respiration from *Euglena gracilis* treated with chromium (CR), Boulassel (2014)⁸ show that the rate of oxidation of Succinate in isolated mitochondria is inhibited by the effect of both xenobiotics.

All this work is in agreement with our results indeed we have demonstrated an inhibition of the respiratory metabolism of the snails especially to the high concentrations of CdSe. This inhibition is due to an effect on the electron transfer process at the level of the respira-

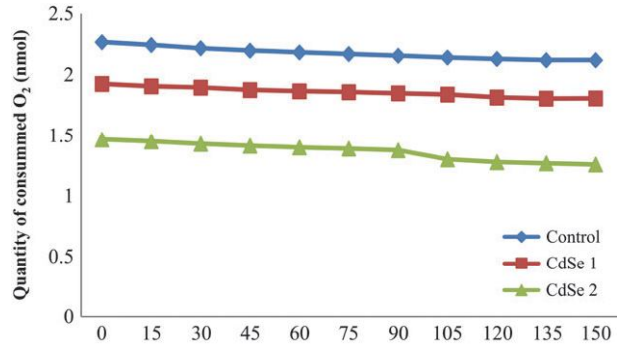


Figure 3. Effect of CdSe on mitochondrial respiration (nmol/sec) after 90 days.

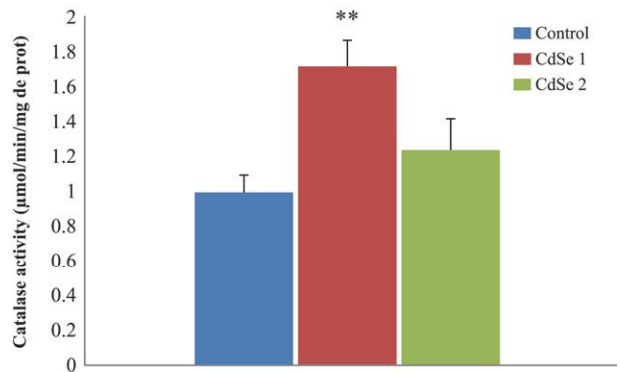


Figure 4. Effect of CdSe-NPs on the variation of stromal catalase (μM/min/mg of prot.) after 90 days.

tory chain causing the decrease in the rate of energy production leading to cell death. These results suggest free radical release at the mitochondrial level.

The other interesting parameter that we found useful to measure is the swelling of the mitochondria. This swelling can be explained by the stimulation of the membrane permeability of the treated mitochondria because some nanoparticles are able to lead to an opening of the PTPM. The main consequence of the opening of PTPMs is apoptotic cell death or necrosis as a function of the number of mitochondria involved. Chagra *et al.* (2009)⁹ observed mitochondrial swelling following treatment with cadmium in mitochondria isolated from potatoes. Our results are in perfect agreement with this work since we also demonstrated mitochondrial swelling in mitochondria treated with CdSe.

Cd may inhibit several enzymes involved in mitochondrial respiratory chain processes (Ivanina *et al.* 2008; Garceau *et al.* 2010)^{10,11}. It can bind to thiol groups of critical mitochondrial molecules and inactivate the enzymes. Wang *et al.* (2004)¹² showed that

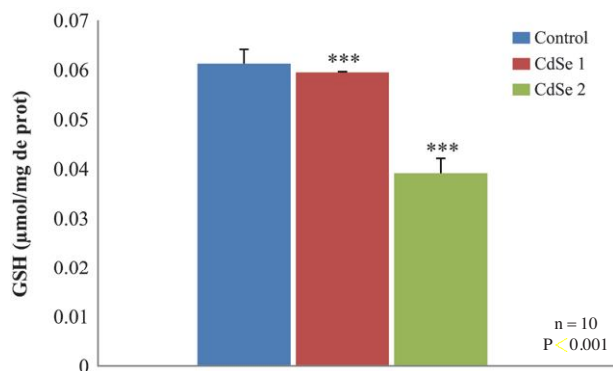


Figure 5. Variation of stromal GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ prot.) in the control and treated snails after 90 days of treatment.

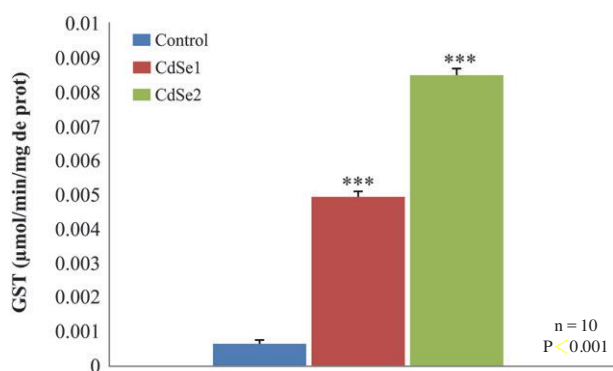


Figure 6. Effect of CdSe-NPs on the variation of stromal GST ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$) after 90 days of treatment.

complexes II and III are more sensitive to Cd inhibition than the others. In addition, the inactivation of thiol groups can generate oxidative stress, depolarization (decrease in membrane potential) and membrane permeability leading to mitochondrial dysfunction.

This work is devoted to the evaluation of the potential toxicity of CdSe through the monitoring of the evolution of certain biomarkers of toxicity such as glutathione (GSH), GST activity, catalase activity and malondialdehyde (MDA) at the level of mitochondrial hepatopancreas. Our results showed strong antioxidant enzymatic activity reflected by an increase in catalase and GST activities known for their role in detoxification of free radicals, in parallel with the decrease of GSH also excellent biomarker of toxicity. The same applies to the rate of Malondialdehyde (MDA), the increase of which accounts for lipid peroxidation. These antioxidant, enzymatic and non-enzymatic reactions provide the cell with a state of equilibrium and protection against oxidized reactive species (Van Acker and Bast. 1993)¹³. An increase in the activity of CAT

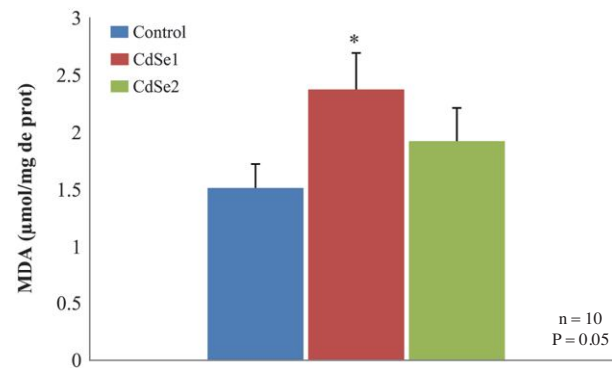


Figure 7. Variation of MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$) level in *Helix aspersa* after 90 days of treatment.

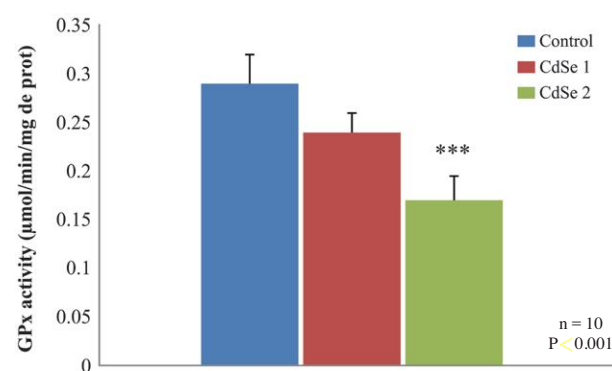


Figure 8. Effect of CdSe-NPs treatments on the variation of stromal GPx ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$) after 90 days of treatment.

and GST are observed in the digestive gland of the mold, *M. galloprovincialis*, exposed 24 h to NP TiO₂ (Canesi *et al.* 2010b)¹⁴. Our results showed an increase in GST activity and CAT activity in snails treated with CdSe nanoparticles, thus demonstrating the triggering of enzymatic defense mechanisms.

Conclusion

In this work, we are interested in the effect of CdSe nanoparticles at the subcellular scale. We have also demonstrated an inhibition of mitochondrial antioxidant enzymatic activities in the presence of high concentrations of CdSe.

Materials and Methods

Materials and Reagents

Semiconductor nanocrystals (CdSe) are objects of

size between 1 and 100 nm and formed of a few tens of thousands of atoms arranged in a crystalline order. They are produced by chemical synthesis by mixing in a solution the elements (for example cadmium and selenium atoms) which make up the semiconductor material. At temperatures of some hundred degrees, the different elements come together to start the nucleation and growth of the material.

There are several methods for obtaining CdSe nanoparticles. The synthesis of the CdSe nanocrystals was carried by standard chemical techniques in the open air. A mixture of CdO (1.8 mmol, 0.2311 g), oleic acid (OA, 6.0 mmol) and diphenyl ether (8 mL) was heated to 18°C for 2 hours. Then, a solution of 3.2 g of selenium TOP, which contains 0.32 g, 4.0 mmol of selenium, was injected very rapidly into this hot solution.

The synthesis was carried under N₂/OA flux at a given reaction time (1 h), an aliquot was removed from the reaction flask by a small syringe and was rapidly transferred in 1/2 mole with chloroform. The rapid cooling of the hot aliquot with cold chloroform stopped the growth of the nanocrystals¹⁵.

Animals (n = 10)

Helix aspersa aspersa, better known as the Garden Snail or Petit-Gris, and used in our experiments, is a pulmonary gastropod mollusk stylomatophorous belonging to the Helicidae family. Sampling of the *Helix aspersa* snail was carried at Bekkaria in the Tebessa wilaya, the farming of *Helix aspersa* snail at the cell toxicology laboratory during a period of three months. Snails are raised under the following conditions which are considered optimal: photoperiods of 18 h of light / 24 h, temperature of 20 ± 2°C, hygrometry of 80 to 95%; Feeding to wheat flour^{16,17}. The snails are distributed in transparent plastic boxes with perforated lids. Each box contains a wet sponge to maintain moisture.

Treatment of the animals was carried by injection with a micro-syringe. We retained two (2) doses and a control medium. The doses that were used were 3.6 µg/g/2days and 7.2 µg/g/2days, The control animals was injected by the distilled water.

After the treatment period, the snails are fasted for 48 hours in order to empty their digestive tract, the animals are then sacrificed by freezing at -20°C. and then dissected to remove the digestive gland.

Extraction of Mitochondria

All operations were carried on ice. cells were placed into buffer A containing 50 mM tris, 1 mM EGTA, 70 mM Sucrose, 210 mM Mannitol, pH 7.40 at +4°C. Then, the homogenate was centrifuged at 1300 g for 3

min, 4°C. The supernatant was centrifuged at 10,000 g for 10 min, 4°C to sediment mitochondria. Finally, the mitochondrial pellet was washed twice and then suspended in 50 mM Tris, 70 mM sucrose, 210 mM mannitol, pH 7.4 at +4°C. Protein content was routinely assayed with a Bradford assay using bovine serum albumin as a standard¹⁸. Mitochondria were kept on ice and used within 4 h.

Mitochondrial Respiration and Swelling Assay

According to the method of kristal *et al.* (1996)¹⁹, we carried out the estimation of the mitochondrial permeability based on the rate of traverse of Ca⁺⁺ followed by an increase in mitochondrial size detected at 540 nm wavelength for 3 minutes and each 30 second. Respiration was estimated using an Oxygraph (HAN-SATECH) according to the method described by Rouabhi *et al.* (2006, 2009)^{20,21,22}.

Dosage Methods

Activity of catalase was determined in the hepatopancreas colorimetrically according to Cakmak & Horst (1991)²³, The speed of disappearance of H₂O₂ is monitored by observing the rate of decrease in absorbance at 240 nm. The measurement of glutathione S-transferase activity (GST) was determined according to the method of Habig *et al.* (1974)²⁴, following the formation of 1-glutathione-2,4-dinitrobenzene resulting from conjugation between substrate (1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) with reduced glutathione. Reduced glutathione was determined spectrophotometrically, according to the method of Weckbecker and Cory (1988)²⁵. MDA can be detected by a colorimetric reaction with thiobarbituric acid (TBA). The MDA is assayed according to the method of Esterbauer *et al.* (1992)²⁶. The enzyme activity of glutathione peroxidase was evaluated by the method of Flohe and Günzler (1984)²⁷ using H₂O₂ as substrate.

Statistical Analysis

Significant differences between the control and the treated groups were determined by the Student's *t*-test. Statistical calculations were carried out using Minitab 17.1 statistical package and the Excel 16.0 (Microsoft, Inc.).

Acknowledgements

first, my thanks are addressed to DGRSDT of Algeria and Prof. Said Fekra the rector of Tebessa university for their support. This work was achieved in the laboratory of toxicology at applied biology department,

Tebessa university which I address my gratitude to all personals.

Funding

All funding is personal.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Ethical Approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of Rats were followed.

References

1. Bigorgne, E. Ecotoxicity of nanoparticles and by-products of alteration of titanium dioxide on the earthworm, *Eisenia fetida*. Doctorate thesis. Paul Verlaine-Metz University. P2 (2011).
2. Triboulet, S. Study of the effects of two types of metallic nanoparticles on murine macrophages by a proteomic approach. Doctorate thesis. Grenoble University. P:25 (2013).
3. Baratli, Y. Study of the toxicity of iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) in the rat, mitochondrial analyzes and oxidative stress. Doctoral thesis. University of Strasbourg and University of Carthage (2015).
4. McBride, H. M., Neuspiel, M. & Wasiak, S. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.* **16**, R551-R560 (2006).
5. Sbartai, I. *et al.* Behavior of *Paramecium* sp. treated with bifentazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci.* **1**, 13-18 (2009).
6. Benbouzid, H., Berrebbah, H., Berredjem, M. & Djebbar, M. R. Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium* sp. With special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicol. & Environ. Chem.* **94**, 557-565 (2012).
7. Jasso-Chávez, R. *et al.* Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. *Aquat. Toxicol.* **100**, 329-338 (2010).
8. Boulassel, A. Evaluation of the toxicity of two drugs: Paracetamol and Ibuprofen, on a cellular model: *Paramecium tetraurelia*. Test on the subcellular scale. Doctorate thesis. Université Badji Mokhtar de Annaba (2014).
9. Chagra, A., Djebbar, M. R., Rouabhi, R. & Berrebbah, H. Cadmium Induced Changes in Metabolic Function of Mitochondrial Isolated from Potato Tissue (*Solanum tuberosum* L.). *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **5**, 35-39 (2009).
10. Ivanina, A. V., Habinck, E. & Sokolova, I. M. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - C. Toxicol. Pharmacol.* **148**, 72-79 (2008).
11. Garceau, N., Pichaud, N. & Couture, P. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquat. Toxicol.* **98**, 107-112 (2010).
12. Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S. & Rao, K. M. K. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 1434-1443 (2004).
13. Acker, V., Koymans, L. M. H. & Bast, A. Molecular pharmacological importance of vitamin E, structural aspects of NADP. *Free Radic. Biol. Med.* **5**, 311-328 (1993).
14. Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M. & Gallo, G. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* **46**, 67-76 (2010).
15. Phuong Nguyen, D. Thèse de doctorat. université Paris VI (2005).
16. Coeurdassier, M. *et al.* The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 1951-1957 (2001).
17. Gomot, A. Effects of heavy metals on the development of snails. Use of snails as bio-indicators of heavy metal pollution for the preservation of human health. *Bull. Acad. Natle. Medicine.* **181**, 59-75 (1997).
18. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
19. Kristal, B. S., Park, B. K. & Yu, B. P. 4-hydroxynonéal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J. Biol. Chem.* **271**, 6033-6038 (1996).
20. Rouabhi, R., Djebbar, H. & Djebbar, M. R. Toxicity evaluation of flucycloxuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium* sp. *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 045-048 (2006).
21. Rouabhi, R., Djebbar, H. & Djebbar, M. R. Toxic Effects of Combined Molecule from Novaluron and Diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. *Am-Euras. J. Toxicol. Sci.* **1**, 74-80 (2009).
22. Rouabhi, R., Djebbar-Berrebbah, H. & Djebbar, M. R. Toxic Effect of a Pesticide, Diflubenzuron on Freshwater Macroinvertebrate (*Tetrahymena pyriformis*). *Chinese J. Appl. Environ. Biol.* **12**, 514-517 (2006).
23. Cakmak, I. & Horst, W. J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*).

- Physiol. Plantarum*. **83**, 463-468 (1991).
24. Habig, H., Pabst, M. J. & Jokoby, W. B. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139 (1974).
25. Weckbker, G. & Cory, J. G. Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett.* **40**, 257-264 (1988).
26. Esterbaer, H., Gebicki, J., Puhl, H. & Jungens, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* **13**, 341 (1992).
27. Flohe, L. & Gunzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, 114-121 (1984).