



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la
Vie

Département : Biologie Appliquée

MEMOIRE de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Toxicologie

L'étude des effets toxiques et protecteurs des nanoparticules métalliques

Présenté par :

Meme: HADDAD Oumnia

Meme: RECHEDEDDINE Manel

Devant le jury :

HAMEL Mahdia	Pr. Université de Tébessa	Président
BOUADILA Soulef	Dr. Université de Tébessa	Examinatrice
BENAMARA Amel	M.C.B. Université de Tébessa	Promoteur

Date de soutenance : 06/06/2021

Note :

Mention

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



REMERCIEMENT

Un grand Merci à (aux)...

Dieu pour tous les bienfaits qu'Il nous accordé et pour le courage qu'il nous a attribué afin de compléter ce travail.

On remercie aussi nous parents pour leur soutien morale et matériel pendant toute notre vie et surtout durant nos études.

De simples remerciements ne sont pas suffisants pour exprimer toute notre reconnaissance envers nos directeurs de mémoire : Mme. BENAMARA, Amel une maitresse assistante a l'université de Tébessa. A la fierté et à la chance d'avoir été votre encadrement.
Merci.

A Mme HAMEL, Mahdia et Mme BOUADILA Soulef merci pour avoir pris sur son temps et accepter d'examiner ce travail et participer à ce jury.

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

DÉDICACE

Avec l'aide du dieu tout puissant, tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance envers les personnes les plus importantes pour moi, je dédie ce travail

À celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce travail : mon mari et l'homme de ma vie « Gasmî Med Islem » pour sa patience et sa présence, ses conseils depuis que je le connais, mais surtout en cette période de fin de mémoire. Celui qui ne se lasse pas de m'écouter sans arrêt et me traite comme une reine.

À Celles qui sont ma vie mes chères mères « Aïcha, Yasmine » aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon bien être Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que vos bénédictions m'accompagne toujours.

A mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir à toi mon deuxième papa « Atmania Cherif » mon meilleur exemple dans la vie, pour tes prières pour tous tes encouragements, tes déplacements, ton inquiétude, ta présence si spéciale dans ma vie.

À ce qu'est toujours dans la vie mon héros mon cher père « Nacereddine » pour les sacrifices qu'il a consentis pour mon avenir et pour son soutien moral, son encouragement, et sa générosité sans limites et qu'il n'a cessé d'offrir.

À mon cher frère « Zakaria », je veux te dire loin des yeux près du cœur, ainsi que « Mohamed ali » et sa belle femme « Aïcha » et mon petit et joli neveu « Skander » qui ont été toujours prêts à me renforcer et me donner l'espoir, ceux qui ont partagé mes meilleurs moments ainsi que mes pires moments. « Que dieu vous accorde le succès ».

À ma petite sœur chérie « Nourane » je voudrais t'exprimer à travers ces quelques lignes tout l'amour et toute l'affection que j'ai pour toi. Je t'aime petite sœur !

À mes oncles Ali et Ammar et leur famille.

A tous mes proches et amies, à Chaima, Ines, Amna, Chifa, et tous ceux que je porte dans mon cœur. À tous mes amis et camarades de promotion 2019 - 2021 de toxicologie pour leurs présence, leurs beaux moments passés ensemble, pour tous ces foux rires que je n'oublierai jamais.

Oumnia

Résumé

Les nanoparticules (NPs) sont largement répandues dans de nombreux domaines d'utilisation grâce à leurs propriétés physico-chimiques pour cette raison il est essentiel de connaître leur impact négatif sur la santé humaine et l'environnement.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la toxicité d'une molécule nanométrique à base d'oxyde de fer Fe_2O_3 , administré par voie digestive à des concentrations croissantes (500, 1000, 5000, 10000, 150000 $\mu\text{g/g}$ de farine) pendant 28 jours chez un organisme bio-accumulateur et bio-indicateur de pollution de l'environnement dans la science de l'écotoxicologie *Helix aspersa* qui est en contact direct avec l'environnement et l'homme

Les résultats obtenus montrent que la présence des nanoparticules métalliques à base de Fe_2O_3 provoquait des modifications métaboliques qui se traduit par une augmentation significative à hautement significative du taux de protéines totales, ainsi qu'une diminution significative à hautement significative des taux des lipides et des glucides (dose dépendante) au niveau de l'hémolymphe des escargots traités par les fortes doses par rapport aux témoins.

Mots clés : Nanoparticules, Oxyde de Fer, *Helix Aspersa*, Ecotoxicologie, Biomarqueurs, Protéines, Lipides, Glucides.

Abstract

Nanoparticles (NPs) are widely used in many fields of use thanks to their physicochemical properties for this reason it is essential to know their negative impact on human health and the environment.

In this study we were interested in the evaluation of the toxicity of a nanometric molecule based on iron oxide Fe_2O_3 , administered by the digestive route at increasing concentrations (500, 1000, 5000, 10,000, 150,000 $\mu\text{g} / \text{g}$ flour) for 28 days in a bio-accumulator organism and bio-indicator of environmental pollution in the science of ecotoxicology *Helix aspersa* which is in direct contact with the environment and man

The results obtained show that the presence of metallic nanoparticles based on Fe_2O_3 , caused metabolic modifications which results in a significant to highly significant increase in the level of total proteins, as well as a significant to highly significant decrease in the levels of lipids and carbohydrates (dose dependent) in the hemolymph of snails treated with high doses compared to controls.

Keywords:

Nanoparticles, iron oxide Fe_2O_3 , *Helix aspersa*, ecotoxicology, biomarkers, proteins, lipids, carbohydrates.

ملخص:

تستخدم الجسيمات النانوية (NPs) على نطاق واسع في العديد من المجالات بفضل خصائصها الفيزيائية و الكيميائية و لهذا السبب من الضروري معرفة تأثيرها السلبي على صحة الإنسان و البيئة

من خلال عملنا ركزنا على تأثير الجسيمات النانوية المعدنية أكسيد الحديد Fe_2O_3 بإستعمال جرعات مختلفة (500-1000-5000-10000-150000 ميكروغرام لدقيق القمح). لمدة 28 يوما على أبرز نوع من أنواع المؤشرات البيولوجية و التراكمية في علم السمية الإيكولوجية حلزون الأرض *Helix aspersa* و الذي هو في إتصال مباشر مع البيئة و الإنسان

أظهرت النتائج أن وجود الجسيمات النانوية المعدنية أكسيد الحديد Fe_2O_3 يؤدي إلى تغيرات أيضية على مستوى الدم بزيادة في محتوى البروتين و انخفاض في مستوى الدهون و الكربوهيدرات باختلاف الجرعات .

الكلمات المفتاحية :

علم السمية الايكولوجية, المؤشرات البيولوجية, Fe_2O_3 , *Helix aspersa*, الجسيمات النانوية, أكسيد الحديد البروتين, الدهون, الكربوهيدرات

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
ملخص	
Abstract	
Résumé	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

I. Généralité	3
I.1. Classification et propriétés des NPs	3
I.2. Types de nanoparticules et domaines d'utilisation	4
I.3. TOXICITE DES NANOPARTICULES : LE « RISQUE NANO »	5
I.3.1. Nanotoxicologie et éconanotoxicologie	5
I.3.2. Modes et voies d'exposition	6
I.3.3. Propriétés des nanoparticules pouvant influencer leur toxicité	8
I.3.3.1. Taille et composition chimique	8
I.3.4. Induction d'un stress oxydant	10
I.3.5. Cytotoxicité et génotoxicité	11

II. Présentation des nanoparticules étudiées	12
II.1. Les nanoparticules d'oxyde de fer	13
II.1.2. Effet toxique d'oxyde de fer	14

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes	18
1. Matériel biologique	18
1.1. Description morphologique	19
1.2. Anatomie d'<i>Helix aspersa</i>	20
1.3. La biologie de l'espèce <i>Helix aspersa</i>	22
2. Matériel chimique	23
3. Méthodes	24
3.1. Conditions d'élevage et application de traitement	24
3.2. Exposition d'<i>Helix aspersa</i> à la nourriture	24
3.3. Mode de traitement	25
3.4. Prélèvement de l'hémolymphe	25
4. Extraction et dosage des paramètres biochimiques	26
4.1. Dosage des protéines totales	28
4.2. Dosage des glucides	28
4.3. Dosage des lipides	29
5. Analyse statistique	30

Résultat et discussion

1. Résultats	32
1.1 Effet des nanoparticules métalliques d'oxyde de fer sur le contenu biochimique de l'hémolymphe	32
1.2. Effet des NPs sur le taux des protéines totales	32
1.3. Effet des NPs sur le taux des glucides totaux	33
1.4. Effet des NPs d'oxyde de fer sur le taux des lipides totaux	34

Conclusion et perspective

Conclusion

41

Références bibliographique

43

Annexes

Liste des abréviations

ABREVIATION	DESIGNATION
NP	Nanoparticule
NPs	Nanoparticules
Nm	Nanomètre
UV	Ultra-violet
Ag	Argent métal
TiO₂	Oxyde de Titane
ZnO	Oxyde de Zinc
CuO	Oxyde de Cuivre
Al₂O₃	Oxyde d'Aluminium
SiO₂	Oxyde de silice
Fe₂O₃	Oxyde de Fer
ZrO₂	Dioxyde de zirconium
Mm	Micromètre
ROS	ReactiveOxygenSpecies
DL50	Dose létale 50
DL30	Dose létale 30
DL20	Dose létale 20
MTT	Méthode de travail et terminologie
ADN	Acide désoxyribonucléique
RAW 264.7	Lignée des macrophages d'origine murine
A549	Lignée épithéliale pulmonaire
Fe₃O₄	Téetroxyde de trifer

CeO₂	Oxyde de Cérium
CrO₃	Trioxyde de chrome
A549	Les lignées de cellules pulmonaires
Neuro-2A	Neuroblastome de souris
K562	Cellules de la lignée tumorale
Hep-2	Dérivée de cellules HeLa
NPs-Fe	Nanoparticule de fer
SPIO	Super Paramagnetic Iron Oxyde
IRM	Imagerie par résonance magnétique
FeOH₂	Hydroxyde de fer
FeOH₃	Oxyhydroxyde de fer
PEG	Polyéthylène glycol
PEO	L'oxyde de polyéthylène
°C	Degré Celsius
Ph	Unité de mesure d'acidité
TCA	Temps de céphaline activée
NaOH	Hydroxyde de sodium
BBC	Bleu brillant de Coomassie
BSA	Albumine de sérum de bœuf

Liste des Figures

N de figure	Titre de figure	N de page
Figure 01	Gamme de tailles des nanostructures comparée à celles des principaux objets connus.	3
Figure 02	Evolution du nombre de journaux sur les nanotechnologies et leurs applications (a) et du nombre de publications relatives à la toxicité des nanomatériaux sur la santé et l'environnement (b)	5
Figure 03	Données disponibles sur les effets toxiques et écotoxiques de plusieurs types de NPs en Avril 2009	6
Figure 04	Distribution possible des NPs dans l'organisme	7
Figure 05	Voies d'entrée hypothétiques des NPs à travers la peau	8
Figure 06	Modes d'internalisation cellulaire des NPs en fonction de leur taille	9
Figure 07	Modélisation des causes et des effets du stress oxydant	10
Figure 08	schéma illustrant la fonctionnalisation des nano-oxydes de fer	14
Figure 09	L'escargot <i>Helix aspersa</i>	18
Figure 10	Morphologie externe de l'escargot	19
Figure 11	Anatomie interne de l'escargot	21
Figure 12	oxyde de fer	23
Figure 13	L'élevage des escargots <i>Helix aspersa</i> dans laboratoire.	24
Figure 14	Prise d'hémolymphe dans l'artère antérieure d'un escargot petit-gris.	26
Figure 15	Extraction et dosage des constituants biochimiques.	27
Figure 16	Effets des différentes concentrations d'oxyde de fer appliquées par ingestion sur les taux des protéines de l'hémolymphe des escargots <i>Hilex aspersa</i> .	33
Figure 17	Effets des différentes concentrations d'oxyde de fer appliqué par ingestion sur le taux des glucides de l'hémolymphe des escargots <i>Hilex aspersa</i> .	34
Figure 18	Effets des différentes concentrations d'oxyde de fer appliqué par ingestion sur le taux des lipides de l'hémolymphe des escargots <i>Hilex aspersa</i>	35

Liste des Tableaux

N de tableau	Titre de tableau	N de page
Tableau 01	Propriétés physico-chimiques de l'oxyde de fer	14
Tableau 02	Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines	28
Tableau 03	Réalisation de la gamme d'étalonnage des glucides	29
Tableau 04	Réalisation de la gamme d'étalonnage des lipides	29
Tableau 05	Effets des différentes concentrations d'oxyde de fer appliquées par ingestion sur les taux des protéines de l'hémolymphe des escargots <i>Hilix aspersa</i>	32
Tableau 06	Effets des différentes concentrations d'oxyde de fer appliquées par ingestion sur le taux des glucides de l'hémolymphe des escargots <i>Hilix aspersa</i>	34
Tableau 07	Effets des différentes concentrations d'oxyde de fer appliquées par ingestion sur le taux des protéines de l'hémolymphe des escargots <i>Hilix aspersa</i>	35

The background of the page features a decorative graphic of overlapping, wavy bands in various shades of blue, ranging from light sky blue to a deep, vibrant blue. These bands create a sense of movement and depth, framing the central text.

INTRODUCTION

Introduction

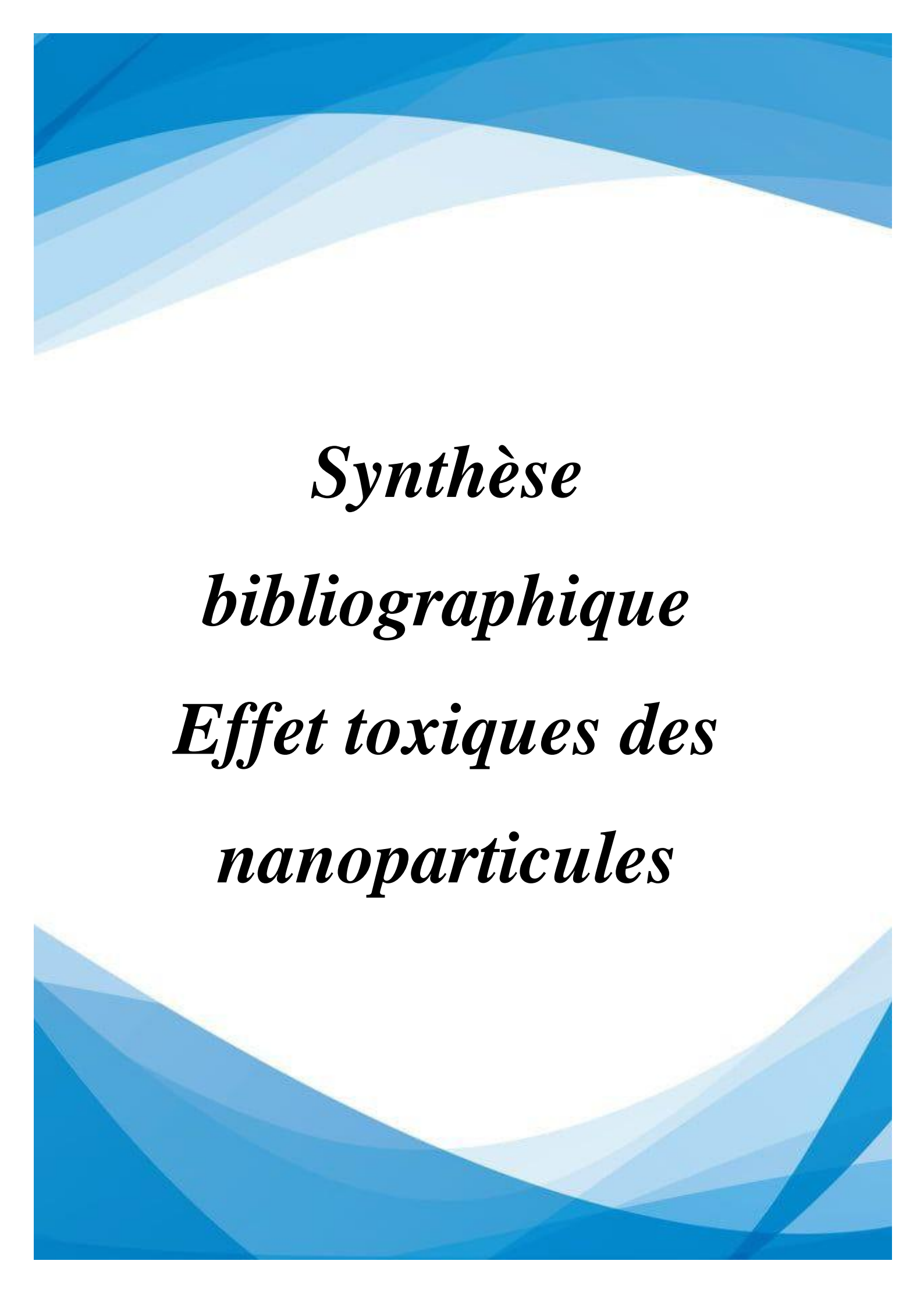
Actuellement, la nanotechnologie est considérée comme la principale technologie du XXI^e siècle impliquant l'utilisation de nouveaux dispositifs pour étudier la matière à l'échelle moléculaire ou supramoléculaire : les échelles caractéristiques de la gamme des nanotechnologies sont de 1 à 100 nanomètres (nm). A ces échelles, la matière acquiert des propriétés inattendues. Ils sont considérés comme de nouveaux composés chimiques dont les caractéristiques et les toxicités sont différentes (**Tsakalagos, 2003**).

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. (**Sarah T 2013**).

En raison de leur introduction potentielle dans le sol, ainsi que le milieu aquatique, l'inclusion d'un ensemble de tests d'écotoxicité dans la caractérisation des risques des NPs est nécessaire. Récemment, plusieurs chercheurs ont mis l'accent sur l'étude de leurs impacts sur les organismes terrestre (**Scott-Fordsmand et al., 2008; Hu et al., 2010; Unrine et al., 2010 a; b; Lapied et al., 2010**) et la littérature sur ce sujet reste limitée. (**Besnaci, S. 2016**).

Il est donc nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement à travers des organismes ou un ensemble d'organismes que l'on utilise comme sentinelles en étudiant les modifications physiologiques, biochimiques et écologiques qui les affectent. Ces êtres vivants très sensibles aux contaminants présentent l'intérêt de se prêter plus facilement que l'homme aux études des effets des polluants et permettent de mettre en évidence des pollutions chroniques ou brutales (**Little. Eet al, 1990**).

Notre travail a pour objectif d'étudier les effets toxiques potentiels induits par une nanoparticule métalliques à base d'oxyde de fer (Fe_2O_3) sur les métabolites hélimolympatiques d'un organisme bioindicateur/bio-accumulateur : l'escargot *Helix aspersa*.



Synthèse
bibliographique
Effet toxiques des
nanoparticules

I. Généralité

En octobre 2011, la commission de l'union européenne a défini un nanomatériau comme « un matériau dont les constituants principaux ont des dimensions comprises entre 1 et 100 nm ». Une NP est alors un assemblage d'atomes, formant un objet dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm. (**Journal officiel de la commission de l'Union Européenne, 18/11/2011**).

La figure 1 compare les nanostructures avec les objets connus dans la vie quotidienne

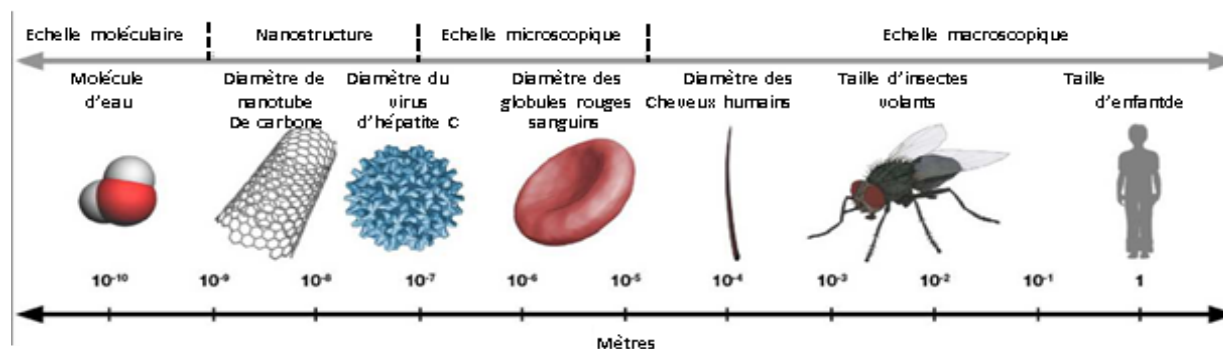


Figure 01: Gamme de tailles des nanostructures comparée à celles des principaux objets connus. (Sèmiyou A, 2012)

Les nanoparticules sont des objets relativement fréquents. Il existe en effet différentes sources de production des nanoparticules : les sources naturelles (incendies, éruptions volcaniques ...), les sources accidentelles (feux de bois, gaz d'échappement de véhicule, freinage,...) et les sources industrielles (nanoparticules manufacturées intentionnellement par l'homme). (Ophélie Z, 2008).

I.1. Classification et propriétés des NPs

Les nanomatériaux peuvent donc se présenter sous un grand nombre de formes différentes, mais ils sont également caractérisés par une grande variété de propriétés chimiques (Simonin, 2015).

On peut les classer selon la nature :(Chuto, 2010).

- **Les nanomatériaux organiques:** sont majoritairement commercialisés sous forme de nanotubes de carbone ou de fullerènes.
- **Les nanomatériaux inorganiques :** sont divisés en 3 classes selon (Simonin, 2015) :
 1. les quantum-dots (séléniure de cadmium)

2. les nanomatériaux métalliques (argent, or...)
3. les oxydes métalliques (titane, fer, cérium, cuivre...) (**Simonin, 2015**)

Les nanoparticules, jonction entre l'échelle atomique et le matériau, ont des particularités structurales très spécifiques. En effet, contrairement aux matériaux classiques, les nanoparticules voient leurs propriétés changer en fonction de leur taille. Elles sont soumises à la fois aux phénomènes de la physique classique et à ceux de la physique quantique lorsqu'elles sont de très petite taille. Les principales propriétés des nanoparticules sont : optiques, électriques, catalytiques, thermiques, magnétiques, mécaniques ou encore biologiques. (**Simonin, 2015**)

I.2.Types de nanoparticules et domaines d'utilisation:

Les types de nanoparticules les plus utilisés sont:

- Les oxydes métalliques comme ceux de titane, de silicium, d'aluminium, d'étain ou de fer. Ils interviennent dans les cosmétiques (filtres UV, stabilisateurs), les produits alimentaires (anti-agglomérants, liants), les vernis et les peintures (traitements anti-corrosion, anti-rayures), les produits d'entretien (traitements de surface) ou encore les céramiques sanitaires (traitements déperlants). (**witschgeret al, 2005**).
- Les métaux comme l'or et l'argent. Le nano-argent est très employé pour ses propriétés antibactériennes et antimicrobiennes dans les vêtements de sport, les revêtements de façade, les brosses à dents et les produits d'hygiène corporelle. Les nanoparticules d'or ont un emploi principalement médical. (**witschgeret al, 2005**).
- Les nanoparticules carbonées sous la forme de noir de carbone ou de nanotubes de carbone. Celles de noir de carbone sont très utilisées pour la fabrication des pneus autos dont elles améliorent l'adhérence sur la route. Les nanotubes trouvent une application dans les articles de sport dont ils augmentent la stabilité. (**witschgeret al, 2005**).
- Les nano cristaux semi-conducteurs comme ceux de sélénure de cadmium ou d'arséniure de gallium. Ils sont notamment utilisés pour la fabrication des panneaux solaires (**witschgeret al, 2005**).

I.3. TOXICITE DES NANOPARTICULES : LE « RISQUE NANO »

I.3.1. Nanotoxicologie et éconanotoxicologie :

Afin de mieux répondre aux interrogations soulevées par l'utilisation croissante des nanomatériaux, la nanotoxicologie se développe parallèlement aux nanotechnologies, et vise à étudier les risques éventuels sur l'environnement et la santé. Ainsi, dans le domaine de la recherche, l'évolution croissante des nanotechnologies est associée à la fois à une augmentation du nombre de journaux spécialisés sur le « nano-monde » (Figure 2 a), et à une augmentation du nombre de publications de nanotoxicologie, domaine qui n'existait pas il y a encore dix ans (Figure 2 b). Ainsi, les données sur la toxicité potentielle des NPs vis-à-vis des systèmes biologiques ne cessent de s'accroître. (sarah T.2013)

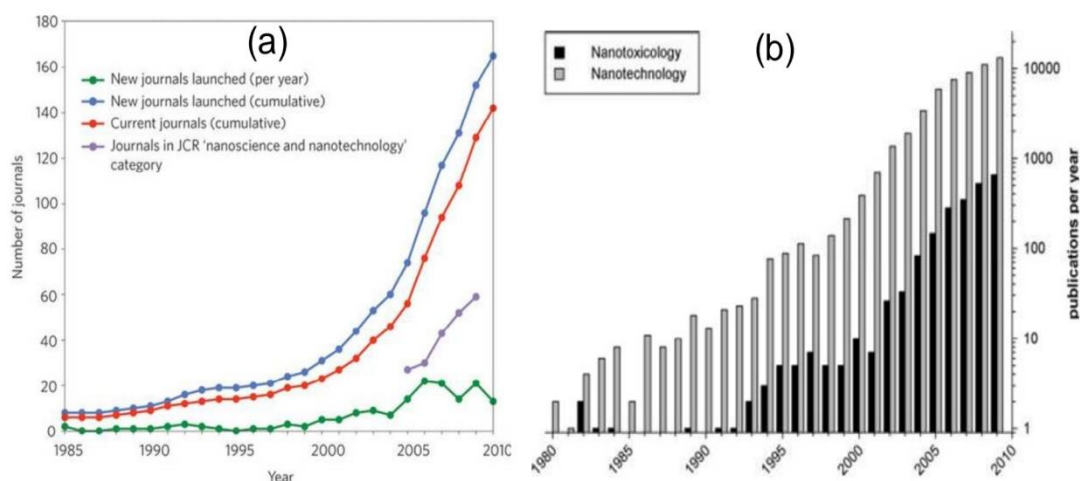


Figure 02 : Evolution du nombre de journaux sur les nanotechnologies et leurs applications (a) et du nombre de publications relatives à la toxicité des nanomatériaux sur la santé et l'environnement (b) (d'après Grieneisen, M.L., 2010 (a), et Sauer, U.G., et al., 2011 (b)).

Cependant, si la nanotoxicologie générale prend de plus en plus d'ampleur, la nanoécotoxicologie se développe beaucoup moins rapidement, et peu de données concernent encore l'impact des NPs manufacturées sur l'environnement et les écosystèmes (Kahru, A., and Savolainen, K., 2010). De plus, la majorité des études ne concernent que certains types de nanomatériaux, notamment les nanotubes de carbone, les fullerènes, l'argent, et le dioxyde de titane (Mueller, N. C., and Nowack, B., 2008 ; Kahru, A., and Dubourguier, H-C., 2010), et plus récemment et dans une moindre mesure les NPs à base de cuivre ou de zinc (Kahru, A., and Ivask, A., 2012) (Figure).

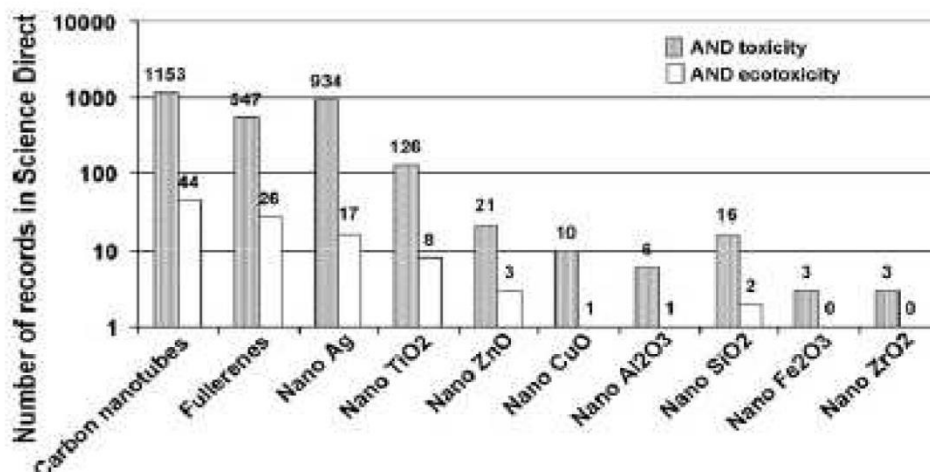


Figure 03 : Données disponibles sur les effets toxiques et écotoxiques de plusieurs types de NPs en Avril 2009 (d'après Kahru, A., and Dubourguier, H-C., 2010).

Pourtant, le relargage non contrôlé et non intentionnel de nanomatériaux manufacturés dans l'environnement est désormais un fait établi. En effet, celui-ci peut se produire aussi bien lors de l'utilisation par les consommateurs de produits contenant des NPs (par exemple vêtements, produits cosmétiques...), qu'au cours du cycle de vie des NPs ou des produits les contenant, depuis leur production jusqu'au traitement des déchets correspondants. Les nanomatériaux peuvent ainsi contaminer les efflux industriels et les eaux de traitement des déchets, l'atmosphère via les gaz d'incinération, et les sols, à l'issue du dépôt des éléments contenus dans ces gaz ou au contact des eaux contaminées (Gottschalk, F., and Nowack, B., 2011).

I.3.2. Modes et voies d'exposition

Le comportement et les effets des nanoparticules dans l'organisme dépendent de la forme à laquelle celui-ci est exposé d'une part, et d'autre part de la voie de pénétration des NPs, ces deux aspects étant étroitement liés. En effet, les NPs peuvent se présenter sous la forme de particules libres dans l'air, susceptibles de pénétrer préférentiellement les voies respiratoires. En revanche, intégrées à la composition de produits manufacturés (cosmétiques, produits de santé ou d'alimentation...), ou employées à des fins biomédicales (imagerie, vectorisation de médicaments...), elles se présentent sous forme solide, gélifiée ou liquide, impactant alors directement la peau ou les voies digestives (Casals, E., et al., 2008 ; Li, J.J., et al., 2010 ; Crosera, M., et al., 2009 ; Fröhlich, E., and Roblegg, E., 2012) (Figure 25).

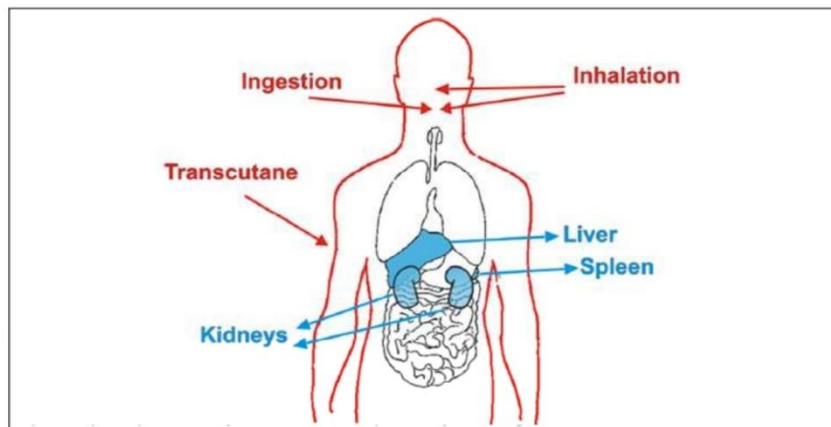


Figure 04 : Distribution possible des NPs dans l'organisme (d'après Casals, E., et al., 2008).

Les voies d'entrée sont principalement le derme, le tractus respiratoire et le tractus digestif. Des études montrent aussi l'accumulation des NPs dans des organes à forte capacité phagocytaire, notamment le foie (jusqu'à 90 %), les reins et la rate.

De plus, certains produits manufacturés, tels que les vêtements, pourraient libérer des NPs dans l'environnement, susceptibles de contaminer les sols et l'eau (Gottschalk, F., and Nowack, B., 2011). Ceci soulève des questions supplémentaires quant à l'ingestion par l'Homme d'espèces animales ou végétales issues des environnements contaminés, qui pourraient constituer une source d'exposition indirecte (Gaiser, B.K., et al., 2009). Par ailleurs, si les tissus atteints sont vascularisés ou proches des systèmes vasculaire ou lymphatique, la dissémination systémique des NPs et l'atteinte de nombreux autres organes et tissus ne sont pas à exclure (Li, J.J., et al., 2010). En particulier, de nombreuses recherches s'intéressent à la toxicité des NPs sur le système nerveux central ainsi qu'à leur rôle potentiel dans les pathologies neurologiques (Yang, Z., 2010 ; Simko, M., and Mattsson, M-O., 2010 ; Bondy, S.C., 2011). D'autres études démontrent également que certaines NPs sont capables de traverser la barrière placentaire, induisant ainsi un risque d'altération du développement foetal (Kulvietis, V., et al., 2011). Quelle que soit la voie d'exposition, il convient également de distinguer les expositions dites aiguës de celles dites chroniques.

I.3.3. Propriétés des nanoparticules pouvant influencer leur toxicité

I.3.3.1. Taille et composition chimique

La taille régit tout d'abord la profondeur d'atteinte des NPs dans l'organisme. Lors d'une exposition par voie aérienne, plus les particules sont de petite taille, plus leur progression dans les voies bronchiques est facilitée, leur permettant ainsi d'atteindre les alvéoles pulmonaires. De même, dans le cas d'une exposition par voie cutanée, la faible taille des particules pourrait favoriser leur passage à travers la couche cornée, soit par voie inter- ou intracellulaire, soit via les pores dans les glandes cutanées et les follicules pileux. Leur progression dans l'épiderme puis le derme serait ainsi facilitée, et ce jusqu'à atteindre la circulation sanguine (**Figure 05**).

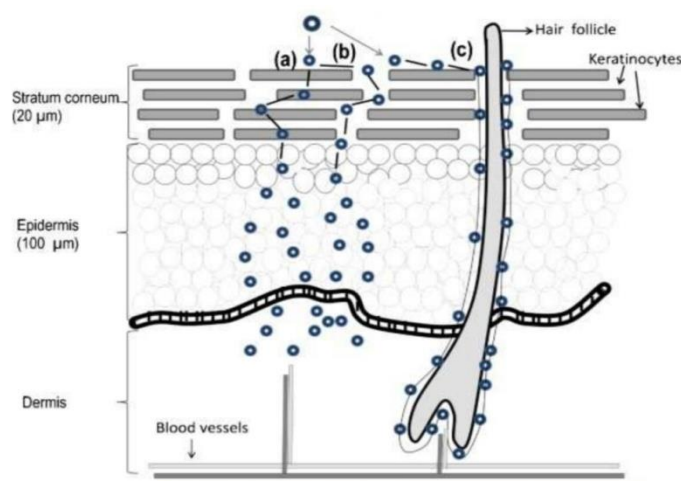


Figure 05 : Voies d'entrée hypothétiques des NPs à travers la peau (d'après Valenzuela, P., and Simon, J.A., 2012).

Les NPs peuvent traverser la couche cornée (a) par voie intracellulaire, (b) par voie trans cellulaire, ou (c) via les pores situés à proximité des follicules pileux (voie trans appendagéale), pour atteindre l'épiderme, le derme et les vaisseaux sanguins.

Au niveau cellulaire, la taille détermine également l'efficacité et la cinétique d'internalisation des NPs par les cellules. Plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu : (1) la phagocytose, qui concerne les très grosses particules de un à plusieurs micromètres ou dizaines de micromètres de diamètre ; (2) la pinocytose et la macropinocytose, correspondant à l'internalisation non spécifique de fluides extracellulaires, mais aussi parfois de particules

de l'ordre de quelques centaines de nanomètres à quelques μm de diamètre, respectivement ; (3) des processus d'endocytose, plus fréquents pour des NPs de taille inférieure à 200 nm, et dont la nature et l'efficacité dépendent aussi du type cellulaire et de la chimie de surface des NPs (Figure 06) (Petros, R.A., and De Simone, J.M., 2010 ; Jiang, W., et al., 2008). De plus, il semblerait qu'il existe une taille optimale d'internalisation lors des mécanismes d'endocytose (Chithrani, B.D., et al., 2006).

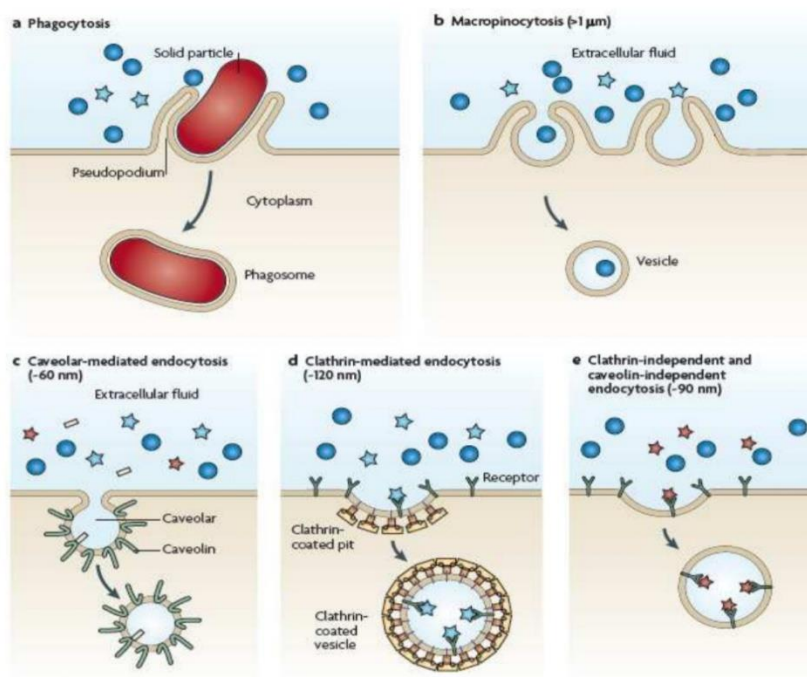


Figure 06 : Modes d'internalisation cellulaire des NPs en fonction de leur taille (d'après Petros, R.A., and DeSimone, J.M., 2010).

(a) Internalisation des particules les plus grosses par phagocytose (jusqu'à $10\ \mu\text{m}$) ; (b) Internalisation non-spécifique de particules plus petites (mais $\approx 1\ \mu\text{m}$) par macropinocytose ; Internalisation des particules plus petites par endocytose cavéole-dépendante (c), clathrine-dépendante (d), ou indépendante (e), chacune ayant des contraintes de taille spécifiques.

La taille des NPs joue également un rôle important dans leurs interactions avec les protéines du milieu, qu'il s'agisse de protéines libres ou de récepteurs membranaires cellulaires. En effet, plus la taille des particules est importante, plus les protéines sont susceptibles de trouver des points d'ancrage à leur surface. L'interaction avec des récepteurs module notamment le type d'internalisation (par exemple l'endocytose clathrine-dépendante), et peut aussi déclencher l'activation en cascades de signalisations cellulaires ou de synthèses

protéiques. Par ailleurs, les modifications des propriétés chimiques de surface des NPs induites par ces interactions peuvent avoir une incidence sur leur toxicité (**Jiang, W., et al., 2008**). La composition chimique des NPs est elle aussi très variable étant donné que tous les groupes de matériaux ou presque sont concernés, bien que les NPs métalliques soient les plus représentées. Ceci contribue à rendre les études toxicologiques difficiles, puisque chaque groupe est associé à une chimie de surface particulière capable d'influencer la toxicité des NPs de façon spécifique. Cependant, certaines NPs à base de métaux s'avèrent plus toxiques que d'autres types de particules, en particulier les NPs comprenant du cuivre et du zinc (**Karlsson, H.L., et al., 2008 ; Lanone, S, et al., 2009**).

I.3.4. Induction d'un stress oxydant :

Le stress oxydant est un concept relativement récent. Il a été introduit au début des années 1990, et est défini comme un ensemble de perturbations de l'équilibre naturel existant entre les espèces pro- et anti-oxydantes, le déséquilibre se faisant en faveur des composés pro-oxydants, et pouvant conduire à des dommages cellulaires (**Figure 07**) (**Kelly, F.J., 2003**). Le stress oxydant est le plus souvent évalué par la mesure des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites dans des conditions données.

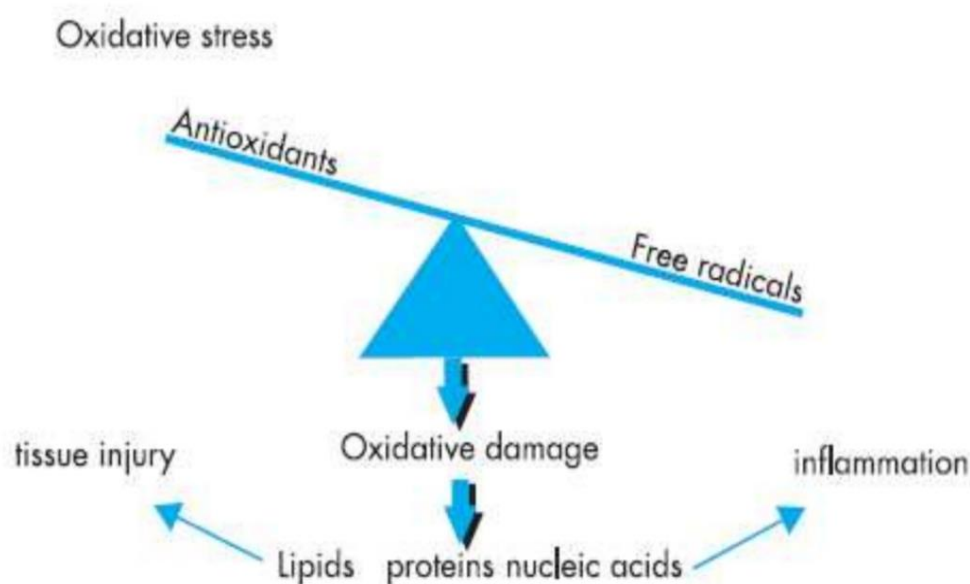


Figure 07 : Modélisation des causes et des effets du stress oxydant (d'après Kelly, F.J., 2003).

Le stress oxydant peut être dû à des facteurs exogènes, tels que l'exposition à des radiations ou des agents cancérogènes, le tabagisme, la prise de certains médicaments ou d'alcool, la présence d'agents infectieux, mais aussi de polluants atmosphériques, ou de particules (**Forman, H.J., and Torres, M., 2002**). En effet, la plupart des études de toxicité des NPs mettent en évidence l'association entre l'exposition aux nanomatériaux et la production de ROS, en particulier dans le cas des NPs métalliques, notamment du fait de leur nature chimique (**Park, E.-J., et al., 2008 ; Karlsson, H.L., et al., 2008 ; Sharma, V., et al., 2011**).

Les métaux qui les composent peuvent en effet interférer avec les métaux intracellulaires et perturber leur homéostasie (**Kao, Y.-Y., et al., 2012**). Certaines études suggèrent de plus que ces perturbations seraient en partie causées par la dissolution partielle des NPs en ions métalliques (**Song, W., et al., 2010 ; Xia, T., et al., 2008**).

Cependant, si les ions présentent une toxicité qui leur est propre et sont en effet capables de générer des ROS au niveau cellulaire, ils n'expliquent pas toujours la toxicité des NPs (**Midander, K., et al., 2009 ; Shaw, B.J., and Handy, R.D., 2011**).

I.3.5. Cytotoxicité et génotoxicité

En toxicologie, on s'intéresse notamment à la détermination de la dose létale 50 (DL50), définie comme étant la dose à partir de laquelle le taux de mortalité concerne la moitié de la population étudiée. La détermination de la DL50 est cruciale dans le cas des NPs, afin de définir un cadre réglementaire quant aux doses de matériaux utilisés en industrie, en particulier pour les produits de consommation. Dans certains cas, il est également possible de rechercher la DL20 ou la DL30.

Cependant, il est à noter que la diversité des modèles cellulaires et des modes d'exposition aux NPs donne lieu dans la littérature à des données pouvant être d'ordres de grandeur différents. Le degré de cytotoxicité peut être évalué *in vitro* par différentes méthodes, les plus utilisées étant le test d'exclusion de colorant (le plus souvent Bleu de Trypan), qui permet d'estimer la perméabilité des membranes ; le test au Rouge Neutre, marqueur de l'intégrité des lysosomes ; ou encore le test MTT (dimethyl-thiazolyl-diphenyl-tetrazolium-bromide), qui permet d'estimer les dommages mitochondriaux (**Seth, R., et al., 2004**).

Le test « comet » est également employé pour détecter les cassures des brins d'ADN (**Hackenberg, S., et al., 2011**). Ces méthodes sont couramment utilisées pour évaluer la toxicité des NPs, en particulier métalliques. Ainsi, les effets cytotoxiques de ces NPs se traduisent principalement par une augmentation dose-dépendante du taux de mortalité cellulaire, et des dommages au niveau des membranes, des organelles (en particulier mitochondries), et de l'ADN (**Peralta-Videa, J.R., et al., 2011**). L'augmentation dose-dépendante du taux de mortalité cellulaire a par exemple été observée sur des macrophages de la lignée RAW264.7 exposée à des NPs de cobalt (**Kwon, Y.-M., et al., 2009**), mais aussi sur des cellules A549 (lignée épithéliale pulmonaire) pour différents types de NPs incluant des nanotubes de carbone et plusieurs NPs d'oxydes métalliques (TiO₂, ZnO, CuO, Fe₃O₄, ou encore Fe₂O₃) (**Karlsson, H.L., et al., 2008 ; Simon-Deckers, A., et al., 2008 ; Jugan, M.L., et al., 2011**), ou encore sur des cellules dendritiques avec des NPs de TiO₂ et ZnO (**Palomäki, J., et al., 2010**).

De nombreux autres exemples relatifs à l'augmentation de la mortalité cellulaire sont présents dans la littérature. Des dommages aux membranes ont été rapportés pour des NPs d'oxyde de cérium (CeO₂) sur les lignées de cellules pulmonaires A549 et L-132 (**Kim, I.-S., et al., 2010**), ainsi que sur des cellules Neuro-2A (neuroblastome de souris) pour différentes NPs métalliques (ZnO, TiO₂, Al₂O₃, Fe₃O₄ et CrO₃) (**Jeng, H.A., and Swanson, J., 2006**). Ces dommages peuvent aussi avoir des effets néfastes sur l'adhésion cellulaire. Enfin, des dommages à l'ADN ont été observés pour des particules de TiO₂ sur des cellules A549 (**Jugan, M.L., et al., 2012**) et Hep-2 (dérivée de cellules HeLa) (**Osman, I.F., et al., 2010**), ainsi qu'avec des nanotubes de carbone sur des cellules A549 (**Karlsson, H.L., et al., 2008**), ou encore pour des NPs de nickel sur des cellules de la lignée tumorale K562 (**Muñoz, A., and Costa, M., 2012**).

II. Présentation des nanoparticules étudiées :

Notre étude concerne les nanoparticules inorganiques et spécialement les nanoparticules d'oxyde métalliques, Il existe plusieurs types, particulièrement la silice, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc (**Ostiguy, 2010**). Et aussi le fer (NPs-Fe) (**Demangeat, 2018**). Qui sont produits à un grand échelle, Ils sont utilisés tels quels ou enrobés, principalement dans le domaine de la rhéologie, des plastiques et du caoutchouc en tant qu'agents actifs et d'additifs (SiO₂), des crèmes solaires (TiO₂, ZnO) et de pigments pour la peinture (TiO₂).

En outre, certaines structures démontrent des propriétés intéressantes pour des applications virtuelles dans des domaines comme les senseurs, l'optoélectronique, les transducteurs, la médecine (**Ostiguy, 2010**).

Parmi tous les types de nanomatériaux disponibles, notre étude s'est restreinte à des nano-oxydes de fer a cause de leur importance dans le développement actuel des nanotechnologies.

II.1. Les nanoparticules d'oxyde de fer

Les NPs d'oxyde de fer super paramagnétiques désignées par le terme SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxide) possèdent des propriétés magnétiques uniques qui font d'elles des matériaux avancés candidats pour la biomédecine. Elles peuvent servir d'agents de contraste pour l'IRM, de « points chauds » locaux capables de tuer les cellules malignes et de transporteurs colloïdaux lors de la vectorisation de médicaments ou du diagnostic. (**Q. A. Pankhurst et al., 2003**)

La propriété des SPIOs provient du fort moment magnétique qu'ils acquièrent en présence d'un champ magnétique externe. Leur moment magnétique élevé engendre un fort contraste en imagerie IRM. En plus de posséder d'excellentes propriétés magnétiques, les SPIOs sont biocompatibles et biodégradables ; donc non toxiques. Au cours de la dégradation, les ions Fe libres n'augmentent pas sensiblement la teneur en fer contenu dans le corps et s'incorporent naturellement dans l'hémoglobine. Ils sont alors dégradés par des voies normales de recyclage du fer. (**R. Weissleder, D. D et al., 1989**).

Les SPIOs sont généralement synthétisés par co-précipitation de suspensions alcalines de Fe(OH)₂ et Fe(OH)₃. (**J. Lee, T. Isobe et al., 1996**).

La taille des particules peut varier entre quelques nanomètres et plusieurs centaines nanomètres de diamètre. (**A.K. Gupta, M ., 2005**).

Pour accroître leur stabilité, leur demi-vie de circulation et leur biocompatibilité, diverses méthodes ont été utilisées pour fonctionnaliser les NPs de SPIO avec un revêtement de polymères inertes, comme le dextran, des polysaccharides, le polyéthylène glycol (PEG) et l'oxyde de polyéthylène (PEO). (**P. Reimer, et al., 2003**)

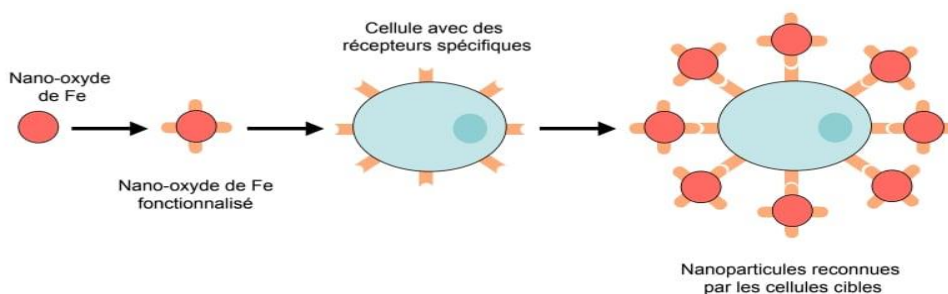


Figure 08: schéma illustrant la fonctionnalisation des nano-oxydes de fer

Tableau 01: Propriétés physico-chimiques de l'oxyde de fer (CERADEL, 2012).

Paramètres	Caractéristique
Apparence	Solide en poudre
Couleur	Rouge sombre à rouge violacé, pourpre
Odeur	Inodore.
Densité	env. 5.2 g/c
Température de fusion	1565°C
Solubilité dans l'eau	inférieure à 1 µg/l
Stabilité chimique	Substance stable dans les conditions normales d'utilisation
Densité relative	env. 3.4 kg/l
pH	Légèrement acide entre 4 et 6 (dans une solution saturée à 100 g/l).

II.1.2. Effet toxique d'oxyde de fer

Bien que le fer soit un élément essentiel à la vie, une augmentation de sa concentration en milieu cellulaire peut générer la formation de ROS (Aiberts et al.1983).

Dans la plupart de leurs applications, les nanoparticules d'oxyde de fer sont en contact avec les cellules voire le milieu intracellulaire. Il est donc probable que les interactions nanoparticules d'oxyde de fer/cellules ne soient pas anodines. C'est notamment le cas des nanoparticules de magnétite dont la toxicité vis-à-vis des cellules humaines a été démontré (Berry et al.2003; 2004).

Synthèse bibliographique Effet toxiques des nanoparticules

Les nanoparticules d'oxyde de fer utilisées à des fins biomédicales (**Gupta et al,2005**) sont généralement fonctionnalisées en surface via le greffage de composés organiques (**Goetze et al.2002; Lacava et al.,2002; Chunfu et al.,2004; Xu et al., 2005; Kim et al.,2005**).

Cette couche organique limite les contacts directs entre le fer des nanoparticules et les composants cellulaires. Comme l'indique la nature de l'enrobage joue un rôle important dans les effets biologiques des nanoparticules.

La multiplicité des applications ainsi que l'utilisation grandissante des NPs-Fe conduisent à leur libération et à leur dissémination dans les différents compartiments de l'environnement. Cette dernière peut intervenir au moment de leur fabrication, au cours de leur utilisation ou lors de leur gestion de fin de vie et entrent alors en interaction avec de multiples composants (microorganismes, constituants organiques et inorganiques dissous et/ou particuliers). Ces derniers modifient les propriétés des NPs-Fe en réagissant avec leur surface, ce qui peut conduire à différents phénomènes (agrégation, dissolution, adsorption). Enfin, les propriétés intrinsèques des NPs-Fe (taille, surface spécifique, composition chimique, cristallinité) sont directement impliquées dans les interactions entre les NPs-Fe et leur environnement (**Demangeat, 2018**).



Partie
Expérimentale

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

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

1. Matériel biologique

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

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

- ✓ **Règne :** Animal.
- ✓ **Embranchement :** Mollusques.
- ✓ **Classe :** Gastéropodes.
- ✓ **Sous-classe :** Euthyneurs.
- ✓ **Super ordre :** Pulmonés.
- ✓ **Ordre :** Stylommatophores.
- ✓ **Famille :** Helicidae.



Figure 09 : L'escargot *Helix aspersa*
(Matéo et Simoncelli, 2008).

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

1.1. Description morphologique

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

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

Deux grandes parties sont distinguées : le pied et les viscères (**Figure10**). Les viscères correspondent aux organes situés à l'intérieur de la coquille et comprennent le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge également dans le pied. Le pied comporte essentiellement la sole pédieuse, musculeuse, la partie antérieure du tube digestif et le système nerveux. (**Kerneyet al., 2006**)

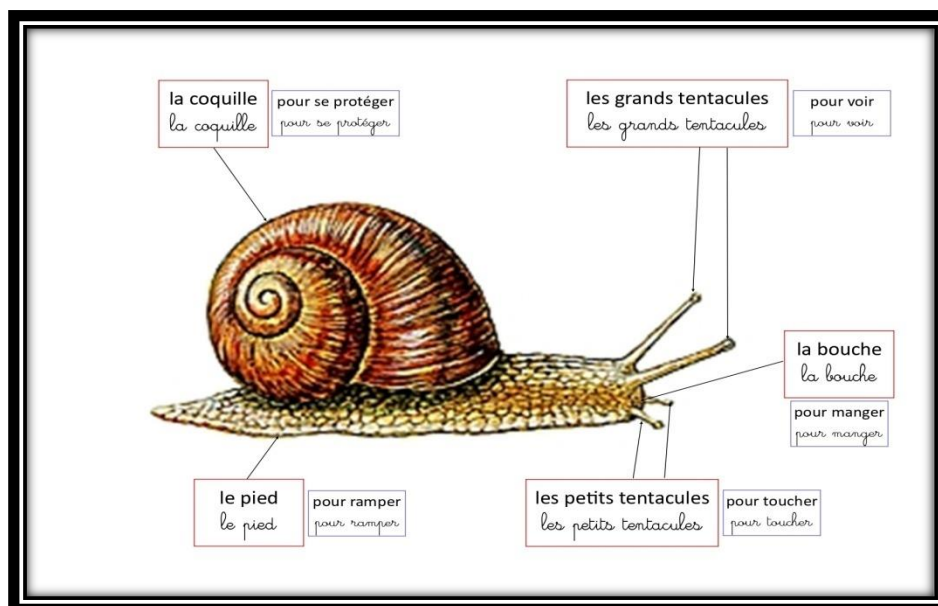


Figure10 : Morphologie externe de l'escargot (**Kerneyet al., 2006**).

1.2. Anatomie d'*Helix aspersa*

1.2.1. Appareil digestif

En raison de la torsion à 180° du corps de l'escargot, le tube digestif forme une boucle ramenant l'anus vers l'avant. La bouche se prolonge par un bulbe buccal à l'intérieur duquel se trouve une langue musculaire recouverte d'une lame cornée : la radula, son rôle est de broyer les aliments. Dans la partie postérieure du bulbe buccal on trouve deux glandes salivaires. Ce bulbe se prolonge par un œsophage qui se renfle en un estomac, lui-même prolongé par un intestin formant une double circonvolution autour de l'hépatopancréas et aboutissant à l'anus (**Sandrine, 2003**).

1.2.2. Système nerveux

Le système nerveux sympathique est constitué par une paire de ganglions buccaux situés sous le bulbe buccal. Ils sont reliés par deux cordons nerveux aux ganglions cérébroïdes et innervent la plus grande partie du tube digestif. Le système nerveux central est situé dans la région céphalique. Il est formé d'une chaîne de ganglions formant un double collier péri œsophagien complexe (**Sandrine, 2003**).

1.2.3. Appareil circulatoire et respiratoire

- ✚ **Le cœur** est constitué d'une oreillette antérieure et d'un ventricule postérieur (**Belhaouchet, 2014**).
- ✚ **Le sangou hémolymphe** c'est le liquide physiologique d'*Helix aspersa* ainsi que d'autres mollusques terrestres et marins.
- ✚ **L'hémolymphe** circule dans un système veineux et un autre artériel. Il est propulsé dans le réseau artériel via deux aortes. Contient un pigment, l'hémocyanine (molécule de nature protéique de la famille des métalloprotéines dont le rôle est de transporter l'oxygène) (**Mebirouk, 2017**). Il est incolore sous sa forme désoxydée et bleu sous sa forme oxydée. Le sang est propulsé dans le réseau artériel via deux aortes. L'aorte antérieure irrigue le pied et la postérieure le tortillon. Le sang revient au cœur par un système de veines et de sinus veineux.
- ✚ **Le poumon** est une poche formée de l'épithélium palléal, irrigué par les vaisseaux pulmonaires, l'air y circule au travers du pneumostome par des mouvements de contraction de son ouverture (**Belhaouchet, 2014**).

Partie expérimentale

1.2.4. Appareil génital

L'escargot est hermaphrodite. Cette particularité explique la complexité de l'appareil, formé d'organes à la fois mâles et femelles et d'organes uniquement mâles ou femelles. Il comprend :

- Une gonade, ou ovotestis, où se forment les ovules et les spermatozoïdes situés à l'extrémité postérieure de l'hépatopancréas.
- Un canal hermaphrodite servant à l'évacuation des gamètes.
- Une glande de l'albumine qui élabore les réserves vitellines.
- Un ovospermiducte

Puis l'appareil se divise en deux voies :

- La voie mâle comprenant un spermiducte où les spermatozoïdes s'accumulent en un spermatophore ainsi qu'un organe copulateur, le pénis.
- La voie femelle comprend la poche qui sécrète le dard calcaire lors de l'accouplement, le vagin et l'orifice génital (**Sandrine, 2003**).

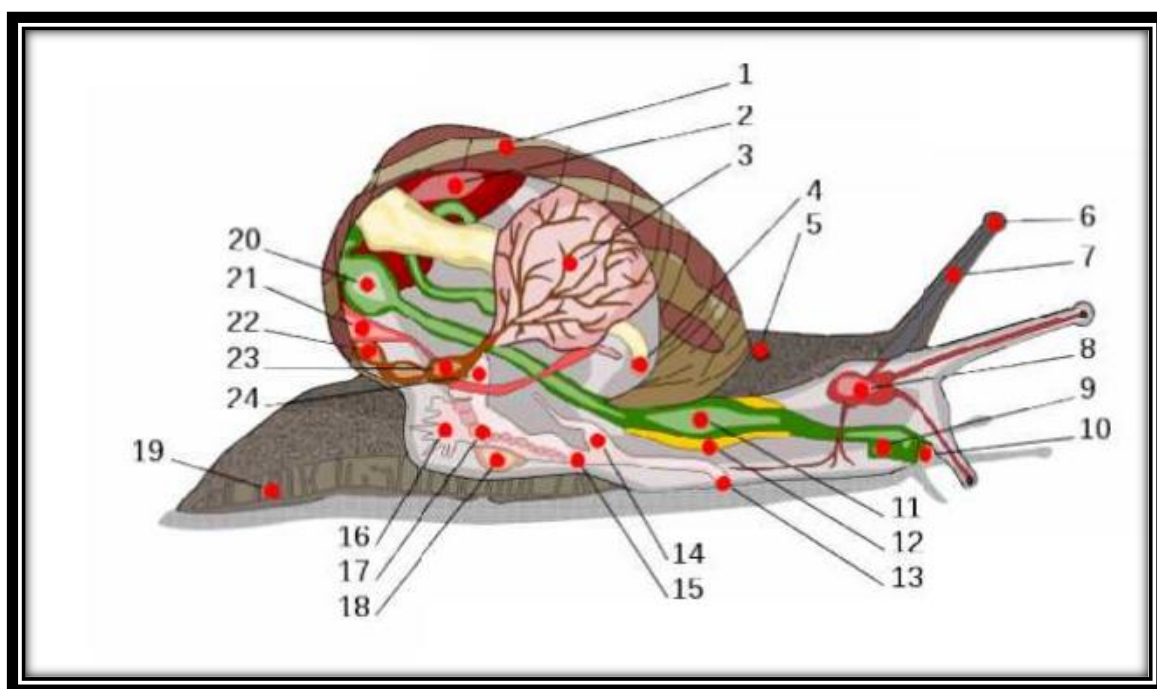


Figure 11 : Anatomie interne de l'escargot (<http://tpecollenaturelle.kealea.fr/escargot/>).

Légende : 1.Coquille - 2.Foie - 3.Poumon - 4.Anus -5.Pore respiratoire - 6.Œil - 7.Tentacule - 8.Cerveau - 9.Conduit salivaire - 10.Bouche - 11.Panse -12.Glande salivaire - 13.Orifice génital - 14.Pénis - 15.Vagin - 16.Glande muqueuse - 17.Ovaire - 18.Sac de dards - 19.Pied - 20.Estomac - 21.Rein - 22.Manteau - 23.Cœur - 24.Canal.

1.3. La biologie de l'espèce *Helix aspersa*

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

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

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

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

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

✚ **Hibernation et estivation**

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

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

▪ **Estivation**

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

Partie expérimentale

▪ **Hibernation**

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

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

▪ **Longévité**

Helix aspersa est adulte à deux ans mais peut vivre plus de cinq ans. Dans la nature, il dépasse rarement l'âge de trois (03) ans. Sa mort est souvent due à des prédateurs ou à des parasites. En captivité, sa longévité est bien plus longue et va de dix à quinze ans (**Pirame et al.,2003**).

2. Matériel chimique

Notre matériel chimique correspond à une préparation commerciale des nanoparticules métalliques à base d'oxyde de fer (Fe_2O_3). (**Figure 12**)



Figure 12 : Nanoparticules d'oxyde de fer

3. Méthodes

3.1. Conditions d'élevage et application de traitement

Les escargots utilisés dans ce travail sont des juvéniles de poids moyen de $(0.84 \pm 0.50\text{g})$, collecté dans la région de Guelma (Nord-Est Algérien). Les conditions d'élevage des escargots sont les suivantes:

- Photopériode de 18h de lumière/24 avec une température de -20°C .
- Les escargots sont répartis dans des boîtes en plastique transparentes avec un couvercle perforé et chaque boîte contient une éponge mouillée pour maintenir de l'humidité.
- Une boîte de pétrie contenant de la nourriture (farine de blé) est placée au fond de la boîte.
- Les boîtes sont nettoyées régulièrement chaque trois jour (**Gomot, 1997**).



Figure 13 : L'élevage des escargots *Helix aspersa* dans le laboratoire.

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

La « farine de blé » est utilisée dans toutes les expériences d'intoxication des escargots par la nourriture. La contamination est réalisée le jour précédant la mise en route des expérimentations. Les nanoparticules de Fe_2O_3 sont ajoutées à la farine sous forme d'une fine poudre. Dans tous les cas, la nourriture est ensuite homogénéisée

manuellement. La nourriture ainsi contaminée est conditionnée dans des boîtes en plastique ou dans des bâteaux en verre puis conservées à -20°C à l'obscurité afin de limiter la dégradation du produit ; les aliquotes sont décongelés 1 à 2 heures avant d'être apportés aux animaux selon la méthode de (Coeurdassier , 2001).

3.3. Mode de traitement

Après 15 jours d'adaptation aux conditions de laboratoire, Les animaux sont traités par addition des concentrations croissantes de NPs d'oxyde métalliques dans l'alimentation (500,1000, 5000,10000 et15000µg/g de farine). Nous avons retenu un lot témoin et 5 lots traitées par l'oxyde de fer, à raison de 10 escargots par lot. Pendant les quatre semaines de traitement, le nettoyage et le changement de nourriture est effectué chaque trois jour.

Dans tous les cas, la nourriture apportée est renouvelée, qu'elle soit contaminée ou non, tous les trois jours au moment du nettoyage des boites d'élevage. Ce nettoyage est fait, autant que possible, à heure fixe. Il comprend un lavage des parois des boites à l'eau distillée, un changement de l'éponge absorbante au fond des boites ou un ramassage des fèces des escargots déposés sur le substrat. Ensuite, l'ensemble des récipients d'essai est humidifié à l'eau distillée.

3.4. Prélèvement de l'hémolymphe

L'escargot possède un appareil circulatoire ouvert avec lacunes (hemocœle), formé du cœur d'où partent une artère antérieure qui va irriguer la cavité palléale et une artère postérieure médiane qui se dirige vers les viscères. Le vaisseau antérieur est atteint après avoir pratiqué une fenêtre dans la coquille, préalablement nettoyée à l'eau distillée, au niveau de l'emplacement du cœur (Letellier, 2010).

L'hémolymphe est ensuite prélevée à l'aide d'une pipete pasteur. Ainsi environ 300 µl d'hémolymphe est obtenu à partir de chaque escargot (Ataillia, 2017).

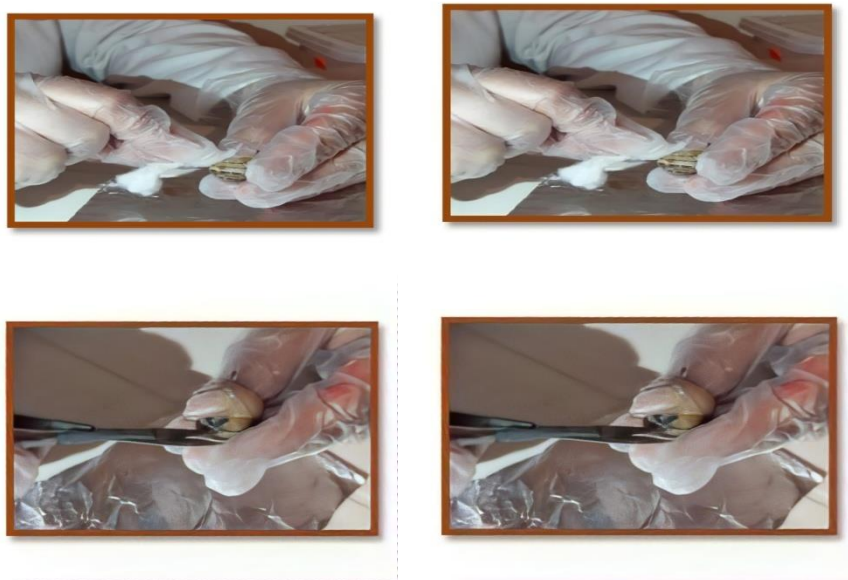


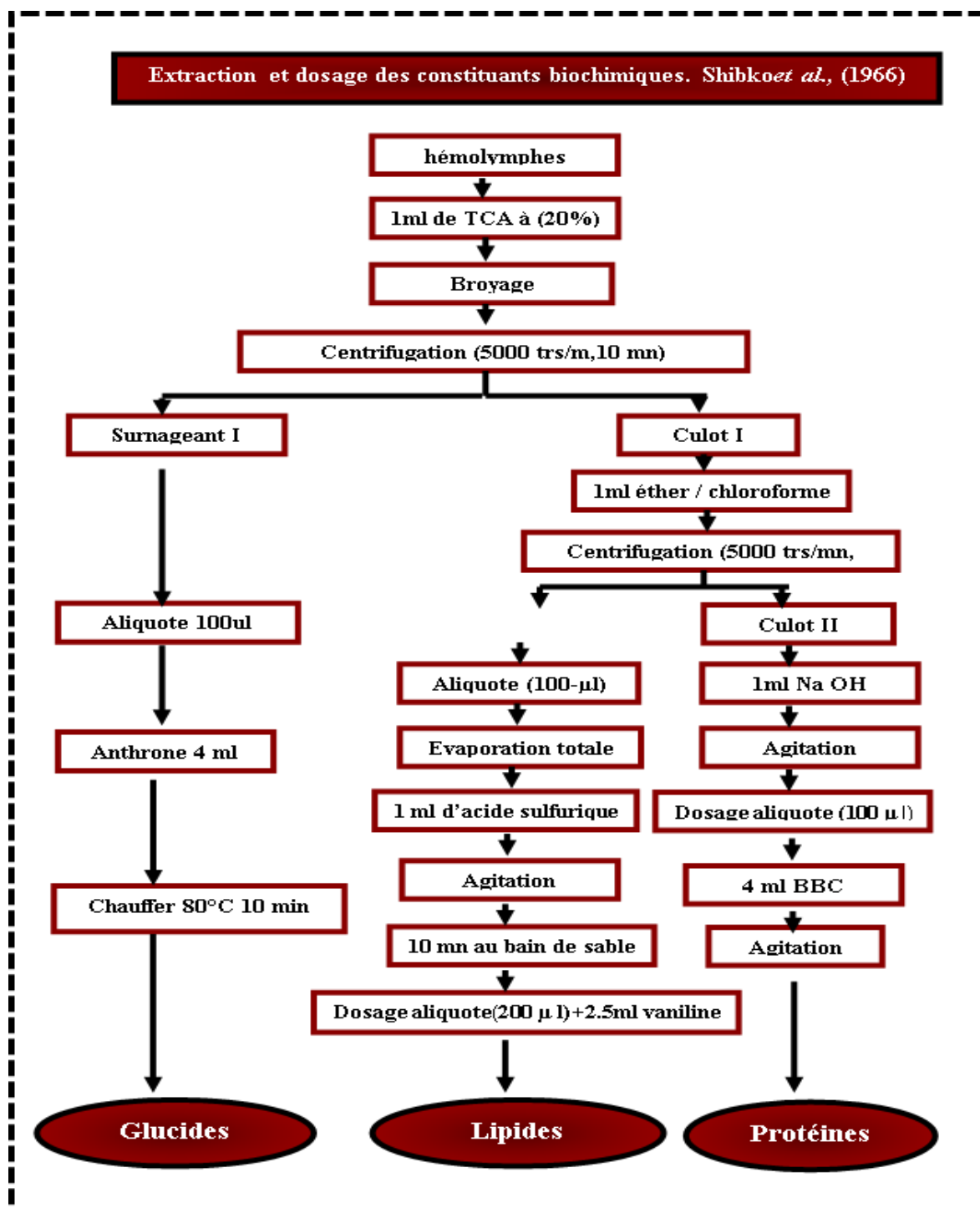
Figure 14: Prise d'hémolymphe dans l'artère antérieure d'un escargot petit-gris.

4. Extraction et dosage des paramètres biochimiques

Afin d'étudier l'effet toxicologique de l'oxyde de fer sur l'escargot *Helix aspersa*, il est primordiale de réaliser une étude biochimique par des dosages des métabolites (protéines, lipides et glucide).

Comme méthode opératoire réalisée au laboratoire de toxicologie, nous avons dosés les métabolites au niveau de l'hémolymphe. Les échantillons témoins et ceux traités ont été conservés dans un millilitre d'acide trichloracétique (TCA) à 20% avec trois répétitions pour chaque lot. L'extraction des différents métabolites à savoir les protéines, glucides et lipides, a été effectuée selon le procédé de **Shibko et al. (1966)** (fig.).

Après l'homogénéisation aux ultra-sons, puis centrifugation pendant une durée de 10 minutes à 5000 tours/minute et à une température de 4°C, le surnageant n°I sert au dosage des glucides totaux selon la méthode de **Duchateau et Florkin(1959)**. Au culot n°I on ajoute un millilitre d'un mélange composé de volumes égaux d'éther et de chloroforme (1V/1V). Après une deuxième centrifugation (5000 tours/min pendant 10 min), on obtient le surnageant n° II qui sera utilisé pour le dosage des lipides (**Goldsworthy et al., 1972**) tandis que le culot n° II dissout dans la soude NaOH (0,1 N), servira pour la quantification des protéines totale selon (**Bradford (1976)**).



(Duchateau&Florkin 1959)

(Goldsworthy *et al.* , 1972)

(Bradford, 1976)

Figure 15: Extraction et dosage des constituants biochimiques. Shibkoet al., (1966)

Partie expérimentale

4.1. Dosage des protéines totales

Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de **Bradford (1976)**, qui utilise le bleu brillant de Coomassie (BBC G 250, Merck) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) (Sigma) comme standard. Le réactif permet de montrer la présence des protéines par une coloration bleue. Une fraction aliquote de 100 μ l à laquelle on ajoute 4 ml de réactif.

La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution mère de BSA (1mg/ml) qui se prépare comme suit : On homogénéise 100 mg de BBC dans 50 ml d'éthanol 95°, on y ajoute 100 ml d'acide orthophosphorique à 85% et le tout est complété à 1000 ml avec de l'eau distillée. La durée de la conservation du réactif est de 2 à 3 semaines à une température 4°C. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme (**Tableau 02**).

Tableau 02. Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité de BSA (μ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μ l)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantité de BSA (μ g)	0	20	40	60	80	100

4.2. Dosage des glucides :

Le dosage des glucides a été réalisé selon **Duchateau et Florkin (1959)**. Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distillée) stocké à l'obscurité, elle consiste à additionner à une fraction aliquote de 100 μ l du surnagent n°I, 4 ml de réactif d'anthrone. Après chauffage du mélange dans un bain marie pendant une durée de 10 minutes et à une température de 80°C, une coloration verte se développe. Les absorbances sont lues à une longueur d'onde de 620 nm contre un blanc de gamme (**Tableau 03**).

Tableau 03. Réalisation de la gamme d'étalonnage des glucides.

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

4.3. Dosage des lipides :

Les lipides totaux sont déterminés selon la méthode de **Goldsworthy *et al.*,(1972)** en utilisant le réactif sulfo-phospho-vanillinique composé de 0,38 g de vanilline, 55 ml d'eau distillée et 195 ml d'acide orthophosphorique à 85%. Ce réactif peut se conserver à l'obscurité pendant trois semaines à une température de 4°C. La solution mère de lipides composée de 2.5 mg d'huile de table à 99% de triglycérides et un millilitre de volumes égaux d'éther et chloroforme, est utilisée comme standard.

Après évaporation des prises aliquotes de 100 µl du surnagent n° II dans un bain à sec à une température 40°C pendant une durée d'environ 20 minutes, on additionne un millilitre d'acide sulfurique concentré (96%). Les tubes fermés sont agités puis chauffés dans un bain de sable à une température 100°C pendant une durée de 10 minutes. Après refroidissement, on prélève 200 µl de chaque tube eppendorf qu'on met dans des tubes à essai auxquels on ajoute 2,5 ml de réactif sulfo-phospho-vanillinique. Après 30 minutes à l'obscurité, le complexe se colore en rose. La densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. La quantité de lipides est estimée à partir de la droite de régression obtenue après une gamme d'étalonnage (**Tableau 04**).

Tableau 04. Réalisation de la gamme d'étalonnage des lipides.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Ether /Chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif Vanilline (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

5. Analyse statistique

Les moyennes \pm l'écart type ($m \pm s$), avec un niveau significatif de $p \leq 0.05$, sont calculées pour chaque groupe d'expérience. L'analyse la variance à un seul critère de classification et le test 'T' de student ont permis de mettre en évidence les différences entre les groupes des escargots témoins et traités. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 13.31.

Résultats Et Discussion

Résultats

1.1 Effet des nanoparticules métalliques d'oxyde de fer sur le contenu biochimique de l'hémolymphe:

Le contenu en protéines, en glucides et en lipides a été déterminé au niveau de l'hémolymphe chez les escargots *Helix aspersa* exposés aux concentrations croissantes des NPs d'oxyde de fer respectivement 500, 1000, 5000, 10000 et 15000 µg/g d'aliment par voie digestive pendant 28 jours.

1.2 Effet des NPs sur le taux des protéines totales

Les résultats de dosages des protéines totales de l'hémolymphe chez les escargots *Helix aspersa* témoins et traités par l'oxyde de fer sont présentés dans le tableau 05. Ce dernier révèle que le traitement de ces bio indicateurs par ce type de molécules nanométrique a provoqué une augmentation des protéines en fonction des concentrations appliquées allant de $0.188 \pm 0.054 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour la concentration la plus faible (500 µg/g) jusqu'au $1.279 \pm 0.328 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ relative à celle de la plus forte concentration testée (15000 µg/g).

Le test 'T' de Student montre une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les traités par les doses (D3), (D4) et (D5) par rapport aux témoins. Cependant chez les escargots traités par les faibles doses (D1) et (D2) la différence est non significative avec $p=0,231$, $p=0,567$ respectivement et ceux toujours par rapport aux témoins. figure 16

Tableau 05: Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administrées par ingestion sur le taux des protéines hémolympatique des escargots *Helix aspersa* ($m \pm SD$, $n = 3$)

Paramètre	Témoin	D1	D2	D3	D4	D5
Protéines ($m \pm SD$)	$0,146 \pm 0,046$ A	$0,188 \pm 0,054$ a	$0,123 \pm 0,021$ a	$0,848 \pm 0,042$ b	$0,891 \pm 0,059$ B	$1,279 \pm 0,328$ B

Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significatives au seuil $p < 0,05$.

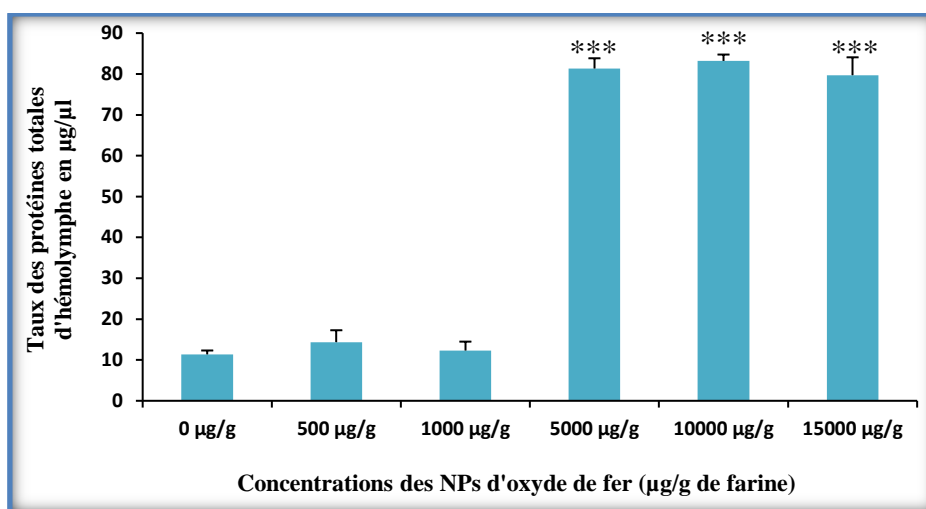


Figure16: Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administré par ingestion sur le taux des protéines hémolympatique des escargots *Helix aspersa*. ($m \pm SD$, $n = 3$).

Les astérisques symbolisent une différence significative entre les lots traités par rapport aux témoins. *** pour $p \leq 0.001$.

1.3 Effet des NPs sur le taux des glucides totaux

Le tableau06 révèle que le traitement d'*Helix aspersa* avec l'oxyde de fer nanométrique administré par ingestion a induit une perturbation des teneurs en glucides hémolympatique en fonction des doses appliquées.

La comparaison des moyennes des différents lots traités par rapport aux témoins par le test T de Student montre une réduction hautement significative chez les traités par les doses (D2 et D3) avec ($p \leq 0.01$), cette différence devient très hautement significative avec ($p \leq 0.001$) chez les escargots exposés aux plus fortes doses D4 et D5 (Figure 16). La dose la plus faible 500 µg/g de farine n'est pas significatif avec ($p = 0,126$).

Tableau 06: Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administrées par ingestion sur le taux des glucides hémolympatique des escargots *Helix aspersa* ($m \pm SD$, $n = 3$).

Paramètre	Témoin	D1	D2	D3	D4	D5
Glucides ($m \pm SD$)	80,819±1,733 A	75,066±3,511 a	54,066±4,163 b	52,73±3,385 b	25,733±0,577 B	29,4±2 b

Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significatives au seuil $p < 0,05$.

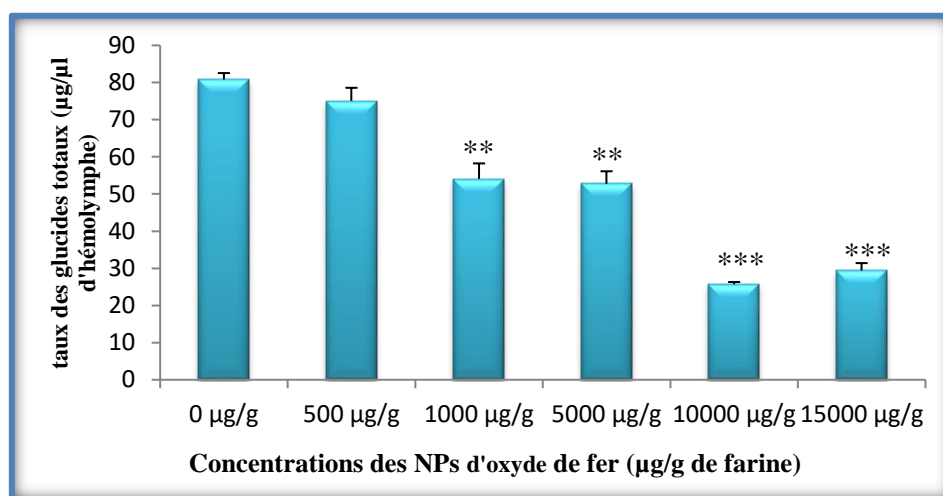


Figure 17 : Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administré par ingestion sur le taux des glucides hémolympatique des escargots *Helix aspersa*. ($m \pm SD$, $n=3$).

Les astérisques symbolisent une différence significative entre les lots traités par rapport aux témoins ** pour $p \leq 0.01$ et *** pour $p \leq 0.001$.

1.4 Effet des NPs d'oxyde de fer sur le taux des lipides totaux :

Les résultats relatifs aux taux des lipides enregistrés dans cette expérimentation montrent que l'oxyde de fer nanométrique administré par ingestion a engendré une perturbation des taux de lipides d'hémolymphe d'*Helix aspersa* en fonction des doses testées (Tableau 07).

L'analyse statistique révèle un effet non significatif entre les témoins et les traités par les deux premières doses D1 et D2 avec ($p > 0,05$). Par contre chez les traités par les doses D3, D4 et D5 l'augmentation est significative ($p \leq 0,05$) et hautement significative ($p \leq 0,01$) par rapport

aux escargots témoins avec des valeurs moyennes enregistrées respectivement 26.869±1.181, 34.949±3.839 et 35.168±2.002 µg/µl d'hémolymphe (Tableau 07).

Tableau 07 : Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administrées par ingestion sur le taux des lipides hémolympatique des escargots *Helix aspersa* (m ± SD, n = 3)

Paramètre	Témoin	D1	D2	D3	D4	D5
Lipides (m ± SD)	19,988±2,143 a	24,027±1,649 a	17,910±2,107 a	26,869±1,181 b	34,949±3,839 B	35,168±2,002 b

Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significatives au seuil p<0,05.

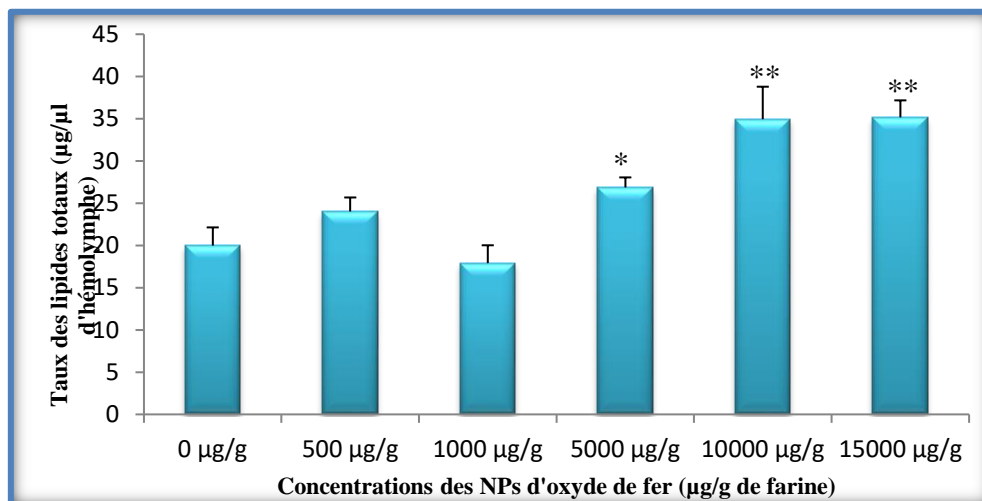


Figure 18 : Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administré par ingestion sur le taux des lipides hémolympatique des escargots *Helix aspersa*. (m ± SD, n=3).

Les astérisques symbolisent une différence significative entre les lots traités par rapport aux témoins. * pour p≤0.05, ** pour p≤0.01.

Discussion

La réponse globale d'un organisme au stress désigne l'ensemble de ses réactions comportementales et physiologiques visant à maintenir son homéostasie, c'est-à-dire le maintien actif de la constance du milieu intérieur pour donner les meilleures chances de survie et permettre de rester fonctionnel dans un environnement défavorable. **(Hoffmann & Parsons, 1991).**

L'eau, les protéines, les carbohydrates, les acides aminés sont des éléments importants fournissant l'énergie et les matériaux nécessaires à la survie, la croissance et à la reproduction des êtres vivants **(Dixon, 1998).**

Ce bio-essai s'inscrit dans la continuité des expériences présentées et vise à déterminer les effets d'une nanoparticule : oxyde de fer sur les paramètres biochimiques (glucides, lipides, et protéines) d'hémolymphes d'une espèce bio-indicateur : *Hilexaspersa*.

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

Les résultats enregistrés révèlent que le traitement d'oxyde de fer appliqué par ingestion a provoqué une réduction des teneurs de glucides d'hémolymphes d'*Helix aspersa*.

L'exposition à des substances toxiques est impliquée dans une cascade d'événement conduisant à une toxicité cellulaire découlant de la production excessive de ROS qui ont des cibles biologiques y compris les protéines, les lipides et les glucides **(Mohamed et al., 2015).**

Cette réduction est probablement provoquée par la mobilisation de ces ressources pour l'initiation des processus de détoxification **Ait Hamlet et al. (2019).**

Une augmentation des protéines totales en fonction de la dose appliquée a été notée dans la présente étude chez les escargots traités par l'oxyde de fer comparés aux escargots témoins. Ceci peut être expliqué par une forte induction de protéines et de la synthèse d'enzymes de détoxification et de métabolisation sous l'effet du stress chimique produit par l'application d'oxyde de fer. Dans des conditions de stress, les escargots ont besoin de plus d'énergie pour détoxifier la substance toxique. Lorsque les escargots ont une quantité limitée de glucides et de lipides, la source d'énergie alternative pour répondre à la demande accrue d'énergie est les protéines **(Moussard, 1999).**

Les résultats de **Mounir et al. (2015)** montrent que la poussière métallique a divers doses de 100, 500, 1000 et 1500 µg a provoqué une augmentation significative des niveaux de protéines totales de manière dose-dépendante des escargots terrestre *Helix aspersa*, collecté d'un site non contaminé dans la région de Guelma ce qui est en accord avec ceux de **Grara et al. (2012)** dont, *Helix aspersa* a été exposée pendant une période de 28 jours à divers métaux (Cu, Zn, Ni et Pb), les résultats ont montré une augmentation significative de la teneur totale en protéines. De même, **Radwan & Mohamed. (2013)** ont observé une augmentation significative du taux de protéines chez la même espèce traitée avec 0,6 DL d'imidaclopride. Alors qu'El **Gohary & Genena, (2011)** a noté une diminution des teneurs en protéine totale.

Le stockage des métaux lourds dans les mollusques souvent induit l'augmentation des protéines de bas poids moléculaire appartenant à la famille des métallothionines (MT), qui jouent un rôle majeur dans l'homéostasie des métaux. Trois isoformes de MT sont connues (**Baurand et al., 2014**)

Nos résultats sont conformes avec ceux de (**Peccini et al., 1994; Masaya et al., 2002**) qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins). Dans le même ordre d'idées **Sbartai et al., (2009)**, ont montré que les manifestations toxiques du bifénazate (acaricide) sur la paramécie, ont été accompagnées par une induction dose dépendante de la synthèse protéique chez les paramécies.

Contrairement les résultats de **Radwan et al., (2008)** qui ont rapporté que l'effet significatif des deux carbamates testés sur la diminution des taux de protéines et des lipides au bout de 7 jours implique la possibilité que ces molécules exercent des effets cytotoxiques, qui dépendent fortement de l'interférence avec le niveau des lipoprotéines et le taux de biosynthèse. **Padmaja & Rao (1994)** ont suggéré que la diminution des lipides et des protéines tissulaire chez l'escargot *B. dissimilis* (Müller) après exposition aux pesticides peut être due à plusieurs mécanismes, parmi lesquels l'utilisation directe des protéines par les cellules pour subvenir aux besoins énergétiques.

En effet, **Eissa et al. (2002)** ont rapporté que l'effet nocif de composés chimiques pourrait être attribué à l'augmentation de l'utilisation de l'énergie et/ou à l'altération des organites des cellules (des escargots traités) et qu'ils peuvent interférer avec la synthèse des protéines.

Les carbohydrates constituent la source première et immédiate d'énergie (**Moussard, 1999**). Dans les conditions de stress, les réserves d'hydrates de carbone sont épuisées pour satisfaire les demandes énergétiques (**Arasta et al., 1996**).

les travaux d'**El-Wakil & Radwan (1991)** et **Padmaja & Rao (1994)** suggérés que la diminution du taux de glycogène dans les tissus de l'escargot d'eau douce *Bellamyadissimilis*(Müller), exposé à l'Endosulfan, le Méthyl parathion, le Quinalphos et le Nuvan peut être due à l'utilisation du glycogène pour générer l'énergie nécessaire pour faire face à l'hypoxie provoquée par ces nanoparticules.

La déplétion en glycogène des tissus hépatiques peut être également interprétée comme une réponse non spécifique au stress chimique avec cependant des conséquences sur la mobilisation à long terme des réserves énergétiques et ainsi sur la sensibilité au stress et la susceptibilité des individus aux maladies (**Schwaigeret al,1997**).

Baturo et al. (1995) observent une stimulation de l'activité enzymatique d'hydrolyse des polysaccharides et une réduction de la teneur en glycogène dans le manteau et la masse viscérale, **Jumel & Lagadic (2000)** rapportent une augmentation de la demande énergétique des animaux qui se traduit par une mobilisation rapide des réserves de glycogène du manteau et une diminution de la teneur en protéine et de la masse de la glande à albumen.

Dans l'étude de **Barky et al. (2012)** l'effet toxique de l'atrazine a provoqué une augmentation de la concentration de glucose chez les escargots *Biomphalaria alexandrina*. Contrairement aux travaux de **Radwan et al. (2008)** ont indiqué une diminution significative du taux de glucides.

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation des lipides d'hémolymphe après le traitement des individus de *Helix aspersa* avec l'oxyde de fer.

Selon **Aurousseau. (2002)** les radicaux oxygénés libres sont toxique via la dégradation des lipides, De plus les métaux comme le Cuivre et le Fer ont été largement utilisés comme agents initiateurs de l'oxydation des lipides (**Nzengue , 2008.**)

Ces résultats sont confrontés avec ceux de (**Padmaja & Rao., 1994**)qui ont mis en évidence une diminution des taux de lipides dans les tissus de *B.dissimilis* exposés aux pesticides. De même pour 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. Ainsi que, les travaux de **Grara et al., (2012c)**,ont mis en

évidence une baisse significative du taux des lipides au niveau des deux organes étudiés. Ceci peut être dû à l'attaque radicalaire des membranes qui a pour conséquence des perturbations de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (**Lawton & Donaldson, 1991**).

Halliwell & Chirico, (1993) indiquent que les effets spécifiques d'une attaque radicalaire se manifestent à l'échelle cellulaire par une peroxydation lipidique induisant des perturbations prononcées du fonctionnement cellulaire.

Boshoff et al. (2015) indiquant que les concentrations de biomarqueurs (lipides, glycogène, protéines) n'étaient pas liées aux concentrations de métaux dans la glande digestive des escargots *Cepaea nemoralis*.

Pal et al. (2017) avancent que la toxicité des nanoparticules est due à leurs formes, **Guimont. (2005)** rapporte que la toxicité des nano-objets était en fonction de la taille ou de l'état d'agglomération.

Les conditions expérimentales différentes peuvent également induire des résultats de toxicité différents. L'absorption de nanoparticules par ces cellules représente une voie d'entrée potentielle, où les nanoparticules vont d'abord passer par le système lymphatique, pour ensuite rejoindre le système sanguin et les organes distants. D'autres voies de pénétration sont aussi suspectées, tel le passage à travers les jonctions épithéliales ou la transcytose de cellules épithéliales (**Koeneman et al. 2010**).



CONCLUSION ET PERSPECTIVE

CONCLUSION

L'objectif principal de notre travail est d'étudier les effets des nanoparticules d'oxyde de fer chez l'escargot terrestre *Helix aspersa*.

On a choisi ce type de gastropode terrestre car ce sont des indicateurs de la qualité des écosystèmes terrestres, ils sont connus par leur pouvoir accumulateurs et peuvent répondre à la pollution d'une manière sensible et mesurable. Ils sont donc employés comme des sentinelles de la pollution environnementale dans les sols contaminés par des polluants métalliques et organiques.

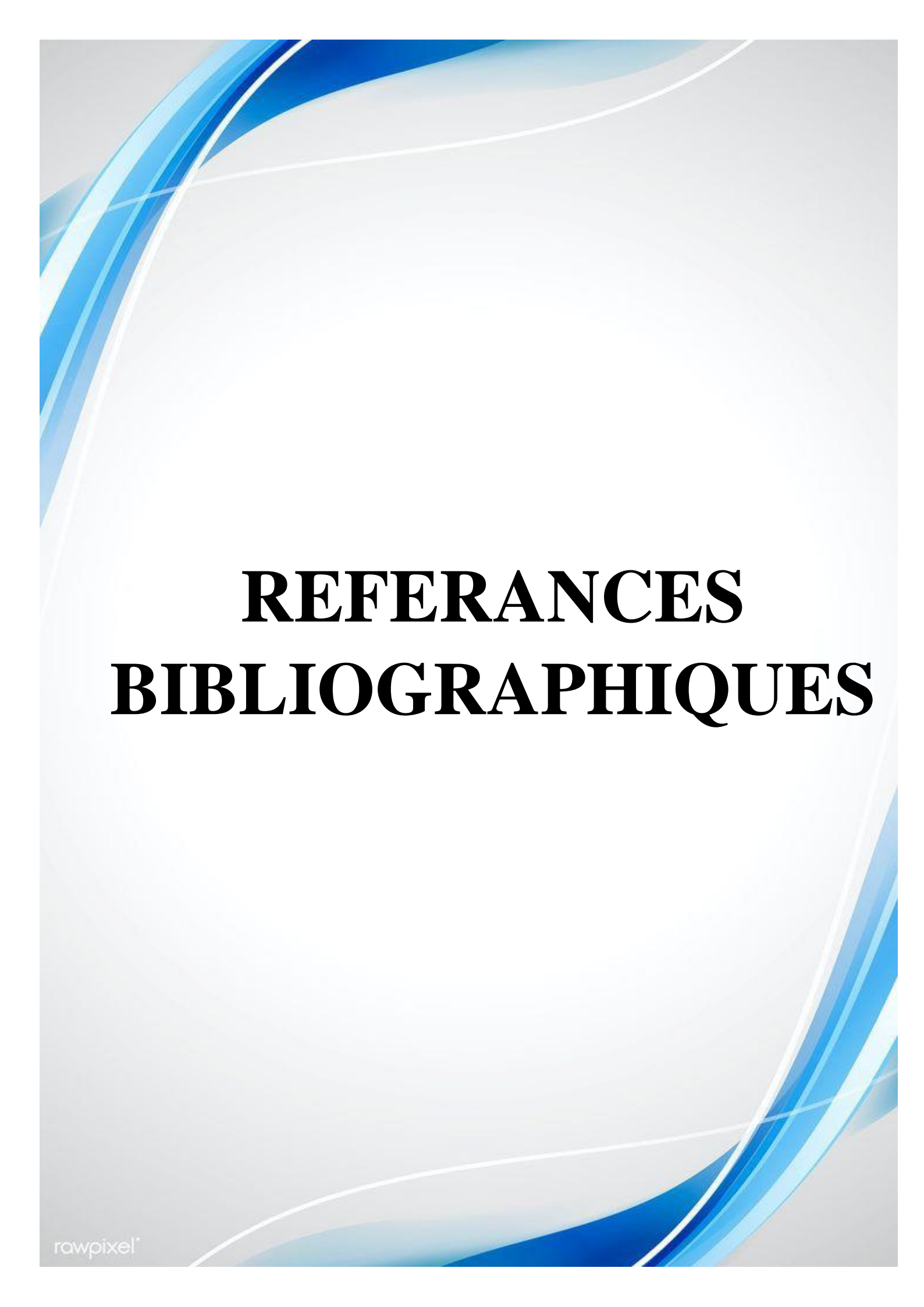
Au cours de cette étude nous avons choisi de suivre le taux des protéines, des lipides et des glucides au niveau de l'hémolymphe.

Nous avons mis en évidence que le taux des protéines dans l'hémolymphe augmente d'une manière dose –dépendante alors qu'une diminution dans les taux des glucides et des lipides a été notée chez les traités en présence des nanoparticules d'oxyde de fer par rapport aux témoins.

Enfin, nous pouvons confirmer que les nanoparticules d'oxyde de fer à fortes concentrations entraînent des effets délétères qui se traduisent par des perturbations au niveau des métabolites d'hémolymphe des escargots *Helix aspersa*. Mais l'effet protecteurs de ce type de molécules nanométriques semble induit par les faibles concentrations (500 et 1000 μ g/g de farine).

Perspective :

- ✓ En vue de l'importance des nanoparticules, il serait intéressant de suivre la recherche afin de bien connaître leur effet sur les organes d'*Helix aspersa* (hépatopancréas, Rein, poumon,....).
- ✓ Conduire cette recherche sur d'autres modèles biologiques.
- ✓ Faire le même type d'étude sur un autre type de NP métalliques.
- ✓ Doser les bio-marqueurs du stress oxydant (GSH, GST, GPx, MDA et CAT) au niveau de l'hémolymphe
- ✓ Réaliser des tests de micro noyaux sur les hémocytes hémolympatique.



REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Ansart A. et Vernon P., 2003.** Cold hardiness in molluscs. *Acta Oecologica*, 24 : (95-102)
- **Ataillia, A. 2017.** Impact de la pollution industrielle (métaux lourds) sur le développement et la reproduction de l'escargot *Helix aspersa*: Effets sur les biomarqueurs. Mémoire de doctorat, Université Bdji-Mokhtar. Annaba. P 27
- **Aït Hamlet S., Djekoun M., Bensoltane S., Berrebbah H. 2019.** Effets du thiamethoxame et de la tefluthrine sur les biomarqueurs physiologiques de l'escargot terrestre *Helix aspersa*. *Revue Agrobiologia*. Algérie, (1491-1498)P.
- **Arasta T., Bais V.S., Thakur P., 1996.** Effect of Nuvan on some biological parameters of Indian catfish, *Mystus vittatus*. *Journal of Environmental Biology*. 17: 167-169.
- **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.
- **Alberts B., Johnson A., Lewis J. 1983.** The extracellular matrix of the animals. In *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science, New York. 692-713 p.
- **A.K. Gupta, M. Gupta. 2005.** Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 26 (18), 3995–4021

B

- **Bonnet J.G., Aupinel P. et Vrillon J. L. 1990.** L'escargot *Helix aspersa*, biologie-élevage ; Institut National de l'Agronomie, Paris, 124p
- **Barker G.M. 2001.** The Biology of Terrestrial Molluscs. CABI Publishing, New York. p : 499.
- **Belhaouchet, N. 2014.** Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix aspersa* ». Mémoire de doctorat, Université Bdji Mokhtar. Annaba. P 13-14.
- **Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method of the quantitation microgram quantities of Protein utilising the principle of dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248 - 254.
- **Besnaci, S. 2016.** Evaluation de la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer « Fe_2O_3 » sur un bioindicateur de pollution terrestre : *Helix aspersa*. Mémoire de doctorat, Université Bdji Mokhtar. Annaba. P 24-56.
- **Bondy, S. C. (2011).** "Nanoparticles and colloids as contributing factors in neurodegenerative disease." *Int J Environ Res Public Health* 8(6): 2200-2211.
- **Berry C.C., Wells S., Charles S., Aitchison, G. et Curtis A.S.C., 2004 (b).** Cell response to dextran derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*, 25(23): 5405-5413.

Bibliographie

- **Berry, C.C., Wells, S., Charles, S., Aitchison, G. et Curtis, A.S.C. 2003.** Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24(25): 4551-4557.
- **Baturo W., Lagadic L., Caquet T., 1995.** Growth, fecundity and glycogen utilization in *Lymnaea palustris* (Mollusca: Gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14: 503-511.

C

- **Coeurdassier M. 2001.** Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnaea stagnalis* et *Lymnaea palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques. Thèse de doctorat. Université de France comté. France. 281p.
- **Chuto, G. Chaumet-Riffaud, P.** le groupe Oncologie de la société française de médecine nucléaire et imagerie moléculaire (SFMN). 2010. Les nanoparticules. *Médecine nucléaire* 34: p 370-376.
- **Casals, E., S. Va'zquez-Campos, N.G. Bastu's, V. Puentes (2008).** "Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems". *Trends in Analytical Chemistry*, 27(8): 672-683.
- **Crosera, M., M. Bovenzi, G. Maina, G. Adami, C. Zanette, C. Florio and F. Filon Larese (2009).** "Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature." *Int Arch Occup Environ Health* 82(9): 1043-1055.
- **Chithrani, B. D., A. A. Ghazani and W. C. Chan (2006).** "Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells." *Nano Lett* 6(4): 662-668.
- **Chithrani, B. D., A. A. Ghazani and W. C. Chan (2006).** "Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells." *Nano Lett* 6(4): 662-668.
- **CERADEL. (2012).** Fiche d'information produit: d'oxyde fer rouge. FDS N°: P018. Version: 01/2012. 1-10.

D

- **Duchateau, G. & Florkin, M. (1959).** Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **67**: 306-314.
- **Demangeat, E. 2018.** Devenir des nanoparticules dans l'environnement : stabilité colloïdale, réactivité chimique et impacts sur le végétal. Sciences de la Terre. Université Rennes 1. Français. P 19-27.
- Definition of a nanomaterial, **Journal officiel de la commission de l'Union Européenne**, 18/11/2011.
- **Dixon, A.F.G. (1998).** Aphid ecology: An optimization approach. 2nd edn

E

- **El-Wakil H.B., Radwan M.A. 1991.** Biochemical studies on the terrestrial snail *Eobania vermiculata* (Müller) and *Thebapisana* ((Müller) treated with some pesticides. *Journal of Environmental Science Health*. B34: 47-60.
- **Eissa S.H., Rizk E.T., Abou-Shafey A.E., Mona M.H., Atlum A., 2002.** Toxicological effect on *Euphorbia peplus* water suspension on heamocytes of the fresh water snails, *Biomphalariaalexandrina* and *Lanistes carinatus*. *Proc LCBS*. 2: 417-447.

F

- **Fubini, B., M. Ghiazza and I. Fenoglio (2010).** "Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity." *Nanotoxicology* 4: 347-363.
- **Forman, H. J. and M. Torres (2002).** "Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling." *Am J Respir Crit Care Med* 166(12 Pt 2): S4-8.
- **Forbes V.A., Forbes T.L., Rivière J.-L., 1997.** *Écotoxicologie: théorie et applications*. Editions Quae, Paris. 424 p.

G

- **Gomot A., et Pihan F., 1997.** Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*.38. 85-94.
- **Goldsworthy, A. C., Mordue, W. & Guthkelch, J. (1972).** Studies on insect adipokinetic hormone. *General and Comparative Endocrinolog*. **18**: 306-314.
- **Grara, N. Atailia, A. Boucenna, M. Khaldi, F. Berrebbah, H. Reda Djebar, M. 2012.** Effects of Heavy Metals on the Snails *Helix-aspersa* Bioindicators of the Environment Pollution for Human Health. *International Conference on Applied Life Sciences (ICALS)*. P 242.
- **Grieneisen, M. L. (2010).** "The proliferation of nano journals." *Nat Nanotechnol* 5(12): 825.
- **Gottschalk, F. and B. Nowack (2011).** "The release of engineered nanomaterials to the environment." *J Environ Monit* 13(5): 1145-1155.
- **Gaiser, B. K., T. F. Fernandes, M. Jepson, J. R. Lead, C. R. Tyler and V. Stone (2009).** "Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments." *Environ Health* 8 Suppl 1: S2.
- **Guimont S. 2005.** Devenir des pesticides dans les sols en fonction de l'état d'humidité et du mode de circulation de l'eau dans le sol. Thèse de Doctorat : Sciences Agronomiques. Institut national polytechnique de Lorraine, France, 214p

H

- **Hsiao, I. L. and Y. J. Huang (2011).** "Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells." *Sci Total Environ* 409(7): 1219-1228.
- **Hackenberg, S., A. Scherzed, A. Technau, M. Kessler, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, M. Burghartz, R. Hagen and N. Kleinsasser (2011).** "Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro." *Toxicol In Vitro* 25(3): 657-663.
- **Halliwell, B., and Chirico, S., 1993.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition* 57, 715S-724S; discussion 724 S-725 S.
- **Hoffmann, A.A., Parsons, P.A. (1991).** *Evolutionary Genetics and Environmental Stress.* (Eds), Oxford University Press, New York, USA. 284 p
- **Hu C.W., Li M., Cui Y.B., Li D.S., Chen J., Yang L.Y. 2010.** Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol Biochem.* 42: 586-91.

J

- **Jiang, W., B. Y. Kim, J. T. Rutka and W. C. Chan (2008).** "Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent." *Nat Nanotechnol* 3(3): 145-150.
- **Jugan, M. L., S. Barillet, A. Simon-Deckers, N. Herlin-Boime, S. Sauvaigo, T. Douki and M. Carriere (2012).** "Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells." *Nanotoxicology* 6(5): 501-513.
- **Jugan, M. L., S. Barillet, A. Simon-Deckers, S. Sauvaigo, T. Douki, N. Herlin and M. Carrière (2011).** "Cytotoxic and genotoxic impact of TiO₂ nanoparticles on A549 cells." *J Biomed Nanotechnol* 7(1): 22-23.
- **Jeng, H. A. and J. Swanson (2006).** "Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells." *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 41(12): 2699-2711.
- **Jugan, M. L., S. Barillet, A. Simon-Deckers, N. Herlin-Boime, S. Sauvaigo, T. Douki and M. Carriere (2012).** "Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells." *Nanotoxicology* 6(5): 501-513.
- **Jumel A., Lagadic L., 2000.** Metabolism of polysaccharides in *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) exposed to 4-nonylphenol and nonylphenol dodecylethoxylate in mesocosms. *Third SETAC World Congress. Global Environmental Issues in the 21th Century: Problems, Causes and Solutions.* Brighton, Angleterre.
- **J. Lee, T. Isobe, M. Senna. 1996.** Preparation of ultrafine Fe₃O₄ particles by precipitation in the presence of PVA at high pH, *J. Colloid Interface Sci*, 177 (2), 490–494.

K

- **Kerney M., Cameron R. et Bertrand A. 2006.** A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe. Delachaux et Niestlé SA, Paris, 2006, 288 p.
- **Kahru, A. and K. Savolainen (2010).** "Potential hazard of nanoparticles: from properties to biological and environmental effects." *Toxicology* 269(2-3): 89-91.
- **Kahru, A. and H. C. Dubourguier (2010).** "From ecotoxicology to nanoecotoxicology." *Toxicology* 269(2-3): 105-119.
- **Kahru, A. and A. Ivask (2012).** "Mapping the Dawn of Nanoecotoxicological Research." *Acc Chem Res*.
- **Kulvietis, V., V. Zalgeviciene, J. Didziapetriene and R. Rotomskis (2011).** "Transport of nanoparticlesthrough the placental barrier." *Tohoku J Exp Med* 225(4): 225-234.
- **Karlsson, H. L., J. Gustafsson, P. Cronholm and L. Möller (2009).** "Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size." *Toxicol Lett* 188(2): 112-118.
- **Kelly, F. J. (2003).** "Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects." *Occup Environ Med* 60(8): 612-616.
- **Karlsson, H. L., P. Cronholm, J. Gustafsson and L. Möller (2008).** "Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes." *Chem Res Toxicol* 21(9): 1726-1732.
- **Kao, Y. Y., Y. C. Chen, T. J. Cheng, Y. M. Chiung and P. S. Liu (2012).** "Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity." *Toxicol Sci* 125(2): 462-472.
- **Kim, I. S., M. Baek and S. J. Choi (2010).** "Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells." *J Nanosci Nanotechnol* 10(5): 3453-3458.
- **Kwon, Y. M., Z. Xia, S. Glyn-Jones, D. Beard, H. S. Gill and D. W. Murray (2009).** "Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages in vitro." *Biomed Mater* 4(2): 025018.
- **Koeneman B. A., Zhang Y., Westerhoff P., Chen Y., Crittenden J. C., Capco, D. G. 2010.** Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol Toxicol*,26, 225-238

L

- **Li, J. J., S. Muralikrishnan, C. T. Ng, L. Y. Yung and B. H. Bay (2010).** "Nanoparticle-induced pulmonary toxicity." *Exp Biol Med (Maywood)* 235(9): 1025-1033.
- **Letellier, C. 2010.** Capacité antioxydante chez les hélicidés : variation intra spécifiques et interspécifiques. Master 2 EFCE. UMR 6553, équipe S.C.A. P 07.
- **Lanone, S., F. Rogerieux, J. Geys, A. Dupont, E. Maillot-Marechal, J. Boczkowski, G. Lacroix and P. Hoet (2009).** "Comparative toxicity of 24

Bibliographie

manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines." Part Fibre Toxicol 6: 14.

- **Lawton L.J., Donaldson W.E. 1991.**Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxydation. Biol. Trace Elem. Res. 28 :93-97.
- **Little E.E, Archeski R.D., Flerov B.A. & Koslovskay V.I.1990.**Bihavioural indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. Environ. Contam. Toxicol.19: 380-385.
- **Lapied E., Moudilou E., Exbrayat J.M., Oughton H., Joner E.J. 2010.** Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (*Oligochaeta*). Nanomedicine. 5:975-84.

M

- **Mebirouk, R. 2017.** Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique) : Activités anti-inflammatoire, anti tumorale et anti-antigénique. Mémoire de doctorat, Université des Frères Mentouri. Constantine. P 5-7.
- **Mueller, N. C. and B. Nowack (2008).** "Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment." Environ Sci Technol 42(12): 4447-4453.
- **Midander, K., P. Cronholm, H. L. Karlsson, K. Elihn, L. Möller, C. Leygraf and I. O. Wallinder (2009).**"Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: a cross-disciplinary study." Small 5(3): 389-399.
- **Muñoz, A. and M. Costa (2012).** "Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: a review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity." Toxicol Appl Pharmacol 260(1): 1-16.
- **Moussard C., 1999.** La biochimie, Biochimie structurale et métabolique, Médecine, Pharmacie, Sciences. De Boek&Larciers.a., Bruxelles. 294 p.
- **Masaya M., Yoshinobu H., Ai Y., Maki K. and Yasuo O. 2002.**Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury. Journal of Phycology. 38(5) : 983.
- **Moussard C. 1999.** La biochimie. Biochimie structurale et métabolique. Médecine.
- **McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M., Yu H., 2000.** Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 2085-2092.

N

- **Ngomsik A.-F., Bee A., Draye M., Cote G. and Cabuil V. 2005.**Magnetic nano- and microparticles for metal removal and environmental applications: a review. Comptes Rendus Chimie. 8(6-7): 963.

O

- **Osman, I. F., A. Baumgartner, E. Cemeli, J. N. Fletcher and D. Anderson (2010).** "Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells." *Nanomedicine (Lond)* 5(8): 1193-1203.
- **Ostiguy, C. Roberge, B. Woods, C. Soucy, B. 2010.** Les nanoparticules de synthèse. Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. 2^é édition. IRSST505, boul. De Maisonneuve Ouest Montréal (Québec). Rapport R-646. P 06-10.
- **Ophélie ZEYONS, 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 330p

P

- **Pirame Sandrine, 2003.** Contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit gris (*Helix aspersa*) reproduction expérimentale, « thèse de doctorat, université Paul Sabatier de Toulouse »
- **Petros, R. A. and J. M. DeSimone (2010).** "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications." *Nat Rev Drug Discov* 9(8): 615-627.
- **Porter, D. W., N. Wu, A. F. Hubbs, R. R. Mercer, K. Funk, F. Meng, J. Li, M. G. Wolfarth, L. Battelli, S. Friend, M. Andrew, R. Hamilton, K. Sriram, F. Yang, V. Castranova and A. Holian (2012).** "Differential mouse pulmonary dose and time course responses to titanium dioxide nanospheres and nanobelts." *Toxicol Sci* 131(1): 179-193.
- **Park, E. J., J. Yi, K. H. Chung, D. Y. Ryu, J. Choi and K. Park (2008).** "Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells." *Toxicol Lett* 180(3): 222-229.
- **Peralta-Videa, J. R., L. Zhao, M. L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong and J. L. Gardea-Torresdey (2011).** "Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010." *J Hazard Mater* 186(1): 1-15.
- **Palomäki, J., P. Karisola, L. Pylkkänen, K. Savolainen and H. Alenius (2010).** "Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells." *Toxicology* 267(1-3): 125-131.
- **Padmaja J.R., Rao M.B. 1994.** Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail, *Bellamya adamsi* (Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53: 142-148
- **Pharmacie. Sciences. De Boek&Larciers.a. Bruxelles. 294 p**
- **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
- **P. Reimer, T. Balzer, Ferucarbotran (Resovist).2003.** a new clinically approved RESspecific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications, *Eur. Radiol*, 2003, 13 (6), 1266–1276

Q

- **Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, J. Phys. D: Appl. Phys, 2003, 36, 167–181.)**

R

- **Radwan M.A., Essawy A.E., Abdelmeguid N.E., Hamed S.S., Ahmed A.E., 2008.** Biochemical and histochemical on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pesticides Biochemistry and Physiology*. 90: 154-167.
- **R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs, J. Lewis, Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity, AJR , 1989, 152 (1), 167–173**

S

- **Sandrine Quignard. 2013.** Comportement des nanoparticules de silice en milieu biologique : des cellules aux biomatériaux. Thèse de doctorat .Université pierre et marie curie.
- **Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyneck, C., New Hall, &Feidman, L. (1966).** A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *AnalyticalBiochemistry***19**: 415-528.
- **Simonin, M. 2015.****Dynamique, réactivité et écotoxicité des nanoparticules d'oxydesmétalliques dans les sols : impact sur les fonctions et la diversité des communautés microbiennes.** *Ecotoxicologie*. Université Claude Bernard -Lyon I. Français. P 16-31.
- **Sauer, U. G., C. Kneuer, J. Tentschert, T. Wächter, M. Schroeder, D. Butzke, A. Luch, M. Liebsch, B. Grune and M. E. Götz (2011).**"A knowledge-based search engine to navigate the information thicket of nanotoxicology." *Regul Toxicol Pharmacol* 59(1): 47-52.
- **Simkó, M. and M. O. Mattsson (2010).** "Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review." *Part Fibre Toxicol* 7: 42.
- **Sharma, V., D. Anderson and A. Dhawan (2011).** "Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2)." *J Biomed Nanotechnol* 7(1): 98-99.
- **Song, W., J. Zhang, J. Guo, F. Ding, L. Li and Z. Sun (2010).** "Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles." *Toxicol Lett* 199(3): 389-397.
- **Shaw, B. J. and R. D. Handy (2011).** "Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions." *Environ Int* 37(6): 1083-1097.
- **Seth, R., S. Yang, S. Choi, M. Sabeen and E. A. Roberts (2004).** "In vitro assessment of copper-inducedtoxicity in the human hepatoma line, Hep G2." *Toxicol In Vitro* 18(4): 501-509.

Bibliographie

- **Simon-Deckers, A., B. Gouget, M. Mayne-L'hermite, N. Herlin-Boime, C. Reynaud and M. Carrière (2008).** "In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes." *Toxicology* 253(1-3): 137-146.
- **Schwaiger J., Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Triebkorn R. 1997.** The use of histopathological indicators to evaluate contaminant -related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6: 75-86.
- **Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi, R., Sbartai H., Smaghe G. and Djebbar M.R. 2009.** Behavior of Paramecium sp. treated with bifentazate with special emphasis on respiratory metabolism. protein and generation time. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci.* 1.p.13-18
- **Sarah Triboulet. 2013.** Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique. *Sciences agricoles. Université de Grenoble. Français.NNT: 2013GRENV021. tel-01124157*
- **Sèmiyou Ayélé OSSENI, 2012.** NANOPATEFORMES HYBRIDES MULTIMODALES POUR L'IMAGERIE MÉDICALE Université de Toulouse III Paul Sabatier 166p)
- **Scott-Fordsmand J.J., Krogh P.H. 2004.** The influence of application form on the toxicity of nonylphenol to *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 58(3):294-299.

T

- **Tsakalacos T. 2003.** NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem. (Nanostructures: Synthesis, Functional Properties and Applications). Publisher Kluwer Academy, 1128p.

U

- **Unrine J.M., Hunyadi S.E., Tsyusko O.V., Rao W., Shoults-Wilson W.A., Bertsch P.M. 2010a.** Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms *Eisenia fetida*. *Environ Sci Technol*. 44:8308-13.
- **Unrine J.M., Tsyusko O.V., Hunyadi S.E., Judy J.D., Bertsch P.M. 2010b.** Effects of particle size on chemical speciation and bioavailability of Cu to earthworms *Eisenia fetida* exposed to Cu nanoparticles. *J Environ Qual*. 39:1942-53.

V

- **Valenzuela, P. and J. A. Simon (2012).** "Nanoparticle delivery for transdermal HRT." *Maturitas* 73(1): 74-80.

X

- **Xia, T., M. Kovoichich, M. Liang, L. Mädler, B. Gilbert, H. Shi, J. I. Yeh, J. I. Zink and A. E. Nel (2008).** "Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium

Bibliographie

oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties." ACS Nano 2(10): 2121-2134.

Y

- **Yang, Z., Z. W. Liu, R. P. Allaker, P. Reip, J. Oxford, Z. Ahmad and G. Ren (2010).** "A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system." J R Soc Interface 7 Suppl 4: S411-422.

Annexes

1/Effet des NPs sur le taux des protéines totales

Tableau 05: Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administrées par ingestion sur le taux des protéines hémolympatique des escargots *Helix aspersa* ($m \pm SD$, $n = 3$)

Paramètre	Témoïn	D1	D2	D3	D4	D5
Protéines ($m \pm SD$)	0,146 \pm 0,046 a	0,188 \pm 0,054 a	0,123 \pm 0,021 a	0,848 \pm 0,042 b	0,891 \pm 0,059 B	1,279 \pm 0,328 B

Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significatives au seuil $p < 0,05$.

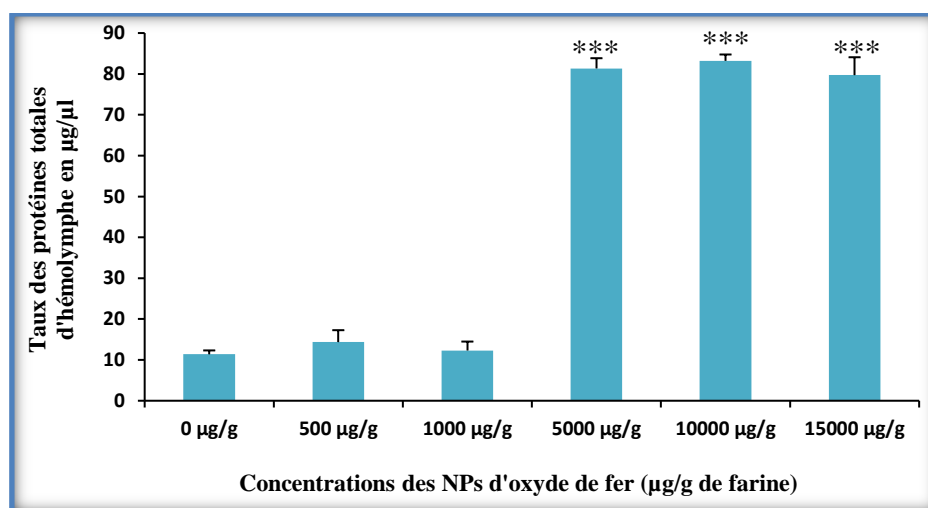


Figure16: Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administré par ingestion sur le taux des protéines hémolympatique des escargots *Helix aspersa*. ($m \pm SD$, $n = 3$).

2/ Effet des NPs sur le taux des glucides totaux

Tableau 06: Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administrées par ingestion sur le taux des glucides hémolympatique des escargots *Helix aspersa* ($m \pm SD$, $n = 3$).

Paramètre	Témoin	D1	D2	D3	D4	D5
Glucides (m ± SD)	80,819±1,733 A	75,066±3,511 a	54,066±4,163 b	52,73±3,385 b	25,733±0,577 B	29,4±2 b

Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significatives au seuil $p < 0,05$.

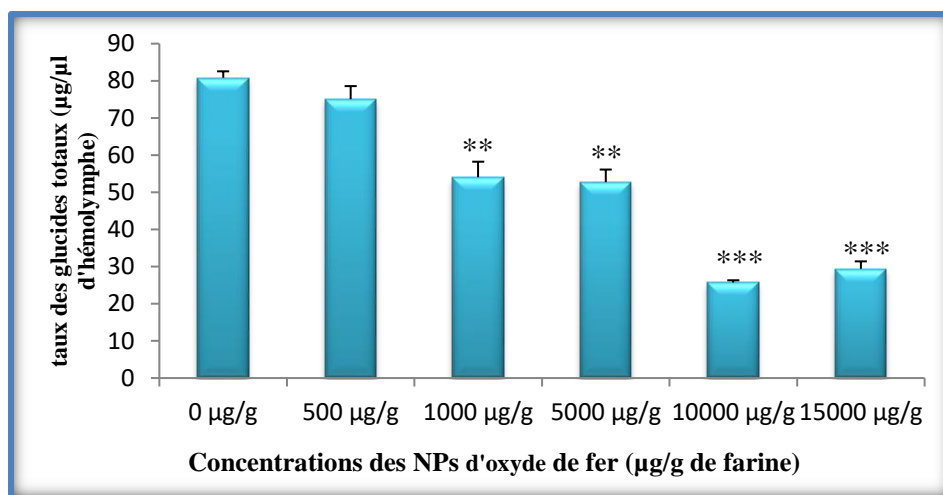


Figure 17 : Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administré par ingestion sur le taux des glucides hémolympatique des escargots *Helix aspersa*. (m ± SD, n=3).

3/Effet des NPs d'oxyde de fer sur le taux des lipides totaux

Tableau 07 : Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométriques administrées par ingestion sur le taux des lipides hémolympatique des escargots *Helix aspersa* (m ± SD, n = 3)

Paramètre	Témoin	D1	D2	D3	D4	D5
Lipides (m ± SD)	19,988±2,143 a	24,027±1,649 a	17,910±2,107 A	26,869±1,181 b	34,949±3,839 B	35,168±2,002 b

Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significatives au seuil $p < 0,05$.

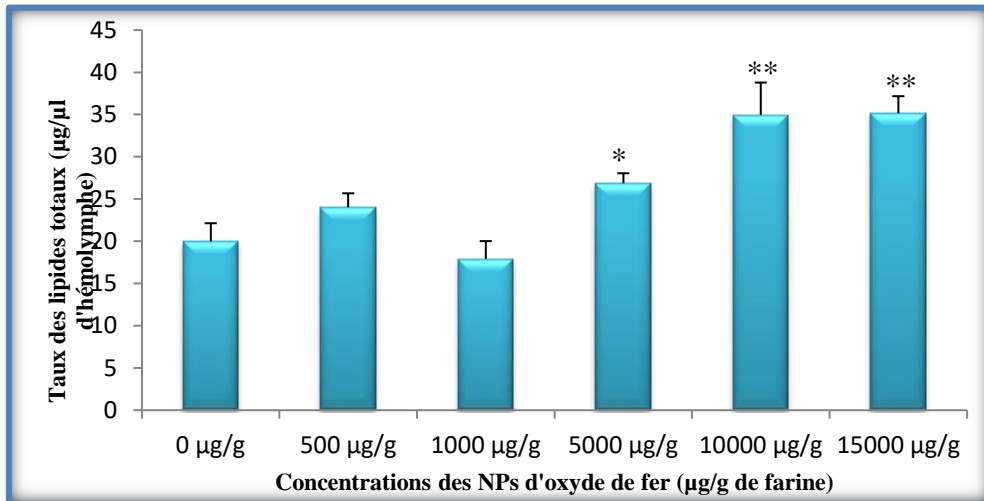


Figure 18 : Effet des différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique administré par ingestion sur le taux des lipides hémolympatique des escargots *Helix aspersa*. ($m \pm SD$, $n=3$).