

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955-سكيكدة  
UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



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

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Ecotoxicologie Animale  
Intitulé :

**Evaluation de la toxicité de mixtures de nanoparticules  
sur les juvéniles d'un bioindicateur de la pollution  
terrestre *Hélix aspersa***

Présenté Par : - Bouzellifa Fatima Zohra  
- Djama Nehla  
- Kerrout Nedjla

**Membres de Jury:**

Mme. Benzazia.S	Présidente	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Nadji.S	Encadrante	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Mellahi.L	Examinatrice	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2022/2023

# *Remerciements*

Avant tout, On remercie Allah qui nous a donné la patience et la force pour atteindre nos buts car sans lui rien n'aurait pu être.

Nos sincères remerciements vont à notre encadrante : Mme Nadji Safia, nous la remercions également pour sa disponibilité, son aide, ses conseils et ses orientations tout au long de cette recherche, et que dieu le bénisse.

Notre respect et reconnaissance sont adressés à Mme Benzazia S, et Mme Mellahi L, qui nous fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Nous tenons également à remercier l'équipage médical du service Annapath de l'EPH Skikda pour sa patience et sa contribution à la réalisation de la partie d'analyse histologique.

Il met est aussi agréable de remercier Mme Noura, ingénieure à laboratoire de chimie et aux ingénieures de nous avoir aidée, encouragé au long de ce travail.

Nous tenons également à remercier Mr Aouzele.B, pour son soutien, ses orientations et ses conseils.

On remercie tous ceux qui ont contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail.

Enfin un grand merci à tous ceux qui nous accompagné au cours de toutes ces années, famille et amis.

**Merci.**



## *Dédicace*

Je dédie ce travail à mes parents : **Bouzellifa Mourad** et **Lakhchine Khmisa**, eux qui m'ont offert l'un des plus beaux cadeaux de la vie, le savoir. Je leur dis merci pour tout ce qu'ils ont fait et continuent à faire pour moi.

A mon cher fiancé **Mr. Mansouria Abdelkrim**, à toute ma famille, à mes meilleurs collègues **Nehla** et **Nedjla**, à mes cousines **Douniazed**, **Hadjar** et **Rahma**, mes amis, **Rania**, **Amani**, **Ilhem**, **Jiji**, **Rayenne** et **Maissa** eux qui m'ont toujours soutenu dans les moments difficiles tout au long de mes études.

A tous ceux qui me sont chers.



**Fatima**



## *Dédicace*

En terme de reconnaissance, je dédie ce travail à : Ma douce et tendre  
mère NACIRA pour son amour, ces conseils précieux  
et son soutien moral.

Mon adorable père AISSA pour tous les efforts qu'il ne cessés de fournir  
pour mon éducation et ma réussite.

Mes adorable frères Djamel Eddine , Mouad, Yahya, Ma soeur Houda,  
Mon oncle Salim et la petite princesse Assil.

Mes meilleurs collègues de travail Fatima et Nadjla.

Et mes chères amies Ikram, yousra, Meriem, Manel, hadjer et khaoula.



**Nehla**



## *Dédicace*

À ma chère mère et mon cher père, merci pour votre sacrifice,

votre don, votre soutien, votre amour je vous aime

À mon mari bien-aimé Samir, qui m'a encouragé et soutenu merci

À ma petite princesse Rafif et à mon bébé à naître je vous aime

À mes adorables sœurs Roubi, Mimi, Sirin

À mes chères frères Adem et Anis À ma meilleure tante Asia

À mes deux famille "Kerrout" et "Zouggar"

À mes meilleurs binômes au travail (Djemma Nehla) et

(Bouzellifa fatima zohra)



**Nedjla**

### Résumé

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer les effets toxique des nanoparticules d'oxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), d'oxyde d'aluminium et de leurs mixtures appliqués par ingestion durant 4 semaines sur les juvéniles d' *H.aspersa* utilisées comme espèce sentinelle de la contamination des agrosystèmes. Les effets ont été testés sur quelques paramètres biométriques (poids des escargots, longueur et diamètre de la coquille) et biochimiques (contenue en protéines, glucides et lipides) de plus une étude histopathologique de l'hépatopancréas a été effectuée pour vérifier l'impact tissulaires.

L'exposition des juvéniles aux deux nanoparticules et leurs mixtures provoquent des altérations sur le gain du poids frais moyen des escargots, de la longueur et du diamètre de la coquille.

Nous avons mis en évidence aussi que la composition biochimique de l'hépatopancréas est affectée par les deux nanoparticules testés et leur mixture avec une augmentation significative des protéines et une diminution des taux des glucides et des lipides, cette diminution est plus marquée chez les escargots traités aux nanoparticules d'oxyde de titane.

Nous avons vu dans ce travail que la glande digestive est un organe très sensible, participant à la détoxification des xénobiotiques, à travers ces atteintes tissulaires, qui sont bien visibles au traitement au titane dès la plus faible dose testée.

**Mots clés:** Juvéniles, *Helix aspersa*, hépatopancréas, glucides, lipides, protéines, histopathologique.

### **Abstract:**

"The main objective of this study was to evaluate the toxic effects of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>), aluminum oxide nanoparticles, and their mixtures applied through ingestion for 4 weeks on *H.aspersa* juveniles used as sentinel species for agro-system contamination. The effects were tested on several biometric parameters (snail weight, length, and shell diameter) as well as biochemical parameters (protein, carbohydrate, and lipid content). Additionally, a histopathological study of the hepatopancreas was conducted to assess tissue impact.

Exposure of the juveniles to both nanoparticles and their mixtures resulted in alterations in the average fresh weight gain of the snails, as well as the length and diameter of the shell.

We also found that the biochemical composition of the hepatopancreas was affected by the two tested nanoparticles and their mixture, with a significant increase in protein content and a decrease in carbohydrate and lipid levels. This decrease was more pronounced in snails treated with titanium dioxide nanoparticles.

In this study, we observed that the digestive gland is a highly sensitive organ involved in the detoxification of xenobiotics, as evidenced by the visible tissue damage even at the lowest tested dose of titanium treatment.

**Keywords:** Juveniles, *Helix aspersa*, hepatopancreas, carbohydrates, lipids, proteins, histopathology."

### ملخص:

كان الهدف الرئيسي لهذه الدراسة هو تقييم التأثيرات السامة لجسيمات أكسيد التيتانيوم (TiO<sub>2</sub>) وأكسيد الألومنيوم ومزيجهما المطبقة عن طريق الابتلاع لمدة 4 أسابيع على الحلزونات الصغيرة H. ASPERSA التي تُستخدم كنوع حساس لتلوث النظم الزراعية. تم اختبار التأثيرات على بعض المعايير البيومترية (وزن الحلزون، طول وقطر القشرة) والبيوكيميائية (محتوى البروتين والكربوهيدرات والدهون)، وأجريت أيضًا دراسة هستوباثولوجية للكبد والبنكرياس للتحقق من التأثيرات النسيجية.

تسبب تعرض الحلزونات الصغيرة لكلتا الجسيمتين ومزيجهما في تغيرات في معدل زيادة الوزن الطازج للحلزونات وطول وقطر القشرة.

لاحظنا أيضًا أن التركيب البيوكيميائي للكبد والبنكرياس تأثر بالجسيمات المختبرة ومزيجهما مع زيادة ملحوظة في محتوى البروتين وانخفاض في مستويات الكربوهيدرات والدهون. كان هذا الانخفاض أكثر وضوحًا في الحلزونات التي تمت معالجتها بجسيمات أكسيد التيتانيوم.

في هذه الدراسة، لاحظنا أن الغدة الهضمية هي عضو حساس جدًا وتشارك في التطهير من المركبات الغريبة، كما يظهر ذلك من الأضرار المرئية على الأنسجة حتى عند أدنى جرعة تم اختبارها لعلاج التيتانيوم.

**الكلمات المفتاحية:** حلزونات صغيرة، HELIX ASPERSA، الكبد والبنكرياس، الكربوهيدرات، الدهون، البروتين، هستوباثولوجيا".

**Liste des abréviations**

**AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** : Oxyde d'Aluminium

**BBC** : Bleu Brillant de Coomassie

**ETM** : Élément Trace Métallique

**HE** : Hématoxyline –Eosine

**LMS** : Laboratoire de Magnétique Et Spectroscopie

**NAOH** : Hydroxyde de Sodium

**NPS** : Nanoparticules

**TCA** : Acide Trichloracétique

**TIO<sub>2</sub>** : Oxyde de Titane

**Sommaire**

Résumés .....	VI
Liste des abréviations .....	IX
Liste de figures .....	XIII
Liste de tableaux .....	XVI
<b>1. Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Matériel et Méthodes .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Matériel biologique .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1. Anatomie générale de l'escargot .....</b>	<b>5</b>
2.1.1.1. Anatomie externe de l'escargot .....	5
2.1.1.2. Anatomie interne de l'escargot .....	7
<b>2.1.2. Distribution géographique des escargots .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.3. Estivation et hibernation .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.4. Cycle de vie d'<i>Helix aspersa</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.5. Reproduction .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.6. Site de prélèvement de l'espèce .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.7. Technique d'échantillonnage et élevage .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Matériel chimique .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1. Présentation des deux nanoparticules .....</b>	<b>14</b>
2.2.1.1 Oxyde d'Aluminium .....	14
2.2.1.2. Dioxyde de titane(TiO <sub>2</sub> ) .....	16
<b>2.3. Elevage et traitement des escargots .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4. Dissection et prélèvement de l'organe .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5. Paramètres étudiés .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5.1. Paramètres morphométriques .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5.2. Paramètre biochimiques .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5.2.1. Extraction et dosage des métabolites .....</b>	<b>19</b>
2.5.2.1.1. Dosage des protéines .....	21
2.5.2.1.2. Dosage des glucides .....	21
2.5.2.1.3. Dosage des lipides .....	22
<b>2.5.2.2. Analyses histologiques .....</b>	<b>22</b>
2.5.2.2.1. La fixation des organes .....	23
2.5.2.2.2. L'inclusion .....	23

2.5.2.2.3. Les coupes .....	23
2.5.2.2.4. Les colorations .....	23
2.5.2.2.5. Le montage .....	24
2.5.2.2.6. Observation microscopique .....	24
2.5.2.3. Analyse statistique .....	24
<b>3. Résultats .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. L'effet des nanoparticules AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et TiO<sub>3</sub> et leurs mixture sur l'évolution des paramètres morphométriques .....</b>	<b>25</b>
3.1.1. Effet de nanoparticule d'oxyde d'Aluminium sur l'évolution du poids des escargots .....	25
3.1.2. Effet de nanoparticule d'oxyde d'Aluminium sur la longueur de la coquille des escargots .....	26
3.1.3. Effet de nanoparticule d'oxyde d'Aluminium sur la largeur de la coquille des escargots .....	26
3.1.4. Effet de nanoparticule de l'oxyde de Titane sur l'évolution du poids des escargots .....	27
3.1.5. Effet de nanoparticule d'oxyde de Titane sur l'évolution de la longueur de la coquille des escargots .....	28
3.1.6. Effet de nanoparticule d'oxyde de Titane sur la largeur de la coquille des escargots .....	29
3.1.7. Effet des mixtures des nanoparticules (l'oxyde d'aluminium + l'oxyde de titane) sur l'évolution du poids des escargots .....	30
3.1.8. Effet des mixtures des nanoparticules d'oxyde d'Aluminium et d'oxyde de Titane sur la longueur de la coquille des escargots .....	31
3.1.9. Effet des mixtures des nanoparticules (l'oxyde d'Aluminium + d'oxyde de Titane) sur la largeur de la coquille des escargots .....	32
<b>3.2. Effets des nanoparticules sur l'évolution des Paramètres biochimiques .....</b>	<b>33</b>
3.2.1. Évolution du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule d'oxyde d'aluminium .....	33
3.2.2. Évolution du taux de glucides totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule d'oxyde d'aluminium .....	34
3.2.3. Évolution du taux de lipides totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule d'oxyde d'aluminium .....	35

3.2.4. Évolution du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule dioxyde de titane .....	36
3.2.5. Évolution du taux de glucides totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule dioxyde de titane .....	37
3.2.6. Évolution du taux de lipides totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule dioxyde de titane .....	38
3.2.7. Évolution du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par la mixture du nanoparticules AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + TiO <sub>2</sub> .....	38
3.2.8. Évolution du taux de glucides totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par la mixture du nanoparticules AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + TiO <sub>2</sub> .....	39
3.2.9. Évolution du taux de lipides totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par la mixture du nanoparticules AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + TiO <sub>2</sub> .....	40
3.3. Aspect histopathologique .....	42
3.3.1 Effets de nanoparticule d'oxyde d'aluminium (AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) .....	42
3.3.2 Effets des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO <sub>2</sub> ) .....	44
3.3.3. Effets des mélanges de nanoparticule d'AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> et TiO <sub>2</sub> .....	45
4. Discussion .....	48
4.1. Effets des nanoparticules (AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> de TiO <sub>2</sub> et des mélanges) sur les paramètres biométriques chez <i>Helix aspersa</i> .....	49
4.2. Effets des nanoparticules (AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , de TiO <sub>2</sub> et des mélanges) sur les paramètres biochimiques chez <i>Helix aspersa</i> .....	50
4.3. Effet des nanoparticules (AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , TiO <sub>2</sub> et des mélanges) sur le taux des protéines .....	50
4.4. Effet des nanoparticules (AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , TiO <sub>2</sub> et des mélanges) sur le taux des glucides	51
4.5. Effet des nanoparticules (AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , TiO <sub>2</sub> et des mélanges) sur le taux des lipides	52
4.6. Effet d'oxyde d'Aluminium, d'oxyde de titane et leurs mélanges sur l'histologie de l'hépatopancréas .....	52
5. Conclusion et perspectives .....	54
Références bibliographiques .....	55

**Liste de figures**

**Figure 2.1:** L'escargot *Helix aspersa* (photo originale) ..... 5

**Figure 2.2:** Escargot en extension (Bonnet, 1990) ..... 6

**Figure 2.3 :** La coquille d'escargot petit gris (photo originale) ..... 6

**Figure 2.4 :** Anatomie interne de l'escargot (www.nature-scientia.com) ..... 8

**Figure 2.5 :** Distribution géographique de l'espèce *Helix aspersa* (Madec, 1989) ..... 9

**Figure 2.6 :** Croissance et survie de l'escargot (www.heliciculture-vendee.netai.net) ..... 11

**Figure 2.7 :** L'accouplement des escargots (www.élevage-escargots.com) ..... 11

**Figure 2.8 :** Ponte d'une certaine d'œufs (www.helixa.blogspot.com) ..... 12

**Figure 2.9 :** Situation géographique de la commune de Boumaiza (Wikipédia, google earth) ..... 13

**Figure 2.10 :** Les appareils utilisés pour le Broyage des oxydes métalliques ..... 14

**Figure 2.11 :** Les nanoparticules de l'oxyde d'Aluminium ..... 15

**Figure 2.12 :** Les nanoparticules de l'oxyde de titane ..... 16

**Figure 2.13 :** la dissection de l'escargot. (Photo originale)..... 17

**Figure 2.14 :** Mesure des deux diamètres D et L de *Helix aspersa* (Coourdassier, 2001). ... 19

**Figure 2.15 :** Mesure des deux diamètres D et L de *Helix aspersa* (Photos originales) ..... 19

**Figure 2.16:** Principales étapes d'extraction des protéines, glucides et lipides selon Shibko *et al.* (1966) ..... 20

**Figure 3.1 :** L'évolution du poids relatifs des escargots traités par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde d'aluminium en fonction du temps ..... 25

**Figure 3.2 :** L'évolution de la longueur de la coquille chez les traités par les nanoparticules d'oxyde d'Aluminium ..... 26

**Figure 3.3 :** L'évolution de la largeur de la coquille chez traités par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde d'aluminium ..... 27

**Figure 3.4 :** L'évolution du poids moyen des escargots traités par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde de Titane ..... 28

**Figure 3.5 :** L'évolution de la longueur de la coquille chez les traités par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde de Titane ..... 29

**Figure 3.6 :** L'évolution de la largeur de la coquille chez les traités par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde de Titane ..... 30

**Figure 3.7 :** L'évolution du poids relatifs des escargots traités par différentes concentrations des mixtures (l'oxyde d'aluminium + l'oxyde de titane) ..... 31

## ***LISTE DE FIGURES***

---

<b>Figure 3.8 :</b> L'évolution de la longueur de la coquille chez les traités par différentes concentrations (d'oxyde d'Aluminium + d'oxyde de Titane) .....	<b>32</b>
<b>Figure 3.9 :</b> L'évolution de la largeur de la coquille chez les traités par différentes concentrations (d'oxyde d'Aluminium + d'oxyde de Titane).....	<b>33</b>
<b>Figure 3.10 :</b> Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule Oxyde d'aluminium sur l'évolution du taux de protéines au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Hélix aspersa</i> .....	<b>34</b>
<b>Figure 3.11 :</b> Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule Oxyde d'aluminium sur l'évolution du taux de glucides au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Hélix aspersa</i> .....	<b>35</b>
<b>Figure 3.12 :</b> Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule Oxyde d'aluminium sur l'évolution du taux de lipides au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Hélix aspersa</i> .....	<b>36</b>
<b>Figure 3.13 :</b> Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule dioxyde de titane sur l'évolution du taux de protéines au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Hélix aspersa</i> .....	<b>37</b>
<b>Figure 3.14 :</b> Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule dioxyde de titane sur l'évolution du taux de glucides au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Hélix aspersa</i> .....	<b>37</b>
<b>Figure 3.15 :</b> Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule dioxyde de titane sur l'évolution du taux de lipides au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Hélix aspersa</i> .....	<b>38</b>
<b>Figure 3.16 :</b> Effet du traitement par des concentrations croissantes de la mixture des nanoparticules Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> et TiO <sub>2</sub> sur l'évolution du taux de protéines au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Hélix aspersa</i> .....	<b>39</b>
<b>Figure 3.17 :</b> Effet du traitement par des concentrations croissantes de la mixture des nanoparticules Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> et TiO <sub>2</sub> sur l'évolution du taux de glucides au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Hélix aspersa</i> .....	<b>40</b>
<b>Figure 3.18 :</b> Effet du traitement par des concentrations croissantes de la mixture des nanoparticules Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> et TiO <sub>2</sub> sur l'évolution du taux de lipides au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Hélix aspersa</i> .....	<b>41</b>
<b>Figure 3.19 :</b> Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (G×10), (G×40).....	<b>42</b>
<b>Figure 3.20 :</b> Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par 250 µg/g de nanoparticule d'oxyde aluminium (G×10) . (G×40).....	<b>43</b>

## ***LISTE DE FIGURES***

---

<b>Figure 3.21</b> : Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traités par 500 µg/g de nanoparticule d'oxyde aluminium (G×10), (G×40) .....	<b>43</b>
<b>Figure 3.22</b> : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par 750 µg/g de nanoparticule d'oxyde d'aluminium (G×40), (G×10) .....	<b>44</b>
<b>Figure 3.23</b> : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par 250 µ g/g de nanoparticule de d'oxyde de titane. (G×10), (G×40) .....	<b>44</b>
<b>Figure 3.24</b> : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par 500 µg/g de nanoparticule de d'oxyde de titane. (G×10), (G×40).....	<b>45</b>
<b>Figure 3.25</b> : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par 750µg/g de nanoparticule de d'oxyde de Titane. (G×10), (G×40).....	<b>45</b>
<b>Figure 3.26</b> : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par la mixture 1 des nanoparticules (G×10), (G×40).....	<b>46</b>
<b>Figure 3.27</b> : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par la mixture 2 des nanoparticules (G×10), (G×40).....	<b>46</b>
<b>Figure 3.28</b> : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par la mixture 3 des nanoparticules (G×10), (G×40).....	<b>47</b>

**Liste de tableaux**

**Tableau 2.1** : Propriétés physico –chimique de l’oxyde d’aluminium ..... **15**

**Tableau 2.2** : Propriétés physico –chimique de l’oxyde de titane ..... **16**

**Tableau 2.3** : Réalisation de la gamme d’étalonnage pour la quantification des protéines ... **21**

**Tableau 2.4** : Réalisation de la gamme d’étalonnage pour la quantification des glucides .... **21**

**Tableau 2.5** : Réalisation de la gamme d’étalonnage pour la quantification des lipides ..... **22**



# ***Introduction***

## **1. Introduction:**

Depuis la révolution industrielle, l'empreinte de l'homme sur son environnement devient de plus en plus importante. Les activités humaines sont en constante évolution et les procédés industriels changent avec chaque nouvelle avancée technologique. Depuis le début du nouveau millénaire, le domaine d'innovation qui progresse le plus rapidement est sans aucun doute la nanotechnologie (François, 2012).

Les nanotechnologies sont définies comme l'ensemble des techniques visant à concevoir, caractériser et produire des matériaux à l'échelle du nanomètre dans au moins une de leurs dimensions. Ces nanomatériaux sont eux-mêmes constitués de nano-objets (nanoparticules, nanotubes...). Leur dimension nanométrique leur confère, du fait des lois de la physique quantique, de nouvelles propriétés physicochimiques et des comportements inédits (Andujar *et al*, 2009).

Le développement des nanotechnologies est en plein essor depuis une dizaine d'années (Grara *et al*, 2015). En effet, Les applications technologiques sont nombreuses notamment dans les secteurs industriels innovants, tels que l'industrie cosmétique (écrans solaires, rouges à lèvres, pâtes dentifrices...), l'industrie automobile (peintures, pneumatiques, lubrifiants, pare-brise...), le secteur de la santé (pharmacocinétique et biodisponibilité des médicaments, matériels prothétiques, imagerie moléculaire...) (Andujar *et al*, 2009).

L'utilisation grandissante de produits contenant des nanoparticules peut entraîner une exposition des différents compartiments environnementaux. Par conséquent, l'évaluation de leurs effets sur l'environnement apparaît indispensable (Manier, 2014). Le risque toxicologique de ces composés est cependant difficile à évaluer car plusieurs aspects des mécanismes de toxicité des nanomatériaux ne sont pas encore bien compris (François, 2012).

Cependant la compréhension de leurs effets sur les organismes est encore à ses débuts. En raison de leur taille nanométrique, les nanomatériaux possèdent des propriétés physicochimiques différentes des mêmes matériaux de plus grande taille. Ces propriétés uniques sont utilisées dans tous les domaines d'applications (François, 2012).

La toxicité des NPs métalliques (Oxyde de silice, Oxyde de titane, Oxyde de zinc....) a été montrée chez plusieurs organismes, cependant plusieurs questions fondamentales demeurent quant à leurs effets sur les systèmes biologiques. Leur taille à l'échelle

## ***INTRODUCTION***

---

nanométrique peut entraîner des effets toxiques nouveaux et différents qui ne sont pas encore élucidés. Pour permettre un développement responsable et sécuritaire des nanotechnologies utilisant des NPs métalliques, une meilleure compréhension des mécanismes de toxicité des NPs métalliques au niveau cellulaire est donc requise (François, 2012).

Il est donc nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement à travers des organismes ou un ensemble d'organismes que l'on utilise comme sentinelles en étudiant les modifications physiologiques, biochimiques et écologiques qui les affectent (Little *et al.*, 1990).

De nombreux groupes d'invertébrés sont reconnus pour leurs intérêts en écotoxicologie, Parmi les plus couramment cités, les mollusques gastéropodes terrestres et aquatiques présentent la plupart des critères définis par Edwards *et al.* (1996) guidant le choix des taxons à retenir pour l'évaluation écotoxicologique (Grara *et al.*, 2017).

Plusieurs espèces d'escargot sont faciles à collecter, à élever, à identifier et peuvent être trouvées presque partout. À travers la pluie et la rosée, les végétaux et le contact avec le sol superficiel, l'escargot est en contact avec divers contaminants qu'il absorbe par voie transcutanée, digestive ou respiratoire (**Gomot-deVaufleury et Pihan, 2000**).

Les petits-gris sont des bioindicateurs d'exposition et d'effets de polluants métalliques (Grara *et al.*, 2009; 2012c; Boucenna *et al.*, 2015) ou organique (Coeurdassier *et al.*, 2002b; Regoli *et al.*, 2006) et ce aussi bien dans les chaînes trophiques (Hispard *et al.*, 2008b), que dans l'évaluation des cinétiques de transfert milieu-escargot (Gimbert *et al.*, 2008). L'accumulation des métaux est influencée par plusieurs facteurs environnementaux (comme la saison, le type de sol, ...) et les paramètres biologiques des escargots (l'espèce, l'âge, ...) (**Marigomez *et al.*, 1986**).

Divers réponses biologiques peuvent être apportées par les escargots *Helix aspersa* quand ils sont exposés aux contaminants: physiologiques par l'inhibition de la croissance, perturbation de la reproduction et le taux de mortalité (Notten *et al.*, 2006), ainsi que des perturbation/modifications biochimiques (Regoli *et al.*, 2006), et des réponses de génotoxicité et embryotoxicité ont été également indiqués chez *Helix aspersa*.(Druart. et al.,2012)

## ***INTRODUCTION***

---

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les effets induit par deux nanoparticules l'oxyde de titane  $TiO_2$  et l'oxyde d'aluminium  $AL_2O_3$  et leurs mixtures sur un organisme bio accumulateur, le gastéropode terrestre *Helix aspersa*.

Les effets ont été testés sur:

- Les paramètres biométriques (le poids frais des escargots, le diamètre et la longueur de la coquille)..
- La composition biochimique en protéines, lipides et glucides
- L'histologie de l'hépatopancréas d'*Hélix aspersa*.



***Matériel et  
Méthodes***

## 2. Matériel et Méthodes :

Les bioessais de cette étude ont été réalisés à l'animalerie du département de biologie et laboratoire de biologie et chimie du sol du département d'agronomie de l'université 20 Août 1955 Skikda. Les coupes histologiques ont été réalisées au service d'Anapath EPH de Skikda.

### 2.1. Matériel biologique :

#### ✚ Présentation et classification de l'espèce :

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

Dont la position systématique est la suivante: (**Bonnet et Vrillon, 1990**)

**Règne:** Animalia

**Embranchement:** Mollusca

**Classe:** Gasteropoda

**Ordre:** Stylommatophora

**Famille:** *Helicidae*

**Genre:** *Helix*

**Espèce:** *aspersa* (Muller, 1774)

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

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



**Figure 2.1:** L'escargot *Helix aspersa* (photo originale).

### **2.1.1. Anatomie générale de l'escargot :**

#### **2.1.1.1. Anatomie externe de l'escargot :**

- **Le corps :** (Figure 2.2)

Le corps est mou, visqueux en raison de la présence du mucus. Il est constitué de trois parties : la tête, le pied et la masse viscérale (Bonnet *et al.*, 1990).

- **La tête :** comporte la bouche qui s'ouvre vers le bas et les organes des sens constitués de deux paires de tentacules. Les tentacules inférieures, tactiles, sont dirigés vers le bas, les tentacules supérieures, oculaires, portant un œil simple et un organe olfactif, qui sont dirigés vers le haut (Bonnet *et al.*, 1990).
- **Le pied :** est musculeux, large et plat, il supporte une coquille calcaire formée d'une seule pièce en forme de spirale. Sa face inférieure, en contact avec le sol, forme une sole de reptation, lorsque l'escargot se déplace, elle laisse une trace brillante formée de mucus
- **La masse viscérale:** dont la plus grande partie est enfermée dans la coquille (Chevalier, 1977), contenant presque tous les organes: poumon, glande digestive, cœur, elle est richement vascularisée.
- **Quatre orifices impairs :** se sont bien visibles sur le corps de l'animal qui sont:
  - ✓ L'orifice génital : situé en arrière du tentacule oculaire droit.
  - ✓ L'orifice respiratoire : situé sur le côté droit du bourrelet qui s'ouvre et se ferme rythmiquement.

- ✓ L'anus : situé à proximité de l'orifice respiratoire, qui se révèle par l'apparition d'un petit cordon d'excréments verdâtres.
- ✓ L'orifice urinaire : situé à proximité de l'anus, est généralement indétectable en raison de sa petite taille (Vallardi, 1971).

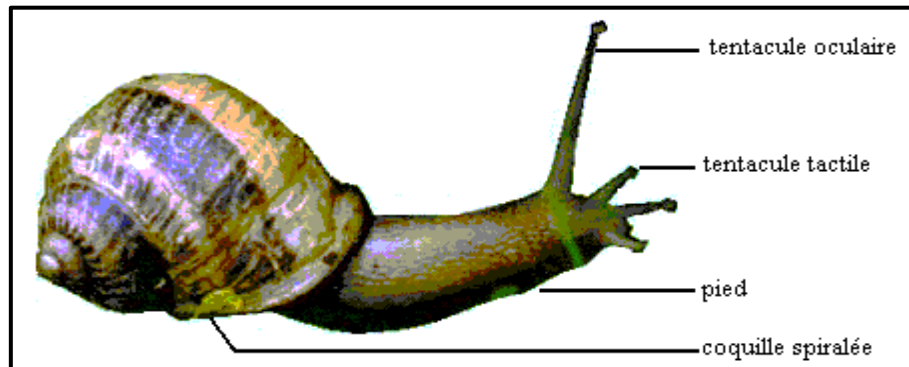


Figure 2.2: Escargot en extension (Bonnet, 1990).

- **La coquille**

La coquille est un squelette externe secrétée par la face dorsale et le bord libre du manteau, elle est globoïde, spirale, a un enroulement dextre, son ouverture est évasée, descendante; son bord externe est appelé: péristome ; la forme, l'épaisseur et la couleur du péristome ont souvent une grande importance dans l'identification des espèces des gastéropodes. Le rôle principale de la coquille est d'assurer la protège du corps en cas de danger.



Figure 2.3 : La coquille d'escargot petit gris (photo originale).

### **2.1.1.2. Anatomie interne de l'escargot :(Figure 2.4)**

- **Appareil digestif**

En raison de la torsion 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 d'hépatopancréas et aboutissant à l'anus.

- **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.

- **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:

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

-Un ovospermiducte (Bonnet *et al.*, 1990). Puis l'appareil se divise en deux voies :

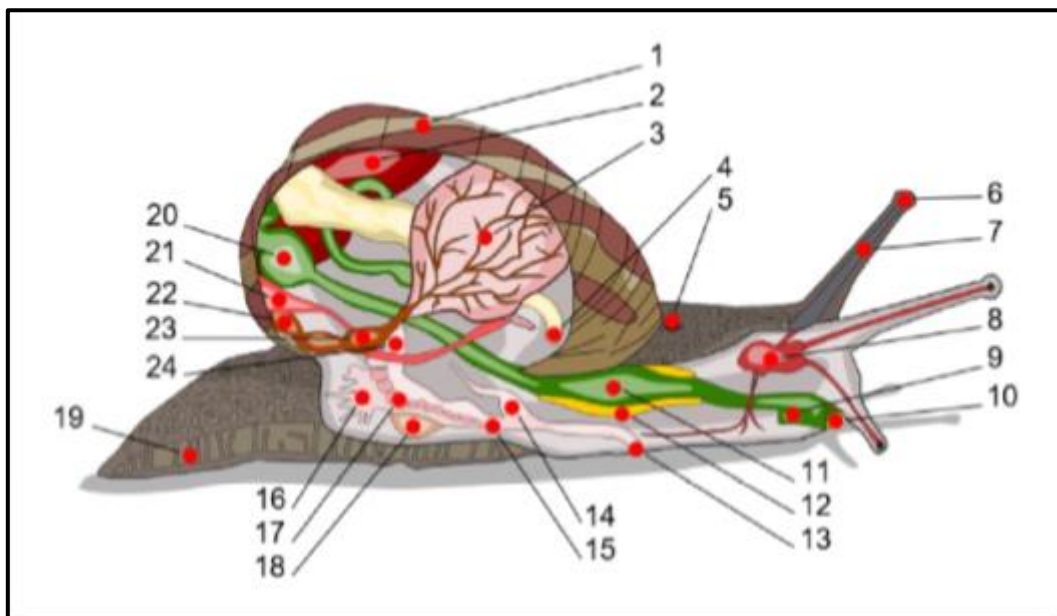
- La voie mâle comprenant un spermiducte où les spermatozoïdes s'accumulent en un spermatophore ainsi qu'un organe copulateur, le pénis.
- La voie femelle comprend la poche qui sécrète le dard calcaire lors de l'accouplement, le vagin et l'orifice génital.

- **Appareil circulatoire :**

Se compose essentiellement d'un cœur, est constitué d'une oreillette antérieure et d'un ventricule postérieur. Le sang ou hémolymphe contient un pigment, l'hémocyanine. 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.

- **Appareil respiratoire :**

Le poumon est une poche formée de l'épithélium palléal, irrigué par les vaisseaux Pulmonaires (Bonnet *et al.*, 1990), situé entre la masse viscérale et le manteau qui recouvre l'intérieur de la coquille. Il s'ouvre à l'extérieur par l'orifice respiratoire dont on peut observer aisément les mouvements rythmiques d'ouverture et de fermeture (Bonnet *et al.*, 1990). L'air y circule au travers du pneumostome par des mouvements de contraction de son ouverture.



**Figure 2.4:**Anatomie interne de l'escargot ([www.nature-scientia.com](http://www.nature-scientia.com)).

Légendes : **1** : coquille ; **2** : foie ; **3** : poumon ; **4** : anus ; **5** : pore respiratoire ; **6** : œil ; **7** : tentacule ; **8** : cerveau ; **9** : conduit salivaire ; **10** : bouche ; **11** : panse ; **12** : glande salivaire ; **13** : orifice génital ; **14** : pénis ; **15** : vagin ; **16** : glande muqueuse ; **17** : oviducte ; **18** : sac de dards ; **19** : pied ; **20** : estomac ; **21** : rein ; **22** : manteau ; **23** : cœur ; **24** : canal déférent.

### 2.1.2. Distribution géographique des escargots : (Figure 2.5)

Grâce à ses pouvoirs adaptatifs aux variations climatiques, *Helix aspersa* est très commun ; se trouve dans ses zones habituelles de répartition : jardins, buissons, haies, champs, mais également dans les zones cultivées (Kerney *et al.*, 2006).

Généralement, il est très commun dans la région méditerranéenne, se distribue dans les régions: Royaume-Uni, l'Italie, la France et le long des frontières des mers Méditerranée et Noire (Dekle et Fasulo, 2008).

Il est introduit en Argentine, Australie, Canada, Chili, Haïti, la Nouvelle-Zélande, le Mexique, l'Afrique du Sud, Etats-Unis et les îles de l'Atlantique (Dekle et Fasulo, 2008). De nos jours mondialement répandu.

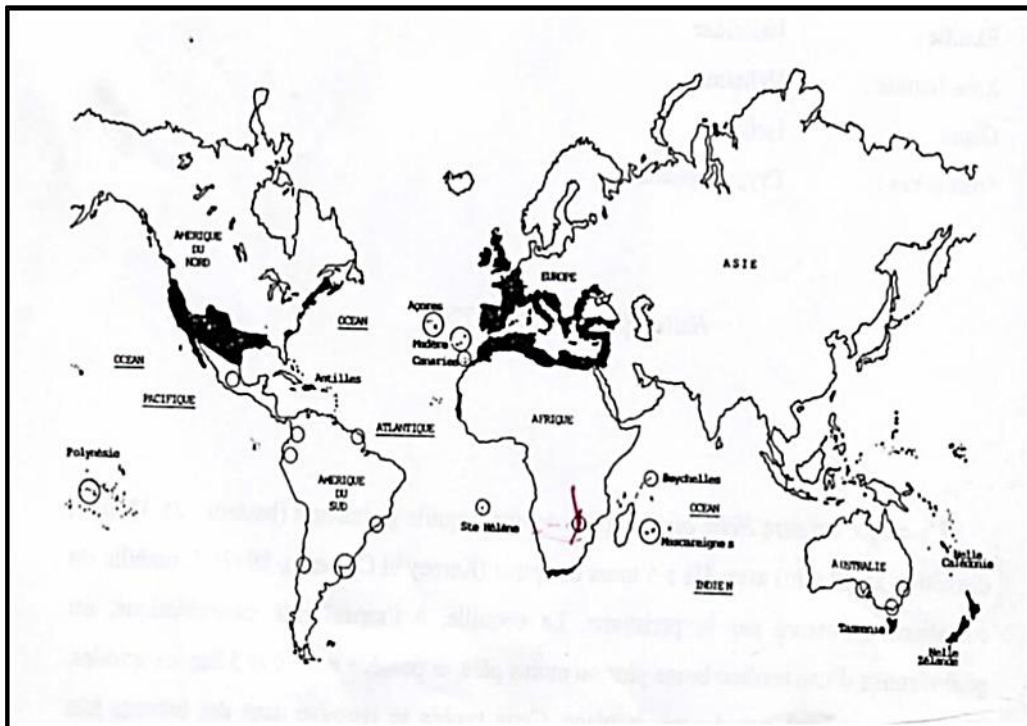


Figure 2.5 : Distribution géographique de l'espèce *Helix aspersa* (Madec, 1989)

### 2.1.3. Estivation et hibernation :

Une absence prolongée d'humidité provoque l'estivation de *H. aspersa* (Chevallier, 1992). L'animal se fixe alors sur un support en fermant l'ouverture de sa coquille par un voile de mucus solidifié: l'épiphragme. Il reprend son activité lorsque les conditions environnementales sont plus favorables. Lorsque la température moyenne devient inférieure à 15°C, les escargots se mettent en hibernation en se "collant" sur un support ou en

s'enfouissant dans le sol ou la litière et secrètent un épiphragme d'hiver. Dans une atmosphère humide, le processus d'hibernation s'effectue en-dessous de 5°C. Le raccourcissement de la durée de jour semble avoir également une action sur la mise en hibernation (**Bailey, 1981**).

### **2.1.4. Cycle de vie d'*Helix aspersa* :**

Chez les gastéropodes pulmonés de nombreux facteurs abiotiques (climatiques, nutritionnels) ou biotiques (âge, densité, génétique) qui conditionnent la croissance (Daguzan, 1982). La croissance de l'escargot correspond à une prise de poids et à un accroissement de la coquille en longueur, mais également en épaisseur (Gomot de Vaufleury, 2001).

La croissance de ce mollusque se distingue en quatre phases en fonction de la taille et de la masse des animaux mais aussi de leur différenciation sexuelle (Gomot, 1997) (Figure 2.6) :

- La phase infantile qui dure de 1 à 2 mois avec un coefficient mensuel de croissance de 4 ou plus, durant laquelle le tractus génital est non-différencié chez des animaux de 0,02 à 0,6 g.
- La phase juvénile avec un coefficient mensuel de croissance de 2, puis qui va en s'amenuisant. Cette phase relative à un tractus génital qui s'organise et à une gamétogenèse active. La masse est comprise entre 0,6 et 6 g.
- La phase de maturation sexuelle ou phase pré-adulte durant laquelle les glandes annexes femelles se développent. Elle concerne des escargots non bordés (absence d'épaississement du péristome) de plus de 6 g. L'animal est à maturité sexuelle et où sa taille est maximale qui est généralement atteinte après 12 à 18 mois de la naissance.
- La phase adulte, où l'animal commence à se reproduire. Ils sont alors bordés. Cette phase est suivie par une autre phase c'est : la phase sénile qui se caractérise par une baisse pondérale. Il est difficile de savoir si l'escargot meurt de vieillesse ou de maladies.

La durée de vie des escargots varie selon les espèces. Dans la nature, les *Helix* dépassent l'âge de trois ans (Gomot et Gomot, 1995). Leur mort est souvent due à des prédateurs ou à des parasites.



**Figure 2.6** : Croissance et survie de l'escargot ([www.heliciculture-vendee.netai.net](http://www.heliciculture-vendee.netai.net)).

### 2.1.5. Reproduction :

Les escargots, comme les limaces, sont hermaphrodites (à la fois mâle et femelle) produisant des spermatozoïdes et des ovules, mais ils doivent s'accoupler pour se reproduire. L'autofécondation n'étant pas possible. La saison de reproduction des régions méditerranéennes aura lieu à la fin du printemps ou début de l'été (Druart, 2011). La reproduction se déroule dans des phases principales :

- **L'accouplement** (Figure 2.7) : les escargots matures sont généralement bordés. Les spermatozoïdes sont alors émis sous forme d'un long filament (le spermatophore). Suivant les régions, les escargots s'accouplent durant toute la période d'activité avec une périodicité bien définie, ce qui synchronise les individus (Pirame, 2003).



**Figure 2.7** : L'accouplement des escargots ([www.élevage-escargots.com](http://www.élevage-escargots.com)).

- **La Ponte** (Figure 2.8) : l'intervalle entre l'accouplement et la ponte est variable. En conditions constantes de température et d'hygrométrie (20° C et 85 %) les durées moyennes sont de 10 à 15 jours. La ponte dure 12 à 48 heures. Un escargot pond en moyenne 120 œufs par ponte (Pirame, 2003).



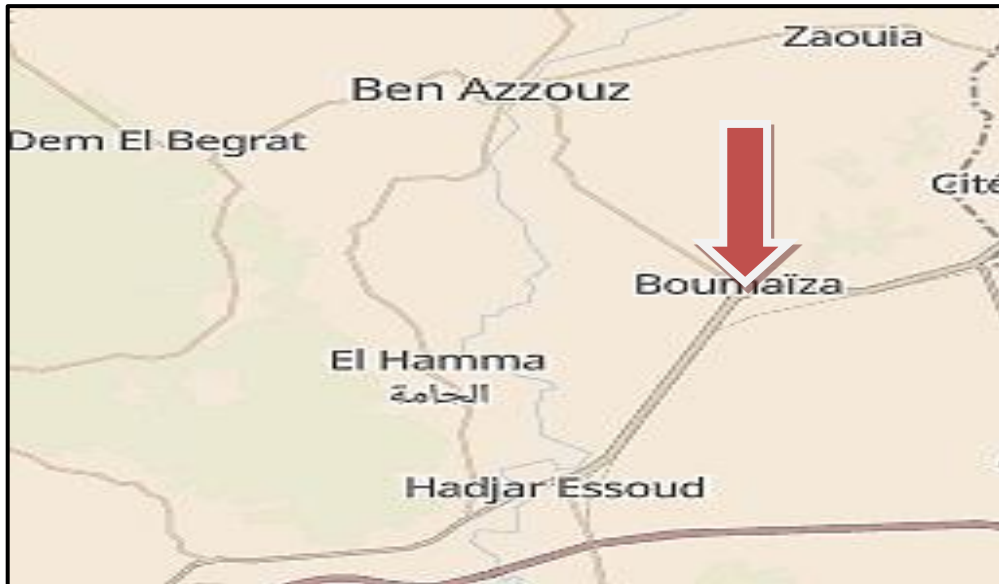
**Figure 2.8** : Ponte d'une certaine d'œufs ([www.helixa.blogspot.com](http://www.helixa.blogspot.com)).

- **Incubation-éclosion:** après la ponte, dès les premiers jours d'incubation, l'embryon élabore une coquille protéique qui se calcifie au cours de son développement. En conditions naturelles, la durée d'incubation varie de 15 à 30 jours. Il se libère par rupture de la membrane externe de l'œuf qu'il consomme. Le nouveau-né va séjourner dans le nid de ponte de 6 à 10 jours ; puis il remonte jusqu'à la surface du sol. Il pèse alors de 10 à 40 mg, mesure 2 à 4 mm de diamètre, il est apte à se nourrir (Pirame, 2003).

#### **2.1.6. Site de prélèvement de l'espèce :**

##### **❖ Boumaiza**

Le patronyme Boumaiza : est un patronyme Algérien qui désigne aujourd'hui les descendants d'une famille tunisienne puis algérienne connue sous le nom des Chabbiya .C'est une localité de la wilaya de SKIKDA situé à 54 Kilomètre de SKIKDA au Sud-est, délimité au Nord par Ben-Azouz, au Sud par Bkouche Lekhdar , à l'Est par Berrahal , et au Sud-ouest par Ain-Charchar ; Elle bénéficie d' un climat humide et Subhumide ,La pluviométrie annuelle dans cette région est de 700mm /an (Wikipédia,google earth). Notre site de prélèvement est une petite montagne située au village de Boumaiza.



**Figure 2.9 :** Situation géographique de la commune de Boumaïza (Wikipédia, google earth).

### **2.1.7. Technique d'échantillonnage et élevage :**

Les juvéniles d'*Helix aspersa* de poids entre (2 à 5 g) ont été prélevés de façon aléatoire, et ils ont été transférés à l'animalerie, placés dans des boîtes de plastiques transparentes (25×20 cm), recouvertes avec des tulles maintenues par des élastiques (pour l'oxygénation), avec 10 individus par boîte et chaque boîte contient une éponge humide pour maintenir d'humidité, l'alimentation (farine de blé) est fournie dans des boîtes de pétrie. Les boîtes sont nettoyées régulièrement tous les trois jours. Ils subissent une acclimatation pendant 15 jours avant de commencer les expériences.

### **2.2. Matériel chimique :**

Le matériel chimique utilisé dans ce travail est deux nanoparticules à la base d'oxyde d'aluminium et d'oxyde de titane.

L'oxyde de titane et d'aluminium nanométriques nous ont été élaboré au laboratoire de magnétisme et spectroscopie des solides (LM2S) par le Professeur Alleg safia, L'élaboration des nanoparticules de  $TiO_2$  et  $AL_2O_3$  été effectuées par broyage mécanique à haute énergie, à partir de la poudre élémentaire de Titane et Aluminium. Le broyage a été réalisée dans un broyeur planétaire à de type Fritsch , en utilisant deux jarres en acier, celui-ci se compose de: une jarre en acier inoxydable de volume 45 ml et des du même type d'acier (Figure 2.10.).

## Matériel et méthodes

La préparation de la charge (billes + poudres) a été effectuée dans une boîte à gants sous atmosphère d'argon. Le rapport massique billes/poudres est de 1/20 environ et la vitesse de broyage est de l'ordre de 500 tr/mn. Pour minimiser les effets relatifs à l'augmentation de la température à l'intérieur. Le broyage a été fait avec des séquences d'une demi-heure suivie de 15mn de pause et cela pendant 8h.

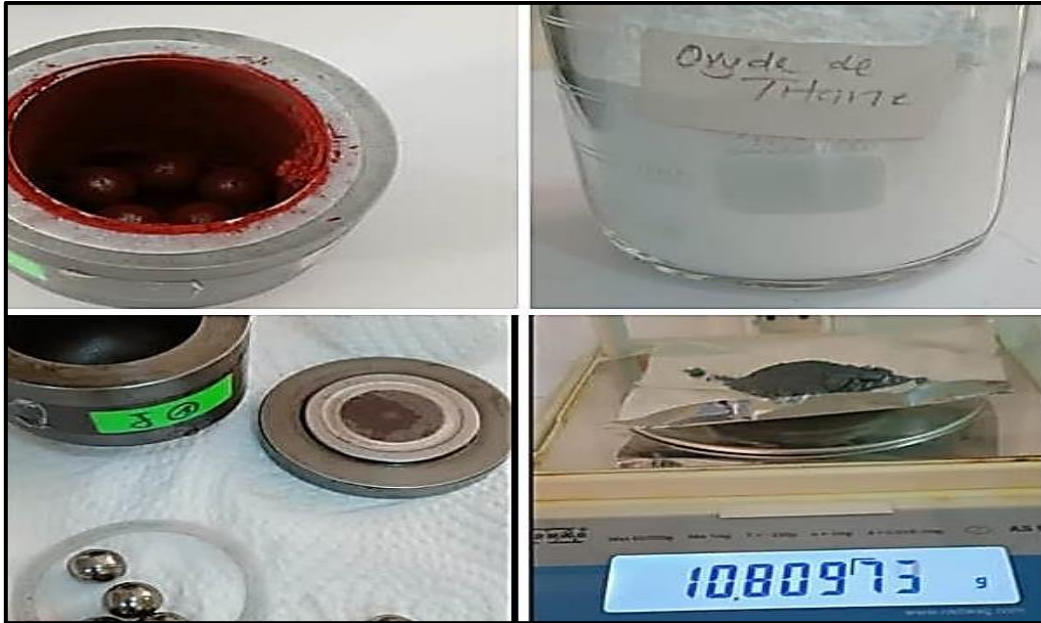


Figure 2.10 : Les appareils utilisés pour le Broyage des oxydes métalliques.

### 2.2.1. Présentation des deux nanoparticules :

#### 2.2.1.1 Oxyde d'Aluminium :

AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou alumine C'est une poudre cristalline gris, inodore, insoluble dans l'eau, présent dans la nature dans de nombreux minéraux comme le corindon, AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, et la diaspore, AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O ; et gibbsite, AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O ; et aussi dans la bauxite, la forme impure de la gibbsite, et cet oxyde est le seul oxyde d'aluminium.

L'alumine a plusieurs phases telles que gamma, delta, thêta et alpha. Cependant, la phase alpha-alumine est la phase la plus stable thermodynamiquement. En général, l'alumine possède de nombreuses propriétés intéressantes, par exemple une dureté élevée, une stabilité élevée, une isolation élevée et une transparence. (GHELLAB. M 2021).

<b>Propriétés physiques :</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Masse volumique (g/cm<sup>3</sup>)</li><li>- Poids moléculaire (g/mole)</li><li>- Température maximale d'utilisation sous air (°C)</li></ul>	3.9 102 1700-1800
<b>Propriétés mécaniques :</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Dureté</li><li>- Coefficient de Poisson</li><li>- Résistance à la flexion</li><li>- Ténacité (Mpa.m<sup>1/2</sup>)</li></ul>	9 0,25 380 2-3
<b>Propriétés électriques:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Constante diélectrique</li><li>- Résistivité électrique à 20 °C (Ohm.cm)</li><li>- Résistance diélectrique (kV/mm)</li></ul>	9-10 > 1014 10-2
<b>Propriétés thermiques :</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Chaleur spécifique (J/K/kg)</li><li>- Conductivité thermique</li><li>- - Point de fusion (°C)</li></ul>	900  2050

**Tableau 2.1 :** Propriétés physico –chimique de l’oxyde d’aluminium (GHELLAB. M 2021)



**Figure 2.11 :** Les nanoparticules de l’oxyde d’Aluminium.

(<https://hunzaroma.com/boutique/ingredients-de-base/oxyde-de-Aluminium/>).

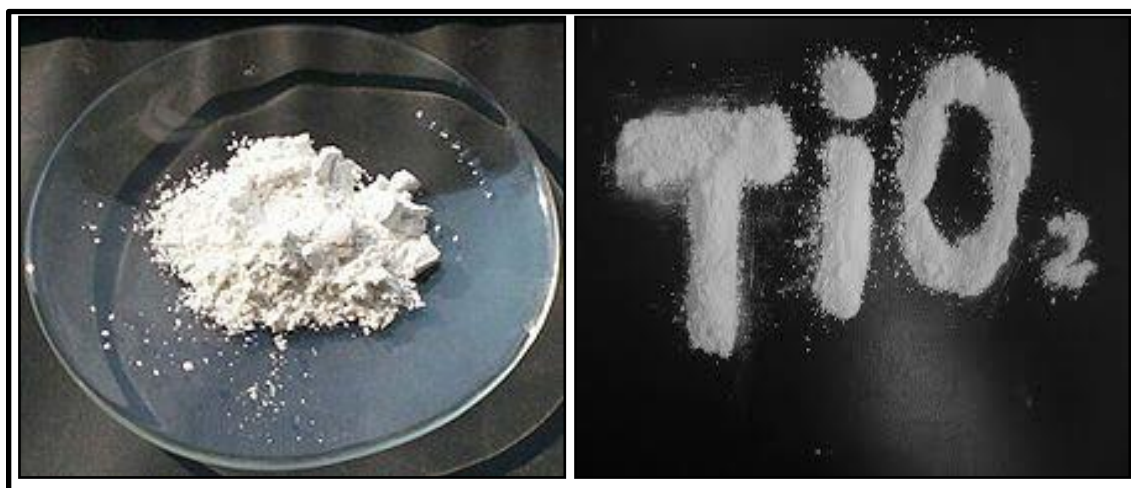
**2.2.1.2. Dioxyde de titane(TiO<sub>2</sub>) :**

Le TiO<sub>2</sub> est un dioxyde métallique, et le 9<sup>ème</sup> composant le plus abondant dans la croûte terrestre. IL est présent sous forme amorphe (les différents atomes le composant ne forment pas de figure particulière) ainsi que sous 3 principales formes tétragonale de paramètres de maille différents : le rutile, l’anatase et le Brookite.

On trouve le TiO<sub>2</sub> dans la nature sous forme de rutile pur (95%), IL a été découvert en 1791 en Angleterre, mais son exploitation commerciale en temps que composé pur n’a commencé qu’en 1913 (Armand, 2013).

<b>Nom</b>	Dioxyde de titane, Oxyde de titane (IV)		
<b>Formule chimique</b>	TiO <sub>2</sub>		
<b>Masse molaire g /mol</b>	79,890		
<b>Apparence</b>	Solide gris		
<b>Phase cristalline</b>	Anatase	Rutile	Brookite

**Tableau 2.2 :** Propriétés physico –chimique de l’oxyde de titane (Benkara, 2014).



**Figure 2.12 :** Les nanoparticules de l’oxyde de titane (<https://hunzaroma.com/boutique/ingredients-de-base/oxyde-de-titane/>).

**2.3. Elevage et traitement des escargots :**

Les escargots utilisés sont les juvéniles d’*Helix aspersa* ont été collectés d’un site non traité, situé dans la région de Boumaiza (Wilaya de Skikda). Les escargots sont ensuite

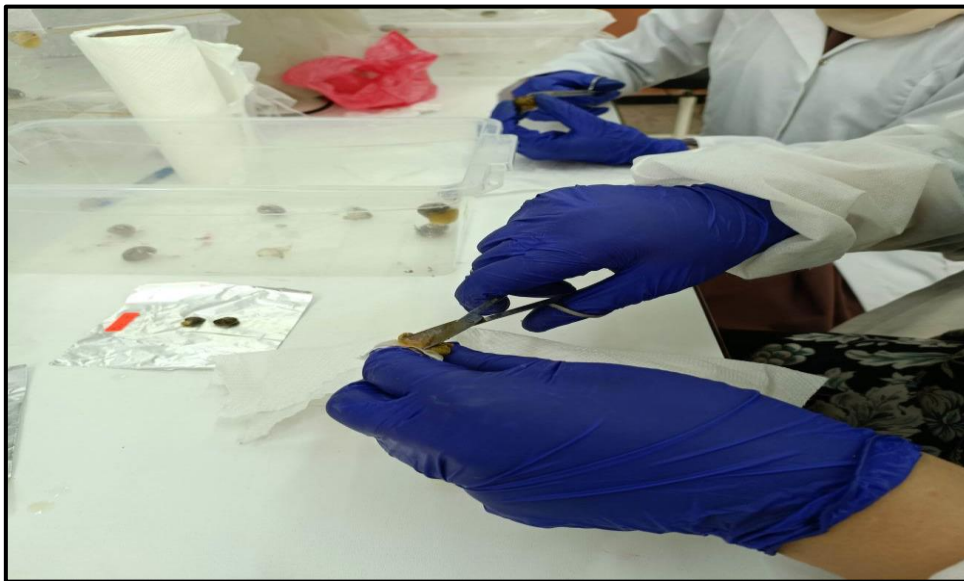
## ***Matériel et méthodes***

---

transférés au laboratoire, où ils seront adaptés aux conditions contrôlées (température  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , photopériode de 12h de lumière/24h) pendant 15 jours.

Le traitement des animaux a été effectué par addition des concentrations croissantes des nanoparticules d'oxyde d'Aluminium, de titane et de leur mixture dans l'alimentation. Nous avons retenu 3 concentrations : 250, 500 et  $750\mu\text{g/g}$  d'alimentation, et un milieu témoin. Les escargots sont répartis en 10 lots de 10 escargots pour chaque traitement ; ils sont individualisés en fonction de la matrice d'exposition à tester. On a retenu un traitement de 4 semaines par l' $\text{AlO}_2$ , par le  $\text{TiO}_2$  et par la mixture ( $\text{AL}_2\text{O}_3 + \text{TiO}_2$ ). Dans tous les cas, la nourriture apportée est renouvelée, qu'elle soit contaminée ou non, tous les trois jours au moment du nettoyage des boîtes d'élevage. Il comprend un lavage des parois des boîtes à l'eau distillée, un changement de l'éponge absorbante au fond des boîtes ou un ramassage des fèces des escargots déposés sur le substrat.

### **2.4. Dissection et prélèvement de l'organe :**



**Figure 2.13** : La dissection de l'escargot. (Photo originale).

Après la période du traitement, les escargots sont mis à jeun pendant 48 heures afin que le contenu de leur tube digestif soit vide. Ceci évite d'éventuelles interférences entre les contaminants présents dans l'aliment ingéré et les quantités de contaminants réellement accumulées dans les tissus. Les boîtes où ils jeunent sont lavées à l'eau, pour éviter la reingestion des fèces. Les escargots sont ensuite disséqués.

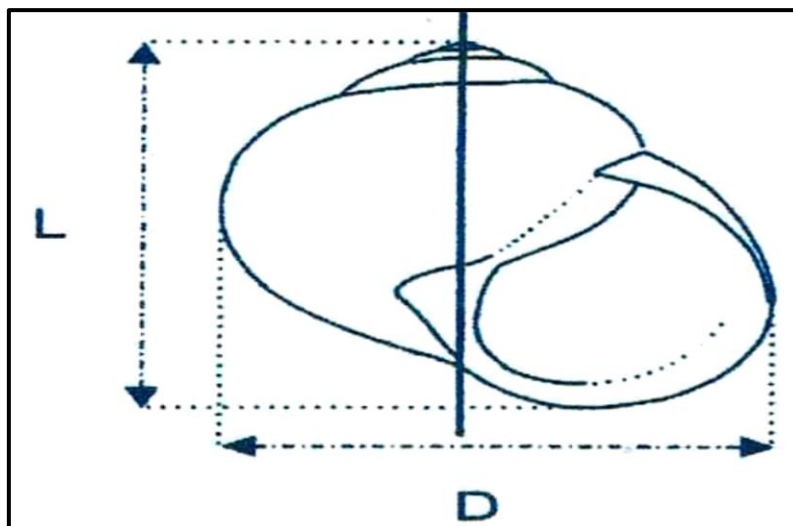
Dans une cuvette à dissection, placer un escargot et découper la coquille avec les ciseaux en suivant le bord d'enroulement de la coquille. Découper délicatement un petit morceau de l'hépatopancréas à raison de 3 répétitions (3 témoins et 3 traités) avec un ciseau. L'hépatopancréas est prélevé séparé en deux lobes le premier lobe est conservé dans le formol à 10%, sert pour faire des coupes histologiques, le deuxième lobe est pesés dans une balance (Sartorius H110) de précision de 0,1g et conservé dans des tubes Eppendorfs contenant l'acide trichloroacétique (TCA 20%) à + 4°C jusqu'aux dosages biochimiques.

### **2.5. Paramètres étudiés :**

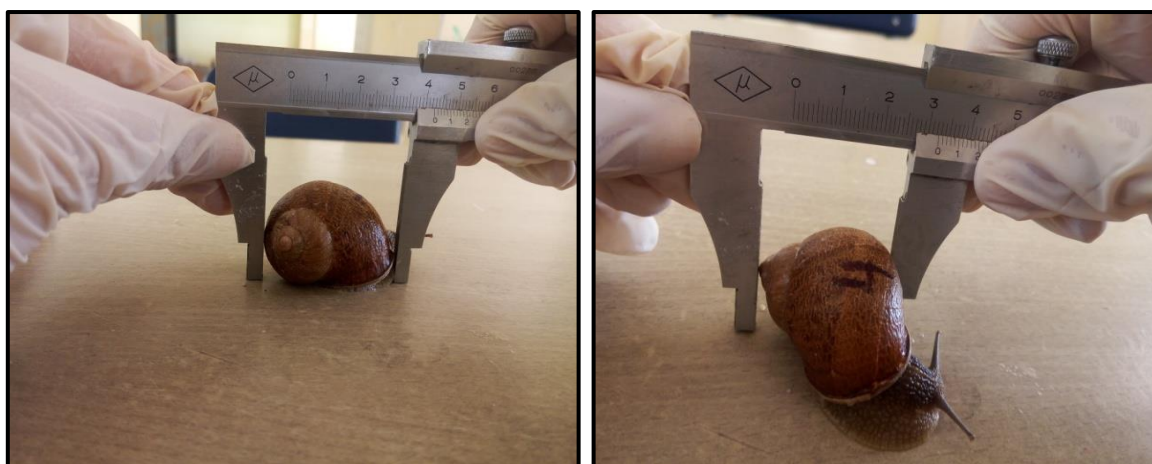
#### **2.5.1. Paramètres morphométriques :**

2 critères peuvent être utilisés :

- **Le poids frais de l'escargot (tissus mous + coquille):** Les escargots sont pesés individuellement avant le traitement et repartis en 10 lots de poids moyen de  $9 \pm 35$ g. Le suivi de poids durant notre traitement se fait à l'aide d'une balance de précision chaque semaine (pendant 4 semaines). Ce critère est recommandé pour évaluer de façon hebdomadaire les effets d'AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> et de la mixture sur des escargots adultes de *Helix aspersa*. Les pesées sont toujours réalisées avant le nettoyage de l'enceinte d'essai (**Gomot, 1997a**).
- **Le diamètre de coquille:** est mesuré avec un pied à coulisse (avec une précision de 10-1mm). La mesure doit se faire délicatement pour éviter d'endommager le bord des coquilles des escargots, très fragile chez ces animaux en croissance. Comme la masse fraîche, les mesures du diamètre de coquille permettent d'évaluer la croissance des animaux à tout moment.



**Figure 2.14 :** Mesure des deux diamètres D et L de *Helix aspersa* (Coeurdassier, 2001).



**Figure 2.15 :** Mesure des deux diamètres D et L de *Helix aspersa* (Photos originales).

## **2.5.2. Paramètre biochimiques :**

### **2.5.2.1. Extraction et dosage des métabolites (Figure 2.16)**

L'extraction des métabolites des échantillons (hépatopancreas) a été réalisée selon le procédé de Shibko *et al.* (1966).

Les fragments de l'hépatopancreas, prélevés sur les adultes témoins et traités avec l'oxyde de titane, l'oxyde de zinc et la mixture (oxyde de titane et oxyde de zinc) pendant quatre semaines, après traitement.

Les échantillons ont été conservés dans 1ml d'acide trichloro-acétique (TCA) à 20%. Après broyage. Les broyats subissent une première centrifugation (5000 tours /min, 10 min) et le surnageant I obtenu sert au dosage des glucides.

## Matériel et méthodes

Au culot I, on ajoute 1ml du mélange méthanol/chloroforme (1v/1v) et après une seconde centrifugation (5000 tours/min, 10 min) permet de récupérer le surnageant 2, qui servira au dosage des lipides.

Le culot 2 est ensuite repris dans 1ml de NaOH et après 1 nuit à 4°C, permettra la solubilisation et la quantification des protéines totale.

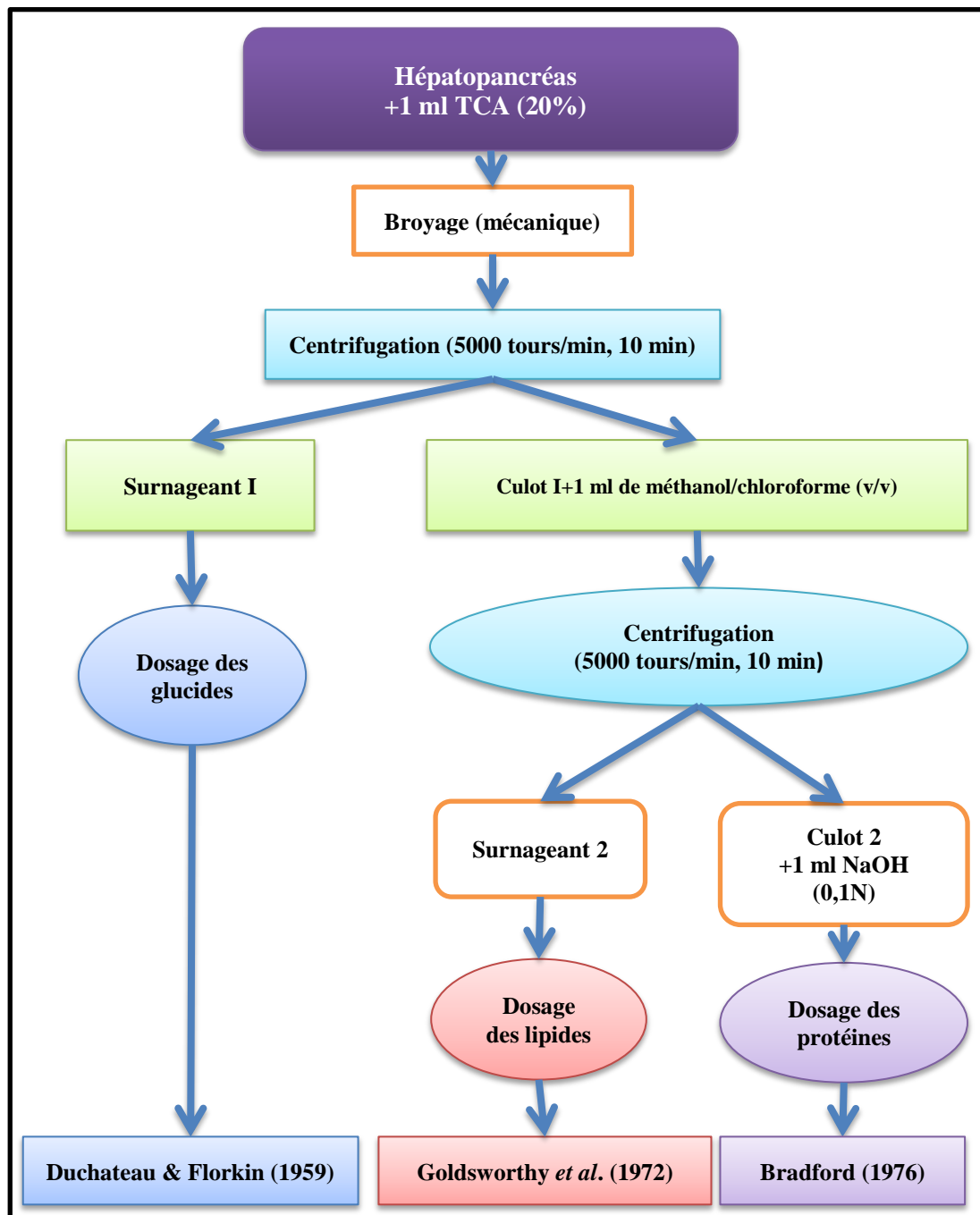


Figure 2.16: Principales étapes d'extraction des protéines, glucides et lipides selon Shibko *et al.* (1966).

### 2.5.2.1.1. Dosage des protéines :

Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant le bleu brillant de comassie (G250, Merck) comme réactif (100 mg BBC + 50 ml d'éthanol absolu + 100 ml d'acide Orthophosphorique complété à 1000 ml par de l'eau distillée) et l'albumine de sérum de bœuf (BSA, sigma) comme protéine standard. La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution mère de BSA (1mg/ml) (Tableau 2.3).

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

**Tableau 2.3:** Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des protéines.

Les absorbances sont lues dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme, après 1 minute et avant 1 heure.

### 2.5.2.1.2. 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) et une solution mère de glucose (0,1 mg/l) comme standard (Tableau 2.4).

Tubes	1	2	3	4	5	6
Glucose (µl)	0	100	200	300	400	500
Eau distillée (µl)	500	400	300	200	100	0
Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

**Tableau 2.4:** Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des glucides.

## **Matériel et méthodes**

---

Le réactif (4ml) est additionné à une fraction aliquote du surnageant I (100µl). Après chauffage au bain marie (80°C pendant 10 min), il se développe une coloration verte, dont l'intensité mesurée à une longueur d'onde de 620 nm est proportionnelle à la concentration des glucides.

### **2.5.2.1.3. Dosage des lipides :**

Les lipides ont été estimés selon la méthode de Goldsworthy *et al.*, (1972), utilisant la vanilline comme réactif (0,38g de vanilline, 55 ml d'eau distillée, 195 ml d'acide orthophosphorique à 85 %), et une solution mère de lipides comme standard (Tableau 2.5). La solution mère des lipides est préparée en utilisant de l'huile de table de la façon suivante: 25mg d'huile de table sont pesés dans un tube Eppendorf, cette quantité est ensuite reprise dans 10 ml du mélange méthanol/chloroforme (1/1 v/v).

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

**Tableau 2.5:** Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des lipides.

Après évaporation des prises aliquotes de 100µl du surnageant 2 dans un bain à sec à 40 °C, on additionne 1 ml d'acide sulfurique concentré (96 %), les tubes fermés sont agités et chauffés, dans un bain à sec (100°C, 10 min), après refroidissement, on prélève 200µl de chaque tube, auxquels on ajoute 2,5 ml de réactif sulfo-phospho-vanillique et ont agité. Après 30 minutes à l'obscurité, le complexe se colore en rose. Les absorbances sont lues à une longueur d'onde de 530 nm.

### **2.5.2.2. Analyses histologiques :**

Les hépatopancreas sont prélevés sur des escargots juveniles témoins et traités par l'oxyde de titane , l'oxyde d'aluminium et les mixtures durant 4 semaines, sont disposés dans des tubes à hémolyse contenant du formol (10%), les échantillons doivent passer par la

fixation, le rinçage. La poste fixation, la déshydratation et l'inclusion afin d'éviter toute altérations des tissus et assurer la stabilisation de leurs structure macromoléculaire.

### **2.5.2.2.1. La fixation des organes :**

A pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur. Le liquide fixateur le plus utilisé est le formol.

La durée de la fixation variée selon le volume des prélèvements (de quelques heures pour un petit fragment biopsique).

### **2.5.2.2.2. L'inclusion :**

A pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains de toluène) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide, qui infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

### **2.5.2.2.3. Les coupes :**

Du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 2 à 5 µm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

### **2.5.2.2.4. Les colorations :**

Réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée. Les colorations les plus fréquemment utilisées associent deux ou trois colorants différents : l'Hématoxyline-Eosine (H.E.) associe l'hématéine qui colore les noyaux en violet et l'éosine les cytoplasmes en rose.

### **2.5.2.2.5. Le montage :**

Après avoir subi une déshydratation (par bains d'alcool de degré croissant puis bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une « préparation microscopique » (simplement appelée « lame » dans le langage courant) prête à être observée au microscope.

### **2.5.2.2.6. Observation microscopique :**

L'observation des coupes histologiques de l'hépatopancréas est réalisée avec un microscope optique (OPTIKA).

### **2.5.2.3. Analyse statistique :**

Les moyennes et les écarts type ( $m \pm s$ ), avec un niveau significatif de  $p \leq 0,05$ , sont calculés pour chaque groupe d'expérience. Le test 't' de Student permis de mettre en évidence les différences entre les groupes étudiés au cours des tests effectués sur les paramètres morphométriques et biochimiques.

Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 17 (Dagnelie, 1999).



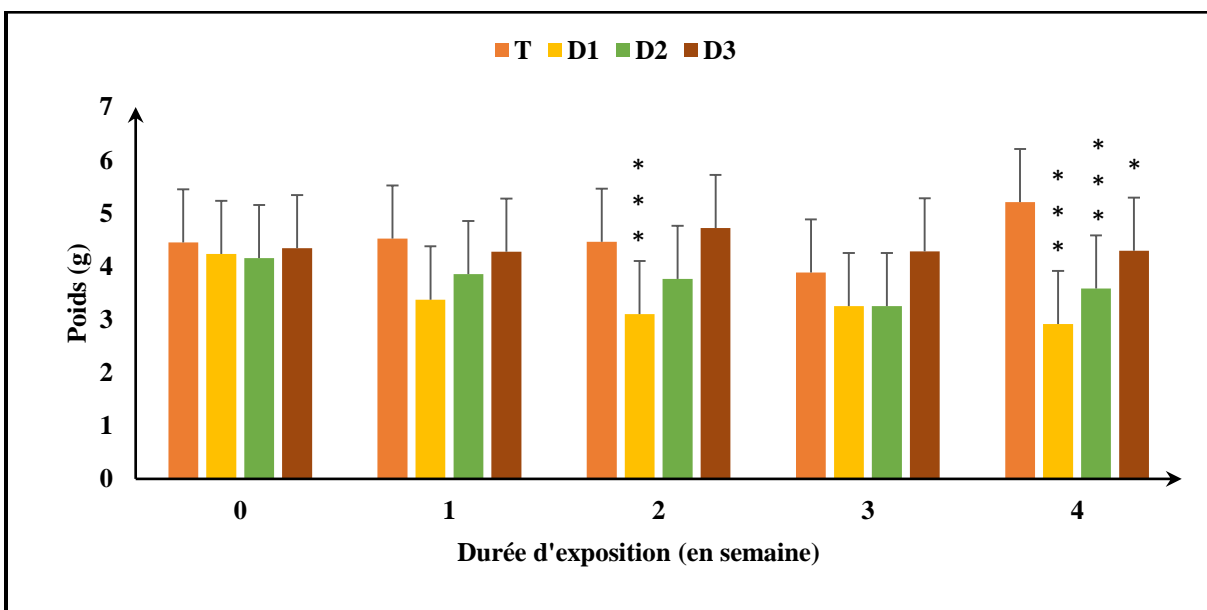
***Résultats et  
Discussion***

### 3. Résultats :

#### 3.1. L'effet des nanoparticules AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et TiO<sub>3</sub> et leurs mixtures sur l'évolution des paramètres morphométriques :

##### 3.1.1. Effet de nanoparticule d'oxyde d'Aluminium sur l'évolution du poids des escargots:

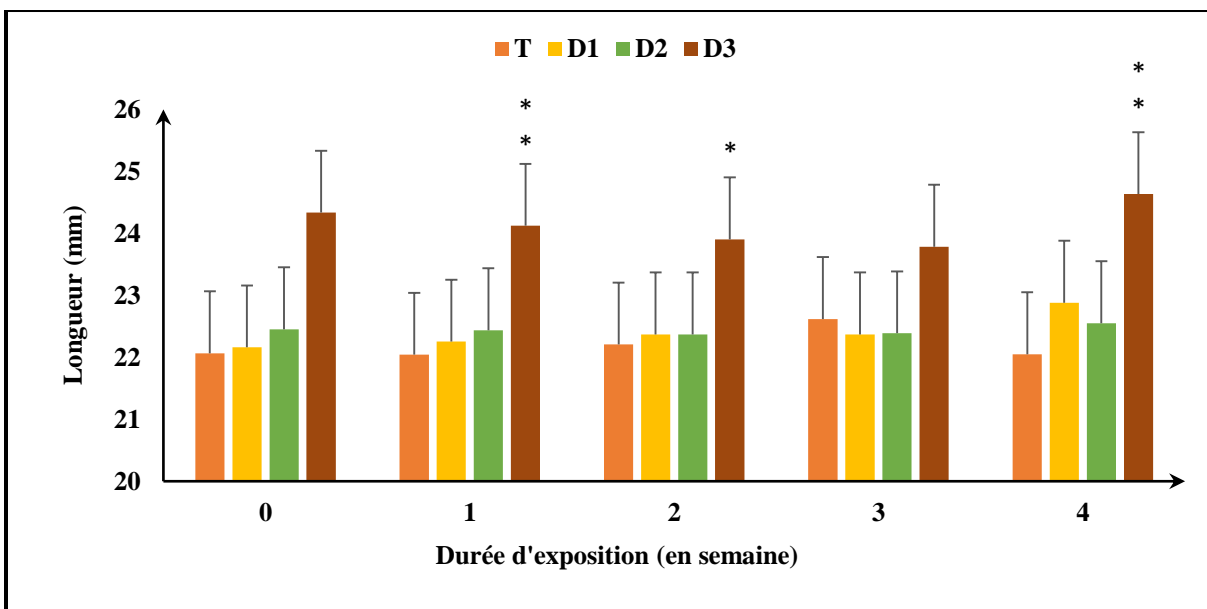
La figure (3.1) illustre l'évolution du poids relatifs des escargots traités par différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde d'aluminium en fonction du temps. Nous remarquons que chez les traités par la concentration (250µg\g) une diminution non significative pour la 1<sup>ère</sup> et la 3<sup>ème</sup> semaine, à la 2<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaine une diminution hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) est enregistré par rapport à la concentration aux témoins, chez les traités par la concentration (500 µg\g) une diminution non significative pour les semaines 1,2 ,3 et une diminution hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) pour la 4<sup>ème</sup> semaine. Chez les traités par la concentration (750 µg\ g) une diminution non significative pour la 1<sup>ère</sup> et la 3<sup>ème</sup> et significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 4<sup>ème</sup> semaine et une augmentation non significative pour la 2<sup>ème</sup> semaine.



**Figure 3.1 :** L'évolution du poids relatifs des escargots traites par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde d'aluminium en fonction du temps.

### 3.1.2. Effet de nanoparticule d'oxyde d'Aluminium sur la longueur de la coquille des escargots:

La figure (3.2) illustre l'évolution de la longueur de la coquille chez les traités par l'oxyde d'aluminium. Nous remarquons que chez les traités par la concentration (250  $\mu\text{g/g}$ ) une augmentation non significative pour les semaines 1, 2, 3,4 par rapport à la 0 semaine. Chez les traités par la concentration (500  $\mu\text{g/g}$ ) une augmentation non significative pour les semaines 1, 2,4 et une diminution non significative pour la 3<sup>ème</sup> semaine. Chez les traités par la concentration (750  $\mu\text{g/g}$ ) une diminution très significatif ( $p \leq 0,01$ ) pour la 1<sup>ère</sup> semaine, et significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 2<sup>ème</sup> semaine et non significative pour la 3<sup>ème</sup> semaine, et une augmentation très significative pour la 4<sup>ème</sup> semaine.



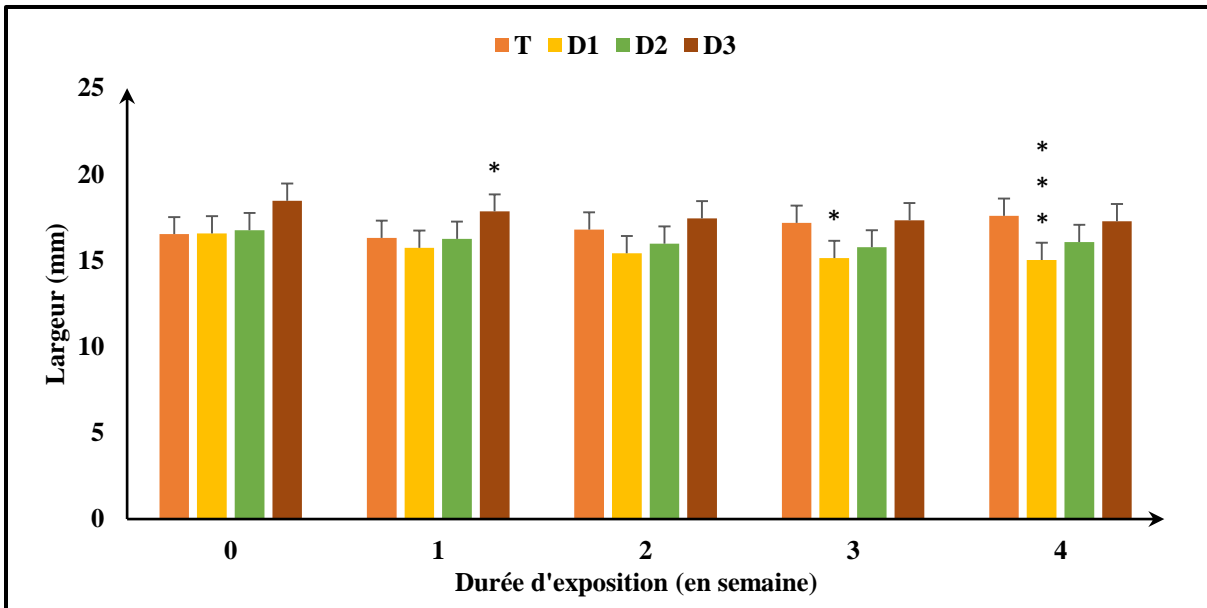
**Figure 3.2 :** L'évolution de la longueur de la coquille chez les traités par les nanoparticules d'oxyde d'Aluminium.

### 3.1.3. Effet de nanoparticule d'oxyde d'Aluminium sur la largeur de la coquille des escargots:

La figure (3.3) illustre l'évolution de la largeur de la coquille chez les traités par les nanoparticules d'oxyde d'aluminium. Nous remarquons chez les traités par la concentration (250  $\mu\text{g/g}$ ) une diminution non significative pour les 1 et 2 semaines et une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 3<sup>ème</sup> semaine et hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) pour la 4<sup>ème</sup> semaine.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

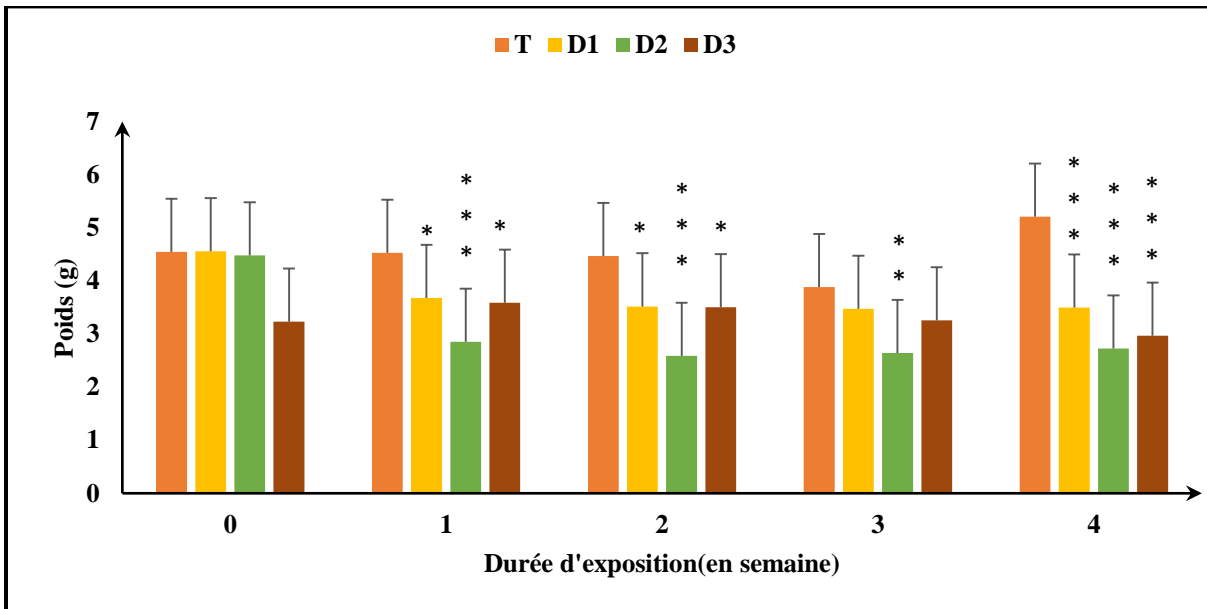
semaine. Chez les traités par la concentration (500  $\mu\text{g/g}$ ) une diminution non significative pour les 4 semaines. Chez les traités par la concentration (750  $\mu\text{g/g}$ ) une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 1<sup>ère</sup> semaine et non significative pour la 2<sup>ème</sup>, la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaine.



**Figure 3.3 :** L'évolution de la largeur de la coquille chez traités par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde d'aluminium.

### 3.1.4. Effet de nanoparticule de l'oxyde de Titane sur l'évolution du poids des escargots:

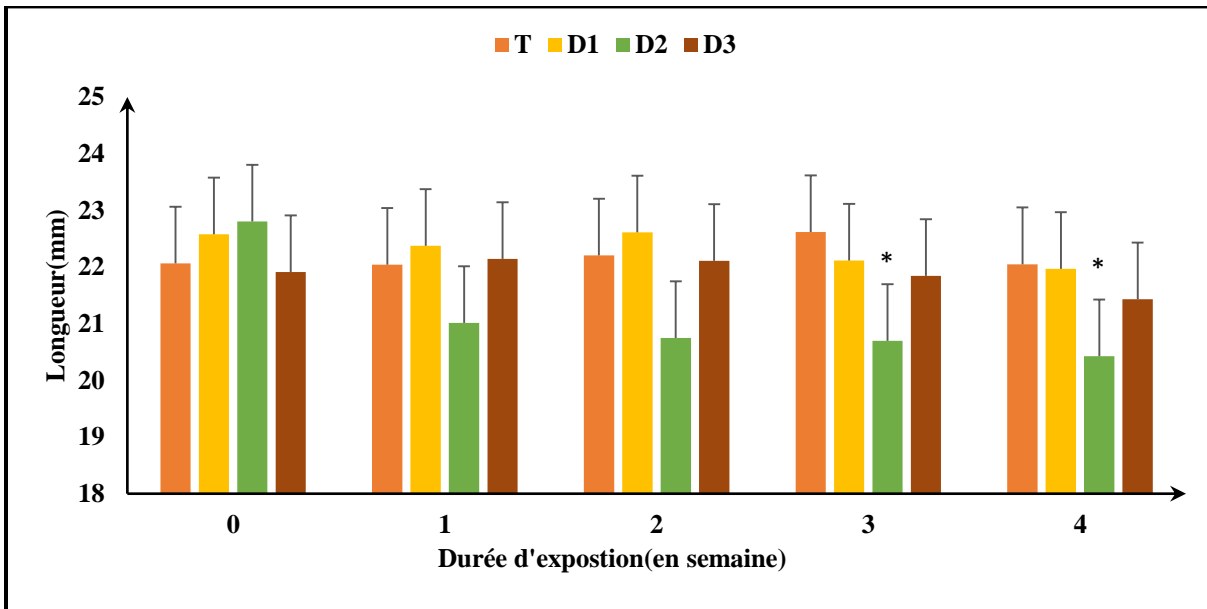
La figure (3.4) illustre l'évolution du poids relatifs des escargots chez les traités par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde de titane en fonction du temps. Nous remarquons que chez les traités par la concentration (250 $\mu\text{g/g}$ ) une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 1<sup>ère</sup> semaine et la 2<sup>ème</sup> semaine, et de façon non significative pour la 3<sup>ème</sup> semaine et hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) pour la 4<sup>ème</sup> semaine, Chez les traités par la concentration (500 $\mu\text{g/g}$ ) nous remarquons une diminution hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) pour les semaines (1, 2 et 4) et de façon très significative ( $p \leq 0,01$ ) pour la 3<sup>ème</sup> semaine, chez les traités par la concentration (750 $\mu\text{g/g}$ ) une augmentation significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine et non significative la pour la 3<sup>ème</sup> semaine et une diminution hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) pour la 4<sup>ème</sup> semaine.



**Figure 3.4 :** L'évolution du poids moyen des escargots traités par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde de Titane.

### 3.1.5. Effet de nanoparticule d'oxyde de Titane sur l'évolution de la longueur de la coquille des escargots:

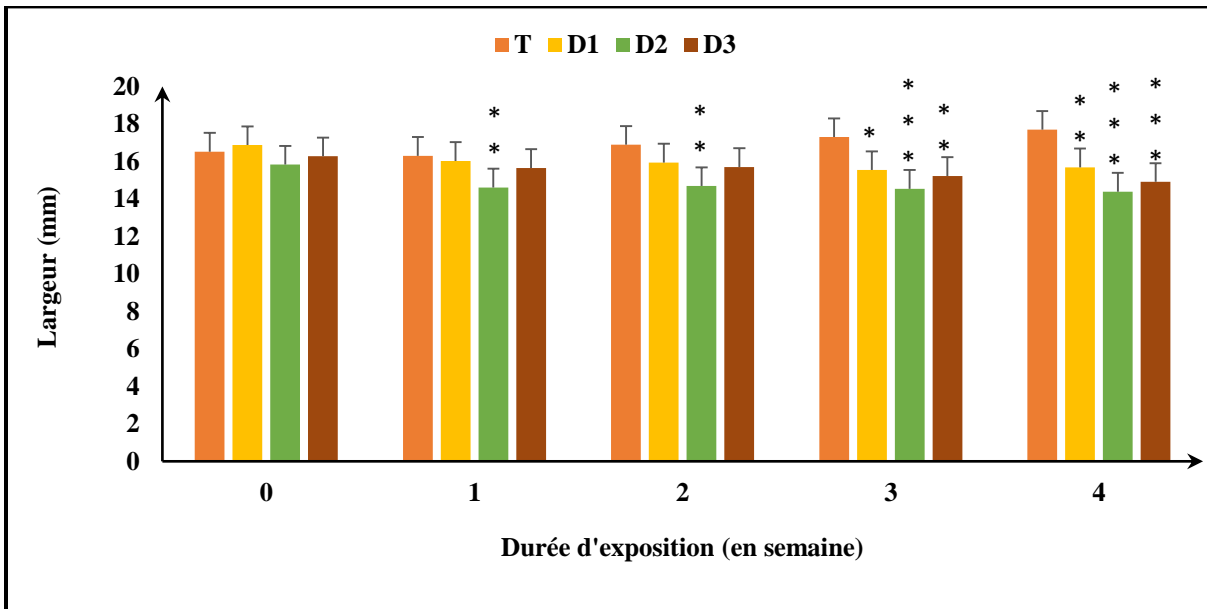
La figure (3.5) illustre l'effet de nanoparticule d'oxyde de Titane sur l'évolution de la longueur de la coquille des escargots en fonction du temps. Nous remarquons que chez les traités par la concentration (250 µg/g) une diminution non significative durant les quatre semaines d'exposition, chez les traités par la concentration (500µg/g) une diminution de façon non significative pour la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine et de façon significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaines, chez les traités par la concentration (750 µg/g) une augmentation non significative pour la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine et une diminution non significative pour la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaines.



**Figure 3.5 :** L'évolution de la longueur de la coquille chez les traités par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde de Titane.

### 3.1.6. Effet de nanoparticule d'oxyde de Titane sur l'évolution de la largeur de la coquille des escargots:

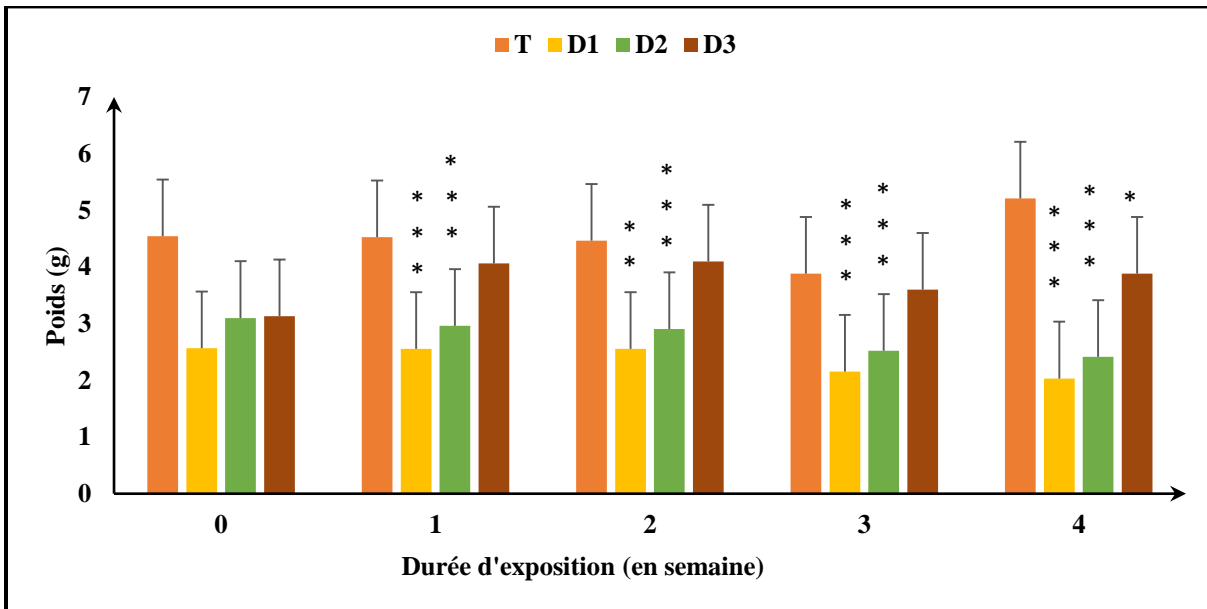
La figure (3.6) illustre l'effet de nanoparticules d'oxyde de titane sur l'évolution de la largeur de la coquille des escargots en fonction du temps. Nous remarquons que chez les traités par la concentration (250 $\mu\text{g/g}$ ) une diminution non significative pour la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> semaine, et significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 3<sup>ème</sup> semaine et très significative ( $p \leq 0,01$ ) pour la 4<sup>ème</sup> semaine. Chez les traités par la concentration (500 $\mu\text{g/g}$ ), nous remarquons une diminution très significative ( $p \leq 0,01$ ) pour la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> semaine et hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) pour la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaine. Chez les traités par la concentration (750 $\mu\text{g/g}$ ) une diminution non significative pour la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> semaine et très significative ( $p \leq 0,01$ ) pour la 3<sup>ème</sup> semaine et hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) pour la 4<sup>ème</sup> semaine.



**Figure 3.6 :** L'évolution de la largeur de la coquille chez les traités par différentes concentrations de nanoparticule d'oxyde de Titane.

**3.1.7. Effet des mixtures des nanoparticules (l'oxyde d'aluminium +l'oxyde de titane) sur l'évolution du poids des escargots :**

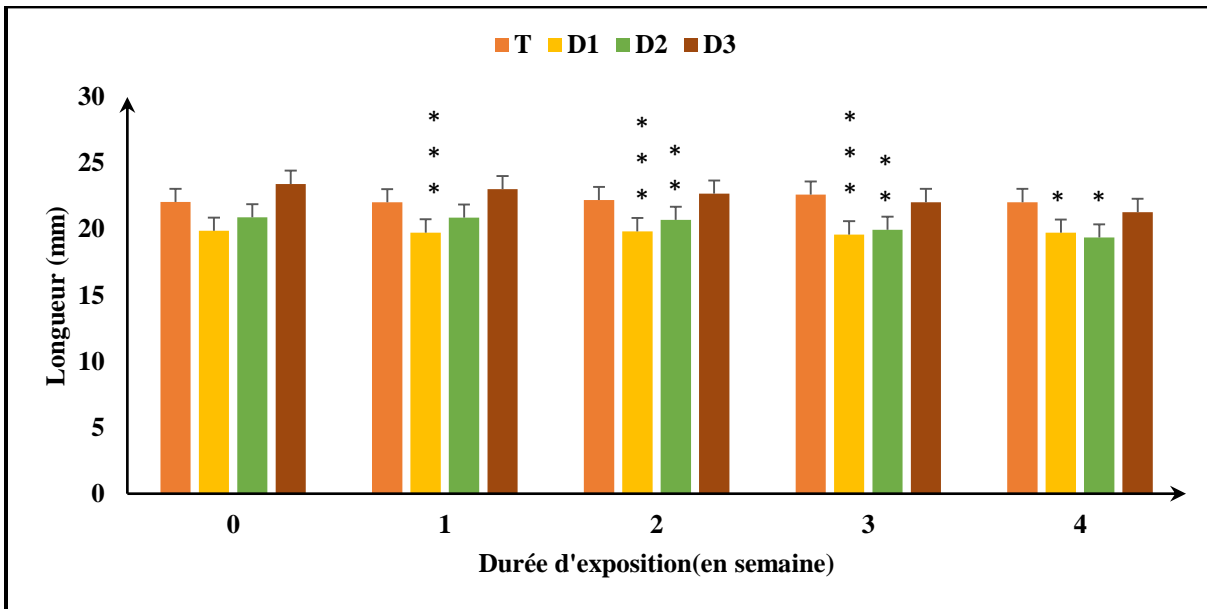
La figure (3.7) illustre l'évolution du poids relatifs des escargots traités par les mixtures de (l'oxyde d'aluminium + l'oxyde de titane) en fonction du temps. Nous remarquons que chez les traités par la Mixture 1 et 2 une diminution de façon hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) durant les 4 semaines d'exposition, chez les traités par la Mixture 3 une augmentation non significative pour les semaines (1, 2 et 3) et significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 4<sup>ème</sup> semaine.



**Figure 3.7 :** L'évolution du poids relatifs des escargots traités par différentes concentrations des mixtures (l'oxyde d'aluminium + l'oxyde de titane).

**3.1.8. Effet des mixtures des nanoparticules (l'oxyde d'Aluminium + d'oxyde de Titane) sur l'évolution de la longueur de la coquille des escargots :**

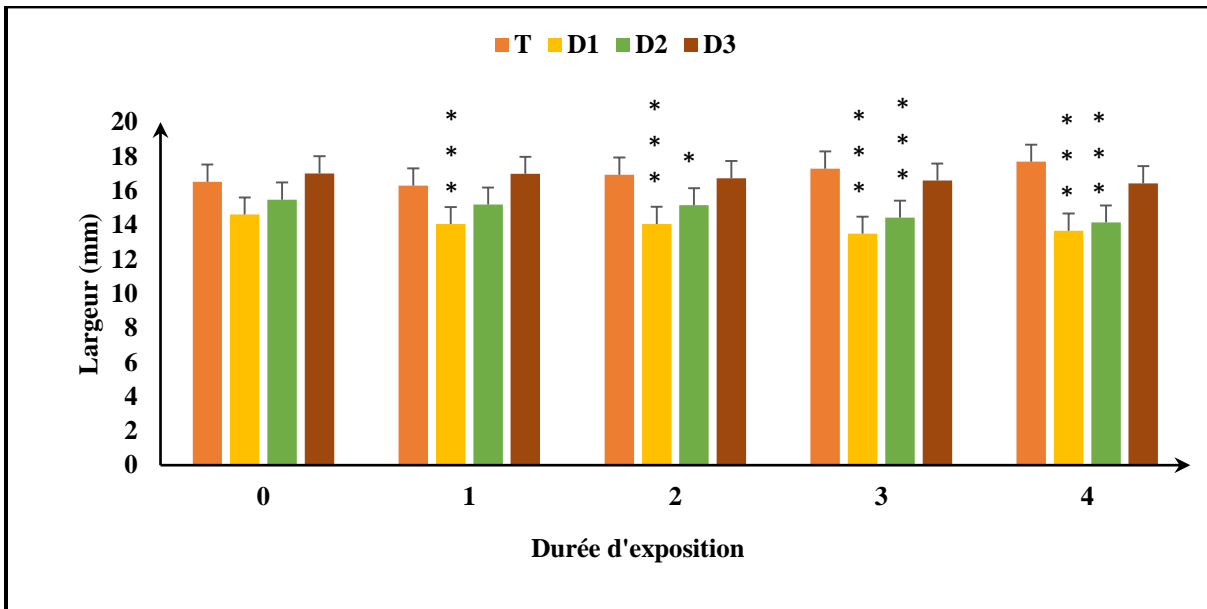
La figure (3.8) illustre l'effet des mixtures des nanoparticules (d'oxyde d'Aluminium + d'oxyde de Titane) sur l'évolution de la longueur des escargots en fonction du temps. Nous remarquons que chez les traités par Mixture 1 une diminution hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) pour la 1, 2, 3<sup>ème</sup> semaines et de façon significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 4<sup>ème</sup> semaine. Chez les traités par Mixture 2 aucune différence pour la 1<sup>ère</sup> semaine par rapport à la concentration de la 0 semaine et une diminution très significative ( $p \leq 0,01$ ) pour la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> semaine et significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 4<sup>ème</sup> semaine. Chez les traités par Mixture 3 une diminution de façon non significative durant les 4 semaines d'exposition.



**Figure 3.8 :** L'évolution de la longueur de la coquille chez les traités par différentes concentrations (d'oxyde d'Aluminium + d'oxyde de Titane).

### 3.1.9. Effet des mixtures des nanoparticules (l'oxyde d'Aluminium + d'oxyde de Titane) sur la largeur de la coquille des escargots :

La figure (3.9) illustre l'effet des nanoparticules (d'oxyde d'Aluminium + d'oxyde de Titane) sur largeur en fonction du temps. Nous remarquons que chez les traités par la Mixture 1 une diminution hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) pour toutes les semaines, chez les traités par la mixture 2 une diminution non significative pour la 1<sup>ère</sup> semaine et significative ( $p \leq 0,05$ ) pour la 2<sup>ème</sup> semaine et hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) pour la 3<sup>ème</sup> et les 4<sup>ème</sup> semaines, chez les traités par la mixture 3 une diminution non significative est enregistrée pour les 4 semaines.

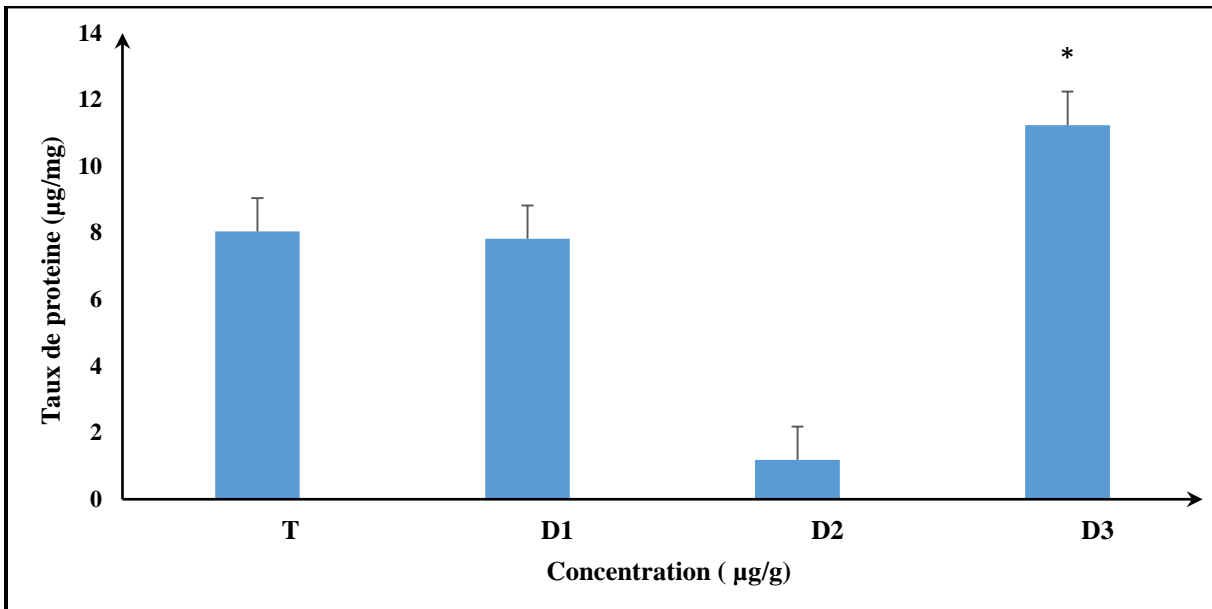


**Figure 3.9 :** L'évolution de la largeur de la coquille chez les traités par différentes concentrations (d'oxyde d'Aluminium + d'oxyde de Titane).

### 3.2. Effets des nanoparticules sur l'évolution des Paramètres biochimiques :

#### 3.2.1. Évolution du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule d'oxyde d'aluminium :

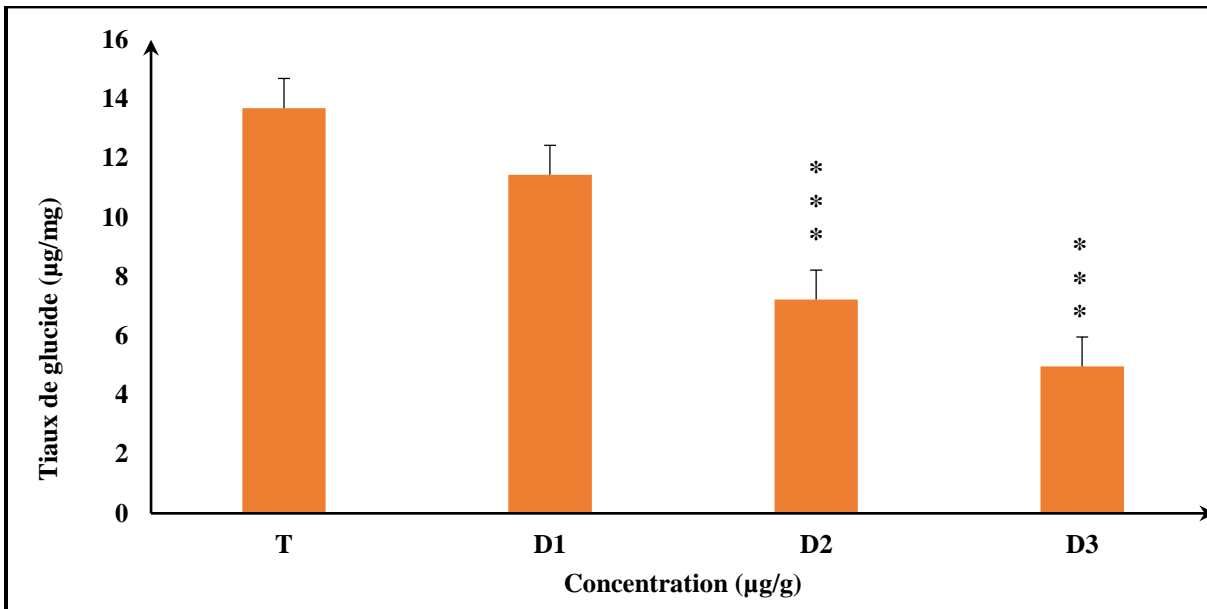
La figure (3.10) illustre l'effet de l'oxyde D'Aluminium sur l'évolution du taux de protéines au niveau de l'Hépatopancréas des escargots. Nous remarquons qu'il y a une augmentation du taux de protéines pour la plus forte concentration (750  $\mu\text{g/g}$ ) d'une manière significative ( $p < 0.05$ ), et aucun différence par rapport au témoin pour la concentration (250  $\mu\text{g/g}$ ).



**Figure 3.10 :** Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule Oxyde d'aluminium sur l'évolution du taux de protéines au niveau de l'hépatopancreas d'*Helix aspersa*.

### 3.2.2. Évolution du taux de glucides totaux au niveau de l'hépatopancreas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule d'oxyde d'aluminium :

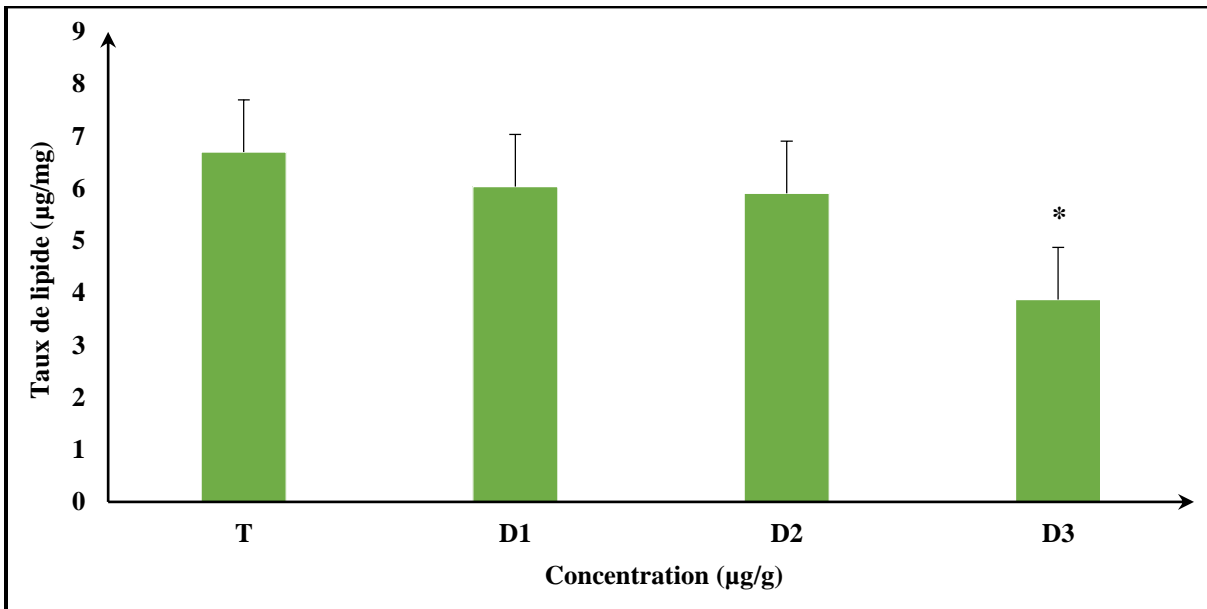
La figure (3.11) illustre l'effet de l'oxyde d'Aluminium sur l'évolution du taux des glucides au niveau de l'Hépatopancreas des escargots traités par différents concentration. Nous remarquons que chez les traités par les concentrations (250 µg/g) une diminution non significative et hautement significative chez les traites par les concentrations (500µg/g et 750 µg/g) par rapport aux témoins.



**Figure 3.11 :** Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule Oxyde d'aluminium sur l'évolution du taux de glucides au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

### 3.2.3. Évolution du taux de lipides totaux au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule d'oxyde d'aluminium :

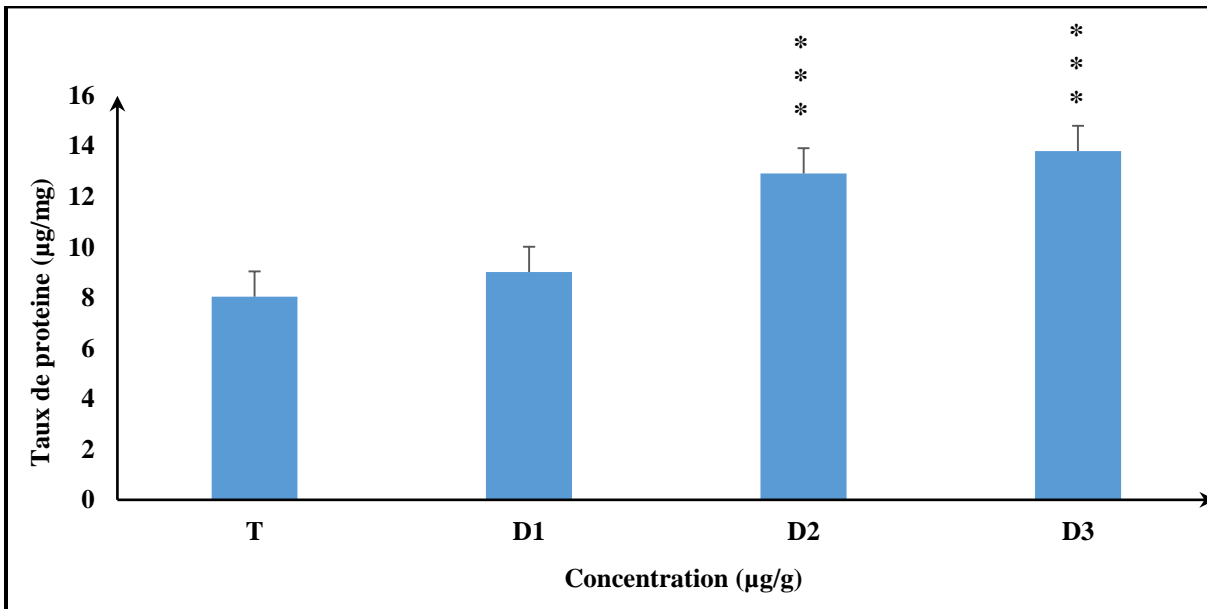
La figure (3.12) illustre l'effet de l'oxyde d'Aluminium sur l'évolution du taux des lipides au niveau de l'Hépatopancréas des escargots. Nous remarquons que le taux des lipides diminue de façon dose dépendante, l'analyse statistique révèle une différence non significative pour la concentration (250µ g/g et 500 µg/g) et significative pour la concentration (750 µg/g) par rapport au témoin.



**Figure 3.12 :** Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule Oxyde d'aluminium sur l'évolution du taux de lipides au niveau de l'hépatopancreas d'*Helix aspersa*.

### 3.2.4. Évolution du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancreas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule dioxyde de titane :

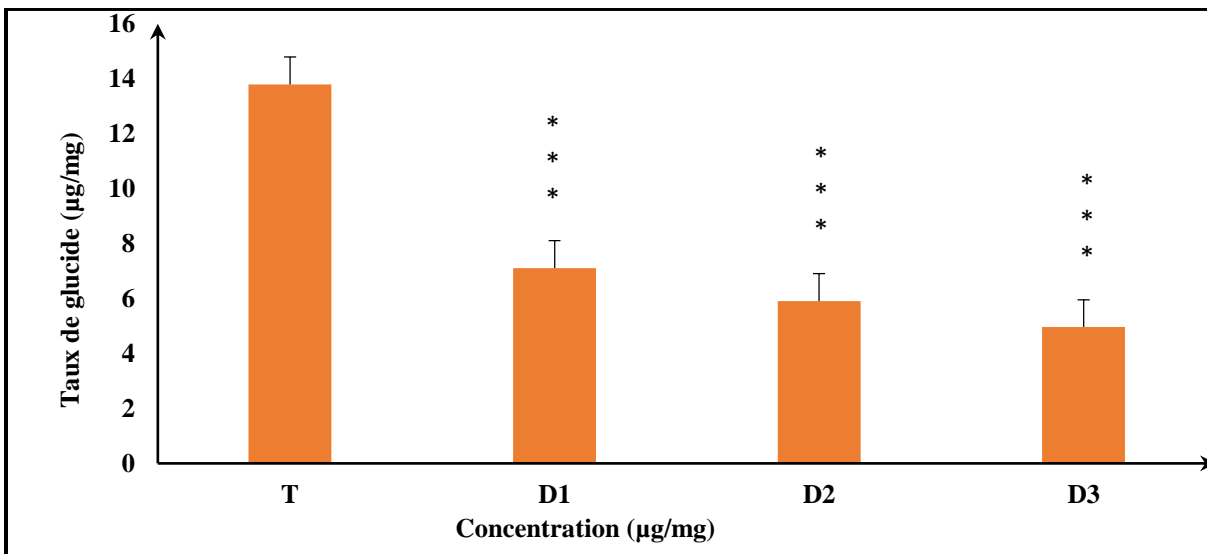
La figure (3.13) illustre l'effet du dioxyde de titane sur le taux des protéines au niveau de l'Hépatopancreas des escargots, Nous remarquons une augmentation hautement significative pour les fortes concentrations (500 et 750 µg/g) et une légère augmentation non significative pour la concentration (250 µg/g) par rapport au témoin.



**Figure 3.13 :** Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule dioxyde de titane sur l'évolution du taux de protéines au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*

### 3.2.5. Évolution du taux de glucides totaux au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule dioxyde de titane :

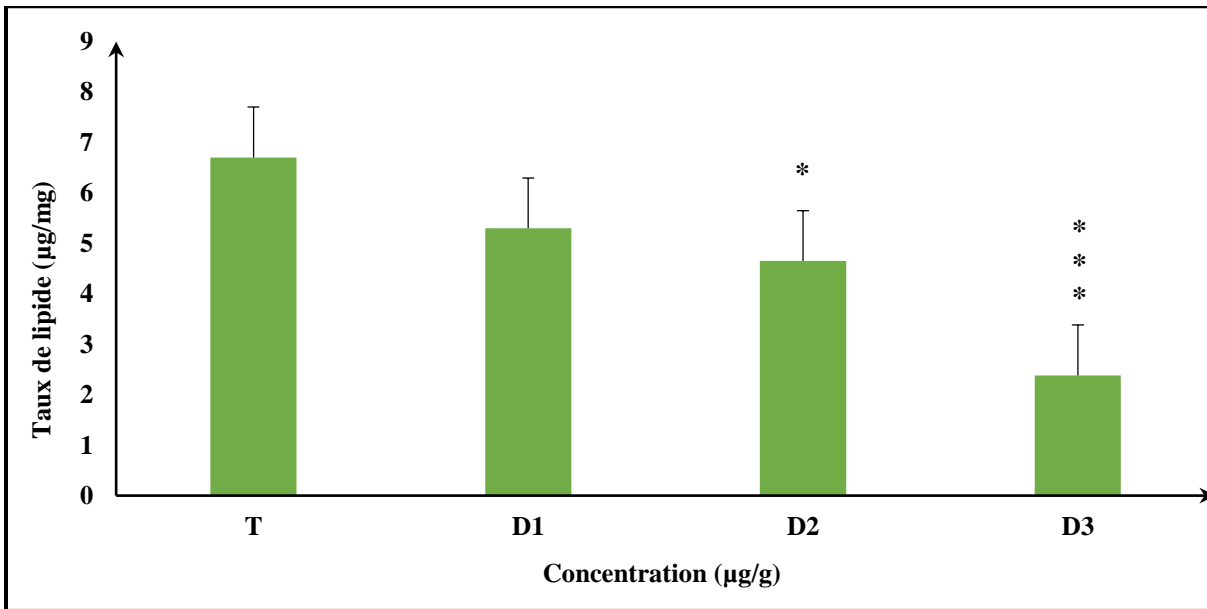
La figure (3.14) illustre l'effet du dioxyde de titane sur le taux des glucides au niveau de l'Hépatopancréas des escargots. Les résultats statistiques révèle une diminution hautement significative ( $p < 0.001$ ) pour toute les concentrations (250 ,500 et 750 µg/g).



**Figure 3.14 :** Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule dioxyde de titane sur l'évolution du taux de glucides au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

### 3.2.6. Évolution du taux de lipides totaux au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par le nanoparticule dioxyde de titane :

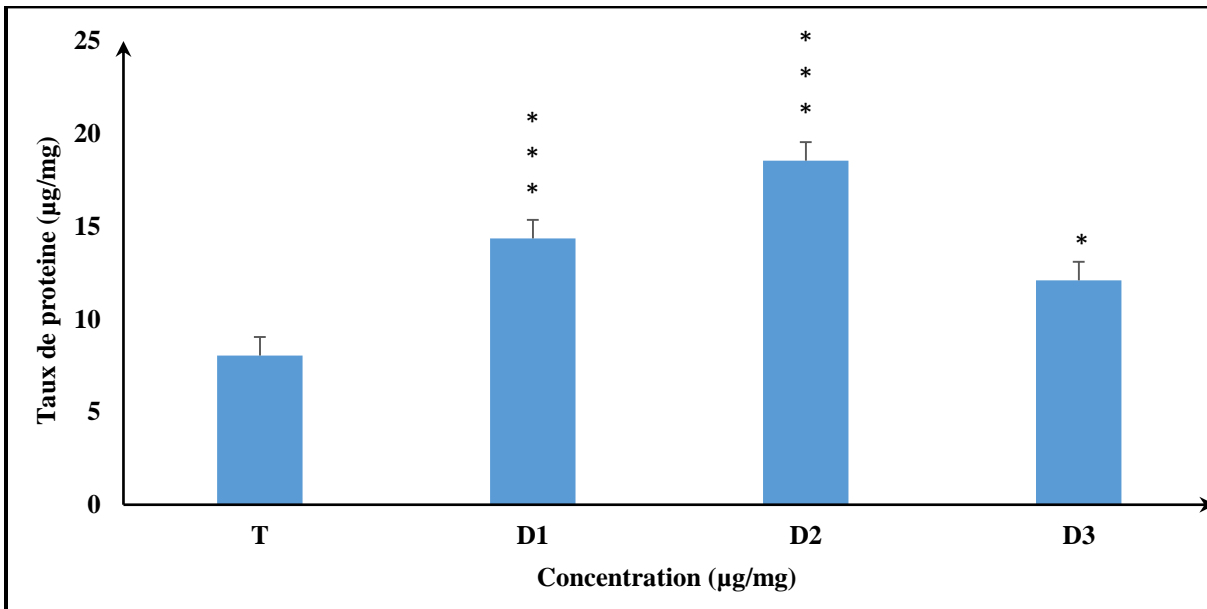
La figure (3.15) illustre l'effet du dioxyde de titane sur le taux des lipides au niveau de l'Hépatopancréas des escargots. Nous remarquons une diminution non significative pour la faible consommation ( $250\mu\text{ g/g}$ ), et significative pour la concentration ( $500\ \mu\text{g/g}$ ), et hautement significative pour la forte concentration ( $750\mu\text{g /g}$ ) par rapport au témoin.



**Figure 3.15 :** Effet du traitement par des concentrations croissantes de nanoparticule dioxyde de titane sur l'évolution du taux de lipides au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

### 3.2.7. Évolution du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par la mixture du nanoparticules AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + TiO<sub>2</sub> :

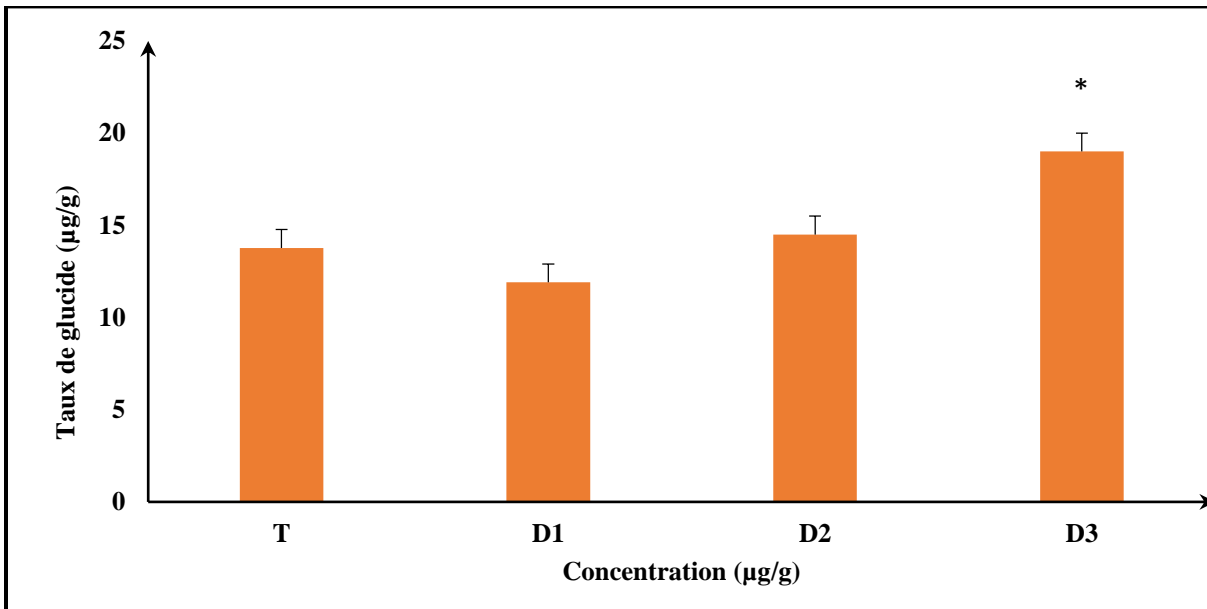
La figure (3.16) illustre l'effet des nanoparticules (mixture de l'oxyde D'Aluminium et dioxyde de titane) sur le taux des protéines au niveau de l'Hépatopancréas des escargots. Le résultat statistique révèle une augmentation hautement significative pour les concentrations ( $250$  et  $500\ \mu\text{g/g}$ ) par rapport au témoin, et significative pour la forte concentration ( $750\mu\text{g /g}$ ).



**Figure 3.16 :** Effet du traitement par des concentrations croissantes de la mixture des nanoparticules AL2O3 et TiO2 sur l'évolution du taux de protéines au niveau de l'hépatopancreas d'*Helix aspersa*.

### 3.2.8. Évolution du taux de glucides totaux au niveau de l'hépatopancreas chez l'escargots qui traitées par la mixture du nanoparticules AL2O3 + TiO2 :

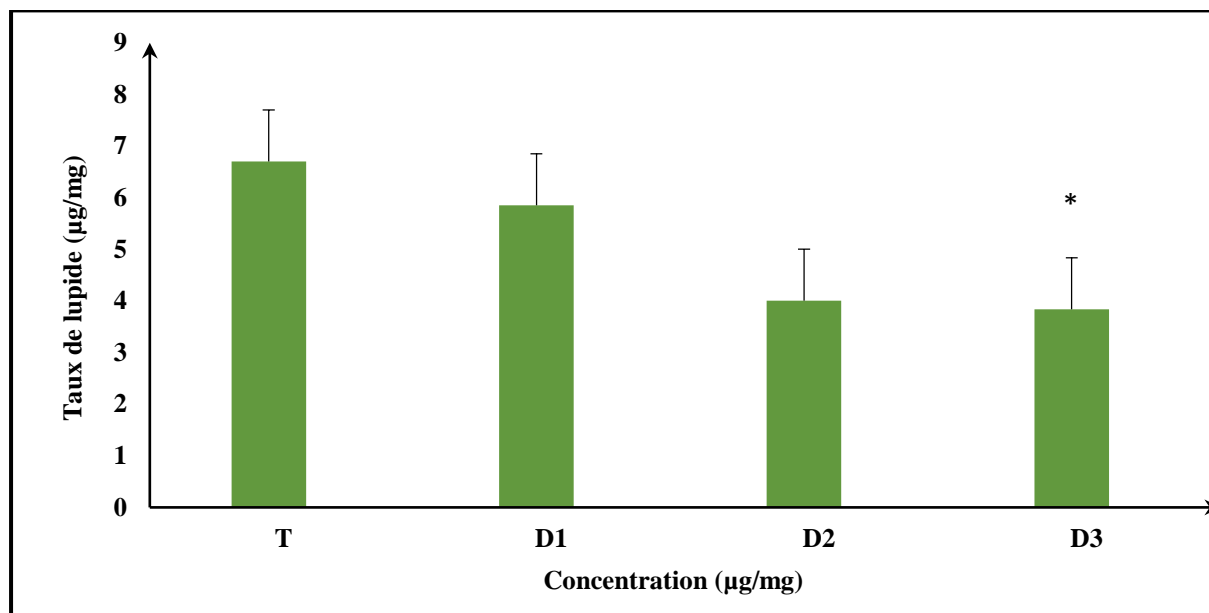
La figure (3.17) illustre l'effet de mixture des nanoparticules (mixture de l'oxyde D'Aluminium et dioxyde de titane) sur le taux de glucide au niveau de l'Hépatopancreas des escargots les résultats statistiques révèle une diminution de façon non significative pour la faible concentration (250 µg /g), puis une augmentation non significative pour la concentration (500 µg/ g) et significative pour la concentration (750 µg/ g).



**Figure 3.17 :** Effet du traitement par des concentrations croissantes de la mixture des nanoparticules AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et TiO<sub>2</sub> sur l'évolution du taux de glucides au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

### 3.2.9. Évolution du taux de lipides totaux au niveau de l'hépatopancréas chez l'escargots qui traitées par la mixture du nanoparticules AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + TiO<sub>2</sub> :

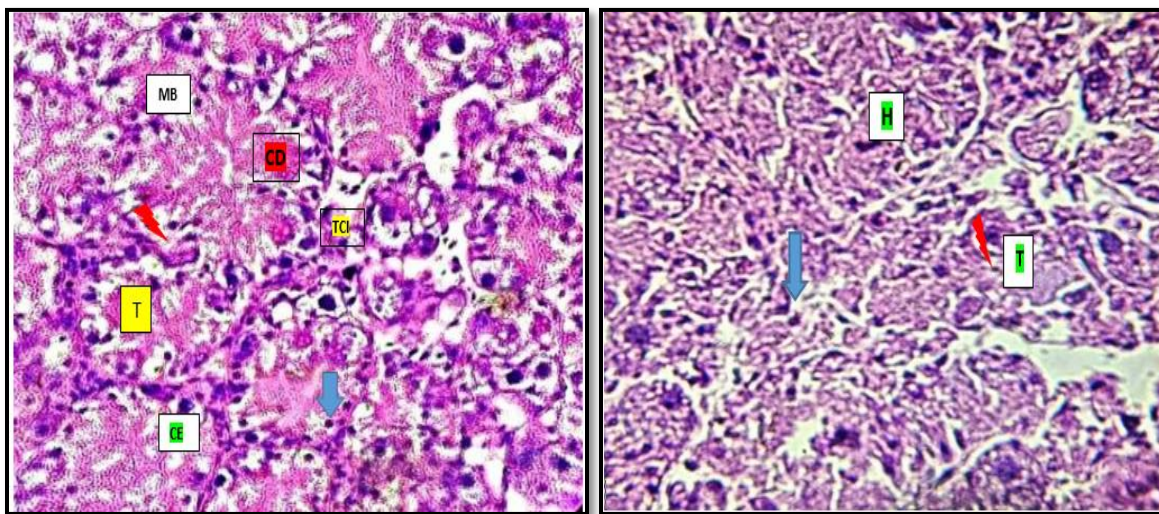
La figure (3.18) illustre l'effet de la mixture des nanoparticules (l'oxyde d'Aluminium et dioxyde de titane) sur le taux de lipides au niveau de l'Hépatopancréas des escargots. Nous remarquons une diminution non significative pour les concentrations (250 et 500µg/g) et significative ( $p < 0.05$ ) pour la concentration (750 µg/g).



**Figure 3.18 :** Effet du traitement par des concentrations croissantes de la mixture des nanoparticules AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et TiO<sub>2</sub> sur l'évolution du taux de lipides au niveau de l'hépatopancreas d'*Helix aspersa*.

### 3.3. Aspect histopathologique :

L'hépatopancréas des escargots témoins (figure 3.19) est constitué d'une glande digestive composée essentiellement par la juxtaposition de nombreux tubules digestifs de différentes formes et tailles, séparés par l'espace inter tubulaire. La lumière des tubules est bordée par un épithélium simple associant trois types cellulaires : les cellules digestives CD (les plus abondantes), les cellules excrétrices CE, et les cellules à calcium.

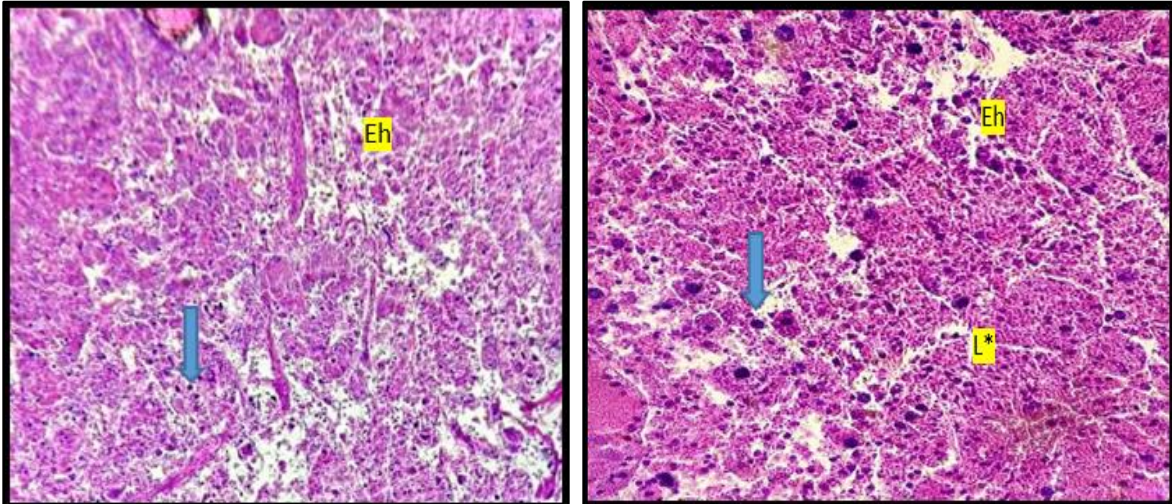


**Figure 3.19 :** Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (G×10), (G×40)

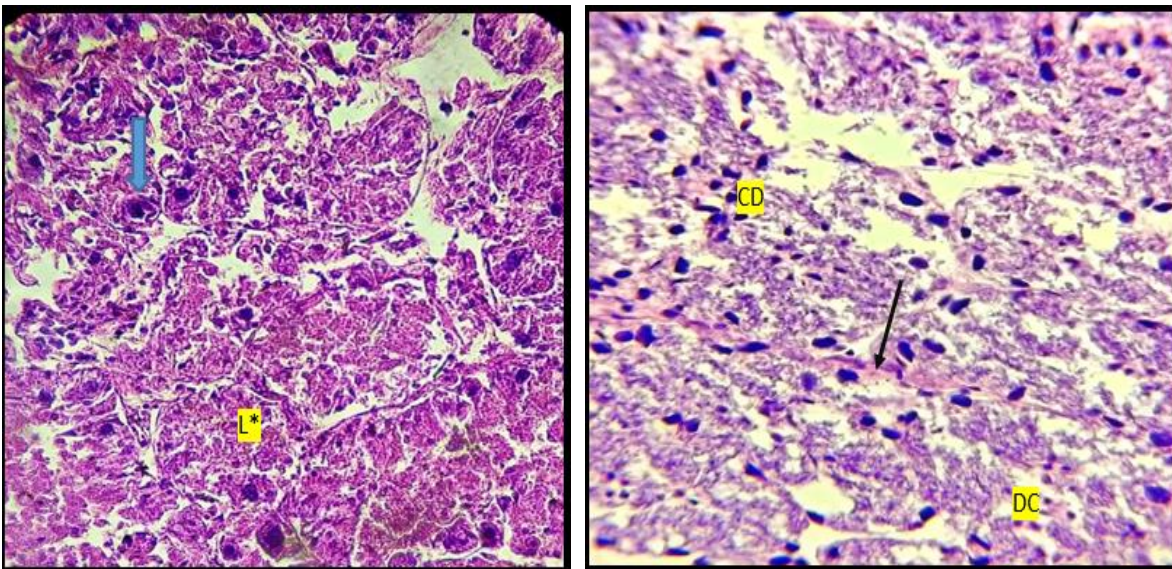
#### 3.3.1 Effets de nanoparticule d'oxyde d'aluminium (AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) :

Chez les lots traités par l'AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> par la dose 1 et 2 (250 µg/g et 500 µg/g) on a observés des rétrécissements des lumières tubulaires, des dilatations des cellules à calcium et des espaces inter tubulaires élargir.

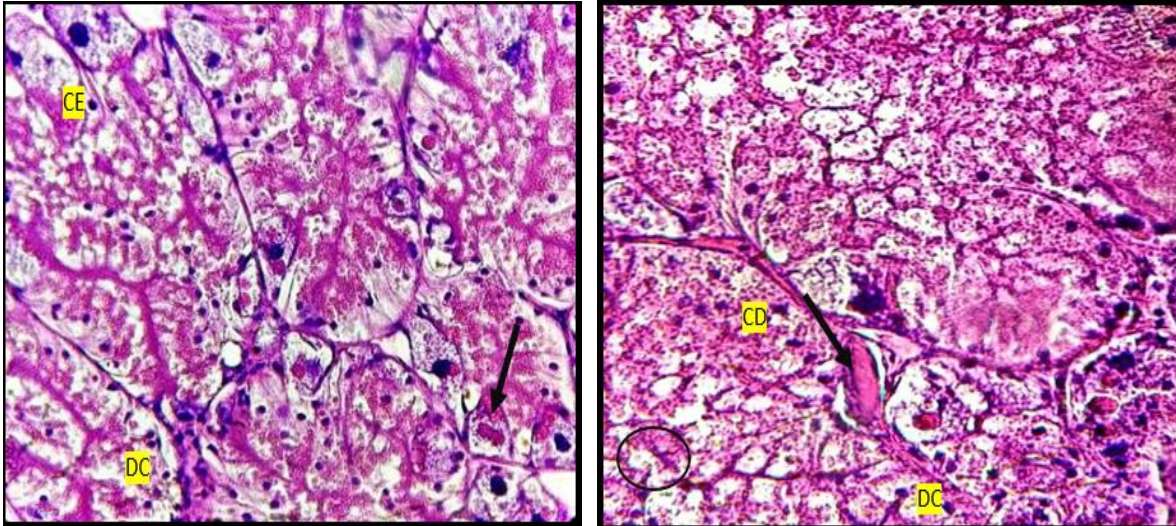
Chez les traités par la dose 3 (750 µg /g), les structures cellulaires présente des altérations visibles se manifestant par une dégénérescence des cellules digestives, un aspect inflammatoire des tissus avec quelques débris cellulaires, ainsi que la diminution de la lumière des acini dont la membrane basale est totalement détériorée.



**Figure 3.20** : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par 250 µg/g de nanoparticule d'oxyde aluminium (G×10) . (G×40).



**Figure 3.21** : Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traités par 500 µg/g de nanoparticule d'oxyde aluminium (G×10), (G×40).

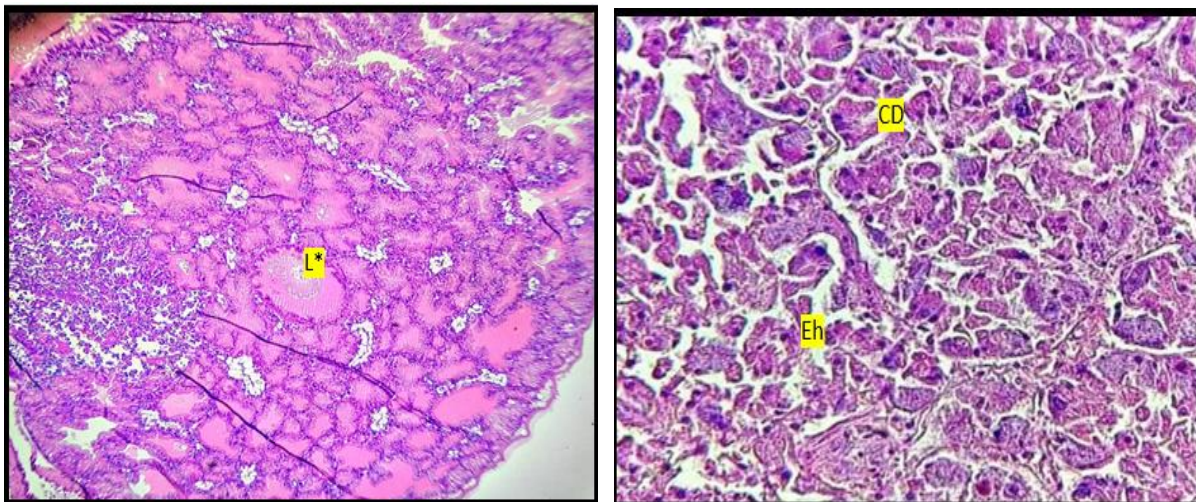


**Figure 3.22 :** Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par 750 µg/g de nanoparticule d'oxyde d'aluminium (G×40), (G×10).

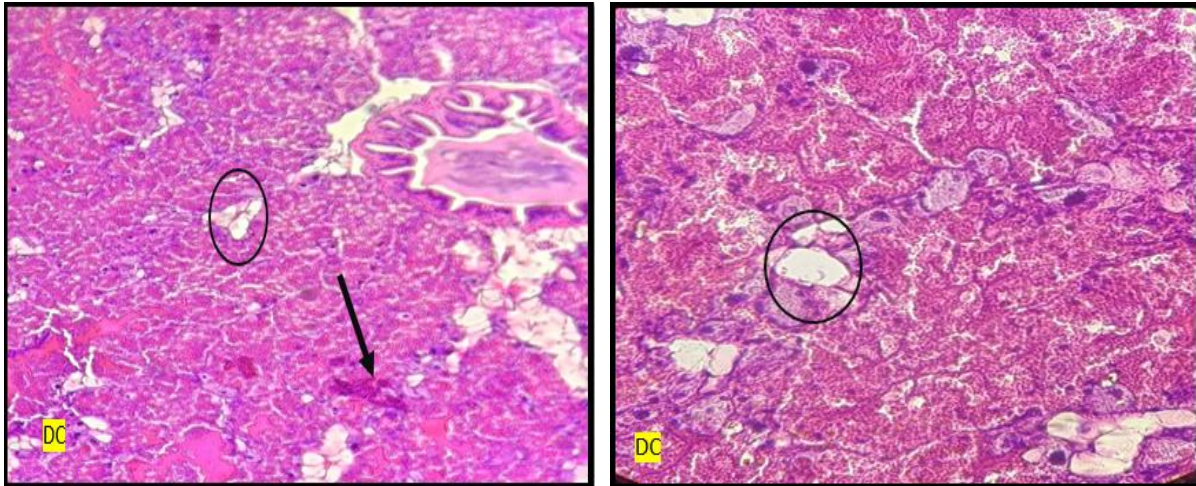
### 3.3.2. Effets des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>)

L'observation microscopique des tissus des traités par les nanoparticules de dioxyde de titane révèle des tubules avec un contour irréguliers et des lumières rétréci accompagnent par la disparition du parenchyme inter tubulaire chez les traités à la dose 1 (250µg/g)

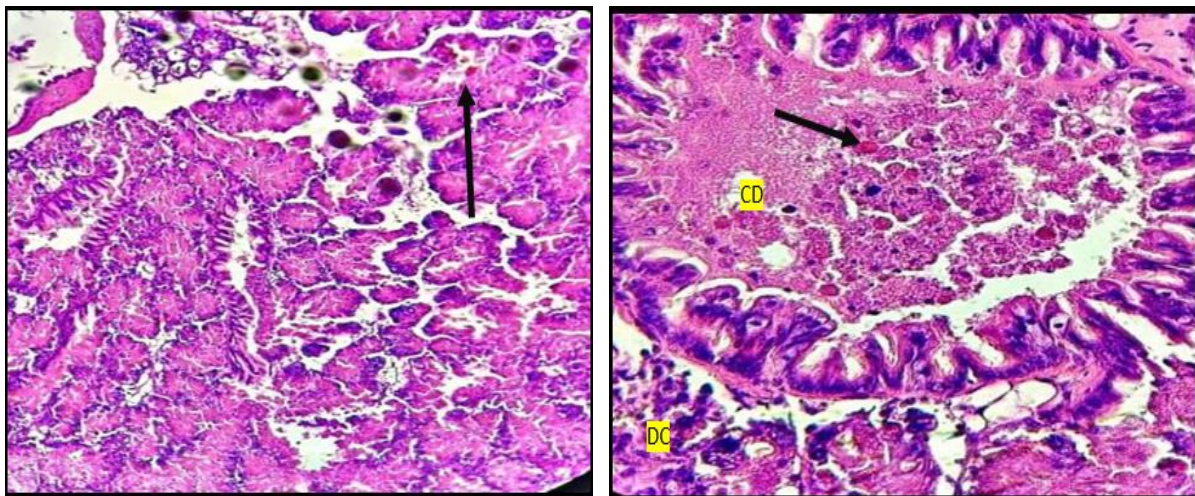
A la dose 500 et 750µg/g (Figure 3.24 et 3.25), les mêmes changements sont observés accompagnés par une dégénérescence de certaines cellules digestives, il y a une rupture de la membrane apicale et basale, le tissu conjonctif, les tubules digestifs et leurs membranes sont endommagées, avec apparition des débris cellulaires et des infiltrats inflammatoires.



**Figure 3.23 :** Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par 250 µ g/g de nanoparticule de d'oxyde de titane. (G×10), (G×40).



**Figure 3.24 :** Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par 500 µg/g de nanoparticule de d'oxyde de titane. (G×10), (G×40)



**Figure 3.25 :** Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par 750µg/g de nanoparticule de d'oxyde de Titane. (G×10), (G×40)

### 3.3.3. Effets des mixtures de nanoparticule d'AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et TiO<sub>2</sub> :

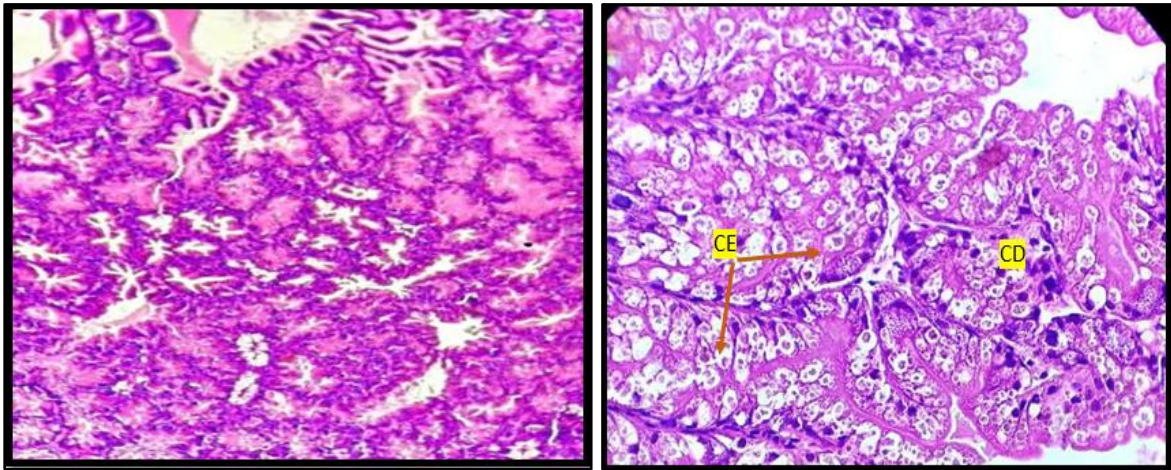
Enfin, l'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots exposés aux mixtures M1, M2 et M3 a montré des altérations tissulaires en réponse à toutes les mixtures comparé à celui des escargots témoins. Ces altérations sont doses- dépendantes. La M1 (Figure 3.26) provoque un rétrécissement de la lumière tubulaire et accompagnés par une diminution dans le nombre des cellules digestives et une augmentation dans les cellules excrétoires.

La M2 (Figure 3.27) entraîne les mêmes effets histopathologies que la M1, avec cependant, une lumière tubulaire plus élargie. La M3 (Figure 3.28) entraîne une dégénérescence très avancée de

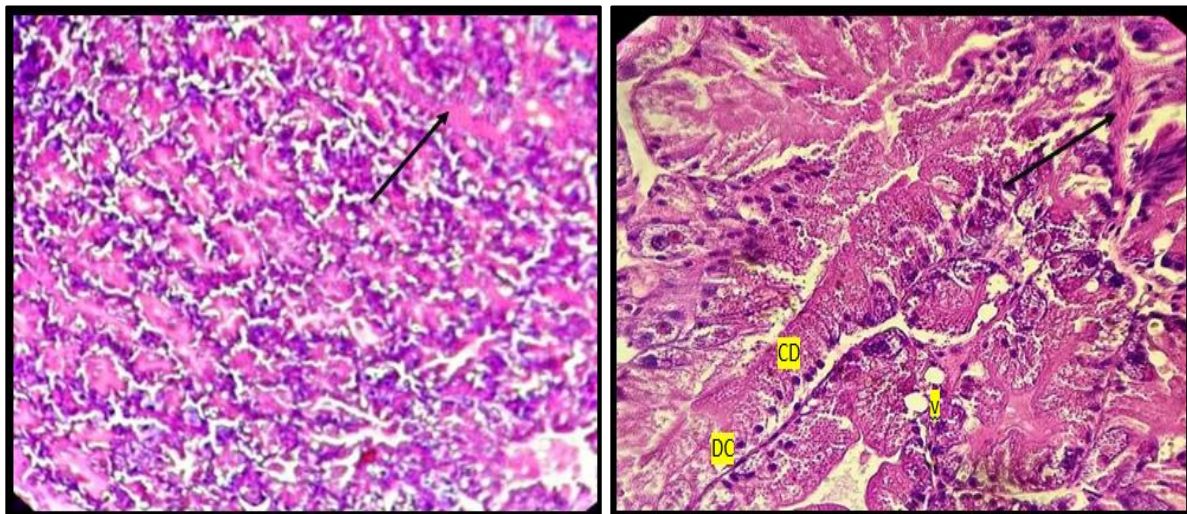
## RÉSULTATS ET DISCUSSION

---

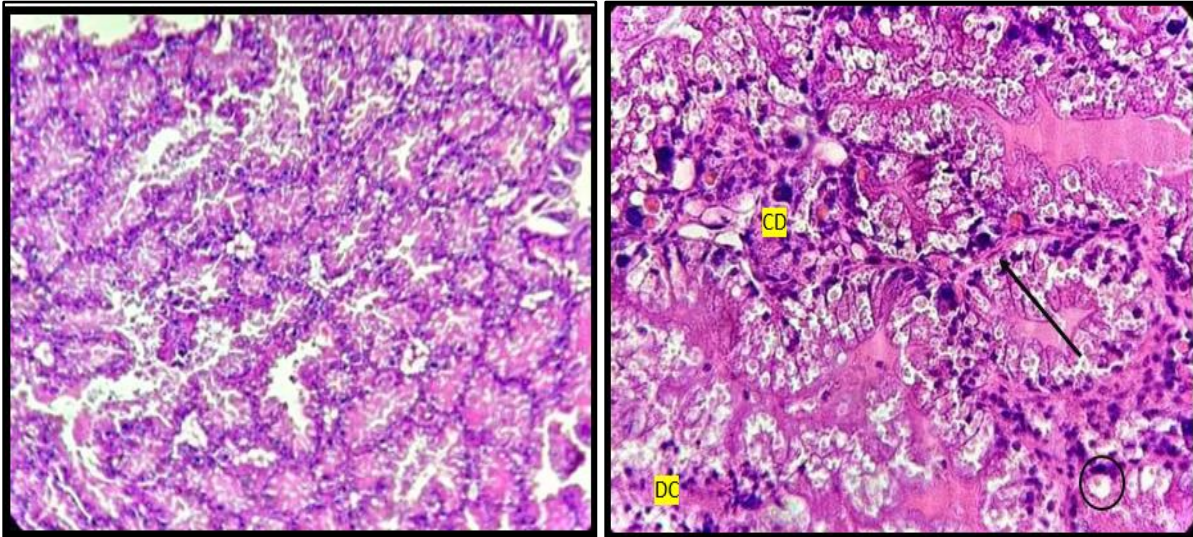
toutes les structures tubulaires. Les contours cellulaires sont moins visibles après exposition à la M3 par rapport à la M2, tous les types cellulaires sont affectés.




**Figure 3.26 :** Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par la mixture 1 des nanoparticules (G×10), (G×40).





**Figure 3.27 :** Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par la mixture 2 des nanoparticules (G×10), (G×40).




**Figure 3.28 :** Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par la mixture 3 des nanoparticules (G×10), (G×40).

DC : Débris cellulaire , T : tubule, Eh : espace hémolympatique,  : Cellule a calcium

L\* : lumière rétracté,  Nécrose membranaire, CD : cellule digestif

 Infiltra inflammatoire, V : Vacuole, CE : cellule excrétrice

 : Lumière tubulaire, TCI : tissu connectif inter tubulaire,

MB : membrane basale,

### 4. Discussion:

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

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

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

Dans cet étude nous nous sommes intéressés à l'effet des nanoparticules ( $Al_2O_3$ , de  $TiO_2$  et leurs mixtures) sur les paramètres morphologiques, biochimiques et histologiques d'une population juvénile l'escargot *Helix aspersa*. Ainsi l'exposition des escargots à des concentrations croissantes des nanoparticules (250, 500 et 750  $\mu g/g$ ) en fonction du temps par ingestion apparaissent assez sensibles à ses deux nanoparticules aux conditions de laboratoire.

### 4.1. Effets des nanoparticules (AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de TiO<sub>2</sub> et des mixtures) sur les paramètres biométriques chez *Helix aspersa* :

Dans notre travail nous avons choisi :

**Sur le poids des escargots :** comme modèle biologique *Helix aspersa* et nous avons noté une diminution de manière non significative de la masse corporelle chez les animaux traités par les nanoparticules (AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> et la mixture) ce qui constitue un premier indice de toxicité, cette perte de poids peut être expliquée par la diminution de la consommation alimentaire et la répulsion de la nourriture, inhibition de synthèse d'une hormone de croissance essentielle à la croissance des escargots que nous avons constatée particulièrement chez les animaux traités par les différentes concentrations, Ces résultats sont d'accord avec **Gomot-de Vaufleury et Bispo (2000)** se sont intéressés aux effets de l'ingestion à partir d'un sol contaminé avec les pesticides du pentachlorophénol, du trichlorophénol et du naphthalène ou de de la pulvérisation de son lixiviat sur la croissance de *Helix aspersa* pendant 28 jours. Une forte inhibition de la croissance est observée,

Ainsi, **Viard et al., (2004)** ont fait des constatations similaires en présence d'une contamination en plomb : c'est l'extrême concentration en plomb dans le sol, détectée par les escargots, qui limite leur taux de consommation et donc inhibe partiellement leur croissance,

Ainsi, **Simkiss et Watkins (1990)** suggéraient déjà que *Helix aspersa* est capable de détecter de fortes concentrations en zinc dans sa nourriture, ce qui entraîne une diminution du taux de consommation de la nourriture fortement contaminée. Toutefois, cette inhibition de croissance peut aussi être due à un phénomène de toxicité

En effet La modification du comportement ainsi la diminution des taux de survie, de croissance et de reproduction peuvent conduire à une modification de la dynamique d'une population, voire à la disparition de l'espèce dans l'habitat pollue (**Caswell, 2001**).

**Hopkin et al., (1995) et Bibic et al., (1997)** stipulent que dans un environnement pollue, l'animal se met dans un état de jeun prolonge pour éviter la nourriture souillée.**Sur la longueur et la largeur de la coquille des escargots.**

Concernant l'évolution des deux diamètres (longueur et largeur) de la coquille, nous notons une diminution et augmentation significative et non significative dose-dépendante de ce facteur en présence des nanoparticules d'oxyde d'aluminium, d'oxyde de titane et de leurs mixtures durant les semaines d'exposition en comparaison avec les témoins, pourrait s'expliquer par une interférence possible entre les nanoparticules du calcium (Ca). En effet, le Ca joue un rôle important dans le développement du corps entier des escargots et en particulier celui de la coquille. Ceci a été montré chez *Helix aspersa* (Gomot *et al.*, 1989) et chez *Achatina fulica* (Irlande, 1991)

Ainsi, Coeurdassier *et al.*, (2001), qui a mis en évidence une perturbation des diamètres de la coquille des escargots après exposition au diméthoate (pesticide à base d'organophosphorés).

Ainsi, Gimbert *et al.*, (2008) ont démontré une diminution de 30% de la masse de la coquille des escargots exposés à un sol artificiel contaminé par le cadmium

Bluzat et Seugé (1979) ont montré chez le mollusque *Lymnea stagnalis* que le Carbaryl et le Lindane provoquent dans le cas d'une intoxication chronique, une diminution de la croissance des coquilles.

#### **4.2. Effets des nanoparticules (AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, de TiO<sub>2</sub> et des mixtures) sur les paramètres biochimiques chez *Helix aspersa* :**

Les paramètres biochimiques chez les espèces exposées à des substances toxiques sont considérés comme des bons biomarqueurs et peuvent constituer un important outil de diagnostic pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (Forbes *et al.*, 1997; Mcloughlin *et al.*, 2000). Les résultats de dosage des paramètres biochimiques montrent une accumulation des protéines et une baisse de niveau des glucides et des lipides au niveau de l'hépatopancreas des traités par les deux nanoparticules,

#### **4.3. Effet des nanoparticules (AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> et des mixtures) sur le taux des protéines :**

Les protéines sont les premiers biomarqueurs de perturbation métabolique. L'évolution du taux de protéines totales dans l'hépatopancreas des escargots traités aux deux nanoparticules a augmenté (avec des différences significatives) et d'une manière dose-dépendante. Ce phénomène

pourrait être considéré comme un biomarqueur précoce de l'exposition aux contaminants chimiques. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de (Géret *et al.*, 2002b) qui montrent que la quantité des protéines totales augmente significativement après 7 jours de traitement à la dose de 40 µg/l.

L'augmentation significative du taux des protéines aux mixtures M1 et M2 peuvent s'expliquer par une forte induction de protéines spécifiques aux mixtures M1 et M2 sous l'effet du stress chimique, et la réduction possible de cette synthèse protéique, suite à une exposition intense (M3) et à l'hépatotoxicité qui en découle, ce qui peut conduire à des faux négatifs. D'ailleurs, les mêmes constatations ont été faites auparavant par Lagadic *et al.* (1997) sous l'effet des contaminants chez les invertébrés.

La synthèse des protéines totales implique plusieurs cas, en particulier l'induction d'activités enzymatiques : les enzymes de détoxification / métabolisation. Cette augmentation peut être expliquée aussi par Kohler *et al.*, (1992) qui ont proposé une hypothèse qui explique comment les oxydes métalliques provoquent la synthèse des protéines de stress (enzymes de détoxification).

#### **4.4. Effet des nanoparticules (AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> et des mixtures) sur le taux des glucides :**

Le taux des glucides dans l'hépatopancréas des escargots traités aux nanoparticules d'oxyde d'Aluminium et de titane est diminué d'une manière dose-dépendante. En effet, 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). Nos résultats sont conformes avec ceux de El-Wakil et Radwan (1991). Padmaja et Rao (1994) ont d'ailleurs suggérés que la diminution du taux de glycogène dans les tissus de l'escargot d'eau douce *Bellamya dissimilis* (Müller), exposé à l'Endosulfan, le Méthyl parathion, le Quinalphos et le Nuvan peut être due à l'utilisation du glycogène pour générer l'énergie nécessaire pour faire face à l'hypoxie provoquée par ces nanoparticules. La déplétion en glycogène des tissus hépatiques peut être également interprétée comme une réponse non spécifique au stress chimique avec cependant des conséquences sur la mobilisation à long terme des réserves énergétiques et

ainsi sur la sensibilité au stress et la susceptibilité des individus aux maladies (Schwaiger *et al.*, 1997).

Quant aux taux des glucides chez les escargots traités par les mixtures M1, M2 montrent des modifications non significatives contrairement à la M3 qui montre une augmentation significative. En fait, il n'existe pas vraiment de règle générale qui permet d'expliquer ou de prédire la toxicité associée à un mélange donné de produits chimiques. Ainsi, les mixtures M1, M2 semblent n'avoir aucun effet sur le métabolisme des glucides, alors que la M3 semble avoir un effet synergique sur le même métabolisme. Ceci peut être expliqué par plusieurs hypothèses comme l'augmentation des réserves énergétiques, ou par des changements structuraux ou de perméabilité des membranes cellulaires (Carpy *et al.*, 2000).

#### **4.5. Effet des nanoparticules (AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> et des mixtures) sur le taux des lipides :**

Concernant le taux des lipides on note une diminution dose-dépendante du continue lipidique après exposition de *Helix aspersa* aux deux nanoparticules et leurs mixtures, peut être due au stress chimique causé par les composés testés. En effet, Eissa *et al.* (2002) ont rapporté que l'effet nocif de composés chimiques pourrait être attribué à l'augmentation de l'utilisation de l'énergie Afin d'assurer l'énergie nécessaire pour les réactions de désintoxication, le corps utilise des éléments de rechange et les dégradent pour augmenter le taux de glucose. Pour la même espèce, Jumel et Lagadic (2000) rapportent une augmentation de la demande énergétique des animaux qui se traduit par une mobilisation rapide de glycogène du manteau. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Saravanan *et al.*, (2015) qui a proposé l'hypothèse de l'élévation du niveau de glucose dans le sang comme réponse à des perturbations respiratoires dues au stress causé par les NPs du Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> d'une taille inférieure à 50 nm (1 et 25 mg/L) appliquées à des carpes (*Labeo rohita*) durant 96 h.

#### **4.6. Effet d'oxyde d'Aluminium, d'oxyde de titane et leurs mixtures sur l'histologie de l'hépatopancréas :**

Notre étude histologique permet de situer les atteintes tissulaires de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* en réponse à la toxicité d'oxyde de d'Aluminium et d'oxyde de titane et leurs mixtures dès la plus faible concentration testée qui pourraient se traduire par des changements

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

---

structurels. Ces changements expriment par des infiltrats inflammatoires, des nécroses cellulaires ainsi une dégénérescence partielle et à la fois totale de certaines cellules digestives. De plus l'examen histologique, a mis en évidence une dilatation des espaces hemolymphatiques entre les tubules, des débris cellulaires, une lumière plus rétréci et l'apparition d'une hypertrophie au niveau des cellules excrétrices.

Ces résultats sont d'accord avec Les travaux de **Marigomez et al., (1996) et (1998) et Zaldibar et al., (2007a)**, ont mis en évidence chez les lingots terrestres soumis a un stress chimique (métallique ou autre) un nombre relatif élevé des cellules a calcium et une hypertrophie des espaces intercellulaires au niveau de la glande digestive.

les modifications de la structure de l'hépatopancréas ont également été soulevées dans les études de (Boucenna, 2015) et celles de (Besnaci, 2016) menée sur les escargots *Helix aspersa* exposés aux nanoparticules et les travaux de (El-Khaya et al., 2015) menés sur des escargots d'eau douce ( *Biomphalaria alexandrina*) collectées au niveau d'un lac impacté par divers contaminants.

**Gust et al. (2011)** ont rapporté que les lésions histologiques dans la glande digestive de l'escargot *Potamopyrgus antipodarum* exposé aux ETM se manifestent par une hypertrophie des cellules à calcium et une vacuolisation et une dilatation des cellules digestives. Il en est de même concernant la glande digestive de *Pomacea canaliculata* après exposition au sédiments contaminés par les ETM (Fe, Zn, Pb, Cr, Cu, Ni, et Cd) (**Kruatrachue et al., 2011**), et également chez les escargots géants *Archachatina marginata* traités par des particules de Cu et Pb (**Otitoloju et al., 2009**).

La sévérité et la fréquence des lésions observées dépendent de l'espèce considérée, varient selon l'organe et sont plus prononcées aux concentrations les plus élevées (Schwaiger et al., 1997; Adams et al., 1990). Cependant, les altérations histopathologiques observées au niveau de l'hépatopancréas intègrent les effets de nombreux facteurs de stress directement ou indirectement liés à la contamination et leur étude permet de détecter des effets secondaires du stress polluant tels que le parasitisme. Schwaiger (2001) suggère qu'en affectant le système immunitaire, les contaminants affaiblissent les organismes suggère qu'en affectant le système immunitaire, les contaminants affaiblissent les organismes exposés, qui deviennent plus sensibles aux infections par l'accumulation des métaux par les organismes.



***Conclusion et  
Perspectives***

### **5. Conclusion et perspectives :**

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'impact de deux nanoparticules d'oxydes métalliques (l'oxyde d'Aluminium, l'oxyde de titane et de leurs mixtures) sur les juvéniles d'un organisme bioaccumulateur et bioindicateur de pollution de l'environnement *Helix aspersa*. Les individus sont collectés d'un site peut polluer Boumaiza. Il s'agit d'une étude de toxicité subchronique (4 semaines) effectué par ingestion. Les animaux sont exposés à trois concentrations (250, 500 µg/g et 750 µg/g), les effets ont été testés sur les paramètres morphologiques (poids des escargots, le diamètre D et la longueur L de la coquille) ainsi que les paramètres biochimiques (contenu en glucides lipides et protéines) de plus une étude histopathologique de l'hépatopancréas est réalisée pour vérifier l'impact tissulaire.

Nos résultats montrent que l'exposition subchronique à une pollution par les nanoparticules dans des conditions contrôlées provoque des altérations sur le gain du poids frais moyen des escargots du diamètre et de la longueur de la coquille.

Nous avons mis en évidence que la composition biochimique de l'hépatopancréas est aussi affectée par les deux xénobiotiques testés et leurs mixture avec une augmentation significative des protéines et une diminution des taux des glucides et des lipides, cette diminution est plus marquée chez les escargots traités au titane.

Ces perturbations peuvent être dues aux perturbations dans le métabolisme biochimique ou un déséquilibre dans les réserves énergétiques.

L'observation microscopique des coupes histologiques ne fait que confirme les altérations tissulaires suite à cette toxicité à travers des atteintes bien visibles dès les plus faibles doses testées chez les traités par les deux nanoparticules et leurs mixtures.

En fin, l'escargot petit gris *Helix aspersa* répond bien aux critères de bioindicateurs et peut participer à la biosurveillance de l'environnement par les nanoparticules.

#### **En perspective, il serait intéressant de :**

- De faire une étude embryotoxicologique
- Rechercher l'impact des nanoparticules sur la capacité de reproduction de l'animal, et d'assurer le suivi des juvéniles après l'élevage d'individus préalablement traités par les ETM.
- De testé l'effet d'un cocktail de xénobiotiques sur la croissance et la reproduction de l'espèce.

### Références bibliographiques :

#### A)

- **Adams S.M., Shugart L., Southworth G.R., Hinton D.E., 1990.** Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: Biomarkers of environmental contamination (eds. McCarthy J. F., Shugart L. R.). Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton. 333-353.
- **Angélique S., 2008.** Effets biologiques des nanoparticules manufacturées : influence de leur caractéristique. Thèse de Doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), France, 194 p

#### B)

- **Bailey S.E.R., 1981.** Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *Journal of Comparative Physiology*, 142: 89-94
- **Barker G., 2001.** The Biology of Terrestrial Molluscs. CAB International. Oxon. Wallingford. UK. 567 p
- **Beeby A. 1985.** The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfer of lead through a polluted ecosystem. *Journal of Applied Ecology*. 22: 267-275 p.
- **Berger B., Dallinger R. 1993.** Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental monitoring assessment. 25: 65-84 p.
- **Besnaci, S. 2016.** Evaluation de la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer « Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> » sur un bioindicateur de pollution terrestre : *Helix aspersa*. Mémoire de doctorat, Université Bdji Mokhtar. Annaba. P 24-56.
- **Bibic A., Drobne D., Strus J., Byrne A., 1997.** Assimilation of zinc by *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) exposed to Zinc, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 814–821 p
- **Bluzat R., Seugé J., 1979.** Etude de la toxicité chronique de deux insecticides (Carbaryl et Lindane) à la génération F1 de *Lymnaea stagnalis* L. (Mollusque).
- **Bonnet J.C., Aupinel P. et Vrillon J.L., 1990.** L'escargot *Helix aspersa* : biologie-élevage. Institut National de la Recherche Agronomique, Éditions Quae, Paris, 124p
- **Bonnet J.C., Aupinel P., Vrillon J.L., 1990.** L'escargot *Helix aspersa*, biologie, élevage. Du labo au terrain, INRA, 1-5.

## ***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

- **Boucenna M., 2015.** Etude de la toxicité des particules métalliques d'origine industrielle.
- **Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:278-254.

### **C)**

- **Caswell H., 2001.** *Matrix Population Models: construction, analysis, and interpretation*, second edition, Sinauer Associates (Eds.), Sunderland, Massachusetts, USA. 722 .
- **Carpy S.A., Kobel W., Doe J., 2000.** Health risk of low-dose pesticides mixtures: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. 3(1): 1-25.
- **Chevallier H., 1977.** La variabilité de l'Escargot Petit-Gris *Helix aspersa* Miiller. France. 442p.
- **Chevalier H., 1992.** L'élevage des escargots. 2ème édition. Editions du point vétérinaire. Paris
- **Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M., 2001.** The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20:1951-1957 p.
- **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 organiques. Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté, Besançon, France, 297 pages.

### **D)**

- **Dagnelie, P., 1999.** *Statistiques théoriques et appliquées. Tome 2 : références statistiques à une et à deux dimensions.* Bruxelles. Univ De BOECK et LARCIER, 659 pages.
- **Dallinger R., Berger B., Triebkom R., Kohler H., 2001.** *Soil biology and ecotoxicology. The biology to terrestrial mollusc.* CAB International. Oxon. Wallingford, UK. 489-525 p.38.

## ***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

- **Dekle, G. W., & Fasulo, T.R. 2008.** Brown Garden Snail, *Cornu aspersum* (Müller, 1774) (Gastropoda: Helicidae). EENY 240, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. Institute of Entomology and Nematology Department, University of Florida. P: 4
- **Druart, c, 2011.** Effets des pesticides de la vigne sur le cycle biologique de l'escargot dans divers contextes d'exposition. Thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de l'Environnement, Université de FRANCHE-COMTE.
- **Duchateau, G., and Florkin ., 1959.** For treahalosemie of insects and its signification. Arch. Insect. Physiol. Biochem 67: 306-314.

### **E)**

- **Eissa S., Rizk E., Abou-Shafey A., Mona M., Atlum A., 2002.** Toxicological effect on *Euphorbia peplus* water suspension on hemocytes of the fresh water snails, *Biomphalaria alexandrina* and *Lanistes carinatus*. 2: 417-447 p.
- **El-Khayat H., Abdel-Hamid H., Gaber H., Kadria M., Flefel H., 2015.** Snails and Fish As Pollution Biomarkers in Lake Manzala and Laboratory A: Lake Manzala Snails. Fish Aquac. 2150-3508 p.
- **El-Wakil H., Radwan M., 1991.** Biochemical studies on the terrestrial snail *Eobania vermiculata* (Müller) and *Thebapisana* (Müller) treated with some pesticides. Journal of Environmental Science Health. 34: 47-60

### **F)**

- **Forbes V., Forbes T., Rivière J., 1997.** Écotoxicologie: théorie et applications. Editions Quae, Paris. 424 p.

### **G)**

- **GHELLAB MAROUA 2021.** Nanotoxicité et réponse hépatique au nanoparticule d'oxyde d'aluminium (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), mémoire de master. Université de Larbi Tébessi \_Tébessa p 15.

## ***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

- **Gimbert F., Mench M., Coeurdassier C., Badot P., M. de Vaufleury A., 2008.** Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field. *Environmental Pollution*. 152: 736-745 p.
- **Goldsworthy, G.J., Mordue, W., and Guthkelch, J., 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol* 18 (3): 545.
- **Gomot A., 1997.** Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme. *Bull. Acad. Natle.Méd.* 181: 59-75 p.
- **Gomot A., 1997.** Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*. 33: 209- 216 p
- **Gomot-de-Vaufleury A., Gomot L., Boukraa, S. et Bruckert S. 1989.** Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of the route for the stimulating factors. *Journal of Molluscan Studies* 5, 1-7.
- **Gomot A., Gomot L., Boukraa S., Bruckert S., 1989.** Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa* - an experimental study of the absorption route for the stimulating factors. *Journal of Molluscan Studies*. 55: 1-7.
- **Gomot-de Vaufleury A., 2001.** Regulation of growth and reproduction. in *The Biology of terrestrial molluscs*, Chap. 9. Barker G.M., C.A.B. International. Wallingford, Royaume-Uni, pp. 331-355.
- **Grara N., Bouloudenine M Khaldi F. Zenir Z., Abdermadjid S., (2015).** Caractérisation Morphophysiolgique de la Toxicité du ZnO (Nanoparticule manufacturée) sur l'escargot 1 *Helix aspersa* bio indicateur de pollution de l'environnement. *J. Mater Environ. Sci.* Vol 6 (9), pp: 2596-2603

### **I)**

- **Irlande M., 1991.** The effect of dietary calcium on growth, shellthickness and tissue calcium distribution in the snail *Achatinafulica*. *Comparative biochemistry and Physiology*. 98 A: 111-116 p.

## ***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

### **J)**

- **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 21st Century: Problems, Causes and Solutions. Brighton, Angleterre.

### **K)**

- **Kerney M-P.; Cameron R.A.D., (2006).** Guide des escargots et limaces d'Europe. Edition Delachaux et Niestlé, France. P 370.
- **Kruatrachue, M., Sumritdee, C., Pokethitiyook, P., Singhakaew., S. 2011.** Histopathological effects of contaminated sediments on golden apple snail (*Pomacea canaliculata*, Lamarck 1822). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 86(6): 610–614 p.

### **L)**

- **Lagadic L., Caquet T., Amiard J., 1997.** Biomarqueurs en ecotoxicologie : principes et définitions, in Masson, ed., Biomarqueurs en ecotoxicologie Aspects fondamentaux: Paris 1-10 p
- **Little E.E, Archeski R.D., Flerov B.A. & Koslovskay V.I. 1990.** Behavioural indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. Environ. Contam. Toxicol. 19: 380- 385

### **M)**

- **Marigomez I., Soto M., Kortabitarte M., 1996.** Tissue-level biomarkers and biological effect of mercury on sentinel slugs, *Arion ater*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 54–62 p
- **Moussard C., 1999.** La biochimie, Biochimie structurale et métabolique, Médecine, Pharmacie, Sciences. De Boek & Larciens. a. Bruxelles. 294 p.
- **Müller O., 1774.** Vermium terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succinct historia. Volumen alterum. - pp. I-XXXVI [1-36], 1-214, [1-10]. Havniæ & Lipsiæ. Heineket Faber. 59 p.

## ***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

### **N)**

- **Notten M., Oosthoek A., Rozema J., Aerts R. 2006.** Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the landsnail *Cepaeanemorialis* fed on naturally polluted *Urticadioicaleaves*. *Ecotoxicology*.15: 295-304 p.

### **O)**

- **Otitoloju A., Ajikobi D., Egonmwan R., 2009.** Histopathology and bioaccumulation of heavy metals (Cu &Pb) in the giant land snail, *Archachatinamarginata*(Swainson). *TheOpen Environmental Pollution and Toxicology*, 1: 79–88 p.

### **P)**

- **Padmaja M., Rao., 1994.** Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose ,glycogen lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail , *Bellamyadissimillis* (Muller ), *bull.environ.contam.toxicol*.53: 142-148 p.16.
- **Pirame S.S.L. 2003.** Contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit gris (*Helix aspersa*) : reproduction expérimentale. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse, 99p.

### **R)**

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

### **S)**

- **Schwaiger J., Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Tribskorn R., 1997.** The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6: 75-86.
- **Schwaiger J., 2001.** Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 8: 231-240.

## ***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

- **Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyeck, C., Newhall, A., and Freidman, L., 1966.** A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt. Biochem*, 19, 415-428.

### **T)**

- **Thoman R., 1989.** Bioaccumulation model of organic-chemical distribution in aquatic food chains. *Environmental Science and Technologie*. 23: 699-707 p.

### **V)**

- **Viard B., Maul A., Pihan J., 2004.** Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination. *Journal of Environmental Monitoring*. 6: 103-107 p.

### **Z)**

- **Zaldibar B., Cancio I., Soto M., Marigomez I., 2007.** Digestive cell turnover in digestive gland epithelium of slugs experimentally exposed to a mixture of cadmium and kerosene. *Chemosphere*,70: 144-154 p.

### **Les sites web:**

- <https://hunzaroma.com/boutique/ingredients-de-base/oxyde-de-Aluminium/>
- <https://hunzaroma.com/boutique/ingredients-de-base/oxyde-de-titane/>
- [www.élevage-escargots.com](http://www.élevage-escargots.com)
- [www.heliciculture-vendee.netai.net](http://www.heliciculture-vendee.netai.net)
- [www.helixa.blogspot.com](http://www.helixa.blogspot.com)
- [www.nature-scientia.com](http://www.nature-scientia.com)