

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة 20 أوت 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

**Option: Ecotoxicologie
Animale**

Intitulé :

**Effet de deux oxydes métalliques sur les paramètres physiologiques des escargots
« Hélix aspersa »**

Présenter par :

-  **Bouznad Cheima (36013690)**
-  **Oughidni Rayane**
-  **Ghedjadjet Manel**
-  **Gharbi Lamia**

Membre de jury :

M^{me} Gabli Z.	Présidente	MCA	Université 20 Août Skikda
M^{me} Nadji S.	Directrice	MCB	Université 20 Août Skikda
M^{me} Mellahi L.	Examinatrice	MAA	Université 20 Août Skikda

Année universitaire 2021/2022

Remerciement

Nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens à fin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au sein à l'animalerie du département de biologie et laboratoire d'agronomie de l'université 20 aout Skikda. Les coupes histologiques ont été réalisées au service d'anapath skikda.

Nous tenons à exprimer nos sentiments les plus vifs et les plus sincères pour remercier :

D'abord notre encadreur Madame "Nadji Safia". Pour sa gentillesse, sa disponibilité, son soutien, ces conseils et de toute la patience dont elle a su faire preuve au cours de la rédaction de ce mémoire.

On tient à exprimer nos sincères remerciements l'ensemble des membres de jury :

A "Madame Gabli" président MAC pour sa disponibilité, ses conseils précieux et pour l'honneur qu'il nous fait d'évaluer ce de soutenance, à "Madame Mellahi" Examinatrice MAA d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

On tient également à remercier le chef service du laboratoire d'anapath EPH Skikda: Madame "Djamae Amina" et Madame "Kifouch Sonia" Pour leur aide précieuse à la réalisation des coupes histologiques et "Mademoiselle Nouhed" travaille au service DRH pour son aide précieuse.

Nous profitons de l'occasion pour remercier nos familles respectives et tous nos camarades de promotion de Toxicologie, et tous ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.



Dédicace

Je dédie ce Modest travail

A mes chers parents la lumière de ma vie qui m'ont toujours encouragé
pour que je réussisse dans mes études

A mes sœurs AHLEM et son mari MOHMED, IBTISSAM et son mari YAZID
et sur tout ma grand sœur HOUDA pour leur soutien, encourage et son
mari HALIME qui tellement m'a aidée, mon frère AMAR

Et tous mes amis LINDA, HASSNA, CHEIMA et sur tous MARWA pour
leur soutien, encourager et aider



Oughidni Rayane .



Dédicace

Je dédie mon fruit de travail aux deux êtres plus chers dans ma vie, pour ce qu'ils ont fait pour que je pense réussir.

A mon très cher père " **Messaoud** " et ma chère mère " **Hanifa** " qui m'a toujours encouragé pendant toute ma vie et pour m'avoir comblé d'amour et affectation et avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui que dieu mes les grandes. A ma copine dieux repose son âme " **AMEL** "

A mes frères et mes sœurs

A mes beaux-frères et ma belle sœur

A tous leurs enfants

A mes chères amies : Ikram, les deux Aya, Rihem, Sahar.

Et finalement à tante : Nadia

Bouznad Cheima





Dédicace

Je remercie en premier lieu 'ALLAH' le Miséricordieux de ma avoir donné la force, Volonté, et la patience durant toutes mes années d'étude.

Je décide ce travail à :

♥ *À ma chère mère " Salima " pour sa tendresse, son amour, son affection, sa patience, tous les sacrifices et ses valeureux conseils durant mes années d'études. ♥*

♥ *J'offre tout l'amour et gratitude à mon cher père " Massouad ", j'aurais bien aimé que tu sois à mes côtés en ce moment privilégie dans ma vie car ton absence m'est tellement pénible. A ton âme qui repose au paradis papa. ♥*

♥ *À mon cher frère " Abd Raouf " qui m'a aidé dans mes études, je souhaitais voir le regard de fierté dans tes yeux, Ton mémoire est toujours dans mon cœur. ♥*

♥ *À mon fiancé " Marouane " tout amour et respect. ♥*

♥ *Mes chères collègues : Lamia, Chaima et Rayane ♥*

♥ *À tous ceux qui me sont chers. ♥*

Manel ♥





Dédicace

*Avec l'aide de dieu tout puissant tous les mots ne peuvent pas la
gratitude*

*Amour, respect et appréciation envers les personnes les plus
importantes pour moi*

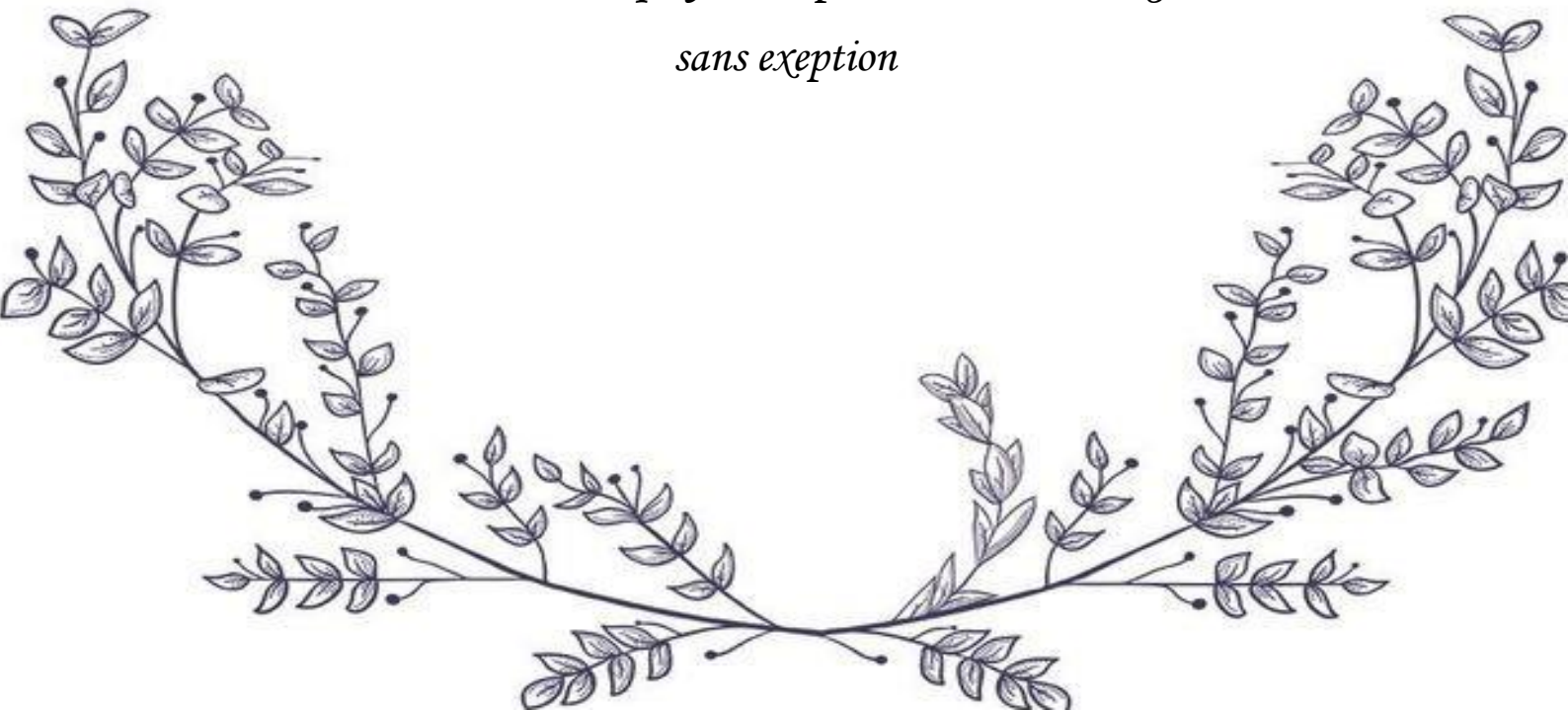
*Je dédie cet humble travail à mes très chers parents, à mon cher père
Djamel pour tous le faire ce qu'il a fait pour moi par son matériel et
moral et patience l'encourageant*

*A ma chère mère Farida qui m'a donné la vie le courage et l'amour pour
eux soutient moral et matériel pour cette tendresse et cet encouragement
que vous m'avez donné*

Pendant moi, voyage que dieu protège et protège mes parents

*A mes sœurs Ibtissem et radia et à tous mes amis manel, cheima et
rayane*

*Pour tous ceux qui font la promo de la toxicologie
sans exception*



Sommaire :

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
I.Introduction.....	01
II.Matériel et Méthodes	
1. Matériel biologique	04
1.1. Présentation et classification de l'espèce.....	04
1.2. Anatomie générale de l'escargot.....	05
1.2.1. Morphologie de l'escargot.....	05
1.2.2. Anatomie interne de l'escargot.....	08
1.3. Distribution géographique des escargots	13
1.4. Cycle de vie d'<i>Helix aspersa</i>.....	13
1.5. Croissance des escargots.....	14
1.6. Site de prélèvement de l'espèce.....	16
1.7. Technique d'échantillonnage et élevage.....	17
2. Matériel chimique	17
2.1. Présentation des oxydes métalliques.....	17
2.1.1. Oxyde de Titane.....	17
2.1.2. Oxyde de fer	18
2.2. Protocole de contamination des escargots.....	20
2.2.1. Les conditions d'élevage.....	20
2.2.2. Mode de traitement.....	20
2.3. Dissection et prélèvement des organes.....	20
2.4. Paramètres étudiés.....	22
2.4.1. Effets comportementaux.....	22

2.4.2. Paramètres physiologique.....	22
2.5. Analyses histologiques.....	22
2.5.1. Fixation des organes.....	23
2.5.2. Déshydrations.....	23
2.5.3. L'inclusion.....	24
2.5.4. Les coupes.....	25
2.5.5. Étalement et collage des coupes.....	25
2.5.6. Déparaffinage	25
2.5.7. Réhydratation	25
2.5.8. Les colorations.....	26
2.5.9. Le montage.....	26
2.5.10. Observation microscopique.....	28
2.6. Analyse statistique.....	28
III. Résultats	
1. Effet des oxydes métalliques (TiO ₂ et Fe ₂ O ₃) sur le poids moyen des escargots <i>Hélix aspersa</i>	29
1.1. Effet de dioxyde de titane sur le poids moyen des escargots <i>Hélix aspersa</i>	29
1.2. Effet d'oxyde de fer sur le poids moyen des escargots <i>Hélix aspersa</i>	30
2. Effets de deux oxydes métalliques (TiO ₂ et Fe ₂ O ₃) sur le pourcentage de mortalité....	31
3. Effets de deux oxydes métalliques (TiO ₂ et Fe ₂ O ₃) sur l'histologie de l'hépatopancréas.....	31
3.1. Effet de dioxyde de titane sur l'histologie de l'hépatopancréas des escargots	32
3.2. Effet d'oxyde de fer sur l'histologie de l'hépatopancréas des escargots.....	32
IV. Discussion	
1. Effets d'oxyde de fer et de titane sur les paramètres physiologiques de l'escargot.....	36
1.1. Effets d'oxyde de fer et de titane sur le poids relatif des escargots.....	36
1.2. Effets d'oxyde de fer et de titane sur le pourcentage de mortalité.....	38
1.3. Effets d'oxyde de fer et de titane sur l'histologie de l'hépatopancréas.....	38
Conclusion et Perspectives.....	40

Résumés

Résumé	41
Abstact.....	42
ملخص	43
Références bibliographiques.....	44

LISTE DES TABLEAUX

Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
1	Description des 4 phases de croissance d' <i>Hélix aspersa</i> (Gomot et Enee 1980).	15
2	Propriétés physico-chimiques de TiO ₂	18
3	Propriétés physico-chimiques de Fe ₂ O ₃	19
4	Pourcentage de mortalité pour chaque lot (TiO ₂)	31
5	Pourcentage de mortalité pour chaque lot (Fe ₂ O ₃)	31

LISTES DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	L'escargot <i>Hélix aspersa</i> (photo personnel)	04
2	Morphologie de l'escargot (http://www.ikonet.com/fr/ledictionnairevisuel)	05
3	Deux paire de tentacules d'escargot (Dcshmidt.,2008)	06
4	Ondes de contraction sur la face ventrale des pieds d'escargots (photo personnel).	06
5	La coquille d'escargot petit gris (photo personnel).	08
6	Système nerveux d'un escargot (Guyard, 2009).	10
7	Schéma de l'appareil génital de l'escargot (Guyard, 2009).	11
8	Anatomie interne de l'escargot (http://www.ikonet.com/fr/ledictionnairevisuel)	12
9	Escargot en hibernation avec son épiphragme (Zaafour, 2014)	14
10	Croissance et survie de l'escargot (www. heliciculture-vendee.netai.net).	16
11	Localisation du site de prélèvement des escargots <i>Hélix aspersa</i> (Wilaya de Skikda) Nord-est de l'Algérie.	16
12	Echantillonnage et élevage d' <i>Hélix aspersa</i> (photos personnel).	17
13	Oxyde de Titane	18
14	Oxyde de Fer	19
15	Dissection de l'escargot et prélèvement de l'hépatopancréas (photo personnel).	21
16	Echantillonnage-hépatopancréas (photo personnel)	21
17	Un hépatopancréas d'un escargot mise dans un histo-cassette (photo personnel).	23
18	Automate pour la déshydratation et l'inclusion à la paraffine (photo personnel).	24
19	Appareils de réalisation des blocs de paraffine contenant les tissus (photo personnel).	24
20	Plaque de refroidissement (photo personnel).	25
21	Etalement des coupes dans un bain-marie chauffé sur plaque chauffante (photo	26

	personnel).	
22	Coloration des lames (photo personnel).	27
23	Coupes colorées et montées pour être observer au microscope optique (photo personnel).	27
24	Effet de TiO ₂ sur l'évaluation du poids moyen des escargots <i>Hélix aspersa</i> en fonction du temps	29
25	Effet de Fe ₂ O ₃ sur l'évaluation du poids moyen des escargots <i>Hélix aspersa</i> en fonction du temps.	30
26	Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots témoins (G×40) (Photo personnel).	33
27	Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par TiO ₂ dose 01 (G×40) (Photo personnel).	33
28	Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par TiO ₂ dose 02 (G×40) (Photo personnel).	33
29	Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par TiO ₂ dose 03 (G×40) (Photo personnel).	34
30	Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par TiO ₂ dose 04 (G×40) (Photo personnel).	34
31	Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par Fe ₂ O ₃ dose 01 (G×4) (Photo personnel).	34
32	Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par Fe ₂ O ₃ dose 02 (G×40) (Photo personnel).	34
33	Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par Fe ₂ O ₃ dose 03(G×40) (Photo personnel).	35
34	Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par Fe ₂ O ₃ dose 04 (G×40) (Photo personnel).	35

LISTE DES ABREVIATION

Liste d'abréviation :

TiO₂ : dioxyde de titane.

Fe₂O₃ : oxydes de fer.

AI : Aspect inflammatoire.

CE : Cellules excrétoires.

CD : Cellules digestives.

CC : Cellules à calcium.

MB : Membrane basale.

D : Dose.

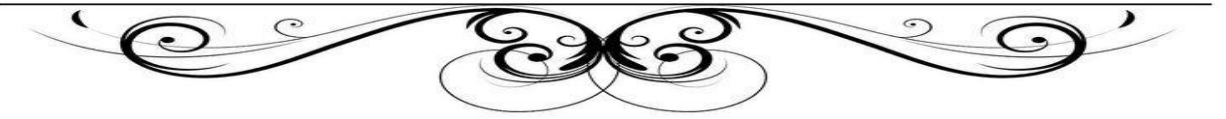
P1 : polluant (oxyde de titane).

P2 : polluant (oxyde de fer).

S : Semaine.



INTRODUCTION



I. 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.

Les problèmes posés par la dispersion de polluants dans l'environnement ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis maintenant de nombreuses décennies. La prise de conscience de la nécessité de préserver les écosystèmes terrestres et aquatiques a ainsi fait émerger certaines questions, notamment celles du devenir de ces polluants dans l'environnement ainsi que de leurs effets sur les communautés animales et végétales.

Il existe de nombreuses substances toxiques susceptibles de perturber les systèmes biologiques, de plus simples ions inorganiques jusqu'aux molécules organiques complexes. Neuf millions de molécules de synthèse étaient déjà listées dans «The Chemical Abstract Service registry of chemicals » en 1990 (**Cairns et Mount, 1990**) Parmi ces substances, plus de 10 000 sont produites mondialement dans des quantités supérieures à 10 tonnes par an (Moriarty, 1999). On peut ajouter à cette liste les molécules issues de la dégradation chimique, physique et/ou biologique des composées de synthèse ainsi que certaines substances naturelles utilisées en quantité importante dans les activités humaines (procédés industriels, installations et équipements technologiques...).

Parmi ces substances on distingue les oxydes métalliques sont considérés comme de nouveaux composés chimiques dont les caractéristiques et les toxicités sont différentes (**Tsakalagos, 2003**).

Les données toxicologiques actuelles sur les oxydes métalliques sont encore insuffisantes. Cependant, plusieurs études montrent que les oxydes métalliques peuvent pénétrer dans le corps à travers plusieurs voies, pulmonaire, cutanée ou intestinale (**Tinkle et al., 2003; Hagens et al., 2007; Mavon et al., 2007; Buzea et al., 2007**); elles ont des effets toxiques systémiques (**Kreuter et al., 2001; Berry et al., 2003; 2004; Chen et al., 2006; Wang et al., 2006**) ; leurs utilisations exigent des études d'impact sur la santé des humains et des animaux.

Parmi les oxydes métalliques, notre étude a porté sur l'oxyde de fer et le titane. La petite taille des particules lui confère des propriétés avantageuses, en particulier magnétique (**Wang et al. 2011**) les rendant utiles dans de nombreuses applications. Ainsi, dans l'ordre du

INTRODUCTION

nanomètre, certaines structures d'oxyde de fer tel que la magnétite (Fe_2O_4) ou de maghémite (Fe_2O_3) et (TiO_2) présentent des propriétés super paramagnétiques. Il a exposé un grand potentiel pour leurs applications comme matériaux catalytiques, absorbantes dans le traitement des eaux usées, des pigments, des flocculants, des revêtements, capteurs de gaz, agent de blanchiment, échangeurs d'ions, des dispositifs d'enregistrement magnétiques, dispositifs de stockage de données magnétiques, des toners et des encres pour la xérogaphie, l'imagerie par résonance magnétique, bioséparation et médecine (**Jolivet et al., 2002; 2003; Riviere et al., 2005; Mohapatra et Anand, 2010**). Bien que le fer soit un élément essentiel pour la vie, une augmentation de la concentration en milieu cellulaire peut générer la formation des ROS (**Alberts et al. 1983**).

La toxicité des oxydes métallique résulte généralement d'une action nocive à long terme par accumulation progressive due à des expositions répétée, jusqu'à une dose pathogène ; hors les contacte cutanées allergique, les effets aigue et immédiats sont rares et sont liées à l'exposition à de fort concentration (**Officiel prévention, 2005**).

L'évaluation toxicologique des oxydes métalliques se heurte à un problème bien spécifique, leur localisation dans les cellules et les organes.

Les chercheurs ont également analysé la cytotoxicité, l'impact immunologique et l'effet stress oxydatif des oxydes métalliques sur les macrophages, les cellules épithéliales de type II (AT II) et les cellules épithéliales du poumon (**Cordis, 2012**).

Pour déterminer les effets des oxydes métalliques étudiés, il est nécessaire de disposer de modèle biologique représentatif du milieu étudié. Au sens écologique général, un bio-indicateur peut être défini comme un organisme ou un groupe d'organismes pertinents pour déterminer qualitativement et quantitativement l'état de l'environnement (**Fränzle, 2006**). Les critères qualifiant une espèce de bio-indicateur sont parmi les suivants:

- 1) elle doit être suffisamment répandue et abondante sur le territoire concerné, si possible facilement détectable,
- 2) elle doit être le plus sédentaire possible pour refléter les conditions locales,
- 3) elle doit avoir une taille rendant possible l'étude de ses différents tissus et de leurs composantes (muscles, os, organes dans le cas d'un animal...).

INTRODUCTION

Les organismes bio-indicateurs d'effets doivent être sensibles à de faibles perturbations de l'environnement tandis que les organismes indicateurs de bioaccumulation doivent tolérer les contaminants à de fortes concentrations et présenter des propriétés bio-accumulatrices.

De nombreuses études ont démontré que les mollusques gastéropodes comme les escargots terrestres sont des bio-indicateurs de pollution notamment des métaux (**Barker, 2001; Dallinger *et al.*, 2001; Beeby et Richmond, 2002; de Vaufleury *et al.*, 2006; de Vaufleury *et al.*, 2006; Regoli *et al.*, 2006; Grara *et al.*, 2012**).

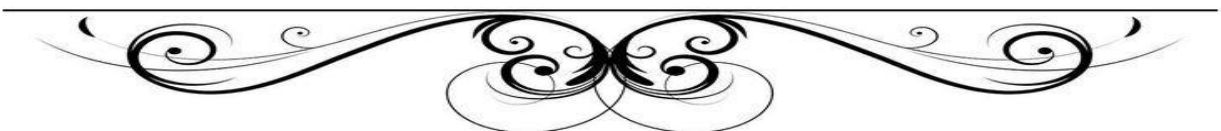
L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les effets induit par deux oxydes métalliques l'oxyde de titane TiO_2 et l'oxyde de fer Fe_2O_3 sur un organisme bio accumulateur, le gastéropode terrestre *Hélix aspersa*.

Les effets ont été testés sur:

- ✓ Les paramètres physiologiques (comportement, pourcentage de mortalité, le poids frais des escargots).
- ✓ L'histologie de l'hépatopancréas des juvéniles d' *Hélix aspersa*.



*MATERIEL ET
METHODES*



II. Matériel et Méthodes :

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

1. *Matériel biologique* :

1.1. *Présentation et classification de l'espèce* :

L'escargot *Hélix aspersa* (Müller ,1774) (figure 01) est un Mollusque gastéropode, pulmoné terrestre, aussi nommé *Cantareus aspersus*, *Cornu aspersum*, *Criptomphalus aspersus* dans la nomenclature récente (Barker, 2001) ou le petit gris.

Selon Bonnet et Vrillon (1990) sa position systématique est la suivante:

Règne: Animalia

Embranchement: Mollusca

Classe: Gastéropoda

Sous -classe: Pulmonés

Ordre: Stylomatophora

Sous-ordre: Helicina

Infra-ordre: Helicoidei

Super-famille : Helicacea

Famille: Helicidae

Genre: *Hélix*

Espèce: *aspersa* (Müller, 1774)



Figure 01 : L'escargot *Hélix aspersa* (photo personnel)

1.2. Anatomie générale des escargots :

1.2.1. Morphologie des escargots :

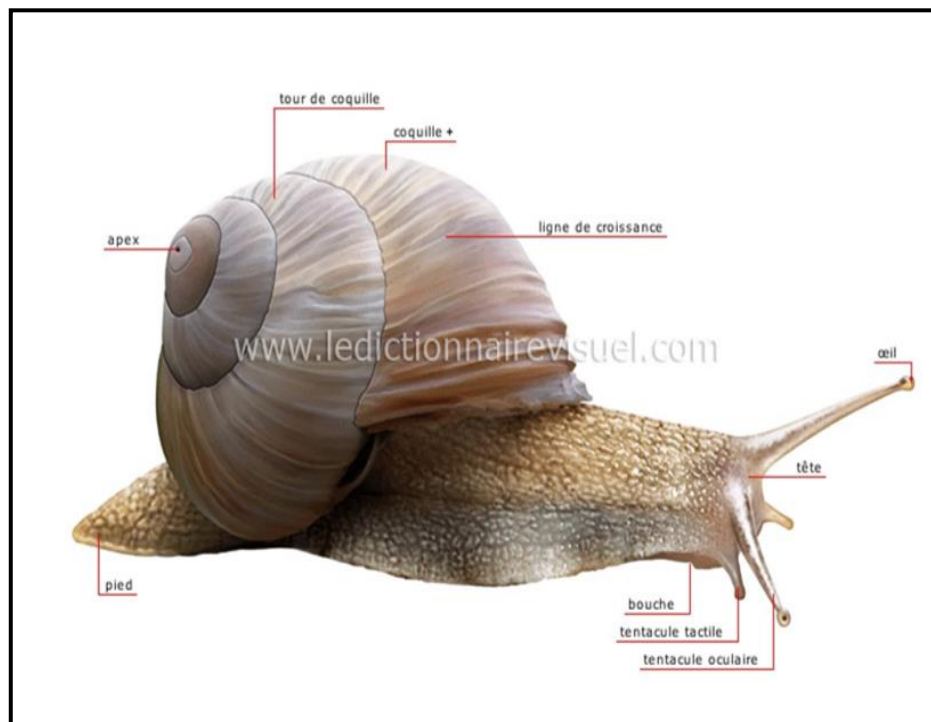


Figure 02: Morphologie de l'escargot (<http://www.ikonet.com/fr/ledictionnairevisuel>)

▪ Le corps :

Le corps d'un escargot est constitué d'un pied unique, d'une tête et d'une masse viscérale enroulée qui est placée à l'intérieur de la coquille.

▪ La tête :

De deux paires de tentacules rétractiles, appelées « cornes » ou « antennes » dans le langage familier. (Figure 03)

➤ dans la partie supérieure de la tête la première paire de « cornes » abrite les yeux mais la vue est un sens peu utilisé. Ils possèdent surtout un bulbe olfactif sous l'œil.

➤ dans la deuxième paire de tentacules il y a un organe olfactif et tactile (épithélium) qui est en revanche très utilisé par l'escargot. Son corps comporte un orifice génital impair situé en arrière des tentacules, sur le côté droit de la tête, cet orifice assure une double fonction sexuelle mâle et femelle.

Alors qu'en position antéro-ventrale, on observe la bouche médiane, entourée de quatre lèvres et pourvue d'une mâchoire supérieure cornée (Michel ., 1979).



Figure 03: Deux paire de tentacules d'escargot (Dcshmidt.,2008)

- **Le pied :**

Est un organe qui soutient le corps et permet à l'escargot de progresser par reptation. Sa partie inférieure contient des glandes qui secrètent le mucus de façon continue, créant ainsi une trace évidente brillante derrière lui (Beeby et Richmond., 2011). (Figure 04)

Différents types de mucus sont, cependant, sécrétés par ses glandes muqueuses. Il faut noter que ce produit synthétisé contient plusieurs composés qui lui permettent d'avancer facilement soit par glissement sur les obstacles ou bien par fixation même verticalement sur des parois mais en plus il est utilisé par la pharmacologie, la cosmétique et pour certains compléments alimentaires et pour soigner les maladies de la prostate (Toja., 2011).



Figure 04 : Ondes de contraction sur la face ventrale des pieds d'escargots (photo personnel).

▪ **Manteau :**

Le manteau est une structure caractéristique bien visible, couvrant environ le tiers de la région antérieure dorsale du corps et qui renferme la coquille vestigiale lorsqu'elle existe. Dans la partie droite du manteau s'ouvre, via le pneumostome, la cavité pulmonaire, qui assure les échanges gazeux et l'excrétion. Le bord antérieur du manteau forme un rabat dans lequel la tête de l'animal peut se rétracter pour se protéger (**Bursztyka, 2015**).

Chez certains gastéropodes, le manteau se prolonge antérieurement en une expansion musculuse qui revêt le cou de l'animal.

Chez les limaces le manteau a la forme d'un bouclier charnu dorsal, et renferme un osselet ovale, aplati, qui sert d'attache aux muscles (**Draparnaud, 1805**).

▪ **La masse viscérale :**

Est enveloppée par le manteau et totalement enfermée dans la coquille, elle contient les organes de respiration, de circulation, de digestion et de reproduction (Beaumont et cassier. 1970).

▪ **Quatre orifices impairs:**

Se sont bien visibles sur le corps de l'animal qui est :

- 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**).

▪ **La coquille :**

Elle est de forme globuleuse et spiralée (**Agro-service, 2004 ; Larba, 2014**). C'est un tube conique calcaire enroulé en spirale autour d'un axe. Les tours les plus anciens forment le sommet du cône appelé l'apex. Les tours s'unissent les uns aux autres en formant un sillon appelé suture (**Barker, 2001 ; Daguzan, 1983**). Le dernier tour aboutit à l'ouverture de la coquille limitée par le péristome (**Larba, 2014 ; Stiévenart & Hardouin**), elle représente le tiers du poids frais de l'escargot, elle est constituée d'une partie organique et une partie minérale. La partie organique est une trame protéique externe (la conchyoline). La partie

minérale représente 98 % de la coquille ; il s'agit de carbonate de calcium sous forme de calcite et d'aragonite qui imprègne la trame de conchyoline (**Chevalier, 1992**).

Si l'on retire la coquille, la partie du corps ainsi découverte présente deux zones distinctes :

- La zone antérieure, recouverte par le manteau, constituant la cavité palléale, dont le plafond richement vascularisé correspond au poumon (**Chevalier, 1992 ; Barker, 2001**).
- La zone postérieure enroulée en spirales comprend le rein, l'hépatopancréas, et la glande à albumine (ou glande à albumen) (**Chevalier, 1992 ; Barker, 2001**).
- Sur le côté gauche, de ces deux zones, se trouve le cœur. Le long de la face interne du tortillon viscéral, se trouve le muscle columellaire, puissant, nacré, qui relie le corps de l'escargot à sa sert à l'y rétracter (**Agro-service, 2004 ; Daguzan, 1983**). Le rôle principale de la coquille est d'assurer la protège du corps en cas de danger.



Figure 05 : La coquille d'escargot petit gris (photo personnel).

1.2.2. Anatomie interne des escargots :

L'anatomie interne montre une dissymétrie qui résulte de modifications subies par la masse viscérale au cours du développement: flexion du tube digestif qui prend une forme de "U", puis torsion de la masse viscérale par rapport à la région céphalique. Ce phénomène de

torsion, qui intéresse aussi le système nerveux, se produit pendant le stade larvaire (**His et Cantin, 1992**).

- **Appareil digestif :**

Le tube digestif forme « V » 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 (**Chevalier, 1992 ; Larba, 2014**), garnie de milliers de dents microscopiques disposées en rangées parallèles, soit 87 dents par rangée pour environ 150 rangées (**Chevalier, 1992 ; Barker, 2001**), son rôle est de broyer les aliments. Dans la partie postérieure du bulbe buccal on trouve deux glandes salivaires. Ce bulbe se prolonge par un œsophage qui se renfle en un estomac, lui-même prolongé par un intestin formant une double circonvolution autour de l'hépatopancréas et aboutissant à l'anus (**Daguzan, 1983 ; Larba, 2014**), l'excrétion se fait grâce au rein et à l'intestin. Il existe un système porte-rénale, qui permet l'infiltration du sang au niveau du rein. L'intestin assure essentiellement l'élimination des déchets (**Chevalier, 1992 ; Barker, 2001**).

- **Système nerveux :**

Le système nerveux forme un anneau tout autour de l'œsophage et placé normalement en arrière du bulbe buccal ; mais quelquefois celui-ci est rétracté et le collier semble alors placer en avant (**Groult, 1897**). Il est constitué d'une masse ganglionnaire dorsale formée de deux ganglions cérébroïdes unis par une commissure cérébroïde et une masse ganglionnaire sousoesophagienne ventrale comportant deux ganglions palléaux latéraux, deux ganglions pédieux ventraux, deux ganglions pariétaux et un ganglion viscéral. Ces différents ganglions sont reliés par des connectifs (connectifs cérébro-pédieux, cérébropalléaux et palléo-pédieux) et l'ensemble forme, de chaque côté du tube digestif, un triangle caractéristique bien que la forte condensation du système nerveux le rende délicat à observer. De chaque ganglion partent de multiples nerfs innervant les divers organes de l'animal (**Heusser et Dupuy, 1998**).

Selon **Gaillard (1991)**, les organes des sens sont les yeux, les tentacules sensoriels portés sur la tête et les statocystes situés dans le pied.

Le système nerveux d'*Helix aspersa* est constitué de deux systèmes

- Un Système nerveux sympathique : constitué d'une paire de ganglions buccaux qui se trouve sous le bulbe buccal et une paire de ganglions cérébroïdes qui sont reliés entre eux par deux cordons nerveux.

- Un Système nerveux central : il se localise dans la région céphalique est constitué d'une chaîne de ganglions. (Pirame., 2003).

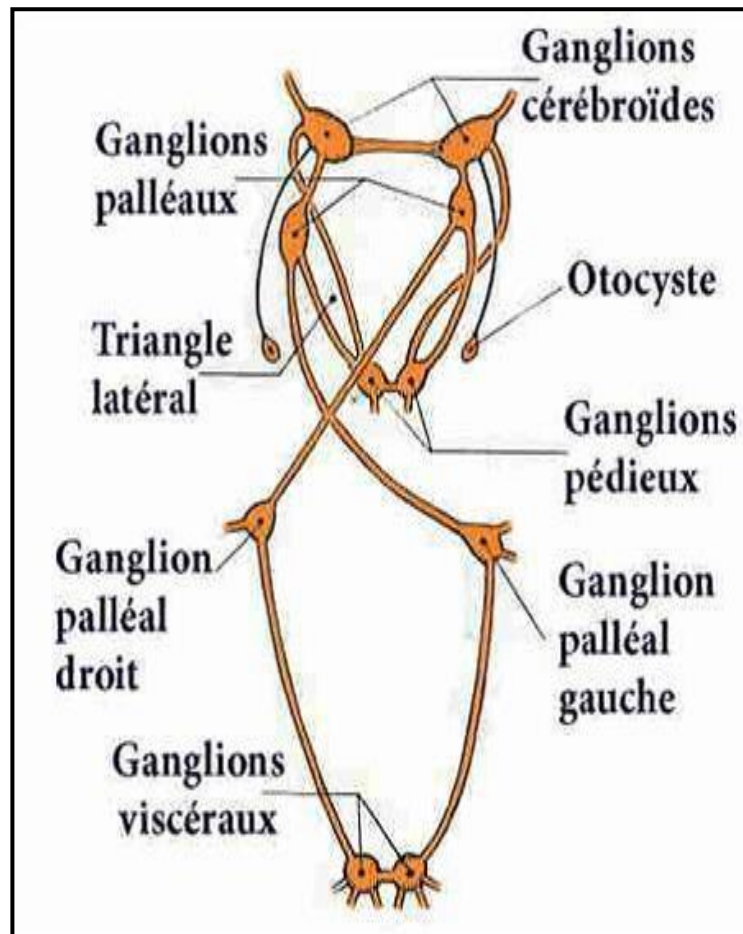


Figure 06: Système nerveux d'un escargot (Guyard, 2009).

- **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.

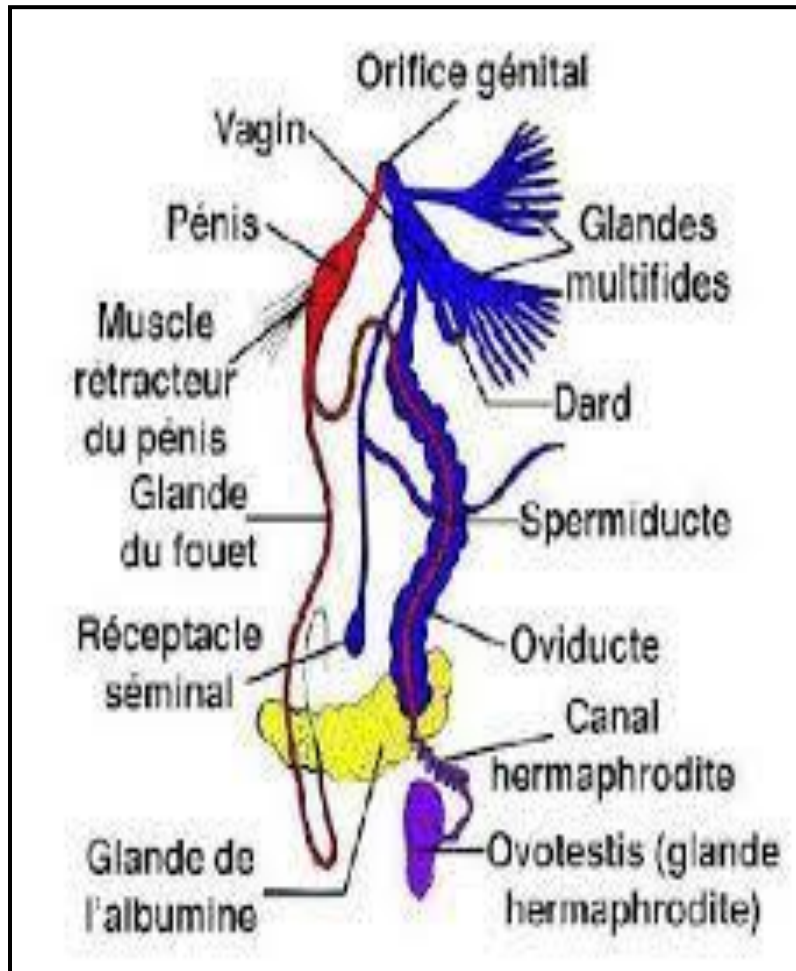


Figure 07 : Schéma de l'appareil génital de l'escargot (Guyard, 2009).

- **Appareil circulatoire :**

Son système circulatoire est constitué :

- **D'un cœur:** constitué d'une seule oreillette et un ventricule (Pirame., 2003).
- **De l'hémolymphe:** c'est le liquide physiologique d'*Helix aspersa* ainsi que d'autres mollusques terrestres et marins. l'hémolymphe circule dans un système veineux et un autre Artériel. Il est propulsé dans le réseau artériel via deux aortes. Il contient un pigment appelé l'hémocyanine et des cellules appelées " hémolyses" (Van Holde et Miller., 1995 ; Sanchez *et al.*, 1998 ; Adamowicz et Bolaczek., 2003).
- **L'hémocyanine:** c'est une molécule de nature protéique de la famille des métalloprotéines dont le rôle est de transporter l'oxygène (Markl., 2013).

- **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.

- **Appareil excréteur :**

Le rein situé à proximité du cœur dont il est cependant indépendant, assure l'excrétion (**Heusser et Dupuy, 1998**). Les mollusques très dépendants de la dessiccation, extraient efficacement de l'eau des excréments, et l'urine est rejetée sous forme d'acide urique solide (**Kerney et Cameron, 2006**).

Le rein des gastéropodes est un sac impair, de teinte fauve ou brun jaunâtre, à paroi spongieuse. Le canal excréteur débouche à côté de l'anus. A l'occasion des organes d'excrétion, nous devons signaler aussi la présence de diverses glandes dont le rôle n'est pas bien connu : telle est la glande muqueuse qui occupe la voûte de la cavité respiratoire ; la glande pédieuse des Limacidae et des Hélicidae; la glande de la pourpre des Murex, Purpura, etc. Celle-ci se trouve aussi dans la chambre branchiale (**Railliet, 1886**).

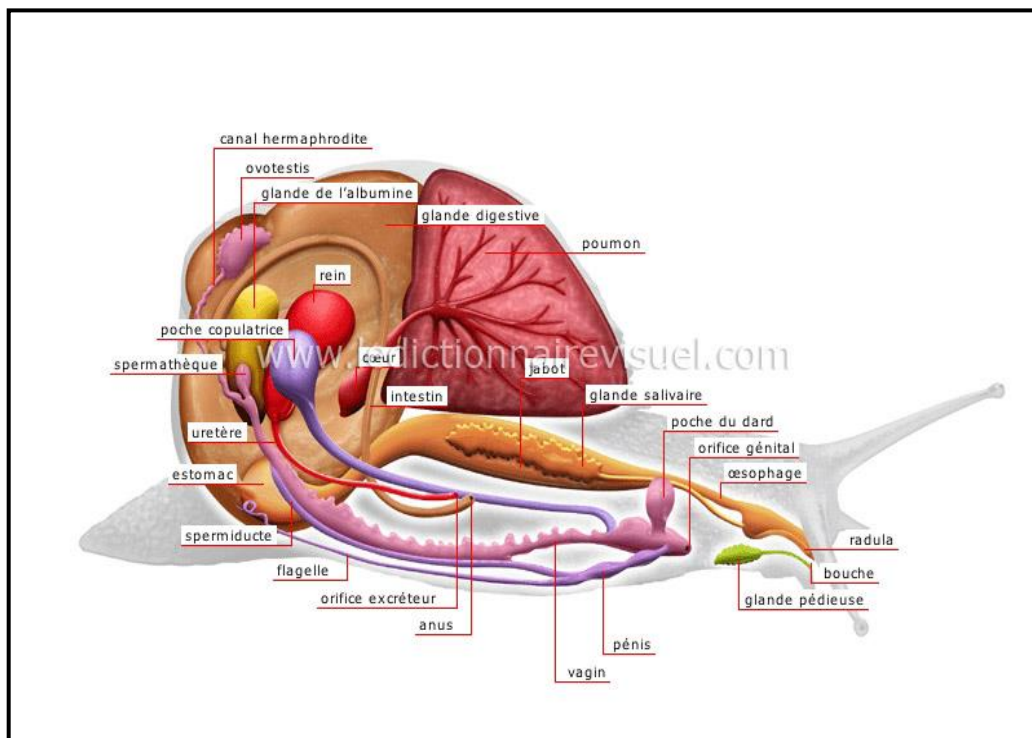


Figure 08 : Anatomie interne de l'escargot (<http://www.ikonet.com/fr/ledictionnairevisuel>)

1.3. Distribution géographique des escargots :

L'escargot Petit Gris, *Hélix aspersa*, est un Pulmoné terrestre paléarctique vivant dans la région méditerranéenne et dans la région atlantique européenne. Sa répartition géographique est la suivante. Pour la région méditerranéenne : Afrique du Nord (à l'exception des zones présahariennes), sud et est de l'Espagne, îles Baléares, Sardaigne, Corse, Sicile, Roussillon, Languedoc, Provence, Italie (sauf la zone alpine et subalpine), le nord-ouest de la Yougoslavie, la Grèce et l'Archipel, l'Anatolie occidentale, Chypre, la côte méditerranéenne du Proche Orient, de l'Egypte et de la Lybie. Pour la région européenne atlantique : l'Espagne et le Portugal atlantiques, la vallée de la Garonne et les pays sub pyrénéens, les régions océaniques de la France, de la Belgique et des Pays-Bas, la Grande Bretagne (sauf le nord de l'Ecosse), l'Irlande. Dans le Centre et l'Est de la France et dans l'Europe moyenne l'Escargot Petit Gris a été introduit dans des zones urbaines ou sub urbaines. L'espèce, suffisamment ubiquiste, est, en effet, facilement acclimatable dans des régions à climat de type méditerranéen, tempéré océanique, tempéré semi-continentale et même tropical. Les lieux d'introduction sont nombreux dans toutes les parties du monde : Afrique occidentale, Afrique du Sud, île de Sainte Hélène, Canaries, Etats Unis, Mexique, Amérique du Sud, Océanie, Australie ... (GERMAIN, 1905 ; TAYLOR, 1910).

1.4 .Cycle de vie d'*Hélix aspersa* :

L'escargot présente un rythme d'activité journalière en relation étroite avec la photopériode. Cette activité peut être inhibée par des conditions thermiques et hygrométriques défavorables. Dans des conditions optimales de température minimale nocturne n'est pas inférieure à 9 °C et humidité supérieure à 80 (Chevalier, 1992).

La phase d'activité débute à la tombée de la nuit est à une durée de 06 heures, il en profite pour se nourrir tandis que la phase d'inactivité relative à une durée inférieure à 18 heures durant cette phase l'escargot est au repos et ne manifeste que peu d'activité locomotrice, sexuelle ou nutritionnelle (Chevalier, 1992 ; Agro-service., 2004 ; Larba, 2014).

L'escargot est un poïkilotherme, il ne peut pas réguler sa température corporelle. Il s'est donc adapté, en climat tempéré aux variations thermiques saisonnières selon trois rythmes d'activités annuels marqués par trois états physiologiques (hibernation, estivation, activité) (Agro-service., 2004 ; Larba, 2014). Leur cycle de vie est marqué par deux phénomènes :

- **Estivation:**

Une absence prolongée d'humidité avec une température supérieure à 15°C provoque le repos de l'escargot qui dure que le temps de la sécheresse (Chevalier, 1992 ; Agro-service., 2004 ; Druart, 2011 ; Larba, 2014). Au printemps et en été les escargots présentent une période de vie ralentie (Agro-service., 2004 ; Larba, 2014). Durant l'estivation, la respiration et les mouvements cardiaques sont normaux mais il y a diminution rapide des réserves d'eau et des réserves énergétiques (Agro-service., 2004).

- **Hibernation:**

En hiver, lorsque la température moyenne devient inférieure à 15°C (Chevalier, 1992). Elle se caractérise par un état de vie ralentie durant lequel le métabolisme des escargots est diminué, L'escargot vit sur le glycogène emmagasiné et il peut perdre jusqu'au 30 % de son poids (perte en eau) (Agro-service, 2004 ; Larba, 2014).

Dans les deux activités saisonnières, l'escargot, se colle sur un support en fermant l'ouverture de coquille par un voile de mucus solidifié : l'épiphragme (Chevalier, 1992 ; Larba, 2014)



Figure 09 : Escargot en hibernation avec son épiphragme (Zaafour, 2014)

1.5. Croissance des escargots:

Dans la nature la croissance de l'escargot assujettie aux conditions climatiques. Elle s'arrête durant les périodes d'estivation et d'hibernation. En général la croissance naturelle s'étale sur deux ans. Exceptionnellement, avec un printemps et un été humide, l'escargot pourrait devenir adulte au bout d'un an. Inversement, deux sécheresses estivales consécutives

pourraient prolonger le temps de croissance à trois mois. En élevage, avec des enceintes humidifiées quotidiennement, l'escargot parvient au stade adulte au bout de dix-douze mois, avec une mise en hibernation d'octobre à mars. Si on maintient les escargots, en automne et en hiver en bâtiment, à une température 18-20°C, la croissance va se poursuivre et les escargots adultes en six mois au plus tôt et neuf mois au plus tard (**Chevalier, 1982-1992 ; Madec, 1983 ; Laurent et al. 1984**).

Les phases de croissance en fonction du développement de l'appareil génital de l'escargot :

- Phase infantile (quatre premiers mois) durant laquelle le tractus génital est non différencié (**Gomot et Enée, 1980 ; Madec, 1983**).
- Phase juvénile, comprise entre une «pré-puberté» et la puberté, avec un tractus génital s'organisant et une gamétogenèse active (**Gomot et Enée, 1980 ; Laurent et al., 1984**).
- Phase de maturité, ou la pré-adulte, durant laquelle l'appareil génital se développe principalement dans une voie femelle (**Gomot et Enée, 1980 ; Madec, 1983**).
- Phase adulte, à croissance nulle, durant laquelle l'escargot se reproduit (**Chevalier, 1982-1992**).

Tableau (01) : Description des 4 phases de croissance d'*Hélix aspersa* (Gomot et Enee 1980).

Phase	Différenciation sexuelle	Masse (g)
Infantile	Tractus génital non différencié	0,02 à 0,6
Juvénile	Organisation du tractus génital, gamétogenèse active	0,6 à 6
Préadulte	Maturation sexuelle : développement des glandes annexes femelles	Plus de 6 (individus non bordés)
Adulte	Différenciation sexuelle terminée : aptitude des individus à la reproduction.	De 6 à 14g (individus bordés)

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



Figure 10: Croissance et survie de l'escargot (www.heliciculture-vendee.netai.net).

1.6. Site de prélèvement de l'espèce :

Les juvéniles *d'Hélix aspersa* sont collectés au niveau du jardin de l'université de 20 août 1955 Skikda non traité par les pesticides. Ce site s'étend sur 246 hectares situé à quatre kilomètres au Sud-Ouest de la ville de Skikda, sur la route d'El-hadaik.



Figure 11: Localisation du site de prélèvement des escargots *Hélix aspersa* (Wilaya de Skikda) Nord-est de l'Algérie.

1.7. Technique d'échantillonnage et élevage :

Les escargots ont été prélevés de façon aléatoire, et ils ont été transférés à l'animalerie, placés dans des boîtes en plastique couvertes de filet perforé bien aérés (Dimensions : 23,5 x 16,5 x 10,5 cm) .Ils subissent une acclimatation pendant 15 jours avant de commencer les expériences.



Figure 12 : Echantillonnage et élevage d'*Helix aspersa* (photos personnel).

2. Matériel chimique :

2.1. Présentation des oxydes métalliques :

2.1.1. Oxyde de titane TiO_2 :

Le dioxyde de titane ou oxyde de titane (IV) est un composé d'oxygène et de titane de formule TiO_2 présent dans la nature, et fabriqué industriellement.

C'est le pigment blanc PW6 du Colour Index, utilisé aussi fréquemment comme opacifiant pour les peintures et de nombreux autres produits. Il est aussi un photocatalyseur de réactions chimiques (testé ou utilisé dans certains systèmes de dépollution).

Longtemps réputé chimiquement inerte (il remplace la céruse, interdite à cause de sa toxicité) le dioxyde de titane fait partie de la formulation de cosmétiques, de médicaments et d'aliments, mais l'Autorité européenne de sécurité des aliments ne le considère plus depuis

2021 comme « sûr en tant qu'additif alimentaire ». Il sert comme filtre ultraviolet dans des crèmes solaires sous sa forme nano particulaire, soupçonnée d'être écotoxique.



Figure 13: Oxyde de Titane

✚ Propriétés physico-chimiques de TiO_2 :

Tableau (02) : Propriétés physico-chimiques de TiO_2

Propriété	Caractéristique		
Nom	Dioxyde de titane, oxyde de titane		
Formule	TiO_2		
Masse molaire g/mol	$79,866 \pm 0,002$ g/mol		
Apparence	Solide blanc		
Phase cristalline	Anatase	Rutile	Brookite
T° fusion	1 855 °C		
T ébullition	2 500 à 3 000 °C		
Solubilité	Insoluble dans l'eau		
Masse volumique	$3,9\text{--}4,3$ g cm^{-3}		
État physique et couleur	poudre cristalline incolore à blanche.		
Odeur	Inodore		

2.1.2. Oxyde de Fer (Fe_2O_3) :

Les oxydes de fer sont très répandus dans la nature. On les trouve dans la croûte terrestre (roche, minéral), dans l'eau (érosion par l'eau, rivières ...) et dans les organismes

biologiques (corps humain, animaux, plantes). Ils ont été utilisés dans l'industrie. Ainsi d'autres applications, non décoratives, telles que la photoélectrolyse de l'eau dans le visible ou la réalisation de capteurs thermiques (assombrissement réversible observé à haute température) sont en cours d'investigation.



Figure 14 : Oxyde de fer

✚ Propriétés physico-chimiques de l'oxyde de fer :

Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'oxyde de fer sont présentées dans le tableau 03.

Tableau (03) : Propriétés physico-chimiques de Fe_2O_3 (CERADEL, 2012).

Paramètres	Caractéristique
Apparence	Solide en poudre
Couleur	Rouge sombre à rouge violacé, pourpre
Odeur	Inodore
Densité	Env. 5,2 g/c
Température de fusion	1565°C
Solubilité dans l'eau	Inférieur à 1µg/l
Stabilité chimique	Substance stable dans les conditions normales d'utilisation
Densité relative	Env. 3,4 kg/l
PH	Légèrement acide entre 4 et 6 (dans une solution saturée à 100 g/l.

2.2. Protocole de contamination des escargots :

2.2.1. Les conditions d'élevage :

Notre étude a été réalisée sur 135 escargots, sont des juvéniles de poids moyen de ($0.6 \pm 7g$), collecté dans la région de Skikda. Les conditions d'élevage des escargots sont les suivantes:

- Photopériode de 18h de lumière/24 avec une température de $-20^{\circ}C$.
- Les escargots sont répartis dans des boîtes en plastique transparentes avec un couvercle perforé et chaque boîte contient une éponge mouillée pour maintenir de l'humidité.
- Une boîte de pétrie contenant de la nourriture (10g farine de blé) est placée au fond de la boîte.
- Les boîtes sont nettoyées régulièrement chaque trois jour (**Gomot, 1997**).

2.2.2. Mode de traitement :

Après 15 jours d'adaptation aux conditions de laboratoire, Les animaux sont traités par addition des concentrations croissantes de deux oxydes métalliques (TiO_2 et Fe_2O_3) sous forme d'une fine poudre dans l'alimentation (500, 1000, 1500 et 2000 $\mu g/g$). Dans tous les cas, la nourriture est ensuite homogénéisée manuellement. Nous avons retenu un lot témoin et 4 lots traitées par l'oxyde de fer et 4 lots traitées par l'oxyde de titane, à raison de 15 escargots par lot. Pendant les 7 semaines de traitement, le nettoyage et le changement de nourriture est effectué chaque trois jour.

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

2.3. Dissection et prélèvement des organes :

Dans une cuvette à dissection, placer un escargot et découper lentement la coquille avec les ciseaux en suivant le bord d'enroulement de la coquille. Puis enlever délicatement leur l'hépatopancréas sont rapidement excisés à raison de 9 répétitions (1 témoins et 8 traités) avec un ciseau.



Figure 15: Dissection de l'escargot et prélèvement de l'hépatopancréas (photo personnel).

L'hépatopancréas est prélevé dans des lobes conservé dans le formol à 10%, sert pour faire des coupes histologiques.



Figure 16 : Echantillonnage (Hépatopancréas) (photo personnel)

2.4. Paramètres étudiés :

2.4.1. Effets comportementaux

Les escargots exposés au Fe₂O₃ et TiO₂ ont montré une série de symptômes. Le premier symptôme est la perte de la chimioréception, de sorte que les escargots ne sont plus attirés par la nourriture de façon dose-dépendante comparé aux escargots témoins. Aux concentrations élevées des deux xénobiotiques, les escargots passent la plupart de leur temps au sommet des boîtes sans montrer aucune activité locomotrice et nutritionnelle après la première semaine d'exposition. À la concentration la plus élevée, presque tous les escargots refusent de consommer la farine contaminée après 3 semaines d'exposition. Toutefois, aux concentrations les plus faibles 5, la plupart des animaux ont montré une activité similaire à celle des escargots témoins pendant la période expérimentale.

2.4.2. Paramètres physiologique:

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

Les escargots sont pesés individuellement avant le traitement et répartis en 9 lots de poids moyen de 0.6 ± 7 g.

Le poids frais des escargots (tissus mou + coquille) est mesuré à l'aide d'une balance de précision chaque semaine. Ce critère est recommandé pour évaluer les effets des oxydes métalliques sur la croissance des escargots *Hélix aspersa*.

➤ Taux de mortalité :

Le contrôle de la vitalité des individus d'*Hélix aspersa* au cours des essais est effectué au moment des renouvellements de nourriture, les individus morts sont évacués des enceintes d'essai. La mort d'un individu est généralement facile à déterminer : le pied flasque et jaunâtre est le plus souvent sorti de la coquille. Le corps luisant et très visqueux indique que la liquéfaction des tissus est en cours. L'odeur nauséabonde que dégage l'escargot est également un indicateur. En cas de doute, le pied est stimulé à l'aide d'une aiguille ou d'une paire de pinces brucelles. L'absence de réaction permet de conclure à la mort de l'individu.

2.5. Analyses histologiques :

Les hépatopancréas sont prélevés sur des escargots juvéniles témoins et traités par oxyde de fer et oxyde de titane durant 6 semaines, sont disposés dans des tubes eppendorf 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.

2.5.1. La fixation des organes :

La fixation est réalisée immédiatement après le prélèvement de l'échantillon à observer. Elle permet d'immobiliser et de conserver l'échantillon dans le temps, dans un état proche du vivant. Elle peut être réalisée par un liquide fixateur ou par congélation.

La fixation en liquide fixateur est réalisée en plongeant le matériel biologique dans une solution de formol.



Figure 17 : un hépatopancréas d'un escargot mise dans un histo-cassette (photo personnel).

2.5.2. Déshydrations :

Il est nécessaire de déshydrater au préalable l'échantillon en remplaçant l'eau qu'il contient par de l'éthanol. L'éthanol est non miscible avec la paraffine, il est donc substitué par une solution (clarifiant) miscible avec la paraffine. Ces étapes sont réalisées à l'aide d'un automate de déshydratation.



Figure 18 : Automate pour la déshydratation et l'inclusion à la paraffine (photo personnel).

2.5.3. L'inclusion :

L'inclusion suit la fixation en liquide fixateur. Elle consiste à rigidifier l'échantillon avec un milieu d'inclusion de paraffine, afin de pouvoir procéder à la coupe ultérieure. Les échantillons sont plongés dans des bains de paraffine. L'étape suivante d'inclusion est réalisée à l'aide d'une table d'inclusion. Elle consiste à orienter l'échantillon dans un moule contenant de la paraffine en fusion, en veillant à respecter le plan de coupe. Le bloc qui en résulte est enfin refroidi. Le bloc doit être taillé avant être passé au microtome.



Figure 19 : Appareils de réalisation des blocs de paraffine contenant les tissus (photo personnel) .



Figure20 : Plaque de refroidissement (photo personnel).

2.5.4. Les coupes :

Les coupes doivent être très fines et transversales par la lumière (en fines tranches de 5 micromètres) ; elles sont réalisées par microtomie ou cryotomie. La coupe est une étape importante de la préparation des lames car elle conditionne la bonne observation de l'échantillon en microscopie.

2.5.5. Etalement et collage des coupes :

La confection des coupes histologiques comporte alors 3 étapes :

- L'étalement : de segments de ruban de paraffine sur une lame de verre contenant un liquide d'étalement tel que l'eau albumineuse.
- Le collage : les lames de verre sont placées sur une étuve, réglée à une température de 140°C, pendant 30 min.
- Le séchage : de la préparation : en inclinant les lames et en les séchant au moyen de papier buvard absorbant.

2.5.6. Déparaffinage :

La paraffine doit être éliminée ; à l'aide d'une étuve pendant 30 minutes.

2.5.7. Réhydratation :

La réhydratation permet l'élimination de la paraffine intracellulaire, en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool à 50°), puis dans de l'eau distillée

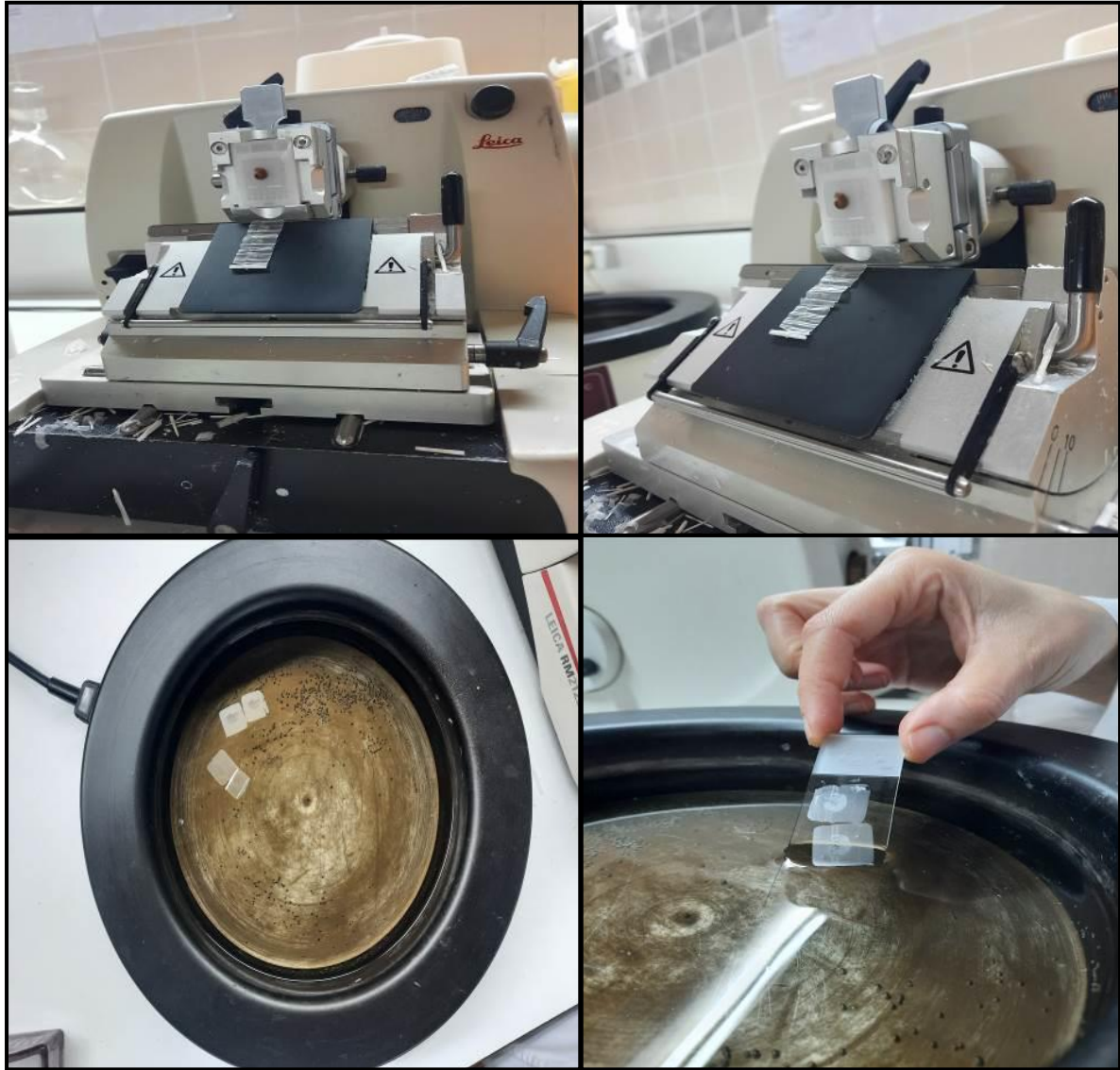


Figure 21 : Etallement des coupes dans un bain-marie chauffé sur plaque chauffante (photo personnel).

2.5.8. 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.



Figure 22 : Coloration des lames (photo personnel).

2.5.9. 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.



Figure 23 : Coupes colorées et montées pour être observées au microscope optique (photo personnel).

2.5.10. Observation microscopique :

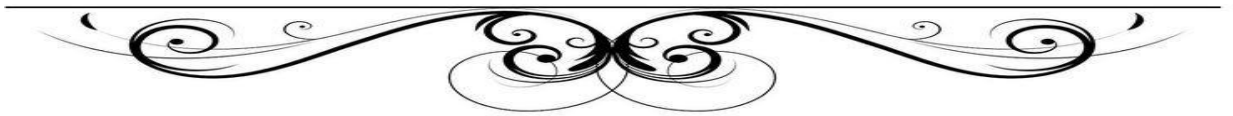
L'observation des coupes histologiques de l'hépatopancréas est réalisée avec un microscope optique (OPTIKA).

2.6. 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 physiologiques. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 16. (**Dagnelie, 1999**) .



RESULTS



III. Résultats :

1. Effet des oxydes métalliques (TiO_2 et Fe_2O_3) sur le poids moyen des escargots *Helix aspersa*:

1.1. Effet de dioxyde de titane sur le poids moyen des escargots *Helix aspersa*:

La figure (24) met en évidence l'évolution du poids moyen des escargots juvéniles sous l'effet de dioxyde de titane en fonction du temps. L'exposition des escargots pendant une semaine ne semble avoir aucun effet sur le poids relatif des animaux et ce pour toutes les concentrations testées.

Cependant après deux semaines de traitement, On observe une diminution significative ($P \leq 0,05$). Chez les traités par la dose 1 et 2.

A la 3^{ème} et 4^{ème} semaine nous constatons à une diminution non significative ($P \geq 0,05$). A la 5^{ème} semaine une diminution significative ($P \leq 0,05$) est enregistrée pour les témoins et ceux des traités par La dose 3.

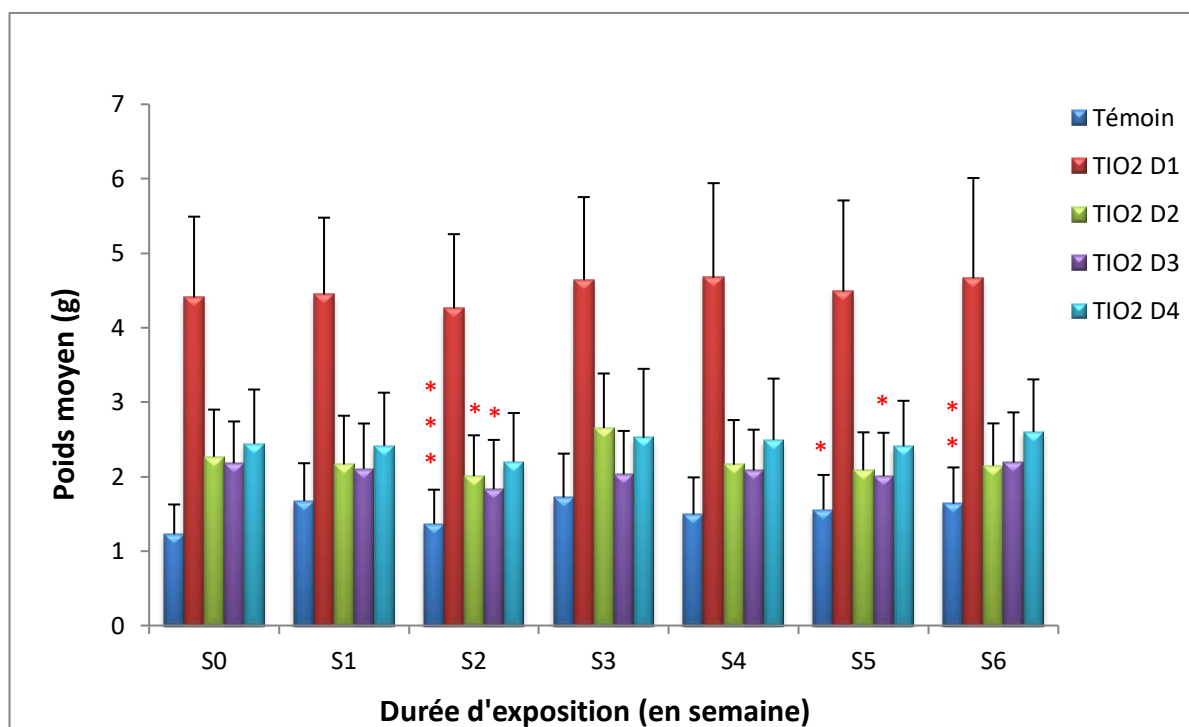


Figure 24 : Evolution des poids relatifs d'*Helix aspersa* traités par différentes concentrations d'oxyde de titane en fonction du temps.

*pour $p \leq 0.05$, ** pour $p \leq 0.01$, *** pour $p \leq 0.001$.

1.2. Effet d'oxyde de fer sur le poids moyen des escargots *Hélix aspersa*:

Le poids frais moyen des escargots traités à l'oxyde de fer tend à augmenter de manière significative sous l'effet des quatre doses à partir de la 1^{ère} semaine chez les traités par la D2. Durant la 2^{ème} semaine de traitement il y a une diminution significative ($P \leq 0,05$) chez les traités par la dose 4.

A la 3^{ème} semaine on constate à une diminution significative ($P \leq 0,05$) chez les traités par la dose 3.

A la 5^{ème} semaine nos résultats montrés qu'il existe une diminution significatives ($P \leq 0,05$) pour le groupe traité avec la D3.

A la 6^{ème} semaine d'exposition nous avons également noté une inhibition de la croissance des escargots, l'examen statistique des données a révélé une différence très significative ($P \leq 0,01$) pour les témoins et une différence significative ($P \leq 0,05$) pour les traités par D1.

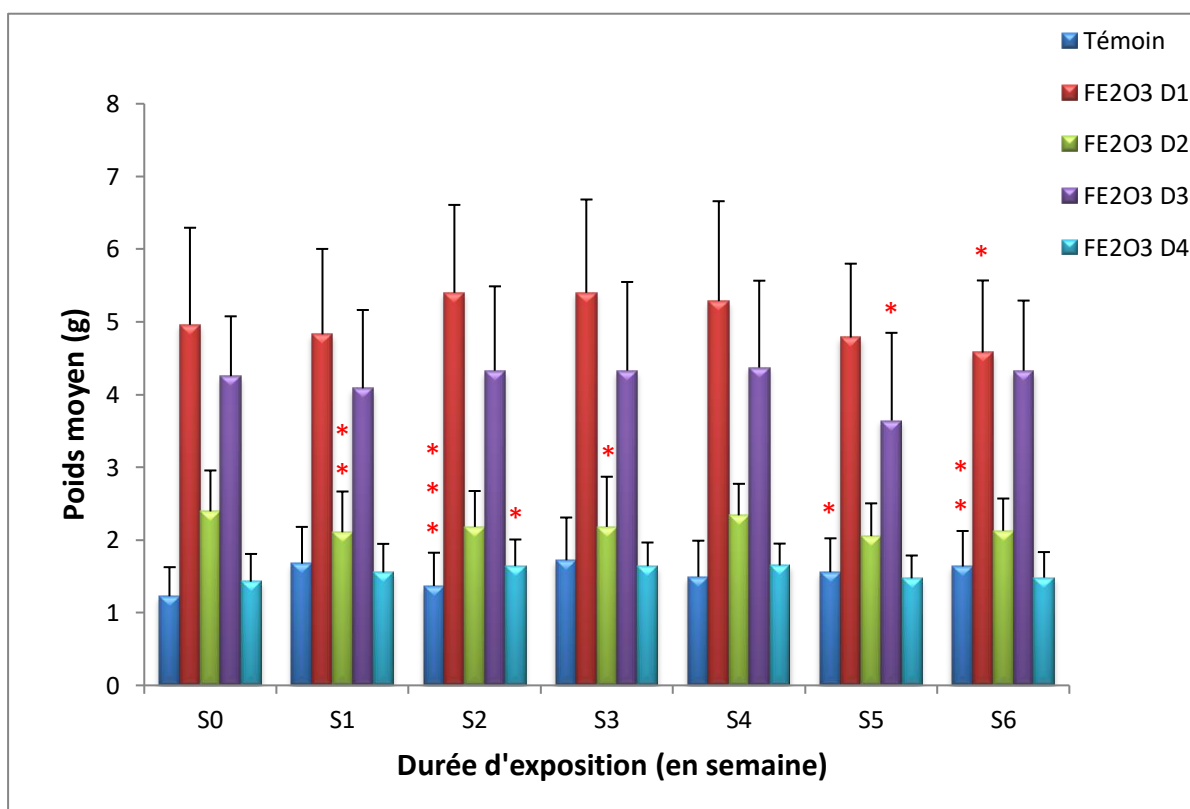


Figure 25 : Evolution des poids relatifs d'*Hélix aspersa* traités par différentes concentrations d'oxyde de fer en fonction du temps.

*pour $p \leq 0,05$, ** pour $p \leq 0,01$, *** pour $p \leq 0,001$.

2. Effets des deux oxydes métalliques (TiO₂ et Fe₂O₃) sur le pourcentage de mortalité

La mort d'un individu est généralement facile à déterminer, le pied flasque et jaunâtre est le plus souvent sorti de la coquille. La sole pédieuse n'adhère à aucune surface

Les résultats de comptage du pourcentage de mortalité sont résumés dans les tableaux (05 et 06).

Durant les bioessais, la mortalité était faible, avec seulement 14 individus sur 135 escargots, ce qui représente 10,37 % de la totalité de la population. Le taux de mortalité le plus élevé est enregistré chez les traités par l'oxyde de titane.

Tableau 04: Pourcentage de mortalité pour chaque lot (TiO₂)

lot	Nombre des individus mort	Pourcentage de mortalité
Témoin	0	0
D1	1	6,66%
D2	0	0
D3	3	20%
D4	4	26,66%

Tableau 05 : Pourcentage de mortalité pour chaque lot (Fe₂O₃)

Lot	Nombre des individus morts	Pourcentage de mortalité
Témoin	0	0
D1	1	6,66%
D2	0	0
D3	1	6,66%
D4	4	26,66%

3. Effets des deux oxydes métalliques (TiO₂ et Fe₂O₃) sur l'histologie de l'hépatopancréas :

Les figures (de 26 'à 34) montrent des observations microscopiques des coupes histologiques effectuées au niveau de l'hépatopancréas, témoin et traités.

Une section histologique de l'hépatopancréas

Du groupe témoin est illustrée dans la figure 26. Cette figure montre que le tissu de la glande digestive est constitué essentiellement par la juxtaposition de nombreux tubules digestifs de différentes formes et tailles, séparés par l'espace inter tubulaire, constitué de vaisseaux

hémo lymphatiques et d'hémocytes. La lumière des tubules est bordée par un épithélium simple associant plusieurs types cellulaires. Les cellules qui le composent présentent des morphologies diverses mais révèlent trois types cellulaires principales :

Des cellules digestives (**CD**) produisant des enzymes digestives déversées dans la lumière des tubules et responsables de la digestion extracellulaire des substances nutritives, des cellules excrétoires, (**CE**) réalisant la phagocytose des particules alimentaires de la lumière des tubules et responsables de la digestion intracellulaire et des cellules à calcium (**CC**) permettant le renouvellement des autres types cellulaires.

A la fin de l'essai, un examen microscopique des coupes histologiques des escargots témoins et traités par deux polluants (TiO_2 , Fe_2O_3) avec des doses croissantes (500, 1000, 1500 et 2000 $\mu\text{g/g}$) à montrer des modifications au niveau de l'hépatopancreas de façon dose-dépendante.

3.1. Effet de dioxyde de Titane sur l'histologie de l'hépatopancreas des escargots

L'examen histologique de l'hépatopancreas des escargots traités par TiO_2 (P1) met en évidence des altérations en réponse à tous les doses étudiées.

Aux doses (500 et 1000 $\mu\text{g/g}$), la figure (27) montre une diminution de la lumière des acinis, accompagnés par une diminution dans le nombre des cellules digestives et une augmentation dans les cellules excrétoires, ainsi qu'une forte congestion (couleur rouge foncé).

Les mêmes changements ont été observés par les doses (1500 et 2000 $\mu\text{g/g}$), avec apparition d'un nombre des cellules excrétrices plus importante que les doses précédentes, accompagnés par une rupture de la membrane basale et quelques débris cellulaires.

3.2. Effet d'oxyde de Fer sur l'histologie de l'hépatopancreas

Chez les lots traités par le Fe_2O_3 (P2) par la dose 1 aucune modification n'a été observée sur l'aspect structural, Par contre chez les traités par la dose 2 il y a une rupture de la membrane basale (MB).

Chez les traités par les doses 3 et 4 les structures cellulaires présentent des altérations visibles se manifestant par une dégénérescence des cellules digestives, la prolifération des cellules excrétrices, un aspect inflammatoire des tissus avec des débris cellulaires, ainsi que la diminution de la lumière des acini dont la membrane basale est totalement détériorée.

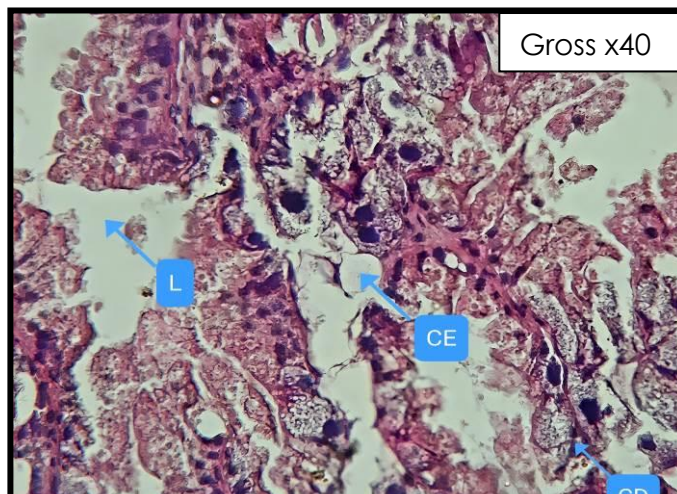


Figure 26 : Coupe histologique de l'hépatopancreas des escargots témoins (Photo personnel) (**CE**) : cellule excrétrice, (**CD**) : cellule digestif, (**L**) : lumière de l'acini

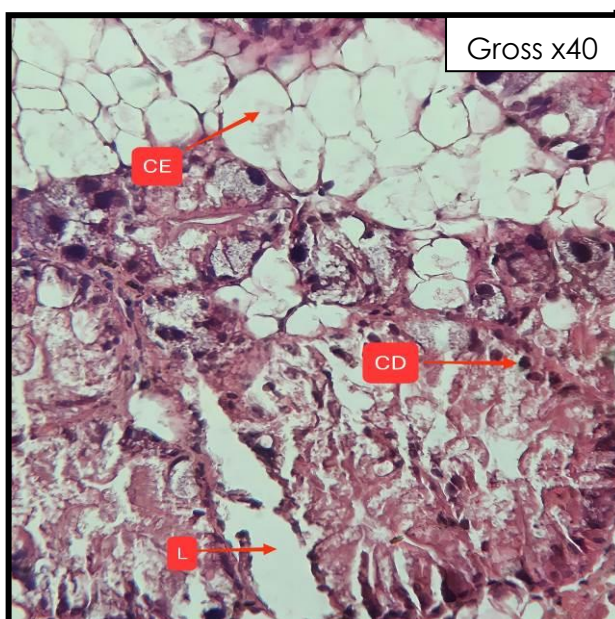


Figure 27 : Coupe histologique de l'hépatopancreas des escargots traité par TiO₂ dose 01 (Photo personnel) (**CE**) : cellule excrétrice, (**CD**) : cellule digestif, (**L**) : lumière de l'acini

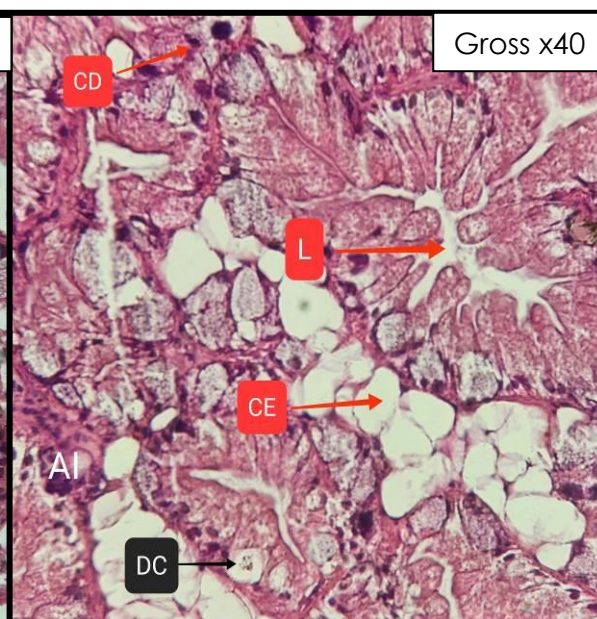


Figure 28 : Coupe histologique de l'hépatopancreas des escargots traité par TiO₂ dose 02 (Photo personnel) (**CE**) : cellule excrétrice, (**CD**) : cellule digestif, (**L**) : lumière de l'acini, (**DC**) : débris cellulaire, (**AI**) : Aspect inflammatoire.

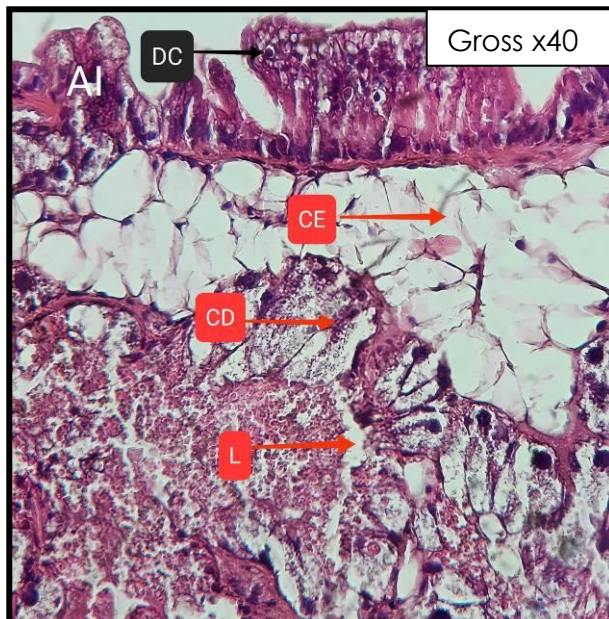


Figure 29 : Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par TiO₂ dose 03 (Photo personnel) (CE) : cellule excrétrice, (CD) : cellule digestif, (L) : lumière de l'acini, (DC) : débris cellulaire, (AI) : Aspect inflammatoire.

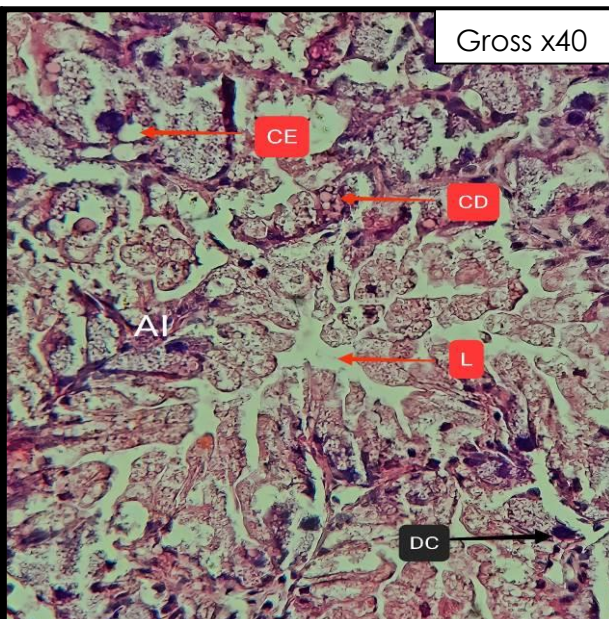


Figure 30 : Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par TiO₂ dose 04 (Photo personnel) (CE) : cellule excrétrice, (CD) : cellule digestif, (L) : lumière de l'acini, (DC) : débris cellulaire, (AI) : Aspect inflammatoire.

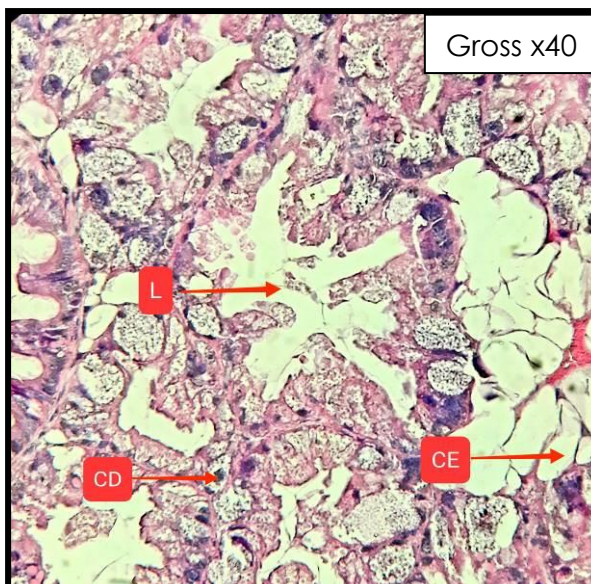


Figure 31 : Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par Fe₂O₃ dose 01 (Photo personnel) (CE) : cellule excrétrice, (CD) : cellule digestif, (L) : lumière de l'acini.



Figure 32 : Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par Fe₂O₃ dose 02 (Photo personnel) (CE) : cellule excrétrice, (CD) : cellule digestif, (L) : lumière de l'acini, (MB) : membrane basale.

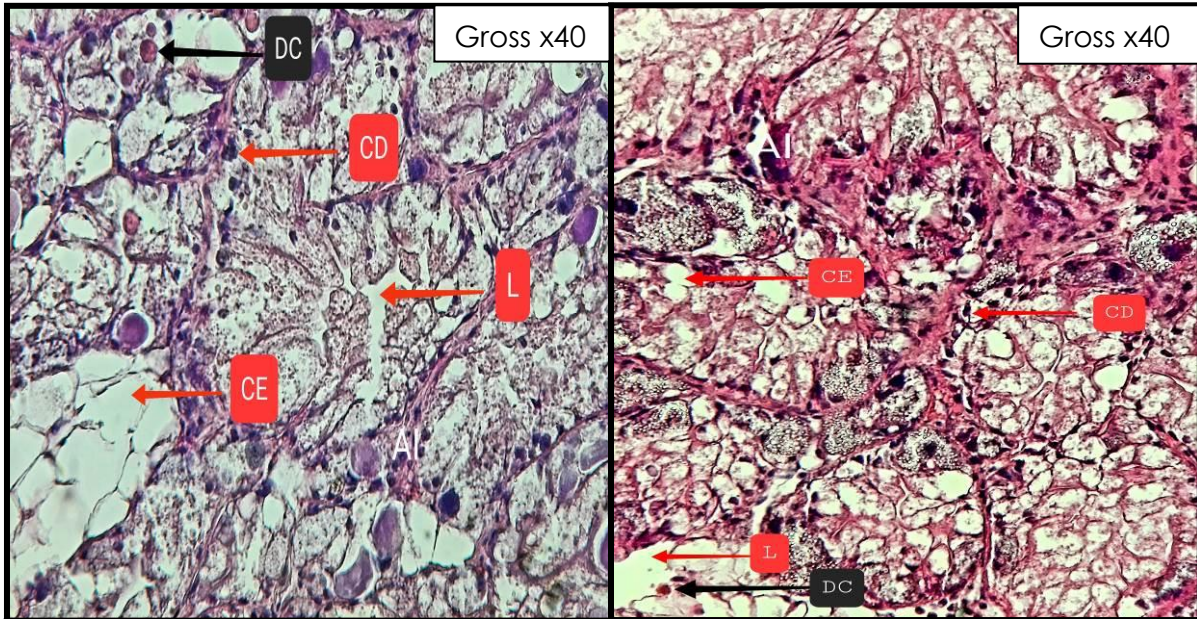
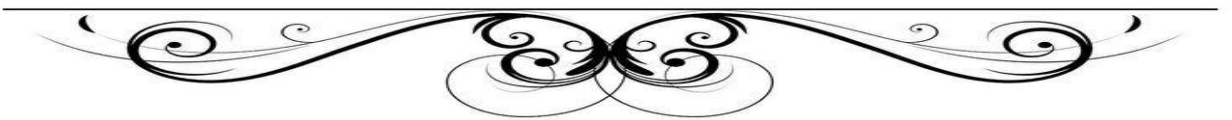


Figure 33 : Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par Fe₂O₃ dose 03 (Photo personnel) (CE) : cellule excrétrice, (CD) : cellule digestif, (L) : lumière de l'acini, (DC) : débris cellulaire.

Figure 34 : Coupe histologique de l'hépatopancréas des escargots traité par Fe₂O₃ dose 04 (Photo personnel) (CE) : cellule excrétrice, (CD) : cellule digestif, (L) : lumière de l'acini, (DC) : débris cellulaire.



DISCUSSION



IV. Discussion :

1. Effet d'oxyde de fer et de titane sur les paramètres physiologiques de l'escargot :

La réponse globale d'un organisme au stress désigne l'ensemble de ses réactions physiologiques visant à maintenir son homéostasie, c'est-à-dire le maintien actif de la constance du milieu intérieur pour donner les meilleures chances de survie et permettre de rester fonctionnel dans un environnement défavorable. (**Hoffmann & Parsons, 1991**). Ainsi, toutes les études sur les bio-indicateurs convergent vers l'idée que les gastéropodes dont les escargots sont d'excellents modèles biologiques pour toutes les études écotoxicologiques d'un milieu. C'est pourquoi, ils sont de plus en plus utilisés pour évaluer l'impact de contamination sur leur physiologie (**Boucenna, 2010**).

1.1. Effet d'oxyde de fer et de titane sur le poids relatif des escargots

Nous nous sommes intéressés de la toxicité des oxydes métalliques sur l'avancement de la croissance de *H. aspersa*, se basant sur l'étude de Gimbert qui a montré que, souvent de nature métallique les xénobiotiques qui pénètrent sans difficulté à l'intérieur de la cellule peuvent s'accumuler et générer des processus cytotoxiques.

Les changements physiologiques observés chez les escargots traités sont causés par la pénétration des oxydes métallique, plus précisément des matières actives toxiques utilisées, à l'intérieur de organisme des escargots, causant ainsi un dysfonctionnement au niveau de leurs organes vitaux ; Cette hypothèse est confirmée par les travaux de **Gimbert (2006)**, qui a expliqué ces changements chez ces animaux par le résultat net des processus d'assimilation/absorption, distribution, de stockage et toxicité.

L'étude de la croissance permet d'observer indirectement les effets d'un stress polluant sur une des composantes de la fitness des organismes et présente l'avantage d'intégrer l'histoire de vie des individus (**Adams et al. 1992 ; Laroche et al. 2002; Marchand et al. 2003 In Bourbia, 2013**)

Car nous avons mis en évidence une réduction du poids relatif des escargots traités par l'oxyde de titane en comparaison avec celui des escargots témoins. Cette diminution en poids est probablement due à la réduction de la consommation alimentaire constatée chez les escargots traités. Ainsi, **Grara (et al. 2015)** ont confirmés cette hypothèse chez des escargots traités par des concentrations croissantes d'oxyde de Zinc dans leur alimentation. Selon **Lalmi & Lazreg (2016)**, cette perte de poids des escargots traités constitue un premier indice d'une toxicité potentielle de ces gastéropodes.

Une rapide récupération de la croissance (poids moyen) des juvéniles après la troisième semaine de traitement, a été observée jusqu'à la cinquième semaine de traitement, et un freinage dès la sixième semaine jusqu'à la fin du traitement. Ceci suggère un effet réversible possible de l'oxyde de titane vis-à-vis de la croissance.

Par rapport à celui du l'oxyde de fer qui semble être irréversible. Ainsi, **Bluzat et Seugé (1979)** ont fait les mêmes constatations avec le lindane.

On remarque que l'oxyde de fer stimule l'augmentation de poids au cours de la première quinzaine et diminue à partir de la cinquième semaine jusqu'à la fin de traitement où on enregistre la croissance la plus faible puis le poids augmente au cours de la dernière quinzaine de contamination, puisque l'*Helix aspersa* est un bon bio-accumulateur (**Vaufleury, 2000**). C'est pour cela qu'ils sont utilisés depuis longtemps pour étudier le phénomène d'accumulation des polluants (**Pauget, 2012**). L'accroissement de la toxicité des deux oxydes métallique avec le temps n'est cependant pas similaire.

Selon **Gomot (1997) in (Bourbia, 2013)**, le mécanisme impliqué dans l'inhibition de croissance des escargots nourris avec de la nourriture contaminée est difficile à identifier. Il pourrait s'agir d'une inhibition de synthèse d'une hormone de croissance essentielle à la croissance des escargots.

Dans un environnement pollué, l'animal se met dans un état de jeun prolonge pour éviter la nourriture souillée c'est une hypothèse confirmée par (**Gimbert et al., 2008 ; Hispard, 2008**)

Ces données reflètent le déclin de la croissance des escargots sous l'effet de tous les traitements. La réduction significative de la croissance des juvéniles exposés au l'oxyde de titane et l'oxyde de Fer peut s'expliquer par une réduction des réserves énergétiques, allouées à la croissance (contenus en lipide et en glucides) dans les cellules de stockage des tissus des escargots, cette réduction est probablement provoquée par la mobilisation de ces ressources pour l'initiation des processus de détoxification.

D'autre part, **Van Straalen et al. (1987)** suggèrent que ces animaux sont capables de réguler la quantité de métaux dans leur masse corporelle avec pour conséquence une diminution de la consommation alimentaire aux fortes doses. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Grara (2011)** qui a mis en évidence une perte de poids chez *Helix aspersa* suite à une exposition subchronique aux particules métalliques.

1.2. Effet d'oxyde de fer et de titane sur le pourcentage de mortalité :

Un autre paramètre suivi dans ce travail concernant la mortalité (10.37%) notée chez les escargots traités pendant les 6 semaines d'exposition, il n'y a pas des morts dans les témoins. nous supposons que la mort due à un effet choc intense provoqués par le traitement chimique, **Darriet (1998)** , En effet, la mortalité des escargots dépend de sa sensibilité vis-à-vis des substances testées, on peut expliquer cela par la forte résistance du système de détoxification qui joue ici un rôle majeur d'élimination et de réparation des dégâts induits par la pénétration de ces molécules. La durée de traitement aussi influence la survie sans oublier la concentration du xénobiotiques et la voie de pénétration.

Lorsque des organismes vivants sont soumis à des changements bruts dans leur environnement, ils sont soumis à un stress intense, entraînant la mort des organismes sans que ces derniers ne puissent réagir ou s'adapter particulièrement lorsque leurs enzymes de détoxifications sont déplétées.

1.3. Effet d'oxyde de fer et de titane sur l'histologie de l'hépatopancréas

Après avoir mis en évidence sur les paramètres physiologies et leurs changements causés par les oxydes métalliques accumulés dans un bioinducteur *Hélix aspersa*, il s'est avéré nécessaire de mettre en évidence les altérations tissulaires potentielles. Le tissu auquel nous nous sommes intéressés est le tissu hépato pancréatique. L'hépatopancréas est l'organe le plus important dans la détoxification des xénobiotiques chez les mollusques. Cet organe est responsable de la production d'enzymes digestives, l'absorption des nutriments et la digestion par endocytose de substances alimentaires, et de l'excrétion (**Owen, 1996**).

L'exposition aux oxydes métalliques peut causer des altérations cytologiques et ultrastructurales très importantes au niveau de l'hépatopancréas (**Frías et al. 2008**) .Ces altérations peuvent être utilisées en tant que bio marqueurs d'exposition aux métaux (**Amaral et al. 2004**).

Dans notre observation, nous avons remarqué au niveau de l'hépatopancréas des nécroses cellulaires ainsi qu'une prolifération des cellules excrétrices et une dégénérescence des cellules digestives chez les escargots exposés aux différentes concentrations des oxydes métalliques.

La perte des cellules digestives semble être une réponse générale après une exposition aux oxydes métalliques chez les gastéropodes terrestres et elle est reliée principalement à la détérioration du processus digestif provoqué par la présence des particules métalliques (**Zaldibar et al. 2008; 2007**). D'un autre coté selon **Marigomez et al .,(1996,1998)** la

prolifération des cellules excrétrices et les changements dans leur proportion après exposition de durée de six semaines à des polluants semblent être une réponse générale chez les mollusques.

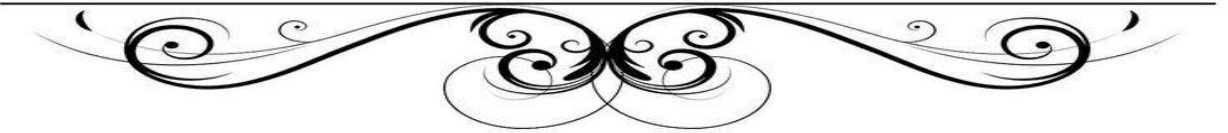
Zaldibar et al. (2008) ont rapporté que les cellules excrétrices sont cinq fois plus abondantes au niveau de l'hépatopancréas chez les limaces implantées sur un site pollué que chez ceux du site non pollué, tandis que le nombre des cellules digestives est passé de 80% chez les limaces du site témoin à 30% chez celles placées sur le site pollué.

Plus récemment, des études ont également permis de révéler la présence d'altérations au niveau du tissu hépato pancréatique chez les escargots exposés différents contaminants, On peut ainsi citer l'étude de **(Boucenna ,2015)** menée sur les escargots *Helix aspersa* exposés aux métaux lourds 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.

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



*CONCLUSION ET
PERSPECTIVES*



Conclusion et perspectives :

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'impact de deux oxydes métalliques l'oxyde de fer et l'oxyde de titane 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 El Hadaik. Il s'agit d'une étude de toxicité chronique (6 semaines) effectué par ingestion. Les animaux sont exposés à quatre concentrations croissantes (500, 1000, 1500 et 2000 $\mu\text{g/g}$ de TiO_2 et Fe_2O_3), les paramètres physiologiques (poids des escargots et pourcentage de mortalité) sont testés, cette étude a été compléter par une étude histopathologique de l'hépatopancréas des escargots.

Nos résultats montrent que l'exposition chronique aux oxydes métalliques dans des conditions contrôlées provoque des altérations sur le gain du poids frais moyen des escargots, la survie aussi est touchée.

Nous avons vu aussi dans ce travail que l'hépatopancréas est un organe très sensible, participant à la détoxification des xénobiotiques, à travers des atteintes tissulaires, qui sont bien visibles aux traitements à la plus forte concentration

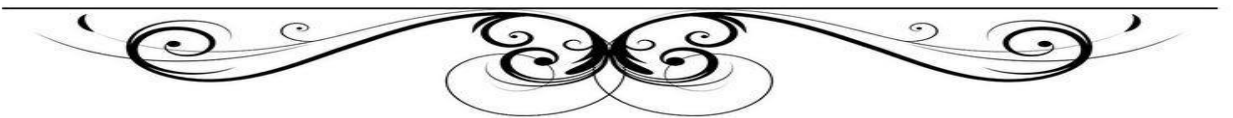
Enfin ces deux xénobiotiques présente une grande capacité de pénétration et d'internalisation au niveau cellulaire accompagné par déclenchement d'un stress oxydant qui suggère une augmentation dans le taux des radicaux libres qui sont responsables des lésions tissulaires et pouvant aboutir à la mort cellulaire.

Dans le cadre d'un travail futur, il serait souhaitable de réaliser:

- Des dosages des biomarqueurs tels que l'acetylcholinestérase, catalase, GSH.
- Dosage des métaux lourds au niveau de l'hépatopancréat
- De faire une étude embryotoxicologique



RESUMES



Résumé :

Le principal objectif de notre travail était d'étudier les effets de deux oxydes métalliques: l'oxyde de titane TiO_2 , et l'oxyde de fer Fe_2O_3 appliquées par voie orale, à des concentrations croissantes (500, 1000,1500 et 2000 μ g/g). Les expérimentations ont été menées sur la survie et l'évolution du poids des escargots, cette étude a été compléter par une étude histopathologique de l'hépatopancreas des escargots.

Les oxydes métalliques testés perturbent les performances individuelles en modifiant l'acquisition de l'énergie et l'augmentation de pourcentage de mortalité notamment chez les traités par l'oxyde de titane.

De plus des perturbations significatives sont également notées dans le poids frais moyen des escargots de façon dose dépendante et en fonction du temps.

L'étude histopathologique de l'hépatopancreas a confirmé cette sensibilité de l'espèce vis-à-vis les deux oxydes métalliques à travers des atteintes tissulaires observées particulièrement à des fortes concentrations des deux oxydes.

Les altérations structurales du tissu hépatopancréatiques témoignent d'une altération du processus digestif, et induisent ainsi, une réduction des capacités de digestion et d'assimilation des aliments par les escargots exposés aux différents traitements.

Mots clés: *Helix aspersa*, Oxyde de fer, oxyde de titane, poids, survie, histopathologie.

Abstract:

The main purpose of our work was to study the effects of two metal oxides: TiO₂ titanium oxide and Fe₂O₃ iron oxide applied orally at increasing concentrations (500, 1000, 1500 and 2000µg/g). The experiments were conducted on the survival and weight evolution of snails, this study was supplemented by a histopathological study of snail hepatopancreas.

Metal oxides tested disrupt individual performance by changing the acquisition of energy and the increase in the percentage of mortality especially in titanium oxide treated.

In addition, significant disturbances are also noted in the average fresh weight of snails in a dose-dependent and time-dependent manner.

The histopathological study of hepatopancreas confirmed this sensitivity of the species to the two metal oxides through tissue damage observed especially at high concentrations of the two oxides.

Structural alterations of the hepatopancreatic tissue show an alteration of the digestive process, and thus induce a reduction in the capacity of digestion and assimilation of food by snails exposed to different treatments.

Keywords: *Helix aspersa*, iron oxide, titanium oxide, weight, survival, histopathology.

ملخص:

كان الهدف الرئيسي لعمليتنا هو دراسة تأثيرات أكاسيد المعادن : أكسيد التيتانيوم TiO_2 ، و أكسيد الحديد Fe_3O_4 المطبق عن طريق الفم، في زيادة التراكيز (500، 1000، 1500، 2000 μ)

أجريت التجارب على بقاء و تطور وزن الحلزون ، تم استكمال هذه الدراسة بدراسة مرضية نسيجية للبنكرياس الكبدية للحلزون.

تعطل أكاسيد المعادن التي تم اختبارها الأداء الفردي من خلال تعديل اكتساب الطاقة وزيادة النسبة المئوية للوفيات خاصة في أكسيد التيتانيوم المعالج.

بالإضافة إلى ذلك، لوحظت اضطرابات كبيرة في متوسط الوزن الجديد للحلزون بطريقة تعتمد على الجرعة و الزمن.

أكدت الدراسة المرضية النسيجية للبنكرياس الكبدية هذه الحساسية لأنواع تجاه أكاسيد المعادن من خلال تلف الأنسجة الذي لوحظ بشكل خاص عند التراكيز العالية للأكاسيد.

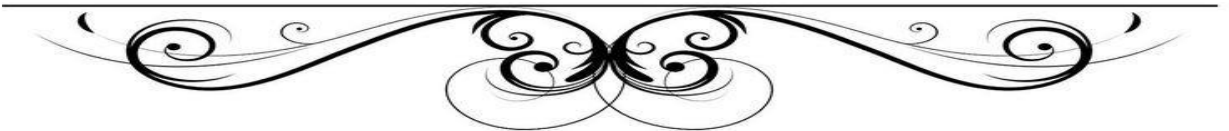
تظهر التغييرات الهيكلية في الأنسجة الكبدية البنكرياسية تغييرا في عملية الهضم، و بالتالي تؤدي إلى تقليل قدرة الهضم و استيعاب الطعام من قبل الحلزونات المعرضة لعلاجات مختلفة.

الكلمات المفتاحية: *Helix aspersa*، أكسيد التيتانيوم، أكسيد الحديد، الوزن، البقاء، علم أمراض الأنسجة.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques :

A

- Alberts B., Johnson A., Lewis J. 1983. The extracellular matrix of the animals. In Molecular Biology of the Cell, 4th edition. *Garland Science, New York*. 692 - 713 p.
- Amaral, A., da Cunha, H., Rodrigues, A., 2004. The connective tissue index of *Helix aspersa* as a metal biomarker. *BioMetals* **17**: 625–629.
- Adams S.M., Crumby W.D., Greeley M.S., Shugart L.R., Saylor C.F., 1992. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicology and Environment Safety*. **24**: 347-60.

B

- Berry C.C., Charles S., Wells S., Dalby M.J., Curtis A.S.G. 2004a. The influence of transferring stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. *International Journal of Pharmaceutics*. **269**(1):211 - 2
- Berry C.C., Wells S., Charles S., Aitchison G., Curtis A.S.C. 2004b. Cell response to dextran derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*. **25**(23): 5405-5413.
- Berry C.C., Wells S., Charles S., Aitchison G., Curtis A.S.C. 2003. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials*. **24**(25):4551-4557.
- Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. **2**(4):55.
- Barker G.M., 2001. The Biology of terrestrial molluscs. Wallingford U.K, C.A.B. International. 558 p.
- Barker, G.M., 2001. The Biology of Terrestrial Mollusks. CAB International, Oxon, Wallingford, UK, 567p.
- Bursztyka P., 2015. Etude du rôle des sémiocimiques dans les stratégies d'évitement des prédateurs chez deux gastéropodes terrestres: *Deroceras reticulatum* et *Xeropictader bentina* (Krynicky, 1836). Thèse. Université de toulouse, 140P.
- Boucenna M., 2010. Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les aciéries 1 et 2 du complexe sidérurgique d'EL-Hadjar sur un modèle bio-

accumulateur helix aspersa.diplome de magister en biologie,université Badji Mokhtar Annaba,85P.

- Bonnet J.C., Aupinel P., Vrillon, J.L., 1990. L'escargot *Helix aspersa*, biologie, élevage .Du labo au terrain. INRA.1-5 p.
- Boucenna, M., Berrebbah, H., Atailia ,A., Grara ,N., Djebar ,M.R.,2015. Effects of MetalDust on Functional Markers and Histology of Gland Digestive and Kidney of the Land Snails(*Helix aspersa*) in the North East of Algeria .*Global Veterinaria*14 (2): 189-198.
- Bluzat R., Seugé J., 1979. Etude de la toxicité chronique de deux insecticides (Carbaryl et Lindane) à la génération F1 de *Lymneastagnalis*L. (Mollusque Gastéropode pulmoné). 1. Croissance des coquilles. *Hydrobiology*. 65(3): 245-255.
- Beaumont, A., & Cassier, P., 1970. Travaux pratiques de biologie animale : zoologie, embryologie, histologie, Dunod, PARIS, p 472.

C

- Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wang T., Yuan H., Ye C., Zhao F. 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. *Toxicol Lett*. 163: 109-120.
- Cairns,J.et Mount,D.I .1990.Aquatic Toxicology. Environ .SCI . technol., 24, 154-161.
- Chevalier H .1992. L'aevage des escargots. Production et préparation du Petite-Gris. Edit. Du Point Vétérinaire, Maisons-alfator,144P
- Dallinger R., Berger B., Triebkorn-Köhler R., Köhler H., 2001. Soil biology and ecotoxicology. The biology of terrestrial molluscs. Barker G.M. Oxon, CABI: 489-525 p.

D

- Draparnaud J.P.R., 1805. Histoire naturelle de mollusques terrestres et fluviatiles de la France, 161p.

E

- El-Khayat,H., Abdel-Hamid,H., Gaber?h., Kadria,M., Flefel.,H.,2015. Snails and Fish as Pollution Biomarkers in Lake Manzala and LaboratoryA: Lake Manzala Snails. *Fish Aquac*• 2150-3508.

F

- Frías,E, Abad,R., Aidée C., Nevárez,V, Isidro ,L, Páez,O., Lozan,O., Domenico,V.,2008.Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeusvannamei* juveniles. *Aquatic Toxicology* .89 ,152–157.

G

- GIMBERT, F. 2006. Cinétique de transfert de polluants métalliques du sol à l'escargot. Thèse de Doctorat en Science de la vie, Université de Franche-Comté, Besançon, France, 192p.
- Gimbert.F ., Annette de Vaufleury., Douay.F., Coeurdassier.M., Scheifler.R., Badot.P.M.,2008 . Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70 138–146.
- GRARA, N., BOULOUDENINE, M., KHALDI, F., ZENIR, Z., & ABDEMADJID, S. 2015. Caractérisation Morphophysiological de la Toxicité du ZnO (Nanoparticule manufacturée) sur l'escargot l'*Helixaspersa* bio-indicateur de pollution de l'environnement. *J. Mater. Environ. Sci.* 6, 9, 2596-2603p
- Gomot A., 1997. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 33: 209-216.
- Gomot A., Gomot L. 1995. Neurohormonal control of body and shell growth of the snail *Helix*. *Bull. Inst. Océanog. Monaco*. 14:141-149.
- Grara, N., 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helixaspersa*) : Cas des métaux .Thèse de doctorat de L'université de Annaba. 120p.
- Grara, N, 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helixaspersa*) : Cas des métaux. Thèse de doctorat en Toxicologie cellulaire. Université Badji Mokhtar, Annaba.
- Gomot, L. et Enee, J., 1980. Biologie de la reproduction de l'escargot *Helixaspersa* Muller :les phases de la croissance et de la différenciation sexuelle. *Atti. Accad. Fisiocrit. Siena*, 37,73-85.

H

- Hughes P., Marshall D., Reid Y., Parkes H., Gelber C. 2007. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need. *Biotechniques* 43(5):575, 577-578, 581, 572 passim.
- Heusser S., et Dupuy H.G., 1998. Atlas biologie animale I. Les grands plans d'organisation 3^e édition, Dunod, Paris, 135p.
- Heusser S., et Dupuy H.G., 1998. Atlas biologie animale I. Les grands plans d'organisation 3^e édition, Dunod, Paris, 135p.
- Hoffmann, A.A., Parsons, P.A. (1991). Evolutionary Genetics and Environmental Stress,. (Eds), Oxford University Press, New York, USA. 284P.
- Hispard ,F., de Vaufleury, A., Cosson R.P., S. Devaux ., Scheifler , R., Coeurdassier, M.,Gimbert,F., Martin,H., Richert, L., Berthelot, A., Badot, P.M., 2008. Comparison of transfer.
- Heusser S., et Dupuy H.G., 1998. Atlas biologie animale I. Les grands plans d'organisation 3^eédition, Dunod, Paris, 135p.

J

- Jolivet J.P., Chanéac C., Tronc E. 2003. Iron oxide chemistry, from molecular clusters to extended solid networks. *Chem. Commun.* 481-487.

K

- Kreuter J. 2001. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47(1):65-81.
- Kerney M.P., Cameron R.A.D., 2006. Guide des escargots et limaces d'Europe, identification et biologie de plus de 300 espèces, Paris, 370p.
- Koeneman B. A., Zhang Y., Westerhoff P., Chen Y., Crittenden J. C., Capco, D. G. 2010. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol Toxicol*,26, 225-238.

L

- LALMI, S., & LAZREG, A. 2016. Effet de deux molécule nanométrique sur les parametre physiologique des escargothelixaspersa. Mémoire de Master en

Toxicologie, Xénobiotiques et Risque Toxicologique, Université de Larbi Tébessi – Tébessa, 82p.

- Laroche J., Quiniou L., Juhel G., Auffret M., Moraga D., 2002. Genetic and physiological responses of flounder (*Platichthys flesus*) populations to chemical contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21: 2705-12.

M

- Mavon A., Miquela C., Lejeune O., Payre B., Moretto P. 2007. *In vitro* percutaneous absorption and *in vivo* stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacol Physiol*.10-20.
- Mohapatra M., Anand S. 2010. Synthesis and applications of nanostructured iron oxides/hydroxides. *International Journal of Engineering, Science and Technology*. 2(8):127 - 146.
- Moriarty F.,1990. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. Academic press,London,289 P
- Müller O.F., 1774. *Vermiumterrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succincta historia*. Volumen alterum. - pp. I-XXXVI [= 1-36], 1- 214, [1-10]. Havnix et Lipsiæ. Heineck et Faber, 59 p.
- Marigomez, I., Kortabitarte, M., Dussart, G.B.J., 1998. Tissue-level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 167e176.
- 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.
- Marchand J., Tanguy A., Laroche J., Quiniou L., Moraga D., 2003. Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Marine Ecology Progress Series*. 260: 273-284.
- Michel Rousslet., 1979. *L'élevage des escargots.*, Deuxième édition entièrement revue, complétée et actualisée. 11 : 13-29.

O

- Owen G., 1966 .Digestion. In: Wilbur KM, Yonge CM, eds. *Physiology of Mollusca*, Vol 2, New York: Academic Press:53–96.
- OMS., 2014. Organisation Mondiale de la santé, Air pollution estimates.

P

- Pirame S.L., 2003. Ecole nationale vétérinaire- Toulouse : 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.
- Pauget B., Gimbert F., coeur d'assier M., Crini N., Pérès G., Faure O., Douay F., Hitmi A., Beguiristain T., Alaphilippe A., Guernion M., Sabine H., Legras M., Vian J-F., Hedde M., Bispo A., Grand C., Vaufleury A. 2013. Ranking field site management priorities according to their metal transfer to snails. *Ecological Indicators* 29 445–45.
- Pirame, S.S.L., 2003. Contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit-Gris (*Helix aspersa*) : reproduction expérimentale. Thèse de doctorat, spécialité vétérinaire, université Paul-Sabatier de Toulouse, France. P.97.
- Pirame, S.S.L., 2003. Contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit gris (*Helix aspersa*) : Reproduction expérimentale. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. P.99 .

T

- Tsakalacos T. 2003. NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem. (Nanostructures: Synthesis, Functional Properties and Applications). *Publisher Kluwer Academy*, 1128p.
- Tinkle S.S., Antonini J.M., Rich B.A., Roberts J.R., Salmen R., DePree K., Adkins E.J. 2003. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 1202-1208.

V

- Vaufleury et Bispo., 2000. Methods for Toxicity Assessment of Contaminated Soil by Oral or Dermal Uptake in Land Snails. 1. Sublethal Effects on Growth. *Environmental Science and Technology* 34(9). DOI: 10.1021/es9907212.
- Vallardi F., 1971. La grande encyclopédie du monde animal (poissons, invertébrés). Tome III: 455-459 p.

R

- Rivière C., Boudgheune F.P., Gazeau F., Roger J., Pons J.N., Laissy J.P., Deux J.F. 2005. Iron Oxide Nanoparticle-labeled Rat Smooth Muscle Cells: Cardiac MR Imaging for Cell Graft Monitoring and Quantitation 1. *Radiology*. 235(3):959-967.

W

- Wang C.T., Ro S.H. 2006. Surface nature of nanoparticle gold/iron oxide aerogel catalysts. *Journal of Non - Crystalline Solids*. 352(1):35.
- Wang H.H., Kou X.M., Pei Z.G., Xiao J.Q., Shan X.Q., Xing B.S. 2011. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin *Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology*. 5(1):30 - 42.

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.
- Zaldibar, B., Cancio, I., Soto, M., Marigomez, I., 2008. Changes in cell-type composition in digestive gland of slugs and its influence in biomarkers following transplantation between a relatively unpolluted and a chronically metal-polluted site. *Environmental Pollution* (156)367-379.

Sites web :

- <https://cordis.europa.eu/article/id/87332-evaluating-the-health-impact-of-metal-nanoparticles/fr>
- <http://www.ikonet.com/fr/ledictionnairevisuel>
- <http://www.officeil-prevention.com/dossier/protection-collective-organisation-ergonomie/risque-chimique-2/la-prevention-des-risques-chimiques-des-metaux-et-composes-metalliques>