



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعرييرج

Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



## Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie

### Intitulé :

**Impact toxicologique du dioxyde de titane nanométrique  
sur un bioindicateur de pollution : l'escargot *Helix aspersa***

Présenté par :

NEZZARI Malika & REZGUI Nassima

Soutenu le 11 / 06/ 2025, Devant le Jury :

	Nom & Prénom	Grade	Affiliation / institution
Président :	Mme. BOUSSAHEI Soulef	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
Encadrant :	Mme. MOUMENI Ouissem	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj
Examineur :	M. LOUKIL Bachir	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2024/2025



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي بوج بوعزيز

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية  
Département des Sciences Biologiques

## ATTESTATION DE CORRECTION DU MEMOIRE DE MASTER

Nom et prénom de l'étudiant(e) : *Mezzani Malika*

Date et lieu de naissance : *21-05-2002 / Medjana*

Numéro d'inscription : *202033046956*

Spécialité : *Toxicologie*

Intitulé du mémoire :

*Impact toxicologique du dioxyde de titane  
nanométrique sur un bioindicateur de pollution  
l'escargot Helix aspersa.*

Date d'évaluation : \_\_\_\_\_

Nous, membres de jury, après avoir lu le document qui nous a été présenté le \_\_\_\_\_ attestons que l'étudiant(e) a effectué(e) toutes les corrections conformément aux observations lors de l'évaluation du document par les membres de jury.

La présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à BBA, le \_\_\_\_\_

Encadrant  
(Nom, prénom et signature)  
signature)

*Dr. Houmeïd O*

Examineur  
(Nom, prénom et signature)

*LOUKIL B*

Président  
(Nom, prénom et signature)

*BOUSSAHEL*  
*Soulef*



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة محمد البشير الإبراهيمي ب.ب.أ.  
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de  
l'Univers  
قسم العلوم البيولوجية  
Département des Sciences Biologiques

## ATTESTATION DE CORRECTION DU MEMOIRE DE MASTER

Nom et prénom de l'étudiant(e) : Baguin Nassim

Date et lieu de naissance : 01/02/2003 EL KHADDA

Numéro d'inscription : 202033046364

Spécialité : Toxicologie

Intitulé du mémoire :

Impact Toxicologique du dioxyde de titane  
nanométrique sur un Bioindicateur de pollution  
l'exospat Helix aspersa.

Date d'évaluation : \_\_\_\_\_

Nous, membres de jury, après avoir lu le document qui nous a été présenté  
attestons que l'étudiant(e) a effectué(e) toutes les  
corrections conformément aux observations lors de l'évaluation du document par les  
membres de jury.

La présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à BBA, le \_\_\_\_\_

Encadrant  
(Nom, prénom et signature)  
signature)

Dr. Youmei

Examineur  
(Nom, prénom et signature)

LOUKIL B

Président  
(Nom, prénom et  
signature)

BOUSSALEL



## *Remerciements*

{ الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات }

Tout d'abord et avant tout nous remercions « Allah » le très méxicordieux qui nous a donné la santé, la force et l'opportunité de mener à terme ce modeste travail.

Nous souhaitons exprimer notre plus profond respect et notre reconnaissance à notre encadrante Mme MOUMENI Ouissem pour ces efforts, conseils et sa disponibilité tout au long de ses mois de travail et de recherche. -un grand merci-

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, Mme. BOUSSAHEL Soulef et Mr. LOUKIL Bachir pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Nous adressons aussi nos plus sincères remerceiments à l'ensemble des profs de notre département qui ont contribué à notre formation.

Nous exprimons également notre gratitude à toute personne ayant contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail, et surtout à Mme. Nezzari O qui nous a collecté le nombre suffisant d'escargots pour notre expérience.

Merci infiniment.



# *Dédicace*

*A mes parents à qui je dois tout*

*A mes petits frères et sœurs que j'aime tant*

*(Lounes, Thiziri, Syla et Youcef)*

*A ma famille bienveillante*

*A mes amis*

*A mon binôme Nassima*

*Et à tous ceux qui croient en moi*

*Cette réussite est la votre*

*Je vous aime.*

*Malika*



## اهداء

إلى من غرست في نفسي بذور الأمل، وعلمتني الصبر والمثابرة

إلى من كانت سندي ودعمني في كل خطوة، أمي الحبيبة

إلى من آمن بقدراتي وساندني بصمته وتشجيعه، أبي العزيز

ثم إلى نفسي

إلى تلك الروح التي قاومت التعب، وواصلت رغم الصعاب

إلى كل لحظة شك تغلبت عليها، وكل طريق شائك اجتزته بإصرار

إلى عقلي الذي لم يتوقف عن السعي، وقلبي الذي لم يفقد الأمل رغم ضعفه

إلى ذاتي التي آمنت بي حين خفت صوت التشجيع من حولي،

أهدي هذا العمل تقديرًا لما بذلته من جهد، واحتفاءً بما وصلتُ إليه رغم كل شيء.

لا أنسى بالذكر إلى اختي إيناس سندي، كوثر إياد محمود

وإلى حبيبة قلبي توأمي اكرام لبني احلام سلسبيل، من كانوا مصدر قوتي وابتسامتي دوما.

وإلى صديقتي مليكة

إلى خالتي وأولادهن وزوجاتهم كنتم دوما السند الحنون كنتم العوض لي أحبكم

إلى أصدقائي الذين شاركوني لحظات حياتي

وكل من ساهم بكلمة، بدعاء، أو بدعم معنوي،

أهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع، عربون محبة وامتنان.

NASSIMA

## Résumé

Le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) est un composé chimique blanc largement utilisé comme agent blanchissant et opacifiant dans de nombreux produits industriels et de consommation.

La présente étude a pour objectif d'évaluer les effets toxiques potentiels des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) chez *Helix aspersa*, un escargot terrestre largement reconnu comme bioindicateur et bioaccumulateur. Les spécimens ont été exposés par voie topique à des concentrations croissantes de TiO<sub>2</sub> (100, 1000 et 5000 mg/L) pendant une période de 14 jours. À l'issue de l'exposition, diverses matrices biologiques ont été analysées, notamment l'hépatopancréas, le rein, la glande albumen ainsi que l'hémolymphe. Les résultats ont révélé que le TiO<sub>2</sub> induit à un état de stress oxydatif se traduisant par l'activation du système de détoxification, caractérisée par une diminution des niveaux de glutathion réduit (GSH) et des protéines albuminiques (vitellogénine), ainsi qu'une augmentation significative de l'activité de la catalase (CAT).

Ces altérations biochimiques soulignent l'importance des marqueurs de stress oxydatif dans l'évaluation de la toxicité des substances chimiques chez les invertébrés terrestres.

**Mots-clés** : *Helix aspersa*, nanoparticules, TiO<sub>2</sub>, stress oxydatif, bioindicateur, bioaccumulation, GSH, CAT.

## Abstract

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) is a white chemical compound widely used as a whitening and opacifying agent in many industrial and consumer products.

The present study aimed to evaluate the potential toxic effects of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in *Helix aspersa*, a land snail widely recognized as a bioindicator and bioaccumulator. Specimens were topically exposed to increasing concentrations of TiO<sub>2</sub> (100, 1000, and 5000 mg/L) for a period of 14 days. Following exposure, various biological matrices were analyzed, including hepatopancreas, kidney, albumen gland, and hemolymph. The results revealed that TiO<sub>2</sub> induced a state of oxidative stress resulting in the activation of the detoxification system, characterized by a decrease in the levels of reduced glutathione (GSH) and albumin proteins (vitellogenin), as well as a significant increase in catalase (CAT) activity.

These biochemical alterations highlight the importance of oxidative stress markers in assessing the toxicity of chemicals in terrestrial invertebrates.

**Keywords:** *Helix aspersa*, nanoparticles, TiO<sub>2</sub>, oxidative stress, bioindicator, bioaccumulation, GSH, CAT.

## ملخص

ثاني أكسيد التيتانيوم ( $TiO_2$ ) مركب كيميائي أبيض اللون يُستخدم على نطاق واسع كعامل تبييض وتعقيم في العديد من المنتجات الصناعية.

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم الآثار السامة المحتملة لجسيمات ثاني أكسيد التيتانيوم النانوية ( $TiO_2$ ) على الحلزون الأرضي *Helix aspersa*, المعروف على نطاق واسع بكونه مؤشرًا ومُراكمًا حيويًا. تعرّضت العينات موضعياً لتركيزات متزايدة من ثاني أكسيد التيتانيوم ( $TiO_2$ ) (100, 1000, و5000 ملغم/لتر). بعد التعرض، حُللت مصفوفات بيولوجية مختلفة، بما في ذلك الكبد والبنكرياس والكلية و غدة الزلال والدم اللمفاوي. أظهرت النتائج أن ثاني أكسيد التيتانيوم يُحدث حالة من الإجهاد التأكسدي، مما يُنشِط نظام إزالة السموم، ويتميز بانخفاض مستويات الـ GSH والبروتينات الالومينية إلى جانب تكثيف النشاط الأنزيمي CAT.

تُبرز هذه التغييرات الكيميائية الحيوية أهمية مؤشرات الإجهاد التأكسدي في تقييم سمية المواد الكيميائية في اللافقاريات الأرضية.

**الكلمات المفتاحية:** *Helix aspersa*، الجسيمات النانوية،  $TiO_2$ ، الإجهاد التأكسدي، المؤشر الحيوي، التراكم الحيوي، CAT، GSH.

**Remerciements**

**Dédicaces**

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des abréviations**

**Introduction..... 01**

## **Chapitre I: Synthèse bibliographique**

1. Les nanomatériaux et les nanoparticules.....	<b>03</b>
1.1. Définitions, origines et applications.....	<b>03</b>
1.1.1. Définitions.....	<b>03</b>
1.1.2. Origine et applications.....	<b>03</b>
1.2. Classification des nanoparticules.....	<b>05</b>
1.2.1. Selon leur composition chimique.....	<b>05</b>
1.2.2. Selon leur structuration dimensionnelle.....	<b>06</b>
1.3. Nanotoxicologie et éconanotoxicologie.....	<b>06</b>
1.3.1. Devenir des NPs dans l'environnement.....	<b>07</b>
1.3.2. Risques toxicologiques.....	<b>08</b>
2. Les nanoparticules métalliques : cas du TiO <sub>2</sub> .....	<b>10</b>
2.1. Présentation et applications.....	<b>10</b>
2.2. Propriétés physico-chimiques.....	<b>11</b>
2.3. Voies d'exposition et toxicité.....	<b>12</b>
3. <i>Helix aspersa</i> : un modèle bioindicateur.....	<b>14</b>
3.1. Présentation de l'espèce.....	<b>14</b>
3.2. Morphologie et anatomie.....	<b>15</b>
3.2.1. Morphologie.....	<b>15</b>

## Table des matières

3.2.2. Anatomie.....	17
3.3. Biologie.....	20
3.4. Habitat.....	23
3.5. Importance écotoxicologique.....	23
<b>Chapitre II: Matériel et méthodes</b>	
1. Matériels.....	25
1.1. Matériel biologique.....	25
1.2. Matériel chimique.....	25
2. Méthodes.....	26
2.1. Conditions d'élevage.....	26
2.2. Mode de traitement.....	27
2.3. Prélèvement de l'hémolymphe.....	28
2.4. Dissection et prélèvement des organes.....	29
2.5. Paramètres étudiés.....	31
2.5.1. Dosage des biomarqueurs du stress oxydatif.....	31
2.5.1.1. Dosage du GSH.....	31
2.5.1.2. Dosage de l'activité CAT.....	32
2.5.2. Dosage des protéines albuminiques VGA.....	32
3. Analyse statistique.....	33
<b>Chapitre III: Résultats</b>	
1. Effets des NPs de TiO <sub>2</sub> sur les biomarqueurs de stress.....	34
1.1. Effet des NPs de TiO <sub>2</sub> sur le taux de GSH.....	34
1.2. Effet des NPs de TiO <sub>2</sub> sur l'activité de la CAT.....	34
2. Effets des NPs de TiO <sub>2</sub> sur le taux des protéines albuminiques.....	36
<b>Chapitre IV: Discussion</b>	
Discussion.....	37
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>43</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>44</b>

## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Propriétés des trois formes cristallines des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> (Argot <i>et al.</i> , 2013)	12
02	Classification de l'espèce <i>Helix aspersa</i> (Bonnet & Vrillon, 1990)	42

## Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Devenir des nanoparticules dans l'environnement ( <b>Lange et al., 2022</b> )	09
02	Représentation schématique des effets indésirables des nanoparticules ( <b>Yang et al., 2021</b> )	09
03	Toxicité des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO <sub>2</sub> ) chez les invertébrés et les vertébrés ( <b>Hao et al., 2018</b> )	14
04	<i>Helix aspersa</i> dans son habitat naturel (Photo personnelle)	15
05	Les deux paires de tentacules de l'escargot ( <b>photo personnelle</b> )	16
06	Anatomie de l'escargot <i>Helix aspersa</i> ( <b>Quibik, 2007</b> )	18
07	L'orifice respiratoire (pneumostome) d'un escargot ( <b>photo personnelle</b> )	19
08	Escargot en hibernation avec son épiphragme ( <b>Horrenberger, 2021</b> )	22
09	Reproduction de l'escargot <i>Helix aspersa</i> ( <b>Buron-Mousseau, 2014 ; Papilio, 2017</b> )	22
10	Voies et sources d'exposition de l'escargot aux polluants ( <b>Scheifler et al., 2002</b> )	24
11	<i>Helix aspersa</i> ( <b>Photo personnelle</b> )	25
12	Les nanoparticules dioxyde de titane (TiO <sub>2</sub> ) ( <b>Photo personnelle</b> )	25
13	Récolte des escargots sur terrain ( <b>Photos personnelles</b> )	26
14	Lot d'escargots <i>Helix aspersa</i> exposés à une concentration de 1000 mg/L de nanoparticules de TiO <sub>2</sub> ( <b>Photo personnelle</b> )	27
15	Application topique des solutions de nanoparticules de TiO <sub>2</sub> sur les escargots <i>Helix aspersa</i> ( <b>Photo personnelle</b> )	28
16	Fenêtre réalisée sur la partie postérieure gauche de la coquille d'un escargot <i>Helix aspersa</i> ( <b>Letellier, 2010</b> )	29
17	Prélèvement de l'hémolymphe d'un escargot <i>Helix aspersa</i> et transfert dans des tubes Eppendorf ( <b>Photo personnelle</b> )	29
18	Sacrifice des escargots et prélèvement des organes ( <b>Photo personnelle</b> )	30
19	Effet des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> sur le taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas, du rein et du lysat hématocytaire des escargots <i>Helix aspersa</i> (m ± SD ; n = 3)	35

## Liste des figures

<b>20</b>	Variations de l'activité CAT au niveau de l'hépatopancréas, du rein et du lysat hémocytaire chez les escargots <i>Helix aspersa</i> témoins et exposés aux nanoparticules de TiO <sub>2</sub> (m ± SD ; n = 3)	<b>35</b>
<b>21</b>	Effets des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO <sub>2</sub> ) sur le taux des protéines albuminiques chez <i>Helix aspersa</i> (m ± SD ; n = 3)	<b>36</b>

## Listes des abréviations

- ASS** : Acide sulfosalicylique
- ATPase** : Adénosine Triphosphatase
- BBC** : Brillant bleu de coomasie
- BSA** : Bovin SerumAlbumin
- CAT** : Catalase
- CaTiO<sub>3</sub>** : Pérovskite (titanate de calcium)
- CaTiSiO<sub>5</sub>** : Titanosilicate de calcium
- DO** : Densité optique
- DTNB** : Acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)
- EDTA** : Ethylène diamine tétra-acétique
- ETM** : Élément Trace Métallique
- FeTiO<sub>3</sub>** : Ilménite (titanate de fer)
- GSH** : Glutathion réduit
- GSSG** : Glutathion disulfide
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène
- NaCl** : Chlorure de Sodium
- NADPH** : La forme réduite de Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NMDA** : N-méthyl-D-aspartate
- NPs** : Nanoparticules
- OH·** : Radical hydroxyle
- PLGA** : Poly (lactic-co-glycolic acid) — polymère biodégradable
- ROS** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- TFM** : 3-trifluorométhyl-4-nitrophénol
- TiO<sub>2</sub>** : Dioxyde de titane
- TiO<sub>4</sub>** : Orthotitanate (groupe TiO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)
- VTG** : Vitéllogénine
- ZnO** : Oxyde de zinc

# Introduction



L'environnement repose sur un équilibre fragile entre les éléments naturels (air, eau, sol, biodiversité) et les activités humaines. Or, depuis plusieurs décennies, cet équilibre est menacé par une intensification des pressions anthropiques. L'industrialisation, l'urbanisation, l'agriculture intensive et la surexploitation des ressources ont conduit à une dégradation généralisée de l'environnement à l'échelle planétaire. La pollution sous ses différentes formes (atmosphérique, aquatique, sonore, chimique ou encore lumineuse), représente aujourd'hui l'une des menaces majeures pour les écosystèmes terrestres et aquatiques ainsi que pour la santé humaine (UNEP, 2019). Cette omniprésence des polluants entraîne non seulement une perte de la biodiversité, mais perturbe également le fonctionnement naturel des écosystèmes (Diaz et al., 2019).

Dans ce contexte de crise écologique, les pays industrialisés ont vu émerger, à la fin du XXI<sup>e</sup> siècle, un essor considérable des nanosciences et des nanotechnologies, apportant à l'humanité de nombreuses innovations, notamment via l'utilisation croissante des nanoparticules (Matthieu, 2014). Ce domaine scientifique s'intéresse à la manipulation, l'assemblage et l'étude des phénomènes à l'échelle nanométrique, où la matière acquiert des propriétés inattendues, souvent très différentes de celles des mêmes matériaux à l'échelle micro- ou macroscopique. Ces propriétés particulières justifient que les nanoparticules soient considérées comme de nouveaux composés chimiques aux caractéristiques spécifiques (Chuto, 2010).

Parmi les nanomatériaux les plus étudiés figurent les nanoparticules d'or, de silice, d'oxydes métalliques (notamment le TiO<sub>2</sub>) ou encore les semi-conducteurs des cristaux quantiques (Quignard, 2013). Leur petite taille et la diversité de leurs compositions en font des candidats prometteurs pour de nombreuses applications, tels que la médecine, l'électronique ou la cosmétique. Toutefois, l'un des principaux défis liés à leur développement réside dans le contrôle rigoureux de leurs caractéristiques physico-chimiques (forme, taille, composition, surface) afin d'optimiser leurs propriétés selon l'usage visé (Sandrine, 2013).

Cependant, l'essor des nanosciences soulève des préoccupations croissantes quant à leur impact environnemental et sanitaire (Matthieu, 2014). Leur usage intensif risque d'augmenter leur concentration dans les compartiments environnementaux (air, eau, sol), favorisant ainsi leur dispersion dans divers écosystèmes et exposant davantage les organismes vivants à des contaminants de taille nanométrique, présentant un risque non négligeable pour la santé humaine et l'environnement (Delay et Frimmel, 2012). Dès lors, il s'avère essentiel d'avoir

recours à des bioindicateurs pour détecter précocement les déséquilibres écologiques. L'étude des réponses physiologiques, biochimiques ou écologiques de ces organismes permet d'évaluer les effets toxiques d'une exposition aiguë ou chronique à ces substances émergentes (**Kendra et al., 2015**).

Les approches écotoxicologiques actuelles s'intéressent donc de plus en plus aux interactions entre les polluants et une grande diversité d'organismes, dans le but de mieux appréhender leur impact sur les communautés biologiques (**Coeurdassier et al., 2001**). Parmi ces modèles, les invertébrés jouent un rôle clé dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, ce qui en fait des espèces sentinelles pertinentes pour l'évaluation des risques environnementaux (**Ramade, 1992**).

Les gastéropodes terrestres, notamment les escargots, sont largement reconnus comme des bioindicateurs efficaces dans les programmes de biosurveillance des sols. Leur grande sensibilité aux stress chimiques, ainsi que leur capacité à accumuler divers polluants dans leurs tissus, en font des organismes modèles dans les tests d'écotoxicité terrestre (**Coeurdassier et al., 2001**). L'espèce *Helix aspersa*, mollusque gastéropode pulmoné, est particulièrement reconnue pour sa faculté à bioaccumuler des métaux à des concentrations importantes, via son exposition directe aux sols, aux végétaux et à l'air. En outre, en tant que maillon de la chaîne trophique, consommé par divers prédateurs, y compris l'homme, *Helix aspersa* peut contribuer au transfert de ces polluants au sein des écosystèmes (**Grara et al., 2012**).

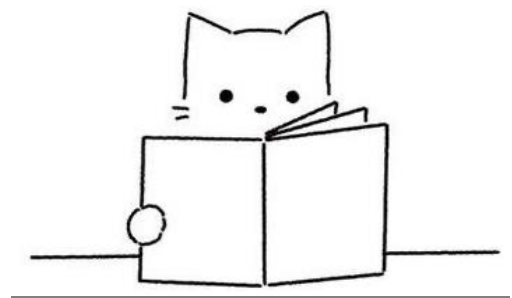
Dans ce contexte, notre travail vise à évaluer les réponses physiologiques de l'escargot terrestre *Helix aspersa* à une exposition par voie topique aux nanoparticules métalliques de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), à travers le suivi de quelques biomarqueurs du stress oxydant.

Ce manuscrit s'articule autour des chapitres suivants :

- Le premier chapitre propose une synthèse bibliographique sur la nanotechnologie, l'impact des nanoparticules sur l'environnement, et l'usage des gastéropodes terrestres, notamment *Helix aspersa*, comme bioindicateurs de la qualité des sols ;
- Le deuxième chapitre décrit le matériel utilisé ainsi que le protocole expérimental et les différentes techniques appliquées ;
- Le troisième chapitre est consacré à l'analyse et à l'interprétation des résultats obtenus ;
- Le quatrième chapitre discute ces résultats à la lumière des études antérieures ;
- Enfin, ce mémoire se conclut par une synthèse générale accompagnée de perspectives pour de futures recherches.

# **Chapitre I**

## **Synthèse bibliographique**



## 1. Les nanomatériaux et les nanoparticules

### 1.1. Définitions, origines et applications

#### 1.1.1. Définitions

Dans le domaine des nanotechnologies, les définitions précises des nanoparticules et des nanomatériaux permettent de distinguer des objets aux dimensions et aux fonctions spécifiques, bien que partageant une échelle de taille similaire (**Sasidharan et Saudagar, 2022**).

Les nanoparticules sont définies comme des entités ultrafines constituées d'assemblages de quelques centaines à quelques milliers d'atomes, dont au moins une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nanomètres. Elles peuvent résulter de l'agglomération d'atomes ou de petites particules (**Djeghboub, 2010**).

Une caractéristique fondamentale des nanoparticules est la prépondérance des atomes situés à la surface par rapport à ceux du cœur de la particule. Cette caractéristique confère à ces matériaux une surface spécifique extrêmement élevée, ce qui amplifie les interactions avec l'environnement, modifiant profondément leurs propriétés thermiques, optiques, mécaniques ou chimiques. En conséquence, leur comportement à l'échelle nanométrique diffère sensiblement de celui des matériaux massifs (**Tian et Zhang, 2022**). Sur le plan morphologique, bien que les nanoparticules soient souvent sphériques, elles peuvent également se présenter sous des formes variées telles que des bâtonnets, des cubes, des prismes ou encore des octaèdres. Ces géométries spécifiques peuvent être modulées et contrôlées en fonction des conditions de synthèse (**Tian et Zhang, 2022**).

Les nanomatériaux quant à eux désignent tout matériau contenant au moins une phase ou une structure nanométrique, c'est-à-dire comprenant des constituants internes ou des surfaces dont les dimensions sont inférieures à 100 nm (**ISO, 2015**). Les nanomatériaux incluent donc les nanoparticules, mais aussi d'autres formes plus complexes comme les structures en couches ou les réseaux ordonnés à l'échelle nanométrique. Leurs propriétés dépendent non seulement de leur composition chimique, mais aussi de leur forme, taille, organisation spatiale, et méthode de synthèse (**Cao, 2004**).

#### 1.1.2. Origine et applications

Les nanoparticules et nanomatériaux trouvent leur origine dans les avancées de la nanotechnologie, un domaine scientifique qui a émergé au tournant des années 1980, à la suite

du développement d'outils capables d'observer et de manipuler la matière à l'échelle nanométrique (un milliardième de mètre). L'introduction du microscope à effet tunnel (STM) en 1981 a marqué un tournant décisif, permettant pour la première fois de visualiser des atomes individuellement. Cette capacité à observer la matière à une échelle si réduite a ouvert la voie à des recherches novatrices, permettant la création de matériaux aux propriétés exceptionnelles (**Adeola et al., 2019**).

Les matériaux nanostructurés peuvent être d'origine naturelle (issue d'incendies de forêts, d'éruptions volcaniques, virus, etc.), ou encore synthétisés intentionnellement en laboratoire à des fins industrielles et technologiques (**Oberdörster et al., 2005**). Grâce à leur surface spécifique élevée, leur réactivité, ou encore leur comportement optique et électrique particulier, les nanoparticules jouent un rôle crucial dans de nombreux secteurs, notamment (**Adeola et al., 2019**).

- **Aéronautique et aérospatiale** : Les nanoparticules sont utilisées pour concevoir des matériaux renforcés et allégés, ainsi que des peintures extérieures offrant des effets de couleur innovants. Ils se distinguent par leur brillance, leur résistance aux rayures, leur propriété anti-corrosion et anti-saleté. On les retrouve également dans les capteurs contribuant à l'amélioration des performances des moteurs, dans les systèmes de détection de givre sur les ailes, ainsi que dans les additifs pour carburants diesel favorisant une meilleure combustion. Par ailleurs, ils permettent la fabrication de pneus plus durables et plus facilement recyclables (**Lanone et Boczkowski, 2010**).

- **Électronique et télécommunications** : Les nanomatériaux sont essentiels au développement de composants tels que les mémoires à haute densité, les microprocesseurs, les cellules solaires, les écrans plats, les ordinateurs à haut débit, les appareils portables et les technologies sans fil de haute définition (**Bouachiba, 2010**).

- **Chimie et science des matériaux** : On les retrouve dans les pigments, les poudres céramiques, les inhibiteurs de corrosion, les catalyseurs, les revêtements autonettoyants, antibactériens ou anti-salissures, ainsi que dans les membranes de filtration pour le traitement de l'eau. Ils jouent également un rôle dans l'isolation thermique et la protection contre la corrosion (**Lanone et Boczkowski, 2010**).

- **Santé, pharmacie et biotechnologie** : Les nanoparticules jouent un rôle central dans le domaine médical. Elles ont permis d'améliorer la qualité des vaccins oraux, des surfaces médicales hypoallergéniques et des agents thérapeutiques pour la régénération osseuse et

tissulaire. Elles sont également utilisées dans des dispositifs d'autodiagnostic, des capteurs multifonctionnels, des tissus et implants biocompatibles, ainsi que dans des outils de diagnostic avancés comme les analyseurs d'ADN ou les machines de dialyse. Par ailleurs, elles ouvrent la voie à des thérapies innovantes, telles que la thérapie génique, la nanochirurgie et la médecine régénérative (**Lanone et Boczkowski, 2010**).

- **Cosmétiques** : Les nanoparticules sont utilisées pour fabriquer des crèmes solaires transparentes, des dentifrices, des produits blanchissants, ainsi que des produits de maquillage qui tiennent plus longtemps, notamment les rouges à lèvres (**Lanone et Boczkowski, 2010**).

- **Environnement et écologie** : Ils contribuent à la réduction des émissions de CO<sub>2</sub>, au dessalement de l'eau de mer, à l'élaboration de pesticides et d'engrais plus écologiques, ainsi qu'au développement de capteurs de toxicité et de techniques de recyclage avancées (**Lanone et Boczkowski, 2010**).

## 1.2. Classification des nanoparticules

### 1.2.1. Classification des nanoparticules selon leur composition chimique

- **Nanoparticules à base de Carbone** : Il s'agit de matériaux composés principalement de carbone, généralement sous forme sphérique ou tubulaire. Parmi les exemples courants, on trouve les fullerènes, les nanotubes de carbone à paroi simple (SWCNT) et à parois multiples (MWCNT) (**EPA, 2007**).

- **Nanoparticules à base de minéraux (ou d'éléments métalliques)** : Ces matériaux contiennent des éléments métalliques tels que l'or, l'argent, le zinc, le titane ou le cérium. Ils peuvent se présenter sous forme de points quantiques, d'oxydes métalliques (ex : dioxyde de titane, oxyde de zinc) ou d'autres structures minérales (**EPA, 2007**).

- **Dendrimères** : Ce sont des polymères ramifiés en couches successives, formant des structures sphériques avec des cavités internes vides. Leur architecture dépend du nombre de générations et de couches unitaires. Chaque branche peut porter des molécules de surface spécifiques, conférant ainsi de nouvelles fonctionnalités aux dendrimères, comme dans le cas des applications biomédicales (par exemple, l'imitation de certaines fonctions des cellules dendritiques) (**EPA, 2007**).

- **Matériaux composites** : Ce groupe comprend des matériaux hybrides, issus de la combinaison de nanoparticules avec d'autres structures à l'échelle nanométrique. Par exemple, la silice mésoporeuse (NP à double porosité), les nanoparticules de gadolinium ou de

manganèse sont utilisées en imagerie par résonance magnétique (IRM). D'autres exemples incluent les nanoparticules de PLGA (poly (dl-lactide-co-glycolide)) conjuguées à des agents thérapeutiques, notamment dans le cadre du traitement du VIH (Afsset, 2010).

### 1.2.2. Classification des nanoparticules selon leur structuration dimensionnelle

- **Matériaux de dimension 0** : Ces matériaux sont confinés dans les trois dimensions de l'espace. Ils se présentent sous forme dispersés, aléatoires ou organisés, comme les points quantiques, les cristaux colloïdaux utilisés en optique, ou encore les ferrofluides (EPA, 2007).
- **Matériaux de première dimension (ou unidimensionnels)** : Ces matériaux sont confinés dans deux dimensions, mais libres dans la troisième. Ils se présentent sous forme de nanofils, de nanorods (nanobâtonnets) ou de nanotubes (EPA, 2007).
- **Matériaux bidimensionnels** : Ils ont une épaisseur nanométrique mais s'étendent sur une large surface. On retrouve ici les films minces, les couches déposées par plasma, ou les structures obtenues par dépôt électrochimique (EPA, 2007).
- **Matériaux tridimensionnels** : Ce sont des structures nanométriques étendues dans les trois dimensions. Ils incluent les matériaux massifs nanostructurés comme certaines céramiques compactées ou les nanostructures métalliques (EPA, 2007).

### 1.3. Nano toxicologie et éconanotoxicologie

**La nanotoxicologie** est une branche de la toxicologie qui analyse les impacts potentiellement nocifs des nanomatériaux sur la santé humaine et l'environnement. Elle s'intéresse aux interactions entre les nanoparticules et les systèmes vivants, soulignant des effets spécifiques liés à leur taille réduite, leur surface étendue et leur réactivité chimique (Fadeel et al., 2017).

**L'éconanotoxicologie**, quant à elle, est une approche intégrée qui combine l'écotoxicologie et la nanotoxicologie afin d'évaluer les effets des nanomatériaux sur les écosystèmes. Elle prend en considération à la fois leur comportement dans l'environnement et leurs impacts sur les organismes à différents niveaux trophiques (Kahru et Dubourguier, 2010).

Bien que la nanotoxicologie ait connu un essor important ces dernières années, la nanoécotoxicologie reste encore peu développée. À ce jour, les données concernant l'impact des nanoparticules manufacturées sur l'environnement et les écosystèmes demeurent limitées, en particulier pour les milieux terrestres et aquatiques (Köhler et Triebkorn, 2021 ;

**Bouariche et al., 2022 ; Fuster, 2022**). De plus, la majorité des études se focalisent sur un nombre restreint de nanomatériaux bien connus, tandis que les effets potentiels à long terme, les interactions complexes au sein des réseaux trophiques et la biodisponibilité environnementale des NPs restent largement méconnus (**Gambardella et Pinsino, 2022**).

### 1.3.1. Devenir des nanoparticules dans l'environnement et impact sur les écosystèmes terrestres

L'évaluation de l'impact environnemental des nanoparticules (NPs) commence par la quantification de leur émission dans les compartiments air, eau et sol, ainsi que par l'identification de leurs zones d'accumulation préférentielles. Les modes d'entrée dans l'environnement sont multiples :

- La pollution atmosphérique résulte souvent de la combustion industrielle et des activités urbaines, dispersant des NPs sous forme de poussières fines pouvant s'agglomérer ou se disperser en fonction des conditions climatiques (**Keller et al., 2013 a,b**).
- Les pratiques agricoles contribuent à la contamination des sols par l'application de pesticides nanostructurés ou via la lixiviation des engrais (**Liu et al., 2018**).

Une fois libérées, les nanoparticules subissent des transformations physico-chimiques, telles que l'agrégation, la dissolution partielle ou la modification de leur surface, qui influencent leur mobilité et leur biodisponibilité dans les différents milieux (**Figure 1**) (**Gottschalk et al., 2013**).

La biodiversité terrestre est affectée à plusieurs niveaux. Les microorganismes du sol, indispensables à la fertilité et aux cycles biogéochimiques, sont particulièrement sensibles à l'exposition aux NPs, qui peuvent altérer leur diversité et leurs fonctions métaboliques (**Ge et al., 2018**). Les invertébrés, tels que les vers de terre, jouent un rôle clé dans la décomposition de la matière organique ; leur exposition aux nanoparticules peut entraîner une réduction de leur activité et de leur survie (**Van der Ploeg et al., 2020 a,b**). Par ailleurs, les plantes absorbent les nanoparticules via leurs racines, ce qui peut perturber leur croissance, leur photosynthèse et leur nutrition (**Ma et al., 2010**). Ces perturbations biologiques sont parfois liées à des mécanismes de stress oxydatif, déclenchés par l'interaction des nanoparticules avec les cellules des organismes (**Zhang et al., 2009**).

D'un point de vue quantitatif, les concentrations environnementales de NPs varient selon les milieux et les zones géographiques. Par exemple, dans certains sols agricoles, des teneurs en nanoparticules de TiO<sub>2</sub> peuvent atteindre plusieurs centaines de mg/kg (**Gottschalk**

et *al.*, 2015). Concernant la persistance, certains nanomatériaux, comme la silice, peuvent demeurer dans le sol sur des périodes allant de plusieurs décennies à plusieurs millénaires, conservant une forte toxicité sur le long terme (Yang et *al.*, 2005).

### 1.3.2. Les risques toxicologiques des nanoparticules

Les nanoparticules (NPs), du fait de leurs dimensions extrêmement réduites (<100 nm), présentent des risques toxicologiques uniques et complexes, principalement liés à leur capacité à traverser les barrières biologiques. Une fois inhalées, ingérées ou appliquées sur la peau (**Figure 2a**), elles peuvent franchir les épithéliums et atteindre la circulation systémique, puis se distribuer dans divers organes, y compris les poumons, le foie, les reins, le système nerveux central, et même le fœtus via le placenta (**Figure 2b**) (Oberdörster et *al.*, 2005).

À l'échelle cellulaire, la réactivité de surface des nanoparticules, souvent accrue par la présence de métaux ou d'oxydes métalliques, peut induire la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), notamment par des réactions catalytiques se déroulant à leur surface (**Figure 2c, ei, eii**) (Zhang et *al.*, 2009). Ces ROS endommagent les membranes cellulaires, les protéines et le matériel génétique, déclenchant des réponses de stress oxydatif (**Figure 2d**), d'inflammation chronique (**Figure 2g**), voire de mort cellulaire programmée (**Figure 2f**). Leur accumulation peut ainsi provoquer des altérations fonctionnelles durables, perturbant le développement biologique, les fonctions immunitaires, ainsi que divers processus métaboliques chez les organismes exposés (**Figure 2eiii**) (Ge et *al.*, 2018 ; Schroeder et *al.*, 2009). Ces mécanismes sont à l'origine de nombreuses pathologies, notamment des troubles neurodégénératifs, cardiovasculaires, des fibroses pulmonaires, ou encore certains cancers (**Figure 2g**) (Nel et *al.*, 2006 ; Ahamed et *al.*, 2010).

Certains types de NPs, comme les oxydes de titane (TiO<sub>2</sub>) et de zinc (ZnO), sont particulièrement étudiés pour leurs effets génotoxiques. Chez la souris, des tests *in vivo* ont révélé des cassures de l'ADN, des aberrations chromosomiques et des altérations du cycle cellulaire après application topique ou inhalation prolongée (Ma et *al.*, 2003 ; Larese Filon et *al.*, 2009). Ces effets peuvent être exacerbés lorsque les nanoparticules transportent d'autres substances toxiques. Ce phénomène, appelé « effet cheval de Troie », augmente les dommages causés à l'organisme (Nel et *al.*, 2006).

En outre, certaines études montrent une accumulation progressive de NPs dans le cerveau, pouvant induire des désordres neurocomportementaux ou endocriniens à long terme.

Chez les rongeurs exposés chroniquement, on observe des troubles cognitifs et une perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, suggérant une atteinte durable des systèmes de régulation hormonale (Yokel et MacPhail, 2009).

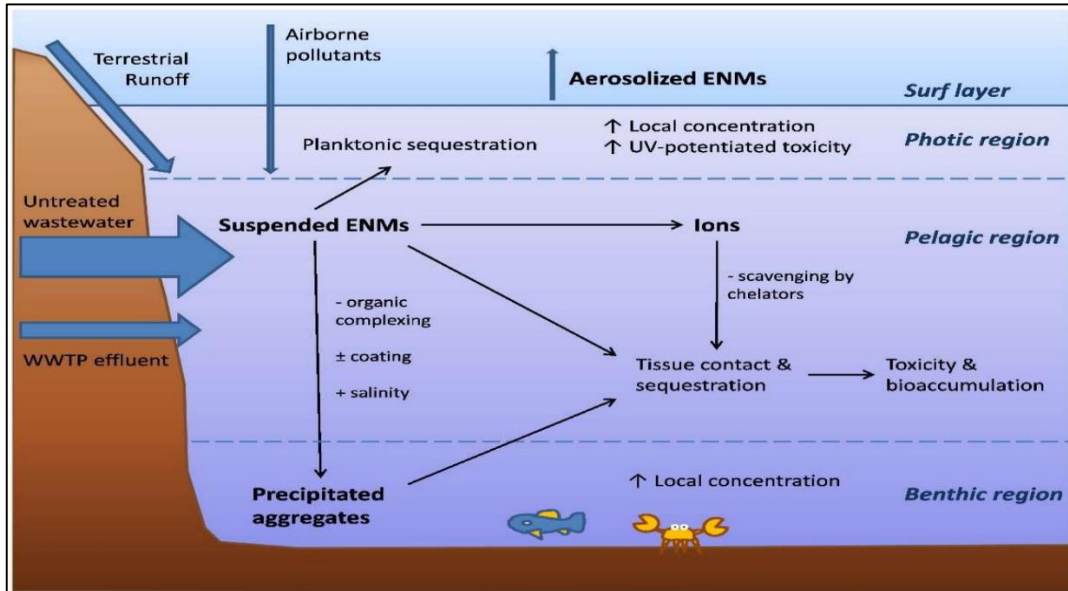


Figure 1 : Devenir des nanoparticules dans l'environnement (Lange et al., 2022).

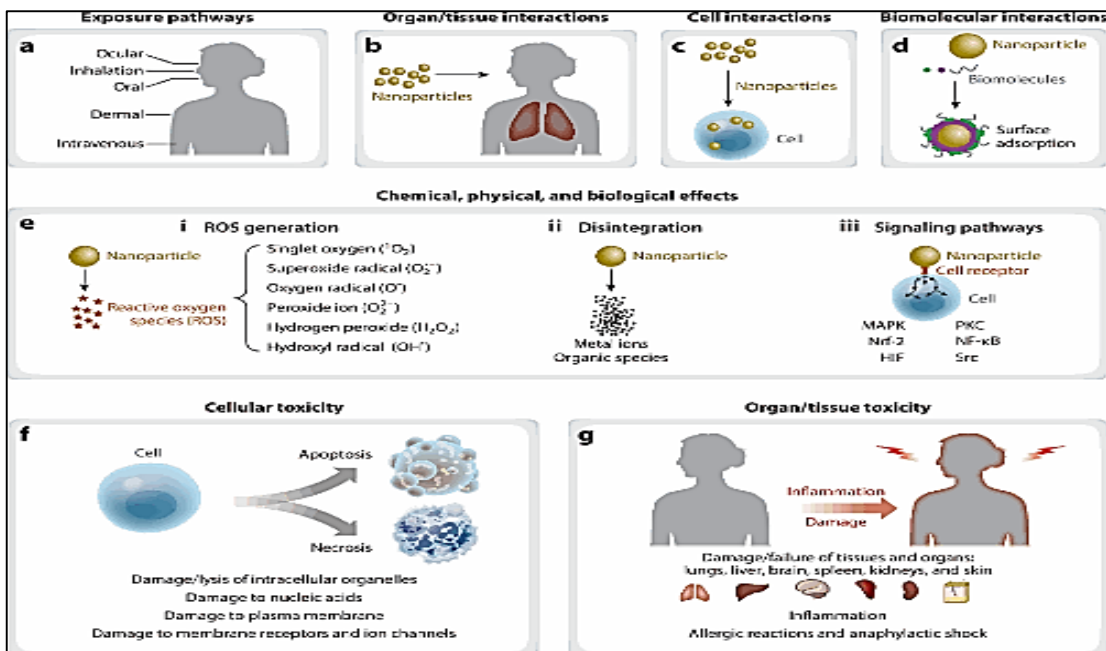


Figure 2 : Représentation schématique des effets indésirables des nanoparticules et de leur toxicité. (a) Voies d'exposition aux nanoparticules. Après exposition, les nanoparticules peuvent interagir avec : (b) les organes/tissus, (c) les cellules, et (d) les biomolécules. Les principaux mécanismes de toxicité des nanoparticules incluent : (e, i) la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), (e, ii) la désintégration des nanoparticules et la libération

d'ions métalliques ou de composés organiques, **(e, iii)** l'activation de voies de signalisation cellulaire médiée par les nanoparticules. Les effets indésirables et la toxicité des nanoparticules peuvent entraîner : **(f)** l'apoptose (mort cellulaire programmée) et la nécrose des cellules, **(g)** des lésions des tissus et organes, de l'inflammation, et même un choc anaphylactique **(Yang et al., 2021)**.

## 2. Les nanoparticules métalliques : Cas du dioxyde de titane

Les nanoparticules métalliques, notamment celles d'or, d'argent et de cuivre, suscitent un intérêt croissant en raison de leurs nombreuses applications dans des domaines variés tels que l'électronique, l'optique, l'environnement, la médecine ou encore la biotechnologie. Ces particules souvent obtenues par des méthodes physiques ou par réduction, notamment photochimique ou électrochimique, présentent des propriétés uniques dues à leur petite taille et leur grande surface spécifique. Cela leur confère une réactivité chimique et des comportements physiques inhabituels. Ces caractéristiques illustrent l'intérêt grandissant pour les nanoparticules métalliques, dont les applications ne cessent de se multiplier **(Yan et al., 2017)**.

### 1.1. Présentation et applications du dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>)

Le titane est le neuvième élément le plus abondant dans la croûte terrestre, après l'hydrogène et le magnésium. On le trouve principalement sous sa forme oxydée dans des minerais mixtes tels que l'ilménite (FeTiO<sub>3</sub>), la pérovskite (CaTiO<sub>3</sub>) ou la titanite (CaTiSiO<sub>5</sub>) **(Sugimoto et al., 2003)**. Le TiO<sub>2</sub> peut également être extrait de divers minerais en traitant l'acide sulfurique pour produire du sulfate de titanyle (TiO<sub>4</sub>), qui est ensuite hydrolysé et séché pour obtenir du TiO<sub>2</sub> **(Sugimoto et al., 2003)**. Depuis les années 1920, le dioxyde de titane est utilisé sous forme de poudre micrométrique pour ses propriétés opaques et blanchissantes. Il représente environ 70 % de la production mondiale de colorants, surpassant le noir de carbone et l'oxyde de fer. Dans les années 1990, le TiO<sub>2</sub> sous forme de nanopoudre a gagné en popularité, notamment pour ses fortes capacités d'absorption des UV, ce qui a conduit à son utilisation dans des produits comme les écrans solaires **(Jargot et al., 2013)**.

Le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) est un matériau aux propriétés optiques, chimiques et électroniques remarquables, ce qui le rend utile dans de nombreux domaines technologiques et industriels. Il est particulièrement apprécié pour sa stabilité et sa disponibilité **(Chen et Mao, 2007)**.

Il est largement utilisé comme photocatalyseur, notamment pour la dégradation de polluants organiques sous rayonnement ultraviolet. Cette propriété permet son utilisation dans la purification de l'air, de l'eau et des surfaces. Depuis 1972, il est également étudié pour la

photolyse de l'eau, visant la production d'hydrogène à partir de l'énergie solaire. Ses propriétés photocatalytiques sont également exploitées en médecine, en particulier dans le cadre de thérapies photodynamiques utilisant des agents photosensibles (**Fujishima et Honda, 1972**).

Dans le secteur de l'électronique, le  $\text{TiO}_2$  est présent dans les transistors à effet de champ, les diodes Schottky, les mémoires à accès aléatoire, les capteurs médicaux et divers dispositifs à couches minces, où il joue le rôle d'isolant ou de semi-conducteur (**Chen et Mao, 2007**). Ses films minces sont utilisés dans les dispositifs optiques pour leur capacité à moduler l'indice de réfraction, amplifier des signaux ou servir de revêtements antireflets, notamment dans les panneaux solaires et l'optique intégrée (**Diebold, 2003**).

Le  $\text{TiO}_2$  est aussi étudié pour le stockage de l'hydrogène et comme composant dans les systèmes multi magnétiques (**Zlaa et al., 2014**). Dans les domaines industriel et biomédical, il sert de pigment blanc dans les peintures et céramiques, d'additif dans les produits pharmaceutiques, et comme revêtement biocompatible, notamment dans les implants médicaux et les valves cardiaques artificielles (**Weir et Westerhoff, 2012**).

## 1.2. Propriétés physico-chimiques

Le dioxyde de titane pur, identifié par le numéro CAS 13463-67-7, se présente comme un solide blanc, thermiquement stable et réfractaire, d'un poids moléculaire de 79,9 g/mol. Il est généralement commercialisé sous forme de poudre sèche ou d'émulsion liquide. Ce composé est inodore et insoluble dans l'eau, l'éthanol ainsi que dans la majorité des solvants organiques. Le dioxyde de titane existe sous trois formes cristallines différentes : l'anatase et le rutile, toutes deux appartenant au système cristallin tétragonal, et la brookite, rattachée au système cristallin orthorhombique comme indiqué dans le **tableau I**. Le rutile est la forme la plus dense et la plus stable sur le plan thermodynamique, tandis que l'anatase est la plus réactive (**Argot et al., 2013**).

Une propriété notable du dioxyde de titane est sa capacité à absorber les rayonnements ultraviolets, une caractéristique qui dépend de la taille des particules ainsi que de leur niveau d'agglomération (**Argot et al., 2013**).

Afin d'optimiser les propriétés physico-chimiques des nanoparticules de dioxyde de titane, des traitements de surface sont couramment mis en œuvre. Ceux-ci consistent notamment en un enrobage par des oxydes inertes tels que l'oxyde de silicium, l'oxyde d'aluminium ou encore l'oxyde de zirconium. Des traitements organiques, impliquant des composés comme le

triméthylolpropane, le néopentyl glycol, l'acide stéarique, la diméthicone ou différents types de silicones, sont également utilisés. L'objectif de ces modifications est d'améliorer la dispersibilité des nanoparticules dans les formulations tout en limitant leur photo-activité (Argot *et al.*, 2013).

**Tableau I** : Propriétés des trois formes cristallines des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (Argot *et al.*, 2013).

Nom de la Forme Cristalline	Propriétés	
<b>Rutile</b>	N° CAS	1317-80-2
	Etat physique	Solide
	Masse molaire	79,9
	Point de fusion	1830 – 1 855 °C (avec décomposition à 1 860°C)
	Point d'ébullition	à partir de 2500 °C
	Densité	4,13-4,25
<b>Anatase</b>	N° CAS	1317-70-0
	Etat physique	Solide
	Masse molaire	79,9
	Point de fusion	se transforme en rutile à partir de 915° C
	Point d'ébullition	à partir 2500 °C
	Densité	3,8-3,9
<b>Brookite</b>	N° CAS	12188-41-9
	Etat physique	Solide
	Masse molaire	79,9
	Point de fusion	se transforme en rutile à partir de 750° C
	Point d'ébullition	à partir 2500 °C
	Densité	4,13

### 1.3. Voies d'exposition et mécanismes de toxicité

Les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) pénètrent dans l'organisme humain principalement par trois voies : respiratoire, digestive et cutanée. L'inhalation reste la plus significative, notamment en milieu professionnel, avec un dépôt préférentiel dans la région alvéolaire des poumons (Angeletti, 2008 ; Witschger et Fabries, 2005). Elles peuvent aussi

être ingérées, directement ou indirectement, ou franchir la barrière cutanée en cas d'exposition prolongée (Yang *et al.*, 2008 ; Cross *et al.*, 2007). Après absorption, ces nanoparticules peuvent traverser plusieurs barrières biologiques (intestinale, hémato-encéphalique, placentaire), ce qui soulève des inquiétudes quant à leur bioaccumulation et leurs effets systémiques (Zhou *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2022).

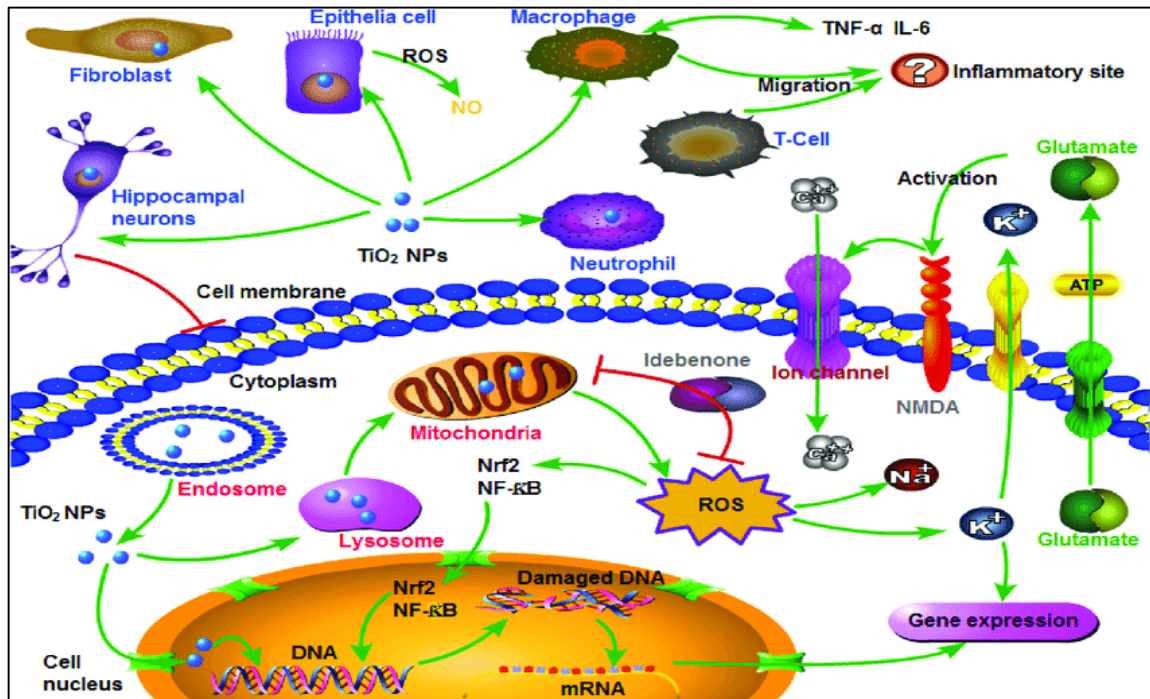
Sur le plan toxicologique, les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> favorisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), en particulier sous irradiation UV, générant un stress oxydatif majeur qui endommage les lipides, les protéines et l'ADN (Shi *et al.*, 2013 ; Kohen et Nyska, 2002). Ce stress oxydatif entraîne notamment la peroxydation des lipides, perturbant la perméabilité membranaire et les fonctions cellulaires vitales (Rikans et Hornbrook, 1997). L'oxydation de l'ADN par les ROS, dont les radicaux hydroxyles (OH<sup>•</sup>), contribue à la génotoxicité, provoquant des cassures de l'ADN, des mutations et des anomalies chromosomiques (Figure 3) (Reeves *et al.*, 2008).

Le stress oxydatif induit par les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> perturbe aussi l'homéostasie cellulaire, notamment en déséquilibrant les niveaux de glutathion hépatique et en augmentant l'excitotoxicité neuronale via une libération excessive de glutamate et une suractivation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ces phénomènes provoquent une entrée massive de calcium dans les neurones, conduisant à un dysfonctionnement cellulaire et contribuant à des maladies neurodégénératives (Hong *et al.*, 2015). Par ailleurs, des altérations enzymatiques (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) et des déséquilibres ioniques affectent la survie, la croissance et la physiologie cellulaire (Figure 3) (Chen *et al.*, 2011).

L'accumulation excessive de ROS peut induire l'apoptose, un processus de mort cellulaire programmée, via deux voies majeures : mitochondriale (endogène) et médiée par des récepteurs de mort (exogène) (Azim *et al.*, 2015). Des études ont démontré que l'exposition aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> provoque l'apoptose dans différentes cellules, y compris les microglies cérébrales et les neurones de l'hippocampe chez la souris, ainsi que des pathologies cellulaires sévères dans le foie de poissons (Long *et al.*, 2006 ; Hao *et al.*, 2009). L'apoptose est souvent précédée par des perturbations ioniques intracellulaires, notamment une accumulation de Na<sup>+</sup> et une diminution de K<sup>+</sup> dans le cytoplasme, contribuant à la toxicité neuronale (Figure 3) (Zhao *et al.*, 2009).

Ainsi, le stress oxydatif et l'apoptose induits par les ROS sont des mécanismes clés dans la toxicité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, responsables d'atteintes cellulaires et organiques

multiples, notamment dans les poumons, le foie, le système nerveux central, et potentiellement d'autres organes cibles, ce qui suscite des préoccupations majeures quant à leur impact sanitaire à long terme (Zhou et al., 2019).



**Figure 3 :** Toxicité des nanoparticules de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) chez les invertébrés et les vertébrés (Hao et al., 2018).

### 3. L'escargot *Helix aspersa* : un modèle bio-indicateur de la pollution des sols

#### 3.1. Présentation de l'espèce *Helix aspersa*

L'espèce *Helix aspersa* (O.F. Müller, 1774), désormais nommée *Cornu aspersum* selon la classification moderne, est plus communément appelée escargot petit-gris ou escargot gris (Figure 4). Il s'agit d'un mollusque gastéropode terrestre, pulmoné, caractérisé par un corps mou dépourvu de squelette interne. Originnaire des régions méditerranéennes, cette espèce ubiquiste, qui s'adapte à des milieux, des sols et des climats variés (Benguedouar, 2016), est largement répandue dans le nord-est de l'Algérie (Barker, 2001).

*Helix aspersa* comprend plusieurs sous-espèces, parmi lesquelles les plus connues sont *Helix aspersa aspersa*, *Helix aspersa elata* et *Helix aspersa maxima*. Ces sous-espèces présentent un polymorphisme important, qui se manifeste par des variations de taille, de couleur, de forme, d'épaisseur, et même de sculpture de la coquille (Bonnet et al., 1990).



**Figure 4 :** *Helix aspersa* dans son habitat naturel (Photo personnelle).

### 3.2. Morphologie et anatomie

#### 3.2.1. Description morphologique

L'escargot *Helix aspersa* est un mollusque mesurant entre 2,8 et 3,5 cm de diamètre pour un poids adulte variant de 7 à 15 g. Sa coquille calcaire est de teinte gris jaunâtre, généralement ornée de motifs bruns rayés de noir. La spirale de la coquille s'enroule typiquement dans le sens des aiguilles d'une montre (Chase, 1986).

Ce mollusque possède un corps mou et visqueux, recouvert de mucus, et composé de trois parties principales : la tête, le pied et la masse viscérale (Bonnet et al., 1990).

- **La tête** comporte deux paires de tentacules :

- Les tentacules supérieurs sont oculaires, dirigés vers le haut, et portent un œil simple ainsi qu'un organe olfactif (Bonne et al., 1990).
- Les tentacules inférieurs, orientés vers le bas, sont tactiles (Figure 5).

La tête porte également la bouche, qui s'ouvre vers le bas (Bonnet et al., 1990).

- **Le pied** est l'organe de locomotion, large, plat et musculeux. Sa face inférieure, appelée sole pédieuse, est en contact direct avec le sol. Lors du déplacement, elle laisse une traînée de mucus

produite par des glandes mucipares. Le pied contient également une partie du tube digestif antérieur et du système nerveux (kerney *et al.*, 2006).



**Figure 5** : Les deux paires de tentacules de l'escargot (photo personnelle).

- **La masse viscérale** comprend la majorité des organes internes : les poumons, le cœur, la glande digestive, les organes reproducteurs, etc. Elle est fortement vascularisée et protégée par la coquille, étant recouverte d'un repli tégumentaire appelé manteau (chevalier, 1977 ; Bonnet, 1990).

- **La coquille** est une enveloppe calcaire spiralée constituée de trois couches successives. Elle joue un rôle de protection des organes internes et permet à l'escargot de s'y rétracter en cas de danger. Elle est sécrétée par le manteau, un repli épais de la peau, qui est relié à la columelle par un muscle puissant (Gireuad, 2008). La contraction de ce muscle permet à l'escargot de rentrer dans sa coquille (Quibik, 2007).

- **Les orifices externes** : *Helix aspersa* possède trois orifices impairs bien visibles :

- L'orifice génital, situé derrière le tentacule oculaire droit ;
- L'orifice respiratoire, situé sur le côté droit du bourrelet palléal (zone de jonction entre le pied et la coquille), s'ouvre et se ferme de manière rythmique ;
- L'anus, situé à proximité de l'orifice respiratoire, se manifeste par un petit cordon d'excréments verdâtres ;

- L'orifice urinaire, très petit et difficilement visible, est également situé près de l'anus (**Vallardi, 1971**).

### 3.2.2. Description anatomique

#### 3.2.2.1. Appareil digestif

En raison de la torsion de 180° subie au cours du développement embryonnaire, le tube digestif de l'escargot présente une configuration en boucle qui ramène l'anus vers l'avant du corps. L'appareil digestif débute par la bouche, qui s'ouvre sur un bulbe buccal. À l'intérieur de celui-ci se trouve une langue musculaire appelée radula, recouverte de dents chitineuses formant une lame cornée. La radula joue un rôle essentiel dans le broyage mécanique des aliments. À l'arrière du bulbe buccal se situent deux glandes salivaires (**Figure 6**), responsables de la sécrétion d'enzymes facilitant la digestion. Le bulbe buccal se prolonge ensuite par un œsophage, qui mène à un estomac renflé. Celui-ci est suivi par un intestin long et sinueux, prolongé par un intestin formant une double circonvolution autour d'hépatopancréas (organe assurant les fonctions digestives et métaboliques) et aboutissant à l'anus (**Charrier et Brune, 2003**).

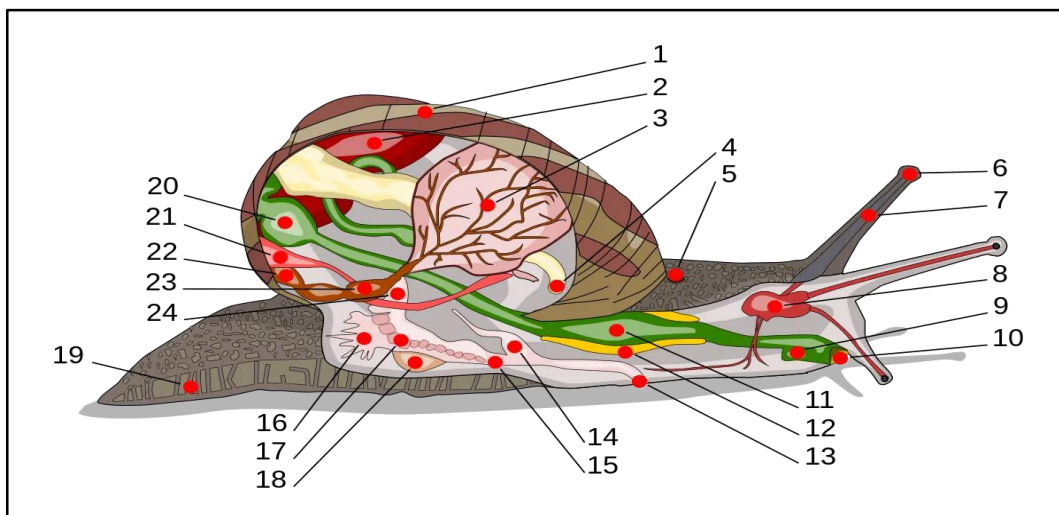
#### 3.2.2.2. Système nerveux

Le système nerveux central d'*Helix aspersa* est situé dans la région céphalique. Il est constitué d'une chaîne de ganglions cérébroïdes, regroupés autour de l'œsophage, formant un collier périœsophagien double et complexe (**Fernández, 1972**).

Ce système comprend :

- Une paire de ganglions cérébroïdes (situés au-dessus de l'œsophage) ;
- Une paire de ganglions pédieux (reliés au pied et responsables de la locomotion) ;
- Une paire de ganglions viscéraux (contrôlant les organes internes) ;
- Une paire de ganglions buccaux, situés sous le bulbe buccal, connectés par des connectifs nerveux aux autres ganglions (**Fernández, 1972**).

Les ganglions buccaux innervent principalement les structures du système digestif antérieur. L'ensemble du système nerveux est parcouru par des commissures et connectifs qui assurent la coordination entre les différentes régions du corps (**Fernández, 1972**).



**Figure 6** : Anatomie de l'escargot *Helix aspersa* (Quibik, 2007). **1**: Coquille. **2**: Hépatopancréas. **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.

### 3.2.2.3. Appareil reproducteur

L'escargot *Helix aspersa* est un animal hermaphrodite. Cette particularité rend son appareil reproducteur particulièrement complexe, avec des structures communes aux deux sexes et d'autres spécifiques à chaque fonction. L'appareil reproducteur comprend (Bonnet et al., 1990) :

- **Un ovotestis** : organe unique produisant à la fois les ovules et les spermatozoïdes. Il est situé à l'extrémité postérieure de l'hépatopancréas.
- **Un canal hermaphrodite** : qui permet l'évacuation des deux types de gamètes.
- **Une glande de l'albumine** : qui sécrète les substances nutritives (réserves vitellines) nécessaires au développement des œufs.
- **Un ovospermiducte** : canal mixte qui transporte les gamètes vers les voies différenciées.

À partir de ce canal, l'appareil se divise en deux voies distinctes (Figure 6) (Bonnet et al., 1990) :

- La voie mâle comprend :
  - le spermiducte, où les spermatozoïdes s'accumulent et forment un spermatophore (capsule contenant les spermatozoïdes),
  - un organe copulateur, le pénis.
- La voie femelle comprend :

- la poche du dard (ou glande du dard), qui sécrète un dard calcaire utilisé lors de la phase pré-copulatoire,
- le vagin,
- l'orifice génital, situé à l'avant droit du corps, à proximité du tentacule oculaire.
- Un ovotestis, où se forment les ovules et les spermatozoïdes située à l'extrémité postérieure de l'hépatopancréas.

#### 3.2.2.4. Appareil circulatoire

Chez *Helix aspersa*, l'appareil circulatoire est de type ouvert, caractérisé par la circulation de l'hémolymphe riche en hémocyanine, un pigment respiratoire incolore sous sa forme désoxydée et bleu sous sa forme oxydée. Le cœur, composé d'un ventricule postérieur et d'une oreillette antérieure, assure la propulsion de l'hémolymphe vers l'ensemble des organes par deux aortes principales (**Figure 6**). Ce système permet les échanges gazeux et nutritifs à travers des sinus, avant le retour de l'hémolymphe au cœur (**Fretter & Peake, 1971**).

#### 3.2.2.5. Appareil respiratoire

La respiration s'effectue par un poumon formé d'une poche vascularisée issue de l'épithélium palléal. Ce poumon est situé dans la cavité palléale, entre la masse viscérale et le manteau, qui tapisse l'intérieur de la coquille. Il est irrigué par un réseau de vaisseaux pulmonaires permettant les échanges gazeux entre l'air et l'hémolymphe. Le poumon communique avec l'extérieur par un orifice respiratoire appelé pneumostome, situé sur le côté droit du corps (**Figure 7**). Celui-ci s'ouvre et se ferme de manière rythmée, permettant l'entrée et la sortie de l'air dans la cavité palléale (**Bonnet et al., 1990**).



**Figure 7** : L'orifice respiratoire (pneumostome) d'un escargot (**photo personnelle**).

### 3.3. Biologie d'*Helix aspersa*

#### 3.3.1. Rythme d'activité

L'activité des escargots gris (*Helix aspersa*), essentiellement nocturne, est synchronisée avec la photopériode naturelle. Elle débute généralement au coucher du soleil et peut se prolonger pendant environ six heures. Cette activité est fortement influencée par trois facteurs principaux : l'humidité ambiante, la température et l'intensité lumineuse. Les escargots deviennent actifs lorsque l'humidité relative de l'air dépasse 80 % et que la température nocturne ne descend pas en dessous de 9 °C (**Chevallier, 1982**).

L'escargot possède deux rythmes d'activité, journalier et saisonnier.

- ✓ **L'activité journalière** : est en relation étroite avec la photopériode. Elle peut être inhibée par les conditions thermiques et hygrométriques défavorables. Dans les conditions optimales, l'escargot sort de sa coquille et devient actif dès la tombée de la nuit jusqu'au lever du jour, il en profite pour se nourrir. La phase d'inactivité est relative à une durée inférieure à 18 heures : durant cette phase, l'escargot est au repos et ne manifeste que peu d'activité locomotrice, sexuelle ou nutritionnelle (**Pirame et al., 2003 ; Laraba, 2014**).
- ✓ **L'activité saisonnière** : est relative au fait que les escargots harmonisent leurs rythmes biologiques en fonction du rythme des saisons. Ils régulent leurs activités en se basant sur les éléments de l'environnement, en l'occurrence la longueur du jour (**Pirame et al., 2003**).

#### 3.3.2. Déplacement

L'escargot se déplace par reptation, en avançant uniquement vers l'avant grâce aux contractions et extensions alternées de son pied musculeux (**Beeby et Richmond, 2011**). La vitesse moyenne de déplacement d'un escargot adulte est d'environ 1 mm/s, ce qui correspond à 3,6 mètres par heure (**Baurand, 2014**).

Le mucus (la bave), contenant de nombreux composés (allantoïne, collagène, élastine), lui permet à la fois d'avancer plus facilement en glissant sur les obstacles et de se fixer même verticalement sur certaines parois. Il lui permet aussi à se débarrasser de certaines substances, comme les métaux lourds, et entre aussi dans la composition de la coquille. Le mucus est épais, il durcit et sèche au contact de l'air en laissant une traînée brillante à la lumière. Les escargots produisent des mucus externes ayant des fonctions de protection, de déplacement, et même de communication (**Ward, 2006**).

### 3.3.3. Alimentation

Selon **Iglesias et Castillejo (1998)**, le petit gris s'alimente la nuit et se nourrit tout particulièrement de feuilles de la grande ortie. *Helix aspersa* est phytophage (phyllophage et succivore), carpophage (ou frugivore), détritivore et parfois cannibale. Il peut s'attaquer aux plantes cultivées des jardins, causant parfois de gros dégâts aux récoltes. Il héberge dans son intestin une flore bactérienne qui participe à la digestion. Les bactéries se maintiennent en vie durant l'estivation ou l'hibernation, en se nourrissant du mucus qui est sécrété par l'épithélium intestinal (**Charrier et al., 2006**). L'alimentation de l'escargot repose sur l'action de la radula, une langue dentée composée de 1500 à 2500 dents, qui râpe les aliments contre une arête dure située au-dessus de la bouche (**Beazley, 2000**).

### 3.3.4. Hibernation et estivation

La photopériode est le principal facteur déclenchant l'activité ou l'inactivité des escargots, en fonction de la durée d'éclairement quotidien, qu'elle soit longue (plus de 15 heures de lumière) ou courte. La compréhension de ce phénomène est essentielle pour une exploitation rationnelle de l'animal. En modulant la durée d'éclairement, il est ainsi possible de stimuler la croissance et la reproduction, ou au contraire, de provoquer l'entrée en hibernation ou en estivation. Dans ces deux états, l'escargot se rétracte dans sa coquille qu'il obture à l'aide d'un voile muqueux appelé épiphragme (**Figure 8**). Ce dernier forme un bouchon de mucus, parfois chargé de calcaire, qui se solidifie en séchant. L'hibernation et l'estivation sont donc des réponses adaptatives à des stress environnementaux prévisibles (**Le Guhenec et al., 1985**).



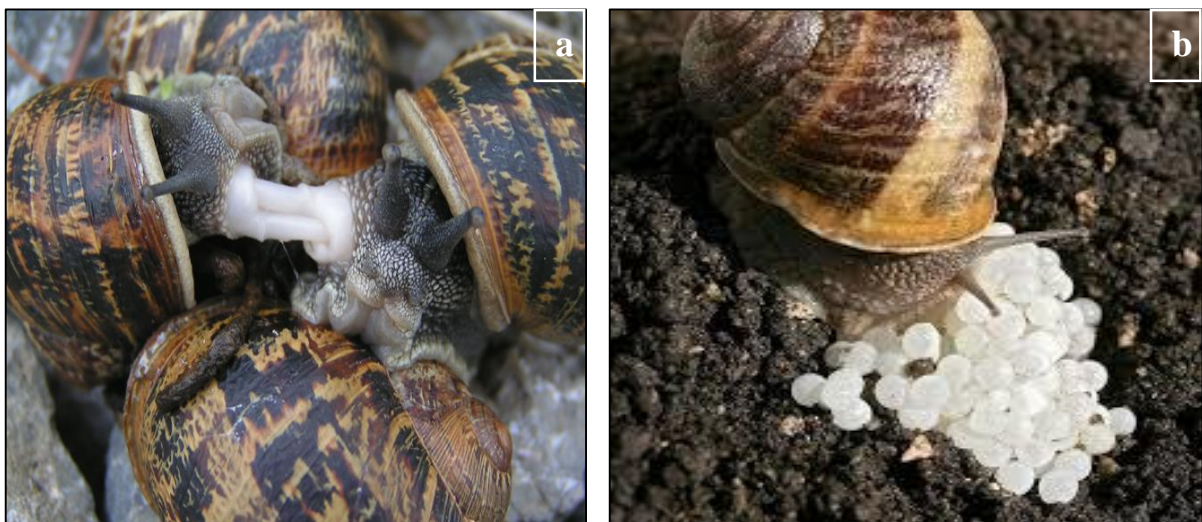
**Figure 8** : Escargot en hibernation avec son épiphragme (**Horrenberger, 2021**).

### 3.3.5. Reproduction et accouplement

Le printemps représente la pleine saison de la reproduction chez les escargots, le climat et la température ont une grande influence sur l'âge de leur maturité sexuelle.

*Helix aspersa* est un animal hermaphrodite : il possède à la fois des organes reproducteurs mâles et femelles (**Zaafour, 2014**), l'accouplement est cependant nécessaire pour la fécondation (**Bertrand et Renaud, 2004**). Il s'agit d'une fécondation réciproque impliquant un échange de spermatophores entre les deux partenaires. Cette règle n'est toutefois pas absolue, certains individus se comportent exclusivement comme mâle ou comme femelle.

Un escargot peut s'accoupler avec plusieurs partenaires. Une fois la fécondation effectuée, la glande hermaphrodite évolue : la partie mâle se résorbe spontanément, tandis que la partie femelle se développe. Les spermatophores déposés par les mâles sont emmagasinés dans le réceptacle séminal jusqu'à la maturation des ovules (**Boue et Chaton, 1971**). Lors de l'accouplement, les deux escargots hermaphrodites effectuent une parade complexe, au cours de laquelle chacun introduit son pénis dans le corps de l'autre (**Figure 9a**) (**Gamlin et Vines, 1996**). Le sperme peut être conservé pendant plus d'un an, mais la ponte des œufs, intervient habituellement une quinzaine de jour après l'accouplement (**Kerney et Cameron, 2006**).



**Figure 9** : Reproduction de l'escargot *Helix aspersa*. **(a)** : Accouplement de deux partenaires (**Buron-Mousseau, 2014**) ; **(b)** : Ponte des œufs chez l'escargot (**Papilio, 2017**).

L'intervalle entre l'accouplement et la ponte est variable. En conditions constantes de température et d'hygrométrie (20°C et 85%), la durée moyenne est de 10 à 15 jours, mais ce délai peut atteindre un à deux mois selon les conditions environnementales (**Daguzan et al., 1981**). Pour pondre, l'escargot creuse une cavité dans le sol, appelée nid de

ponde, d'environ 4 à 5 cm de profondeur (**Figure 9b**). La durée de la ponte est comprise entre 12 et 48 heures (**Cobbinah et al., 2008**). Le nombre moyen d'œufs pondus varie de 80 à 130 selon l'origine des individus (**Madec, 1983**).

### 3.3.6. Incubation et éclosion

En conditions naturelles, la durée d'incubation varie de 15 à 30 jours. Dès les premiers jours, l'embryon commence à former une coquille protéique, qui se calcifie progressivement au cours de son développement. L'éclosion se produit lorsque le jeune escargot rompt la membrane externe de l'œuf, qu'il consomme partiellement. Le nouveau-né remonte à la surface du sol après la solidification de sa coquille, généralement entre 6 et 10 jours après l'éclosion (**Bertrand et Renaud, 2004**). À ce stade, il pèse entre 10 et 40 mg, mesure de 2 à 4 mm de diamètre, et commence à se nourrir de la végétation environnante.

### 3.4. Habitat

*Helix aspersa* occupe des milieux abrités, principalement dans des zones à sols riches en bases. On le retrouve fréquemment dans les haies, falaises, carrières, cimetières, jardins urbains ainsi que dans des terrains vagues négligés. Il est également présent dans les forêts de feuillus (**Kerney, 1999 ; Kerney et Cameron, 2006**).

L'espèce présente une niche écologique très variée grâce à sa remarquable capacité d'adaptation. Elle peut survivre dans des conditions environnementales défavorables, en adoptant une stratégie de résistance passive qui limite les dépenses énergétiques. Sa faculté à jeûner pendant de longues périodes est particulièrement remarquable (**Karamoko, 2009**).

### 3.5. Importance écotoxicologique

L'écotoxicologie joue un rôle fondamental dans l'évaluation de la qualité des écosystèmes. Elle s'intéresse aux effets des substances chimiques présentes dans l'environnement sur les organismes vivants, en intégrant des disciplines variées, notamment la mise en place de bio-indicateurs. Parmi ceux-ci, l'escargot *Helix aspersa* (**Müller, 1774**) se distingue comme un modèle pertinent (**Al-Alam, 2023**).

Un bio-indicateur est défini comme un organisme ou un groupe d'organismes permettant d'évaluer de façon qualitative et quantitative l'état de l'environnement. Les critères qualifiant une espèce de bio-indicateur sont, généralement, les suivants : être sédentaire afin de refléter les conditions locales, être abondant et facile à détecter, et posséder une taille suffisante pour permettre l'analyse de ses tissus (muscles, organes, etc.) (**Fränzle, 2003**).

Le choix préférentiel de l'escargot est principalement lié à sa distribution mondiale, traduisant sa capacité d'adaptation à divers biotopes terrestres. Il représente également une part significative de la biomasse des invertébrés des sols, ce qui le rend d'autant plus intéressant dans les études écotoxicologiques (Dallinger *et al.*, 2001 ; Zaldibar *et al.*, 2007).

En raison de sa position écologique à l'interface sol-plante-atmosphère, *Helix aspersa* est particulièrement sensible à la pollution. Il est capable d'absorber les contaminants présents dans l'environnement par différentes voies (Figure 10) (Vaufleury *et al.*, 2009 ; Baurand, 2014) :

- **Voie digestive** : par ingestion de plantes ou de sol contaminés (Gimbert, 2006) ;
- **Voie cutanée** : par diffusion des polluants à travers l'épithélium du pied (De Vaufleury *et al.*, 2009) ;
- **Voie respiratoire** : par inhalation de gaz ou de particules atmosphériques (Baurand, 2014).

De plus, les escargots présentent d'importantes capacités de bioaccumulation pour de nombreux polluants, aussi bien métalliques qu'organiques (Scheifler *et al.*, 2002a,b Viard *et al.*, 2004 ; Bourabia, 2013 ; Belhaouchett, 2014 ; Grara *et al.*, 2016). Leur exposition à ces contaminants peut provoquer diverses réponses physiologiques (telles que l'inhibition de la croissance ou de la reproduction, voire la mortalité) (Swaileh et Ezzughayyar, 2001 ; Notten *et al.*, 2006 ; Carbone & Faggio, 2019), ainsi que des modifications biochimiques (Ismert *et al.*, 2002 ; Regoli *et al.*, 2006). Leur facilité d'élevage et leur tolérance à des climats variés renforcent également leur intérêt comme organisme modèle (Gomot, 1997 ; Cortet *et al.*, 1999 ; Dallinger *et al.*, 2001).

Enfin, en tant qu'élément des réseaux trophiques, *Helix aspersa* peut contribuer au transfert des polluants du sol ou des plantes vers ses prédateurs (Beeby, 1985 ; Laskowski et Hopkin, 1995 ; Scheifler *et al.*, 2002), accentuant ainsi son rôle dans les études de contamination environnementale.

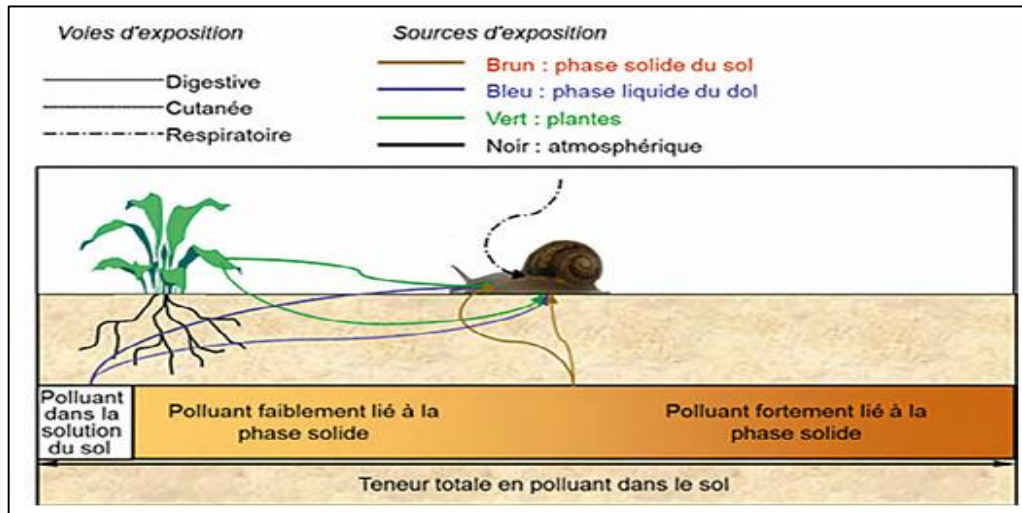
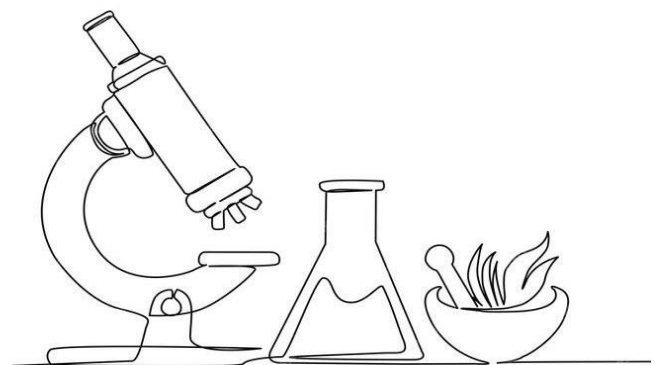


Figure 10 : Voies et sources d'exposition de l'escargot aux polluants (Scheifler et al., 2002).

# **Chapitre II**

## **Matériel et méthodes**



Notre travail a été réalisé au sein du Laboratoire des Sciences Biologiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Wilaya de Bordj Bou Arreridj.

## 1. Matériels

### 1.1. Matériel biologique

Notre étude a été menée sur un gastéropode terrestre, *Helix aspersa* (Müller, 1774) (Figure 11), reconnu pour ses importantes capacités de bioindication et de bioaccumulation. Sa position systématique, selon Bonnet et Vrillon (1990), est la suivante (Tableau II) :

**Tableau II** : Classification de l'espèce *Helix aspersa* (Muller, 1774).

<b>Règne</b>	<b>Animalia</b>
<b>Embranchement</b>	<b>Molluca</b>
<b>Classe</b>	<b>Gastropoda</b>
<b>Sous-classe</b>	<b>Euthyneurs</b>
<b>Super ordre</b>	<b>Pulmoné</b>
<b>Ordre</b>	<b>stylommatophora</b>
<b>Famille</b>	<b>Helicidae</b>
<b>Genre</b>	<i>Helix</i>
<b>Espèce</b>	<i>aspersa</i>
<b>Sous-espèce</b>	<i>aspersa</i>



**Figure 11** : *Helix aspersa* (Photo personnelle).

### 1.2. Matériel chimique

Le matériel chimique utilisé dans notre travail est le dioxyde de titane nanométrique ( $\text{TiO}_2$ ). Ces nanoparticules, d'une taille de 80 nm, ont été fournies par le laboratoire de Chimie des Matériaux de l'Université Badji Mokhtar Annaba (Figure 12).



**Figure 12** : Les nanoparticules dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) (Photo personnelle).

## 2. Méthodes

### 2.1. Conditions d'élevage

Les escargots utilisés dans notre étude ont été collectés dans la région de Djaafra, wilaya de Bordj Bou Arreridj (**Figure 13**), puis transférés au laboratoire, où ils ont été maintenus dans des conditions environnementales optimales : une photopériode de 12h de lumière / 24h, et une température de  $20 \pm 2$  °C (Coeurdassier *et al.*, 2001).

Les escargots ont été triés en fonction de leurs poids, puis répartis dans des boîtes en plastique transparent, munies de couvercles perforés pour assurer une bonne aération. Ils ont été nourris quotidiennement avec des feuilles de laitue fraîche. L'humidité ambiante a été maintenue grâce à une éponge mouillée. Les boîtes ont été nettoyées régulièrement tous les deux jours, avec renouvellement de la nourriture. Après une période d'acclimatation de 15 jours aux conditions du laboratoire, les escargots ont été exposés aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub>.



**Figure 13** : Récolte des escargots sur terrain (Photos personnelles).

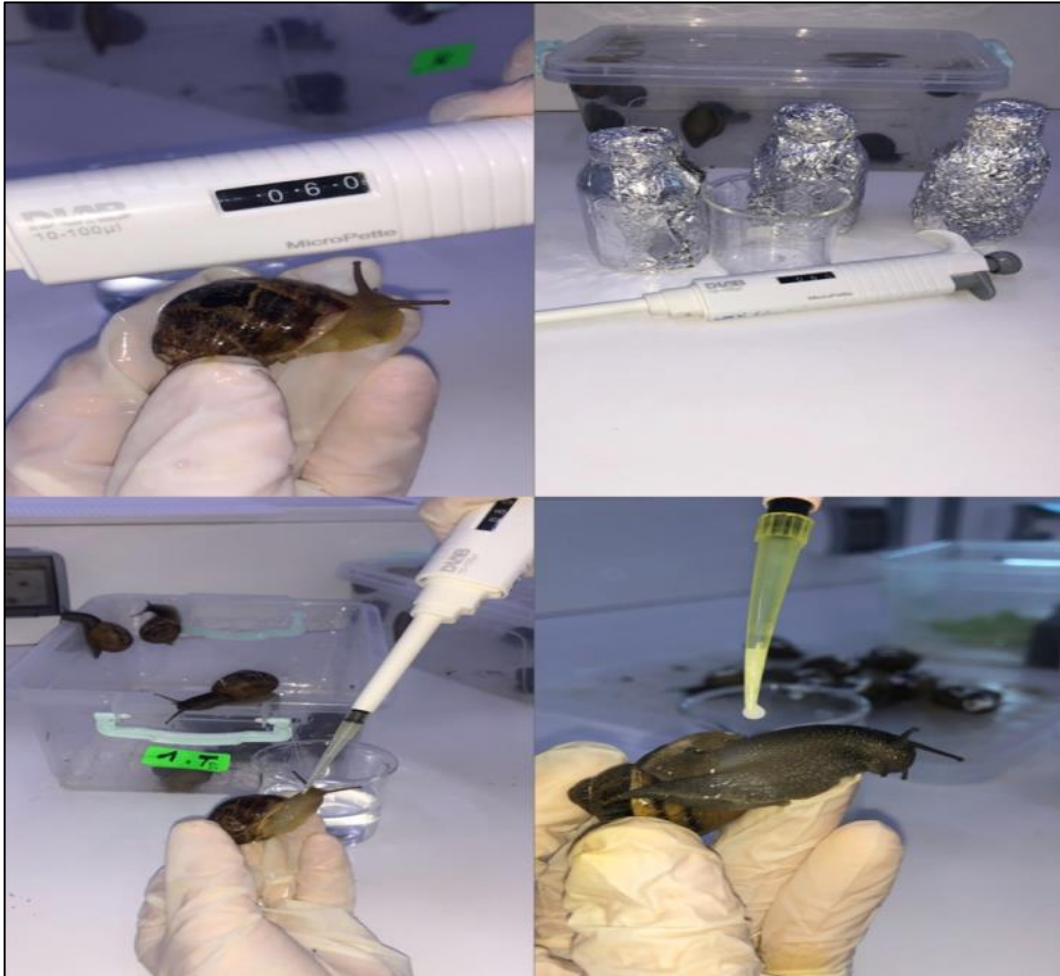
## 2.2. Mode de traitement

L'expérience a été réalisée dans les mêmes conditions environnementales que celles de l'élevage. 40 escargots adultes, d'un poids moyen compris entre 8 et 10 g, ont été sélectionnés et répartis en 4 lots de 10 escargots chacun (**Figure 14**). Une exposition quotidienne aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> par voie topique a été réalisée pendant 14 jours (**Hussein et al., 1994 ; Radwan et al., 2008**). Trois concentrations ont été testées : 100, 1000 et 5000 mg/L en plus d'un lot témoin.

Après une agitation des solutions pendant 15 à 20 minutes, les nanoparticules ont été appliquées délicatement sur la surface du corps de l'escargot, à l'intérieur de la coquille, à l'aide d'une micropipette contenant 60 µl de la solution à tester, selon la méthode décrite par **Belhaouchet et al., 2012** et **Abdel-Halim et al., 2021** (**Figure 15**). Les escargots témoins ont reçu la même quantité d'eau distillé. Durant toute la période de traitement, les escargots ont été nourris quotidiennement avec des feuilles de laitue fraîche. Les boîtes ont été nettoyées régulièrement tous les deux jours.



**Figure 14 :** Lot d'escargots *Helix aspersa* exposés à une concentration de 1000 mg/L de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (**Photo personnelle**).



**Figure 15 :** Application topique des solutions de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur les escargots *Helix aspersa* (Photo personnelle).

### 2.3. Prélèvement de l'hémolymphe

Après 14 jours de traitement aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, un prélèvement d'hémolymphe a été réalisé selon la méthode décrite par **Letellier (2010)**. L'escargot possède un appareil circulatoire ouvert avec des lacunes (hémocoèle), constitué d'un cœur dont partent deux artères principales : une artère antérieure, qui irrigue la cavité palléale, et une artère postérieure médiane, qui se dirige vers les viscères.

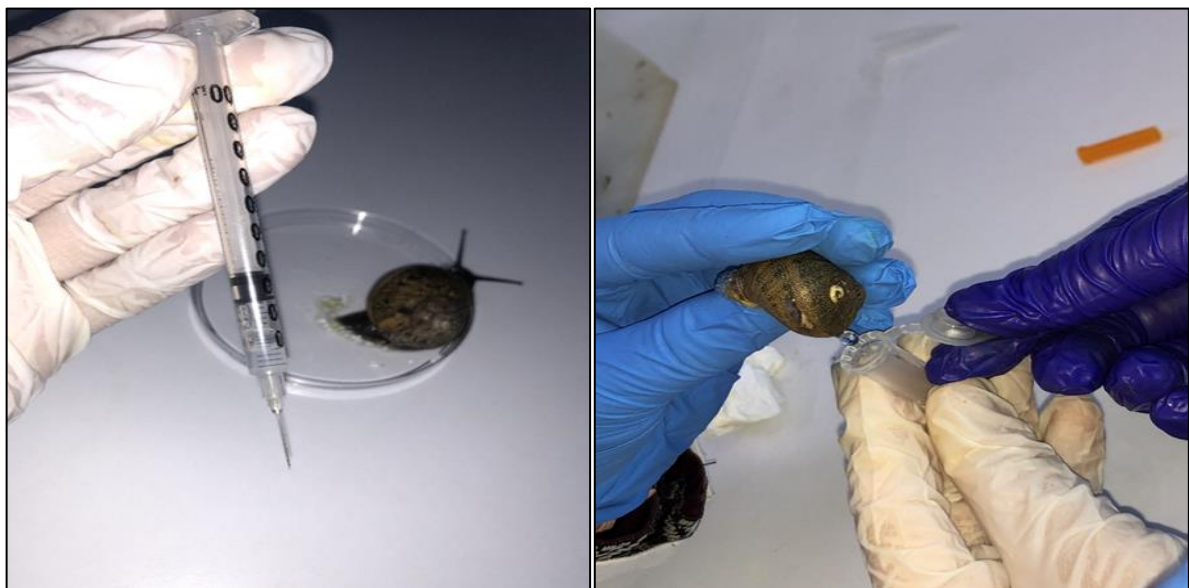
En brisant délicatement la coquille sur le côté postérieur gauche à l'aide d'un instrument pointu et stérile, le vaisseau antérieur peut être atteint au niveau du cœur (**Figure 16**). L'hémolymphe est ensuite prélevée à l'aide d'une seringue stérile (**Figure 17**). Environ 100 µl d'hémolymphe sont obtenus par escargot (**Atailia, 2017**).

L'hémolymphe prélevée est immédiatement transférée dans des tubes contenant une solution anticoagulante (EDTA, 1.5 mg/mL), puis centrifugée à 4000 g pendant 30 min à 4 °C.

Le culot cellulaire (hémocytes) est ensuite récupéré pour le dosage des biomarqueurs de stress oxydatif, à savoir le glutathion réduit (GSH) et la catalase (CAT).



**Figure 16 :** Fenêtre réalisée sur la partie postérieure gauche de la coquille d'un escargot *Helix aspersa* (Letellier, 2010).



**Figure 17 :** Prélèvement de l'hémolymphe d'un escargot *Helix aspersa* et transfert dans des tubes Eppendorf (Photo personnelle).

#### 2.4. Dissection et prélèvement des organes

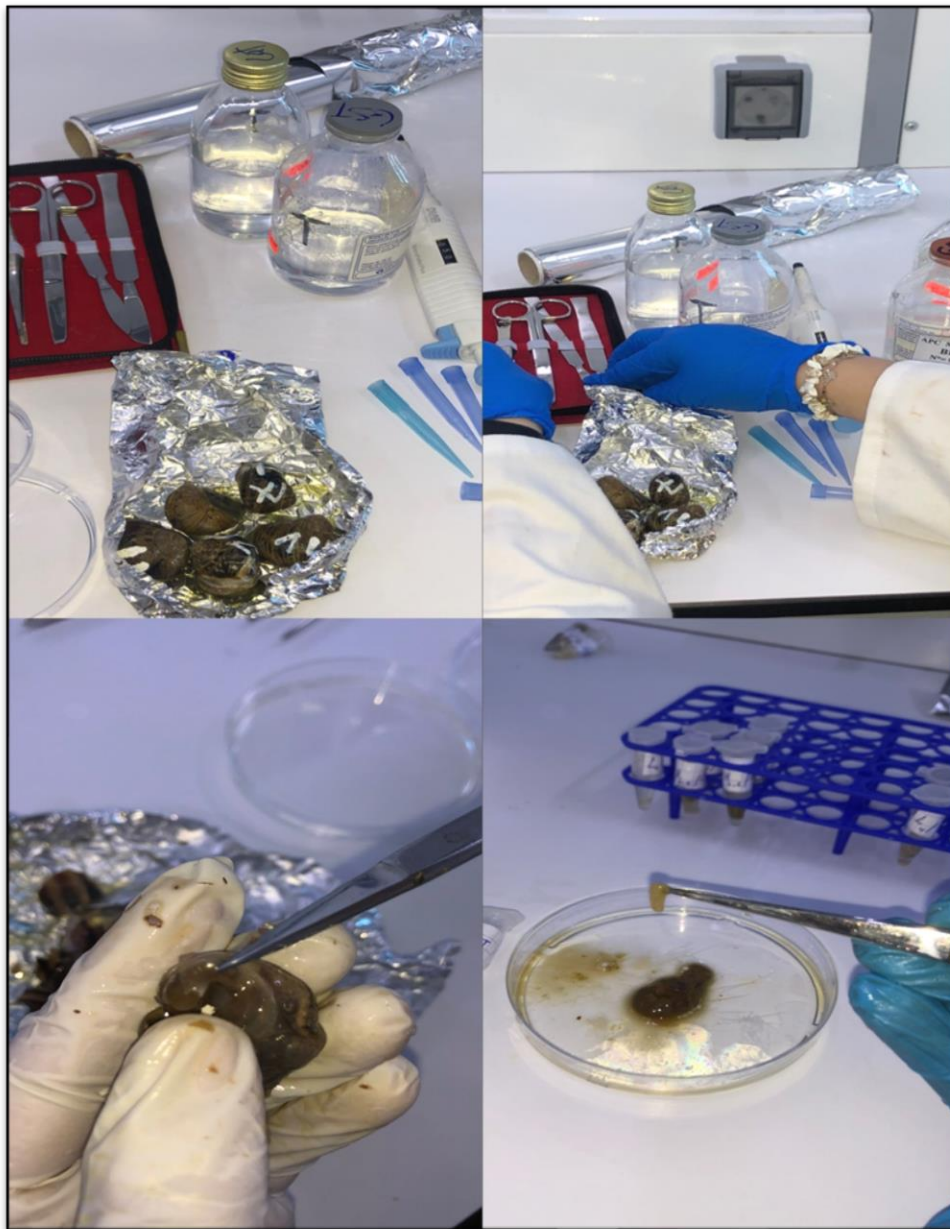
Après le prélèvement de l'hémolymphe, les escargots sont mis à jeun pendant 48 heures dans des boîtes soigneusement nettoyées, afin de permettre la vidange complète de leur tube

digestif. Les animaux sont ensuite sacrifiés par congélation, puis disséqués à l'aide d'une paire de ciseaux et de pinces (**Figure 18**).

Après la dissection, l'hépatopancréas et le rein sont prélevés, puis divisés en deux fragments :

- Un échantillon destiné au dosage du glutathion (GSH).
- Un échantillon destiné au dosage de l'activité catalase (CAT).

La glande albumen a été également prélevée en vue du dosage des protéines albuminiques (vitéllogénines).



**Figure 18** : Sacrifice des escargots et prélèvement des organes (**Photo personnelle**).

## 2.5. Paramètres étudiés

### 2.5.1. Dosage des biomarqueurs du stress oxydatif

#### 2.5.1.1. Dosage du glutathion réduit (GSH)

Le taux de glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode **de Weckberker et Cory (1988)**. Cette méthode repose sur une réaction colorimétrique basée sur la formation de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique, résultant de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 412 nm. Le dosage est réalisé après broyage des échantillons dans 1 mL d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M, effectué dans un bain de glace. L'homogénat est ensuite soumis à une déprotéinisation à l'aide d'une solution d'acide sulfosalicylique (ASS) à 0,25 %, en ajoutant 0,2 mL d'ASS à 0,8 mL d'homogénat. Le mélange est agité au vortex, puis centrifugé à 1000 tours/min pendant 5 minutes.

Après centrifugation, 500 µL du surnageant sont prélevés et mélangés à 1 mL de tampon Tris/EDTA, puis à 25 µL de DTNB (0,01 M). La lecture de l'absorbance est effectuée à 412 nm, après 5 minutes de repos à température ambiante, afin de permettre la stabilisation de la coloration. Un blanc est préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant les 500 µL de surnageant par 500 µL d'eau distillée.

Le taux du glutathion est ensuite estimé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de GSH } (\mu\text{M/mg de protéines}) = \frac{DO \times 1 \times 1,525}{13,1 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg de protéines}}$$

- **Taux du GSH** : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM/ mg de protéines).
- **DO** : Densité optique
- **Vd (1)** : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat).
- **Vt (1,525)** : volume total des solutions utilisées dans la cuve (0,025 ml DTNB + 0,5 ml surnageant + 1 ml Tris-EDTA).
- **ε (13,1)** : coefficient d'absorbance (concernant le groupement -SH à 412 nm).
- **Vh (0,8)** : volume de l'homogénat utilisé en ml.
- **Vs (0,5)** : volume de surnageant utilisé en ml.
- **mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg.

### 2.5.1.2. Dosage de l'activité spécifique de la catalase (CAT)

L'activité catalase (CAT) est mesurée selon la méthode de **Regoli et Principato (1995)**, à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 240 nm. Cette méthode repose sur la variation de la densité optique provoquée par la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le mélange réactionnel est composé de 750 µL de tampon phosphate (100 mM, pH 7,5), 200 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 mM), et 50 µL d'homogénat. L'incubation est réalisée à une température de 25 °C. L'absorbance est mesurée pendant 1 minute, avec un intervalle de lecture toutes les 15 secondes. Les résultats sont exprimés en µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposé par minute et par milligramme de protéines.

L'activité catalase est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité CAT (}\mu\text{mol /min/ mg protéines)} = \frac{(\Delta \text{DO} \times 10)}{(\epsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéines})}$$

- **Activité CAT** : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines
- **Δ DO** : différences des absorbances pendant une minute.
- **ε** : Facteur d'extinction (0,040 m<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>).
- **L** : Longueur de la cuve utilisée.
- **mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg.

### 2.5.2. Dosage des protéines albuminiques (vitéllogénines)

Les glandes albumen prélevées sont placées dans des tubes Eppendorf contenant 500 µL de tampon Tris-HCl-NaCl (pH 7,4). Après broyage dans un bain de glace, l'homogénat obtenu est centrifugé à 5000 tours/min pendant 10 minutes. Cette centrifugation permet la séparation en trois phases :

- une couche surnageante contenant principalement les lipides,
- un culot riche en glycoprotéines,
- et une couche intermédiaire renfermant les vitéllogénines.

Cette dernière est soigneusement récupérée à l'aide d'une seringue stérile, puis transférée dans un autre tube Eppendorf (**Postlethwait et al., 1980 ; Fabre et al., 1990**).

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de **Bradford (1976)**, qui repose sur l'utilisation du Bleu Brillant de Coomassie G-250 (BBC) comme réactif, et de l'albumine de sérum bovin (1 mg/mL) comme standard. L'analyse est effectuée sur une aliquote de 100  $\mu$ L. L'absorbance est mesurée à 595 nm contre un blanc, après 5 minutes d'incubation à l'obscurité.

### 3. Analyse statistique

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique grâce au logiciel Minitab (Version 14.0). Les moyennes des groupes témoins et traités ont été comparées deux à deux en utilisant le test *t* de Student. Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $p \leq 0,05$  (\*); hautement significatives lorsque  $p \leq 0,01$  (\*\*); et très hautement significatives lorsque  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) (**Dagnelie, 1999**).

# **Chapitre III**

## **Résultats**



## 1. Effets des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur les biomarqueurs de stress chez *Helix aspersa*

### 1.1. Effet des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur le taux de GSH

La **figure (19)** illustre l'effet des concentrations croissantes des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur le taux de GSH dans l'hépatopancréas, le rein et le lysat hémostatique de l'escargot *Helix aspersa*.

Les résultats montrent une diminution dose-dépendante du taux de GSH chez les escargots exposés aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, comparativement aux témoins. Cette déplétion est significative ( $p \leq 0,05$ ) à la concentration la plus élevée (5000 mg/L) dans l'ensemble des matrices biologiques étudiées.

Au niveau de l'hépatopancréas, le taux de GSH passe de 3,958  $\mu\text{mol/mg}$  de protéines chez les témoins à 1,806  $\mu\text{mol/mg}$  pour la concentration de 1000 mg/L, puis à 1,499  $\mu\text{mol/mg}$  pour la plus forte concentration (5000 mg/L).

Le taux de GSH rénal, quant à lui, diminue de 2,683  $\mu\text{mol/mg}$  de protéines chez les témoins à 1,302  $\mu\text{mol/mg}$  pour les escargots exposés à la concentration de 5000 mg/L.

Concernant le lysat hémostatique, une baisse significative ( $P = 0,02$ ) est également observée. Ainsi, le taux de GSH chute de 0,343  $\mu\text{mol/mg}$  de protéines chez les témoins à 0,131  $\mu\text{mol/mg}$  à la plus forte concentration testée.

### 1.2. Effet des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur l'activité CAT

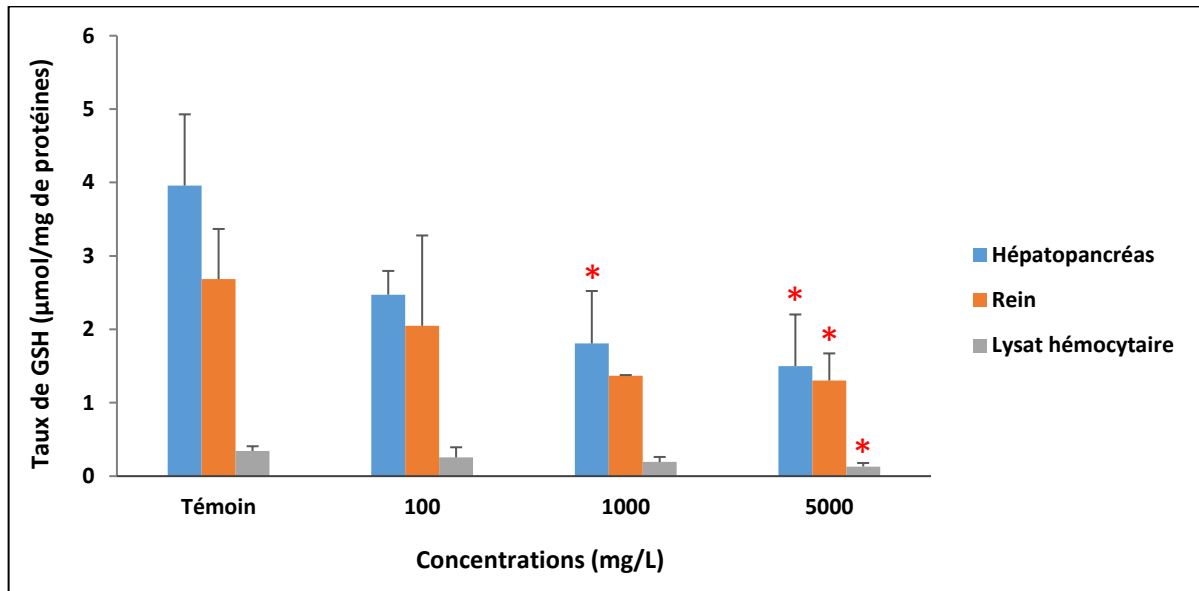
Les résultats relatifs à la variation de l'activité CAT dans les trois matrices biologiques étudiées (hépatopancréas, rein et lysat hémostatique) chez les escargots exposés aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sont présentés dans la **figure (20)**.

Une augmentation hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) de l'activité enzymatique est observée chez les escargots exposés aux deux plus fortes concentrations (1000 et 5000 mg/L), en comparaison avec les témoins, au niveau de l'hépatopancréas et du rein.

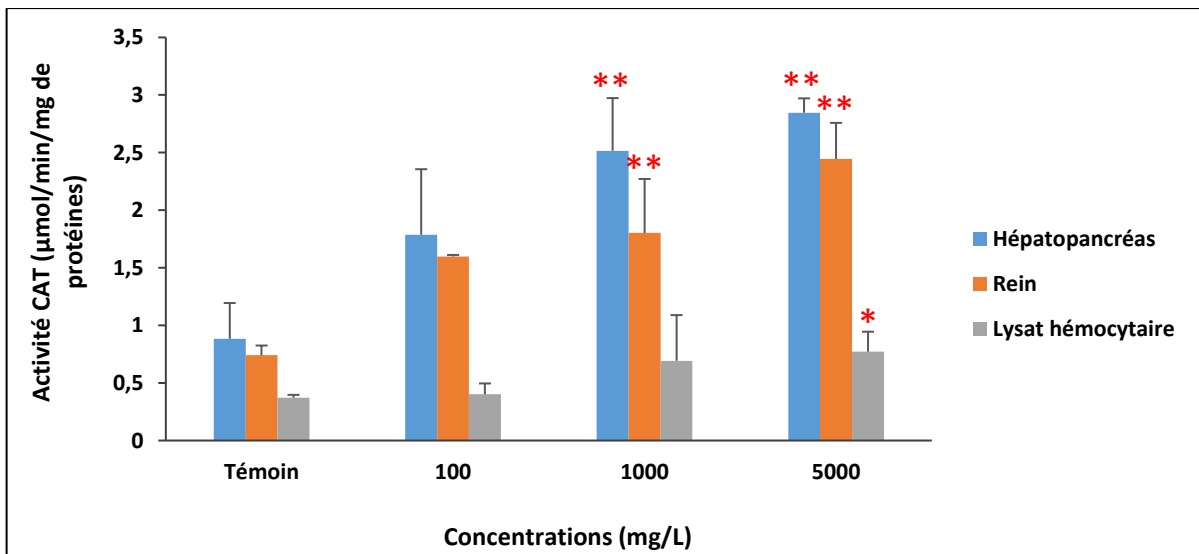
Ainsi, l'activité de la CAT dans l'hépatopancréas passe de 0,883  $\mu\text{mol/min/mg}$  de protéines chez les témoins à 2,516  $\mu\text{mol/min/mg}$  pour la concentration de 1000 mg/L, atteignant une valeur maximale d'environ 2,9  $\mu\text{mol/min/mg}$  pour la plus forte concentration (5000 mg/L). Au niveau du rein, l'activité enzymatique augmente de 0,740  $\mu\text{mol/min/mg}$  chez les témoins à

1,802  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  pour la concentration de 1000 mg/L, puis à 2,445  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  pour la concentration la plus élevée (5000 mg/L).

Concernant le lysat hémocytaire, une augmentation significative ( $p = 0,05$ ) de l'activité CAT n'est constatée qu'à la plus forte concentration, atteignant 0,771  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines, contre 0,372  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  chez les témoins.



**Figure 19 :** Effet des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  sur le taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas, du rein et du lysat hémocytaire des escargots *Helix aspersa* ( $m \pm \text{SD}$  ;  $n = 3$ ).

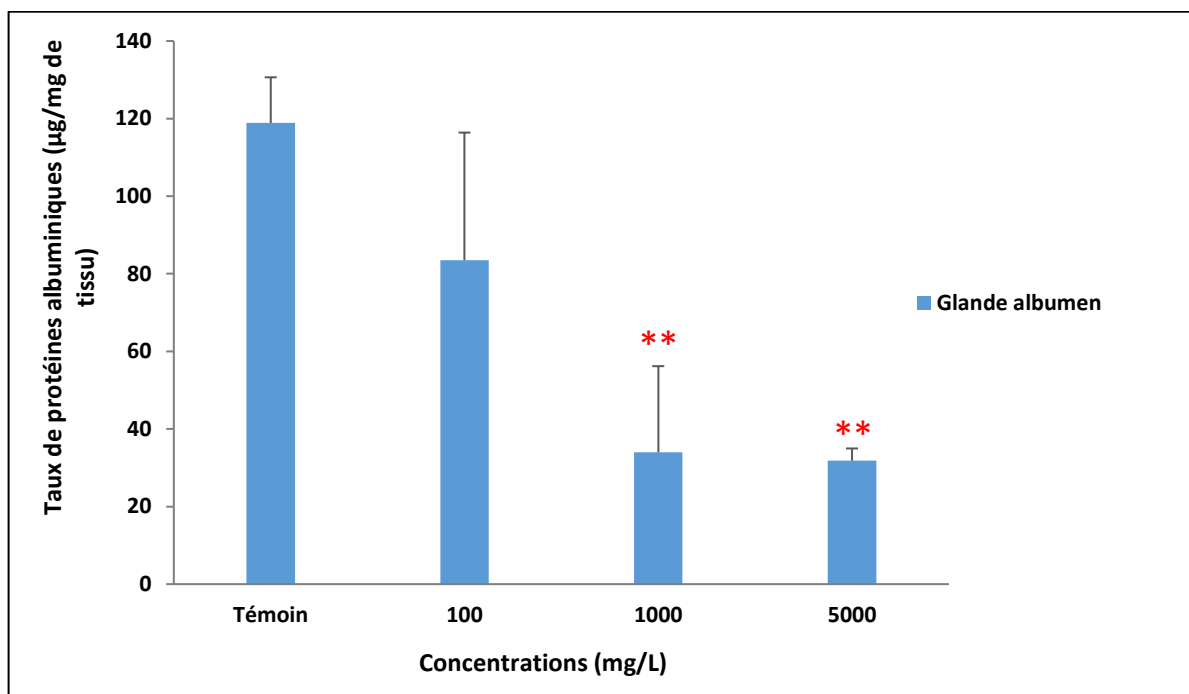


**Figure 20 :** Variations de l'activité CAT au niveau de l'hépatopancréas, du rein et du lysat hémocytaire chez les escargots *Helix aspersa* témoins et exposés aux nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  ( $m \pm \text{SD}$  ;  $n = 3$ ).

## 2. Effets des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur le taux des protéines albuminiques

La **figure (21)** présente l'effet des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur le taux des protéines albuminiques.

Les résultats montrent une diminution dose-dépendante et hautement significative ( $p < 0,01$ ) de ce paramètre chez les escargots exposés aux deux plus fortes concentrations (1000 et 5000 mg/L) par rapport aux témoins. Les teneurs enregistrées sont respectivement de 33,978  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu et 31,831  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu, contre 118,896  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu chez les escargots témoins.



**Figure 21** : Effets des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur le taux des protéines albuminiques chez *Helix aspersa* ( $m \pm SD$  ;  $n = 3$ ).

# **Chapitre IV**

## **Discussion**



L'expansion industrielle observée au cours des derniers siècles, accompagnée d'un manque notable de préoccupation environnementale, a conduit au déversement de nombreuses substances polluantes dans les milieux naturels. Celles qui sont peu ou non dégradables s'accumulent dans les sols, les sédiments, les eaux et les organismes et provoquent la dégradation des écosystèmes et de la biodiversité. Ces polluants, de natures variées, présentent des rémanences différentes dans les sols (**Morel, 1997**). Parmi eux, les NPs suscitent aujourd'hui une problématique écotoxicologique majeure, en raison de leur libération et leur dispersion croissante dans l'environnement (**Masse et Boudène, 2013 ; Khene et al., 2017**). Leur toxicité reste encore peu étudiée, malgré leur présence grandissante, et les connaissances actuelles sur leur impact environnemental demeurent insuffisantes (**Klaine et al., 2008 ; Askri, 2018**).

Cependant, il est légitime d'évaluer les interactions de ces polluants avec les organismes clés de la chaîne alimentaire, tels que les mollusques gastéropodes, qui servent d'organismes sentinelles dans les programmes de surveillance de la contamination chimique des écosystèmes. Parmi eux, on compte notamment *Helix aspersa* (**Radwan, 2000 ; Scheifler, 2002 ; Regoli et al., 2006 ; Angélique, 2008 ; Valérie 2009**). Ce gastéropode terrestre possède une forte capacité d'accumulation des polluants, jouant ainsi un rôle essentiel dans leur transfert depuis la végétation jusqu'aux prédateurs des réseaux trophiques supérieurs (**Kahli, 2015 ; Notten et al., 2005**).

La réponse biologique aux contaminants à l'échelle individuelle se manifeste par une perturbation de la physiologie cellulaire, qui se traduit par des effets sur le comportement, la survie, la croissance et la reproduction. Ces effets dépendent des caractéristiques biologiques et écologiques des espèces étudiées (**Koeman, 1991**). Ces caractéristiques influencent non seulement le niveau d'exposition des individus aux contaminants, mais également leur cinétique dans l'organisme, ainsi que la capacité de ce dernier à les éliminer ou à les stocker (**Escher et Hermens, 2002**). Ces manifestations résultent des interactions spécifiques entre les molécules cellulaires et les contaminants. Ces interactions peuvent être mesurées par la présence et la concentration de molécules ayant pénétré dans la cellule ou produites en réponse à l'exposition, constituant ainsi des biomarqueurs.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est l'évaluation de la toxicité du dioxyde de titane nanométrique (TiO<sub>2</sub>) sur un organisme bio-accumulateur/ bioindicateur de la pollution,

le gastéropode terrestre : *Helix aspersa*, à travers le suivi de certains biomarqueurs du stress oxydatif.

Le stress oxydatif constitue l'un des mécanismes majeurs clés par lesquels les nanoparticules exercent leur toxicité. Il se manifeste par un déséquilibre entre les oxydants et les défenses antioxydantes biologiques, entraînant des dommages oxydatifs aux lipides, aux protéines, aux glucides et même aux acides nucléiques (**El-Demerdash, 2007**).

Lorsque les concentrations de xénobiotiques deviennent toxiques dans l'organisme, elles déclenchent l'activation de systèmes de défense cellulaire, visant à neutraliser ou éliminer les métabolites réactifs. Les composants antioxydants impliqués dans le stress oxydatif agissent en chaîne pour limiter les dommages causés par les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Benbouzid, 2012**). Parmi ces défenses, le glutathion réduit (GSH) et l'activité de la catalase (CAT) sont deux biomarqueurs essentiels permettant d'évaluer les effets toxiques des xénobiotiques sur l'organisme (**McLoughlin et al., 2000**).

Le glutathion (GSH) est le thiol cellulaire le plus abondant, impliqué dans de nombreux processus métaboliques, de transport, ainsi que dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, y compris les ROS et les NPs (**Meister et Anderson, 1983 ; Sies et Ketterer, 1988 ; Taniguchi et al., 1989**). En plus de son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également dans la défense antiradicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase (**Barillet, 2007**). Ses fonctions reposent principalement sur son caractère nucléophile : en se liant à des composés électrophiles, il les rend plus hydrosolubles, facilitant ainsi leur transport et leur élimination. Grâce à cette propriété, le GSH joue un rôle important dans la protection des cellules contre le stress oxydatif et les xénobiotiques (**Choi et al., 1997**). En raison de son implication directe dans la neutralisation des ROS et la détoxification cellulaire, le dosage du GSH constitue un indicateur pertinent et sensible du stress oxydatif, justifiant ainsi son utilisation comme biomarqueur dans cette étude.

Nos résultats ont mis en évidence une diminution significative du taux de GSH dans l'hépatopancréas, le rein et le lysat hémocytaire des escargots exposés par voie topique aux NPs de TiO<sub>2</sub>, comparativement aux témoins. Cette déplétion pourrait probablement être due à la surproduction de radicaux libres induite par les NPs, nécessitant une mobilisation accrue du glutathion pour neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Zhao et al., 2013**). Cela pourrait être également expliqué par la liaison directe du GSH à certains composants

métalliques des nanoparticules, comme l'a suggéré **Barillet (2007)**. Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sont en effet capables d'induire la formation de ROS tels que l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), contribuant à déséquilibrer l'état redox intracellulaire et à réduire les antioxydants cellulaires telles que le glutathion ou la vitamine E (**Doudi et al., 2015**).

Il est important de souligner que la diminution du taux de GSH est plus marquée au niveau de l'hépatopancréas, et ce dès la concentration de 1000 mg/L. Cela s'explique par le rôle physiologique central de cet organe, principal site de métabolisme, de stockage et de détoxication, ce qui le rend particulièrement sensible aux effets toxiques des NPs (**Benamara et al., 2022 ; Benziane et Mendoud, 2024**). En revanche, dans le rein et le lysat hélocytaire, la diminution du taux de GSH n'est significative que pour la plus forte concentration testée (5000 mg/L), ce qui pourrait refléter une sensibilité moindre de ces matrices biologiques ou une meilleure capacité de défense antioxydante. Par ailleurs, les hélocytes, bien qu'impliqués dans la réponse immunitaire, présentent une activité métabolique plus faible, ce qui pourrait expliquer la réponse plus tardive du GSH observée à ce niveau. Cela rejoint les observations d'**Abdel-Halim et al. (2021)**, qui ont rapporté une baisse non significative du taux de GSH au niveau de l'hémolymphe d'*Helix aspersa* exposé aux NPs de TiO<sub>2</sub>, contrairement à l'hépatopancréas, où la diminution était significative.

Cette différence entre les tissus s'explique également par les propriétés du glutathion lui-même. Les éléments métalliques sont caractérisés par leur forte affinité vis-à-vis des groupements thiols et forment des complexes avec ces entités chimiques (**Viarengo et Nott, 1993 ; Viarengo, 1994**). Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le GSH agit comme un tampon antioxydant en fixant ces éléments. Durant ce processus, il est oxydé en glutathion disulfure (GSSG), qui est ensuite réduit de nouveau en GSH grâce à l'action de la glutathion réductase, en présence de NADPH (**DiMonte & Lavasani, 2002 ; Filomeni et al., 2002 ; Arora, 2016 ; Rjeibi, 2016**). Ce cycle de régénération permet normalement de maintenir l'homéostasie redox, mais il peut être dépassé en cas de stress oxydatif intense.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Kahli (2015), Khene et al. (2017)** qui ont mis en évidence des effets similaires du TiO<sub>2</sub> chez *Helix aspersa*. Des travaux réalisés sur d'autres espèces, comme ceux de **Ramsden et al. (2013)** chez le poisson zèbre, ont aussi montré une diminution du taux de GSH dans des organes métaboliquement actifs tels que le foie, les branchies et le cerveau, confirmant le rôle central du GSH dans la réponse au stress oxydatif induit par les nanoparticules.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'évolution de l'activité catalase (CAT), qui avec la superoxyde dismutase (SOD), constitue la première ligne de défense contre les attaques radicalaires (**Basopo, 2015**). La catalase est une enzyme antioxydante héminique localisée dans le peroxydosome de nombreuses cellules tissulaires, elle est particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. Elle catalyse la détoxification du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en  $H_2O$  et en  $O_2$  par dismutation, agissant en synergie avec la SOD (**Belli et al., 2010 ; Bas et al., 2011**). Cette enzyme joue un rôle crucial dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs induits par divers polluants, y compris les nanoparticules, et son activité est considérée comme l'un des biomarqueurs les plus sensibles du stress oxydatif (**Khalil, 2015 ; Zouaghi et al., 2015**).

Dans notre étude, l'activité de la catalase a montré une augmentation significative chez les escargots exposés aux nanoparticules de  $TiO_2$ , en particulier aux fortes concentrations, et ce dans les trois matrices analysées. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Abdel-Halim et al. (2021)**, qui ont observé une intensification de l'activité catalase dans l'hépatopancréas et l'hémolymphe des escargots exposés aux nanoparticules de  $TiO_2$ , avec une activité plus marquée dans l'hépatopancréas, ce qui corrobore parfaitement nos propres observations. De même, **Atailia (2017)** a signalé une induction importante de l'activité CAT dans le lysat hélocytaire des escargots traités par une forte concentration de poussières métalliques, reflétant l'intensité du stress oxydatif et l'implication directe des hémocytes dans la réponse immunitaire (**Gopalakrishnan et al., 2013**).

Des résultats similaires ont également été rapportés par **Ben Belouaer et Beurghoul (2022)**, ainsi que par **Guasmia et al. (2024)**, qui ont observé une augmentation de l'activité CAT dans l'hépatopancréas et le rein d'escargots exposés aux nanoparticules d'oxydes de cuivre (CuO) et de zinc (ZnO), respectivement. Par ailleurs, **Ali et al. (2014 ; 2015)** ont noté une induction significative de cette activité chez le mollusque d'eau douce *Lymnaea luteola* traité par des nanoparticules de  $TiO_2$ .

Ces observations rejoignent celles d'**Elwakil et Radwan (1991)**, qui ont constaté une hausse de l'activité catalase chez l'escargot terrestre *Eobania vermiculata* exposé à divers pesticides (Méthomyl, Thiodicarb, Métaldéhyde). De même, **Khalil (2015)** a observé une augmentation de cette activité chez l'escargot d'eau douce *Lanistes carinatus* après exposition au chlorpyrifos.

Cependant, **Abdel Azeem et al. (2023)** ont rapporté une diminution de l'activité CAT dans l'hépatopancréas d'escargots *Helix aspersa* après une exposition de deux semaines aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub>. Cette inhibition serait due à une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), perturbant les processus cellulaires. **Li et al. (2011)** appuient cette hypothèse en évoquant une réponse biphasique du système antioxydant : une activation initiale suivie d'une inhibition due à une surcharge oxydative ou à une altération enzymatique. Ces réponses dépendent fortement de la concentration des polluants, de la durée d'exposition et de la sensibilité de l'espèce (**Ballesteros et al., 2009**).

Après avoir évalué l'activité de la catalase comme indicateur du stress oxydatif, notre attention s'est portée sur les protéines de la glande albumen, en particulier la vitellogénine (VTG), une glycoprotéine majeure synthétisée par cette glande chez les gastéropodes. Précurseur des protéines du vitellus, la VTG joue un rôle essentiel dans la reproduction. Sa synthèse est sensible aux perturbations environnementales, ce qui en fait un biomarqueur reconnu de la reproduction et de la perturbation endocrinienne (**Fernando et al., 2012**).

Bien que peu d'études aient spécifiquement exploré les effets du dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) chez les gastéropodes terrestres, les impacts toxiques de ce composé peuvent être comparés à ceux de certaines substances chimiques, notamment les pesticides tels que le décène (C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>) ou les carbamates. Chez les escargots exposés à ces toxiques, plusieurs études ont mis en évidence une diminution significative des taux de la VTG, accompagnée d'une baisse de fertilité, de malformations reproductives, d'une déplétion en glycogène et de modifications histologiques au niveau de la glande albumen (**El-Bolkiny et al., 2000 ; Praveen et Miyata, 2000 ; Polbahal et al., 2015 ; Srivastava et Singh, 2015 ; Suha Mubarak, 2016**). **Attia (2022)** a également observé une réduction des niveaux de la VTG chez l'escargot *Helix vermiculata* traité avec les pesticides Decis, Zoom et Weatfert, probablement liée à une altération de la régulation endocrinienne ou à un dysfonctionnement des voies hormonales impliquées.

Dans notre étude, une diminution significative des taux de la vitellogénine a été observée chez les escargots exposés aux deux plus fortes concentrations de TiO<sub>2</sub> (1000 et 5000 mg/L). Cette réduction pourrait être le résultat d'un effet cytotoxique direct sur les tissus synthétisant la VTG, d'une altération du métabolisme des protéines, ou encore de perturbations au niveau du réticulum endoplasmique, induites par les nanoparticules, pouvant inhiber la synthèse protéique et déclencher des réponses inflammatoires.

Ces résultats concordent avec ceux de **Ben Cheikh et al. (2016)**, qui ont rapporté une baisse des niveaux protéiques chez *Helix aspersa* exposé aux métaux lourds. De manière similaire, **Soltani et al. (1999)** ont montré que le pesticide 3-trifluorométhyl-4-nitrophénol (TFM) affecte les protéines ovariennes chez le poisson d'eau douce *Gambusia affinis*, tandis que **Sun et al. (2003)** ont observé que le tubufenozide et le methoxyfenozide, des agonistes des ecdystéroïdes, altèrent la vitellogenèse chez l'insecte *Cydia pomonella*. L'azadirachtine, un insecticide d'origine végétale, perturbe également cette fonction chez l'insecte *Bombus terrestris* (**Barbosa et al., 2014**).

Enfin, les travaux de **El-Bolkiny et al. (2000)** ont révélé que l'exposition aux carbamates entraîne une réduction importante de la teneur en glycogène, accompagnée d'une diminution du volume cellulaire de la glande albumen et des glandes hermaphrodites, ce qui pourrait expliquer la baisse de la capacité de reproduction observée chez les escargots traités.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  n'ont pas seulement un effet délétère sur la vitellogénine, mais compromettent également l'ensemble des fonctions métaboliques et reproductives des gastéropodes.

# **Conclusion et perspectives**



En raison de l'intensification des pressions humaines telles que la déforestation, l'urbanisation massive et l'exploitation excessive des ressources naturelles, l'environnement est plus menacé que jamais par tous types de pollution ainsi que le réchauffement climatique. Ces activités ont perturbé l'équilibre des milieux naturels, entraînant la disparition progressive de nombreuses espèces et la dégradation des écosystèmes à l'échelle mondiale.

L'essor de l'utilisation massive des nanoparticules métalliques, en particulier celles composées des oxydes métalliques comme le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ), constitue une source majeure de pollution chimique environnementale. En raison de leur taille nanométrique, ces particules possèdent une grande réactivité et peuvent interagir avec les systèmes biologiques, exposant ainsi les organismes du sol à des effets toxiques potentiellement graves.

Dans ce contexte, notre étude a évalué les effets toxiques des nanoparticules de dioxyde de titane chez *Helix aspersa*, un gastéropode terrestre reconnu pour sa sensibilité environnementale et sa capacité de bioaccumulation. Les escargots ont été exposés par voie topique à trois concentrations croissantes de NPs de  $\text{TiO}_2$  (100, 1000 et 5000 mg/L) pendant 14 jours.

L'analyse des biomarqueurs a révélé une toxicité hépatique, rénale et endocrinienne, traduite par une augmentation de l'activité de la catalase (CAT), une diminution des taux de glutathion (GSH) et une réduction des protéines albuminiques, notamment la vitellogénine. Ces altérations biochimiques indiquent l'installation d'un stress oxydatif et l'activation du système de détoxification cellulaire.

Nos résultats confirment la capacité d'*Helix aspersa* à déclencher des mécanismes de défense face à l'exposition aux nanoparticules métalliques, renforçant son statut d'organisme bioindicateur pertinent pour l'évaluation de la pollution terrestre d'origine nanométrique.

Enfin, pour approfondir la compréhension des effets des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$ , il serait pertinent de compléter ce travail par :

- une étude histopathologique permettant d'identifier les lésions tissulaires et les sites d'accumulation des nanoparticules ;
- une analyse des effets chroniques à long terme (toxicité cumulative) ;
- une comparaison entre différentes formes ou tailles de nanoparticules ;
- une étude génétique portant sur les éventuels dommages à l'ADN.

# **Références bibliographiques**



### A

- **Adeola, A. O., Aruleba, R. T., Akinrinde, A. S., & Ogunrinola, O. O. (2019).** The impact of engineered nanoparticles on the environment. *Environmental Nanotechnology*, 13(4), 289–302.
- **Afsset. (2010).** Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement (Rapport de l'expertise collective). La Doc. Fr, 3, 36–37.
- **Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S. M., Schlager, J. J., & Hong, Y. (2010).** DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233(3), 404–410.
- **Al-Alam, J., Millet, M., Harb, M., Akoury, E., Tokajian, S., & Wazne, M. (2023).** Field evaluation of metal bioaccumulation in the gastropod *Helix aspersa* at agricultural and industrial sites in Lebanon. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(3), 197. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10791-5>
- **Angélique, S. D. (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, 194P.
- **Argot J., Jargot F., et Robert S. (2013).** Base de données fiches toxicologiques, sur le site web l'inrs : [www.inrs.fr/fr/chetox](http://www.inrs.fr/fr/chetox). inrs. 2-5.
- **Arora D. H. S., (2016).** Evaluation and physiological correlation of plasma proteomic finger prints for Deltamethrin induced hepatotoxicity in Wistar rats. *LFS* 14866 : 04-25.
- **Askri, D., Ouni, S., Galai, S., Arnaud, J., Chovelon, B., Lehmann, S. G., ... & Amara, S. (2018).** Intranasal instillation of iron oxide nanoparticles induces inflammation and perturbation of trace elements and neurotransmitters, but not behavioral impairment in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(17), 16922-16932.
- **Azim, S., Khan, M. A., Ahmad, M., & Islam, F. (2015).** Mitochondria-mediated and death receptor-mediated apoptosis pathways in toxicology. *Toxicology Research*, 4(3), 455-468.

### 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. *J. Comp. Physiol.* 142. p.89-94.
- **Ballesteros ML, Wunderlin DA, Bistoni MA (2009).** Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol Environ Saf* 72(1) :199–205.
- **Barillet, S., (2007).** Toxicocinetique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). *PhD Thesis, Paul Verlaine University at Metz.* 476 p.
- **Barker, G. M. (Ed.). (2001).** *The biology of terrestrial molluscs.* CABI.
- **Bas H., Kalender Y., (2011).** Chlorpyrifos Induced Cardiotoxicity in Rats and the Protective Role of Quercetin and Catechin, Gazi University. *Journal of Science*, Vol 24(3), pp: 387-395.
- **Basopo N., (2015).** Toxicological Effects of Chlorpyrifos and Lead on the Aquatic Snail *Helisoma duryi*, *Advances in Biological Chemistry.* Vol 5, pp : 225-233.

- **Baurand.P. E. (2014).** Embryotoxicité de contaminants métalliques et organiques chez l'escargot *Elicia aspersa*. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de l'Environnement Université de Franche-Comté. 207p.
- **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.)
- **Beeby A., Richmond L.( 2011).** Magnesium and the deposition of lead in the shell of three populations of the garden snail *Cantareus aspersus*. *Environmental Pollution*, 159(6): 1667-1672.
- **Belhaouchette N, (2014).** Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix aspersa* ». Université Badji Mokhtar Annaba, P94.
- **Belli N., Lahouel M., Chebab S., Tekouk M et Leghouchi E., (2010).** Stress oxydant induit par la coexposition au plomb et au cadmium : deux contaminants des eaux souterraines de Oued Nil (Jijel - Algérie), *Journal of Water Science*. Vol 23(3), pp : 289-301.
- **Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M. Djebar M.R., (2012).** Toxic effects of phosphoramidate on Paramecium sp. with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicol Environ Chem*. 94(3) : (557-565).
- **Bertrand, S., et Renaud, J.M. (2004).** Je construis mes apprentissages en sciences en premier degré.pp. 1-43.
- **Bonnet, J. C., Vrillon, J. L. (1990).** L'escargot *Helix aspersa* biologie-élevage. *Edition INRA*.14-15.
- **Bouariche, C., Kedadouche, N., & Abdelli, M. 2022.** État des connaissances sur l'impact des substances nanométriques sur l'environnement et les organismes vivants. Université de Béjaïa.
- **Bouachiba Y (2010).** Synthèse de films TiO2 et étude structurale et optique, Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine 1.
- **Boué H., chaton R., (1971).** B.A. Zoologie I. Invertébré. Ed. *Dion, Paris.*, page 376.
- **Bourbia-Ait Hamlet S., (2013).** Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Université Badji Mokhtar Annaba, P177.
- **Buron-Mousseau, F. (2014).** Accouplement de Petits-Gris. Dans *Zoologie*. Consulté en ligne le : 01 juin 2017 à l'URL : <http://www2.aclyon.fr/enseigne/biologie/photossql/photos.php?RollID=images&FrameID=escargot1>

## C

- **CABI. (2020).** *Cornu aspersum* (common garden snail). In *Invasive species compendium*. [<https://www.cabi.org/isc/datasheet/26821>]
- **Cao, G. (2004).** Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications. *Imperial College Press*.
- **Carbone, D., & Faggio, C. (2019).** *Helix aspersa* as sentinel of development damage for biomonitoring purpose: a validation study. *Molecular reproduction and development*, 86(10), 1283-1291.

- **Charrier, M., & Brune, A. (2003).** The gut microenvironment of helcid snails (*Gastropoda : Pulmonata*) : In-situ profiles of pH, oxygen, and hydrogen determined by microsensors. *Canadian Journal of Zoology*, 81(5), 747–758. <https://doi.org/10.1139/z03-071>
- **Charrier, M., Fonty, G., Gaillard-Martinie, B., Ainouche, K. et Andant, G. (2006).** Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biological Research*, 39(4) : 669-81.
- **Chase R, (1986).** Les sons from Snail Tentacles, *chemical Senses.*, pages 411-421.
- **Chen, J., Shao, M., Yang, H., & Li, Y. (2011).** Effects of titanium dioxide nanoparticles on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in intestines and gills of *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 104(3-4), 303-309.
- **Chen, X., & Mao, S. S. (2007).** Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications and applications. *Chemical Reviews*, 107(7), 2891–2959
- **Chevalier, H., (1977).** La variabilité de l'escargot petit-gris *Helix aspersa* Muller, Bull. Mus. Nat. Hist. Nat., 3<sup>e</sup> sér. 448, *Zoologie 3 11* : pp. 425-442.
- **Chevallier, H., (1982).** Facteurs de croissance chez des gastéropodes pulmonés terrestres paléarctiques en élevage. *Haliotis*, 12, 29-46.
- **Chevallier, H., (1992).** L'élevage des Escargots. Production et Préparation du 14PetitGris. 2<sup>e</sup>ème édition. Edition du point vétérinaire, *Maison-Alfort*.
- **Choi, J., Liu, R.M., and Forman, H.J., (1997).** Adaptation to oxidative stress : quinone-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells. *Biochem Pharmacol*, 53 (7), 987-993.
- **Chuto G ,P. Chaumet-Riffaud , et le Groupe Oncologie de la Société française de médecine nucléaire et imagerie moléculaire (SFMN) (2010).** Les nanoparticules. *Médecine Nucléaire* 34 (2010) 370 –376.
- **Cobbinah J C., Vink A., et Onwuka B., (2008).** L'élevage d'escargots (Production Transformation et commercialisation). Ed. Fond. *Agromisa, Wageningen.*,page 84
- **Coeurdassier M., Saint-Denis, M., Gomot-de Vaufleury, A., Ribera, D., Badot, P.M. (2001).** The garden snail (*Elicia aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environmental Toxicology and C.* 20, 1951- 1957.
- **Cortet J. (1999),** Les micro-arthropodes du sol et la décomposition de la matière organique, bio-indicateurs de la gestion des sols agricoles en zones de grandes cultures, *The sis*, Marseille, France, 1999.

### 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.
- **Daguzan J. (1981).** Contribution à l'élevage de l'escargot petit-gris : *Helix aspersa Müller* (mollusque gastéropode pulmoné stylommatophore). I. Reproduction et éclosion des jeunes en bâtiment et en conditions thermohygro-métriques contrôlées. *Ann. Zootechn.*30. p.249-272.
- **Dallinger, R., Berger, B., Triebkom, R., Kohler, H. (2001).** Soil biology and ecotoxicology. In: Baker G.M. (Ed). *The biology to terrestrial molluscs. CAB International, Oxon, Wallingford, UK*, 489-525

- **De Vaufleury, A., Fritsch, C., Gimbert, F., Pauget, B., Coeurdassier, M. CRINI, N., & Scheifler, R. (2009).** Utilisation et intérêt des escargots et des micromammifères pour la bio-indication de la qualité des sols. *Etude et Gestion des Sols*, 16, 3/4, 203-217p.
- **Delay M., et Frimmel F., 2012.** Nanoparticles in aquatic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 402: 583-592
- **Di Monte D., Lavasani M., (2002).** Manning-Bog Ab. Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 23 : 487-502.
- **Díaz, S., Settele, J., Brondizio, E. S., et al. (2019).** Pervasive human-driven decline of life on Earth points to the need for transformative change. *Science*, 366(6471), 3100.
- **Diebold, U. (2003).** The surface science of titanium dioxide. *Surface Science Reports*, 48(5–8), 53–229.

### E

- **EL –wakil H.B., Radwan M.A., (1991).** Biochemical studies on the terrestrial snail, *Eobania vermicula* (Muller) treated with some pesticides, *J. Environ. Sci. Health*. B 26, 479-489.
- **El-Demerdash, F.M., (2007).** Lambda-cyhalothrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidant. *Toxicol in Vitro.*, 21: 392-397.
- **Escher B.I. & Hermens J.L.M., (2002).** Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects, *Environmental Science and Technology*, 36, 4201-4217.

### F

- **Federici, G., Shaw, B. J., & Handy, R. D. (2007).** Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): oxidative stress, apoptosis and other physiological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(10), 2161-2167.
- **Fernández, J. (1972).** Nervous system of the snail *Helix aspersa*. *Cell and Tissue Research*, 127(2), 157–182. <https://doi.org/10.1007/BF00324617>
- **Fernando, L., Senevirathna, D., & Pathiratne, A. (2012).** Vitellogenin as a biomarker of endocrine disruption in aquatic organisms. *Journal of Environmental Biology*, 33(1), 1–9.
- **Flechtmann CHW ; Baggio D. (1985).** Sur la présence de Riccardoella linacum (Schrank, 1781) (Acari, Ereyneidae) dans des élevages d'escargots (*Helix pomatia* L. et *H. aspersa* L.) au Brésil. *Anais da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidad de Sao Paulo*, 42(1) :51-54.
- **Fränzle O., (2003).** Bioindicators and environmental stress assessment. Bioindicators and biomonitors : principles, concepts and applications, B.A. Market, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors (*Amsterdam : Elsevier Science Ltd.*), pp. 41-84
- **Fretter, V., & Peake, J. F. (1971).** *Pulmonates: Functional anatomy and physiology*. *Academic Press*.
- **Fridovich, I. (1978).** The biology of oxygen radicals. *Science*, 201(4359), 875-880.
- **Fujishima, A., & Honda, K. (1972).** Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature*, 238, 37–38. <https://doi.org/10.1038/238037a0>
- **Fuster, M. (2022).** Importance quantitative et fonctionnelle de nanoparticules organiques inédites dans les réseaux trophiques aquatiques. Thèse de doctorat, Université Clermont Auvergne.

### G

- **Gambardella, C., & Pinsino, A. (2022).** Nanomaterial ecotoxicology in the terrestrial and aquatic environment: a systematic review. *Toxics*, 10(7), 393.
- **Gamlin et Vines., (1996).** L'évolution de la vie. Artes Graficas, S. A. Ed. *Vicirria Espagne*, page 24.
- **Garner, K. L., & Keller, A. A. (2014).** Emerging patterns for engineered nanomaterials in the environment : A review of fate and toxicity studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(11), 2503.
- **Ge, Y., Schimel, J. P., & Holden, P. A. (2018).** Evidence for negative effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environmental Science & Technology*, 52(4), 2165–2172.
- **Gimbert, F. (2006).** Cinétique de transfert de polluants métalliques du sol à l'escargot. Thèse de Doctorat en Science de la vie, *Université de FrancheComté*, Besançon, France, .192p.
- **Gireaud O., (2008).** *Helici culture*. Consultable sur internet : <http://www.gireaud.net/helici culture. Htm>
- **Gomot A. (1997).** b.Double labelling of neural grafts for identification of sites mediating growth in snails. *Biol. Cell*. 89. 133-140.
- **Gottschalk, F., Kost, E., & Nowack, B. (2015).** Engineered nanomaterials in soils and water: How do they behave and where do they end up? *Environmental Science: Nano*, 2(6), 515–532.
- **Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., & Nowack, B. (2009).** Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology*, 43(24), 9216–9222. <https://doi.org/10.1021/es9015553>
- **Gottschalk, F., Sun, T., & Nowack, B. (2013).** Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environmental Pollution*, 181, 287–300.
- **Grara N., Atailia A., Boucenna M, Berrebbah H., Djebbar M.R., (2016).** Etude biochimique et histopathologique de la toxicité des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord- Est Algérien) chez *Helix aspersa*. *Journal of Materials and Environmental Science* ; 7 (12) :( 4733-4741).
- **Grara, N., Atailia, A., Boucenna, M., Berrebbah, H., Djebbar, M. R. a. (2012).** Toxicity of metal dust from Annaba steel complex (Eastern Algeria) on the morpho physiological parameters of the snail *Elicha aspersa*. *Advances in Environment* 0756. 6(2). 605 – 611.

### H

- **Hanna, P.M., Mason, R.P., (1992).** Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu (I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spintrapping technique. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 295, 205-13.
- **Hao, L., Liu, Y., Li, C., & Wang, J. (2009).** Cellular pathologies in liver of *Cyprinus carpio* exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 187(3), 134-142.
- **Hong, F., Jiang, X., Gu, J., & Li, Q. (2015).** Excitotoxicity and neuronal dysfunction mediated by NMDA receptor activation in hippocampal neurons exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Neurotoxicology*, 48, 74-82.

- **Horrenberger, N., (2021).** Comment se passe l'hibernation de l'escargot ? Revue Salamandre. Disponible sur : <https://www.salamandre.org/article/comment-les-escargots-passent-ils-lhiver> (consulté le 22 avril 2025).

### I

- **Iglesias, J. et Castillejo, J. (1998).** Field observations on feeding of the land snail *Helix aspersa* Müller. Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain. *Oxford Journals, Life Sciences, Journal of Molluscan Studies*, 65: 411-423.
- **Ismert M., Oster T., Bagrel D., (2002).** Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail *Helix aspersa* .Chemosphere. 46 : 273-280.
- **ISO. (2015).** Terminologie et définitions des nano-objets liés aux nanotechnologies : nanoparticules, nanofibres et nanoplaques (ISO/TS 80004-2 :2015). Organisation internationale de normalisation.

### J

- **Jargot, D., Zirah, S., & Moulti-Mati, F. (2013).** Risques liés aux nanomatériaux : le cas du dioxyde de titane. Techniques de l'Ingénieur, sécurité et gestion des risques.

### K

- **Kahli H (2015).** Evaluation du stress oxydatif induit par les nanoparticules chez *Helix aspersa* : Cas du dioxyde de titane. Université Badji Mokhtar Annaba, P53
- **Kahru, A. et Dubourguier, H. C. (2010).** Ecotoxicology of nanomaterials. *Environmental Pollution*, 158(5), 2185-2193. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.01.015>
- **Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., & Suh, S. (2013).** Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(6), 1692.
- **Keller, A. A., Wang, H., & Zhou, D. (2013).** Environmental fate and behavior of nanomaterials: current knowledge and gaps. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(4), 711–729.
- **Kelly, F. J., Hallsworth, P., & Mudway, I. S. (1998).** Oxidative damage in biological systems: mechanisms and consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(7), 790-806.
- **Kendra, L., et al. (2015).** Using snails as bioindicators of environmental pollution. *Ecotoxicology*, 24(7), 1457–1465.
- **Kerney M P., Cameron R A D., (2006).** Guide des escargots et limaces d'Europe Identification et biologie de plus de 300 espèces, *Delachaux et Niestle*, Lausanne Paris., page 386.
- **Kerney M., Cameron R. et Bertrand A. (2006).** A field guide to the land snails of Britain and north/west Europe. *Delachaux et Niestlé SA*, Paris, 2006, 288 p.
- **Kerney, M. (1999).** Atlas of the land and freshwater molluscs of Britain and Ireland. *Colchester (Harley)*. 264p.

- **Khalil AM., (2015).** Toxicological effects and oxidative stress responses in fresh water snail, *Lanistes carinatus*, following exposure to chlorpyrifos, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol 11, pp : 137–142.
- **Khene L, Berrebbah H, Yahyaoui A, Bouarroudj T, Zouainia S, Kahli H, Bourayou C, (2017).** Biomarkers of oxidative stress, lipid peroxidation and ROS production induced by TiO<sub>2</sub> microparticles on snails *Helix aspersa*. *Studia Universitatis*. 27 (2) :127-133.
- **Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE and al. (2008).** Nanomaterials in the Environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem*; 27: 1825-1851.
- **Koeman, J.H., (1991).** From comparative physiology to toxicological risk assessment, *Comparative Biochemistry and physiology*, 100, 7-10.
- **Kohen, R., & Nyska, A. (2002).** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
- **Köhler, H.-R., & Triebkorn, R. (2021).** Nanoparticles and the environment: The need for a comprehensive assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(1), 1–4. <https://doi.org/10.1002/etc.4847>.

### L

- **Lange, T., Schneider, P., Schymura, S., & Franke, K. (2022).** Environmental fate of metal nanoparticles in estuarine environments. *Water*, 14(8), 1297. <https://doi.org/10.3390/w14081297>.
- **Lanone, S., & Boczkowski, J. (2010).** Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: Molecular mechanisms. *Current Molecular Medicine*, 10(6), 614-627. <https://doi.org/10.2174/156652410792015585>
- **Larese Filon, F., D’Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Bovenzi, M., & Maina, G. (2009).** Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*, 255(1–2), 33–37.
- **Letellier, C., (2010).** Capacité antioxydant chez les hélicidés : variations intraspécifiques et interspécifiques. Master 2 EFCE. UMR 6553, équipe S.C.A.
- **Li, M., Zhu, L., & Lin, D. (2011).** Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli* : Mechanism and the influence of medium components. *Environmental Science & Technology*, 45(5), 1977–1983.
- **Liu, R., Zhang, Z., & Li, X. (2018).** Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate, and ecotoxicity. *Science of The Total Environment*, 615, 1071–1081. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.121>
- **Livre blanc de l’EPA sur la nanotechnologie, Livre blanc sur la nanotechnologie.** Amendement (EPA) Agence américaine de protection de l’environnement (Washington). (2007), p. 120.
- **Long, T. C., Saleh, N., Tilton, R. D., Lowry, G. V., & Veronesi, B. (2007).** Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and apoptosis in mammalian cells. *Toxicology*, 230(1), 38-46.

### M

- **Ma, L., Liu, J., Liu, J., & Liu, Y. (2003).** Biochemical effects of nanomaterials on animal models: TiO<sub>2</sub> nanoparticles induced oxidative stress. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2(2), 124–132.
- **Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010).** Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408(16), 3053–3061.
- **Madec, L., (1983).** Importance des conditions climatiques et de l'origine des individus pour la reproduction de l'escargot petit-gris en élevage sous bâtiment contrôlé. *Session ITAVI*, Rennes.
- **Masse.R. et Boudéne. C., (2013).** Des Maladies Professionnelles et de l'Environnement, Les Nanoparticules : *une nouvelle classe de toxiques environnementaux* 74 :316-319.
- **Matthieu H, (2014).** Toxicité de deux tyopes de nanoparticules d'argent sur la -cyanobactérie modèle : *Synchococcus elongotus. Pcc 7942.*, pages 1-2-7.
- **McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M., Yu H., (2000).** Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 2085-2092.
- **Meister, A., Anderson, M.E., (1983).** Glutathione. *Ann. Rev.Biochem.* 52, 711–760.
- **Müller, O.F. (1774).** Vermium terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum, et testaceorum, non marinorum, succinct historia. Volumenalterum. - pp. I-XXXVI [= 1-36], 1-214, [1-10]. *Havniæ & Lipsiæ. Heineck et Faber*, p. 59.

### N

- **Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006).** Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622–627.
- **Notten .M.J.M., Oosthoek A.J.P., Rozema J., Aerts R. (2006).** Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the landsnail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. *Ecotoxicology*. 15.P.295-304.
- **Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R. (2005).** Heavy metal concentrations in a soil-plantsnail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution* 138 : (178-190).

### O

- **Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005).** Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–839.

### P

- **Papilio. (2025).** Escargot *Helix aspersa* pondant des œufs. Dans Alamy Banque d'Images. Consulté en ligne le : 26 avril 2025 à l'url : <https://www.alamyimages.fr/escargot-helix-aspersa-pondre-des-oeufs-dans-le-sol-a-l-animal-nuit-nature-imagek6yb80>.
- **Pirame Sandrine, (2003).** Contribution à l'étude de la pathoogie estivale de l'escargot petit gris (*Helix aspersa*) reproduction expérimentale, « thèse de doctorat, université Paul Sabatier de Toulouse ».
- **Protiere Myriam, 2006.** Synthèse de nano cristaux fluorescents de semi-conducteurs II-VI et III-V. Augmentation de l'échelle de synthèse » thèse de doctorat .université joseph Fourier Grenoble I.

### Q

- **Quignard, F. (2013).** Nanoparticules et matériaux innovants. *Matériaux et Techniques*, 101(5), 20-29.

### R

- **Rahman, M. F., Wang, J., Patterson, T. A., Saini, U. T., Robinson, B. L., Newport, G. D., Ali, S. F., & Brown, J. M. (2002).** Induction of apoptosis by titanium dioxide nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology Letters*, 134(1-3), 25-34.
- **Rajapakse, N., Silva, R. J., & Lockridge, O. (2012).** Hepatic antioxidant changes following exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263(2)
- **Ramade, F. (1992).** *Précis d'Ecotoxicologie*, Ed Masson.
- **Ramsden, C.S., T.B. Henry and R.D. Handy, (2013).** Sub-lethal effects of titanium dioxide nanoparticles on the physiology and reproduction of zebra fish. *Aquat. Toxicol.*, 126: 404-413.
- **Reeves, J. F., Davies, S. J., Dodd, N. J. F., & Jha, A. N. (2008).** Hydroxyl radicals ( $\bullet\text{OH}$ ) are associated with titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 640(1-2), 113-122.
- **Reeves, J. L., Patel, S., & Kroll, D. J. (2008).** DNA damage induced by hydroxyl radicals generated from titanium dioxide nanoparticles. *Mutation Research*, 652(1-2), 121-130.
- **Regoli, F., and Pricipato, G., (1995).** Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31: 143-164.
- **Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F., (2006).** Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environ. Health Perspect.* 114, 63-69.
- **Rikans, L. E., & Hornbrook, K. R. (1997).** Lipid peroxidation, antioxidant protection, and aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1362(2-3), 116-127.
- **Rjeibi I, (2016).** Oxidative damage and hepatotoxicity associated with deltamethrin in rats : The protective effects of *Amaranthus spinosus* seed extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 84(8): 853-860.

### S

- **Salinas, A.E., Wong, M.G., (1999).** Glutathione S-transferases – a review. *Curr. Med. Chem.* 4, 279-309.
- **Sandrine, L. (2013).** Contrôle des propriétés des nanomatériaux. *Techniques de l'Ingénieur*, 122(3), 34-40.
- **Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2022).** Gold and silver nanoparticles functionalized with 4', 7-dihydroxyflavone exhibit activity against *Leishmania donovani*. *Acta Tropica*, 231, 106448.

- **Scheifler, R., Gomot-De Vaufleury, A., Badot, P.-M. (2002) a.** Transfer Of Cadmium From Plant Leaves And Vegetable Flour To The Snail *Helix Aspersa*: Bioaccumulation And Effects. *Ecotoxicol Environ Saf.* 53, 148–153.
- **Scheifler, R., Gomot-De Vaufleury, A., Toussaint, M.L., Badot, P.-M. (2002) b.** Transfer And Effects Of Cadmium In An Experimental Food Chain Involving The Snail *Helix Aspersa* And The Predatory Carabid Beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* 48, 571–579.
- **Schroeder, P., Fischer, C., & Calles, C. (2009).** The role of oxidative stress in DNA damage and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 27(1), 1–23.
- **Sies, H., Ketterer, B., (1988).** Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance. Academic Press, London, 480 pages.
- **Soltani N., Rehim N., Drardja H., Bendali F., (1999)** Activité du triflumuron à l'égard de *Culex pipiens* et impacts sur deux espèces larvivoires non visées. *Ann. Soc. Entomol. Fr*, 35, 59-64.
- **Srivastava, S., & Singh, A. (2015).** Toxic impact of environmental pollutants on snail gonadal development. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(4), 258–265. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1007187>
- **Sugimoto, T., Zhou, X., & Muramatsu, A. (2003).** Synthesis of uniform anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles by gel–sol method: 4. *Shape control*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 259(1), 43–52. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(02\)00184-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00184-2)
- **Suha Mubarak, S. (2016).** Endocrine disrupting effects of environmental contaminants on molluscan reproduction. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(21), 21563–21570. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7345-9>
- **Sun X., Song Q., Barrett B., (2003).** Effect of ecdysone agonists on vitellogenesis and the expression of EcR and USP in codling moth (*Cydia pomonella*). *Arch. Insect. Biochem. Physiol*, 52(3), 115-129.
- **Swaih K.M., Ezzughayyar A., (2001).** Dose-dependent effects of dietary Pb and Zn on feeding and growth rates of the land snail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 50: 9-14.

### T

- **Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., Meister, A., (1989).** Glutathione Centennial: Molecular Perspectives and Clinical Applications. *Academic Press*, London, 441 pages.
- **Tian, Y., & Zhang, H. (2022).** Controlled synthesis of noble metal nanomaterials: motivation and strategies *Aquatic and Aquatic Biosciences*, 34(2), 123-145.

### U

- **United Nations Environment Programme. (2019).** Global Environment Outlook – GEO-6: *Healthy Planet, Healthy People*. Cambridge University Press.

### V

- **Valérie.B., (2009).** Mise au point et validation, sur sites contaminés, (ETM-HAP) d'un test de biosurveillance en microcosme : croissance et bioaccumulation par le gasteropode terrestre *Helix aspersa*. 21 p.
- **Vallardi, F., (1971).** La grande encyclopédie du monde animal (poissons, invertébrés). *Tome III* : 455-459.
- **Van der Ploeg, M. J. C., Handy, R. D., Waalewijn-Kool, P. L., van den Berg, J. H. Jabrunz, A., Ragas, A. M. J., & van Gestel, C. A. M. (2020).** Effects of silver nanoparticles on soil invertebrates: A review of toxicity, bioavailability and potential ecological risks. *Environmental Pollution*, 267, 115635.
- **Van der Ploeg, M., et al. (2020).** Effects of nanoparticles on soil invertebrates: a meta-analysis. *Science of The Total Environment*, 715, 136976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136976>,
- **Viard B., Maul A., Pihan J.-C. (2004).** Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination. *Journal of Environmental Monitoring*. 6: 103-107.
- **Viarengo, A., (1994).** Heavy metal cytotoxicity in marine organisms: effects on Ca2 homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 20, 85–110.
- **Viarengo, A., Nott, J., (1993).** Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.* 104, 355–372.

### W

- **Ward B., (2006).** Unraveling Collagen structure to be installed in Orange Memorial Park Sculpture Garden. In : *Expert Review Proteomics*, 3(2,2) : 174.
- **Weckberker, G. and Cory, G., (1988).** Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells in vitro. *Cancer letters* 40: 257-264.
- **Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., & von Goetz, N. (2012).** Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental Science & Technology*, 46(4), 2242–2250.
- **Witschger, O., Fabries, J.F. (2005).** « Particules ultrafines et santé au travail ». Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *Hygiène et sécurité du travail*, 199 :ND2227

### Y

- **Yan, Y., Du, J. S., Gilroy, K. D., Yang, D., Xia, Y., & Zhang, H. (2017).** Intermetallic Nanocrystals: Syntheses and Catalytic Applications. *Nature Reviews Materials*, 2(9), 17081. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.81>
- **Yang, W., Wang, L., Mettenbrink, E. M., DeAngelis, P. L., & Wilhelm, S. (2021).** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61, 269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032320-110338>
- **Yang, Y., Westerhoff, P., & Hristovski, K. (2005).** Fate and transport of engineered nanomaterials in the environment. *Journal of Environmental Quality*, 34(1), 40–50.

- **Yokel, R. A., & MacPhail, R. C. (2009).** Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 4(1), 9.

### Z

- **Zaafour, M. (2014).** Étude écophysiologique de la reproduction de l'escargot terrestre Petit-Gris (*Elicia aspersa aspersa*, Gastropoda: Stylommatophora; Helicidea) dans la région Nord-Est d'Annaba – Algérie. Thèse de Doctorat en Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba . 109p.
- **Zaldibar, B., Cancio, I., & Marigómez, I. (2007).** Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. *Aquatic toxicology*, 81(2), 183-196.
- **Zhang, H., Ji, Z., Xia, T., Meng, H., Low-Kam, C., Liu, R., ... & Nel, A. E. (2009).** Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS Nano*, 6(5), 4340–4355.
- **Zhao, J., Li, Y., Wang, S., & Zhou, M. (2009).** Intracellular ionic imbalances and apoptosis in rat hippocampal neurons exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Neurochemical Research*, 34(7), 1160-1168.
- **Zhao, J., Wang, Z., Liu, X., Xie, X., Zhang, K., & Xing, B. (2013).** Distribution and bioaccumulation of manufactured nanoparticles in aquatic organisms : A review. *Environmental Pollution*, 182, 1–18.
- **Zlaa, S., Houas, A., & Labidi, A. (2014).** Étude de l'adsorption et de la photocatalyse du bleu de méthylène en présence du dioxyde de titane. *Revue des Sciences de l'Eau*, 27(1), 1–14.
- **Zouaghi M F., Berrebbah H., Réda Djrbar M., Amamra R., (2015).** Study of the behavior/adaptation of non-target biological models exposed to multiple pollution, *J. Bio. & Env. Sci*, Vol. 7(2), pp: 207-215.