



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 : SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : TOXICOLOGIE.

## Intitulé :

Évaluation de la toxicité de nanoparticules de dioxyde de titane ( $TiO_2$ ) sur un bioindicateur de la pollution terrestre :

*Helix aspersa*

## Présenté par :

BENZIANE Icherak & MENDOUD Aicha

Soutenu le 11/ 06 / 2024, Devant le Jury :

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

Année Universitaire 2023/2024

# *Remerciements*

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos Remerciements et notre profonde gratitude, avant tout à Dieu qui nous a donné le Courage et la force pour mener à bout ce modeste travail.

Nous remercions chaleureusement notre encadrant Dr MOUMENI Ouissem, pour ses judicieux conseils, ses directives précieuses, et de son soutien scientifique et moral au cours de la réalisation pratique et théorique de ce Travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Mr. Mezdour Hichem et Mr. Loukil Bachir.

Nos remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

## *Dédicaces*

Tout d'abord je remercie le dieu notre créateur de m'avoir donné la force la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail.

Je dédie ce travail à **ma mère** la source de tendresse et la lumière qui guide mes routes, pour ses sacrifices consentis pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

À **mon père** que je le remercie énormément pour ses efforts pour la persévérance et de l'honnêteté, merci pour tout.

À ma deuxième mère ma grande sœur **Hanane** mon support qui était toujours à mes cotes qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.

A mes chers frères **Hichem, Linda, Nawal, Salah eddin, Fouad, Ibtissam** et à mes belle-sœur **Nasira** et **Sara** à tous **mes neveux**, merci pour votre humour contagieux et votre présence réconfortante, vous êtes ma source de joie et de bonheur, et je suis fière de vous avoir dans ma vie.

À mon deuxième frère Hichem souici qui Allah te garde.

À mes très chères amies Ibtissam, Houda, Aya, Asma, Fatma, Amina, mon voisin Amel, mes cousins Ramla et bouthaina.

À ma binôme Aicha Mendoud

*Ichrak benziane*

# Dédicace

Avec tous mes sentiments de respect, avec d'expérience de ma reconnaissance, je dédie ma remise de diplôme et ma joie

Tout d'abord, à mon paradis, à la prunelle de mes yeux, à la source de ma joie et mon bonheur, ma lune et le fil d'espoir qui allumer mon chemin, ma moitié maman que dieu ait ton âme tu resteras à jamais dans mon cœur

A celui qui m'a fait une femme, ma source de vie, d'amour et d'affection, à mon support qui était toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, Abi et sa femme tante mouna

A mon frère abdrehman et mes sœurs ines et malika sans oublier mon petit ange nada pour l'amour qu'ils me réservent

A ma chère tante louiza qui a été comme une seconde mère pour moi

A mes meilleurs amis aya et wafa, votre amitié a été ma lumière et ma force tout au long de ce voyage .merci pour votre soutien

Sans oublier mon binôme ichrak benziane pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

Aicha



## Résumé

Le but de cette étude est l'évaluation des effets toxiques potentiels des nanoparticules métalliques de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur une espèce bioindicatrice et bioaccumulatrice de la pollution, l'escargot terrestre : *Helix aspersa*.

L'exposition de 28 jours par voie digestive aux concentrations croissantes de TiO<sub>2</sub> (25, 50, 100 et 150 mg/L) a révélé une perturbation comportementale à travers une réduction voire une inhibition de l'activité des escargots ainsi qu'une diminution de la consommation de nourriture ou encore un évitement de celle-ci. Sur le plan morphométrique, la toxicité des nanoparticules métalliques s'est manifestée par une diminution du poids moyen des escargots et du diamètre de la coquille ainsi qu'une augmentation du poids moyen des organes (hépatopancréas et rein). Au niveau biochimique, le TiO<sub>2</sub> a engendré un stress oxydatif qui s'est traduit à l'échelle cellulaire par une déplétion du taux de GSH parallèlement à une intensification de l'activité enzymatique CAT.

**Mots clés :** *Helix aspersa*, nanoparticules métalliques, TiO<sub>2</sub>, hépatopancréas, rein, stress oxydant, biomarqueurs, GSH, CAT, bioaccumulation.

## Abstract

The aim of this study is to evaluate the potential toxic effects of metallic titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on a bioindicator and bioaccumulator species of pollution, the land snail: *Helix aspersa*.

Exposure for 28 days through the digestive tract to increasing concentrations of TiO<sub>2</sub> (25, 50, 100 and 150 mg/L) revealed a behavioral disturbance through a reduction or even inhibition of the activity of the snails as well as a decrease in the consumption of food or even an avoidance of it. Morphometrically, the toxicity of metal nanoparticles was manifested by a reduction in the average weight of the snails and the diameter of the shell as well as an increase in the average weight of the organs (hepatopancreas and kidney). At the biochemical level, TiO<sub>2</sub> caused oxidative stress which resulted at the cellular level in a depletion of GSH levels alongside an intensification of CAT enzymatic activity.

**Keywords:** *Helix aspersa*, metal Nanoparticles, TiO<sub>2</sub>, Hepatopancreas, kidney, Oxidative Stress, Biomarkers, GSH, CAT, bioaccumulation,

## الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثيرات السامة المحتملة للجسيمات النانوية المعدنية لثاني أكسيد التيتانيوم ( $TiO_2$ ) على نوع من المؤشرات الحيوية والمترجمة الحيوية للتلوث، الحلزون الأرضي: *Helix aspersa*.

كشفت التعرض لمدة 28 يومًا عبر الجهاز الهضمي لتركيزات متزايدة من ثاني أكسيد التيتانيوم (25 و 50 و 100 و 150 ملغم/لتر) عن اضطراب سلوكي من خلال تقليل أو حتى تثبيط نشاط القواقع بالإضافة إلى انخفاض استهلاك القواقع. الطعام أو حتى تجنبه. من الناحية الشكلية، تجلت سمية الجسيمات النانوية المعدنية في انخفاض متوسط وزن القواقع وقطر الصدفة وكذلك زيادة متوسط وزن الأعضاء (الكبد والبنكرياس والكلية). على المستوى الكيميائي الحيوي، تسبب  $TiO_2$  في حدوث إجهاد تأكسدي أدى على المستوى الخلوي إلى استنفاد مستويات GSH إلى جانب تكثيف النشاط الأنزيمي CAT .

**الكلمات المفتاحية:** *Helix aspersa*، الجسيمات النانوية،  $TiO_2$ ، البنكرياس الكبدي، الكلي، الاجهاد التأكسدي، المؤشرات الحيوية، GSH، CAT، التراكم الحيوي.

## Liste des tableaux

---

N°	Titres	Pages
1	Classification de l'espèce <i>Helix aspersa</i> (Muller, 1774)	04
2	Propriétés des trois formes cristallines des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> (Argot et al., 2013)	13

## Liste des figures

N°	Titres	Pages
1	<i>Helix aspersa</i> (photo personnelle)	04
2	Morphologie externe de l'escargot (Kerney et al., 2006)	05
3	Anatomie interne de l'escargot (Quibik, 2007)	06
4	Appareil digestif de l'escargot (Skendraoui, 2015)	07
5	Schéma de l'appareil reproducteur de l'escargot (Guyard, 2009)	08
6	Les voies d'exposition de l'escargot <i>Helix aspersa</i> aux polluants dans le milieu naturel (Sahraoui, 2022)	11
7	Les nanoparticules dioxyde de titane (TiO <sub>2</sub> ) (photo personnelle)	12
8	Elevage d' <i>Helix aspersa</i> au laboratoire (photo personnelle)	15
9	Photo des lots d'escargots exposés aux concentrations croissantes des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> (photo personnelle)	16
10	Dissection des escargots et prélèvement des organes (photo personnelle). <b>A</b> : Incision de la coquille d'escargots ; <b>B</b> : Séparation des organes, <b>C</b> : Hépatopancréas, <b>D</b> : Rein	17
11	Effet des concentrations croissantes de nanoparticules de TiO <sub>2</sub> sur l'évolution du poids moyen des escargots durant les 28 jours de traitement (m ± SD ; n = 8)	21
12	Poids moyens de l'hépatopancréas et du rein des escargots témoins et traités par les concentrations croissantes de TiO <sub>2</sub> après 28 jours de traitement (m ± SD ; n = 8)	22

## Liste des figures

<b>13</b>	Effet des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> sur le taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots <i>Helix aspersa</i> ( $m \pm SD$ ; $n = 4$ )	<b>23</b>
<b>14</b>	Effet des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> sur l'activité CAT au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots <i>Helix aspersa</i> ( $m \pm SD$ ; $n = 4$ )	<b>24</b>

## Liste des abréviations

---

**AgNPs** : nanoparticules d'argent

**ASS** : Acide sulfosalicylique

**BBC** : bleu brillant de Coomassie.

**CAT** : Catalase

**CuO** : Oxyde de cuivre

**DTNB** : Acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque

**EDTA** : Ethylène diamine tétra-acétique

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**ETMs** : Éléments traces métalliques

**GSH** : Glutathion réduit

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**Mg** : milligramme

**mg/L** : Milligramme sur litre

**Min** : minute

**ml** : millilitre

**nm** : Nanomètre

**NMx** : nanomatériaux.

**NPs** : Nanoparticules.

**ROS** : Reative Oxygen Species

**SOD** : La superoxyde dismutase

**TiO<sub>2</sub>** : Dioxyde de titane

**Tris** : Tris hydroxy méthyl-amine-méthane

**UV** : Rayonnement Ultraviolet

**ZnO** : Oxyde de zinc

## Liste des abréviations

---

**μl** : microlitre

**%** : Pourcentage

**° C** : Degré Celsius



# Table des matières

---

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

<b>1. Introduction.....</b>	<b>01</b>
<b>2. Matériel et méthodes.....</b>	<b>04</b>
<b>2.1. Matériel biologique .....</b>	<b>04</b>
<b>2.1.1. Présentation et classification de l'espèce <i>Helix aspersa</i>.....</b>	<b>04</b>
<b>2.1.2. Anatomie générale .....</b>	<b>04</b>
<b>2.1.2.1. Anatomie externe de l'escargot .....</b>	<b>04</b>
<b>2.1.2.2. Anatomie interne.....</b>	<b>06</b>
<b>2.1.3. Croissance et reproduction.....</b>	<b>09</b>
<b>2.1.4. Ecologie de l'espèce.....</b>	<b>09</b>
<b>2.1.5. Intérêt de l'utilisation des escargots en écotoxicologie.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Matériel chimique.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1. Le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) : Présentation et applications.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2. Propriétés physico-chimiques.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.3. Données toxicologiques.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3. Méthodes.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.1. Conditions d'élevage.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2. Mode de traitement .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.3. Dissection et prélèvement d'organes.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.4. Paramètres étudiés.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.4.1. Etude comportementale.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.4.2 Mesure des paramètres morphométriques.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.4.2.1. Poids frais des escargots .....</b>	<b>18</b>

## Table des matières

---

2.3.4.2.2. Poids frais de l'hépatopancréas et du rein.....	18
2.3.4.2.3 Dosage des paramètres du stress oxydant.....	18
a. Dosage du taux de GSH.....	18
b. Dosage de l'activité catalase .....	19
2.4. Analyse statistique.....	19
<b>3. Résultats.....</b>	<b>20</b>
3.1. Effet des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO <sub>2</sub> ) sur le comportement des escargots.....	20
3.2. Effet des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO <sub>2</sub> ) sur les paramètres morphométriques des escargots.....	20
3.2.1. Effet sur la croissance pondérale de l'escargot <i>Helix aspersa</i> .....	20
3.2.2. Effet sur le poids moyen des organes .....	21
3.3. Effet des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO <sub>2</sub> ) sur les biomarqueurs de stress chez <i>Helix aspersa</i> .....	22
3.3.1. Effet des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> sur le taux de GSH.....	22
3.3.2. Effet des nanoparticules de TiO <sub>2</sub> sur l'activité CAT.....	23
<b>4. Discussion .....</b>	<b>25</b>
<b>5. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>29</b>
<b>6. Références bibliographiques.....</b>	<b>30</b>



# INTRODUCTION

## 1. Introduction

Ces dernières années, les nanosciences et les nanotechnologies ont suscité un intérêt croissant grâce à leurs avancées significatives dans des domaines aussi variés que la médecine, la biologie, la chimie, la biotechnologie, l'énergie, la mécanique, l'électronique ou encore l'informatique. En effet, les progrès révolutionnaires réalisés en nanotechnologie ont permis d'élaborer une grande variété de nanomatériaux (NMx) présentant des propriétés physico-chimiques exceptionnelles, inexistantes à des échelles plus grandes, les rendant utiles dans une vaste gamme de produits (**Angélique, 2008 ; Xiao et al., 2008 ; Aguilar, 2013 ; Bour, 2015 ; Biola-Clier, 2016 ; Azad et Gajanan et al., 2017**).

Les nanoparticules (NPs) figurent parmi les nanomatériaux les plus employés, occupant une importance croissante tant dans les procédés industriels que dans la recherche biomédicale (**Sandrine, 2013 ; Triboulet et al., 2014 ; Besnaci, 2016**). L'un des principaux avantages de ces nanoparticules est la capacité à contrôler leur forme, leur taille et leur composition lors de leur fabrication, ainsi que la modification de leur surface pour les adapter à différents usages. Elles possèdent, ainsi, des propriétés photocatalytiques et une forte capacité d'absorption des UV, justifiant leur intégration dans les textiles, les peintures, le ciment et les verres autonettoyants, ainsi que leur utilisation dans le traitement des sols contaminés (**Angélique, 2008**). A ce jour, les nanoparticules font l'objet de nombreuses études dans des centaines de laboratoires et d'entreprises à travers le monde, dans le but d'exploiter davantage leurs caractéristiques impressionnantes et de développer ainsi de nouvelles applications (**Daniel, 2010**). Toutefois, l'utilisation massive de ces nanomatériaux soulève actuellement des préoccupations majeures en matière de santé publique et d'environnement (**Triboulet, 2013**).

Bien que le domaine de la nanotoxicologie soit en plein essor, les résultats actuels des recherches restent insuffisants pour garantir l'utilisation sécurisée des nanoparticules. En effet, les interactions des nanoparticules avec les systèmes biologiques et leur toxicité potentielle restent à ce jour mal comprises. Par conséquent, il est encore difficile d'évaluer les risques sanitaires associés. De plus, l'utilisation industrielle de nanoparticules entraîne la production de déchets dont la libération dans l'environnement pourrait être difficile à contrôler, avec des conséquences encore largement inconnues (**Oberdörster et al., 2005 ; Triboulet, 2013 ; Sajid et al., 2015**).

L'utilisation des nanoparticules requiert donc, à l'instar de toute nouvelle technologie, des études approfondies sur leurs impacts toxicologiques sur les organismes vivants et sur

l'environnement. Dans ce cadre, de nombreuses études scientifiques sont désormais entreprises afin de mieux comprendre les interactions nanoparticules-systèmes biologiques. Ces recherches ont révélé que leur potentiel toxique est directement attribuable à leur taille nanométrique leur conférant une réactivité chimique accrue (**Oberdörster et al., 2005 ; Triboulet, 2013**).

Vu le potentiel d'introduction des nanoparticules dans le sol, habitat de nombreux organismes vivants (**Jeffery et al., 2010 ; Singh et Singh, 2020**), il est crucial d'inclure une série de tests d'écotoxicité pour évaluer leurs risques. Récemment, plusieurs chercheurs se sont penchés sur l'étude de l'impact des nanoparticules sur les organismes terrestres (**Scott-Fordsmand et al., 2008 ; Hu et al., 2010 ; Lapied et al., 2010 ; Unrine et al., 2010 a,b**), bien que les données bibliographiques relatives à ce sujet demeurent limitées (**Besnaci, 2016**).

Les gastéropodes, et plus particulièrement les escargots, comptent parmi les invertébrés terrestres les plus couramment utilisés dans les programmes de biosurveillance des sols. Leur grande sensibilité aux stress chimiques en fait des espèces modèles idéales pour les tests d'écotoxicité terrestre (**Radwan, 2000**). Ils sont considérés comme de bons bio-indicateurs permettant d'identifier ou de prévoir les atteintes aux écosystèmes et de suivre leur évolution spatiotemporelle, principalement en raison de leur grande capacité à accumuler diverses substances polluantes dans leurs tissus (**Coeurdassier et al., 2001**).

Nous avons choisi de nous intéresser, dans notre étude, aux effets du dioxyde de titane nanométrique (TiO<sub>2</sub>). Ce composé, largement utilisé comme agent de blanchiment dans divers secteurs, représente environ 70% de la production mondiale de pigments (**Shi et al., 2013**). Sa taille nanométrique lui confère également des propriétés de photocatalyse, ce qui en fait l'un des nanomatériaux les plus produits actuellement (**ANSES, 2014**). Ces chiffres soulèvent beaucoup d'inquiétudes quant à son devenir et ses impacts sur l'environnement.

Dans cette optique, l'objectif de ce travail est d'évaluer les effets des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur un organisme bio-indicateur de la qualité des sols, le gastéropode terrestre *Helix aspersa* après exposition par voie digestive. Cette voie est considérée comme majeure et représentative pour estimer la bioaccumulation et les effets toxiques des polluants (**Besnaci et al., 2016a,b**).

La structure retenue dans ce manuscrit est la suivante :

- Premièrement, l'introduction générale qui présente une synthèse des connaissances actuelles sur la nanotechnologie et la nanotoxicologie ainsi que l'utilisation des escargots comme modèles biologiques pour l'évaluation de la qualité des sols.

- Ensuite, dans la partie « Matériel et méthodes », nous décrivons le modèle animal choisi (*Helix aspersa*), et fournissons quelques données bibliographiques sur les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>). Nous détaillons également les différentes techniques mises en œuvre dans ce travail.
- Nous procédons, ensuite, à une interprétation puis une discussion des résultats obtenus.
- Enfin, nous concluons ce manuscrit par une synthèse des principaux apports de cette étude et proposons des pistes de recherches futures.



# MATÉRIEL ET METHODES

## 2. Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de chimie du Département des Sciences Biologiques à l'Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi de Bordj Bou Arréridj.

### 2.1. Matériel biologique

#### 2.1.1. Présentation et classification de l'espèce *Helix aspersa*

Le matériel biologique utilisé dans notre étude est l'escargot *Helix aspersa*, également connu sous les noms de petit gris, *Cantareus aspersus*, *Cornu aspersum* et *Criptomphalus aspersus* (**Figure 1**). Il s'agit d'un mollusque gastéropode terrestre, pulmoné, caractérisé par un corps mou dépourvu de squelette. Originaire des pays méditerranéens, cette espèce ubiquiste est largement répandue dans le Nord-Est Algérien (**Chevalier, 1977 ; Barker, 2001**). Sa position systématique selon **Bonnet et Vrillon (1990)** est la suivante (**Tableau 1**) :

**Tableau 1** : Classification de l'espèce *Helix aspersa* (**Muller, 1774**).

<b>Règne</b>	Animalia
<b>Embranchement</b>	Mollusca
<b>Classe</b>	Gastropoda
<b>Ordre</b>	Stylommatophora
<b>Famille</b>	Helicidae
<b>Genre</b>	<i>Helix</i>
<b>Espèce</b>	<i>aspersa</i>
<b>Sous-espèce</b>	<i>Aspersa</i>



**Figure 1** : *Helix aspersa* (Photo personnelle).

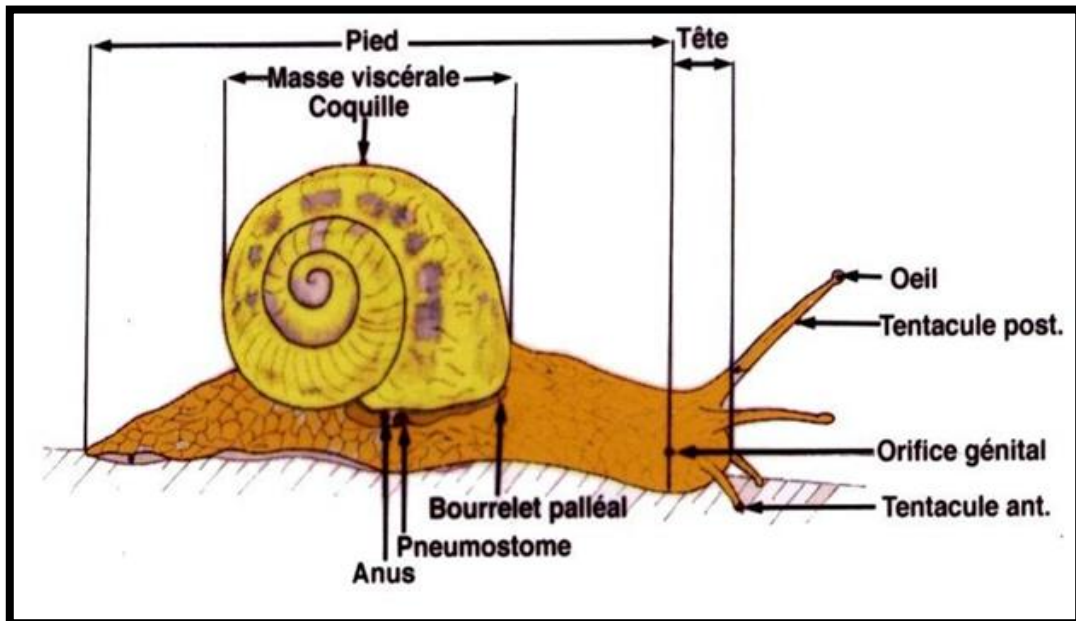
#### 2.1.2. Anatomie générale

##### 2.1.2.1. Anatomie externe de l'escargot

Le corps de l'escargot se compose de trois parties principales. La tête, le pied et la masse viscérale. En position étendue, l'escargot repose sur le sol grâce à son pied, une masse



musculaire large et épaisse qui s'étend à la fois en arrière et en avant de sa coquille (Bonnet, 1990 ; Beeby et Richmond, 2011).



**Figure 2** : Morphologie externe de l'escargot (Kerney et al., 2006).

- **La tête** : constituant la région antérieure, comprend la bouche dirigée vers le bas ainsi que les organes sensoriels composés de deux paires de tentacules rétractiles souvent désignés sous le nom de "cornes" ou "antennes" dans le langage courant (Michel rousselet et al., 1979). Les tentacules supérieurs sont oculaires, comprenant un œil simple et un organe olfactif, tandis que les tentacules inférieurs sont tactiles (Figure 2) (Bonne et al., 1990 ; Bellala, 2013).

- **Le pied** d'*Helix aspersa* est un organe qui soutient son corps et lui permet de se déplacer par reptation. Sa partie inférieure contient des glandes qui sécrètent continuellement du mucus, laissant ainsi une trace brillante lors de son déplacement (Figure 2) (Bonnet, 1990 ; Beeby et Richmond, 2011).

- **La masse viscérale** : englobe les organes principaux (Christian, 1980). Elle contient la partie centrale du tube digestif, la plupart des organes génitaux et la partie supérieure du muscle columellaire, attachée à la columelle. Elle est entièrement logée à l'intérieur de la coquille (Dallinger et al., 2001 ; Amroun, 2006) (Figure 2).

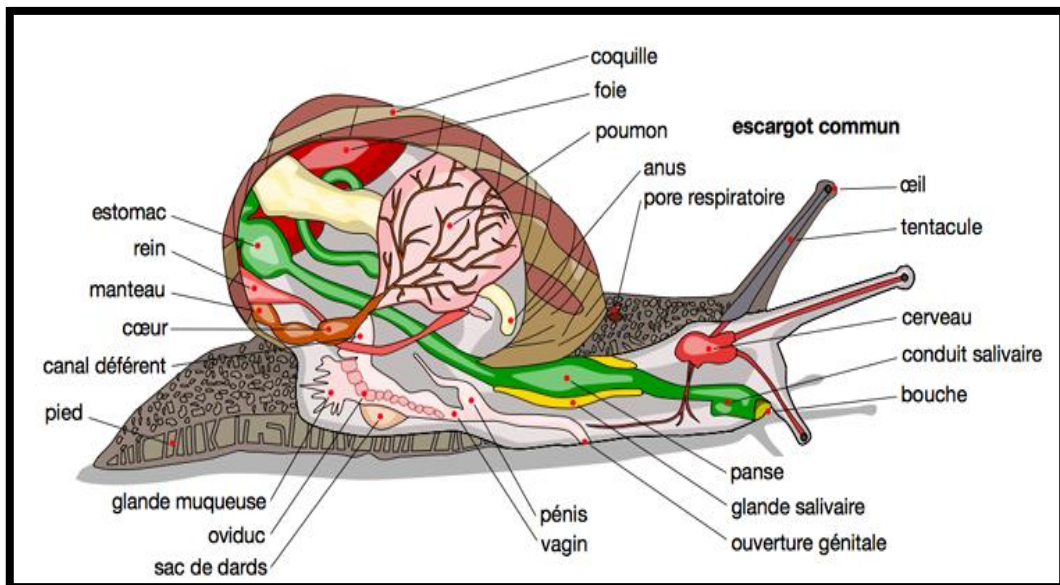
- **La coquille** : représente environ le tiers du poids total de l'escargot. Elle joue un rôle clé dans l'identification des différentes espèces et peut adopter diverses formes, telles que conique,

spirale ou hélicoïdale (**Kiddy, 1999**). La paroi de la coquille se compose de trois couches superposées :

- **La couche lamelleuse** : qui recouvre la surface interne de la coquille.
- **La couche externe** : cornée, très résistante aux cassures.
- **La couche moyenne** : est formé de calcaire presque pur (**Beaumont et Cassier, 1970**).

### 2.1.2.2. Anatomie interne

L'anatomie interne des gastéropodes (**Figure 3**), comme l'escargot *Helix aspersa*, présente une dissymétrie notable due aux transformations de la masse viscérale durant le développement. Ces transformations découlent d'une flexion, d'un enroulement et d'une torsion qui affectent la région dorsale des embryons (**Boué et Chanton, 1971**).



**Figure 3** : Anatomie interne de l'escargot (**Quibik, 2007**).

➤ **Appareil digestif** : En raison de la torsion à 180° du corps de l'escargot, son tube digestif forme une boucle qui ramène l'anus vers l'avant. La bouche se prolonge par un bulbe buccal contenant une radula, une langue musculaire munie d'une lame cornée servant à broyer les aliments. Les glandes salivaires se trouvent dans la partie postérieure du bulbe buccal. Celui-ci se connecte à l'œsophage, qui s'élargit pour former l'estomac, puis se poursuit par l'intestin lui-même enroulé autour de l'hépatopancréas, avant de se terminer à l'anus (**Figure 4**) (**Sandrine et al., 2003**).

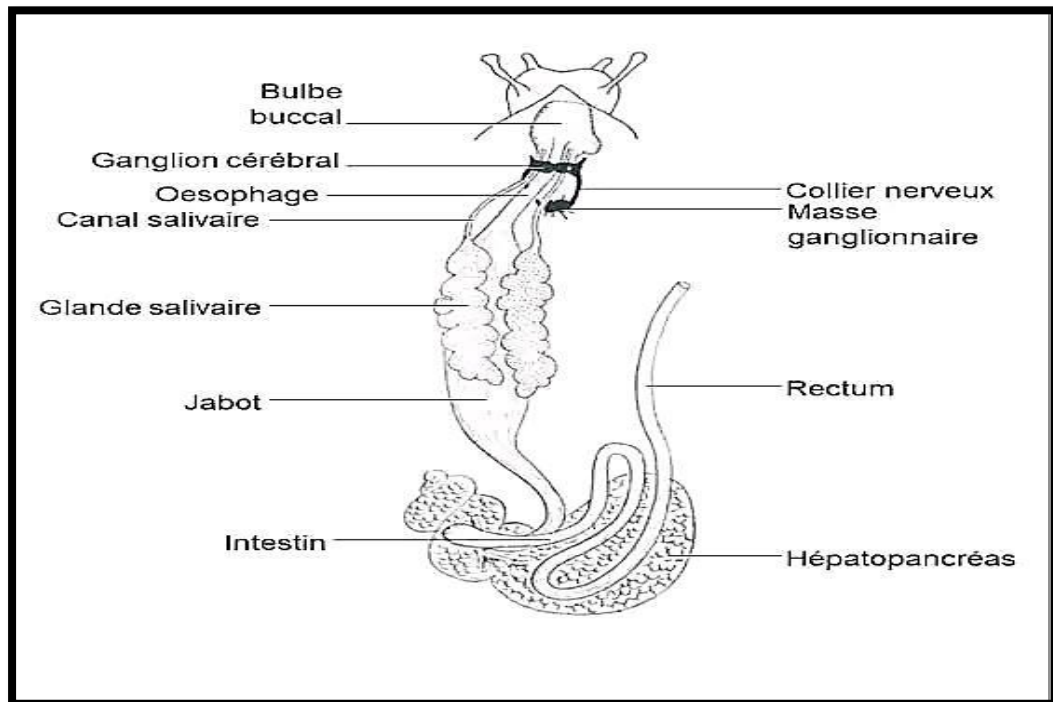


Figure 4 : Appareil digestif de l'escargot (Skendraoui, 2015).

➤ **Système nerveux** : Le système nerveux de l'escargot se divise en deux parties principales : le système stomatogastrique ou sympathique et le système nerveux central. Ce dernier englobe les ganglions cérébroïdes, les ganglions pédieux, ainsi que le système viscéral (Michel Rousslet, 1979 ; Pirame, 2003 ; Larbaa, 2014).

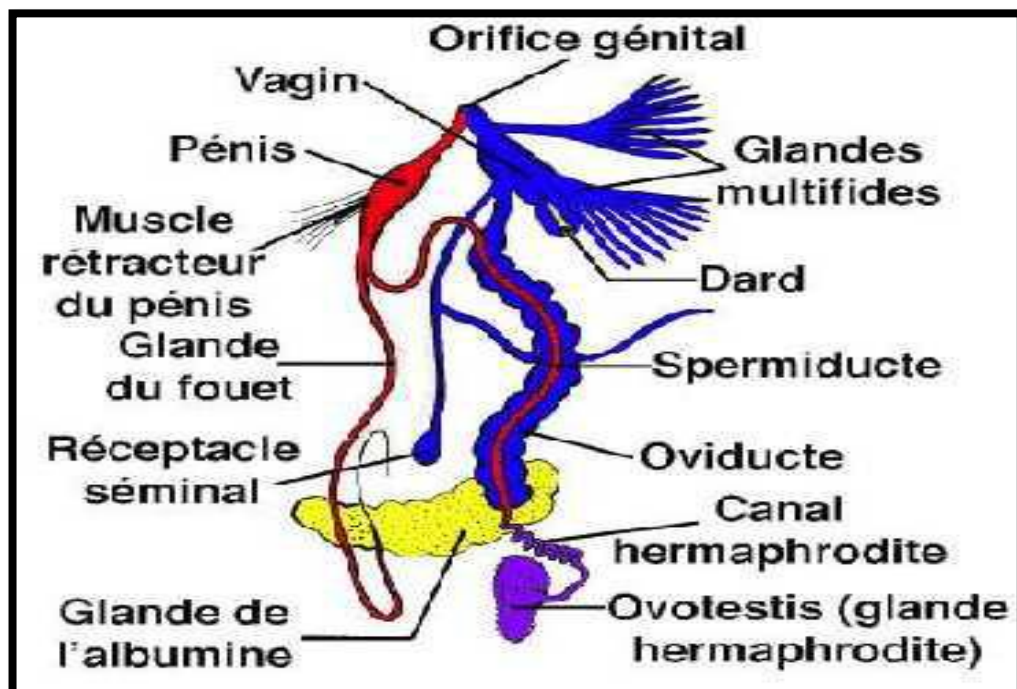
➤ **Appareils circulatoire et respiratoire** : L'escargot a une respiration pulmonaire. Son poumon est formé par la cavité palléale, un espace entre le manteau qui tapisse l'intérieur de la coquille et la masse viscérale. Cette cavité s'ouvre à l'extérieur par l'orifice respiratoire (également appelé pneumostome), dont on peut observer les mouvements rythmiques d'ouverture et de fermeture (Gomot de Vaufler, 1998). L'appareil circulatoire se compose d'un cœur enveloppé dans un péricarde. Ce cœur est constitué d'une oreillette piriforme antérieure et d'un ventricule allongé postérieur, d'où émergent deux aortes. L'une de ces aortes, antérieure, irrigue le pied et la région céphalique, tandis que l'autre, postérieure, se dirige vers le tortillon. À partir de ces deux aortes, divergent des artères qui irriguent en hémolymphe (sang) les différents organes. Enfin, un système de sinus veineux et de veines ramène le sang vers le cœur (Michel Rousslet, 1979 ; Barker, 2001 ; Larbaa, 2014).

➤ **Appareil excréteur** : est constitué d'un seul rein, également connu sous le nom d'organe de Bojanus, de couleur gris-jaunâtre et est situé entre le cœur et le rectum. De forme triangulaire,

il se compose de deux parties distinctes : une partie proprement excrétrice et une autre qui agit comme une vessie d'accumulation. À partir de cette dernière, un fin canal urinaire se déploie pour aboutir à l'orifice excréteur, positionné entre l'anus et le pneumostome (**Popple et Tribune, 2002**).

➤ **Appareil génital** : L'escargot est hermaphrodite. Son appareil génital comprend plusieurs éléments (**Figure 5**) (**Bonnet et al., 1990 ; Larbaa, 2014**) :

- Un ovotestis, situé à l'extrémité postérieure de l'hépatopancréas, où se forment à la fois les ovules et les spermatozoïdes.
- Un canal hermaphrodite qui permet l'évacuation des gamètes.
- Une glande de l'albumine qui produit les réserves vitellines.
- Un ovospermiducte.
- La voie mâle, comprenant un spermiducte où les spermatozoïdes s'accumulent pour former un spermatophore, ainsi qu'un organe copulateur, le pénis.
- La voie femelle, qui comprend le vagin, l'orifice génital et une poche sécrétant le dard calcaire lors de l'accouplement.



**Figure 5** : Schéma de l'appareil reproducteur de l'escargot (**Guyard, 2009**).

### 2.1.3. Croissance et reproduction

Quatre phases de croissance ont été établies en tenant compte de la taille et de la masse des animaux mais aussi de leur différenciation sexuelle (**Gomot, 1997**) :

- ✓ **La phase infantile**, dont le poids varie généralement entre 0,02 et 0,6 g. A ce stade, les escargots sont caractérisés par un tractus génital non différencié.
- ✓ **La phase juvénile** se caractérisant par une gamétogenèse active avec une masse corporelle comprise entre 0,6 et 6 g.
- ✓ **La phase de maturation sexuelle**, ou phase pré-adulte, qui est caractérisée par le développement des glandes annexes chez les femelles. Cette étape concerne les escargots dont le poids dépasse 6 g.
- ✓ **La phase adulte** à croissance nulle durant laquelle les animaux sont sexuellement matures et en reproduction active. Ils pèsent entre 6 et 14 g.

Etant hermaphrodite, l'escargot dispose d'un appareil génital complexe possédant à la fois des organes reproducteurs mâles et femelles (**Zaafour, 2014**). L'accouplement est cependant nécessaire pour la fécondation. Une seule gonade produit les spermatozoïdes et les ovules qui atteignent l'orifice génital par des conduits séparés. Lors de l'accouplement, deux escargots se positionnent tête-bêche où le pénis de chacun pénètre dans le vagin de l'autre afin d'échanger leurs spermatozoïdes. Ces derniers sont libérés par le biais d'un long filament appelé le spermatophore (**Larbaa, 2014**). La durée de l'accouplement est très variable, pouvant dans certains cas dépasser les 12 heures. Pour pondre, l'escargot creuse avec sa tête une cavité de 2-4 cm de profondeur dans le sol, et y dépose une ponte constituée en moyenne d'une centaine d'œufs. A une température de 18-20°C, les œufs vont se développer en 12 à 15 jours avant d'éclore. Après environ 5 à 10 jours, les jeunes éclos remontent à la surface du sol (**Lecalve, 1989 ; Pirame, 2003**).

### 2.1.4. Ecologie de l'espèce

*Helix aspersa* est une espèce fréquemment retrouvée dans les prairies, les champs de culture et les lisières de forêts (**Barker, 2001 ; Kerney et Cameron, 2006**). Cette espèce omniprésente s'adapte à des conditions environnementales, des sols et des climats variés, et s'acclimate très bien aux milieux fortement anthropisés. Son régime alimentaire est varié, comprenant des plantes herbacées, des graminées, des légumes de culture, des lichens, certaines céréales, et des champignons (**Barker, 2001 ; Chevalier et al., 2001**). Le sol fait également

partie de son alimentation, apportant ainsi le calcium indispensable à la formation de sa coquille (Gomot *et al.*, 1989 ; Dallinger *et al.*, 2001).

Les escargots petit-gris préfèrent être actifs la nuit, en synchronisation avec le cycle naturel de la lumière, en commençant après le coucher du soleil et atteignant leur pic d'activité environ six heures plus tard (Chevallier, 1992 ; Larbaa, 2014). Trois éléments influencent cette activité : l'humidité de l'air et du sol, la température, et l'intensité lumineuse (Chevallier, 1982). Les escargots sont plus actifs lorsque l'humidité de l'air dépasse 80 % et que la température nocturne minimale atteint au moins 9 °C.

En cas d'un manque prolongé d'humidité, *Helix aspersa* entre en estivation (Chevallier, 1992). L'animal se fixe alors à un support en scellant l'ouverture de sa coquille avec un voile de mucus durci, appelé épiphragme. Il reprend son activité dès que les conditions environnementales redeviennent favorables. Lorsque la température moyenne descend en dessous de 15°C, l'escargot aura aussi une période de vie ralentie, connue sous le nom d'hibernation. L'escargot hiberne en se fixant sur un support ou en s'enfouissant dans le sol ou la litière, et produisant ainsi un épiphragme hivernal épais. En présence d'une atmosphère humide, l'hibernation peut se produire à des températures inférieures à 5°C (Bailey, 1981 ; Welter-Schultes, 2012).

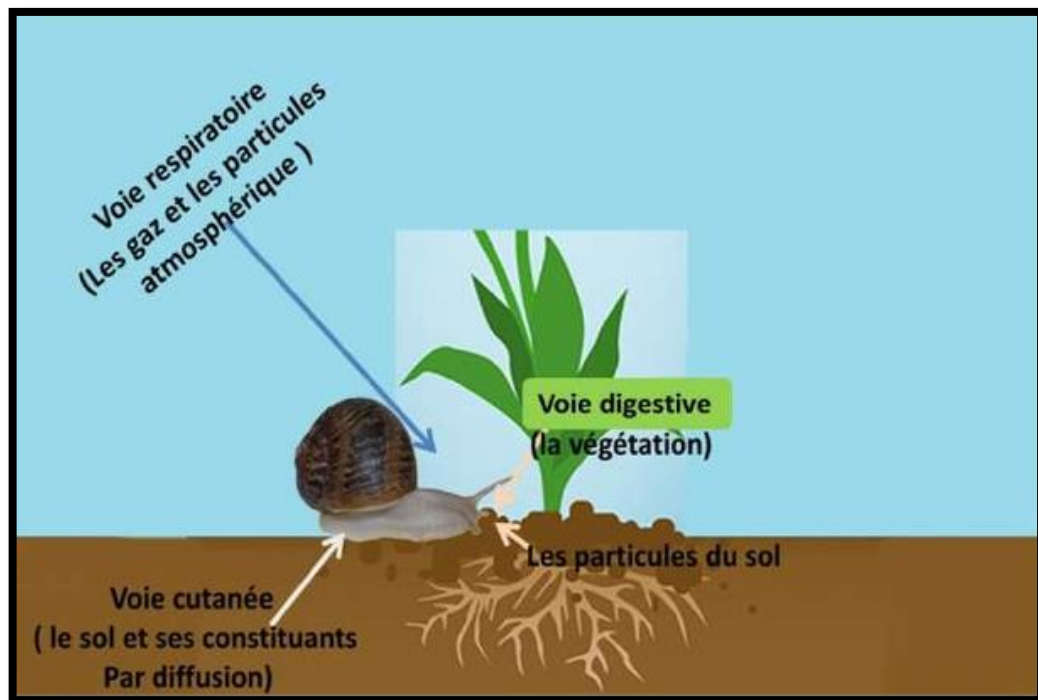
### 2.1.5. Intérêt de l'utilisation des escargots en écotoxicologie

Dernièrement, une attention croissante est portée à l'intégration de la faune du sol, particulièrement les escargots, dans les programmes de biosurveillance de la qualité des milieux. Les escargots terrestres, tel qu'*Helix aspersa* sont considérés comme d'excellents bio-indicateurs de la qualité des sols. Leur choix comme modèles biologiques est largement attribuable à leur répartition mondiale, reflétant leur capacité d'adaptation à divers biotopes et climats, ainsi que leur facilité d'élevage (Berger et Dallinger, 1993 ; Gomot, 1997 ; Cortet *et al.*, 1999 ; Dallinger *et al.*, 2001 ). En occupant une position clé à l'interface sol-plante-atmosphère, ils intègrent diverses sources et voies de contamination à savoir digestive, respiratoire et cutanée (Vaufleury *et al.*, 2009). La contamination digestive survient par l'ingestion de plantes et/ou de sol contaminés (Gimbert, 2006). La contamination cutanée, quant à elle, résulte de la diffusion des polluants à travers l'épithélium du pied. Enfin, la contamination respiratoire se produit par l'inhalation de gaz et/ou de particules atmosphériques (Figure 6) (Barber, 2001 ; Coeurdassier *et al.*, 2002 ; Gomot de Vaufleury et Pihan, 2002, Baurand, 2004). En tant que maillons essentiels des réseaux trophiques, ils facilitent ainsi le



transfert des polluants du sol et/ou des plantes aux prédateurs (Beeby, 1985 ; Laskowski et Hopkin, 1995 ; Scheifler *et al.*, 2002).

Les escargots possèdent une capacité notable de bioaccumulation pour de nombreux polluants métalliques et organiques (Viard *et al.*, 2004). Lorsqu'ils sont exposés à des contaminants, ils manifestent diverses réponses telles que l'inhibition de la croissance, la réduction de la reproduction, l'augmentation du taux de mortalité... (Notten *et al.*, 2006 ; Regoli *et al.*, 2006).



**Figure 6 :** Les voies d'exposition de l'escargot *Helix aspersa* aux polluants dans le milieu naturel (Sahraoui, 2022).

## 2.2. Matériel chimique

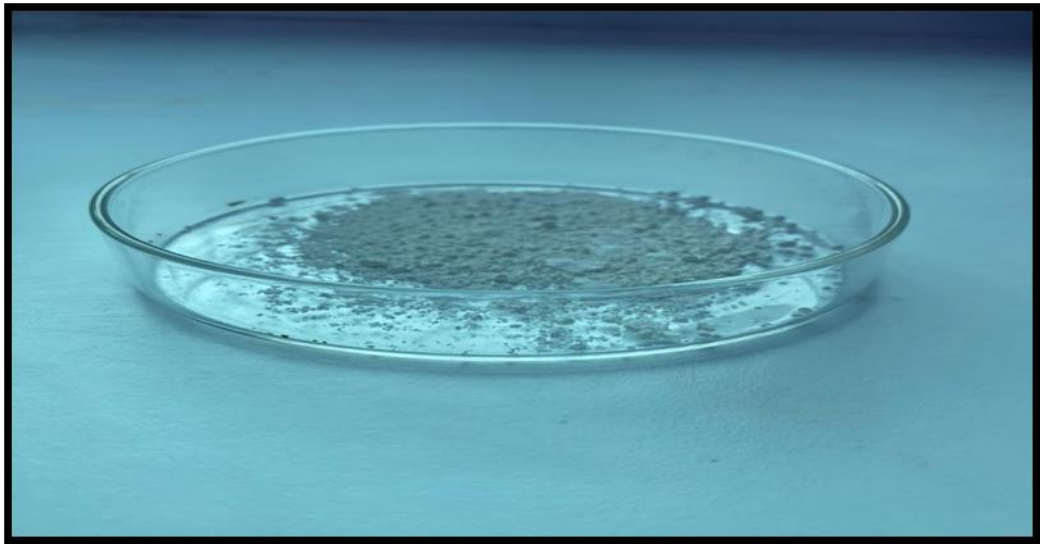
Le matériel chimique utilisé dans notre travail est le dioxyde de titane nanométrique ( $\text{TiO}_2$ ). Ces nanoparticules nous ont été fournies par le laboratoire de Chimie des Matériaux de l'Université Badji Mokhtar Annaba. Leur taille est de 80 nm (Figure 7).

### 2.2.1. Le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) : Présentation et applications

Le dioxyde de titane est un oxyde métallique qui se classe au neuvième rang des composants les plus abondants de la croûte terrestre. Sa découverte en Angleterre date de

l'année 1791, mais son utilisation commerciale sous forme pure n'a débuté qu'en 1913 (Armand, 2013).

Les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  sont couramment employées comme pigments dans divers revêtements de surface tels que les peintures, les vernis et les laques, ainsi que dans les plastiques, les papiers, et dans une moindre mesure, dans les fibres, les caoutchoucs, les cuirs, les céramiques, les encres d'imprimerie, les cosmétiques, les médicaments et dans certains produits alimentaires. Elles sont également utilisées en tant que photo-catalyseurs, en raison de leur efficacité remarquable, leur photostabilité, leur faible coût, ainsi que leur bonne résistance mécanique (Tuyet *et al.*, 2011 ; Romero, 2013). Elles sont abondamment fabriquées à l'échelle mondiale, avec un volume de vente annuel dépassant les 3,5 millions de tonnes, et une demande mondiale en augmentation d'environ 2% par an (Azouani, 2009).



**Figure 7 :** Les nanoparticules dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) (photo personnelle).

### 2.2.2. Propriétés physico-chimiques

Le dioxyde de titane pur associé au numéro CAS 13463-67-7 est un solide blanc réfringent, thermostable, de poids moléculaire 79,9 g/mol. Il est commercialisé sous forme de poudre ou de dispersion liquide. Il est inodore, insoluble dans l'eau, dans l'éthanol et autres solvants organiques. Le  $\text{TiO}_2$  existe sous trois formes cristallines différentes : anatase et rutile (quadratiques), brookite (orthorhombique) (Tableau 2). La forme rutile est plus dense et plus stable thermodynamiquement que la forme anatase (la plus réactive). Le dioxyde de titane



absorbe les rayons ultraviolets et le degré d'absorption varie en fonction de la taille des particules et agrégats/agglomérats qui le composent (Argot *et al.*, 2013).

Des traitements de surface effectués sur les nanoparticules de dioxyde de titane, conduisant à un enrobage par des oxydes inertes (oxydes de silicium, d'aluminium ou de zirconium) ou encore des traitements de surface mettant en œuvre des substances organiques telles que le triméthylolpropane, le néopentylglycol, l'acide stéarique, la diméthicone et autres silicones, permettent d'améliorer la dispersibilité de ces nanoparticules dans les formulations et de réduire leur photoréactivité (Argot *et al.*, 2013).

**Tableau 2 :** 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	1 830 - 1 855 °C (avec décomposition à 1 860°C)
	Point d'ébullition	à partir de 2 500 °C
	Densité	4,13 - 4,24
<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 de 2 500 °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 de 2 500 °C
	Densité	4,13

### 2.2.3. Données toxicologiques

La grande réactivité des NPs de TiO<sub>2</sub> leur confère de nombreuses applications industrielles. Cependant, cette réactivité accrue implique également une toxicité potentiellement plus élevée par rapport aux particules de taille supérieure, qui sont plus inertes (**Shi et al., 2013**). De plus, en raison de leur petite taille, les nanoparticules n'empruntent pas nécessairement les mêmes voies d'entrée dans les systèmes biologiques que les grosses particules et pourraient être internalisées en proportion plus importante (**Bruinink et al., 2015**).

En raison de la large gamme d'applications des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, l'homme peut entrer en contact avec elles par inhalation, ingestion ou contact cutané (**Shi et al., 2013**). Les deux dernières voies d'exposition concernent principalement les étapes d'utilisation du TiO<sub>2</sub>, notamment comme pigment dans les produits alimentaires et cosmétiques (**Weir et al., 2012 ; Dan et al., 2015**). En revanche, l'exposition par inhalation peut survenir à toutes les étapes du cycle de vie de ces nanoparticules, que ce soit lors de leur production ou de leur utilisation (**Shi et al., 2013**).

Après l'absorption des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, le système circulatoire peut les distribuer à travers tous les organes et tissus du corps. Une fois dans la circulation systémique, ces nanoparticules peuvent interagir avec divers composants tels que le plasma, les protéines, les facteurs de coagulation, les plaquettes, ainsi que les globules rouges et blancs. Leur liaison à ces composants plasmatiques peut influencer de manière significative leur distribution, leur métabolisme et leur excrétion, ce qui peut potentiellement masquer leurs effets indésirables dans la circulation systémique. La plupart des nanoparticules s'accumulent dans le foie, mais aussi dans le cerveau suite à une administration intra-nasale (**Shi et al., 2013**).

Les données disponibles concernant le métabolisme et les effets toxiques de ces nanoparticules sur l'organisme sont à ce jour peu discutés (**Shi et al., 2013 ; Kahli, 2015**). Les résultats des études entreprises sont difficiles à interpréter car ils sont fortement influencés par les conditions expérimentales, le type de lignée cellulaire ou de modèle biologique, le type de particules (taille et/ou surface spécifique, forme cristalline, présence ou absence d'enrobage...) et la voie d'exposition (**Jargot et al., 2013**).

## 2.3. Méthodes

### 2.3.1. Conditions d'élevage

Les escargots utilisés dans notre expérimentation ont été ramenés d'une ferme d'élevage de la wilaya de Constantine puis transférés au laboratoire où ils sont maintenus dans des conditions environnementales optimales (photopériode 12h lumière / 24h, température  $(20 \pm 2$  °C) (Coeurdassier *et al.*, 2001). Ils ont été acclimatés à ces conditions pendant 15 jours avant d'être exposés aux nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (Khene, 2017). Les escargots ont été répartis dans des boîtes en plastique transparentes, avec un couvercle perforé (pour assurer l'oxygénation) et nourris avec des feuilles de laitue. L'humidité a été maintenue à l'aide d'une éponge humide. Les boîtes ont été nettoyées régulièrement tous les deux jours avec renouvellement de la nourriture (Figure 8).



**Figure 8** : Elevage d'*Helix aspersa* au laboratoire (photo personnelle).

### 2.3.2. Mode de traitement

Les essais ont été réalisés dans les mêmes conditions environnementales que celles de l'élevage. 40 escargots sub-adultes d'un poids moyen de 5 à 6 g ont été sélectionnés et répartis en 5 lots à raison de 8 escargots / lot. Une exposition de 28 jours aux nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  via l'alimentation contaminée a été réalisée. Les escargots ont été nourris tous les deux jours avec des feuilles de laitue préalablement trempées pendant une heure dans des solutions de nanoparticules, selon la méthode décrite par Dallinger *et al.* (2005). Quatre concentrations ont été utilisées : 25, 50, 100 et 150 mg/L (Figure 9). Les animaux du lot témoin ont été nourris avec de la laitue trempée dans de l'eau distillée. Pendant les 28 jours de l'essai, des observations sur le comportement des escargots ont été enregistrées.



**Figure 9** : Photo des lots d'escargots exposés aux concentrations croissantes des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (photo personnelle).

### 2.3.3. Dissection et prélèvement d'organes

Après 28 jours de traitement, les escargots ont été mis à jeun pendant 48 h pour vider leurs tubes digestifs. Les animaux sont par la suite sacrifiés par congélation puis disséqués. Les hépatopancréas et les reins sont prélevés (**Figure 10**), pesés puis divisés en 2 fragments :

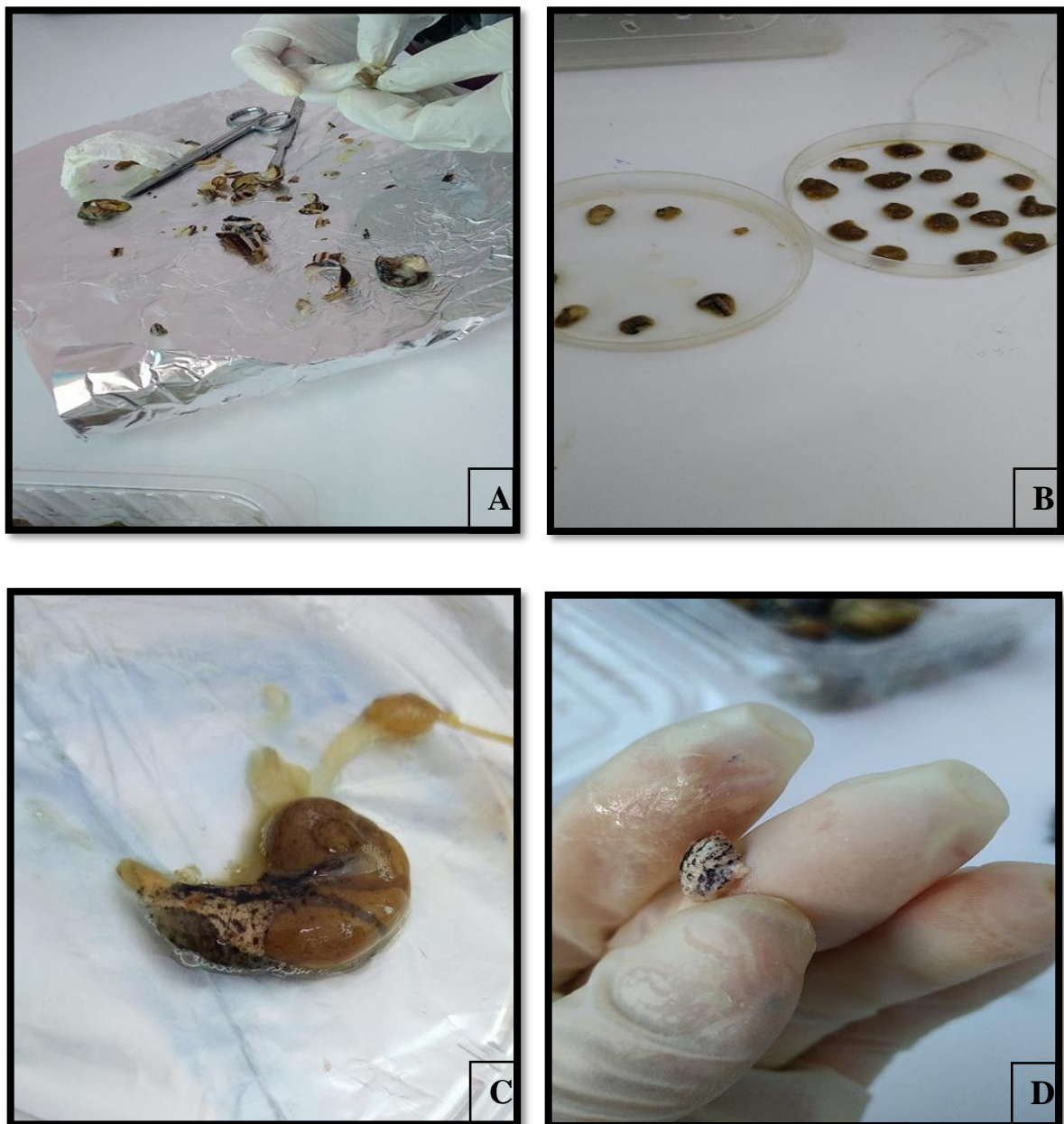
- ✓ Un échantillon pour le dosage du taux de GSH.
- ✓ Un échantillon pour le dosage de l'activité CAT.

### 2.3.4. Paramètres étudiés

#### 2.3.4.1. Etude comportementale

Au cours de la période de l'essai, nous avons cherché à déterminer les effets des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  sur les comportements des escargots. Nous nous sommes intéressés à l'activité des animaux et leur position spatiale dans la boîte : par exemple, actifs ou inactifs en position haute ou sur les supports, ou encore, actifs ou inactifs sur la nourriture. Ces comportements ont été enregistrés individuellement, à heure fixe, les jours de changement de nourriture soit 3 séries d'observations par semaine. L'emplacement dans la boîte est facilement repérable et les mouvements des animaux sont enregistrés de la manière suivante : la boîte est ouverte et le couvercle retourné est posé sur la paille. Après une minute, les escargots en

mouvement sont considérés comme actifs, ceux qui restent immobiles sont considérés comme inactifs. Il est à noter que cette méthode est plus efficace que l'observation directe sans l'ouverture de la boîte, car étant assez nocturnes, lorsque les escargots sont observés, presque tous sont inactifs. Ainsi, l'activité observée représente un état réceptif et une capacité à répondre aux stimulations mécaniques (déplacement et ouverture de la boîte) (Coeurdassier, 2001). Les résultats sont présentés sous forme d'observations hebdomadaires de chaque comportement en fonction des concentrations de nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, comparées au groupe témoin (Coeurdassier, 2001 ; Ait Hamlet, 2013).



**Figure 10** : Dissection des escargots et prélèvement des organes (photo personnelle). **A** : Incision de la coquille d'escargots ; **B** : Séparation des organes, **C** : Hépatopancréas, **D** : Rein.



### 2.3.4.2. Mesure des paramètres morphométriques

#### 2.3.4.2.1. Poids frais des escargots :

Au cours de la période de traitement, les escargots ont été hebdomadairement pesés à l'aide d'une balance de précision.

#### 2.3.4.2.2. Poids frais de l'hépatopancréas et du rein

Après la dissection des escargots, les hépatopancréas et les reins sont prélevés et pesés individuellement à l'aide d'une balance de précision.

#### 2.3.4.2.3 Dosage des paramètres du stress oxydant

##### a. Dosage du taux de GSH

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de **Weckberker et Cory (1988)**, dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5- mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm. 1 ml d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0.02 M est ajouté aux échantillons. Après broyage dans un bain de glace, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0,25% où 0,2 ml de ASS sont additionnés à 0.8 ml d'homogénat. Le mélange est agité au vortex puis centrifugé 5 minutes à 1000 tours.min<sup>-1</sup>. A 500 µl du surnageant on ajoute 1ml du tampon tris/EDTA et 0,025 ml de DTNB (0,01M). La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 min de repos à une température ambiante pour la stabilisation de la couleur. Le taux du glutathion est quantifié selon la formule suivante :

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

**Taux du GSH** : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM/mg de protéines).

**Do** : Densité optique

**1** : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat).

**1,525** : volume total des solutions utilisées dans le GSH (0,025 ml DTNB + 0,5 ml surnageant + 1 ml Tris-EDTA).

**13,1** : coefficient d'absorbance (concernant le groupement -SH à 412 nm).

**0,8** : volume de l'homogénat utilisé en ml.

**0,5** : volume de surnageant utilisé en ml.

**mg de protéine** : quantité de protéines exprimée en mg.

### b. Dosage de l'activité catalase

Selon la méthode **de Regoli et Principato (1995)**, l'activité catalase (CAT) est mesurée à 240 nm par la variation de la densité optique suite à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en faisant réagir dans 750 µl du tampon phosphate (100 Mm, pH 7,5), 200 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500mM) sur 50 µl d'homogénat à 25°C pendant 1 minute avec un intervalle de 15 secondes.

L'activité catalase (CAT) est exprimée en µm d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minute et par mg de protéines selon la formule suivante :

$$\text{CAT } (\mu\text{g}/\text{mn}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta \text{Do}}{\varepsilon \times L \times \text{mg de protéines}}$$

**CAT** : µ moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommées par minute et par mg de protéines.

**ε** : coefficient d'extinction (0,040 mM-1. cm<sup>-1</sup>).

**L** : longueur de la cuve utilisée (1cm).

**Δ DO** : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

**mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg.

### 2.4. Analyse statistique

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique grâce au logiciel Minitab (Version 14.0). Une analyse de la variance à un critère (traitement) et à deux critères de classification (traitement, temps) a été effectuée en utilisant le test ANOVA. 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  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) .



# RESULTATS



## 3. Résultats

### 3.1. Effet des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur le comportement des escargots

D'après nos observations hebdomadaires, les escargots traités par les différentes concentrations de TiO<sub>2</sub> montrent une activité et une prise alimentaire quasi-similaires à celles des escargots témoins pendant les deux premières semaines de l'expérience. Cependant, à partir de la troisième semaine, ceux exposés aux concentrations les plus élevées (100 et 150 mg/L) deviennent inactifs, évitent la nourriture et se placent souvent en haut sur le couvercle. Les escargots exposés aux concentrations 25 et 50 mg/L montrent une diminution de la mobilité et de la consommation alimentaire par rapport aux témoins qui conservent une activité locomotrice et un comportement alimentaire normaux.

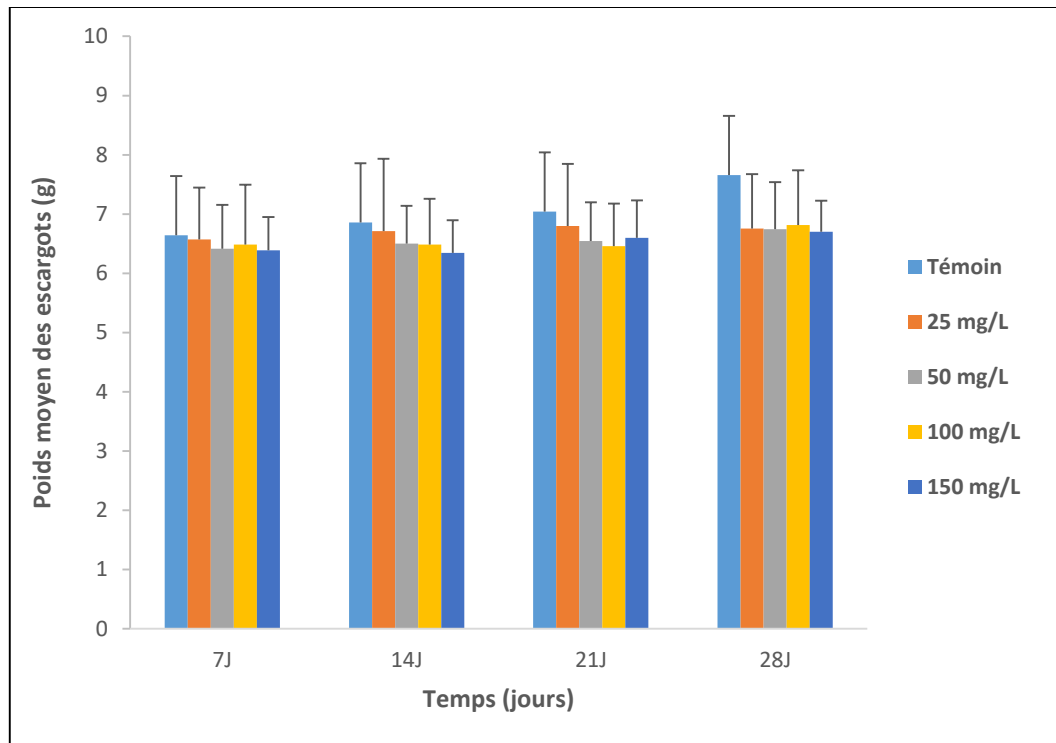
### 3.2. Effet des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur les paramètres morphométriques des escargots

#### 3.2.1. Effet sur la croissance pondérale de l'escargot *Helix aspersa*

La **figure (11)** représente l'effet des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur l'évolution du poids moyen des escargots en fonction du temps.

D'après nos résultats, nous constatons que le poids moyen des escargots tend à diminuer de manière non significative ( $p > 0.05$ ) chez ceux traités par les concentrations croissantes de nanoparticules par rapport aux escargots témoins, et ce, durant toute la période de traitement. Cette diminution est plus prononcée à la quatrième semaine, où nous enregistrons un poids moyen de 6,70 g chez les escargots traités par la plus forte concentration (150 mg/L) comparé à celui des témoins qui atteint 7,65 g.

L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle un effet traitement et un effet temps non significatifs ( $p > 0.05$ ).



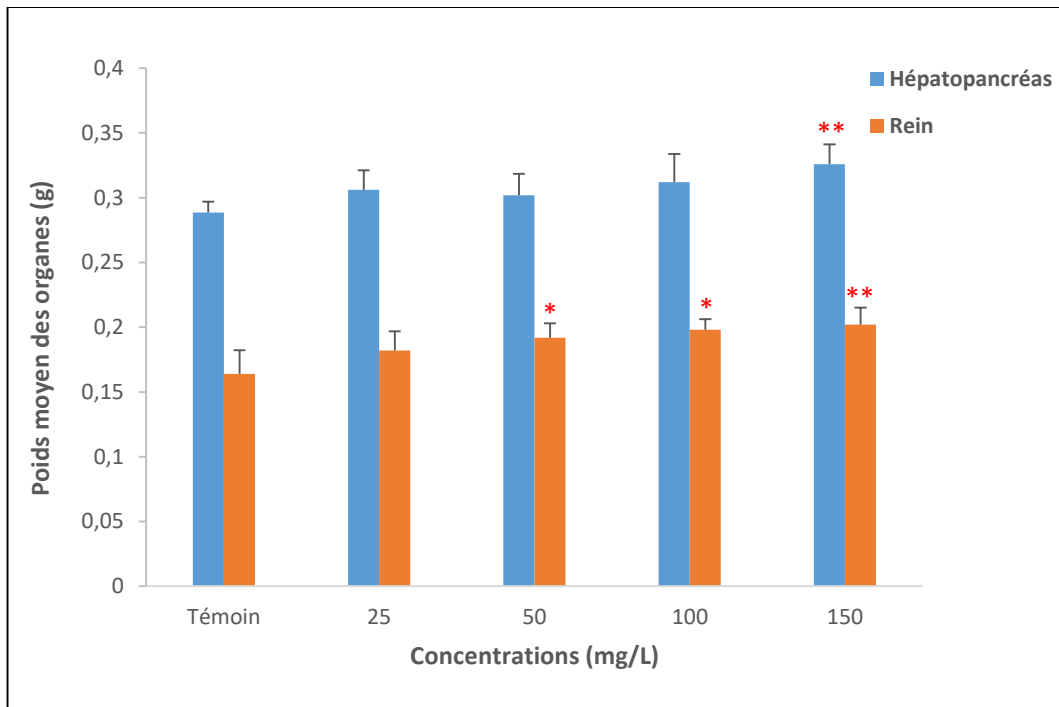
**Figure 11 :** Effet des concentrations croissantes de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur l'évolution du poids moyen des escargots durant les 28 jours de traitement ( $m \pm SD$  ;  $n = 8$ ).

### 3.2.2. Effet sur le poids moyen des organes

Les résultats relatifs à l'effet du dioxyde de titane nanométrique sur l'évolution du poids moyen des organes (hépatopancréas et rein) chez *Helix aspersa* après 28 jours d'exposition sont représentés dans la **figure (12)**.

Nos résultats mettent en évidence une augmentation hautement significative ( $p < 0,01$ ) du poids moyen de l'hépatopancréas, en particulier chez les escargots exposés à la plus forte concentration où nous notons une valeur de 0,326 g contre 0,288 g chez les témoins. Parallèlement, une augmentation dose-dépendante et significative du poids moyen du rein a également été observée chez les escargots traités par le TiO<sub>2</sub> comparativement aux témoins. Ainsi, le poids moyen du rein passe de 0,164 g chez les escargots témoins à 0,198 g chez ceux traités par la concentration 100 mg/L pour atteindre 0,202 g chez ceux traités par la plus forte concentration (150 mg/L).

L'analyse de la variance à un critère de classification révèle un effet significatif ( $p < 0,05$ ) du traitement pour l'hépatopancréas, et un effet hautement significatif ( $p < 0,01$ ) pour le rein.



**Figure 12 :** Poids moyens de l'hépatopancréas et du rein des escargots témoins et traités par les concentrations croissantes de TiO<sub>2</sub> après 28 jours de traitement (m ± SD ; n = 8).

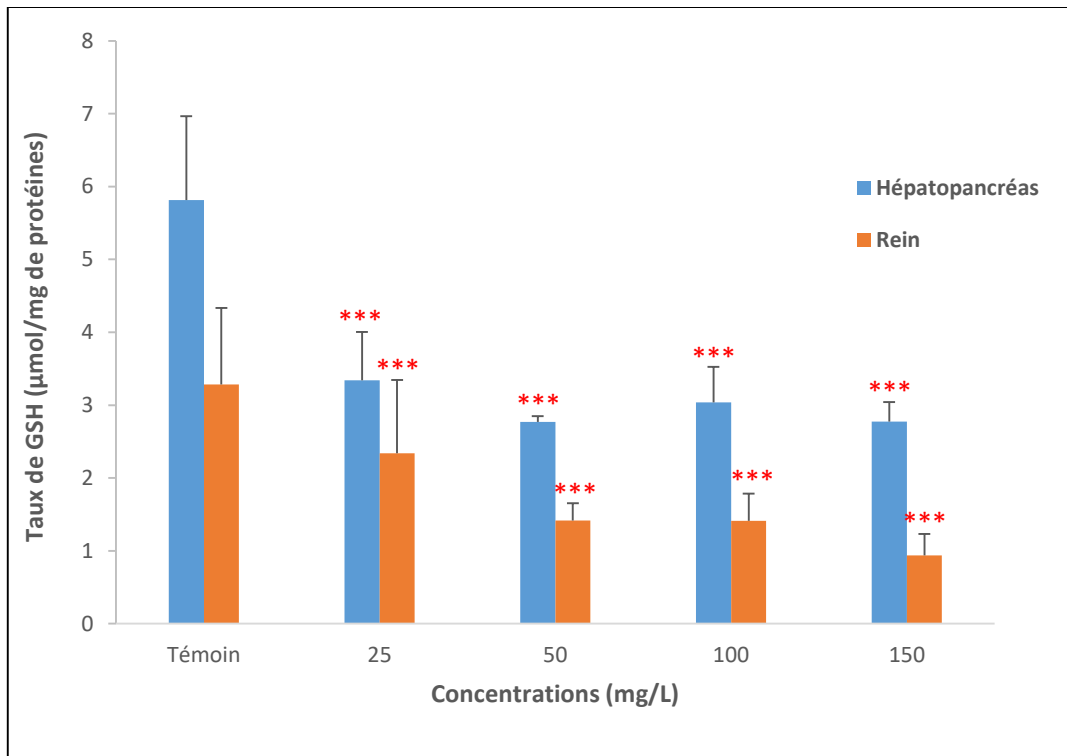
### 3.3. Effet des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur les biomarqueurs de stress chez *Helix aspersa*

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

La **figure (13)** illustre l'évolution du taux de GSH hépatopancréatique et rénal chez *Helix aspersa* en réponse à un traitement avec les concentrations croissantes de dioxyde de titane nanométrique.

Nous observons, d'après les résultats obtenus, une diminution très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du taux de GSH chez les escargots traités par les concentrations croissantes de TiO<sub>2</sub>, tant au niveau de l'hépatopancréas qu'au niveau du rein. Ainsi, le taux de GSH hépatopancréatique diminue pour atteindre un minimum de 2,774 µg/mg de protéines pour la dose 150 mg/L, par rapport à 5,813 µg/mg de protéines chez les témoins. De même, le taux de GSH rénal passe de 3,282 µg/mg de protéines chez les témoins à seulement 0,936 µg/mg de protéines chez les escargots traités par la plus forte concentration (150 mg/L).

L'analyse de la variance à un critère montre un effet hautement significatif ( $p \leq 0,01$ ) du traitement, et ce au niveau des deux organes étudiés.



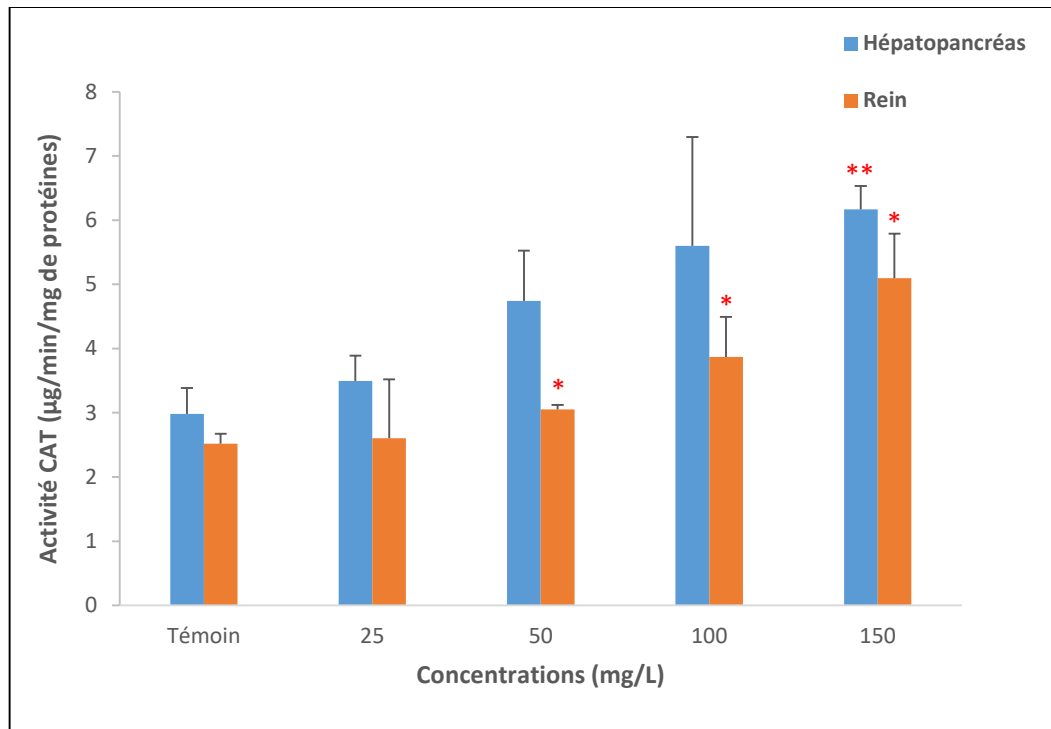
**Figure 13 :** Effet des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur le taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots *Helix aspersa* ( $m \pm SD$  ;  $n = 4$ ).

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

Les résultats concernant la variation de l'activité CAT hépatopancréatique et rénale présentés dans la **figure (14)**, révèlent une induction dose-dépendante et significative surtout pour la plus forte concentration comparativement aux témoins.

Au niveau hépatopancréatique, l'activité CAT passe ainsi de 2,984  $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines chez les escargots témoins à environ 6,170  $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines chez ceux traités par la concentration 150 mg. Concernant le tissu rénal, l'activité CAT des escargots passe d'une valeur de 2,517  $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines chez les témoins à 3,870  $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines chez les traités par la concentration 100 mg/L, pour atteindre une valeur maximale d'approximativement 5,100  $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$  chez les traités par la plus forte concentration (150 mg/L).

L'analyse de la variance à un critère de classification indique un effet hautement significatif du traitement ( $p \leq 0,01$ ) au niveau hépatopancréatique et un effet significatif au niveau rénal ( $p=0,001$ ).



**Figure 14 :** Effet des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  sur l'activité CAT au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots *Helix aspersa* ( $m \pm SD$  ;  $n = 4$ ).



# DISCUSSION

#### 4. Discussion

L'utilisation intensive des nanoparticules suscite un problème écotoxicologique émergent en raison de leur libération et leur dispersion dans l'environnement (**Masse et Boudène, 2012 ; Khene et al., 2017**). Cette situation soulève des interrogations sur leur toxicité, à laquelle peu d'études ont été consacrées jusqu'à présent (**Klaine et al., 2008**). Les nanoparticules peuvent se trouver dans tous les compartiments environnementaux (eau, sol, air) exposant potentiellement toutes les espèces de la chaîne alimentaire. Par conséquent, il est crucial d'évaluer leurs interactions avec les organismes clés de la chaîne alimentaire, tel que l'escargot *Helix aspersa* (**Scheifler, 2002 ; Angélique, 2008 ; Valérie 2009**). Ce gastéropode terrestre a une forte capacité à accumuler les substances polluantes telles que les métaux et les nanoparticules métalliques jouant ainsi un rôle essentiel dans leur transfert de la végétation vers les prédateurs des réseaux trophiques supérieurs (**Notten et al., 2005 ; Kahli, 2015**). Cela inclut également l'être humain, étant donné qu'*Helix aspersa* est consommé par diverses populations à travers le monde, y compris en Algérie.

C'est dans ce contexte que se situe notre travail visant à étudier l'effet des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur un modèle bioindicateur de la pollution terrestre, l'escargot *Helix aspersa*. Pour cela, nous avons évalué différents paramètres (comportementaux, morphométriques et biochimiques).

Dans un premier temps, notre étude s'est focalisée sur l'effet des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur le comportement de l'escargot *Helix aspersa*. Les réponses comportementales représentent le premier niveau de réaction face aux changements environnementaux (**Hellou, 2011; Amiard-Triquet et Amiard, 2012**), offrant ainsi un lien direct entre les effets toxiques observés à l'échelle cellulaire/biochimique et les impacts au niveau des populations ou des communautés. Ces réponses sont considérées comme des « indicateurs d'alerte précoce », étant à la fois immédiates et hautement sensibles au stress (**Rinderhagen et al., 2000 ; Wallace et Estephan, 2004 ; Mills et al., 2006**).

Nos résultats ont révélé une altération du comportement des escargots traités par le TiO<sub>2</sub> par rapport aux témoins, principalement aux plus fortes concentrations (100 et 150 mg/L) et à partir de la troisième semaine d'exposition. Cette perturbation comportementale s'est manifestée par une réduction voire une inhibition de l'activité des escargots ainsi qu'une diminution de la consommation de nourriture ou encore un évitement de celle-ci. Des

observations similaires ont été également rapportés par plusieurs auteurs ayant étudié l'effet des métaux et de nanoparticules métalliques sur le comportement de l'escargot *Helix aspersa* suite à une exposition à une alimentation contaminée (**Besnaci, 2016 ; Grara et al., 2017 ; Selmi, 2018 ; Zergui et Djafer, 2020 ; Bouacidi et Rebai, 2022**). **Chevallier (1992)** et **Courdassier (2001)** ont signalé que lorsque des contaminants sont présents dans le sol et/ou la nourriture, *Helix aspersa* tend à devenir inactif et à se réfugier en hauteur sur des supports situés à quelques centimètres du sol cherchant ainsi des endroits moins pollués. Selon **Le Bras (2007)** et **Besnaci (2016)**, l'exposition des mollusques aux métaux et nanoparticules métalliques entraîne la génération d'un stress oxydatif par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau cellulaire, se traduisant par un état de stress général et une perturbation comportementale. D'autre part, la réduction de la consommation alimentaire observée dans notre travail, au cours des deux dernières semaines de traitement, pourrait constituer une stratégie adoptée par ses animaux pour restreindre la quantité de nanoparticules métalliques accumulées dans leur masse corporelle (**Swaileh et Ezzughayyar, 2001**).

Nous nous sommes intéressés dans un second temps à l'évaluation de l'effet des nanoparticules de dioxyde de titane sur la croissance pondérale des escargots. Nos résultats ont révélé une diminution non significative du poids moyen des escargots traités par rapport aux témoins. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Grara et al. (2015)** qui ont noté une diminution du poids des escargots *Helix aspersa* après exposition aux nanoparticules de ZnO dans l'alimentation (farine de blé). Par ailleurs, de nombreuses recherches ont mis en évidence que dans un environnement pollué, les animaux entrent dans un état de jeûne prolongé pour éviter la nourriture contaminée (**Notton et al., 2006 ; Gimbert et al., 2008 ; Atilia, 2009 ; Alayat et Amamra, 2011 ; Kahli, 2015 ; Grara et al., 2012**). De même, **Viard et al. (2004)** ont constaté que la détection par les escargots d'une concentration extrêmement élevée de plomb dans le sol entraîne une restriction de leur taux de consommation, ce qui conduit à une inhibition partielle de leur croissance. Les travaux de **Wu et al. (2021)** ont également observé une inhibition importante de la croissance et l'activité d'*Helix aspersa* après ingestion de feuilles de laitue contaminées par des nanoparticules d'argent (AgNPs), de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>NPs) et leur mixture.

Nous nous sommes penchés ensuite sur l'étude de l'effet des NPs de TiO<sub>2</sub> sur le poids moyen de l'hépatopancréas et du rein des escargots, principaux sièges de biotransformation et d'élimination des xénobiotiques. Nos résultats ont montré que ces nanoparticules induisent une augmentation significative du poids des organes. Ces résultats concordent avec ceux de



**Boutreaa (2023)** qui a noté une augmentation du poids du foie des rats exposées par voie orale aux concentrations croissantes de NPs de TiO<sub>2</sub>. Ces résultats pourraient être expliqués par une hypertrophie tissulaire en raison de l'accumulation des NPs dans l'organisme. De plus, les polluants peuvent conduire à la mort cellulaire par l'apoptose de certaines lignées cellulaires due à l'accumulation de dérivés lipidiques toxiques comme les céramides (**Wang et al., 2000, Rudolf et cervinka, 2010**). Ces dérivés lipidiques toxiques induisent une hypertrophie cellulaire de l'organe cible. Nos résultats sont, cependant, en contradiction avec ceux de **Belgacem et Charef (2018)** qui ont rapporté une diminution du poids moyen de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa* exposé aux NPs de TiO<sub>2</sub>. Les auteurs expliquent cette diminution par une variation des sécrétions des enzymes digestives ou encore un évitement de la nourriture contaminée qui se traduit par une diminution du poids corporel et celui de la glande digestive.

La présence de xénobiotiques à des concentrations toxiques stimule l'activation des systèmes de protection cellulaire, dont la fonction est de piéger et/ou d'éliminer les métabolites toxiques. Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques impliqués dans le stress oxydatif agissent par des réactions en chaîne pour prévenir les lésions cellulaires résultant de l'attaque des radicaux libres (**Benbouzid et al., 2012**). Afin de compléter notre travail, nous avons jugé essentiel d'évaluer le potentiel des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> à générer un stress oxydatif au niveau cellulaire à travers le suivi de deux biomarqueurs à savoir le taux de GSH et l'activité CAT qui sont des outils importants pour évaluer les effets toxiques des xénobiotiques (**Mcloughlin et al., 2000**).

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans le compartiment intracellulaire. Outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau dans la défense antiradicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase (**Barillet, 2007**). Les résultats obtenus dans cette étude ont illustré une déplétion significative du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots exposés aux NPs de TiO<sub>2</sub>. Cette diminution pourrait probablement être due à la présence de radicaux libres produits par les NPs et/ou par la liaison directe du glutathion au métal, comme décrit par **Barillet (2007)**. Effectivement, les études de **Doudi et al. (2015)** confirment la capacité importante du TiO<sub>2</sub> à produire des ROS réduisant ainsi les antioxydants cellulaires tels que le glutathion et la vitamine E. Selon **Xiong et al. (2011)** et **Fahmy et al. (2014)**, les ETMs et les particules ultrafines se caractérisent par leurs grandes affinités aux groupements thiols du GSH avec lesquelles ils forment des complexes. Nos résultats

corroborent ceux de **Grara et al. (2016)** qui ont mis en évidence une réduction dose dépendante de la teneur en GSH hépatopancréatique et rénale en présence de poussières métalliques. Il en est de même, en ce qui est des résultats trouvés par **Kahli (2015)** et **Khen et al. (2017)** concernant l'effet des nano et microparticules de TiO<sub>2</sub> sur *Helix aspersa*. Les mêmes résultats sont également observés par **Ramsden et al. (2013)** au niveau du cerveau, des branchies et du foie du poisson zèbre exposé au TiO<sub>2</sub>.

D'autre part, nos résultats relatifs à la variation de l'activité CAT hépatopancréatique et rénale indiquent une stimulation dose dépendante et significative de cette dernière chez *Helix aspersa* exposé au TiO<sub>2</sub>. La catalase est une enzyme antioxydante principalement péroxysomale dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par le peroxyde d'hydrogène en catalysant la réaction de sa dismutation en eau et en oxygène moléculaire. Elles constituent avec les SOD la première ligne de défense contre les attaques radicalaires (**Amin et Hashem, 2012 ; Sapana Devi et Gupta, 2014**). En effet, la catalase est considérée comme l'un des biomarqueurs les plus sensibles au stress oxydatif induit par certains contaminants tels que les métaux toxiques (**Almeida et al., 2007**). L'induction importante de l'activité CAT observée dans notre étude pourrait être due à une activation d'un mécanisme antioxydant en vue de la dégradation du peroxyde d'hydrogène généré par l'exposition au TiO<sub>2</sub>. Les mêmes résultats ont été récemment rapportés par **Benamara et al. (2021)** et **Ben belouaer et Beurghoul (2022)** chez le même modèle biologique exposé aux NPs d'oxyde de cuivre (CuO). De même, **Ali et al. (2014 ; 2015)** ont enregistré une induction significative de l'activité catalase chez le mollusque gastéropode d'eau douce *Lymnaea luteola* traité par les NPs de TiO<sub>2</sub>. **Abdel-Azeem et al. (2023)** ont, cependant, enregistré une réduction de l'activité catalase au niveau de l'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* suite à une exposition de deux semaines aux NPs de TiO<sub>2</sub>. Ces auteurs précisent que les activités des enzymes antioxydantes dépendent de la durée d'exposition, de la concentration des polluants et de la susceptibilité de l'espèce (**Ballesteros et al., 2009**). Ainsi, la production accrue de ROS résultant du traitement par les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> a affecté les processus cellulaires et a par conséquent conduit à une inhibition de l'activité CAT.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

### 5. Conclusion et perspectives

L'utilisation croissante des nanoparticules métalliques ou d'oxydes métalliques entraîne une augmentation de la pollution chimique de l'environnement, exposant ainsi les organismes vivants du sol à des risques non négligeables. Leurs propriétés nanométriques les rendent potentiellement dangereuses, car elles peuvent interférer avec les systèmes biologiques.

Dans notre travail nous avons évalué l'effet toxique des nanoparticules métalliques de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur un bioindicateur de la pollution terrestre le mollusque : *Helix aspersa* pendant une période de 28 jours.

L'exposition des escargots *Helix aspersa* aux concentrations croissantes des nanoparticules du dioxyde de titane (25, 50, 100 et 150 mg/L) semble induire une hépatotoxicité et une néphrotoxicité traduites par des perturbations comportementales, morphométriques et biochimiques.

En effet, ces perturbations se sont manifestées, d'une part, par une diminution voire une inhibition de l'activité des escargots et une diminution de la consommation de nourriture. D'autre part, une diminution du poids des escargots ainsi qu'une hypertrophie des organes (hépatopancréas et reins) ont été notées. Par ailleurs, l'intensification de l'activité CAT et la déplétion du taux de GSH enregistrées rendent compte de la survenue d'un stress oxydatif et l'activation du système de détoxification.

A l'issue de ce travail, nous pouvons conclure que le TiO<sub>2</sub> peut être toxique induisant des perturbations tant au niveau physiologique que métabolique. De plus, il est démontré que le mollusque *Helix aspersa* est un excellent bioindicateur de la pollution terrestre.

Afin de mieux étayer les résultats obtenus, il serait intéressant de :

- Réaliser une étude histologique sur les organes d'*Helix aspersa* (hépatopancréas, rein) afin de déterminer les éventuelles altérations pouvant être engendrées.
- Réaliser le dosage d'autres biomarqueurs du stress oxydant (GST, MDA, LDH, SOD, métallothionéines...).
- Étudier la toxicité de ces nanoparticules sur les œufs d'escargots et les juvéniles.
- Utilisez plus d'escargot dans l'expérience (12 à 15 escargot par lot).



## Références *bibliographiques*

## 6. Références bibliographiques

- Aguilar ZP. (2013).** Chapter 7 - Nanopharmacology. *Nanomaterials for Medical Applications*, Aguilar ZP (Édit) Elsevier. p 293-360.
- Ait Hamlet, Y (2013).** Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa* Thèse de Doctorat en Sciences Université Badji Mokhtarannaba.177P
- Ali D., Ali H., Alarifi S., Kumar S., Serajuddin M., Mashih A.P., Ansari A.A. 2015.** Impairment of DNA in a Freshwater Gastropod (*Lymnea luteola* L.) After Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 68(3):543-552
- Ali D., Yadav P.G., Kumar S., Ali H., Alarifi S., Harrath A.H. 2014.** Sensitivity of freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L., to silver nanoparticles. *Chemosphere*. 104 :134-140
- Almeida E.A., DiasBainy A.C., MeloLoureiro A.P., MartinezRegina R., Miyamoto S., Onuki J., FujitaBarbosa L., Machado Garcia C.C., Manso Prado F., Ronsein G.E., Sigolo C.A., Brochini C.B., Gracioso Martins A.M., Gennari de Medeiros M.H., Di Mascio P. 2007.** Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol., A*. 146: 588–600.
- Amiard-Triquet C., Amiard J.C. (2012).** Behavioural ecotoxicology. In: Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Rainbow PS (eds) *Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects*. CRC Press, Boca Raton, pp: 253–278.
- Amin K.A., Hashem K.S., (2012).** Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC Vet. Res*, 8, 45.
- Amroun M. 2006.** Zoologie des invertébrés 1-des protozoaires aux Echinodermes UMMTO, 98p
- 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.
- ANSES (2014).** Évaluation des risques liés aux nanomatériaux : enjeux et mise à jour des connaissances. Autosaisine n°2012-SA-0273 « Nanomatériaux et Santé ».
- Argot J., J argot F., s. robert S. (2013).** base de données fiches toxicologiques, sur le site web l'inrs : [www.inrs.fr/fi\\_chetox](http://www.inrs.fr/fi_chetox). inrs . 2-5.
- Arie Bruinink · Jing Wang · Peter Wick (2015)** Effect of particle agglomeration in nanotoxicologie 659P Tuyet Le1, Eric Fribourg-Blanc and Mau Chien Dang1 The influence of solvents and surfactants on the preparation of copper nanoparticles by a chemical reduction method 8P
- Armand. (2013)** Effet des nanoparticules de dioxyde de titane sur les métalloprotéases, influence des paramètres physicochimiques. *Sciences agricoles*. AgroParisTech, 2011. Français. NNT : 2011AGPT0063. pastel-00771963

as sentinel organisme for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: An integrated approach. Environmental Health Perspectives. 114. p.63-69.

**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

**Azad, K., & Gajanan, P. (2017).** Photodegradation of methyl orange in aqueous solution by the visible light active Co: La: TiO<sub>2</sub> nanocomposite. Chem. Sci. J, 8(3), 1000164 1000174.

**Azouani. (2009)** Elaboration de nouveaux nanomatériaux photocatalytiques actifs sous rayonnement visible / Rabah Azouani ; sous la direction de Andrei Kanaev Université Sorbonne Paris Nord (Bobigny, Villetaneuse, Seine-Saint-Denis ; 1970-....). Organisme de soutenance 2009 .

**Bailey, J.C. (1981)** Geochemical Criteria for a Refined Tectonic Discrimination of Orogenic Andesites. Chemical Geology, 38, 27-34.

**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).** Toxicocinétique, toxicité chronique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). PhD Thesis, Paul Verlaine University at Metz. 476 p.

**Barker G.M. (2001).** The Biology of Terrestrial Molluscs. CAB International. Oxon.Wallingford.UK. 567 pages

**Barker,G.M.,(2001).**gastropods on land :phylogeny,diversity and adaptive morphology. The biology of terrestrial molluscs,vol : (1), pp.139.

**Baurand.P. E. (2014).**Embryotoxicité de contaminants métalliques et organiques chez l'escargot *Helix aspersa* .Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de l'Environnement Université de Franche-Comté,. 207p.

**Beaumont A, Cassier P, (1970).** Travaux pratiques de biologie animale : zoologie, embryologie, histologie, Dunod, PARIS, pp : 472.

**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.

**Bellala.** 2013. Inventaire qualitatif et quantitatif des gastéropodes au niveau de trois stations De la wilaya de Tizi-Ouzou Mémoire du master, Université akli mohand oulhadj – bouira . P01. (Juin 2012-Mai 2013).

**Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M. Djebbar 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)

- Berger B., Dallinger R.1993.**Terrestrial snails as quantitative indicators of enviromental monitoring assessment.25. p.65-84
- Besnaci S., Bensoltane S., Braia F.M.H., Zerari L., Khadri S., Loucif, H., 2016b.** Embryotoxicity evaluation of iron oxide Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on land snails: *Helix aspersa*. *J. Entomol. Zool. Stud.*, 4: 317-323.
- Besnaci S., Bensoltane S., Zerari L., Chrairia S., Ait-Hamlet S., Berrebbah H., 2016a.** Impact of nanometric iron oxide in the hepatopancreas of terrestrial gastropod *Helix Aspersa* : Histological Changes and Biochemical Parameters. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 36(2): 234-241.
- Besnaci, S. 2016.** Evaluation de la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer « Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> » sur un bioindicateur de pollution terrestre : *Helix aspersa*. Mémoire de doctorat, Université Bdji Mokhtar. Annaba. P 24-56.
- Biola-Clier M. (2016).** Génotoxicité et impact de nanoparticules de dioxyde de titane sur la réparation de l'ADN dans des cellules alvéolaires pulmonaires. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire. Université Grenoble Alpes, France, 246p.
- Bonnet et j.G., Aupinel P.et Vrillon j.L.1990.** l'escargot *Helix aspersa*, biologie\_élevage ; institut national de l'Agronomi, Paris,124 P.
- Bonnet J.C., Aupinel P., Vrillon J.L., 1990.** L'escargot *Helix aspersa*, biologie, élevage Du labo au terrain, INRA, 1-5.
- Bonnet, J.C., Vrillon, J.L.1990.**L'escargot *Helix aspersa* biologie-élevage. Edition INRA.14-15
- Boué H. Chanton R., 1971.** Biologie Animale Zoologie I. Invertébrés. ED Doin, Paris, 542 p
- Bour A. (2015).** Effets écotoxicologiques de nanoparticules de dioxyde de cérium en milieu aquatique : d'une évaluation en conditions monospécifiques à l'étude de la chaîne trophique expérimentale en microcosme. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, France, 271p.
- Bouteraa.Z.(2023).** Nanotoxicologie d'un oxyde de fer et titane chez les rats et l'effet opposé de diféruoyl-méthane. Thèse de Doctorat en Sciences, Université Echahid Cheikh Larbi Tébéssi –Tébessa.136p
- Chandran, R., Sivakumar, A., Sivakumar, A., Mohandass, S., and M. Aruchami., 2005.** Effect of cadmium and zinc on antioxidant anzyme activity in the gastropod. *Achatina fulica*. *Comparative Biochamistry and physiology, Part C.*, 140: 422-426.DOI.
- Chevallier H (1992).** L'élevage des Escargots. Production et Préparation du Petit-Gris. 2ème édition. Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort.
- 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 Petit-Gris. 2ème édition. Edition du point vétérinaire. Maison-Alfort



**Chevallier, H., (1977).** la variabilité de l'Escargot petit\_Gris hélix aspersa Muller. bulletin du museum d'Histoire Naturelle, PP425\_442.

**Christian L. 1980.** Les Mollusques 10.

**Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Ribera, D., Badot PM., 2001.**The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: Effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 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.

**Dallinger R., Berger B., Triebekom R., Kohler H. 2001.** Soil biology and ecotoxicology. The biology to terrestrial mollusc. CAB International. Oxon. Wallingford, UK. 489-525.

**Dallinger., Chabicovsky M., Hödl E ., Prem C ., Hunziker P and Manzl C (2005)** *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 289:1185-1195, 2005. First published May 19, 2005; doi:10.1152/ajpregu.00052.2005

**Dan Y., Zhang W., Xue R., Ma X., Stephan C., Shi H. (2015).** Characterization of gold nanoparticle uptake by tomato plants using enzymatic extraction followed by single-particle inductively coupled plasma–mass spectrometry analysis. *Environ. Sci. Technol* .

**Daniel J, Fiorino. (2010).** Voluntary initiatives regulation and nanotechnology oversight: Charting a Path. P56.

**Fahmy, S.R., F. Abdel-Ghaffar, F.A. Bakry and D.A. Sayed, 2014.** Ecotoxicological Effect of Sublethal Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles on Freshwater Snail *Biomphalaria alexandrina*. *Arch Environ Contam Toxicol.*, 67(2): Contam Toxicol., 67(2): -(192-202).

**Gimbert, F. (2006).** Cinétique de transfert de polluants métalliques du sol à l'escargot. Thèse de Doctorat en Science de la vie, Université de Franche Comté, Besançon, France, 192p.

**Gomot A. 1997.** Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme. *Bull. Acad. Natle.Méd.* 181.p.59-75.

**Gomot A. 1997b.** Double labelling of neural grafts for identification of sites mediating growth in snails. *Biol.celle.*89.133-140.

**Gomot A. de Vaufleury A., 1998.** Use of land snails to monitor environmental pollution. Laboratoire de Biologie et d'Ecophysiologie

**Guyard, A., 2009.**L'escargot. Consultable sur internet:[http://baladesnaturalistes hautetfort.com/archive/2009/10/10/l-escargot-debourgogne.html](http://baladesnaturalistes.hautetfort.com/archive/2009/10/10/l-escargot-debourgogne.html)

**Hellou J., (2011).** Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*, 18, 1–11.

- Hu C.W., Li M., Cui Y.B., Li D.S., Chen J., Yang L.Y. (2010).** Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol Biochem.* 42: 586-91.  
ISBN-10: 3-933922-75-5, ISBN-13: 978-3-933922-75-5, hardcover, 674 + Q1–78 pp.
- Jargot, D., Falcu, M., Robert, S et al. (2013).** Fiches toxicologiques, n° 299. INRS.
- Jeffery S., Gardi C., Jones A., Montanarella L., Marmo L., Miko L., Ritz K., Peres G., Römbke J., & Van der Putten W.H., (2010).** European Atlas of Soil Biodiversity. European Commission, Publications Office of the European Union, Luxembourg. 128 p.
- Kahli H (2015).** Evaluation du stress oxydatif induit par les nanoparticules chez *Helix aspersa* : Cas du dioxyde de titane. Université Badji Mokhtar Annaba, P53.
- 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.
- Khene, Berrebbah H., Yahyaoui A., Bouarroudj T., ZouainiaS, Kahlil H., Bourayoul C.,(2017).** biomarkers of oxidative stress, lipid peroxidation and ros production induced by tio<sub>2</sub> microparticles on snails *helix aspersa*.p127-133
- Kiddy H., 1999.** Tous au sujet des escargots, 36 ; 38p
- Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE and al. (2008).** Nanomaterials in the Environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem*; 27: 1825-1851
- Lalmi, S., & Lazreg, A. (2016).** Effet de deux molécule nanométrique sur les paramètre physiologique des escargots *Helix aspersa*. Mémoire de Master en Toxicologie, Xénobiotiques et Risque Toxicologique, Université de Larbi Tébessi –Tébessa,. 82p.
- Lapied E., Moudilou E., Exbrayat J.M., Oughton H., Joner E.J. (2010).** Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Nanomedicine.* 5:975-84.
- Larba, R. (2014).** Bio-surveillance de l'environnement dans la région Est : mesure debiomarqueurs chez *Elicha aspersa* et corrélation avec les caractéristiques physicochimiques des sols. Thèse de Doctorat en Physio-Toxicologie, Université Badji Mokhtar d'Annaba, 105p.
- Laskowski R., Hopkin P. 1995 b.** Accumulation of Zn. Cu. Pb. and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): Implication for Predators. *Environmental Pollution.* 91. p.289- 297.
- Le Bras G.J. (2007).** Ecotoxicologie et méthodes d'investigation « les bio-indicateurs ». Version 2.0, ISA & Université Catholique de Lille. France. 91p.
- Lecalve, D.,1989.** Influence of incubations condition of eggs on the 1st 6 weeks of the growth of snails *Helix aspersa* Muller (gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). *Bull.Soc. Zool.Fr.Evol.Zool.*114,101,110

- Masse.R. et Boudéne. C., 2013.** Des Maladies Professionnelles et de l'Environnement, Les Nanoparticules : une nouvelle classe de toxiques environnementaux 74 :316-319
- 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.
- MICHEL Rousselet, 1979,** docteur vétérinaire. L'élevage des escargots 2<sup>e</sup> édition du point vétérinaire, ISBN :2-86326-08-5. Pages : 10-11-12-13-30-31-32.
- Rousslet,M.(1979),** L'élevage des escargots., Deuxième édition, entièrement revue, complétée et actualisée. 11 : 13-29
- Mills C.L., Shukla D.H., Compton, G.J., (2006).** Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. *Aquat. Toxicol*, 77, 197–201.
- Müller O.F., 1774.** Vermium terrestrium et fluviatilium seu animalium infusorium, helminthicorum et testaceorum, non marinorum, succinda historia, vol. II. 89
- 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-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution* 138; (178-190).
- Oberdorster, G., Maynard, A., & Donaldson, K. et al. (2005).** Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.*; 2:8.
- PopleI. &Tribune M.G., 2002.** Are snails 'Love Darts' Source of Cupid Lore, *National Geographic News*,63: 211-243
- Quibik, (2007)** Schéma en coupe de l'anatomie d'un escargot.
- Radwan, M.A., Mohamed, M.S., (2013).** Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95: 91–97.
- Ramsden, C.S., T.B. Henry and R.D. Handy, 2013.** Sub-lethal effects of titanium dioxide nanoparticles on the physiology and reproduction of zebrafish. *Aquat. Toxicol.*, 126: 404-413.
- 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*
- Rinderhagen M., Ritterhof J., Zauke G.P. (2000).** Crustaceans as bioindicators. In: A. Gerhardt (Eds.) *Biomonitoring of polluted water - Reviews on actual topics*. Environmental Research Forum. Volume 9. Trans Tech Publications – Scitech Publications, 161–194.

**Romero, (2013)** Nanoparticules à base d'oxyde de titane pour la photocatalyse thèse de doctorat université paris-sud 158p.

**Sahraoui, A.S. (2022).** Utilisation *in situ* et *ex situ* de *Helix aspersa* comme bioindicateur de la contamination des sols par le cadmium et le plomb. Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine, 184p

**Sajid M., Ilyas M., Basheer C., Tariq M., Daud M., Baig N., & Shehzad F. (2015).** Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. Environ. Sci. Pollut. Res. 22 :4122– 4143.

**Sandrine.,Sylvie .,Louisette pirame., 2003 .**contribution à l'étude de la pathologie estivale de l'escargot petit-gris (*helix aspersa*) :reproduction expérimentale

**Sapana Devi M., Gupta A., (2014).** Sublethal toxicity of commercial formulations of deltamethrin and permethrin on selected biochemical constituents and enzyme activities in liver and muscle tissues of *Anabas testudineus*. Pestic. Biochem. Physiol, 115, 48–52.

**Scheifler R., Gomot-de Vaufleury A., Toussaint M.L., Badot P.M. 2002.** Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. Chemosphere 48.P.571-579.

**Scott-Fordsmand J.J., Krogh P.H. (2004).** The influence of application form on the toxicity of nonylphenol to *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomidae). Ecotoxicology and Environmental Safety. 58(3):294-299.

**Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., and Zhao, J. (2013).** Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Particle and Fibre Toxicology 10, 15.

**Singh et Singh 2020.** Soil Pollution and Human Health, *in*: Singh, P., Singh, S.K., S.M. (Eds), Plant Responses to Soil Pollution. Springer, Singapore. 205-220.

**Skendraoui F. 2015** Inventaire qualitatif et quantitatif des gastéropodes au niveau de deux stations de la wilaya de Tizi-Ouzou (Makouda et Drâa Ben Khedda).

**Swaileh K.M., Ezzughayyar A. (2000).** Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the land snail *Helix engaddensis*. Ecotoxicol. Environ. Saf, 47, 253-260.

**Triboulet S. (2013).** Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique. Thèse de Doctoaat en Sciences agricoles. Université de Grenoble. France. 343p.

**Unrine J.M., Hunyadi S.E., Tsyusko O.V., Rao W., Shoultz-Wilson W.A., Bertsch P.M. (2010)a.** Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms *Eisenia fetida*. Environ Sci Technol. 44:8308-13.

**Unrine J.M., Tsyusko O.V., Hunyadi S.E., Judy J.D., Bertsch P.M. (2010)b.** Effects of particle size on chemical speciation and bioavailability of Cu to earthworms *Eisenia fetida* exposed to Cu nanoparticles. J Environ Qual. 39:1942-53.

- 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.
- 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.
- 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.
- Wallace W.G., Estephan A., (2004).** Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaride amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquat. Toxicol*, 69, 289-297.
- Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., Hristovski K., von Goetz N., (2012)** Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol*, 2012, 46, 2242–2250
- welter-schultes f. w. (2012).** European non-marine molluscs, a guide for species identification. Bestimmungsbuch für europäische Land- und Süßwassermollusken. Planet Poster Editions, Göttingen
- Xiao X., Fan F.-R.F., Zhou J., & Bard A.J. (2008).** Current transients in single nanoparticle collision events. *J Am Chem Soc* 130 :16669–16677.
- Xiong D., Fang T., Yu L., Sima X., and Zhu W., 2011.** Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci total Environ* 409: (144-1452).
- Zaafour. M. (2014).** Étude écophysiological de la reproduction de l'escargot terrestre Petit-Gris (*Elicia aspersa aspersa*, Gastropoda: Stylommatophora; Helicidae) dans la région Nord-Est d'Annaba – Algérie. Thèse de Doctorat en Sciences, Université Badji Mokhtarannaba . 109p .