



République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة باجي مختار عنابة
Université Badji Mokhtar Annaba
Faculté des Sciences
Département de Biologie

Laboratoire de Toxicologie Cellulaire

Thèse présentée en vue de l'obtention d'un diplôme de Doctorat en Science
en Biologie Animale – Option : Toxicologie

Intitulé :

**Etude de la toxicité des particules métalliques d'origine
industrielle chez *Helix aspersa*. Evaluation
nanotoxicologique du Fe_2O_3 et Al_2O_3 .**

Présentée Par

Mr BOUCENNA Mounir

Soutenue publiquement le 04-01-2016

Devant le jury composé de :

Président : Pr. DJEBAR Mohamed Réda	Prof.	Université Badji Mokhtar Annaba
Directrice de thèse : Pr. BERREBBAH Houria	Prof.	Université Badji Mokhtar Annaba
Examineurs : Pr. BOUSLAMA Zihad	Prof.	Université Badji Mokhtar Annaba
Pr. HAMDY-PACHA Youcef	Prof.	E.N.S.V. Alger
Pr. TADJINE Aicha	Prof.	Université Chadli Bendjedid Tarf
Dr. ZAIDI Nedjouda	MCA.	Université 20 Août 1955 Skikda

Année Universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire de toxicologie cellulaire (LTC) dirigé par le Professeur **Mohamed Réda DJEBAR**. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour son accueil bienveillant au sein du laboratoire, pour sa rigueur scientifique et ses encouragements ainsi que pour la confiance qu'il m'a constamment témoignée.

Mes remerciements les plus sincères vont au Professeur **Houria BERREBBAH-DJEBAR** pour m'avoir suggéré de travailler sur ce sujet de recherche et avoir accepté la direction de cette thèse, pour sa bonne humeur, sa gentillesse, sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je remercie vivement une deuxième fois le Professeur **Mohamed Réda DJEBAR** d'avoir accepté la présidence du jury.

Je remercie infiniment Madame **BOUSLAMA Zihad**, Professeur à l'université de Annaba d'avoir accepté d'examiner et de venir honorer de sa présence mon jury de thèse.

Mes sincères remerciements vont aussi à Monsieur **HAMDI-PACHA Youcef** Professeur à l'école national des sciences vétérinaires d'Alger qui m'a fait l'honneur d'évaluer et d'examiner ce travail.

Je remercie également Madame **TADJINE Aicha**, Professeur à l'université de El-Tarf d'avoir accepté de juger mon travail en qualité d'examinatrice.

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame **ZAIDI Nedjouda**, Maître de conférences « A » à l'université de Skikda de m'avoir accordé le privilège de participer à ce jury et d'examiner avec soin cette thèse.

Je remercie également tous mes collègues de l'université Badji Mokhtar Annaba et de l'université Ferhat Abas Sétif-1-.

Je tiens à remercier doublement mon épouse Hind, pour ses discussions scientifiques et son aide pour la réalisation de cette thèse.

Un grand hommage à monsieur le Professeur Draissia Mohamed « Allah yarahmou».

Enfin, je tiens à remercier infiniment toute ma famille.

Du fond du cœur, merci pour tous !

Résumé :

Dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de certaines particules métalliques (ETM) et nanoparticules métalliques en l'occurrence Fe_2O_3 et Al_2O_3 sur un modèle biologique bioindicateur/bioaccumulateur (*Helix aspersa*), nous nous sommes intéressés à certains paramètres biologiques (physiologiques, biochimiques et enzymatiques) pouvant être affectés par ces xénobiotiques. Dans un premier temps nous avons ciblé les perturbations précoces et sublétales chez l'escargot, à travers l'évaluation des variations des principaux métabolites (Protéines, Glucides et Lipides) au niveau des principaux organes tels l'hépatopancréas et le rein. Nos résultats ont mis en évidence une augmentation de ces métabolites particulièrement au niveau de l'hépatopancréas.

Le suivi des biomarqueurs de la toxicité a révélé un état de stress oxydatif chez *Helix aspersa* après son exposition aux poussières métalliques (ETM) pendant deux semaines et pour les traités par les NPs de fer et d'aluminium pendant notamment huit semaines. Cette toxicité s'est manifestée par une augmentation significative du taux de MDA (peroxydation lipidique), par l'induction de l'activité CAT et GST au niveau de l'hépatopancréas et du rein, et par une diminution du taux de GSH en faveur de son utilisation dans le processus de détoxification de ces contaminants parallèlement à une inhibition de l'activité AChE révélant un effet neurotoxique pour les ETM.

L'étude des capacités bioaccumulatrices de notre modèle biologique a mis en évidence un pouvoir accumulateur très important des NPs étudiés, plus marqué au niveau de l'hépatopancréas et plus importante pour l'oxyde d'aluminium. L'aspect histopathologie a permis d'illustrer les atteintes tissulaires suite à l'exposition aux différentes particules métalliques micro et nanométriques se manifestant par une hypertrophie cellulaire, des nécroses importantes et une présence de particules sphériques sous forme d'amas confirmant ainsi la bioaccumulation des NPs.

Mots clés : Nanoparticules, ETM, CAT, GST, GSH, MDA, Bioaccumulation, Histologie, Escargot, *Helix aspersa*.

Abstract:

In the frame of the evaluation of some metallic particles and nanoparticles toxicities in occurrence of Fe₂O₃ and Al₂O₃, using animal model as a bioindicator/bio accumulator (*Helix aspersa*), we were interested in some biological parameters (Physiological, biochemical and enzymatic parameters) that could be affected by these xenobiotic. In the first time, we focused on the early disruption and sub-lethal in snail, through the evaluation of principal metabolite variations (Proteins, Carbohydrates and Lipids) in the principal organs, such as digestive gland and kidney. Our results evidenced an elevation of the studied metabolites, in particular in digestive gland.

The biomarkers of toxicity showed a state of oxidative stress in *Helix aspersa*, following exposure to metallic dusts (MD) for two weeks, and in the treated animals with NPs and aluminum of iron for eight weeks. This toxicity was manifested by a significant increase in the level of MDA (lipid peroxidation), along with induction of CAT and GST activities in the digestive gland and the kidney, as well as decreased level of GSH, due to its utilization in detoxification process of the contaminants, especially following inhibition of AChE activity that exhibits a neurotoxic effect for metallic dusts (MD).

Studying the bioaccumulative capacity of our biological model evidenced an important accumulative ability of the studied NPs. Interestingly, the highest level was noticed for aluminum oxide in the digestive gland. Histopathological examinations showed tissue alterations following varying metallic dust exposures (micro and nanoparticles), showing cellular hypertrophy; sever necrosis along with presence of particles at spherical form of clusters confirming bioaccumulation of NPs.

Keywords: Nanoparticles, MT, CAT, GST, GSH, MDA, Bioaccumulation, Histology, Snail, *Helix aspersa*.

ملخص:

تتمحور موضوع بحث أطروحتنا هذه حول معرفة خطورة و تأثير سمية " Natotoxicologie " أكسيد الحديد و أكسيد الألمنيوم و كذا تأثير الغبار المعدني المنبعث من مركب الحديد و الصلب بالحجار على نموذج بيولوجي مؤشر و مكسد للمعادن و هو الحلزون *Helix aspersa* ، تظهر النتائج المتحصل عليها التغيرات البيوكيميائية لكل من الحلزونات المعالجة بالغبار المعدني للحجار، لمدة أسبوعين من خلال التغيرات المسجلة في قياس التغيرات اللايضية (البروتين، السكريات و الدهون) خاصة على مستوى الكبد، و قد بينت النتائج ايضا، العلامات البيولوجية لحالة الإجهاد التأكسدي لحلزونات *Helix aspersa* المعالجة بأكسيد الحديد و أكسيد الألمنيوم لمدة ثمانية أسابيع، و التي تأكدها الزيادة في النشاط الإنزيمي لـ CAT و GST على مستوى الكبد و الكلية إضافة الى المعدلات العليا من MDA ، و الذي صاحبها من إنخفاض في مستويات GSH لإستخدامها في عمليات إزالة السموم الخلوية كما تؤكد النتائج الأثر السمي العصبي من خلال الإنخفاض الملحوظ في النشاط الإنزيمي لـ: AChE.

يمثل الحلزون *Helix aspersa* نموذجا واضحا على قدرته الكبيرة في تكديس كميات عالية من المعادن المستعملة في البحث على مستوى الكبد مقارنة بالكلية، وذلك من خلال الكميات الكبيرة المكدسة لأكسيد الألمنيوم مقارنة بتلك المسجلة بالنسبة لأكسيد الحديد. كما بينت الدراسة النسيجية حالة التلف النسيجي، و التي تتجلى من خلال إنتفاخ في حجم الخلايا، نخر، إضافة إلى وجود جزيئات كروية الشكل و متناهية الصغر، و التي تؤكد ظاهرة التكدس في الأعضاء محل الدراسة.

الكلمات المفتاحية :

Nanoparticules ، *Helix aspersa* ، الحلزون، الأنسجة، التكديس، MDA، GSH، GST، CAT، ETM

Liste des abréviations

AChE : Acétylcholinestérase.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.

Al₂O₃ : Oxyde d'Aluminium.

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

CAT : Catalase.

ddl : degré de liberté.

ETM : Eléments Traces Métalliques.

Fe₂O₃ : Oxyde de Fer.

GPx : Glutathion Peroxydase.

GSH : Glutathion.

GSSG : Glutathion Disulfure.

GST : Glutathion-S-transférase.

HSDB: Hazardous Substances Data Bank.

HSp : Heat Shock proteins.

IRSTEA : Institut Français de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement & l'Agriculture.

ISO : International Organization for Standardization.

IUCLID : International Uniform Chemical Information Database.

LDH : Lactates Déshydrogénases

LM2S : Laboratoire de Magnétisme et Spectroscopie des Solides.

MDA : Malonedialdéhyde.

MEB : Microscopie Electronique à Balayage.

MET : Microscopie Electronique à Transmission.

MTs : Métallothionéines

NPs : Nanoparticules.

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques.

OMS : Organisation Mondiale de Santé.

PCP : Phénylcyclohexyl-Pipéridine.

ROS : Reactive Oxygen Species.

SAA : Spectrophotométrie d'Absorption Atomique.

SOD : Superoxyde Dismutase.

TBT : Tributylétain.

USEPA : United States Environmental Protection Agency.

Liste des Tableaux

	Titre	Page
1	Composition en ppm des poussières rejetées par l'aciérie électrique 1 (ACE 1) et l'aciérie électrique 2 (ACE 2) du complexe sidérurgique d'El-Hadjar durant l'année (2008) (Tadjine <i>et al.</i> , 2008)	24
2	Propriétés physico-chimiques de l'oxyde de fer (CERADEL, 2012)	25
3	Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'oxyde d'aluminium (Al_2O_3)	25
4	Répartition des lots des escargots des bioessais avec les différentes concentrations de poussières métalliques, Fe_2O_3 et Al_2O_3 .	29
5	Carrés moyens de l'analyse de la variance à un critère des paramètres mesurés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par les poussières métalliques	44
6	Carrés moyens de l'analyse de la variance à un facteur des paramètres mesurés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par l'oxyde de fer	48
7	Carrés moyens de l'analyse de la variance à un facteur des paramètres mesurés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par l'oxyde d'aluminium	49
8	Comparaison des moyennes des paramètres étudiés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par l'oxyde de fer et l'oxyde d'aluminium	51
9	Carrés moyens de l'analyse de la variance à un facteur des paramètres mesurés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par les poussières métalliques	52

- 10** Comparaison des moyennes des paramètres étudiés au niveau 54
de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par les
poussières métalliques
- 11** Carrés moyens de l'analyse de la variance à un facteur de la 76
bioaccumulation mesurés au niveau de l'hépatopancréas et du
rein des escargots traités par l'oxyde de fer et l'oxyde
d'aluminium
- 12** Comparaison des moyennes des paramètres étudiés au niveau 78
de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par l'oxyde
de fer et l'oxyde d'aluminium
-

Liste des Figures

	Titre	Page
1	Transfert, transformation et biodisponibilité des nanoparticules dans l'environnement (Bottero <i>et al.</i> , 2015)	5
2	Différentes voies de contamination d' <i>Helix aspersa</i> (La Rocca, 2004)	8
3	Différents mécanisme de pénétration des nanoparticules dans la cellule (modifié d'après Krug et Wick, 2011)	12
4	Systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques impliqués lors d'une exposition aux NPs (modifié de Unfried <i>et al.</i> , 2007)	20
5	<i>Helix aspersa</i> adulte a) photographie ; b) Morphologie externe de l'escargot (Kerney <i>et al.</i> , 2006)	22
6	Présentation de l'oxyde de fer (a : poudre), (b : la structure cristallographique)	24
7	Spectre des rayons-X de l'oxyde de fer	27
8	Spectre des rayons-X de l'oxyde d'aluminium	28
9	Photographie de la dissection de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	30
10	Principales étapes d'extraction des métabolites : protéines, glucides et lipides (Shibko <i>et al.</i> , 1966)	31
11	Variation du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas et du rein en fonction des différentes concentrations de poussières métalliques	45
12	Variation du taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas et du rein en fonction des différentes concentrations de poussières métalliques	46
13	Variation du taux de lipides au niveau de l'hépatopancréas et du rein en fonction des différentes concentrations de poussières métalliques	46

14	Variations de l'activité catalase en fonction des concentrations croissantes de Fe ₂ O ₃ et Al ₂ O ₃ au niveau de l'hépatopancréas et du rein	56
15	Variations de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes de Fe ₂ O ₃ et Al ₂ O ₃ au niveau de l'hépatopancréas et du rein	56
16	Variations du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes de Fe ₂ O ₃ et Al ₂ O ₃ au niveau de l'hépatopancréas et du rein	57
17	Variations du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes de Fe ₂ O ₃ et Al ₂ O ₃ au niveau de l'hépatopancréas et du rein	57
18	Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau de l'hépatopancréas	58
19	Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau du rein	59
20	Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau de l'hépatopancréas	60
21	Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau du rein	60
22	Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau de l'hépatopancréas	61
23	Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau du rein	62
24	Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau de l'hépatopancréas	63

25	Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau du rein	63
26	Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau de l'hépatopancréas	64
27	Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau du rein	65
28	Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau de l'hépatopancréas	66
29	Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau du rein	66
30	Variation de l'activité AChE au niveau de la tête en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques	67
31	Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau de l'hépatopancréas	68
32	Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau du rein	69
33	Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau de l'hépatopancréas	69
34	Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau du rein	70
35	Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau de l'hépatopancréas	71
36	Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau du rein	71

37	Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau de l'hépatopancréas	72
38	Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau du rein	73
39	Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau de l'hépatopancréas	74
40	Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau du rein	74
41	Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau de l'hépatopancréas	75
42	Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau du rein	76
43	Bioaccumulation des NPs de fer au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i>	78
44	Bioaccumulation des NPs de fer au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i>	79
45	Bioaccumulation des NPs d'alumine au niveau de l'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i>	80
46	Bioaccumulation des NPs d'alumine au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i>	80

Liste des Planches

	Titre	Page
1	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 1000 µg/g (B), et 1500 µg/g(C) de poussières métalliques (X 40).	82
2	Coupes histologiques au niveau du rein des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 1000 µg /g (B), et 1500 µg/g(C) de poussières métalliques (X 40).	84
3	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par les concentrations 200 µg/g (A), et 400 µg/g(B) de Fe ₂ O ₃ (X 40).	86
4	Coupes histologiques du rein des escargots traités par les concentrations 200 µg/g (A), et 400 µg/g(B) de Fe ₂ O ₃ (X 40).	87
5	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités par les concentrations 200 µg/g (A), et 400 µg/g(B) d'Al ₂ O ₃ (X 40).	89
6	Coupes histologiques du rein des escargots traités par les concentrations 200 µg/g (A), et 400 µg/g(B) d'Al ₂ O ₃ (X 40).	90

Chapitre I. Introduction Générale

1. Généralités	1
2. Les éléments traces métalliques (ETM).....	2
3. Les nanoparticules (NPs).....	3
3.1. Définition et étymologie des nanoparticules	3
3.2. Caractéristiques et propriétés des nanoparticules	3
3.3. Domaines d'applications des nanoparticules.....	5
3.4. Nanotoxicologie : l'émergence d'une nouvelle discipline.....	6
3.5. Importance de la caractérisation physico-chimique en nanotoxicologie.....	6
4. Toxicité des ETM et des NPs	7
4.1. Toxicité des ETM : cas des escargots	7
4.1.1. Bioaccumulation	9
4.1.2. Devenir des ETM	10
4.2. Toxicité des nanoparticules (NPs)	10
4.2.1. Relation taille des NPs/Toxicité	11
4.2.2. Relation chimie de surface/Toxicité des nanoparticules.....	12
4.2.3. Effet de la solubilité sur la toxicité des nanoparticules.....	13
5. Biosurveillance des écosystèmes et bioindication	13
5.1. Biosurveillance passive et active.....	14
5.2. La bioindication	15
5.3. Les biomarqueurs : concepts et rôle biologique.....	15
6. Biologie et écologie de l'escargot	16
6.1. L'utilisation de l'escargot en écotoxicologie	17

7. Stress oxydant	18
7.1. Origine des espèces réactives de l'oxygène.....	19
7.2. Le système antioxydants cellulaire.....	19

Chapitre II. Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique	22
1.1. Collecte et sélection des échantillons.....	23
2. Matériel chimique	23
2.1. Les rejets métalliques utilisés	23
2.2. L'oxyde de fer (Fe_2O_3)	24
2.3. L'oxyde d'aluminium(Al_2O_3).....	25
2.4. Caractérisation de la taille moyenne des grains de Fe_2O_3 et Al_2O_3	26
2.4.1. Diffraction des rayons-X	26
2.4.2. Identification des échantillons	26
2.4.3. Calcul de la taille des cristallites	26
3. Méthodes	28
3.1. Dispositif expérimental et protocole de traitement	28
3.2. Dosages de principaux métabolites et biomarqueurs.....	29
3.2.1. Dosage des métabolites	31
3.2.1.1. Dosage des protéines totales	32
3.2.1.2. Dosage des glucides totaux	32
3.2.1.3. Dosage des lipides totaux	32
3.2.2. Dosages des biomarqueurs	33
3.2.2.1. Dosage de l'activité catalase (CAT).....	33
3.2.2.2. Dosage de l'activité glutathion-S-transférase (GST).....	34
3.2.2.3. Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE).....	35

3.2.2.4. Dosage du Glutathion (GSH).....	36
3.2.2.5. Dosage du malonedialdéhyde (MDA)	38
3.3. Détermination de la bioaccumulation par la spectrophotométrie d’Absorption atomique (SAA)	40
3.3.1. Préparation des tissus, minéralisation et extraction	40
3.3.2. Minéralisation.....	40
3.4. Analyses histologiques	41
3.4.1. Fixation des organes	41
3.4.2. Inclusion des organes dans la paraffine.....	41
3.4.3. Réalisation des coupes au microtome.....	41
3.5. Traitement des données	42

Chapitre III. Résultats et discussion

1. Effets des poussières métalliques sur les variations des métabolites.....	44
2. Effet des traitements sur les variations des biomarqueurs.....	47
3. Effet des traitements (Fe_2O_3 et Al_2O_3) sur la variation des biomarqueurs étudiés.....	55
3.1. Effet de l’oxyde de fer , de l’oxyde d’aluminium et des poussières métalliques sur l’activité catalase.....	58
3.2. Effet de l’oxyde de fer, de l’oxyde d’aluminium et des poussières métalliques sur l’activité GST.....	62
3.3. Effet de poussières métalliques sur l’activité acétylcholinestérase (AChE).....	67
3.4. Effet de l’oxyde de fer , de l’oxyde d’aluminium et des poussières métalliques sur le taux de GSH.....	68
3.5. Effet de l’oxyde de fer, de l’oxyde d’aluminium et des poussières métalliques sur la variation du MDA.....	72

4. Bioaccumulation des nanoparticules métalliques de fer et d'aluminium.....	76
5. Etude histopathologique	81
5.1. Cas des traités par les poussières métalliques.....	81
5.2. Cas des traités par les NPs de Fe ₂ O ₃	85
5.3. Cas des traités par les NPs d'Al ₂ O ₃	88
Discussion Générale.....	91
Conclusion générale et perspectives	111
Références Bibliographiques	113

Chapitre I. Introduction Générale

1. Généralités

La pollution de l'environnement constitue depuis les années 60 une préoccupation mondiale avec des grands efforts déployés pour la protection de l'environnement et la gestion efficace des ressources naturelles, développées lors de la conférence des Nations Unies sur l'environnement à Stockholm 1972. Les activités humaines ont considérablement accru la libération de diverses molécules dans l'environnement qui se révèlent toxiques non seulement pour la flore et la faune mais également pour l'homme. Les sources de pollution sont soit d'origine naturelle, soit d'origine anthropique et peuvent être de différentes natures suivant la manière dont elles polluent les différents compartiments de l'environnement, l'eau, l'air et le sol, via plusieurs mécanismes physico-chimiques de transfert. Les polluants d'origine industrielle sont responsables d'une pollution de proximité qui affecte la santé des populations lors des pics de pollution (OMS, 2014).

A l'échelle globale, le transfert et la transformation des substances oxydantes sont à l'origine des pluies acides (González et Aristizábal 2012; Chen *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015), les États-Unis, l'Europe et le sud de la Chine sont les plus grande zone touchée par les pluies acides (Wang et Xu, 2009). L'émission de substances précurseurs de la pollution photochimique (oxydes d'azote, composés organiques, monoxyde de carbone) est également imputable en partie aux activités industrielles, elle provoque également l'effet de serre (GIEC, 2007).

Le développement de l'agriculture intensive contribue également à la dégradation environnementale. Toutefois, les produits phytosanitaires sont aussi devenus des agents polluants quasi omniprésents (Bacchetta *et al.*, 2014; Macary *et al.*, 2014), et largement distribués avec des traces qui peuvent être détectées dans tous les compartiment de l'environnement (Yadav *et al.*, 2015). Le caractère non-sélectif de certains d'entre eux et leur persistance peuvent avoir de graves conséquences sur

l'environnement : ils peuvent affecter des organismes non ciblés et contaminer les sols agricoles, les eaux souterraines, les rivières, les lacs et la chaîne alimentaire (Wagner *et al.*, 2010).

2. Les éléments traces métalliques (ETM)

La croûte terrestre est constituée d'éléments majeurs (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti, H, P et Mn) avec un total de 99.4% (Coïc et Coppenet, 1989), le reste est représenté par l'ensemble des éléments traces (0.6%) de la lithosphère (Baize, 1997). Ces éléments regroupent 68 éléments inorganiques (métaux et métalloïdes) ont une concentration inférieure à 0.1% pour chacun d'entre eux qui sont désignés sous le terme général d'Eléments Traces Métalliques (ETM), (Kabata-Pendias et Pendias, 2001; Burnol *et al.*, 2006).

Les activités humaines représentent la principale source de pollution par les ETM (Roth *et al.*, 2006; Nagajyoti *et al.*, 2010). A partir d'une source ponctuelle, les éléments traces vont, par différents transferts successifs, passer d'un compartiment de l'environnement à un autre, mais il semble que le récepteur final privilégié de cette contamination soit le plus souvent le sol et ses constituants, réacteurs biogéochimiques complexes (Walker *et al.*, 1996; Bourrelier *et al.*, 1998), capables de devenir source de pollution en libérant les composés stockés vers les autres compartiments environnementaux exposant les organismes qu'ils abritent : plantes, animaux et les humains (Prokop *et al.*, 2000; Stankovic et Stankovic 2013). Cette contamination est aggravée par la persistance des ETM qui ne sont pas minéralisés ou dégradés pour devenir des composés moins complexes (Yang *et al.*, 2005; Lohmann *et al.*, 2007).

Les ETM peuvent être classés en fonction de leur caractère essentiel pour les organismes vivants. Des éléments essentiels ou oligo-éléments comme le Cu, Mn, Zn, Co, Mo, Se, Cr, Ni, V et As ont des fonctions biologiques connues (catalyseurs enzymatiques) (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Leur concentration dans

l'alimentation ou dans le sol doit être maintenue pour permettre un développement et une reproduction normale des organismes vivants (Walker *et al.*, 1996; Senesi *et al.*, 1999). En effet, si les teneurs sont trop élevées, des mécanismes de toxicité peuvent être développés (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Les éléments non essentiels comme Hg, Cd, Pb, As, Sb, Tl et Pu (Stankovic *et al.*, 2011a; Stankovic et Jovic, 2012), qui, en plus d'être toxiques pour les êtres vivants, peuvent induire des déficiences en éléments essentiels, à travers la compétition au niveau des sites actifs des macromolécules importantes (sites de protéines enzymatiques ou sites membranaires) (Walker *et al.*, 1996; Ingersoll *et al.*, 2000 ; Stankovic *et al.*, 2011a).

3. Les nanoparticules (Nps)

3.1. Définition et étymologie des nanoparticules

Le nano dérivé du préfixe grec *nanos* qui signifie nain, il est de l'ordre du milliardième (10⁻⁹). Un nanomètre (nm) équivaut à un milliardième de mètre. Selon les travaux de l'institut britannique de normalisation (BSI, 2005), de l'American Society for Testing and Materials (ASTM, 2006), du groupe nordique (Schneider *et al.*, 2007) et ISO (2008a) ont défini les NPs comme des particules de synthèse ayant une ou plusieurs dimensions de moins de 100 nm. En outre, le terme particules ultrafines a été en usage pendant un certain temps pour désigner nanoparticules (Oberdörster *et al.*, 2005). C'est dans ce contexte (taille des NPs) que sont nées les nanosciences qui se situent à l'interface de trois grandes disciplines, la biologie, la physique et la chimie. Les nanotechnologies ont pour objectif de mettre en application les concepts et les procédés obtenus par les nanosciences (Pautrat, 2011; Logothetidis, 2011).

3.2. Caractéristiques et propriétés des nanoparticules

Les nanoparticules (NPs) sont une classe très large de particules regroupant des composés de nature organique, inorganique ou composite. Les particularités structurales très spécifiques des NPs, la jonction entre l'échelle atomique et le

matériau leur confère d'autres propriétés spécifiques. En effet, contrairement aux matériaux classiques, les nanoparticules voient leurs propriétés changer en fonction de leur taille, leur surface spécifique, l'état de surface, ou encore la forme du nano-objet considéré (Oberdörster *et al.*, 2005; El Badawy *et al.*, 2011; Neoh *et al.*, 2015).

Les propriétés optiques des nanoparticules sont connues depuis le 9^{ème} siècle en mésopotamie où les artisans utilisaient des nanoparticules pour donner un aspect brillant à leur poterie (Padovani *et al.*, 2003, Pradell *et al.*, 2008).

Les NPs possèdent également des propriétés électriques particulières. Zhan *et al.*, (2003a) et Aitken *et al.*, (2004) notent que l'ajout des nanotubes de carbone à des matrices composites démontrent des propriétés métalliques ou semi-conductrices, ils sont aussi d'excellents conducteurs thermiques (Hameed Hyder, 2003).

Les propriétés mécaniques des nanoparticules sont également impressionnantes, elles s'étendent de la superplasticité (Lu *et al.*, 2000) à des résistances décuplées (Qi *et al.*, 2003). Les NPs sont dotés d'une légèreté et d'une flexibilité importante, Ratner et Ratner, (2003) et Aitken *et al.*, (2004) mentionnent que la résistance mécanique des nanotubes de carbone est plus de soixante fois supérieure aux meilleurs aciers, même si leur poids est plus de six fois inférieur.

La nature des éléments formant les nanomatériaux (métal, carbone, polymère) est évidemment le premier facteur qui contrôle la nature de leurs propriétés, influant ainsi sur la transformation et la persistance des NPs dans l'environnement (figure 1).

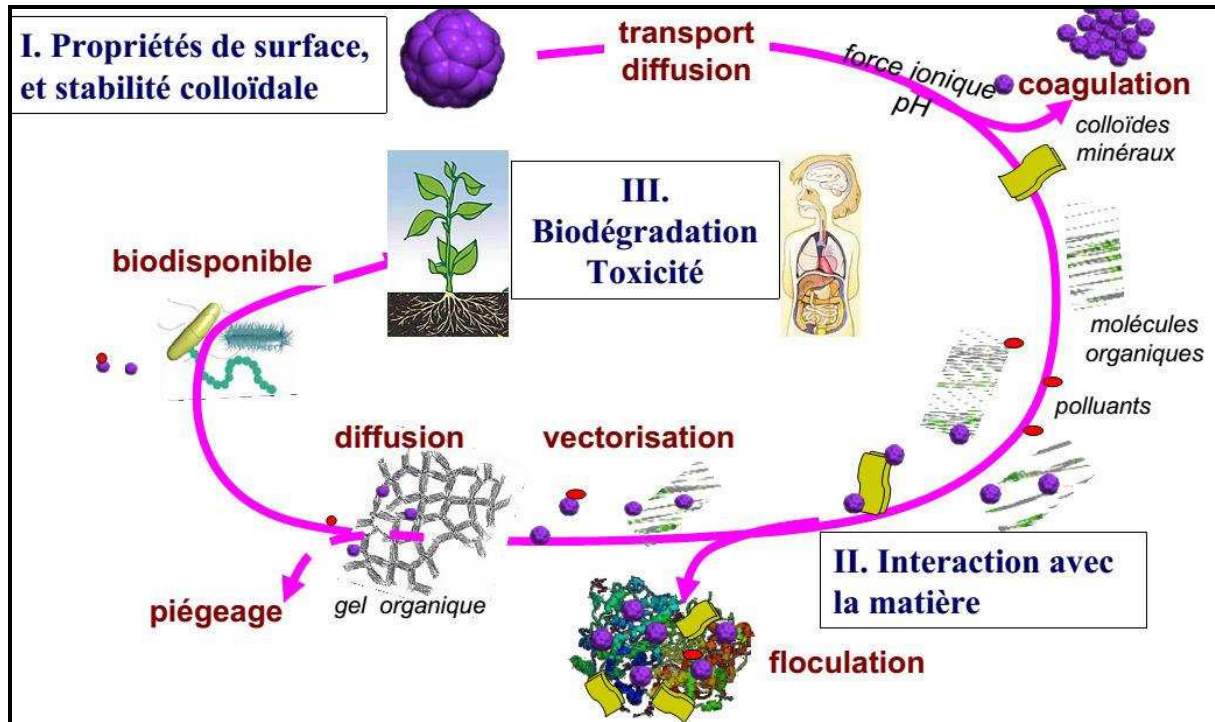


Figure 1 : Transfert, transformation et biodisponibilité des nanoparticules dans l'environnement (modifié d'après Bottero *et al.*, 2015).

3.3. Domaines d'applications des nanoparticules

Les nanotechnologies et nanoparticules sont actuellement considérées comme la nouvelle révolution industrielle et affectent toutes les sphères de la société (Roco, 2001). Ils ont permis aussi d'ouvrir de nouvelles perspectives dans le monde industriel, scientifique, économique (Koh et Wong, 2005) et technique (Hussein, 2015) et les nanoarchitectures (Ariga, 2015). L'intégration des nanoparticules dans les produits commerciaux est en constante croissance, selon l'inventaire du *Woodrow Wilson International Center for Scholars*, on retrouve chaque année environ 250 nouveaux produits comprenant des NPs dans leur composition.

L'utilisation des nanotechnologies et particulièrement les NPs, dans le domaine médical par exemple constitue actuellement un enjeu majeur. Ainsi, les NPs métalliques telles que l'oxyde de fer (Gupta et Gupta, 2005; Barnett *et al.*, 2012), l'oxyde d'aluminium (Ansari et Hussain, 2011), l'oxyde de zinc (Ansari *et al.*, 2011) et

l'oxyde de cuivre (Ren *et al.*, 2009) sont actuellement utilisées en médecine. Les premières nanoparticules ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) sont des nanoparticules à base d'oxydes de fer (Fe₂O₃), développées comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM) chez l'homme (Bonnemain, 1998; Sonvico *et al.*, 2005). Les NPs sont également utilisées dans le cadre de la lutte contre la pollution atmosphérique et automobile pour augmenter l'autonomie des voitures électriques, ou encore dans les techniques de biodépollution des résidus médicaments grâce à des membranes de filtration d'eaux usées contenant des nanoparticules, et enfin dans le domaine de l'énergie solaire (dans des cellules solaires pour accroître leur efficacité) (Gratzel, 2001).

3.4. Nanotoxicologie : l'émergence d'une nouvelle discipline

La nanotoxicologie a été proposée comme une nouvelle branche de la toxicologie pour l'étude des effets néfastes des nanoparticules sur les organismes vivants (Donaldson *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

Ferin *et al.*, (1990) et Oberdorster *et al.*,(1990) ont mis en évidence que les particules ultra-fines, sont plus toxiques que celles de taille plus élevée et ce pour la même dose massique. Quelques années plus tard, il a été démontré que la toxicité des particules ultra-fines était beaucoup mieux corrélée avec l'aire de surface des particules qu'avec la masse (Oberdorster *et al.*, 1992). Ce changement de concept dans la dosimétrie des particules est fondamental dans l'émergence de la nanotoxicologie et les toxicologues ont depuis porté beaucoup d'attention aux différentes propriétés physico-chimiques des particules (Oberdörster, 2001).

3.5. Importance de la caractérisation physico-chimique en nanotoxicologie

La bonne caractérisation des propriétés physico-chimiques des NPs est une étape cruciale dans toute étude toxicologique des nanoparticules (Bouwmeester *et al.*, 2011; Hristozov *et al.*, 2012). Cependant, une faible variation de la taille ou des propriétés de surface des NPs peut considérablement changer leur toxicité. Pour cette

raison, l'importance de la caractérisation a été étudié par plusieurs auteurs, qui ont suggéré plusieurs paramètres à évaluer pour une caractérisation adéquate (Da Silva *et al.*, 2014; Koedrith *et al.*, 2014). Par ailleurs, la dégradation des NPs donne des produits plus toxiques que la molécule initiale (Fisichella *et al.*, 2014).

Les paramètres les plus fréquemment mentionnés sont : La taille et la taille des agglomérats, la composition (pureté), la surface (charge, groupement chimique, aire de surface), forme, stabilité (stabilité colloïdale, solubilité) et enfin la structure cristalline. La caractérisation complète des nanoparticules nécessite plusieurs approches méthodologiques (Da Silva *et al.*, 2011; Wilkinson *et al.*, 2012). En général, les chercheurs en nanoparticules analysent la forme, la distribution et le degré d'agglomération des NPs avec la microscopie électronique à balayage (MEB), la microscopie électronique à transmission (MET) (Carlton et Ferreira, 2012; Hondow *et al.*, 2012), et la diffraction des rayons X (XRD) (Zhong *et al.*, 2012), également suggérée par les lignes directrices de l'OCDE (OCDE, 2012). La mesure de la taille des nanoparticules est toutefois considérée comme essentielle pour toute étude en nanotoxicologie (Dhawan *et al.*, 2009).

4. Toxicité des ETM et des NPs

4.1. Toxicité des ETM : cas des escargots

Après sa libération dans l'environnement, les contaminants sont soumis à des processus de transport et de dispersion complexes à l'intérieur et entre les différents compartiments de la biosphère. L'exposition est le processus par lequel un organisme acquiert une concentration (Suter, 1993), elle conditionne l'absorption qui résulte de la combinaison des concentrations biodisponibles, des caractéristiques des différentes voies d'exposition et d'absorption ainsi que la fréquence et la durée de contact (Coeurdassier, 2001).

L'étude du transfert des ETM est souvent réalisée en mesurant les concentrations en métaux dans différents organismes présents sur un site et en se

basant sur des données bibliographiques pour estimer le régime alimentaire des espèces étudiées (Roberts et Johnson, 1978; Notten *et al.*, 2005; Veltman *et al.*, 2008). L'utilisation de modèles bioaccumulateurs (*Helix aspersa*) a également permis de suivre les transferts des divers polluants (organiques, métalliques, radionucléides) dans des chaînes trophiques (Scheifler *et al.*, 2002b, 2006 ; Hispard *et al.*, 2008b).

Les gastéropodes terrestres ont potentiellement plusieurs voies d'absorption dépendant principalement de l'écologie de l'organisme considéré (Peijnenburg *et al.*, 2000 ; Heikens *et al.*, 2001) : la voie digestive, la voie cutanée et la voie respiratoire.

Les principales voies d'exposition de l'escargot *Helix aspersa* sont présentées sur la figure (2).

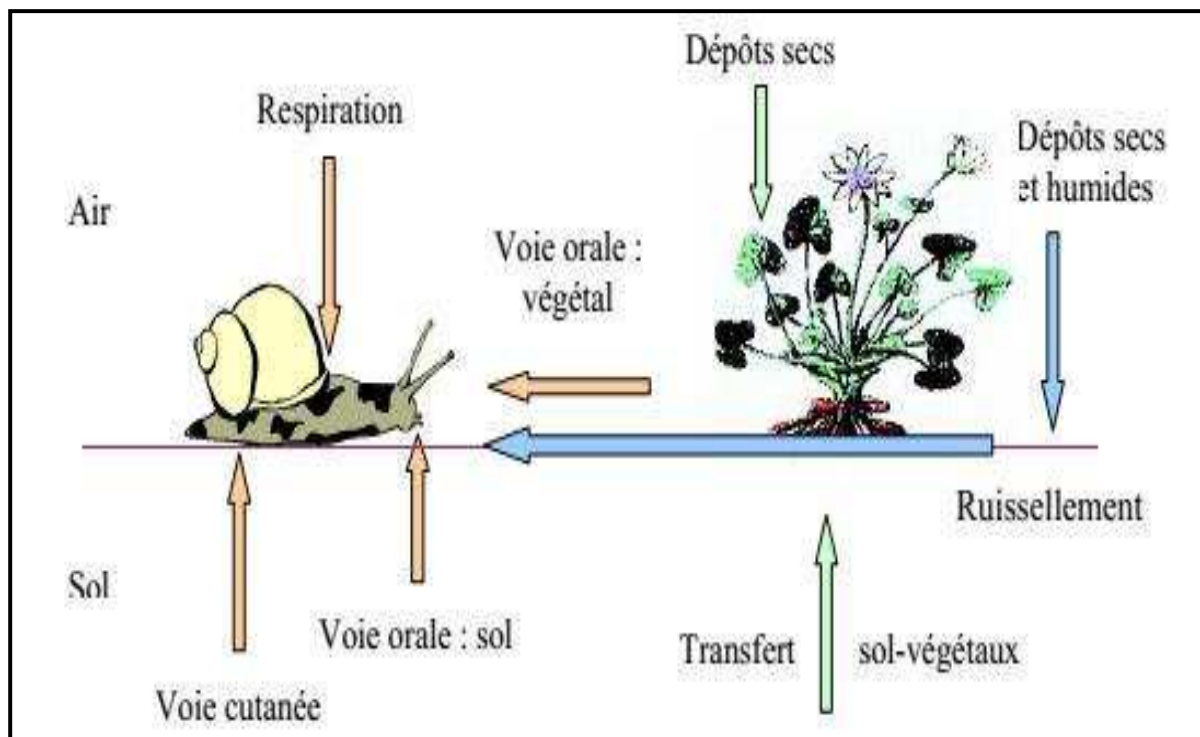


Figure 2 : Différentes voies de contamination d'*Helix aspersa* (La Rocca, 2004).

Cependant, les organismes vivant à l'interface air-sol sont exposés à des concentrations supérieures de contaminants car ces derniers tendent à se concentrer à ce niveau (Boshoff *et al.*, 2015). De plus, chaque espèce présente une sensibilité

propre déterminée par les propriétés intrinsèques de son organisme, comme la présence de système de détoxification adapté ou des cibles biochimiques potentielles.

4.1.1. Bioaccumulation

Les quantités d'ETM accumulées dans les tissus d'organismes contaminés sont déterminées par la balance entre le taux d'absorption et le taux d'excrétion (Fairbrother *et al.*, 2007). Elles varient au cours du temps et peuvent être modélisées grâce à des approches toxicocinétiques (Gimbert, 2006; Fairbrother *et al.*, 2007). La variation des quantités accumulées dépend non seulement des caractéristiques physiologiques spécifiques à une espèce mais aussi de l'âge ou de facteurs environnementaux (Van Straalen *et al.*, 2001). Chez les escargots *Helix aspersa*, la contribution du sol à l'accumulation totale des ETM est supérieure à 80% pour le Pb, comprise entre 30 et 60% pour le Zn et entre 2 et 40% pour le Cd (Scheifler *et al.*, 2006). Les taux d'assimilation et la toxicité des ETM dépendent fortement des ligands présents dans la nourriture et des mécanismes variés de désorption et d'assimilation des ETM dans la lumière du tube digestif (Hopkin, 1989; Berger *et al.*, 1993).

Lors de l'exposition au sol comme seule source de contamination, la voie digestive contribue à environ 90% de l'accumulation de Cd chez des *Helix aspersa* (Coeurdassier *et al.*, 2002). Bien que l'absorption cutanée soit relativement faible chez l'escargot, elle n'est pas négligeable et plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le passage des ions métalliques à travers les membranes biologiques : diffusion passive sous forme libre ou sous forme de complexes organométalliques liposolubles (Ireland, 1982 ; Hopkin, 1989), canaux et pompes ioniques, passage facilité par des transporteurs membranaires (Simkiss et Taylor, 1989; Rainbow et Dallinger, 1993), structures épithéliales particulières comme les canaux cellulaires (Campion, 1961; Martin et Deyrup-Olsen, 1986).

4.1.2. Devenir des ETM

Les gastéropodes absorbent les ETM essentiels ou toxiques par la nourriture via l'épithélium digestif, ou par la peau (Marigomez, *et al.*, 2002). Une fois passées les différentes barrières biologiques, les ETM circulent dans l'organisme grâce à l'hémolymphe et sont distribués entre les différents organes où ils peuvent être stockés. Les hémocytes jouent un rôle important dans le métabolisme des métaux et leur distribution dans les différents tissus (Cheng et Sullivan, 1984; Suresh et Mohandas, 1990), grâce à leur faculté de phagocytose des corps étrangers (Bulla et Cheng, 1997; Marigomez *et al.*, 2002). Les principaux organes impliqués dans le stockage des métaux sont ceux associés au système digestif et en particulier l'hépatopancréas (Hopkin 1989; Dallinger, 1993; Grara *et al.*, 2012b). De plus, le pied de l'escargot est considéré comme un site d'accumulation transitoire en rapport avec l'absorption cutanée (Dallinger et Wieser, 1984a; Chabicoovsky *et al.*, 2003). Le Cu, associé à l'hémocyanine est distribué de manière plus homogène dans le corps entier et s'accumule principalement dans le manteau et le pied (Dallinger et Wieser, 1984a; Gomot et Pihan, 1997). Quant au Pb, il a été retrouvé dans la coquille mais à des concentrations n'excédant pas 3% des quantités totales accumulées dans l'organisme (Beeby et Richmond, 1989 ; Beeby *et al.*, 2002).

4.2. Toxicité des nanoparticules (NPs)

Les travaux de Aruoja *et al.*, (2009) et Trouiller *et al.*, (2009), ont mis l'accent sur la toxicité des NPs sur l'environnement. De plus en plus d'enquêtes sur la toxicité des NPs montrent que le devenir des NPs dans l'écosystème est influencé par plusieurs facteurs dont la composition des particules, la taille, la distribution, la solubilité et l'agglomération, la forme et la structure cristalline, la surface, la masse et la concentration en nombre, la charge la chimie et de la présence d'impuretés (Tiede *et al.*, 2008; Neoh *et al.*, 2015). Cependant, les effets toxicologiques des NPs se manifestent à travers des mécanismes liés à l'inflammation et à la formation de

radicaux libres qui peuvent altérer les tissus biologiques environnants, si les systèmes antioxydants de l'organisme ne sont pas en quantité suffisante pour les inactiver (Ali *et al.*, 2012; Falfushynska *et al.*, 2015).

4.2.1. Relation taille des NPs/Toxicité

La toxicité des NPs dépend de la réactivité des composants nano-objets, de leur surface, et de leur chimie de surface en interactions avec les composantes du milieu. La maîtrise des caractéristiques morphologiques des NPs tels que la taille, la forme, l'état d'agrégation/agglomération est indispensable pour toute étude toxicologique (Zhao *et al.*, 2011b; Park *et al.*, 2015).

Une petite taille des NPs favorise leur pénétration dans la cellule et les mécanismes qui influencent leur pénétration sont complexes (Nabeshi *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2011). La taille influence également le transport dans les tissus de l'organisme. Les NPs d'or de petite taille (15 nm) peuvent pénétrer plus profondément dans la peau et dans l'intestin que les particules de taille supérieure à 100 nm (Sonavane *et al.*, 2008). Les NPs d'or de 20 nm, peuvent passer du sang jusqu'à la rétine lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse à des rats (Kim *et al.*, 2009). La grande capacité des NPs de petite taille à traverser les membranes biologiques peut également leur permettre de traverser le placenta des mammifères pour atteindre le fœtus.

Krug et Wick (2011) et Stern *et al.*, (2012) mentionnent que la capacité de pénétration des NPs dépend des différents mécanismes d'entrée dans la cellule, par endocytose, phagocytose ou pinocytose, alors que d'autres peuvent pénétrer par diffusion passive à travers la membrane (Figure 3).

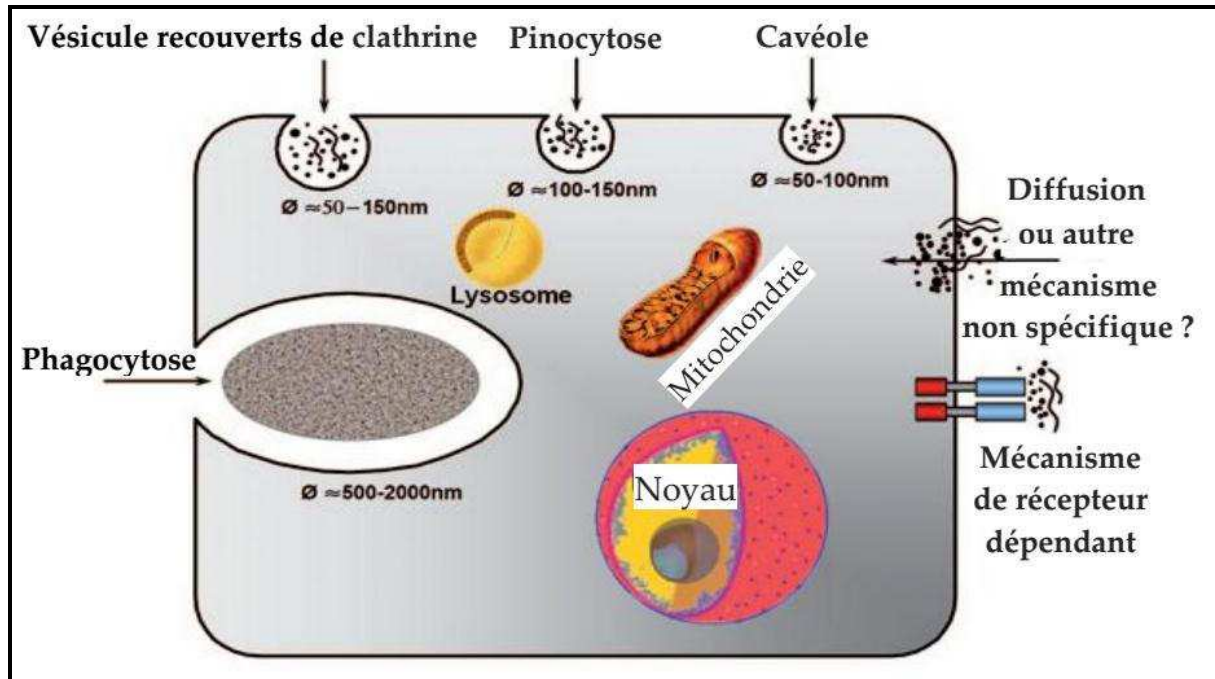


Figure 3 : Différents mécanismes de pénétration des nanoparticules dans la cellule (modifié d'après Krug et Wick, 2011).

4.2.2. Relation chimie de surface/Toxicité des nanoparticules

La modification de la chimie de surface peut influencer la toxicité par différents mécanismes. Les nanoparticules cationiques sont généralement plus toxiques que les NPs anioniques en raison de la charge négative des membranes cellulaires (Hedberg *et al.*, 2010; Hirsch *et al.*, 2013). Ainsi, les NPs cationiques sont cytotoxiques et induisent ainsi un stress oxydatif conduisant à l'apoptose (Zhang *et al.*, 2012a; Niska *et al.*, 2015). Le nombre de groupements fonctionnels à la surface détermine aussi la capacité des NPs à réagir avec les cellules et influe par conséquent leur toxicité (Naha *et al.*, 2009; Mukherjee *et al.*, 2010).

L'hydrophobicité de la surface affecte également les interactions entre les nanoparticules et les systèmes biologiques à plusieurs niveaux, en raison de leur capacité à traverser les membranes lipidiques et leur liaison avec les protéines. Les NPs hydrophobes sont plus toxiques que les NPs hydrophiles à cause de leur plus

grande capacité à traverser les membranes cellulaires (Makarucha *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2015).

4.2.3. Effet de la solubilité sur la toxicité des nanoparticules

La solubilisation des NPs métalliques varie en fonction du type de NPs et du milieu. La solubilité des NPs varie également en fonction de leur nature (Pujalté *et al.*, 2011). Ceci a été mis en évidence chez les algues pour les NPs d'argent et de ZnO (Franklin *et al.*, 2007), chez les bactéries et les invertébrés pour les NPs de CuO et d'argent (Heinlaan *et al.*, 2008; Mortimer *et al.*, 2010).

En outre, la taille des particules influence la solubilité des NPs, et les macroparticules sont souvent moins solubles que ceux nanométriques (Aruoja *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2012). En plus de la solubilisation dans le milieu externe, les NPs peuvent relâcher des ions après leur pénétration directement dans le milieu intracellulaire. Cet effet est appelé « Cheval de Troie » et a été préconisé comme un mécanisme majeur pour la toxicité de certaines NPs au niveau cellulaire (Studer *et al.*, 2010).

5. Biosurveillance des écosystèmes et bioindication

L'IRSTEA (2010), définit la biosurveillance comme l'utilisation du vivant pour surveiller l'évolution, des modifications, des altérations, ou la stabilité de la qualité d'un milieu. L'avantage de la biosurveillance réside dans les deux points suivants :

- Les organismes collectés apportent un effet intégrateur de la pollution existante.
- Ils sont utilisables pour de nombreux polluants et pour un territoire de taille variable, ce qui explique que la biosurveillance peut faire partie d'un plan de suivi de sites sensibles.

5.1. Biosurveillance passive et active

Deux stratégies mise en œuvre dans la biosurveillance des écosystèmes ont été établies :

La biosurveillance passive ou méthode *in situ* qui se sert d'espèces présentes sur le site d'étude, ce qui présente l'avantage de ne pas demander d'entretien et permet de couvrir des zones étendues et de longues périodes (études extensives) (Steinnes *et al.*, 1992). Les gastéropodes terrestres sont largement utilisés dans ce cas là pour déterminer les niveaux de contamination d'un écosystème (Rabitsch, 1996).

Biosurveillance active ou méthode des transplants, qui utilise des espèces dont la croissance est réalisée dans des conditions standards puis qui sont transplantés sur le site d'étude durant une période limitée, généralement plusieurs semaines (Wegener *et al.*, 1992). Cette méthode nécessite de connaître l'origine des individus transférés et les concentrations en éléments métalliques dans les individus avant le transfert et de disposer de lots homogènes (même âge et même poids moyen), un contrôle de la nourriture des organismes macroconcentrateurs utilisés est dans ce cas indispensable (Cortet *et al.*, 1999).

A l'heure actuelle, plusieurs études ont été réalisées en biosurveillance aquatique (Pandey *et al.*, 2014; Gecheva et Yurukova, 2014), marine (Chakraborty *et al.*, 2014; Nasrolahi *et al.*, 2014) et biosurveillance des sols (Calisi *et al.*, 2013 ; Safruk *et al.*, 2015).

L'utilisation des escargots pour la biosurveillance des sols a été abordée par Gimbert, *et al.*, (2006), Nica *et al.*, (2012) et Boshoff *et al.*, (2015).

5.2. La bioindication

Tous les êtres vivants, plantes ou animaux sont capables de donner des indications sur les caractéristiques naturelles d'un site et des informations qualitatives et quantitatives sur les changements provoqués par les activités anthropiques (Markert *et al.*, 1997, 2003a). Les bioindicateurs permettent d'évaluer l'activité d'un phénomène cellulaire précis, comme l'activité d'une enzyme, l'expression d'un gène ou l'augmentation d'un métabolite (Brain et Cedergreen, 2008).

L'évaluation nanotoxicologique chez les animaux à la fois *in vitro* et *in vivo* permet d'obtenir une réponse globale sur le devenir et les effets des nanoparticules dans l'organisme (Radziun *et al.*, 2011). Les modèles *in vivo*, comme les souris, les rats et les poissons, permettent de déterminer les voies d'entrées dans l'organisme, la biodistribution des nanoparticules dans les différents organes et les mécanismes d'excrétion des nanoparticules hors de l'organisme (Stern *et al.*, 2012; Hashimoto et Imazato, 2015). Ces modèles ont déjà montré une sensibilité pour la toxicité des nanoparticules (Rajkumar *et al.*, 2015).

5.3. Les biomarqueurs : concepts et rôle biologique

Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997). Ce changement peut être associé à l'exposition en elle-même, aux effets toxiques ou à la sensibilité vis-à-vis du contaminant environnemental (Peakall, 1994). Depledge (1994) considère que le métabolisme basal des organismes suffit à assurer le maintien de leur homéostasie vis à vis des toxiques.

En effet, au-delà d'un certain seuil les capacités de maintien de l'homéostasie peuvent être dépassées (Van der Oost *et al.*, 2003). Ainsi, lorsque les capacités de

compensation ne sont plus suffisantes pour limiter l'action des polluants toxiques, l'état des individus contaminés peut évoluer vers une dégradation, réversible ou non selon le degré d'atteinte toxique. Les biomarqueurs représentent la réponse biologique initiale des organismes face à des perturbations ou des contaminations du milieu dans lequel ils vivent (Stegeman, *et al.*, 1992).

6. Biologie et écologie de l'escargot

L'escargot *Helix aspersa* aussi nommé *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* Müller, 1774) (Barker, 2001) communément appelé petit-gris, est un mollusque gastéropode pulmoné qui fait partie de l'ordre de stylommatophores, de la famille des helicidae.

Il possède une coquille dextre (qui s'enroule de gauche à droite), de couleur brun-jaune globuleuse brun pâle de 4.5 à 5 tours et un ombilic complètement fermé avec un diamètre moyen de 30 mm et 35 mm d'hauteur pour un poids adulte variant de 6 à 15 g (Gomot et Enée 1980). Le corps de l'escargot est composé de deux parties distinctes: le pied et les viscères. Le pied lui permet de se déplacer avec un mouvement de glisse aidé par l'émission d'un mucus qui réduit la friction avec les surfaces rugueuses. Il comporte le système nerveux, la partie antérieure du tube digestif, la sole pédieuse et musculuse. Les viscères sont constitués des organes présents dans le tortillon à l'intérieur de la coquille renferme: le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge jusque dans le pied.

Le petit-gris est une espèce ubiquiste qui s'adapte à des milieux, des sols et des climats variés et s'accommode très bien de milieux fortement anthropisés, originaire des pays méditerranéens très répandue en Europe mais introduite dans les régions de l'atlantiques (Chevallier, 1992; De Kerney *et al.* 1999). Il est assez rare dans les champs et les prairies, et préfère fréquenter la périphérie des zones cultivées, les lisières de forêts, voire les milieux forestiers (Kerney et Cameron, 2006). Il est

herbivore et détritivore avec un régime alimentaire mixte composé de plantes (herbacées, graminées, légumes de culture, lichens, certaines céréales, champignons) (Barker, 2001).

L'activité des escargots *Helix aspersa* est préférentiellement nocturne. Elle se synchronise avec la photopériode naturelle et débute au coucher du soleil avec un maximum six heures après celui-ci (Chevallier, 1992). Les trois facteurs qui influencent cette activité sont l'hygrométrie du milieu (air et sol), la température et l'intensité lumineuse (Chevallier, 1982). Les escargots sont actifs si l'humidité relative de l'air est supérieure à 80% et si la température minimale nocturne n'est pas inférieure à 9°C.

L'absence prolongée d'humidité provoque l'estivation d'*Helix aspersa* (Chevallier, 1992), en se fixant contre une paroi et en obturant sa coquille d'un voile blanchâtre « l'épiphragme ». Il reprend son activité lorsque les conditions environnementales sont plus favorables. A partir du mois d'octobre, les escargots se mettent en hibernation en se collant sur un support ou en s'enfouissant dans le sol ou la litière et secrètent un épiphragme d'hiver. Il reprend son activité au printemps quand les températures avoisinent les 12 à 14°C (Kerney et Cameron, 2006 ; Ferreira-Cravo *et al.*, 2010).

6.1. L'utilisation de l'escargot en écotoxicologie

L'escargot *Helix aspersa* juvéniles et adultes sont utilisés dans de nombreuses études écotoxicologiques. En effet, de par leur place au sein de l'écosystème terrestre, ils représentent une biomasse significative au sein de la communauté des invertébrés du sol (Dallinger *et al.*, 2001), les escargots sont capables d'intégrer des sources multiples de contamination (sol, atmosphère, végétaux) par diverses voies : digestive, respiratoire et/ou cutanée ils occupent une situation privilégiée à l'interface sol-plante-atmosphère (Barker, 2001). Les capacités de résistance et d'accumulation

des métaux ont été démontrées chez ces espèces (Viard *et al.*, 2004 ; Grara *et al.*, 2012b).

Les petit-gris sont des bioindicateurs d'exposition et d'effets de polluants métalliques (Grara *et al.*, 2009, 2012c; Boucenna *et al.*, 2015) ou organiques (Coeurdassier *et al.*, 2002b; Regoli *et al.* 2006) et ce aussi bien dans les chaînes trophiques (Hispard *et al.*, 2008b), que dans l'évaluation des cinétiques de transfert milieu-escargot (Gimbert *et al.*, 2006, 2008).

Diverses réponses biologiques peuvent être apportées par les escargots *Helix aspersa* quand ils sont exposés aux contaminants : physiologiques par l'inhibition de croissance, perturbation de la reproduction et le taux de mortalité (Swaileh et Ezzughayyar, 2001; Notten *et al.*, 2006) ainsi que des perturbations/modifications biochimiques (Ismert *et al.*, 2002 ; Regoli *et al.*, 2006), et des réponses de génotoxicité et embryotoxicité ont été également indiqués chez *Helix aspersa* (Druart *et al.*, 2012; Baurand *et al.*, 2013; Baurand *et al.*, 2014a). En plus ils constituent un maillon des réseaux trophiques qui contribue au transfert des polluants du sol et/ou des plantes aux prédateurs (Beeby, 1985; Scheifler *et al.*, 2002a ; Hispard *et al.*, 2008b).

7. Stress oxydant

Les conséquences de l'exposition des êtres vivants aux contaminants est l'accroissement du stress, le caractère ubiquiste des processus oxydants et leur implication possible en tant que facteurs de toxicité ont largement été abordés en toxicologie. Ainsi, selon Sies (1991), le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et anti-oxydants en faveur des premiers (Leomanni *et al.*, 2015). De trop fortes concentrations en radicaux libres peuvent conduire à des modifications irréversibles des protéines et acides aminés cellulaires. Ils peuvent même à terme entrainer la mort cellulaire (Droge, 2002).

L'inhibition de certaines composantes des systèmes antioxydants peut également survenir lors de l'exposition aux NPs, en liaison avec l'altération de l'état des individus et la perte de l'homéostasie cellulaire (McCarthy *et al.*, 2013; Fahmy *et al.*, 2014). Ce phénomène d'inhibition est souvent associé à des effets de peroxydation lipidique qui constitue alors un indice de toxicité relatif à un état de non compensation des lésions cellulaires initiales (Ali *et al.*, 2014 ; Gomes *et al.*, 2015 ; Rajkumar *et al.* , 2015).

7.1. Origine des espèces réactives de l'oxygène

L'origine du stress oxydant chez les organismes aérobies provient de la consommation intracellulaire de la molécule d'oxygène qui est essentielle pour de nombreuses fonctions physiologiques mais qui génère dans le même temps la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) potentiellement toxiques pour la cellule. Elles sont produites principalement de manière endogène au niveau des membranes des mitochondries, au cours du transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire (Livingstone, 2001; Staniek et Nohl, 2000). Les ROS sont aussi impliquées dans le processus de la mort cellulaire programmée ou apoptose (Matès, 2000).

7.2. Le système antioxydants cellulaire

Afin d'éliminer les espèces radicalaires et de limiter les dommages provoqués par le stress oxydant, les cellules disposent de trois mécanismes de défense antioxydant. On pourra ainsi citer : (1) l'élimination des espèces réactives et des catalyseurs de la production d'OH[•] en les séquestrant par des métalloprotéines, (2) l'induction de la synthèse d'antioxydants pour l'inactivation d'O₂^{•-} et d'H₂O₂ et (3) l'augmentation de l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées par l'induction des espèces réactives de l'oxygène à l'aide de piègeurs moléculaires (Cossu *et al.*, 1997b).

Les mécanismes de systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques qui contribuent à la détoxification des espèces réactives illustrent la complexité des réactions qui coexistent lors d'un stress oxydant induit par les NPs (Figure 4).

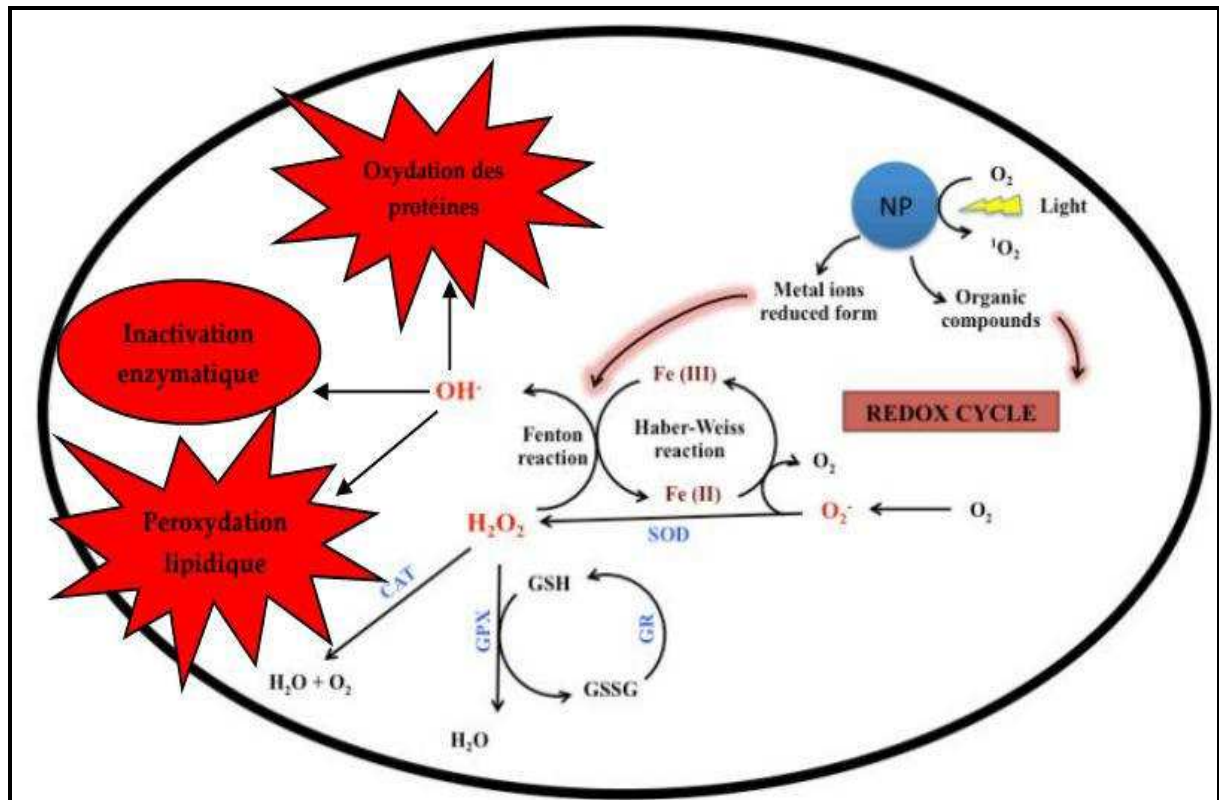


Figure 4 : Systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques impliqués lors d'une exposition aux NPs (modifié de Unfried *et al.*, 2007).

L'objectif de la présente contribution est d'évaluer l'effet toxique des poussières métalliques et des nanoparticules de fer et d'aluminium sur un bioindicateur / bioaccumulateur *Helix aspersa*.

Notre travail s'articule autour de trois chapitres principaux. Le chapitre I est une revue de la littérature qui a pour objectif de faire une mise au point sur les aspects liés au thème d'étude. Dans ce chapitre il est mis l'accent surtout sur les effets de la toxicité des particules métalliques micrométriques et nanométriques sur un modèle bioindicateur et bioaccumulateur l'escargot *Helix aspersa* objet de la thèse. Le deuxième chapitre décrit les différentes techniques et méthodes utilisées au cours de la réalisation de ce travail, ainsi qu'un aperçu sur la biologie de notre modèle biologique et les différents contaminants utilisés. Le troisième chapitre traite de l'interprétation et la discussion des données issues de l'expérimentation. Le chapitre est complété par une étude histopathologique.

Enfin, une conclusion générale vient clore ce travail avec des perspectives de recherches dans le domaine.

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Les bioessais de cette étude ont été réalisés au laboratoire de toxicologie cellulaire, du département de biologie, université Badji Mokhtar Annaba. L'étude de la bioaccumulation des oxydes métalliques a été réalisée au laboratoire (Lab-Horizon) Annaba. Les coupes histologiques ont été réalisées au service d'Anatomopathologie CHU Saadna Abdenour de Sétif.

1. Matériel biologique

L'espèce *Helix aspersa* Müller (1774) appelée récemment *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* (Barker, 2001). Nous avons travaillé sur des petit gris de taille de 23-35 x 23- 38 mm (Figure 5 a.b).

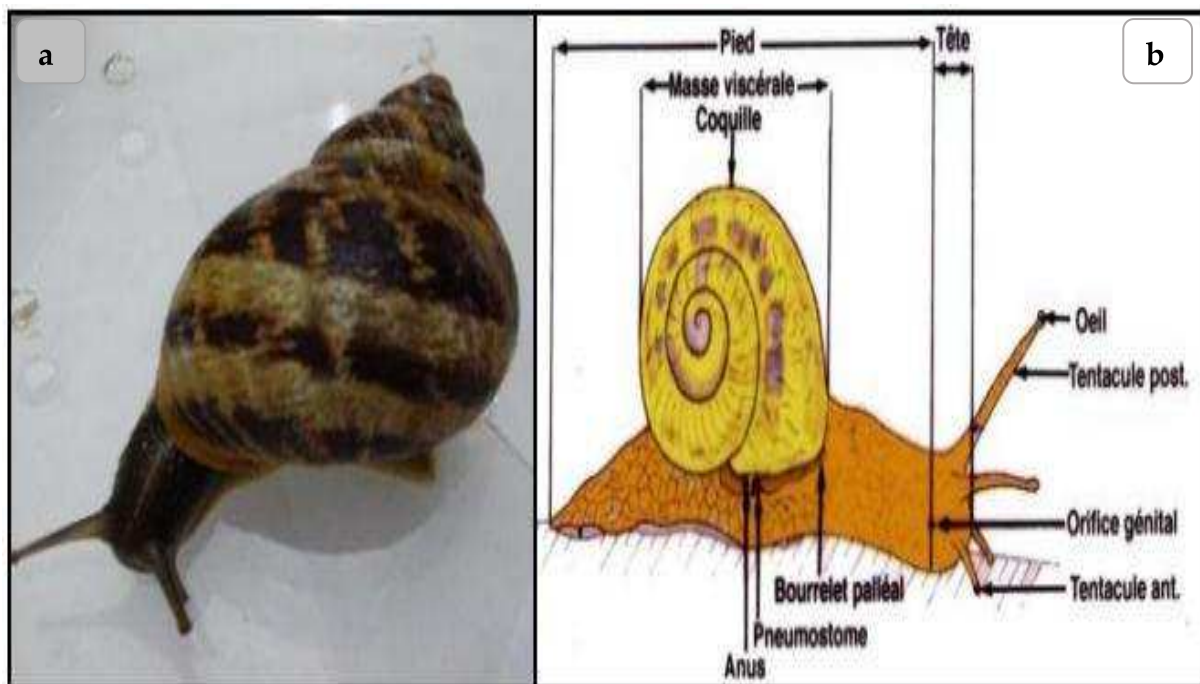


Figure 5 : Photographie a) *Helix aspersa* adulte; b) Morphologie externe de l'escargot (Kerney *et al.*, 2006).

1.1. Collecte et sélection des échantillons

Les escargots *Helix aspersa* ont été obtenus d'une ferme d'élevage des escargots à Bouchegouf Wilaya de Guelma en 2011 et 2012. Les escargots adultes collectés ont été triés par taille et poids au laboratoire avec un poids moyen de 10 ± 0.35 g, placés et conservés dans des microcosmes avant d'être sélectionnés dans des lots pour les différents traitements et expériences.

Les escargots sont élevés dans des conditions ambiantes de laboratoire, 20-23°C de température moyenne le jour, 18 heures de photopériode et 80 à 90 % d'humidité relative (Gomot de vaufleury, 2000).

Ils sont répartis dans des boîtes en plastique transparentes (25x15x15 cm) dont le volume est de 5625 cm³, avec un couvercle perforé, chaque boîte contient une éponge mouillée pour maintenir de l'humidité. L'alimentation (farine de blé) est fournie dans des boîtes de pétrir. Les boîtes sont quotidiennement nettoyées tout en renouvelant leurs alimentations.

Les escargots sont mis sous conditions de laboratoire pendant 15 jours pour leurs acclimations avant de les exposer à un gradient de contamination en poussière métallique pour une période de deux semaines. Le deuxième et le troisième traitement consiste à exposer les escargots à l'oxyde de fer (Fe₂O₃) et l'oxyde d'aluminium (Al₂O₃) pendant huit semaines.

2. Matériel chimique

2.1. Les rejets métalliques utilisés

Les poussières métalliques utilisées dans notre étude ont été collectées à partir du complexe sidérurgique d'El-Hadjjar (Annaba), une analyse chimique par absorption atomique a été réalisée pour déterminer la composition de ces poussières. Cette analyse a déterminé la présence de six ETM indiqués dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Composition en ppm des poussières rejetées par l'aciérie électrique 1 (ACE 1) et l'aciérie électrique 2 (ACE 2) du complexe sidérurgique d'El-Hadjar durant l'année (2008) (Tadjine *et al.*, 2008).

Echantillon	Zn	Pb	Cr	Ni	Mn	Fe
Poussières ACE1 (ppm)	240	24	10	1.2	320	3000
Poussières ACE 2 (ppm)	480	62.4	12	1.3	540	3600
Total (ppm)	720	88.4	22	2.5	860	6600

2.2. L'oxyde de fer (Fe_2O_3)

L'oxyde de fer (III), également appelé oxyde ferrique, est le composé chimique de formule Fe_2O_3 , dont la forme minérale est l'hématite. C'est un oxyde paramagnétique stable du fer, dont une forme hydratée constitue la rouille. Il est de couleur rouge (Figure 6).

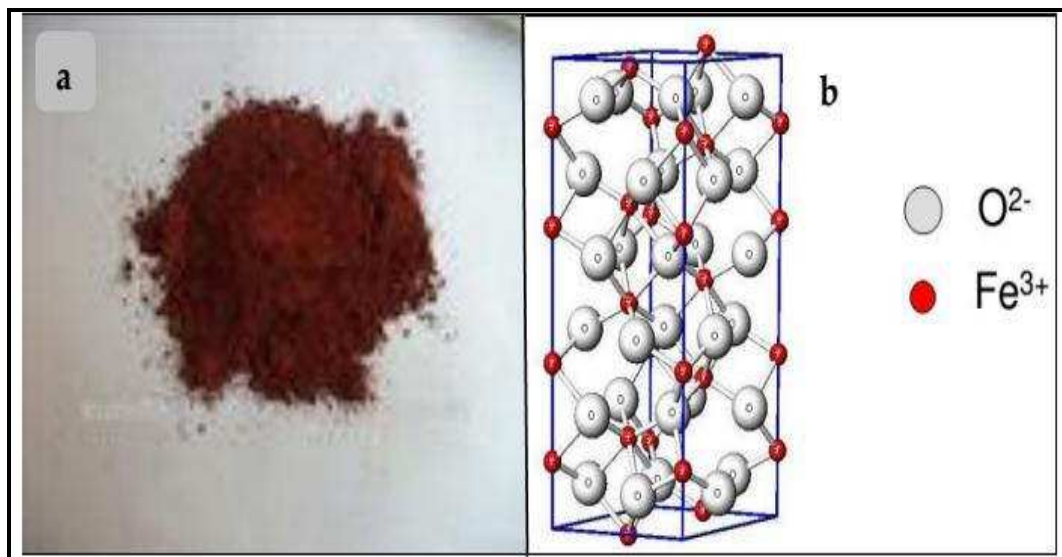


Figure 6 : Présentation de l'oxyde de fer (a : poudre), (b : la structure cristallographique).

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques de l'oxyde de fer (CERADEL, 2012).

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

2.3. L'oxyde d'aluminium(Al₂O₃)

L'alumine ou oxyde d'aluminium a pour formule Al₂O₃, lorsqu'elle est sous la forme anhydre. Elle présente un polymorphisme structural remarquable avec les variétés α-, γ-, δ-, θ, κ-, ε-, η-, χ-Al₂O₃. Sa bonne tenue mécanique à haute température, sa dureté élevée, son excellente résistance à l'usure, sa grande résistivité électrique et son inertie chimique importante font de l'alumine un matériau utilisé dans des domaines très variés (tableau 3).

Tableau 3 : Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'oxyde d'aluminium Al₂O₃.

Paramètres	Valeur	Référence
Masse molaire (g/mol)	101.94	ATSDR (1999), HSDB (2003), OMS IPCS (1997)
Point d'ébullition (°C) (à pression normale)	Environ 3 000 °C	ATSDR (1999)
Pression de vapeur (Pa)	0 à température ambiante	IUCLID (2000)
Densité Solide (par rapport à l'air)	d ^{20/25} ₄ = 3,2 à 4,0	ATSDR (1999), Guide de la chimie (2002), HSDB (2003), IUCLID (2000), OMS IPCS (1997)
Solubilité (mg/L) dans l'eau	≈ 1,0 à 20 °C	IUCLID (2000)

2.4. Caractérisation de la taille moyenne des grains du Fe₂O₃ et Al₂O₃

2.4.1. Diffraction des rayons-X

Les différents échantillons ont été caractérisés par rayons-X.

Le principe des rayons-X consiste en une interaction de ces derniers avec la matière à analyser. L'énergie de ce rayonnement est généralement exprimée en eV, elle peut être exprimée par la relation suivante :

$$E = h \times C / \lambda$$

Où :

h: la constante de Planck.

C : la vitesse de la lumière.

λ : la longueur d'onde des rayons-X.

2.4.2. Identification des échantillons

L'analyse par diffraction des rayons-X a été effectuée sur poudre en adoptant la méthode de Debye Sherrer. Nous avons utilisé un diffractomètre type APD-15 Philips 2134 et une anticathode en cuivre de longueur d'onde $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ avec sélection de la raie K_α.

De la loi de Bragg $\lambda = 2d \sin\theta$, nous déduisons la valeur de la distance réticulaire pour chacune des raies des spectres des échantillons et nous les comparons à celles données par les fiches A.S.T.M (American Système Testing Métal) n° 11-549 et 25-447 respectivement de β et α-PbO₂.

2.4.3. Calcul de la taille des cristallites

La taille des cristallites est déterminée généralement par la méthode de Scherrer (Scherrer, 1918) en exploitant les raies des spectres de diffraction des rayons-X. le calcul est basé sur l'équation suivante :

$$B = k\lambda / D\cos\theta$$

$$D = 0,94 \lambda / B\cos\theta$$

Où :

B : Largeur de la raie à mi- hauteur exprimée en radians

λ : longueur d'onde de l'anticathode

k : constante (0,94).

D : taille des cristallites (en Å°).

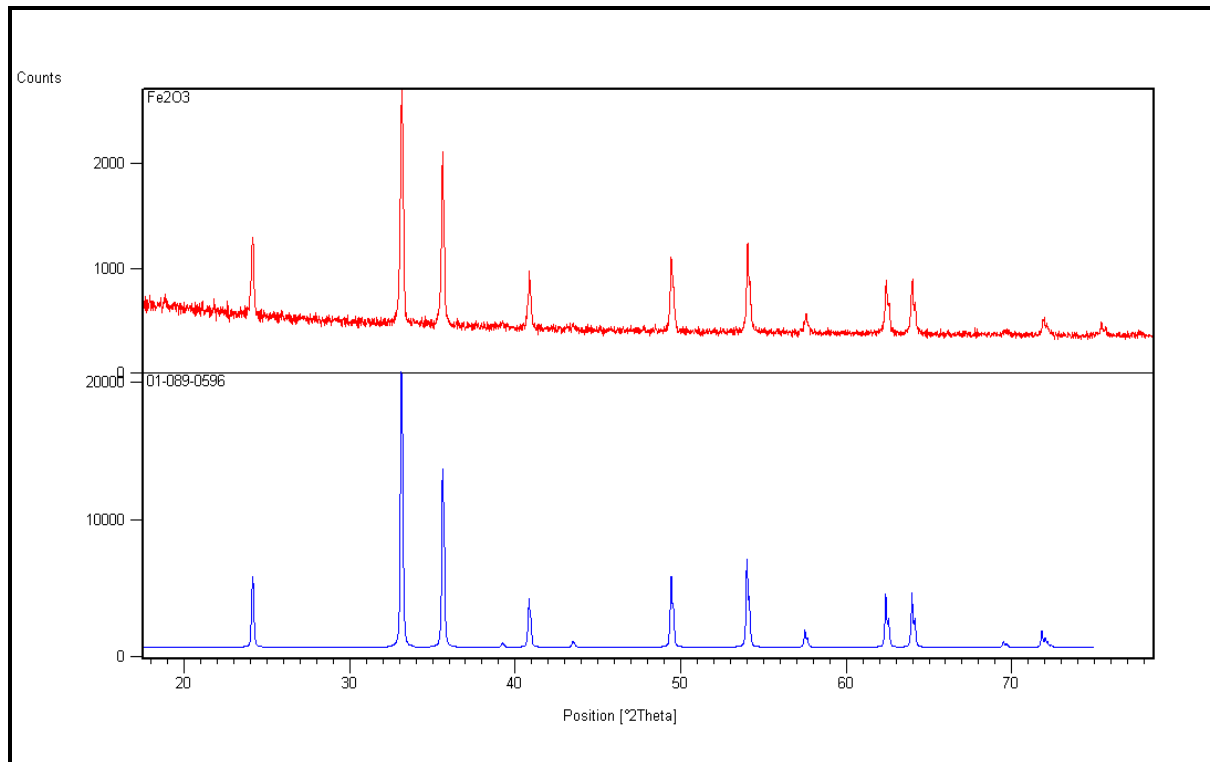


Figure 7 : Spectre de diffraction des rayons-X de l'oxyde de fer.

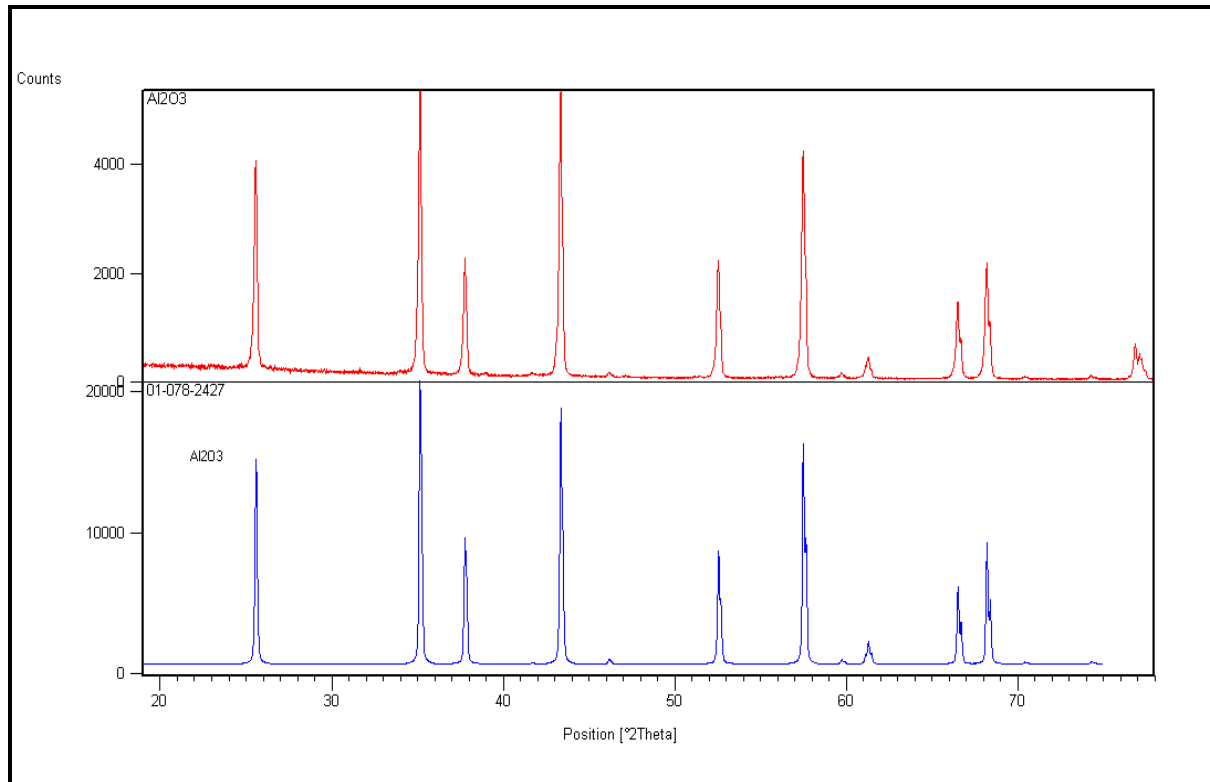


Figure 8 : Spectre de diffraction des rayons-X de l'oxyde d'aluminium.

Les poudres d'oxyde de fer et d'oxyde d'aluminium utilisés dans nos expériences sont obtenues du laboratoire de recherche en physique (LM2S). La méthode de Scherrer nous permet de caractériser les poudres, en calculant la taille moyenne des grains, nous avons enregistré une taille de **99 nm** pour l'oxyde de fer, alors que l'oxyde d'aluminium présente une taille de **93 nm**.

3. Méthodes

3.1. Dispositif expérimental et protocole de traitement

Les escargots sélectionnés ont été répartis en 15 lots à raison de 12 escargots/lot dans des boîtes en plastiques. Les cinq premiers lots sont exposés à la poussière métallique mélangée à leur alimentation pendant deux semaines. Les dix autres lots sont traités par l'oxyde de fer (Fe_2O_3) et l'oxyde d'aluminium (Al_2O_3) durant une période de huit semaines (cinq lots pour chaque traitement), Tableau (4).

Tableau 4 : Répartition des lots des escargots des bioessais avec les différentes concentrations de poussières métalliques, Fe₂O₃ et Al₂O₃.

Type de traitement	Concentration en µg /g d'aliment sec (farine de blé)	Numéro de lot	Nombre des escargots traités
Poussières Métalliques	0	(Témoin) 1	12
	100	2	12
	500	3	12
	1000	4	12
	1500	5	12
Oxyde de fer Fe₂O₃	0	(Témoin) 1	12
	50	2	12
	100	3	12
	200	4	12
	400	5	12
Oxyde d'aluminium Al₂O₃	0	(Témoin) 1	12
	50	2	12
	100	3	12
	200	4	12
	400	5	12

3.2. Dosages de principaux métabolites et biomarqueurs

Après deux semaines d'exposition à la poussière métallique, les escargots sont pesés et maintenus pendant 48 h sans nourriture, cette période de jeûn permet aux escargots d'excréter le contenu de leur tube digestif afin d'éviter des biais dans les analyses. L'escargot est sacrifié, il est décoquillé puis disséqué afin de prélever la masse viscérale entière qui sera ensuite pesée avant de séparer les organes, l'hépatopancréas, le rein et la tête.

Après dissection l'hépatopancréas est prélevé, pesé et divisé en 6 fragments :

- Un échantillon pour le dosage des métabolites (lipides, protéines, glucides).
- Un échantillon pour le dosage de la catalase(CAT).
- Un échantillon pour le dosage de la glutathion-s-transférase (GST).
- Un échantillon pour le dosage du glutathion (GSH).
- Un échantillon pour le dosage de malondialdéhyde (MDA).
- Un dernier échantillon conservé dans une solution de bouin alcoolique pour une étude histologique.

Les reins prélevés ont subi les mêmes étapes de dissection et les mêmes dosages.

Les têtes sont prélevées et conservées dans un tampon adéquat pour le dosage de l'acétylcholinestérase (AChE).

La détermination des concentrations et la bioaccumulation de l'oxyde de fer et de l'oxyde d'aluminium au niveau des deux organes est réalisée par la méthode SAA.

Une étude histologique a été également effectuée sur les mêmes organes.



Figure 9 : Photographie de la dissection de l'escargot *Helix aspersa*.

3.2.1. Dosage des métabolites

Extraction des métabolites : L'extraction des métabolites de l'hépatopancréas et du rein ont été réalisées selon le procédé de (Shibko *et al.*, 1966) (Figure 10).

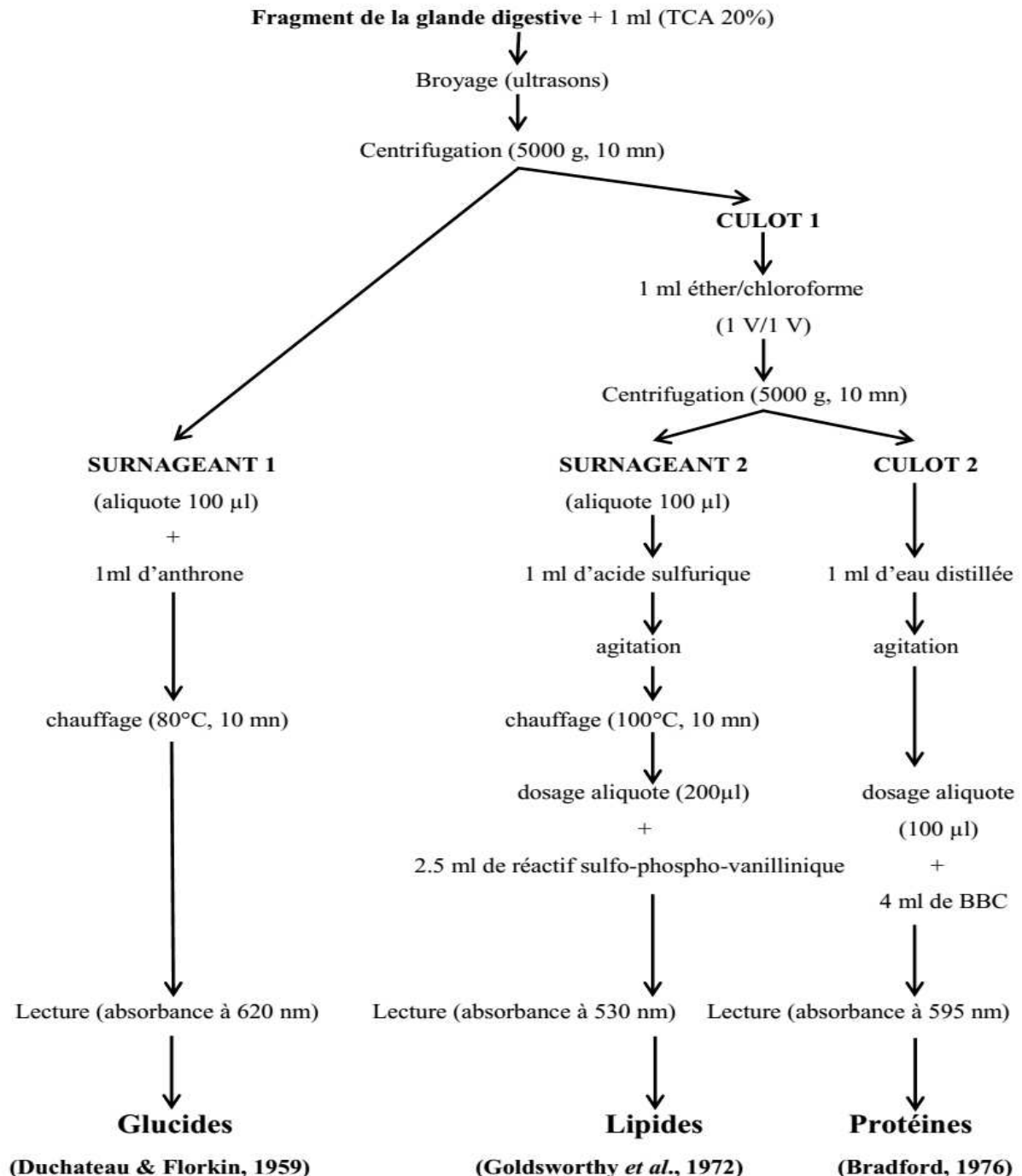


Figure 10 : Principales étapes d'extraction des métabolites : protéines, glucides et lipides (Shibko *et al.*, 1966).

3.2.1.1. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976), qui consiste à additionner à une fraction aliquote de 100 µl du surnageant ou de la gamme étalon à 4 ml du réactif colorant bleu brillant de Coomassie (BBC) G250. La présence des protéines dans l'échantillon se révèle par une coloration bleue. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre visible (JENWAY 6300). La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une protéine standard, l'albumine sérum de boeuf (BSA).

3.2.1.2. Dosage des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux a été effectué selon Duchateau et Florin (1959). Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distillée) et une solution mère de glucose (1g/l).

La méthode consiste à additionner à une fraction aliquote de 100 µl de surnageant, 4 ml de réactif d'anthrone et après chauffage du mélange dans un bain marie (80°C pendant 10 min), une coloration verte se développe, dont l'intensité mesurée à une longueur d'onde de 620 nm est proportionnelle à la concentration des glucides présente dans l'échantillon.

3.2.1.3. Dosage des lipides totaux

La concentration des lipides totaux a été estimée selon Glodsworthy *et al* (1972) utilisant le réactif sulfophosphanillique (0.38 g de vanilline, 55 ml d'eau distillée et 195 ml d'acide orthophosphorique à 85%). La solution mère des lipides est préparée en utilisant l'huile de table selon la procédure suivante : 25 mg d'huile de table pesée dans un tube eppendorf ; cette quantité est ensuite reprise dans 10 ml du mélange (éther/chloroforme) (1V/1V). Après évaporation des prises aliquotes de 100 µl de surnageant II dans un bain à sec à 60°C, on additionne 1 ml d'acide sulfurique

concentré (96 %), les tubes fermés sont agités et chauffés dans un bain à sec à 100 °C pendant 10 minutes.

Après refroidissement, on prélève 200 µl de chaque tube auxquels on ajoute 2.5 ml de réactif sulfophosphovanillinique. Après 30 minutes à l'obscurité, le complexe se colore en rose. La densité optique est lue dans un spectrophotomètre (Jenway 6300) à une longueur d'onde de 530 nm.

3.2.2. Dosages des biomarqueurs

3.2.2.1. Dosage de l'activité catalase (CAT)

La catalase est l'enzyme antioxydante le plus couramment mesurées dans les recherches liées aux radicaux libres. La catalase est l'enzyme qui élimine le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le protocole le plus couramment utilisé est le plus direct (Aebi 1984; Goth 1991 a,b). Cette enzyme intervient dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique en eau et en oxygène (Regoli et Principato, 1995).



L'activité enzymatique catalase (CAT) est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en faisant réagir dans 100Mm de tampon phosphate pendant 1mn à pH 7.5 100 µl de H₂O₂ (500 mM) sur 20 µl d'homogénat, à une température d'incubation de 25°C. Les résultats sont exprimés en µmol d' H₂O₂ par minute et par mg de protéines.

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel contient 20 µl de surnageant, 200 µL de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) et 780 µL de tampon phosphate². La réaction est déclenchée par l'addition de l'eau oxygénée. Le dosage s'effectue en suivant la cinétique de la réaction pendant 1 mn à 240 nm dans

des cuves UV en quartz au spectrophotomètre. L'activité spécifique de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante :

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol /mn /mg de prot}) = (\Delta \text{ DO } \times 10) / (\epsilon \times L \times 0.05 \times \text{mg de prot})$$

Activité CAT : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines ($\mu\text{M/mn/mg}$ de protéines).

Δ DO : différences des absorbances pendant une minute

ϵ : Facteur d'extinction

L : Longueur de la cuve utilisée.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

3.2.2.2. Dosage de l'activité glutathion-S-transférase (GST)

La mesure de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de Habig *et al.*, (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH) et mesurée à une longueur d'onde de 340 nm dans un spectrophotomètre visible/UV (JENWAY 6300).

Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 14000 trs/mn pendant 30 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage consiste à faire réagir 200 μl du surnageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1 mM)/GSH (5 mM) [20.26 mg CDNB, 153.65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0.1 M, pH 6)]. La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15' à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 μl d'eau distillée remplaçant la quantité du surnageant. L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante :

$$\text{Activité GST } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protéine}) = (\Delta\text{DO} \times \text{Vt}) / (9.6 \times d \times \text{Vs} \times \text{mg de prot})$$

Où :

Taux de GST : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines).

Δ DO : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

9.6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB.

Vt : volume total dans la cuve : 1.4 ml [0.2 ml surnageant + 1.2 ml du mélange CDNB/GSH].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0.2 ml.

d : épaisseur de la cuve

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

3.2.2.3. Dosage de l'activité Acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase catalyse la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique. Elle est spécifique des esters de l'acide acétique et si, physiologiquement, son substrat est l'acétylcholine, elle catalyse également l'hydrolyse de la butyrylcholine, de la butyrylthiocholine ou de l'acétylthiocholine (ATCh). Dans ce dernier cas, les produits de la réaction d'hydrolyse sont l'acide acétique et la thiocholine. La méthode spectrophotométrique d'Ellman (1961) utilise cette propriété de l'AChE en faisant interagir les groupements thiols ainsi rendus disponibles dans le milieu avec le DTNB pour donner du TNB (coloré en jaune).

Le dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) est réalisé selon la méthode d'Ellman *et al.*, (1961) qui consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'acétylthiocholine (ASCh) dont l'hydrolyse libère de la thiocholine (SCh) et de l'acide acétique. La thiocholine en présence de DTNB (acide 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque) forme un

complexe de couleur jaune dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 412 nm. La tête des animaux est homogénéisée dans 1 ml de solution détergente (solution D), 1ml Triton X 100%, 5.845 g NaCl (chlorure de sodium), 80 ml tampon tris (10 mM, pH 7), puis centrifugés (5000 trs/mn, 5 mn). Le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage de l'activité AChE est réalisé sur une fraction aliquote de 100 µl à laquelle on ajoute 100 µl de DTNB préparé extemporanément et 1 ml de tampon tris (0.1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes, 100 µl de substrat acétylthiocholine préparé extemporanément sont ajoutés. La lecture des absorbances s'effectue toutes les 4 mn pendant 20 mn à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc où 100 µl de la solution détergente remplace les 100 µl du surnageant. L'activité Acétylcholine Estérase est calculée selon la formule suivante :

$$\text{L'activité AChE } (\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = (\Delta \text{DO} \times \text{Vt}) / (1.36 \times 10^4 \times \text{Vs} \times \text{mg de prot})$$

X : µmole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (nM/mn/mg de protéines).

Δ Do : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps. 1.36 x 10⁴ : coefficient d'extinction molaire du DTNB.

Vt : volume total dans la cuve.

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0.1 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

3.2.2.4. Dosage du Glutathion (GSH)

Le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, cystéine et de glucine. Le GSH est requis pour l'activité de plusieurs enzymes, il participe avec le glutathion réductase à l'établissement de ponts désulfures dans de nombreuses protéines et dans des hormones polypeptidiques et prend part au métabolisme des

xénobiotiques. Il est aussi un substrat des glutathions peroxydases sélénodépendantes (GPx). Avoir présent dans la majorité des tissus. Il est intéressant de noter que le GSH peut chélater les ions Cu⁺ et ainsi limiter leur participation à la génération de radicaux libres par la réaction de Fenton (Hanna et Mason, 1992).

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de Weckberker et Cory (1988), Cette technique est basé sur la réaction entre le groupement thiol (-SH) du glutathion et le DTNB (dithiobisnitrobenzoate ou acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque). En effet, le groupement SH réduit le DTNB en TNB (thionitrobenzoate ou acide 5-thio (2-nitrobenzoïque)). Le TNB, coloré en jaune, possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (412-415 nm) qui permet un dosage du glutathion présent initialement dans le milieu réactionnel.

La réalisation de ce dosage commence par l'homogénéisation des échantillons dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0.02 M [7.448 g EDTA, 1000 ml eau distillée]. Afin de protéger les groupements thiols du glutathion l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0,25 % [0.25 g ASS, 100 ml eau distillée] où 0.2 ml de l'ASS sont additionnés à 0.8 ml d'homogénat. Le mélange après agitation est plongé dans un bain de glace pendant 15 mn, puis centrifugé à 1000 trs/mn pendant 5 mn.

Une aliquote de 500 µl du surnageant récupéré est ajoutée à 1 ml du tampon tris/EDTA (0.02 M, pH 9.6) [63,04 g tris, 7.4448 g EDTA, 1000 ml eau distillée] et 0.025 ml de DTNB (0.01 M) [3.96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu]. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc où les 500 µl du surnageant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée en utilisant le spectrophotomètre de type (JENWAY 6300). Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

Taux du GSH (µM/mg de protéines) = (ΔDo × 1 × 1.525) / (13.1 × 0.8 × 0.5 × mg de prot)

Où :

Taux du GSH : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines).

ΔDo : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

13.1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH).

Vd : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1 ml [0.2 ml ASS + 0.8 ml homogénat].

Vh : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0.8 ml

Vt : volume total dans la cuve : 1.525 ml [0.5 ml surnageant + 1 ml tris/EDTA + 0.025 ml DTNB].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0.5 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

3.2.2.5. Dosage du malonedialdéhyde (MDA)

Le MDA, "messenger toxique secondaire" responsable de la cytotoxicité liée à la lipoperoxydation, est le représentant le plus réactif et le plus abondant des aldéhydes produits *in vivo* par la décomposition des hydroperoxydes lipidiques par les FAO (Cossu *et al.*, 1997b). Il représente un marqueur important de la lipoperoxydation membranaire qui est un des premiers mécanismes d'atteinte cellulaire par les polluants (Ribera *et al.*, 1991 ; Klobucar *et al.*, 1997).

Le malondialdéhyde (MDA) est dosé selon la méthode de Draper et Hadley (1990). La détection du MDA présent dans les échantillons biologiques se base sur la réaction au cours de laquelle, 2 molécules de TBA réagissent avec une molécule de MDA ce qui entraîne la formation d'un chromogène rouge dont l'absorption maximale est comprise entre 312 et 535 nm (Sunderman *et al.*, 1985). L'intensité de la coloration rouge augmente avec la concentration en MDA. Il faut noter que le

complexe MDA-TBA n'est stable que pendant 3 heures à l'abri de la lumière et à température ambiante.

Les fragments d'hépatopancréas et de rein de *H. aspersa* sont broyés aux ultrasons dans 1 ml de tampon tris-HCl (50 mM, pH 7.5) [1.5137 g tris, 0.0730 g EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique), 42.78 g sucrose, 250 ml eau distillée]. Une fois l'homogénéisation réalisée, une centrifugation est effectuée pendant 10 mn à 10000 trs/mn et le surnageant récupéré servira au dosage du MDA.

Le dosage est réalisé avec 500 µl du surnageant additionnés de 2,5 ml de TCA [100 g TCA, 1000 ml eau distillée]. Après chauffage au bain marie à 100 °C pendant 15 mn et refroidissement dans de la glace, une centrifugation est effectuée à 10000 trs/mn pendant 10 mn. Une fraction aliquote de 2 ml du surnageant est alors prélevée à laquelle on ajoute 1 ml de TBA [6.7 g TBA, 1000 ml eau distille]. Après un second chauffage (100 °C, 15 mn) et refroidissement, 1.5 ml de butanol sont rajoutés. Après agitation, une dernière centrifugation (10000 trs/mn, 10 mn) est réalisée et le surnageant constitué de 1 ml de butanol renfermant les complexes TBA/MDA est récupéré et une lecture des absorbances est effectuée à 532 nm contre un blanc où du tampon tris-Hcl remplace le surnageant. Le taux du MDA est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Taux du MDA } (\mu\text{M/mg de protéines}) = (\Delta \text{ Do} \times \text{Vt}) / (156 \times \text{Vs} \times \text{mg de prot})$$

Où :

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

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

156: coefficient d'extinction molaire du TBA.

Vt : volume total dans la cuve : 1 ml [volume total du butanol récupéré renfermant les complexes TBA/MDA].

Vs : volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0.5 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

3.3. Détermination de la bioaccumulation des NPs par la spectrophotométrie d'Absorption atomique (SAA)

L'accumulation des oxydes métalliques (Fe₂O₃, Al₂O₃) est étudiée sur des escargots mise en expérience exposés à différentes concentrations en oxydes métalliques.

3.3.1. Préparation des tissus, minéralisation et extraction

Avant la minéralisation ou l'extraction, les animaux sont décongelés, plongés dans une solution d'EDTA 10 µM pendant 5 min pour les animaux exposés à des métaux puis rincés à l'eau pure et disséqués pour séparer les deux organes. Les fragments d'organes sont placés individuellement dans des tubes à vis puis séchés à l'étuve (50°C) entre environ 48 à 72 heures (Coeurdassier ,2001).

3.3.2. Minéralisation

La minéralisation consiste en une destruction complète de la matière organique sous l'effet combiné de la température et de l'acide nitrique concentré. Aux tissus préalablement séchés, nous avons ajouté 4 ml d'acide nitrique concentré (50%). L'ensemble est mis à 60°C durant (environ 72 heures) jusqu'à ce que la solution devienne claire et que les vapeurs nitreuses rousses disparaissent.). Ensuite, chaque échantillon est complété à 19 ml avec de l'eau distillée puis conservé à 4°C jusqu'à l'analyse (Coeurdassier, 2001), Les minéralisats sont ensuite récupérés dans des tubes gradués.

L'échantillon sous forme liquide est porté dans une flamme à une haute température, de sorte qu'il se forme une vapeur atomique qui sera irradiée avec une lampe spectrale émettant des raies de transition des atomes recherchés. En raison de la quantification des états énergétiques, seuls les atomes concernés absorbent la radiation excitatrice. L'absorption lumineuse que l'on mesure est liée à la concentration des atomes étudiés par la loi de Beer Lambert : $\text{Log}(I_0 / I) = K.L.C$

3.4. Analyses histologiques

3.4.1. Fixation des organes

Les organes sont fixés dans environ 2 ml de liquide de Bouin (fixateur à base d'acide picrique, d'acide acétique et de formol) pendant 12 à 24 h. Le maximum de Bouin est retiré des piluliers dans lesquels les organes sont immergés puis un morceau de gaze est fixé à l'aide d'un élastique sur le haut de chaque tube. Les tubes sont placés sous l'eau courante durant 3-4 h afin d'éliminer le reste de Bouin. Après ce rinçage, 3 bains successifs d'alcool à 95%, d'une demi-journée chacun, sont effectués, suivis par 2 bains de butanol d'environ 24 h.

3.4.2. Inclusion des organes dans la paraffine

Les organes sont placés à l'étuve (56°C) dans des piluliers contenant de la paraffine. Trois bains successifs de paraffine sont effectués, d'environ 8 h chacun. Les organes sont ensuite disposés dans des petits blocs en plastique dans lesquels est coulée de la paraffine chaude. Puis ces blocs sont laissés à température ambiante jusqu'à durcissement complet de la paraffine.

3.4.3. Réalisation des coupes au microtome

Les blocs sont fixés sur un microtome à manivelle (Anglia scientific 0325) après avoir été taillés afin d'obtenir une section de coupe enserrant étroitement l'organe. L'avancement de l'axe de coupe est réglé pour que l'épaisseur de la coupe soit de 2 µm. Les coupes sont par la suite déparaffinées avant d'être colorées à

l'hémalum éosine (hématoxyline 1 g, iodate de sodium 0.2 g, chloral hydraté 150 g) qui permet une coloration différentielle .après déshydratation dans les bains suivants : éthanol 95°, éthanol à 95° et du xylène pur et enfin du xylène pur. Les pièces sont montées à l'aide du baume de Canada (Martoja et Martoja, 1967). Les rubans de coupes sont placés dans un support fermé puis seront collés sur lames.

Les observations des coupes sont effectuées avec une photo microscope LEICA DM 1000.

3.5. Traitement des données

Les variables mesurées ont été analysées selon un dispositif factoriel en blocs avec quatre répétitions.

Les données obtenues ont été soumises à une analyse de la variance à un seul critère étudié, en utilisant le logiciel Openstat (Miller, 2014).

L'analyse est complétée par des comparaisons des moyennes par le test de Fisher's de la plus petite différence significative au seuil de 5% (Steel et Torrie, 1980).

L'analyse des régressions est faite à l'aide du logiciel IBM-SPSS (version 20), pour déterminer l'effet des facteurs biotiques sur les concentrations des biomarqueurs étudiés. Le modèle de la régression linéaire multiple s'écrit de la façon suivante :

$$Y = a + b_1x_1 + b_2x_2, \dots, b_kx_k$$

Où :

Y est la variable dépendante,

x_1, x_2, \dots, x_k , sont les variables indépendantes ;

a est l'ordonnée à l'origine estimée ;

b_1, b_2, \dots, b_k , sont les pentes estimées.

Chaque pente indique le changement attendu dans Y pour un changement d'une unité dans xk.

Les valeurs de p (probabilité) reflètent la présence ($p < 0.05$ et $p < 0.01$) ou l'absence ($p > 0.05$ et $p < 0.01$) d'effet significatif des variables indépendantes sur les variables dépendantes

Les graphes ont été faits par Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Redmond, WA, Etats-Unis).

Chapitre III. Résultats et discussion

1. Effets des poussières métalliques sur les variations des métabolites

Le tableau (5) représente les carrés moyens de l'analyse de la variance à un critère des paramètres mesurés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par les poussières métalliques.

L'analyse de la variance a mis en évidence un effet concentration hautement significatif pour les trois paramètres étudiés au niveau de l'hépatopancréas des escargots exposés aux différentes concentrations de poussières métalliques. Par ailleurs, au niveau du rein l'analyse de la variance révèle des différences significatives au seuil de 5% pour les protéines totales et les lipides, et hautement significatives ($p \leq 0.001$) pour les glucides.

Tableau 5 : Carrés moyens de l'analyse de la variance à un critère des paramètres mesurés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par les poussières métalliques.

Source de variation	ddl	Prot H	Glu H	Lip H
Concentrations	4	3.30 ***	168***	0.30***
Erreur	15	0.07	4.11	0.001
C.V %		9.08	8.99	10.92
Source de variation	ddl	Prot R	Glu R	Lip R
Concentrations	4	2.05*	44.88***	0.23*
Erreur	15	0.57	1.60	0.099
C.V %		18.70	11.00	17.86

ddl=degré de liberté, C.V= Coefficient de variation, ProtH=Protéines hépatopancréas, Glu H= Glucide hépatopancréas, Lip H= Lipide hépatopancréas, Prot R= Protéines rein, Glu R= Glucide Rein, Lip R= Lipides Rein.

L'analyse de la régression linéaire explique que 83% de la variation des protéines totales au niveau de l'hépatopancréas est influencée par l'effet des concentrations croissantes des poussières métalliques. La valeur du coefficient de régression montre que l'augmentation de la concentration augmente le taux des protéines de 0.0013 µg/g de poids frais. Alors que ce même paramètre n'est pas

affecté par la contamination en poussières métalliques au niveau du rein ($r = 0.041^{ns}$) (Figure 11).

Les taux de glucides sont positivement et significativement corrélés aux concentrations de poussières métalliques où $r = 0.98^{***}$ et $r = 0.88^{**}$ au niveau de l'hépatopancréas et du rein, respectivement. Ainsi, les valeurs des pentes des régressions réalisées indiquent que l'élévation de la concentration augmente le taux des glucides de $0.004 \mu\text{g/g}$ de poids frais au niveau de l'hépatopancréas et $0.010 \mu\text{g/g}$ de poids frais au niveau du rein (Figure 12).

La figure (13) montre qu'au niveau de l'hépatopancréas, les lipides sont peu liés aux concentrations de poussières métalliques où $r = 0.68^{**}$, et l'analyse de la régression linéaire au niveau du rein indique qu'il n'y a pas de corrélation avec le traitement par les différentes concentrations de poussières métalliques et le modèle linéaire a un faible pouvoir explicatif ($r = 0.076^{ns}$). Cependant, les taux de lipides enregistrés ne varient qu'entre 1.59 et $1.78 \mu\text{g/g}$ de poids frais.

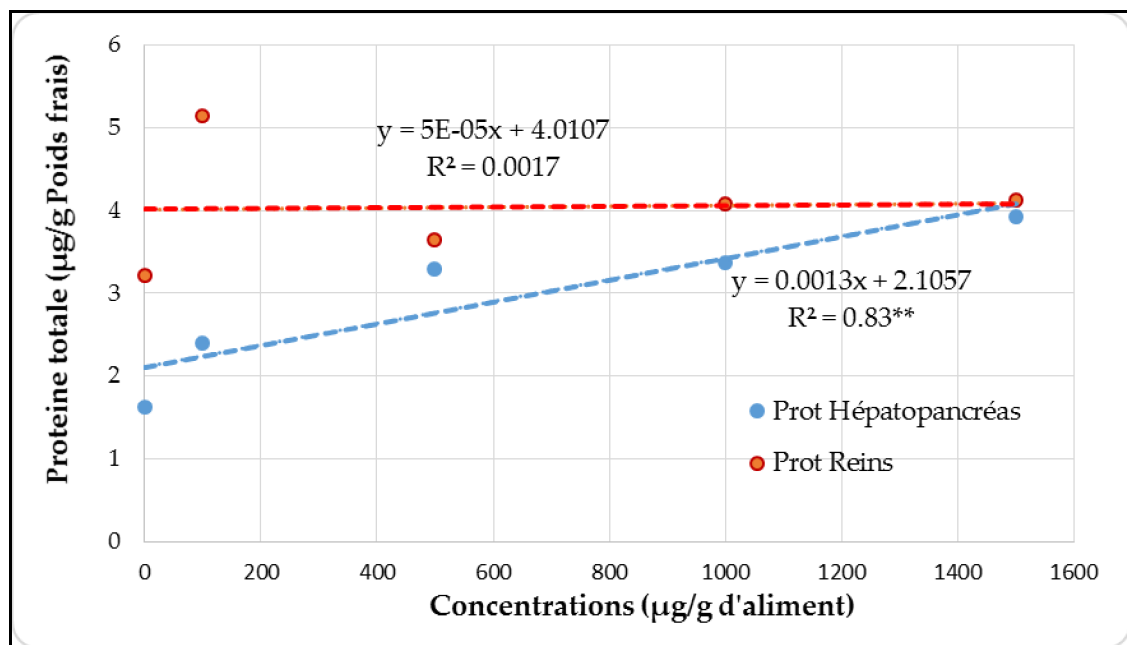


Figure 11 : Variation du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas et du rein en fonction des différentes concentrations de poussières métalliques.

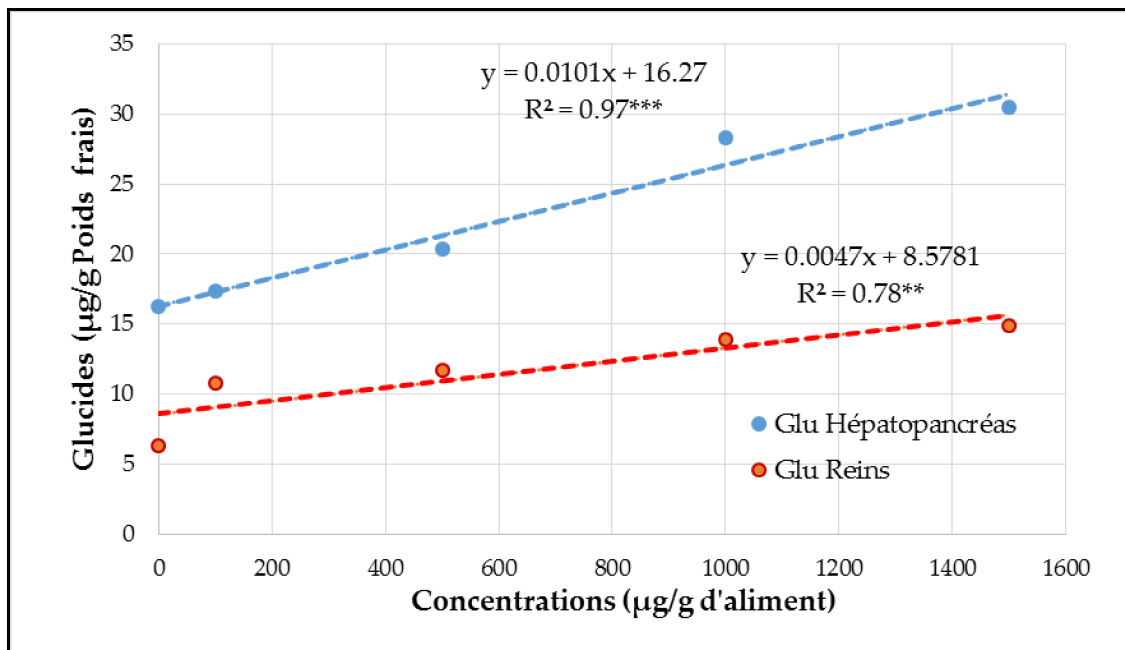


Figure 12 : Variation du taux des glucides au niveau de l'hépatopancréas et du rein en fonction des différentes concentrations de poussières métalliques.

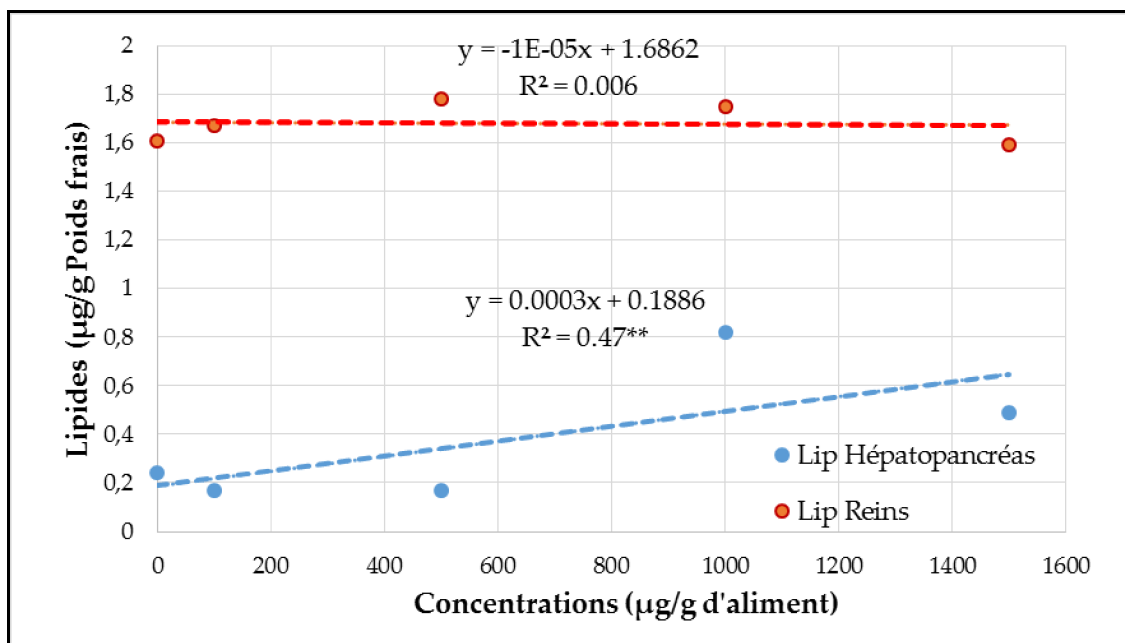


Figure 13 : Variation du taux de lipides au niveau de l'hépatopancréas et du rein en fonction des différentes concentrations de poussières métalliques.

2. Effet des traitements sur les variations des biomarqueurs

L'analyse de la variance montre un effet concentrations hautement significatif au niveau de l'hépatopancréas et du rein pour l'ensemble des paramètres étudiés chez les escargots traités par l'oxyde de fer (Tableau 6). La comparaison des moyennes des biomarqueurs étudiés au niveau de l'hépatopancréas chez les traités par l'oxyde de fer révèle quatre groupes homogènes pour l'activité CAT et GST, cinq groupes pour le GSH, alors que le MDA présente trois groupes seulement (Tableau 8).

Tenant compte de la plus petite différence significative au seuil de 5% ($P_{pds5\%} = 0.002$), le taux de l'activité enzymatique catalase (CAT) chez les individus témoins présente la moyenne la plus faible ($0.003 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de prot), alors que les individus traités par les concentrations 50 et 400 forment un seul groupe dont le taux enregistré est le plus élevé avec $0.030 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (Tableau 8).

Pour l'activité GST, le test de Fisher's fait ressortir quatre groupes homogènes qui se chevauchent pour les concentrations 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{g}$ présentant les taux maximum. Les témoins présentent la valeur la plus faible avec $0.02 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (Tableau 8).

Le taux de glutathion (GSH) le plus élevé est noté chez les individus témoins, alors que chez les individus traités par la concentration 400 $\mu\text{g}/\text{g}$ Le taux de GSH est de $0.12 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines et présente le taux le plus faible (Tableau 8).

La valeur maximale est obtenue chez les escargots traités par la concentration 400 $\mu\text{g}/\text{g}$ avec une valeur de $0.47 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines pour le taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas, alors que la valeur minimale est de $0.08 (\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les témoins (Tableau 8).

Tableau 6 : Carrés moyens de l'analyse de la variance à un facteur des paramètres mesurés au niveau de l'hépatopancreas et du rein des escargots traités par l'oxyde de fer.

Source de variation	ddl	CAT H	GST H	GSH H	MDAH
Concentrations	4	6.24 ^{e-4***}	0.003 ^{***}	0.20 ^{***}	0.10 ^{***}
Erreur	15	1.88 ^{e-6}	4.32 ^{e-5}	0.002	2.20 ^{e-4}
C.V %		7.03	10.18	15.93	7.90
Source de variation	ddl	CAT R	GST R	GSH R	MDA R
Concentrations	4	0.001 ^{***}	0.037 ^{***}	0.68 ^{***}	2.53 ^{e-4***}
Erreur	15	5.56 ^{e-6}	6.84 ^{e-5}	0.006	2.85 ^{e-6}
C.V %		4.71	9.01	11.27	4.50

ddl=degré de liberté, *C.V*= Coefficient de variation, *CAT H*= CAT hépatopancreas. *GST H* = GST hépatopancreas, *GSH H*= GSH hépatopancreas, *MDA H*= MDA hépatopancreas. *CAT R*= CAT Rein, *GST R*= GST Rein, *GSH R*= GSH Rein, *MDA R*= MDA Rein.

L'induction de l'activité CAT est nettement supérieure chez les traités par les concentrations croissantes d'oxyde de fer par rapport aux groupes témoins (Tableau 8).

La comparaison des moyennes des différentes concentrations sur la base de l'induction l'activité GST laisse apparaître quatre groupes distincts. Le groupe (a) est représenté par la concentrations 400 µg/g, le groupe (b) est constitué des concentrations 100 et 200 µg/g, le groupe (b,c) représenté par la concentration 50 µg/g et enfin, le dernier groupe (c) qui représente les témoins avec l'activité la plus faible (0.037 µM/min/mg de protéines) (Tableau 8).

Au niveau du rein, le traitement par l'oxyde de fer (tableau 4), met en évidence des taux de GSH de l'ordre 0.356 (µM/mg de protéines) chez les traités par la plus faible concentration et un taux de 1.107 (µM/mg de protéines) chez les individus traités par la plus forte concentration.

Le test Fisher's révèle trois groupes homogènes, avec le taux le plus faible de MDA chez les témoins, quant à la valeur la plus élevée, elle est enregistrée chez

escargots traités par la plus forte concentration (400 µg/g) avec un taux de 0.051 µM/mg de protéines (Tableau 8).

L'analyse de la variance montre un effet concentration hautement significatif pour l'ensemble des variables soumises à l'analyse chez les escargots traités par l'oxyde d'aluminium (Tableau 7). L'effet concentration subsiste pour tous les biomarqueurs au niveau de l'hépatopancréas et du rein.

Tableau 7: Carrés moyens de l'analyse de la variance à un facteur des paramètres mesurés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par l'oxyde d'aluminium.

Source de variation	ddl	CAT H	GST H	GSH H	MDA H
Concentrations	4	2.80 ^{e-4***}	0.004 ^{***}	0.064 ^{***}	0.058 ^{***}
Erreur	15	1.93 ^{e-7}	2.20 ^{e-4}	5.00 ^{e-4}	2.03 ^{e-4}
C.V %		3.52	13.48	7.28	9.60
Source de variation	ddl	CAT R	GST R	GSH R	MDA R
Concentrations	4	0.003 ^{***}	3.33e-4 ^{***}	29.04 ^{***}	0.01 ^{***}
Erreur	15	7.80 ^{e-7}	1.74 ^{e-5}	0.26	1.15 ^{e-4}
C.V %		1.55	5.20	19.27	10.74

ddl=degré de liberté, C.V= Coefficient de variation, CAT H= CAT hépatopancréas. GST H= GST hépatopancréas, GSH H= GSH hépatopancréas, MDA H= MDA hépatopancréas. CAT R= CAT Rein, GST R= GST Rein, GSH R= GSH Rein, MDA R= MDA Rein.

Le tableau (8) représente l'évolution de l'activité catalase chez les escargots exposés à l'oxyde d'aluminium au niveau de l'hépatopancréas, avec un minimum de 0.001µM/min/mg de protéines chez les témoins, et un maximum de 0.022 µM/min/mg de protéines chez les traités par 400 µg/g.

Concernant l'activité GST, trois groupes sont distincts, avec une moyenne générale de 0.110 µM/min/mg de protéines (Tableau 8).

En tenant compte de la plus petite différence significative au seuil de 5% (Ppds_{5%} = 0.033), 0.464 µM/mg de protéines correspond au taux de GSH le plus élevé et il est enregistré chez les escargots traités par la concentration 50 µg/g, en revanche,

0.148 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines est la valeur la plus faible rencontrée chez les escargots traités par la plus forte concentration de xénobiotiques (Tableau 8).

Au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*, le test de Fisher's a révélé quatre groupes pour le biomarqueur MDA, mettant en évidence un effet concentration dépendant vis à vis de l'oxyde d'aluminium (Tableau 8).

Concernant l'activité catalase au niveau du rein, le traitement des escargots par l'oxyde d'aluminium met en évidence une variation entre les groupes allant de 0.035 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins, à 0.104 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines chez les traités par la concentration 400 $\mu\text{g}/\text{g}$ (Tableau 8).

Concernant l'activité GST, nous ne distinguons que deux groupes homogènes avec une moyenne générale de 0.080 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, le premier groupe (a) représente les témoins et les individus traités par les concentrations 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{g}$ et le second groupe (b) englobe les individus exposés à 50 et 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ (Tableau 8).

Le taux du GSH au niveau du rein enregistre une valeur maximale de 6.823 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins, cependant 0.235 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines est la valeur minimale observée chez les escargots traités par la plus forte concentration (Tableau 8).

S'agissant du taux de MDA au niveau du rein d'*Helix aspersa* traités par l'oxyde d'aluminium, la comparaison des moyennes laisse apparaitre trois groupes homogènes, un premier groupe représentant les témoins, un second groupe renfermant les individus traités par les concentrations 50, 100 et 200 $\mu\text{g}/\text{g}$, et un troisième groupe spécifique aux traités par la plus forte concentration de xénobiotiques (Tableau 8).

Tableau 8 : Comparaison des moyennes des paramètres étudiés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par l'oxyde de fer et l'oxyde d'aluminium.

Paramètres	Concentrations (µg/g)	Oxyde de fer		Oxyde d'aluminium	
		Glande digestive	Rein	Glande digestive	Rein
CAT	0	0.003 (d)	0.025 (d)	0.001 (e)	0.035 (e)
	50	0.031 (a)	0.051 (b)	0.006 (d)	0.037 (d)
	100	0.010 (c)	0.047 (c)	0.016 (b)	0.050 (c)
	200	0.021 (b)	0.050 (bc)	0.015 (c)	0.057 (b)
	400	0.030 (a)	0.073 (a)	0.022 (a)	0.104 (a)
Moyenne		0.019	0.050	0.012	0.056
Ppds 5%		0.002	0.003	6.633	0.001
GST	0	0.020 (d)	0.037 (c)	0.062 (c)	0.088 (a)
	50	0.040 (c)	0.047 (bc)	0.121 (a)	0.069 (b)
	100	0.071 (b)	0.052 (b)	0.094 (b)	0.071 (b)
	200	0.090 (a)	0.055 (b)	0.138 (a)	0.083 (a)
	400	0.088 (a)	0.265 (a)	0.132 (a)	0.088 (a)
Moyenne		0.064	0.091	0.110	0.080
Ppds 5%		0.009	0.012	0.022	0.006
GSH	0	0.690 (a)	1.107 (a)	0.367 (b)	6.823 (a)
	50	0.262 (bc)	1.110 (a)	0.464 (a)	3.593 (b)
	100	0.324 (b)	0.221(d)	0.344 (b)	2.239 (c)
	200	0.189 (cd)	0.755 (b)	0.209 (c)	0.474 (d)
	400	0.122 (d)	0.356 (c)	0.148 (d)	0.235 (d)
Moyenne		0.320	0.710	0.307	2.673
Ppds 5%		0.076	0.120	0.033	0.776
MDA	0	0.088 (c)	0.030 (c)	0.050 (d)	0.195 (a)
	50	0.147 (b)	0.032 (c)	0.125 (b)	0.076 (b)
	100	0.151 (b)	0.036 (b)	0.129 (b)	0.090 (b)
	200	0.087 (c)	0.037 (b)	0.078 (c)	0.078 (b)
	400	0.476 (a)	0.051 (a)	0.357 (a)	0.058 (c)
Moyenne		0.188	0.037	0.148	0.099
Ppds 5%		0.022	0.002	0.021	0.016

L'analyse de la variance indique un effet concentration hautement significatif pour tous les biomarqueurs étudiés au niveau de l'hépatopancréas et du rein chez les escargots traités par les poussières métalliques (Tableau 9).

Tableau 9 : Carrés moyens de l'analyse de la variance à un facteur des paramètres mesurés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par les poussières métalliques.

Source de variation	ddl	CAT H	GST H	GSH H	MDA H
Concentrations	4	0.054***	6.36***	1.24***	3.12 ^{e-4***}
Erreur	15	6.08e-4	0.08	0.07	7.37 ^{e-6}
C.V %		9.85	15.16	10.49	4.23
Source de variation	ddl	CAT R	GST R	GSH R	MDA R
Concentrations	4	0.002***	0.002***	0.23**	0.001***
Erreur	15	6.45 ^{e-5}	1.62 ^{e-4}	0.03	2.10 ^{e-5}
C.V %		14.29	11.45	14.52	3.20

ddl=degré de liberté, C.V= Coefficient de variation, CAT H= CAT hépatopancréas. GST H= GST hépatopancréas, GSH H= GSH hépatopancréas, MDA H= MDA hépatopancréas. CAT R= CAT Rein, GST R= GST Rein, GSH R= GSH Rein, MDA R= MDA Rein.

La comparaison des moyennes de l'activité catalase étudiée au niveau de l'hépatopancréas de l'escargot *Helix aspersa* exposé à des concentrations croissantes de poussières métalliques, révèle quatre groupes homogènes, avec une activité minimale de 0.091 µM/min/mg de protéines observé chez les témoins, et une induction maximale de 0.366 µM/min/mg de protéines représentant les escargots traités par la concentration 1500 µg/g (Tableau 10).

En tenant compte de la plus petite différence significative au seuil de 5% (Ppds 5% = 0.442), l'activité GST présente une faible valeur chez les témoins avec 0.342 µM/min/mg de protéines, et une valeur élevée de 3.662 µM/min/mg de protéines chez les escargots exposés à la concentration 1500 µg/g (Tableau 10).

Cinq groupes homogènes sont distincts pour le GSH. Le taux maximal de ce biomarqueur est enregistré chez les témoins avec 3.315 µM/mg de protéines, alors

que le taux minimal est enregistré chez les escargots traités par la plus forte concentration en poussières métalliques (Tableau 10).

Concernant le taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* exposé à des concentrations croissantes de poussières métalliques, nous notons l'émergence de cinq groupes homogènes avec une moyenne générale de 0.064 µM/mg de protéines (Tableau 10).

Le test de Fisher's (LSD 5%) montre quatre groupes homogènes relatifs à l'activité catalase au niveau du rein : le taux le plus faible est enregistré chez les individus témoins avec 0.028 µM/min/mg de protéines, et le taux le plus élevé est observé chez les individus traités par la concentration 1500 µg/g avec 0.081 µM/min/mg de protéines (Tableau 10).

Trois groupes homogènes sont distincts pour l'activité GST, le premier groupe représente les escargots témoins, le deuxième groupe englobe les individus exposés aux concentrations 100 et 500 µg/g, et le troisième groupe englobe les deux plus fortes concentrations (1000 et 1500 µg/g) (Tableau 10).

Le taux du GSH le plus faible est enregistré chez les individus exposés à la plus forte concentration de xénobiotique avec une valeur de 0.864 µM/mg de protéines alors que la valeur la plus élevée (1.484 µM/mg de protéines) est observée chez les individus témoins (Tableau 10).

En tenant compte de la plus petite différence significative au seuil de 5% ($P_{pds5\%} = 0.006$), au niveau du rein, le taux de MDA est faible chez les témoins avec 0.111 µM/mg de protéines, alors que chez les escargots traités par les poussières métalliques, ce taux est de 0.170 µM/mg de protéines particulièrement chez les escargots exposés à la concentration 1500 µg/g (Tableau 10).

Tableau 10 : Comparaison des moyennes des paramètres étudiés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par les poussières métalliques.

Paramètres	Concentrations (µg/g)	Poussières métalliques	
		Hépatopancréas	Rein
CAT	0	0.091 (d)	0.028 (c)
	100	0.260 (b)	0.030 (c)
	500	0.178 (c)	0.067 (b)
	1000	0.355 (a)	0.073 (ab)
	1500	0.366(a)	0.081 (a)
Moyenne		0.250	0.056
Ppds 5%		0.037	0.012
GST	0	0.342 (d)	0.073 (c)
	100	1.364 (c)	0.101 (b)
	500	1.694 (c)	0.107 (b)
	1000	2.613 (b)	0.130 (a)
	1500	3.662 (a)	0.142 (a)
Moyenne		1.935	0.111
Ppds 5%		0.442	0.019
GSH	0	3.315 (a)	1.484 (a)
	100	2.781 (b)	1.413 (ab)
	500	2.548 (bc)	1.276 (ab)
	1000	2.153 (cd)	1.159 (b)
	1500	1.881 (d)	0.864 (c)
Moyenne		2.535	1.239
Ppds 5%		0.401	0.271
MDA	0	0.053 (d)	0.111 (d)
	100	0.060 (c)	0.137 (c)
	500	0.063 (bc)	0.149 (b)
	1000	0.066 (b)	0.145 (b)
	1500	0.077 (a)	0.170 (a)
Moyenne		0.064	0.142
Ppds 5%		0.004	0.006

3. Effet des traitements par Fe₂O₃ et Al₂O₃ sur les variations des biomarqueurs étudiés

La figure (14) illustre les variations de l'activité catalase au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par l'oxyde de fer et l'oxyde d'aluminium. Nous remarquons que l'activité catalase est plus élevée au niveau du rein par rapport à l'hépatopancréas pour les deux xénobiotiques testés, de plus nous constatons que cette activité enzymatique est plus élevée chez les traités par l'oxyde de fer par rapport à ceux traités par l'oxyde d'aluminium et cette différence est de l'ordre de 40 %.

Au niveau de l'hépatopancréas, l'activité GST est plus importante que celle enregistrée au niveau du rein chez les individus exposés à Al₂O₃ et la différence est de l'ordre de 66%. Le même phénomène est observé pour les traités par le Fe₂O₃ (Figure 15).

L'effet traitement par l'oxyde d'aluminium moyen au niveau du rein, indique une diminution du taux de GSH (Figure 16).

La figure (17) montre que le taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas des escargots traités par l'oxyde de fer est nettement supérieur que celui enregistré au niveau du rein. Ce taux est plus élevé chez les individus exposés à l'oxyde d'aluminium.

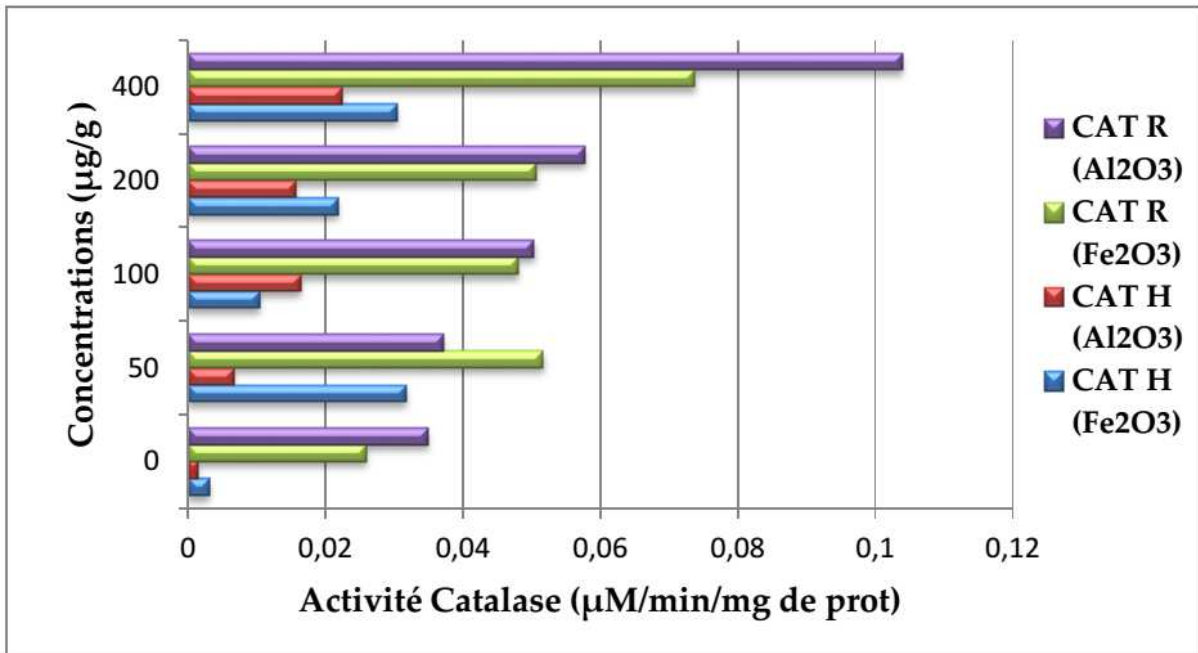


Figure 14 : Variations de l'activité catalase en fonction des concentrations croissantes de Fe₂O₃ et Al₂O₃ au niveau de l'hépatopancréas et du rein.

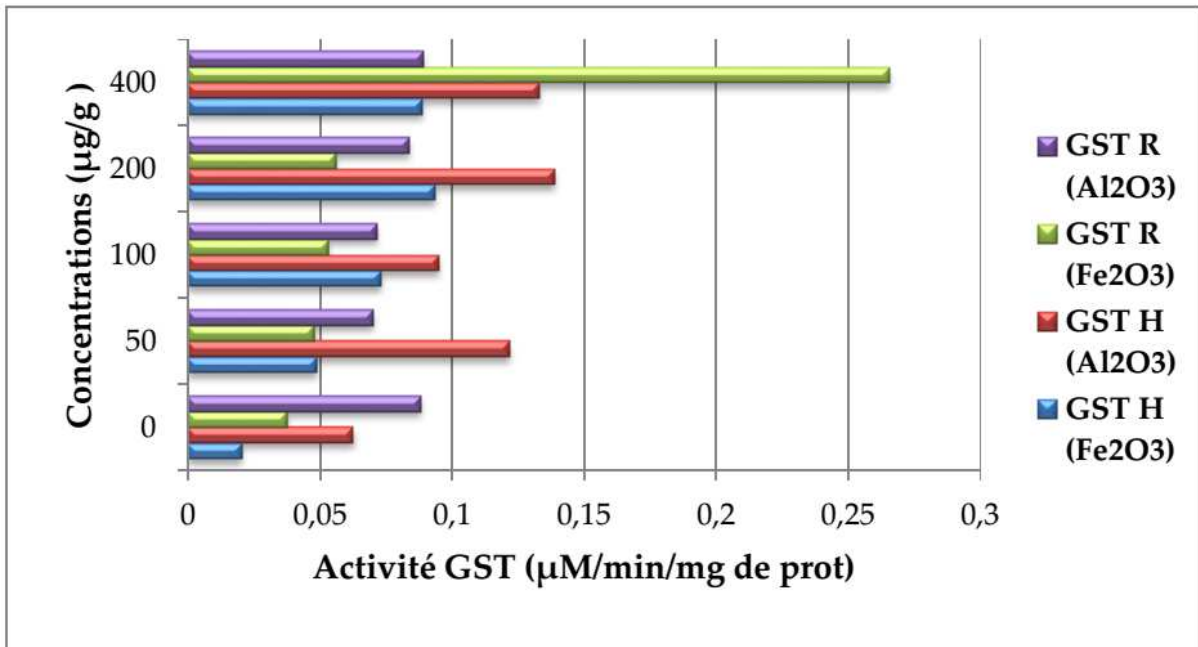


Figure 15 : Variations de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes de Fe₂O₃ et Al₂O₃ au niveau de l'hépatopancréas et du rein.

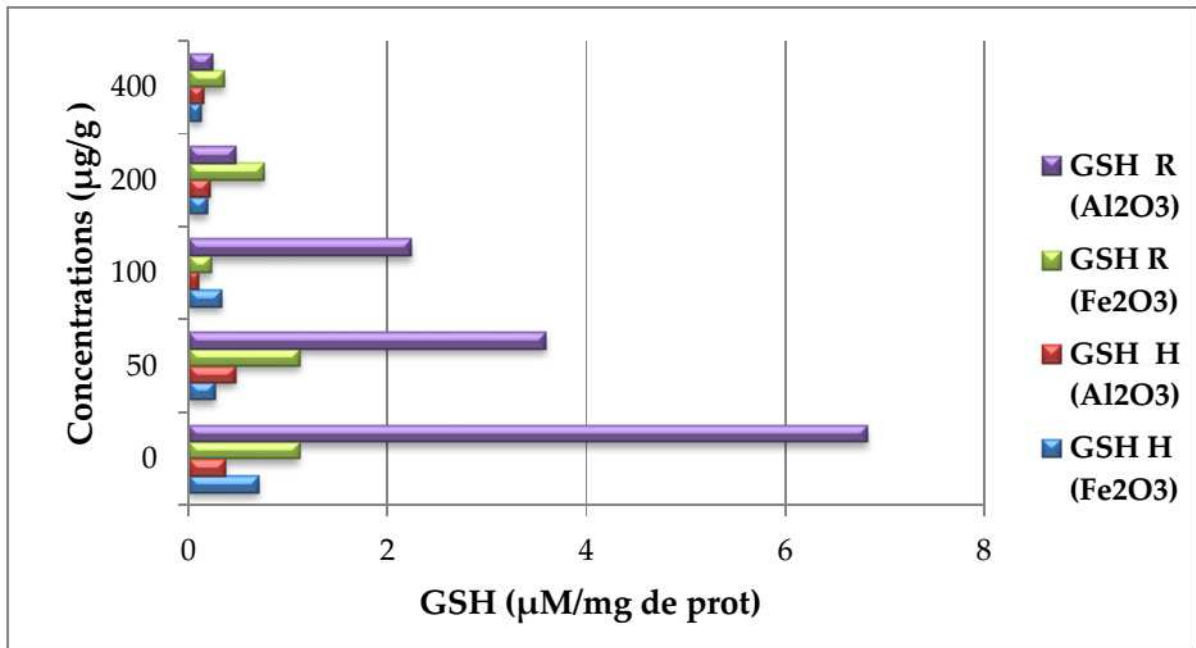


Figure 16 : Variations du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes de Fe₂O₃ et Al₂O₃ au niveau de l'hépatopancréas et du rein.

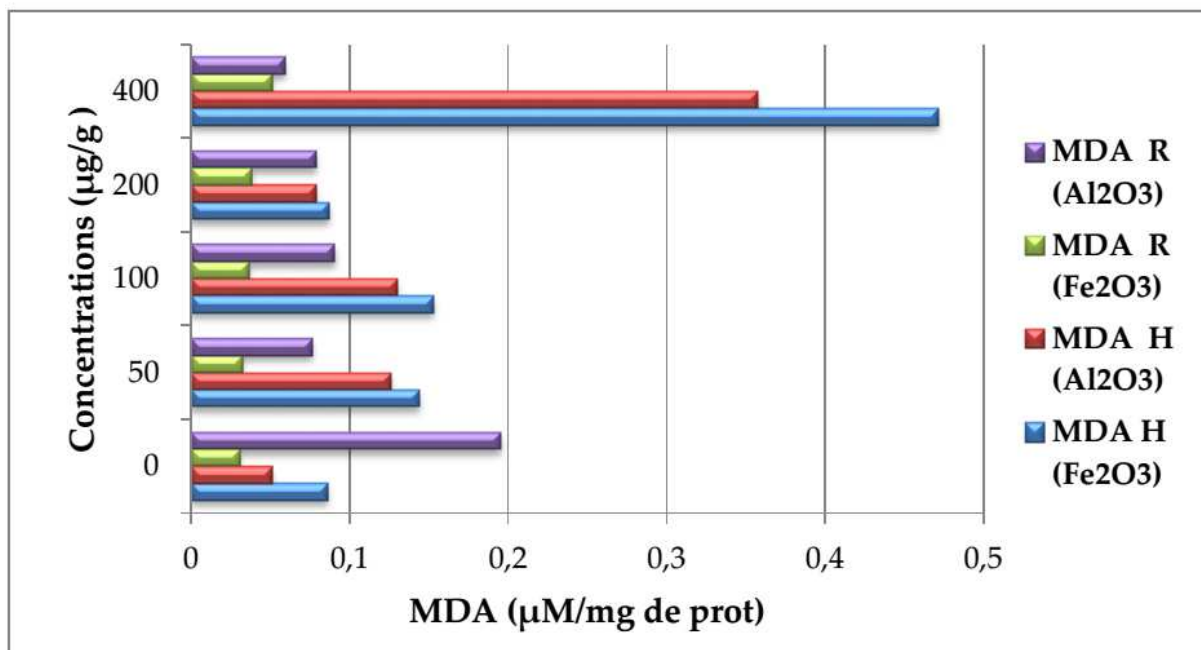


Figure 17 : Variations du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes de Fe₂O₃ et Al₂O₃ au niveau de l'hépatopancréas et du rein.

3.1. Effet de l'oxyde de fer, de l'oxyde d'aluminium et des poussières métalliques sur l'activité catalase

Nos résultats indiquent que la variation de l'induction de l'activité CAT au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots exposés à l'oxyde de fer est positivement liée aux concentrations croissantes de traitement ($r = 0.56^*$). Des valeurs qui passent de 0.003 à 0.03 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, chez les témoins et les individus traités par la concentration 400 $\mu\text{g}/\text{g}$ d'aliment, respectivement (Figure 18).

Une augmentation très hautement significative de l'induction de l'activité CAT au niveau du rein en présence de l'oxyde de fer est à signaler où le coefficient de détermination (R^2) explique 94% de la variation totale de l'activité CAT, ce qui est important (Figure 19).

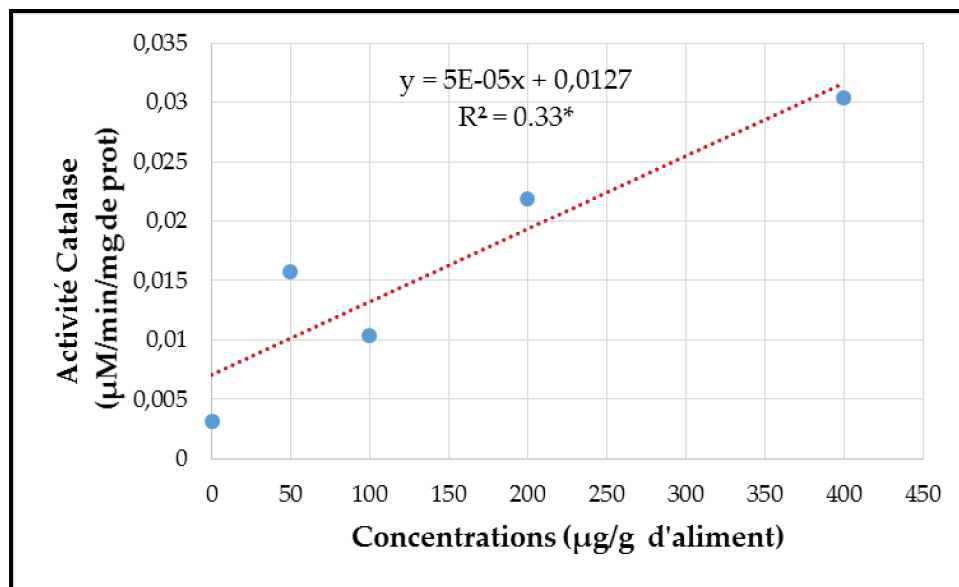


Figure 18 : Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau de l'hépatopancréas.

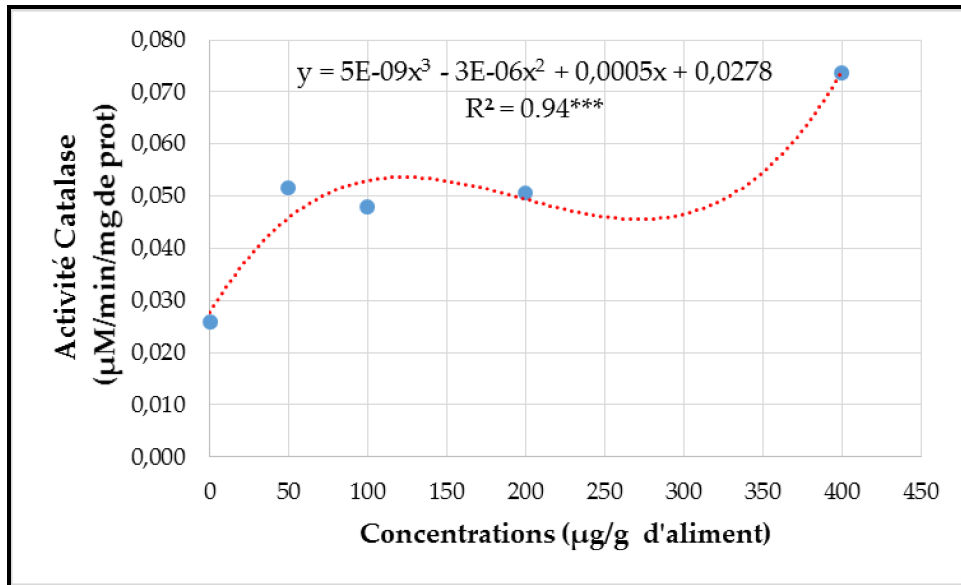


Figure 19 : Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau du rein.

La figure 20 montre que l'exposition des escargots aux concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium provoque une augmentation dose-dépendante et très significative de l'induction de l'activité catalase au niveau de l'hépatopancréas ($r = 0.88^{**}$).

Au niveau du rein, cette induction est positivement et très hautement significativement liée aux différentes concentrations d'oxyde d'aluminium ($r = 0.99^{***}$). Nous avons également mis en évidence une augmentation de l'ordre de 300% de cette activité enzymatique chez les individus traités par la plus forte concentration de xénobiotique comparativement aux témoins (Figure 21).

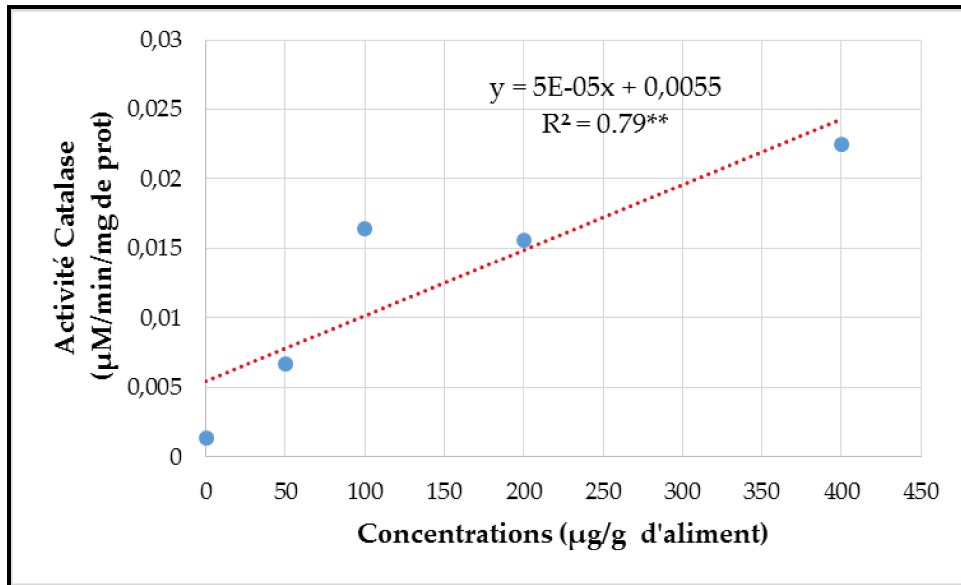


Figure 20 : Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau de l'hépatopancréas.

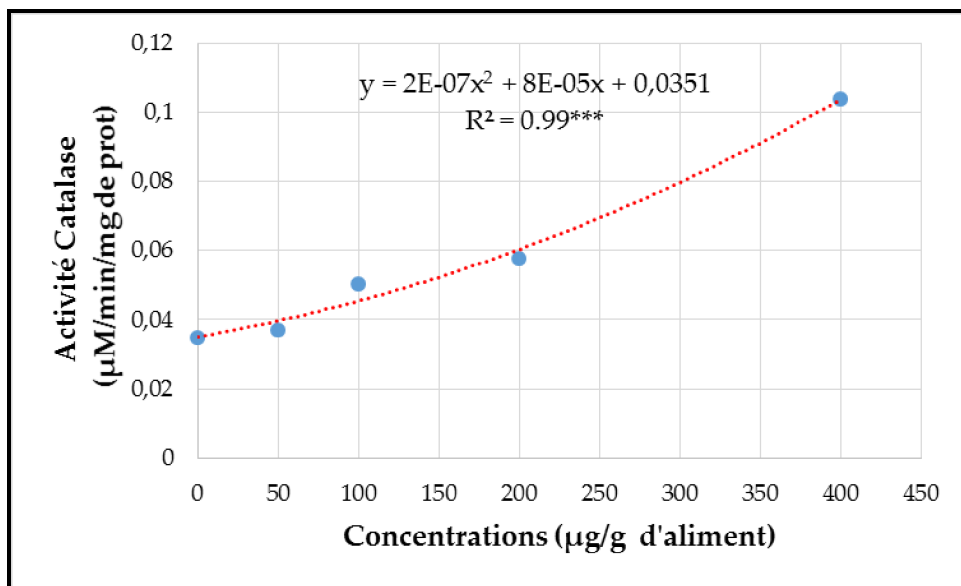


Figure 21 : Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau du rein.

Nous remarquons que le modèle linéaire permet d'expliquer 68% de la variation totale de l'activité catalase qui est dépendante des concentrations de poussières métalliques. La valeur de la pente de régression montre que l'augmentation de la concentration induit l'augmentation de l'induction de l'activité CAT de 0.0002 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (Figure 22).

D'après la régression linéaire (figure 23), l'induction de l'activité catalase est positivement et très significativement corrélée avec les concentrations de poussières métalliques au niveau du rein où $r = 0.92^{***}$. Cependant, cette activité est multipliée par 4 chez les escargots exposés à la concentration 1500 $\mu\text{g}/\text{g}$ comparativement aux témoins, avec respectivement des valeurs de 0.08 et 0.02 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

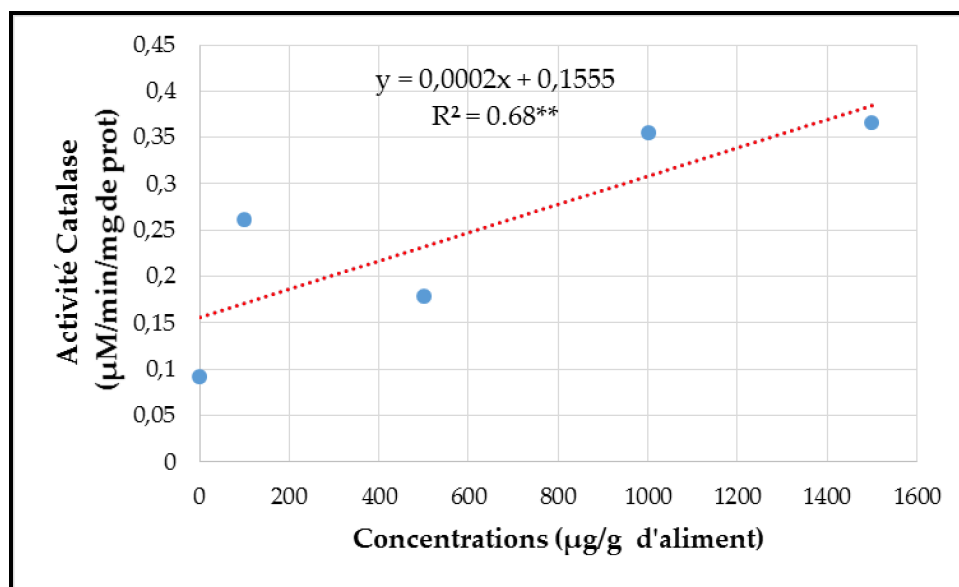


Figure 22 : Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau de l'hépatopancréas.

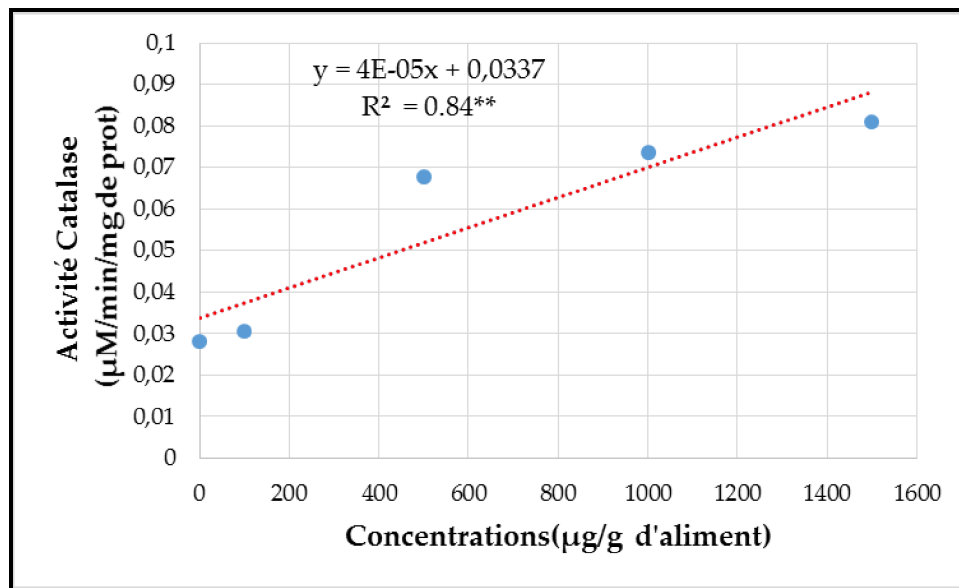


Figure 23 : Variation de l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau du rein.

3.2. Effet de l'oxyde de fer, de l'oxyde d'aluminium et des poussières métalliques sur l'activité GST

La figure (24) met en évidence l'évolution de l'induction de l'activité GST au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots exposés à l'oxyde de fer. Nous constatons une liaison positive et significative ($r = 0.80^*$) entre les concentrations du xénobiotique et l'activité GST. Le coefficient régression indique que l'augmentation de la concentration est à l'origine d'une induction de l'activité GST de l'ordre de $0.0002 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

D'un autre côté au niveau du rein, les différentes concentrations d'oxyde de fer sont positivement et très significativement corrélées avec l'induction de l'activité GST ($r = 0.91^{***}$), la valeur du coefficient de régression indique que l'augmentation de la concentration augmente l'activité GST de $0.0006 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (Figure 25).

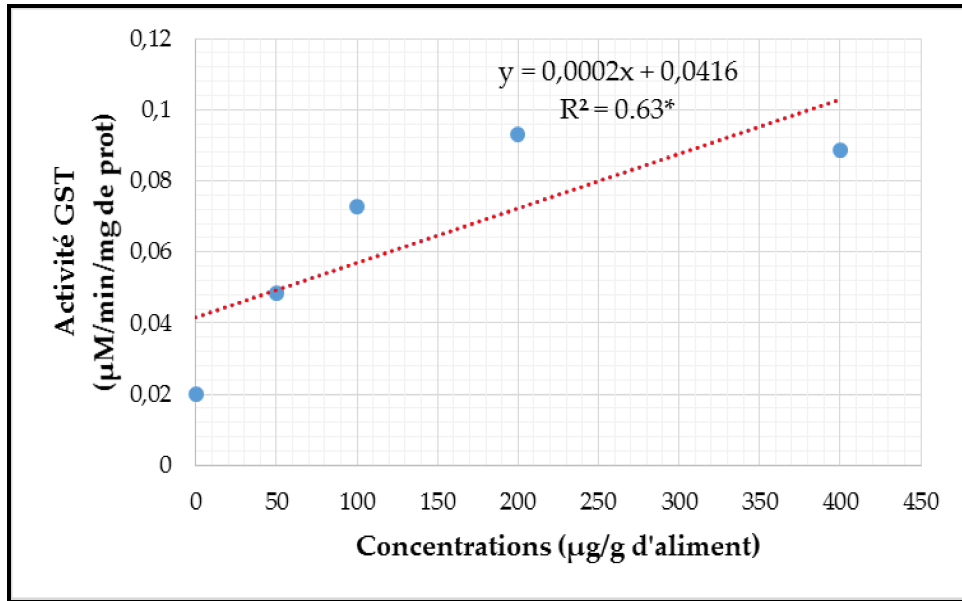


Figure 24 : Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau de l'hépatopancreas.

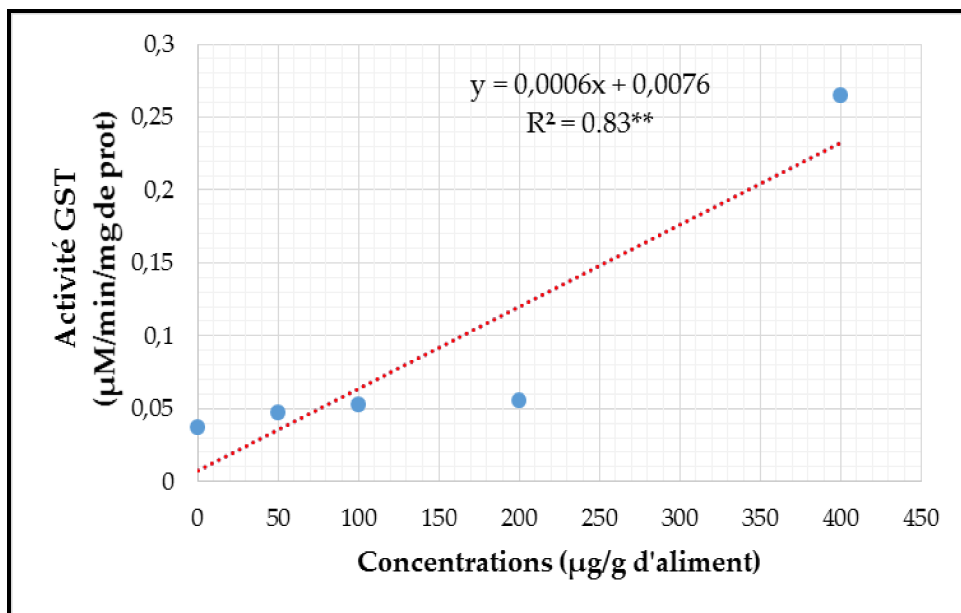


Figure 25 : Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau du rein.

L'analyse de la régression linéaire explique que 49 % de la variation de l'activité GST est dose dépendante au niveau de l'hépatopancréas, la valeur du coefficient de régression indique que l'augmentation de la concentration induit l'augmentation de l'activité GST de 0.0001 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (Figure 26).

Au niveau du rein, l'induction de l'activité GST est positivement et très significativement corrélée aux différentes concentrations d'oxyde d'aluminium ($r = 0.98^{**}$). On remarque que les valeurs de la GST oscillent entre 0.069 et 0.088 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (Figure 27).

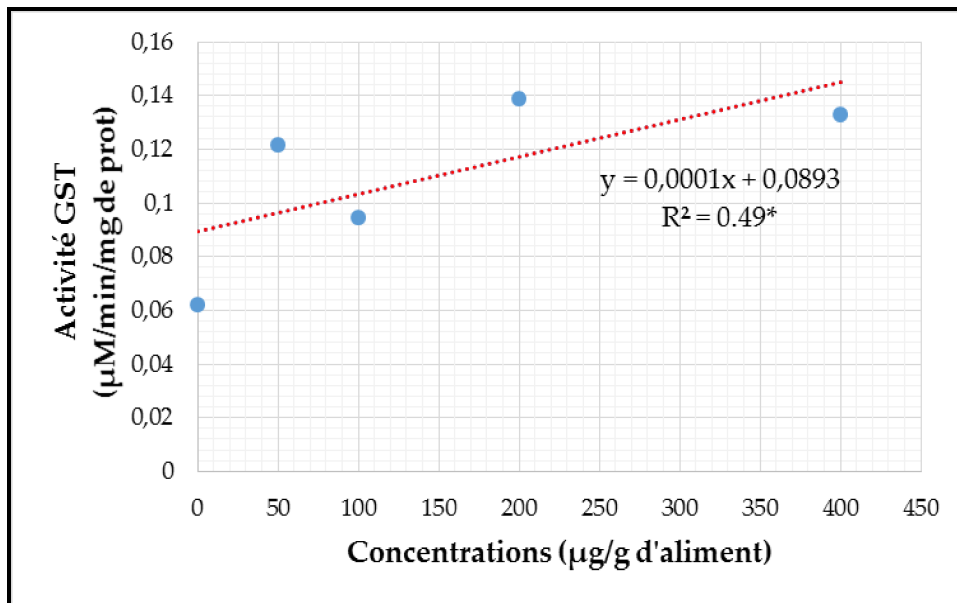


Figure 26 : Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau de l'hépatopancréas.

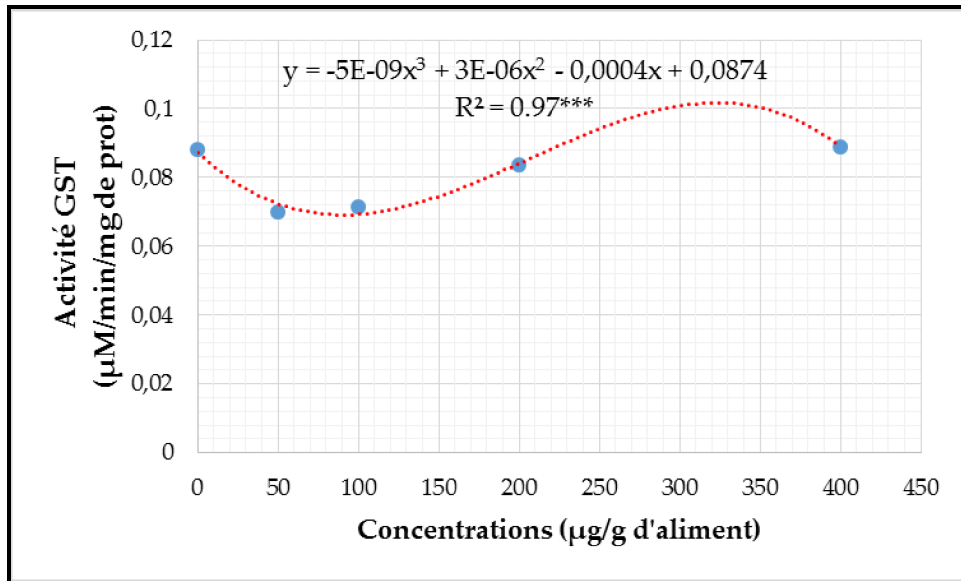


Figure 27 : Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau du rein.

La figure (28) montre une induction dose dépendante et progressive de l'activité GST. Cette activité passe de 0.34 à 3.66 µM/min/mg de protéines avec un coefficient de corrélation $r = 0.97^{***}$.

L'analyse de la régression linéaire laisse apparaitre une forte corrélation entre la variation de l'induction de l'activité GST et les différentes concentrations de poussières métalliques au niveau du rein où $r = 0.94^{***}$ (Figure 29).

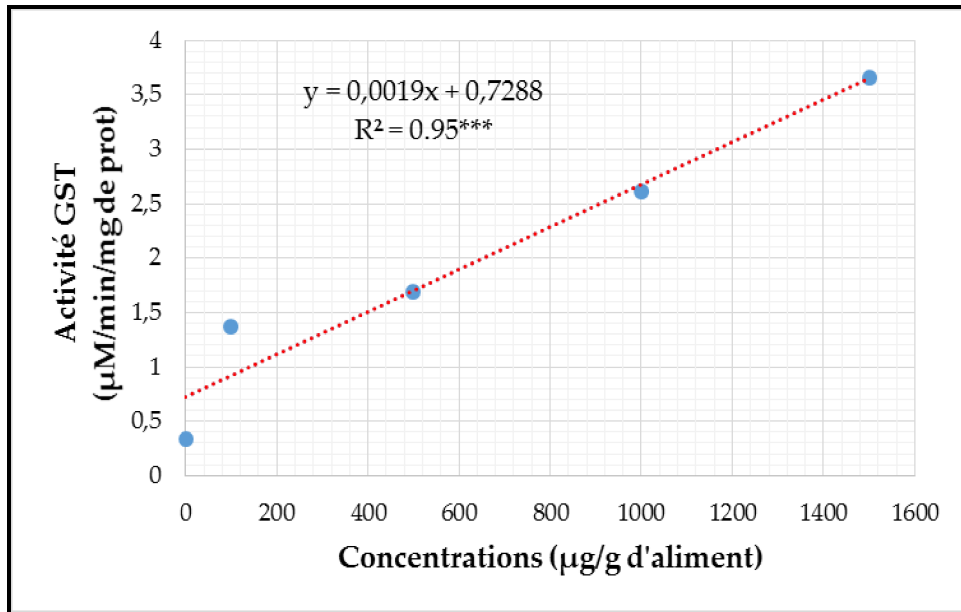


Figure 28 : Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau de l'hépatopancréas.

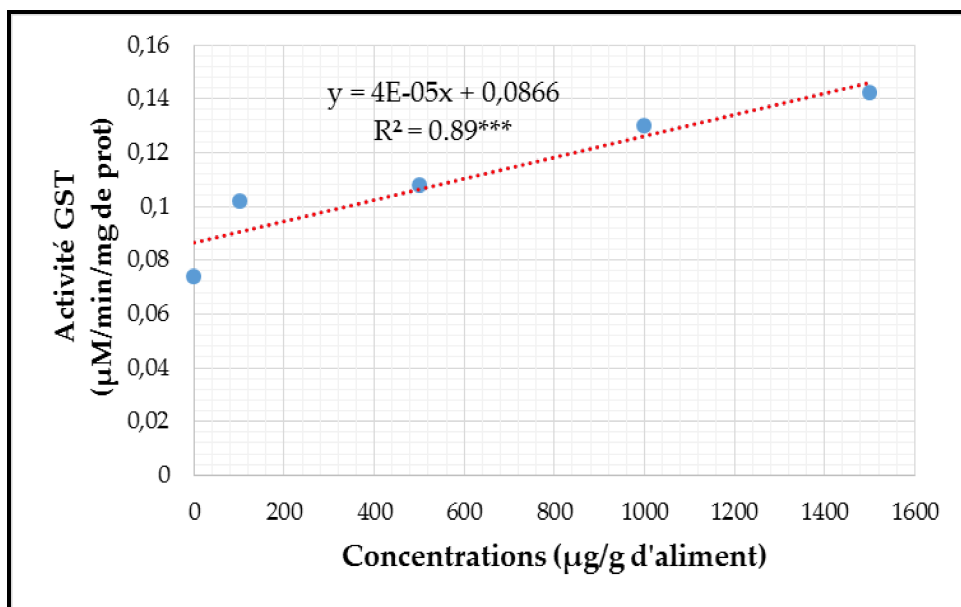


Figure 29 : Variation de l'activité GST en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau du rein.

3.3. Effet de poussières métalliques sur l'activité acétylcholinestérase (AChE)

L'analyse de la variance à un seul critère indique un effet concentration hautement significatif pour l'activité acétylcholine-estérase mesuré au niveau de la tête avec un carré moyen des écarts égal à 0.028***.

La figure (30) illustre que l'analyse de regression linéaire révèle un profil de décroissance significatif de l'activité acétylcholine-estérase (AChE) au niveau de la tête d'*Helix aspersa* exposé à différentes concentrations de poussières métalliques, nous avons mis également en évidence une grande corrélation où $r = -0.97^{***}$.

L'activité AChE passe de 0.27 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines à 0.067 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines respectivement chez les témoins et les traités par la concentration 1500 $\mu\text{g}/\text{g}$.

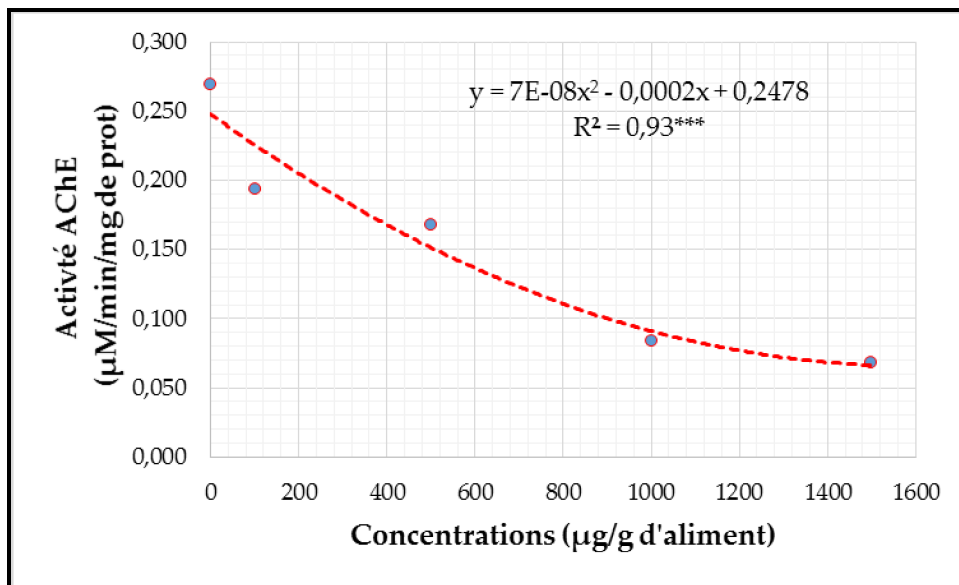


Figure 30 : Variation de l'activité AChE au niveau de la tête en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques.

3.4. Effet de l'oxyde de fer, de l'oxyde d'aluminium et des poussières métalliques sur le taux de GSH

Au niveau de l'hépatopancréas des escargots exposés aux concentrations croissantes d'oxyde de fer, le taux de GSH diminue de manière significative, et passe de 0.69 µM/mg de protéines enregistrés chez les témoins à 0.12 µM/mg de protéines observés chez les traités par la concentration 400 µg /g (Figure 31).

Au niveau du rein, l'analyse de la régression linéaire explique que 67% de la variation du taux de GSH est dose dépendante, la valeur de la pente de régression montre que l'augmentation de la concentration réduit significativement le taux de GSH de l'ordre de 0.0018 µM/mg de protéines (Figure 32).

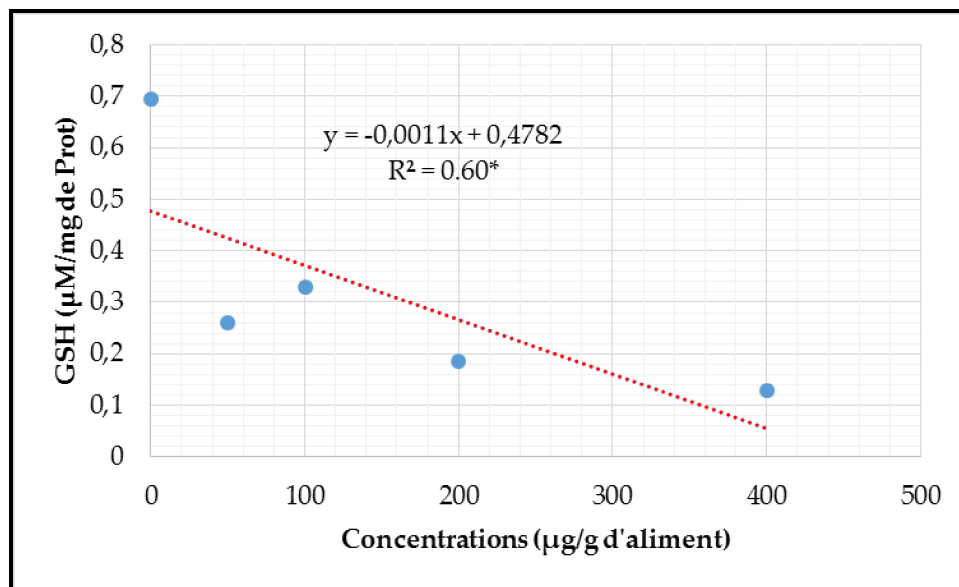


Figure 31 : Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau de l'hépatopancréas.

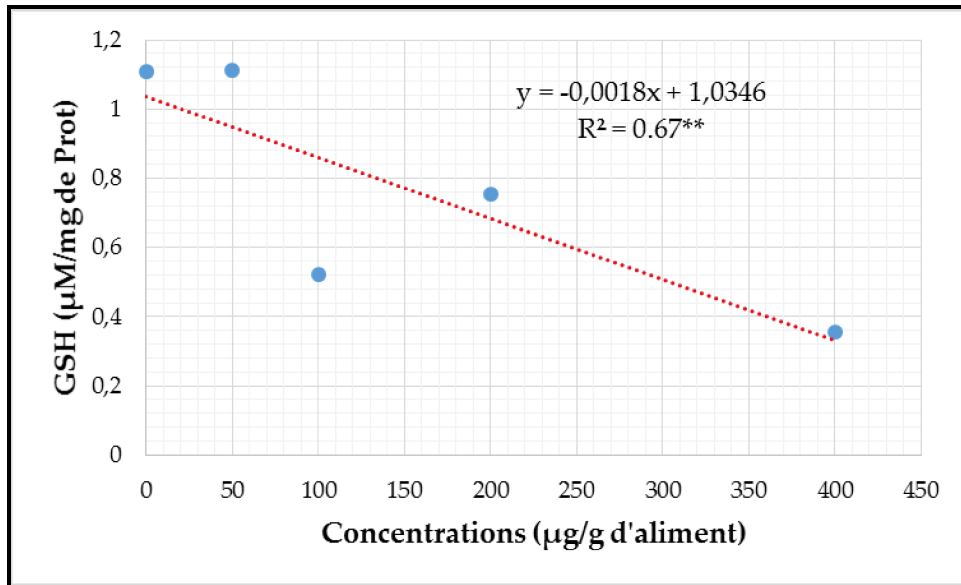


Figure 32 : Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau du rein.

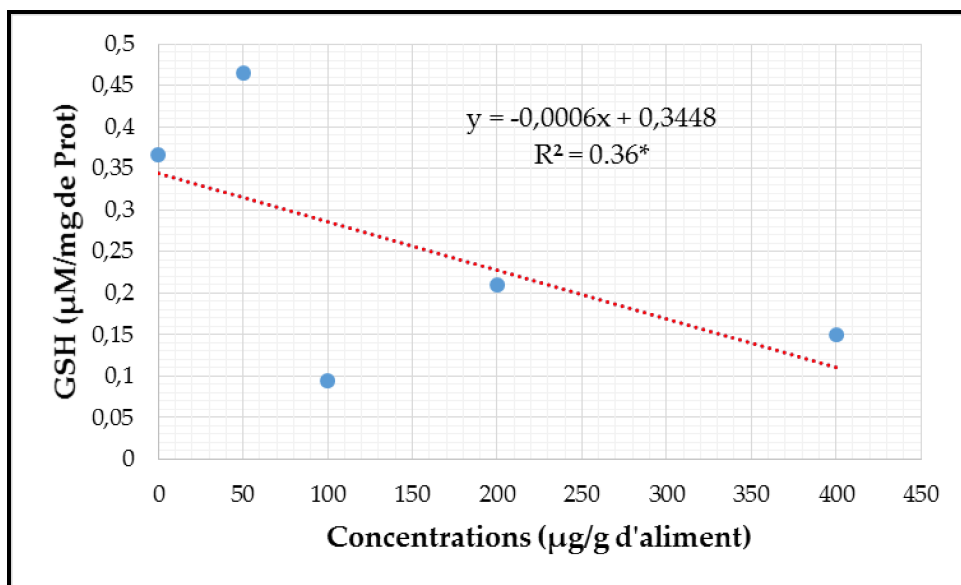


Figure 33 : Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau de l'hépatopancreas.

Chez les escargots exposés aux différentes concentrations d'oxyde d'aluminium, le taux du biomarqueur GSH, tend à diminuer au niveau de l'hépatopancréas. Cette diminution du taux de GSH est inversement proportionnelle aux concentrations de xénobiotique. En effet le taux de GSH diminue jusqu'à 0.0006 μM/mg de protéines (Figure 33).

Au niveau du rein, le facteur concentrations affecte d'une façon très significative la variation du taux de GSH ($r = -0.99^{***}$). Ainsi, le taux de GSH tend à diminuer de manière significative et inversement proportionnelle aux concentrations d'oxyde d'aluminium. En effet, le taux de GST est 30 fois plus important chez les témoins comparativement aux escargots exposés à la plus forte concentration (Figure 34).

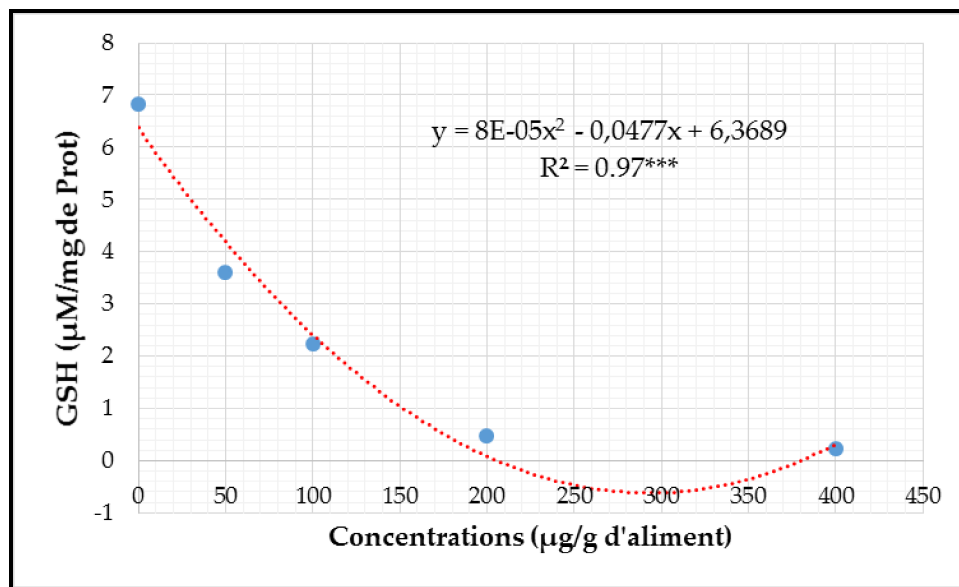


Figure 34 : Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau du rein.

Une diminution très significative des taux de GSH a été observée au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots traités par les poussières métalliques ($r = -0.95^{***}$). Nous avons enregistré un taux de 3.31 μM/mg de protéine chez les

témoins, contrairement aux individus contaminés par la concentration 1500 µg /g qui ont enregistré une valeur de 1.88 µM/mg de protéines (Figure 35).

L'analyse de la régression linéaire a mis en évidence une liaison négative et très significative ($r = - 0.98^{***}$) entre le taux de GSH et les différentes concentrations de traitement par les poussières métalliques au niveau du rein. Le taux de GSH décroît de 1.48 chez les témoins à 0.86 µM/mg de protéines chez les escargots traités par la concentration 1500 µg/g (Figure 36).

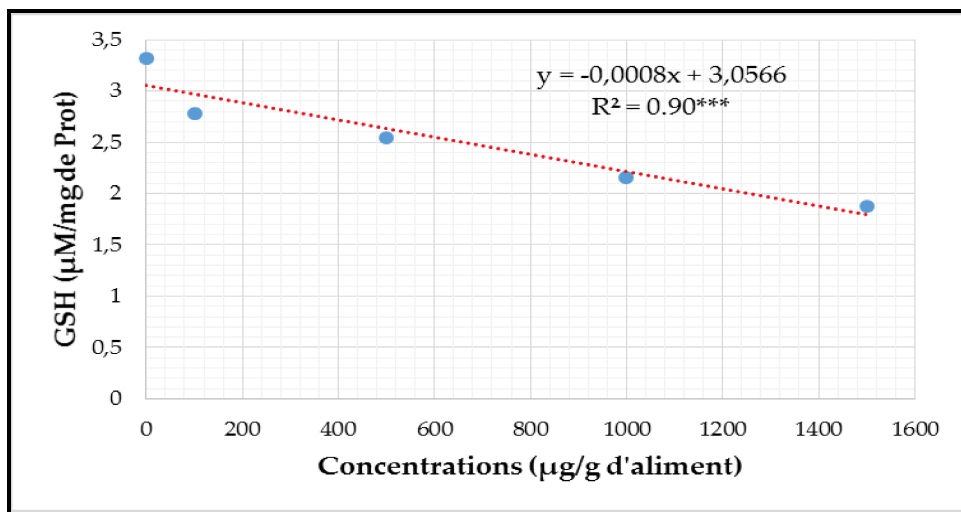


Figure 35 : Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau de l'hépatopancréas.

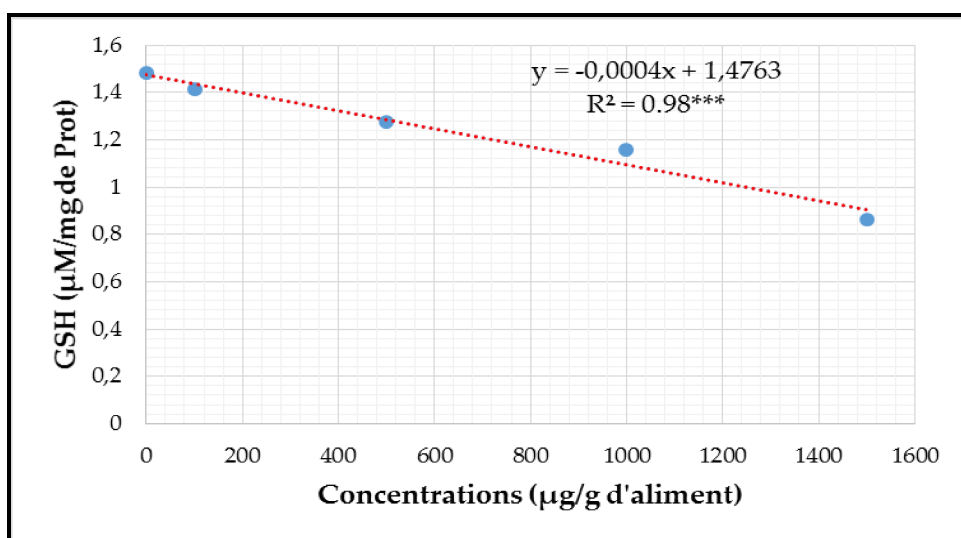


Figure 36 : Variation du taux de GSH en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau du rein.

3.5. Effet de l'oxyde de fer, de l'oxyde d'aluminium et les poussières métalliques sur la variation du MDA

Au niveau de l'hépatopancréas, l'analyse de la régression indique une variation du taux de MDA de 90%. Chez les traités par la concentration 400 µg/g d'oxyde de fer, le taux de MDA augmente six fois plus par rapport aux témoins, avec des valeurs qui passent de 0.08 à 0.47 µM/mg de protéines (Figure 37).

Au niveau du rein, nos résultats indiquent que la variation du taux de MDA chez les escargots exposés à l'oxyde de fer est positivement, très significativement et proportionnelle aux concentrations de xénobiotique avec $r = 0.99^{***}$. Ainsi, le taux de MDA passe de 0.03 à 0.05 µM/mg de protéines, chez les individus traités par la plus forte concentration d'oxyde de fer (400 µg/g) (Figure 38).

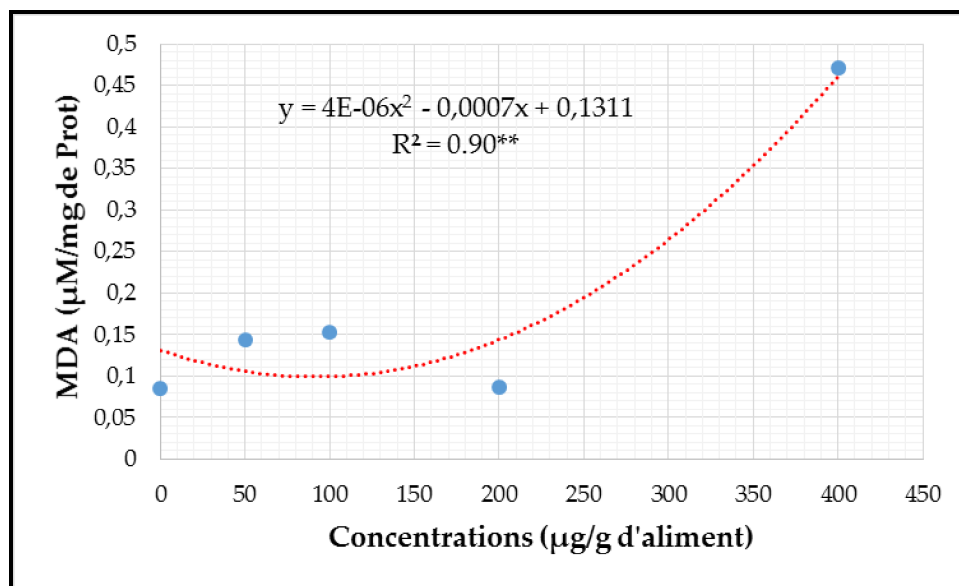


Figure 37 : Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau de l'hépatopancréas.

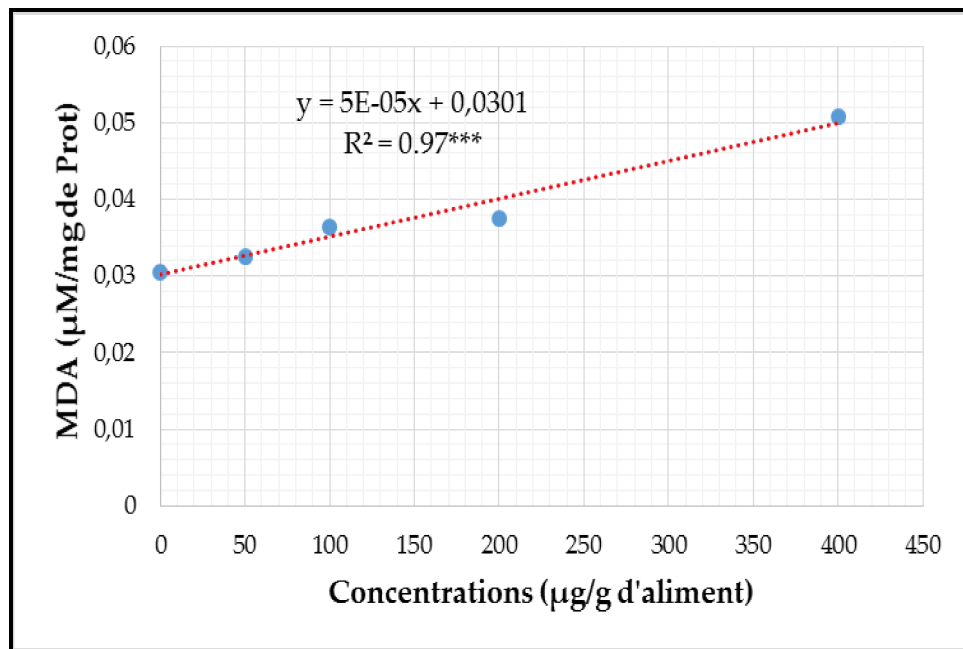


Figure 38 : Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes d'oxyde de fer au niveau du rein.

L'analyse de la régression linéaire au niveau de l'hépatopancréas chez les traités par l'oxyde d'aluminium et les témoins, indique que 75% de la variation du taux MDA est dose dépendante. En effet le taux de MDA augmente de 0.0007 µM/mg de protéines (Figure 39).

La figure (40) illustre une diminution significative du taux de MDA au niveau du rein en présence de l'oxyde d'aluminium avec un coefficient de détermination (R^2) qui explique 66% de cette variation.

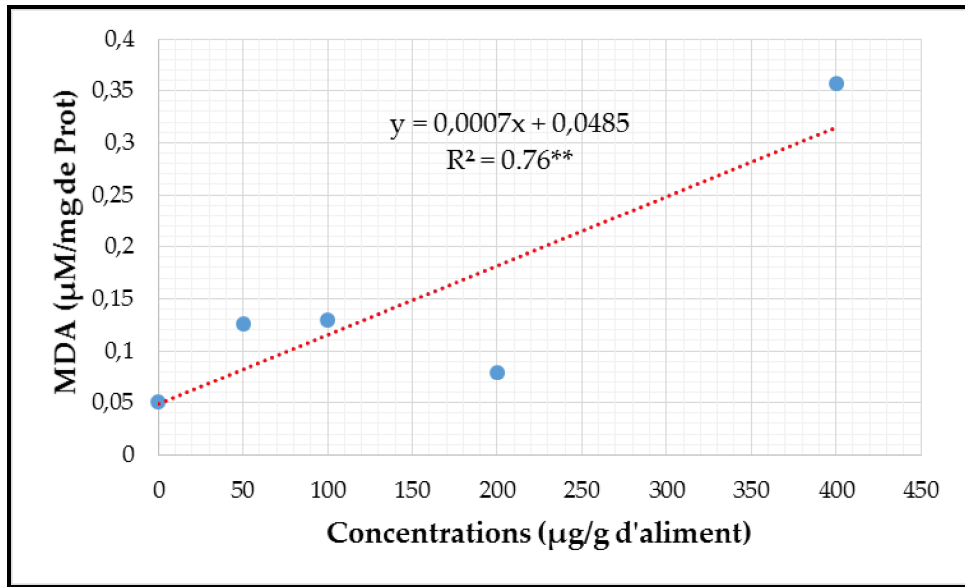


Figure 39 : Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau de l'hépatopancréas.

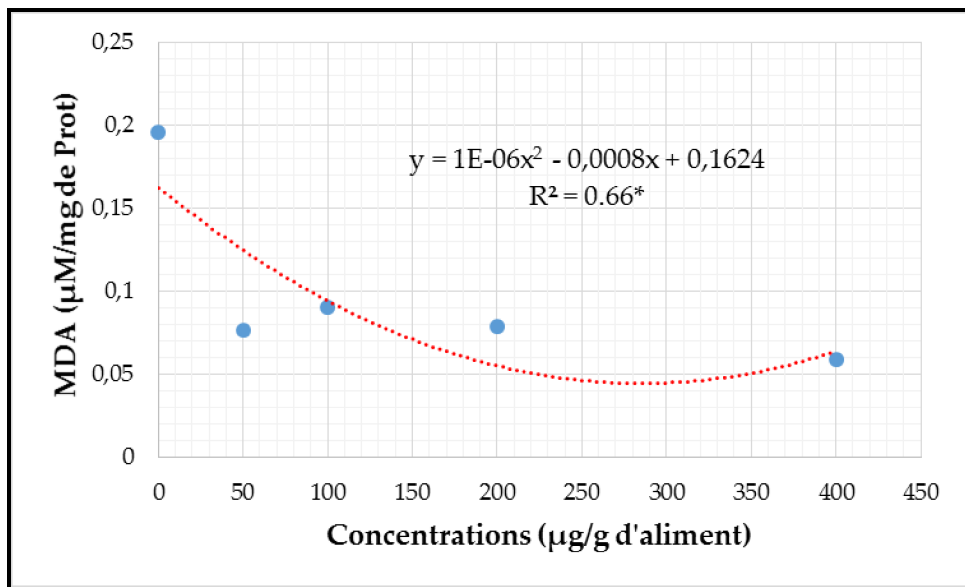


Figure 40 : Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium au niveau du rein.

La régression linéaire met en évidence un effet concentration très hautement significatif ($r = 0.95^{***}$) chez les traités par les poussières métalliques au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*. Les taux de MDA qui passent de 0.053 à 0.077 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines respectivement chez les témoins et les traités par la plus forte concentration de xénobiotique (1500 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Figure 41).

Au niveau du rein, nos résultats indiquent que la variation du taux du MDA chez les escargots exposés aux poussières métalliques est dose-dépendante ($r = 0.86^{**}$). Les taux de MDA oscillent entre 0.11 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins et 0.17 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines chez les traités par la concentration 1500 $\mu\text{g}/\text{g}$ (Figure 42).

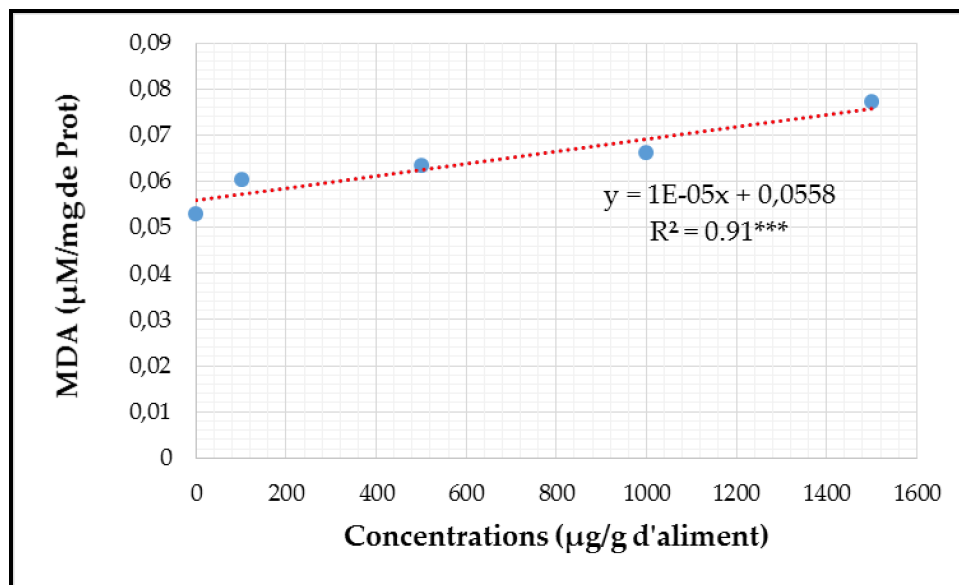


Figure 41 : Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau de l'hépatopancréas.

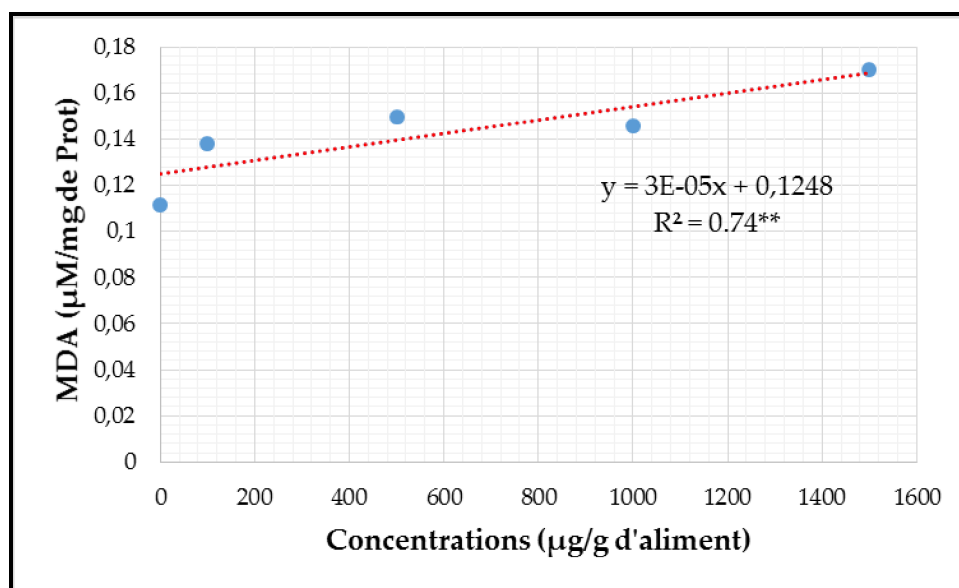


Figure 42 : Variation du taux de MDA en fonction des concentrations croissantes de poussières métalliques au niveau du rein.

4. Bioaccumulation des nanoparticules métalliques de fer et d'aluminium

L'analyse de la variance a mis en évidence un effet concentration hautement significatif pour la bioaccumulation des nanoparticules de fer et d'alumine au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots *Helix aspersa* traités (Tableau 11).

Tableau 11 : Carrés moyens de l'analyse de la variance à un facteur de la bioaccumulation mesurés au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par l'oxyde de fer et l'oxyde d'aluminium.

Source de variation	ddl	Bioaccumulation Fe ₂ O ₃ H	Bioaccumulation Fe ₂ O ₃ R
Concentrations	4	32.08***	28.93***
Erreur	15	0.12	0.22
C.V %		6.05	7.96
Source de variation	ddl	Bioaccumulation Al ₂ O ₃ H	Bioaccumulation Al ₂ O ₃ R
Concentrations	4	62.95 ***	52.61***
Erreur	15	0.11	0.12
C.V %		4.43	4.55

ddl=degré de liberté, C.V= Coefficient de variation, H= Hépatopancréas. R=Rein.

Le test de Fisher's (LSD 5%) indique l'émergence de quatre groupes homogènes concernant la bioaccumulation de l'oxyde de fer au niveau de l'hépatopancréas, la concentration la plus faible est enregistrée chez les individus témoins avec 1.143 µg/g de poids sec, alors que la bioaccumulation la plus élevée est observée chez les individus traités par la concentration 200 µg/g avec une concentration de 8.126 µg/g de poids sec (Tableau 12).

Au niveau du rein, le test de Fisher's révèle également l'émergence de quatre groupes homogènes pour la bioaccumulation des nanoparticules de fer, le premier groupe (a) est représenté par les escargots traités par la concentration 50 µg/g, où le taux de bioaccumulation est maximum avec 8.707 µg/g de poids sec, le deuxième groupe (b) caractérise les escargots exposés à la plus forte concentration (400 µg/g), le troisième groupe (c) englobe les traités par les concentrations 100 et 200 µg/g, alors que le dernière groupe (d) représente les témoins avec un taux de bioaccumulation de 1.544 µg/g de poids sec (Tableau 12).

Concernant le taux de bioaccumulation au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* exposés à des concentrations croissantes d'oxyde d'aluminium, nous distinguons cinq groupes homogènes avec une moyenne générale de 7.612 µg/g de poids sec (Tableau 12).

Trois groupes homogènes sont distincts après utilisation du test de Fisher's (LSD 5%) sur le même paramètre mesuré au niveau des rein, le premier groupe (a) représente les escargots contaminés par les concentrations 50 et 400 µg/g, le deuxième groupe (b) englobe les individus exposés aux concentrations 100 et 200 µg/g, cependant le troisième groupe (c) représente les témoins (Tableau 12).

Tableau 12 : Comparaison des moyennes des paramètres étudiés au niveau de l'hépatopancreas et du rein des escargots traités par l'oxyde de fer et l'oxyde d'aluminium.

Paramètres	Concentrations (µg/g)	Oxyde de fer		Oxyde d'aluminium	
		Glande digestive	Rein	Glande digestive	Rein
Bioaccumulation	0	1.143 (d)	1.544 (d)	1.315 (e)	1.776 (c)
	50	5.222 (c)	8.707 (a)	6.215 (d)	10.612 (a)
	100	7.544 (b)	5.994 (c)	9.354 (c)	7.683 (b)
	200	8.126 (a)	5.994 (c)	11.132 (a)	8.213 (b)
	400	7.074 (b)	7.337 (b)	10.046 (b)	10.669 (a)
Moyenne		5.822	5.915	7.612	7.790
Ppds 5%		0.530	0.710	0.509	0.535

Nos résultats indiquent que la bioaccumulation des NPs de fer au niveau de l'hépatopancreas est positivement et très significativement liée aux concentrations croissantes du Fe₂O₃. Ceci est particulièrement mis en évidence pour les traités par la concentration 200 µg/g, avec $r = 0.96^{**}$ (Figure 43).

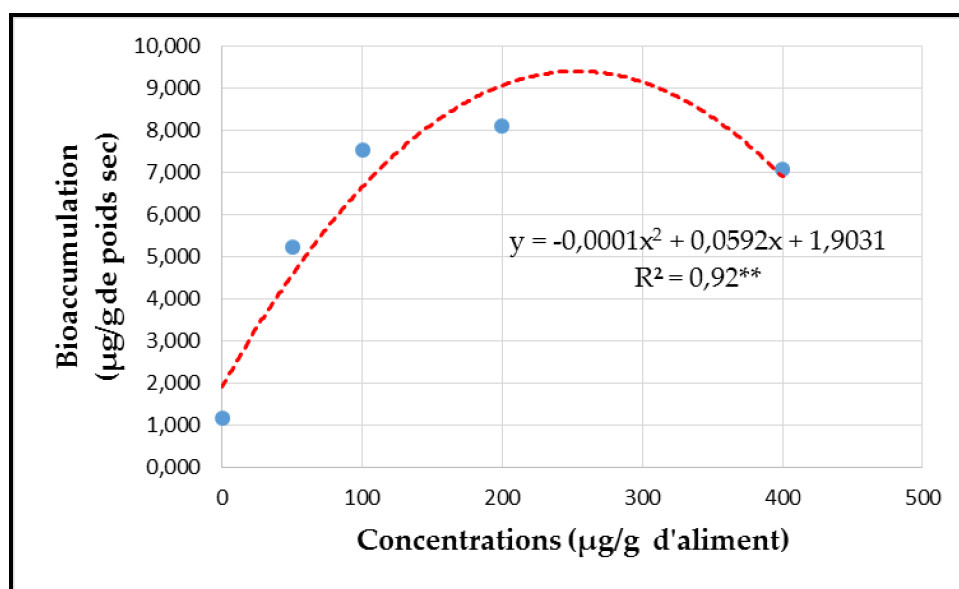


Figure 43 : Bioaccumulation des NPs de fer au niveau de l'hépatopancreas d'*Helix aspersa*.

Au niveau du rein, les concentrations des NPs de fer accumulées, après huit semaines d'exposition, sont illustrées dans la figure (44). Nous avons mis en évidence une augmentation dose-dépendante de la bioaccumulation des particules de Fe₂O₃ et l'analyse de la régression met en évidence la présence d'un effet concentrations significatif des NPs ($r=0.55$). Les concentrations de fer accumulées varient de 1.54 µg/g de poids sec chez les témoins à 8.70 µg/g de poids sec chez les traités par la concentration 50 µg/g.

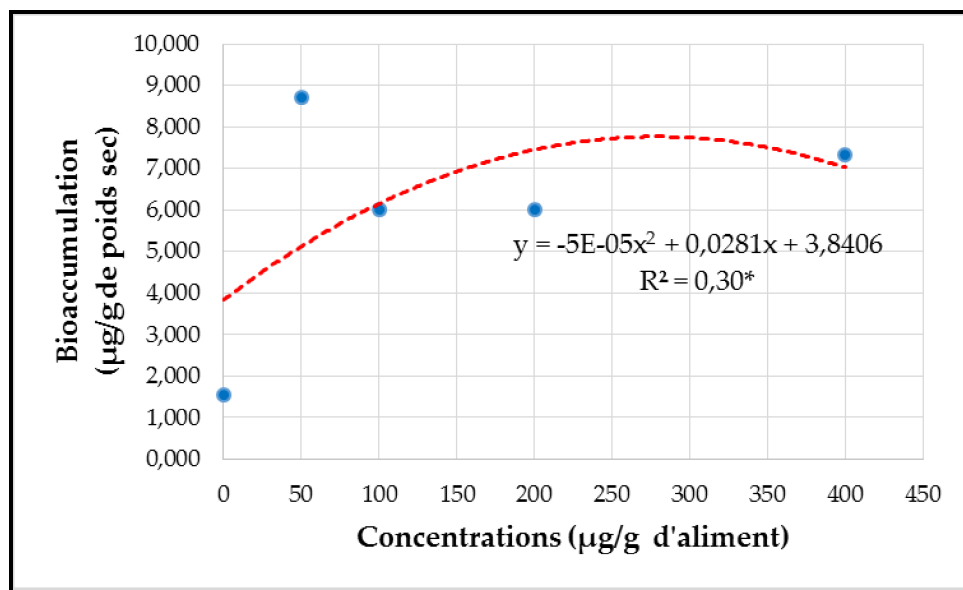


Figure 44 : Bioaccumulation des NPs de fer au niveau du rein d'*Helix aspersa*.

Au niveau l'hépatopancréas, les concentrations de NPs d'alumine accumulées tendent à augmenter d'une manière dose-dépendante et très significative chez les traités comparativement aux témoins ($r = 0.95^{**}$). Dès les traités par la concentration 50 µg/g de NPs d'alumine, la bioaccumulation augmente et atteint environ 11 µg/g de poids sec chez les individus traités par la concentration 200 µg/g, alors que la concentration d'Al₂O₃ chez les témoins n'est que de 1.31 µg/g de poids sec (Figure 45).

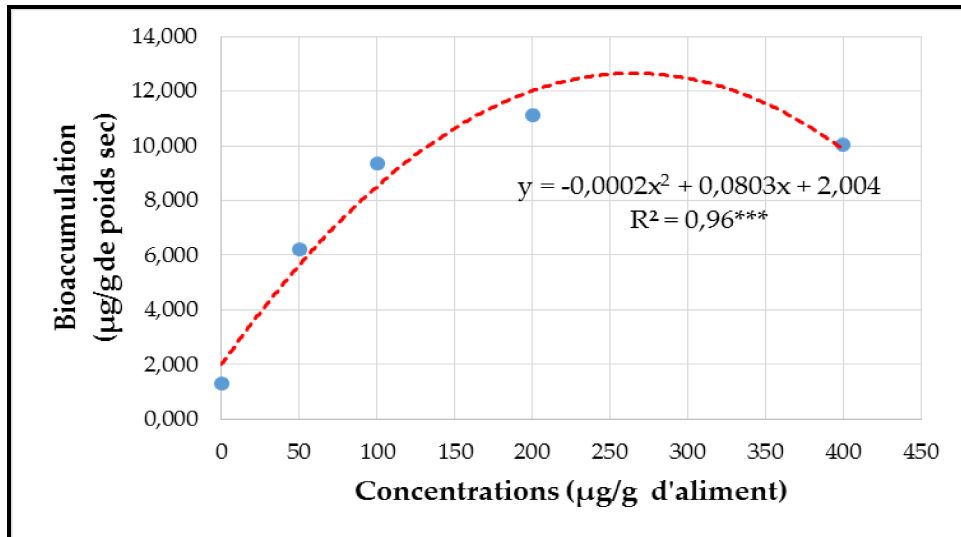


Figure 45 : Bioaccumulation des NPs d'alumine au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

Au niveau du rein, l'analyse de la régression linéaire a mis en évidence une corrélation positive et significative ($r = 0.60^*$) entre la capacité de bioaccumulation des particules d'Al₂O₃ et leur concentration. La teneur en particules d'Al₂O₃ accumulée augmente et atteint des valeurs d'autant plus élevées que la concentration des NPs d'alumine est importante. Ainsi la quantité de particules accumulée passe de 1.77 µg/g de poids sec chez les témoins à 10.67 µg/g de poids sec chez les traités par la plus forte concentration (400 µg/g) (Figure 46).

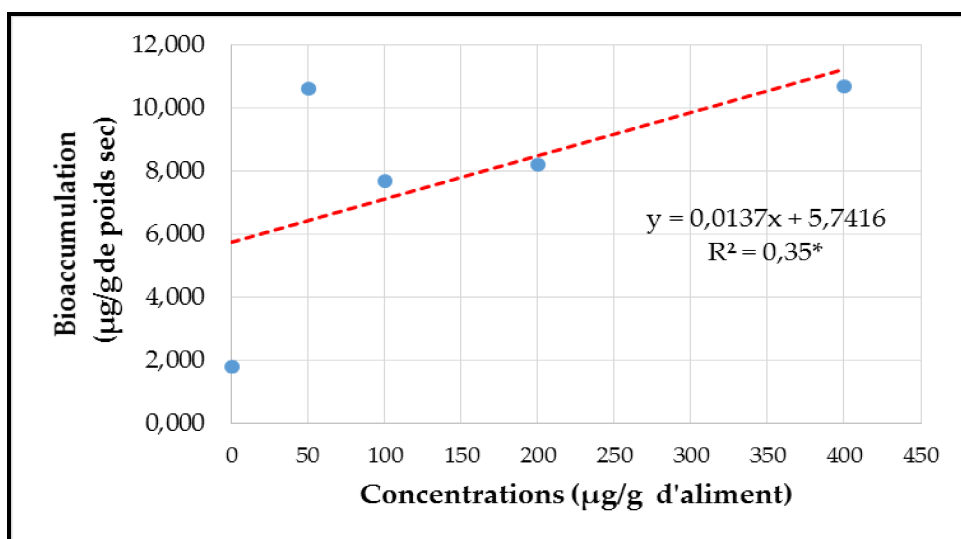


Figure 46 : Bioaccumulation des NPs d'alumine au niveau du rein d'*Helix aspersa*.

5. Etude histopathologique

5.1. Cas des traités par les poussières métalliques

➤ Au niveau de l'hépatopancréas

L'hépatopancréas occupe un volume important de la masse viscérale. Il est formé de deux lobes, chacun étant relié au mésentéron par un canal hépatopancréatique. Les lobes de l'hépatopancréas sont entourés de tissu conjonctif associé à quelques fibres musculaires lisses, l'ensemble constituant une enveloppe. Ils apparaissent formés par la juxtaposition de nombreux tubules, les espaces qui les séparent étant occupés par du tissu conjonctif au sein duquel circule l'hémolymphe. La lumière des tubules hépatopancréatiques est bordée par un épithélium simple associant plusieurs types cellulaires et est en continuité avec celle de canaux de faible diamètre. Les canaux hépatopancréatiques résultent de la convergence de ces petits canaux. L'épithélium renferment trois types de cellules et chaque cellule présente les constituants essentiels (noyau et membrane) : les cellules digestives CD (les plus abondantes), les cellules excrétrices CE, et les cellules à calcium(CC) (Planche 1.B). Cependant chez les lots traités cette structure cellulaire présente des altérations visibles se manifestant par une congestion vasculaire(CV), des acinis présentant une lumière élargie ainsi des structures cellulaires nécrosées particulièrement à la concentration 1000 µg/g (Planche 1.B).

L'observation microscopique des tissus des traités par la concentration 1500 µg/g de poussières métalliques (Planche 1.C) illustre un aspect peu régulier des acinis (destruction) avec une lumière irrégulière contenant des débris cellulaires, ainsi qu'une forte congestion (couleur rouge foncée), une quasi absence des cellules digestives et une diminution de l'épaisseur de l'épithélium confirmant ainsi le phénomène de nécrose.

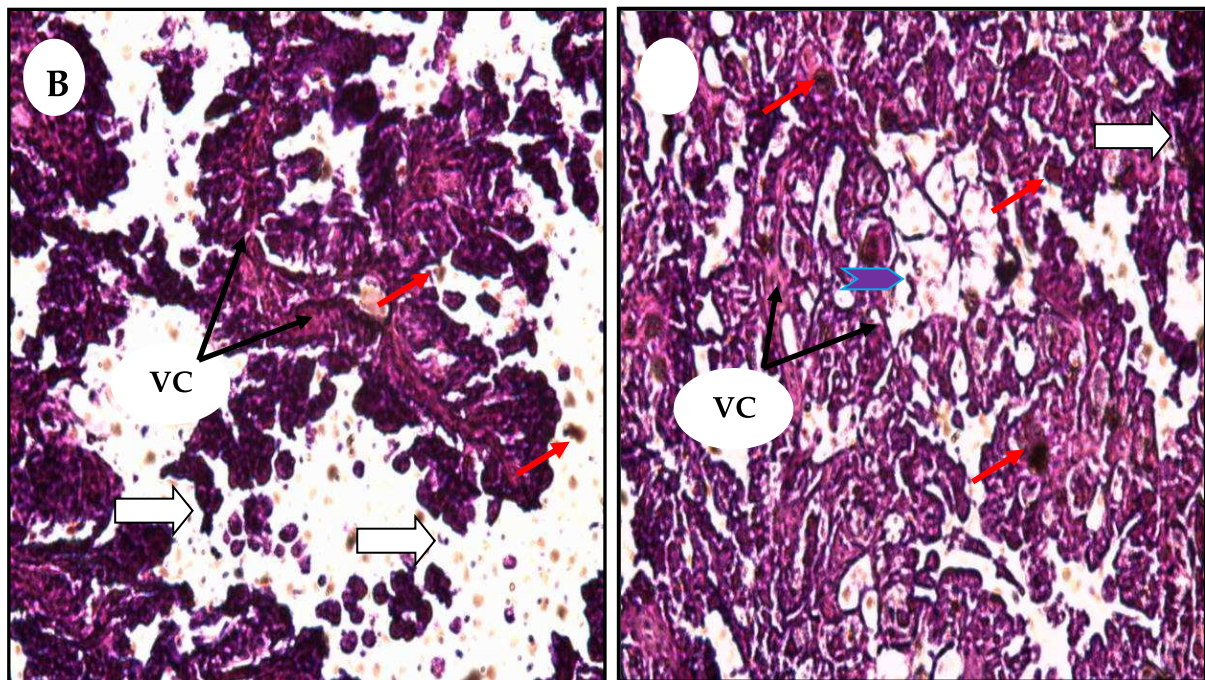
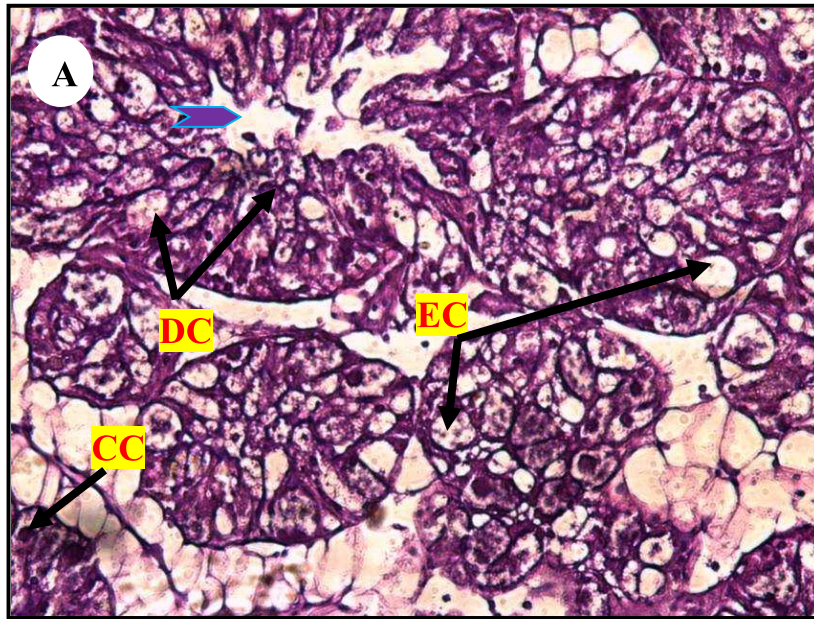


Planche 1 : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 1000 µg/g (B), et 1500 µg/g(C) de poussières métalliques, (X 40).

CB : cellules à bâtonnet, CC : cellules ciliées.

➤ Débris cellulaire, ➤ Nécrose

➤ L : Lumière de l'acini ➤ Hypertrophie cellulaire

➤ **Au niveau du rein**

Le rein est situé en position dorsale et postérieure, à la surface de la masse viscérale. Il est en relation d'une part avec la cavité péricardique par un orifice réno-péricardique réduit, et d'autre part avec un uretère qui prend en charge l'urine produite. La paroi rénale forme des replis nombreux et étendus, soutenus par des axes conjonctifs au sein desquels des lacunes hémolympatiques sont présentes. Ces replis sont tapissés d'un épithélium simple, prismatique, formé de cellules semblables les unes aux autres, les néphrocytes (Heusser et Dupuy, 2011). L'épithélium rénal est uniformément composé de néphrocytes. Il s'agit de cellules hautes, qui présentent une polarité nette : elles possèdent un noyau basal associé à un cytoplasme chromophile, alors que leur région apicale est occupée par une volumineuse vacuole contenant une concrétion d'acide urique. Au contact de la lumière rénale, la membrane porte une bordure en brosse peu épaisse (Heusser et Dupuy, 2011).

L'épithélium renferme un seul type de cellules excrétrices présentant un noyau et une membrane granulaire, ces cellules excrétrices sont subdivisées en cellules à bâtonnet et ciliées (Planche 2.A).

Les manifestations histologiques induites par la présence des particules métalliques (Planche 2.B) se traduisent par une hypertrophie des épithéliums, une nécrose avec une lumière irrégulière encombrée par des débris cellulaires. Parallèlement l'examen histologique des traités par la concentration 1500 µg/g (Planche 2.C) met en évidence une absence des membranes des cellules excrétrices et la prolifération du tissu conjonctif ainsi qu'une hypertrophie des cellules à calcium.

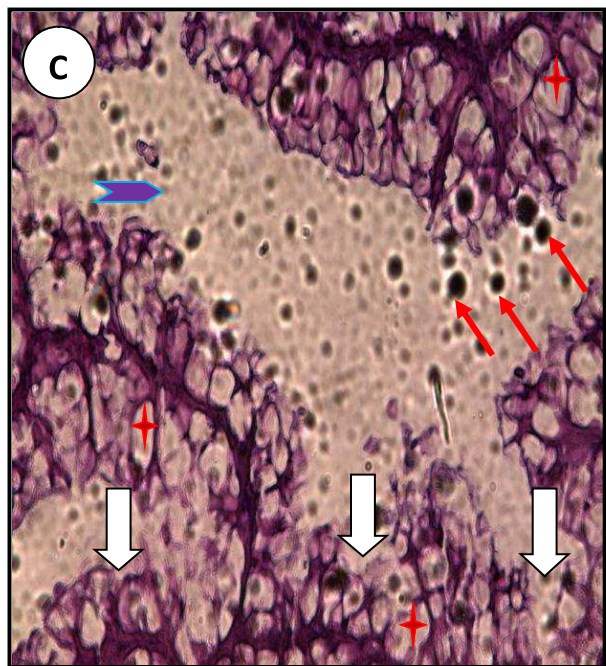
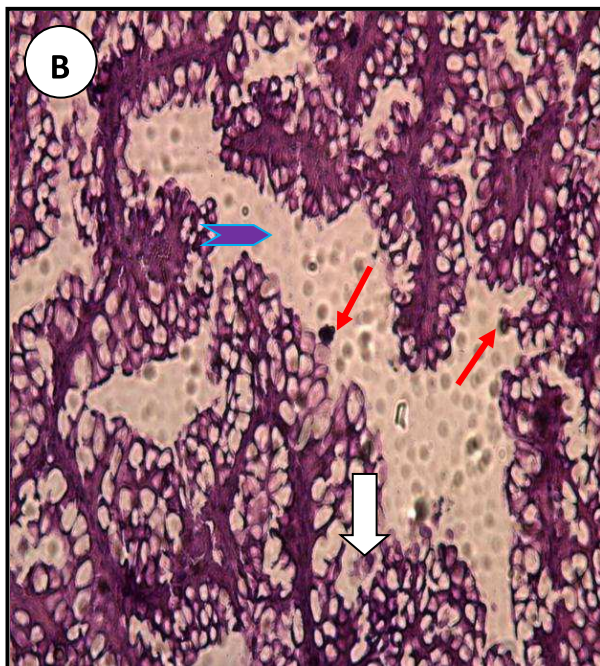
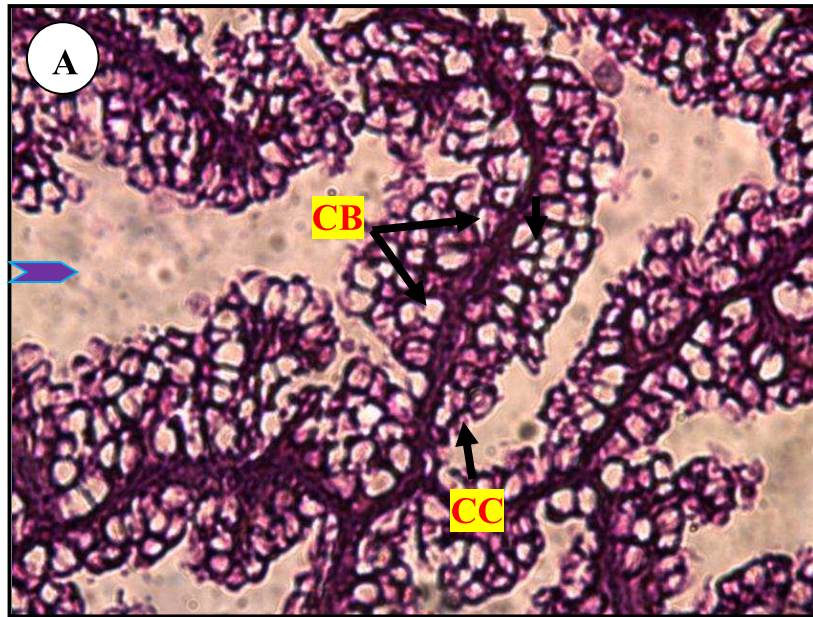


Planche 2 : Coupes histologiques au niveau du rein des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 1000 µg /g (B), et 1500 µg/g(C) de poussières métalliques, (X 40).

CB : cellules à bâtonnet, CC : cellules ciliées.

➔ Débris cellulaire, ⇨ Nécrose

➡ L : Lumière de l'acini ✦ Hypertrophie cellulaire

5.2. Cas des traités par les NPs de Fe₂O₃

L'hépatopancréas normal des escargots *Helix aspersa* est constitué d'un épithélium digestif constitué des lobules formant un ensemble d'acini maintenus cohérents par un tissu conjonctif

La paroi des tubules hépatopancréatiques est constituée d'un épithélium simple et haut, les cellules qui le composent présentent des morphologies diverses mais relèvent de trois catégories principales : des cellules sécrétrices, produisant des enzymes digestives déversées dans la lumière des tubules et responsables de la digestion extra-cellulaire des substances nutritives, des cellules absorbantes, réalisant la phagocytose des particules alimentaires de la lumière des tubules et responsables de la digestion intracellulaire, des cellules indifférenciées, basales, permettant le renouvellement des autres types cellulaires (Heusser et Dupuy, 2011).

L'observation des coupes réalisées au niveau de l'hépatopancréas des escargots traités par l'oxyde de fer mettent en évidence la présence de particules sphériques jaunâtres dans les lumières des tubules hépatopancréatiques composées probablement d'amas de nanoparticules, nous avons également noté la présence d'infiltrats inflammatoires, ainsi qu'un phénomène de nécrose et une désorganisation cellulaire particulièrement pour les plus fortes concentrations 200 et 400 µg/g (Planche 3 A,B).

Au niveau du rein, l'examen histologique a mis en évidence la présence des particules sphériques et une hypertrophie cellulaire chez les traités par la concentration 50 µg/g d'oxyde de fer. A la concentration 200 µg/g nous avons remarqué une hypertrophie des néphrocytes (Planche 4 A, B).

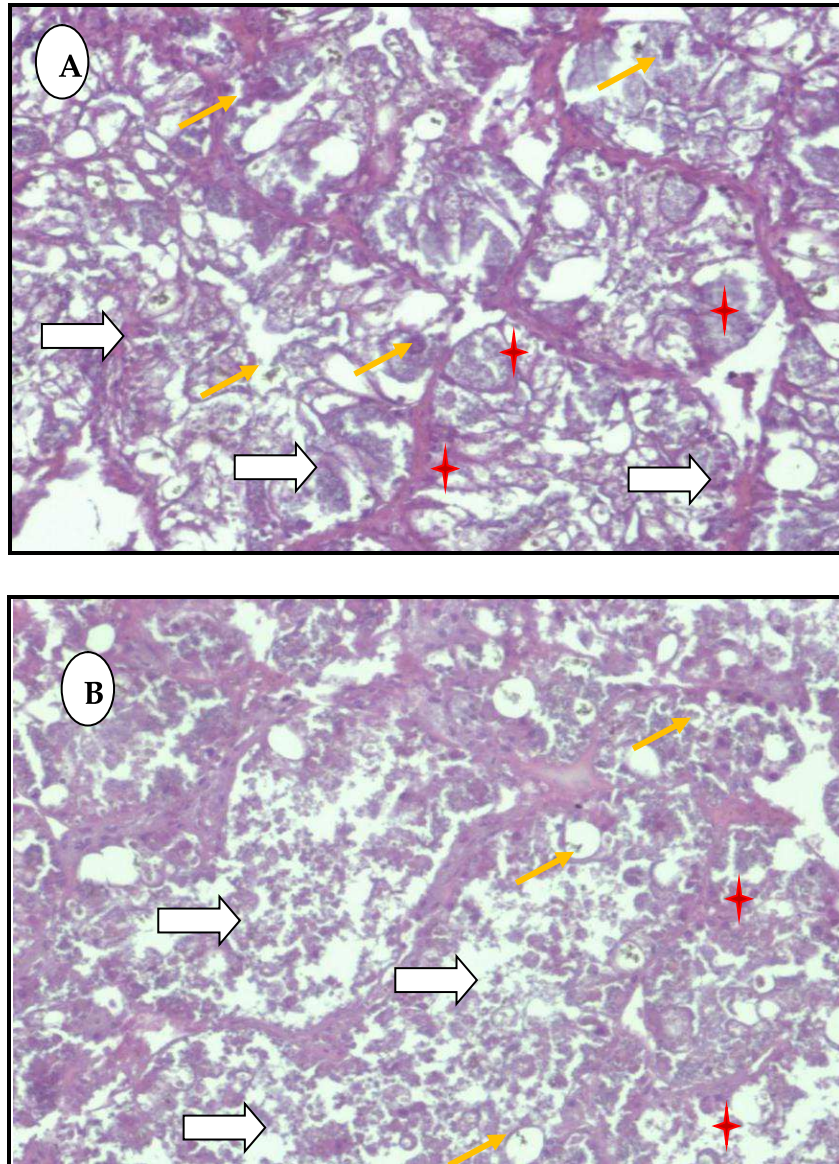


Planche 3 : Coupes histologiques de l'hépatopancreas des escargots traités par les concentrations 200 µg/g (A), et 400 µg/g(B) de Fe₂O₃, (X 40).

- Particules sphériques, ➡ Nécrose
➡ L : Lumière de l'acini ✦ Hypertrophie cellulaire

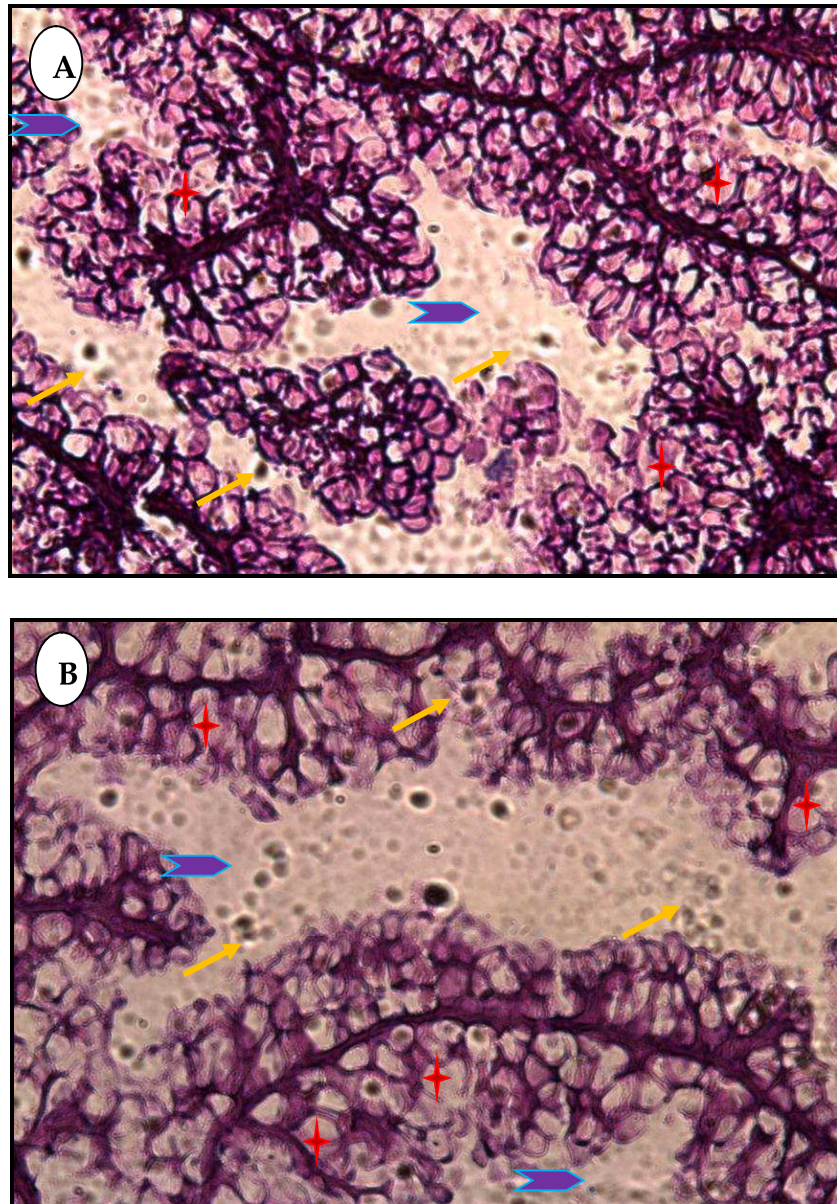


Planche 4 : Coupes histologiques du rein des escargots traités par les concentrations 200 µg/g (A), et 400 µg/g(B) de Fe₂O₃, (X 40).

- ↗ Particules sphériques, ✦ Hypertrophie cellulaire
➡ Lumière de l'acini

5.3. Cas des traités par les NPs d'Al₂O₃

Le traitement de l'escargot *Helix aspersa* par l'oxyde d'aluminium laisse apparaître des altérations histologiques au niveau de l'hépatopancréas chez les traités par les plus fortes concentrations, se traduisant par une destruction des lumières des tubules hépatopancréatiques, ainsi que la présence de particules de différentes tailles et des nécroses (Planche 5 A, B).

La Planche 6 (A et B) illustre l'aspect histopathologique du rein d'*Helix aspersa* après huit semaines d'exposition à l'oxyde l'aluminium. Nous avons mis en évidence de particules sphériques sous forme d'amas au niveau du cytosol, ainsi qu'une hypertrophie cellulaire.

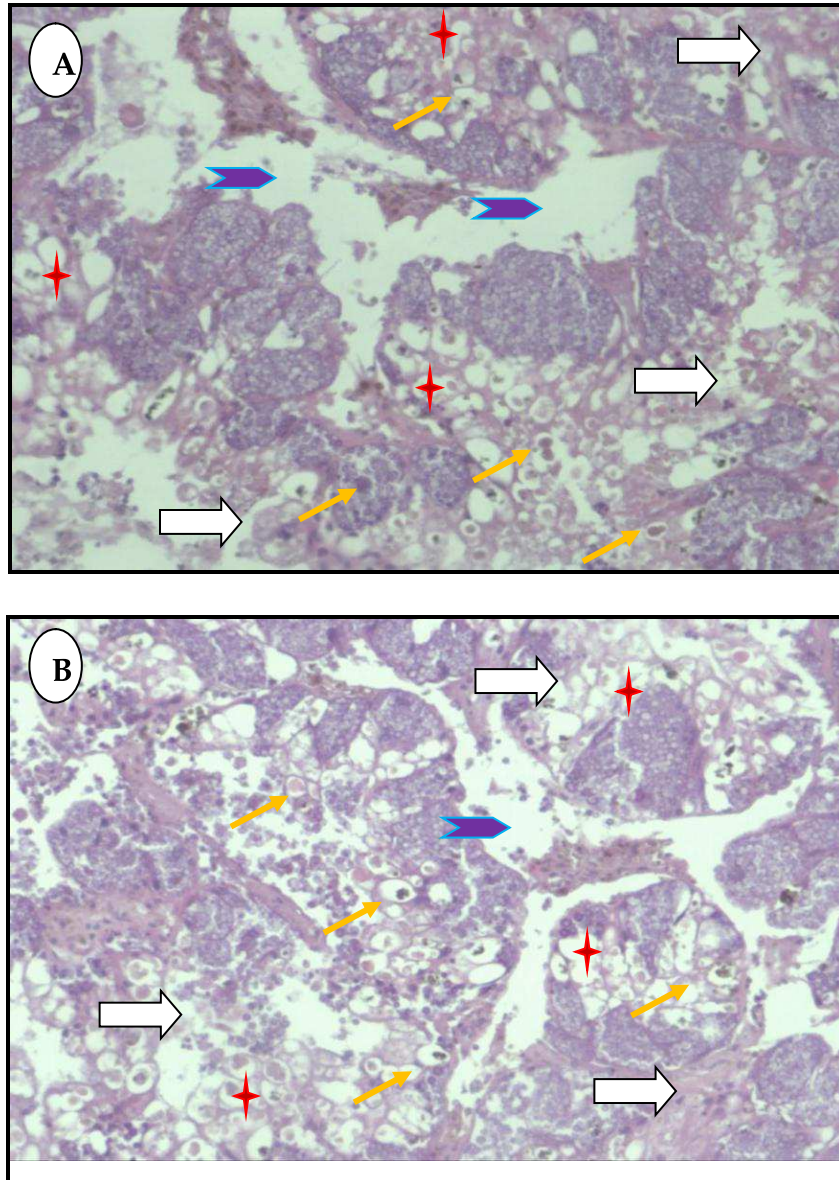


Planche 5 : Coupes histologiques de l'hépatopancreas des escargots traités par les concentrations 200 µg/g (A), et 400 µg/g(B) de Al₂O₃, (X 40).

- ↗ Particules sphériques, ⇨ Nécrose
⇨ L : Lumière de l'acini ★ Hypertrophie cellulaire

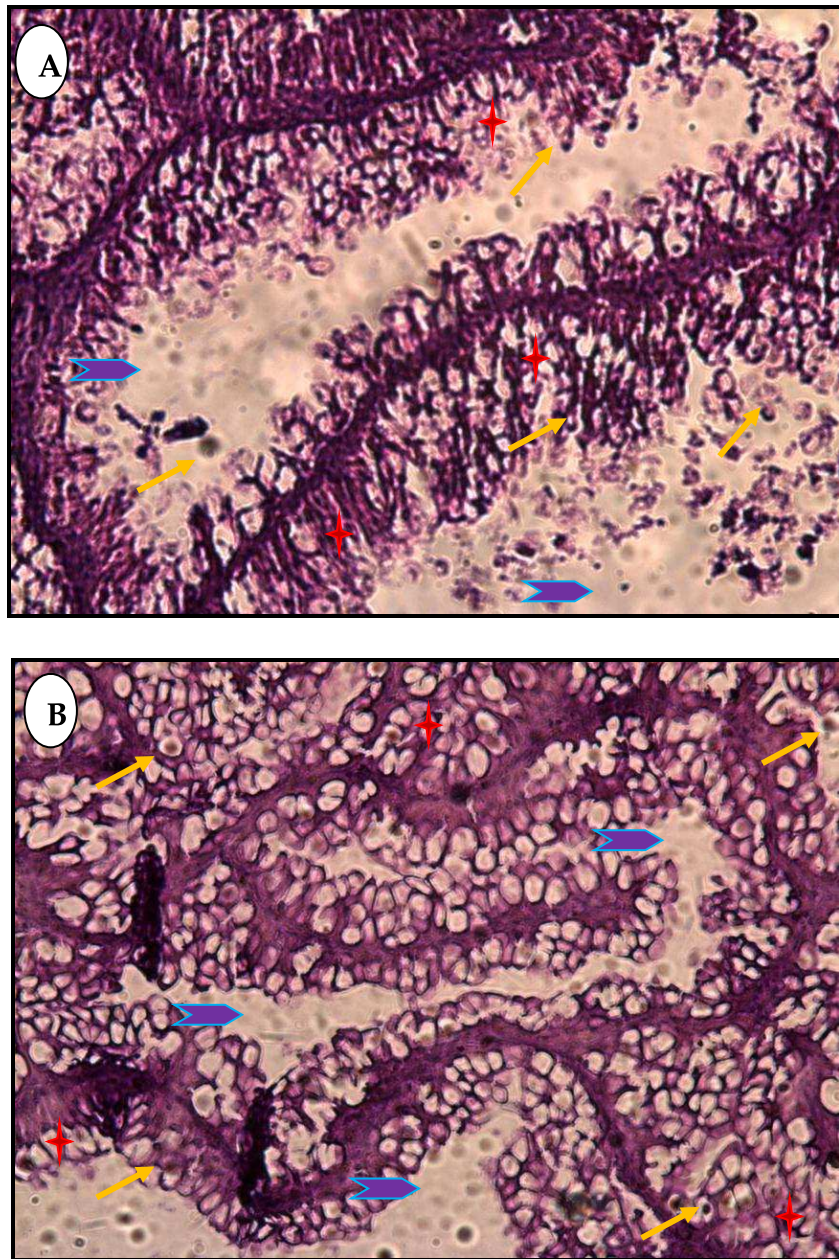


Planche 6 : Coupes histologiques du rein des escargots traités par les concentrations 200 µg/g (A), et 400 µg/g(B) de Al₂O₃, (X 40).

- Particules sphériques, ✦ Hypertrophie cellulaire
➤ Lumière de l'acini

Discussion Générale

Afin d'évaluer l'impact toxicologique des polluants sur les organismes terrestres, l'utilisation des marqueurs biologiques ou biomarqueurs est indispensable. Ces biomarqueurs sont largement utilisés et peuvent constituer un importante outil de diagnostic pour évaluer le degré d'exposition et les effets des xénobiotiques (Forbes *et al.*, 1997; McLoughlin *et al.*, 2000). L'utilisation de batteries de biomarqueurs permettrait vraisemblablement une évaluation réaliste et fiable des effets toxicologiques des contaminants sur les individus et les populations (Lagadic *et al.*, 1997).

Dans notre étude une approche multiparamétrique a été mise en place en utilisant les paramètres biochimiques et enzymatiques pour l'évaluation diagnostique et prédictive des effets de la contamination sur une population d'escargot *Helix aspersa*.

Plusieurs études suggèrent que certains aspects de la toxicité des ETM, en particulier les effets chroniques et sublétaux, dépendent plus de la vitesse à laquelle un ETM entre dans l'organisme que des concentrations internes (Rainbow, 2002; Van Straalen *et al.*, 2005). L'exposition et l'ingestion des ETM provoquent des effets et des perturbation de certains systèmes enzymatiques et également des activités métaboliques et physiologiques chez l'homme et l'animal (Iscan *et al.*, 1994).

Dans notre travail, nous avons pu mettre en évidence une atteinte du métabolisme des escargots à travers la perturbation du taux de protéines totales, avec un effet concentration significatif au niveau de l'hépatopancréas et du rein chez les animaux exposés aux poussières métalliques. Nos résultats corroborent ceux de Grara *et al.*, (2012c), Radwan et Mohamed, (2013) et Bouaricha (2013) qui ont montré une augmentation du taux des protéines totales chez l'escargot *Helix aspersa* traités par divers xénobiotiques dont les poussières métalliques et des pesticides (l'imidaclopride et l'emamectine benzoate entre autres). Cette augmentation pourrait

être expliquée en partie par l'induction des métallothionéines (MTs). Celles-ci constituent une superfamille de faible poids moléculaire, riches en cystéine et responsables à la fois de la protection des cellules contre les ETM toxiques tels le Cd ou le mercure (Dallinger *et al.*, 2004) et de la régulation homéostatique des ETM essentiels comme le Zn ou le Cu (Dallinger, 1993).

Ainsi, chez les mollusques, la capacité à résister aux fortes concentrations des ETM est liée principalement à la liaison de ces derniers avec les MTs (Simkiss et Mason, 1983), dont on distingue trois isoformes chez les escargots (Dallinger *et al.*, 1997; Hispard *et al.*, 2008; Baurand *et al.*, 2015).

D'un autre côté l'augmentation du pool protéique suggère une induction des gènes HSps, en effet il est maintenant admis que chez quelques invertébrés, y compris les mollusques, divers facteurs, tels que le choc thermique ou l'exposition aux ETM, activent les gènes HSp70 chez *Mytilus galloprovincialis* (Franzellitti et Fabbri, 2005), (Kourtidis *et al.*, 2006), et également chez l'escargot *Achatina fulica* (Martynova *et al.*, 2007). En revanche, Desouky, (2012) ne note aucune variation du taux de protéines totales chez deux mollusques *Lymnaea stagnalis* et *Dreissena polymorpha* exposés à l'aluminium et au cadmium. Contrairement à El Gohary et Genena, (2011) et Al-Fahmie, (2012) qui ont mis en évidence une diminution du taux de protéines totales lors de l'exposition des escargots terrestres à certains polluants y compris les ETM et les molluscicides. Dans le même contexte, El-Shenawy *et al.*, (2012) mentionnent un faible taux de protéines totales au niveau de la glande digestive des escargots *Eobania vermiculata* collectés au niveau des sites pollués par les ETM.

Concerant l'étude de la variation des glucides, nos résultats indiquent une forte corrélation entre le taux des glucides au niveau des deux organes ciblés chez *Helix aspersa* après traitement par les concentrations croissantes en poussières métalliques. L'augmentation du taux des glucides est observée chez *Helix aspersa* exposé aux poussières métalliques pendant quatre semaines (Grara *et al.*, 2012c), il en

est de même pour l'escargot *Biomphalaria alexandrina* exposé à l'atrazine (Barky *et al.*, 2012). Tandis que Radwan *et al.*, (2008) a révélé que le traitement de l'escargot *Eobania vermiculata* par le méthomyl et le méthiocarbe induit une diminution significative des taux des glucides. D'un autre côté et toujours dans le même ordre d'idée, El-Wakil et Radwan (1991) suggèrent que l'épuisement du taux de glycogène dans les tissus de l'escargot d'eau douce *Bellamya dissimilis*, exposés à des pesticides (l'endosulfane, parathion, quinalphos et nuvan méthyliques) est dû à l'utilisation directe du glycogène pour la régénération de l'énergie, ou à une hypoxie induite par les pesticides. Les glucides sont les sources d'énergie primaires et immédiates, dans des conditions de stress, les réserves de glucides sont épuisées pour satisfaire des demandes énergétiques accrues (Arasta *et al.*, 1996). Cette diminution est due à l'oxydation des glucides en présence des ions métalliques conduisant à la libération d'aldéhydes et du peroxyde d'hydrogène (Nzengue, 2008). D'après Carefoot *et al.*, (1993), le taux du glucose diminue lorsque l'on soumet l'escargot *Abalone* à un stress chimique.

Par ailleurs, Canesi *et al.*, (1998), a mis en évidence une augmentation du taux de glucides au niveau de la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* en raison de l'inhibition de l'hexokinase .

Les lipides sont également une source principale d'énergie métabolique et l'un des composants essentiels des cellules, et des membranes (Eghtesadi-Aragh et Bastami, 2011). Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation du taux de lipides au niveau de l'hépatopancréas contrairement aux essais menés sur du rein qui ont mis en évidence de faibles variations du taux de lipides.

Selon El-Shenawy *et al.*, (2012), les lipides augmentent de façon significative au niveau de la glande digestive de l'escargot *Eobania vermiculata* collectés à partir de zones polluées. Le taux de lipides peut être également affecté par le mode de nutrition de l'escargot qui est herbivore dans les écosystèmes terrestre (Beeby, 1985).

Ceci pourrait expliquer en partie l'augmentation du taux de lipides mise en évidence dans notre travail. Par ailleurs, Boshoff *et al.*, (2015) indiquent que les taux de lipides ne sont pas corrélés avec les concentrations d'ETM au niveau de la glande digestive de l'escargot *Cepaea nemoralis*. En revanche, les travaux de Grara *et al.*, (2012c), ont mis en évidence une baisse significative du taux des lipides au niveau des deux organes étudiés. Ceci peut être dû à l'attaque radicalaire des membranes qui a pour conséquence des perturbations de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (Lawton et Donaldson, 1991). De plus, Halliwell et Chirico (1993) stipulent que les effets spécifiques d'une attaque radicalaire se manifestent à l'échelle cellulaire par une peroxydation lipidique induisant des perturbations prononcées du fonctionnement cellulaire.

Tous les composants peuvent être touchés : lipides, protéines et donc la membrane dans son ensemble (Radi *et al.*,1991; Halliwell et Chirico, 1993), jusqu'à l'ADN et provoquant ainsi des pathologies diverses (Curtin *et al.*, 2002; Gutteridge, 1992). Selon Aourousseau (2002), les radicaux libres oxygénés sont à l'origine d'une dégradation des lipides, à travers la β oxydation. De plus, les ETM comme le cuivre et le fer ont été largement utilisés comme des agents initiateurs de l'oxydation des lipides (Nzengue, 2008). Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Padjama et Rao (1994) qui ont mis en évidence une diminution des taux des lipides chez l'escargot d'eau douce *Bellamya dissimilis* exposé aux pesticides.

La libération de ROS au niveau cellulaire provoque un stress oxydant et une perturbation de l'efficacité du système antioxydant (Valko *et al.*, 2005; Prevodnik *et al.*, 2007), elle est connue comme le mécanisme général le plus important de la toxicité de nombreux xénobiotiques (Regoli *et al.*, 2006; Ozden *et al.*, 2013). Selon Manzl *et al.*, (2004), au niveau des cellules de l'hépatopancréas d'*Helix pomatia* le taux de ROS augmente après exposition des animaux à des concentrations élevées de Cu (100 μ M). Cependant, le déclenchement du stress oxydatif est corrélé à une induction de l'activité des enzymes antioxydantes chez les animaux (Halliwell et Gutteridge,

1985). En effet, ces enzymes permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal. Il en est ainsi de la superoxyde dismutase (SOD) qui joue un rôle très important dans protection de l'organisme contre les dommages du stress oxydant (Livingstone, 2001; Suntres, 2002). Elle a la particularité de ne pas pouvoir traverser les membranes biologiques, et elle remplit ses fonctions de détoxification au sein même du compartiment cellulaire où les ROS sont formées (Staniek et Nohl, 2000). Les SOD catalysent la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Elle est liée de manière fonctionnelle avec l'activité catalase (les deux enzymes fonctionnent de façon séquentielle) (Asagba *et al.*, 2008), la relation entre les CAT et l'activation de la SOD a également été constaté chez les vers de terre *Eisenia foetida* exposés à l'éthylbenzène (Liu *et al.*, 2010). La catalase et la GPx appartiennent au mécanisme de défense primaire contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) en catalysant la conversion du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en H₂O (Franco *et al.*, 1999; Hirrlinger *et al.*, 2002), après leur libération qui est induite par la présence de composés exogènes à l'organisme comme c'est notamment le cas des ETM (Van der Oost *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004) et des NPs (Ali *et al.*, 2012).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation très significative de l'activité catalase au niveau de l'hépatopancrès et du rein chez l'escargots *Helix aspersa* traité par les concentrations croissantes de l'oxyde de fer, de l'oxyde d'aluminium et de poussières métalliques, cette activité varie non seulement selon le type de traitement mais aussi en fonction de l'organe testé. Nos résultats montrent une induction importante de l'activité catalase chez les individus traités par Fe₂O₃ comparativement à ceux traités par Al₂O₃. Par ailleurs, l'activité enzymatique est plus élevée au niveau du rein par rapport à l'hépatopancrès pour les deux traitements Fe₂O₃ et Al₂O₃. Boukhessaim, (2013) a également mis en évidence une augmentation significative de l'induction de l'activité CAT au niveau de

l'hépatopancréas chez *Helix aspersa* traité par les concentrations 200 et 300 µg/g d'aluminium.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Grara *et al.*, (2009) et Belhaouchet *et al.*, (2012), qui ont révélé une induction de l'activité catalase chez *Helix aspersa* traités par des ETM pendant 14 et 28 jours, cette induction est également observée chez l'escargot *Cantareus apertus* exposé aux carbamates pendant une période de trois, sept et 14 jours (Leomanni *et al.*, 2015).

D'autres part, l'exposition de rongeurs à des particules d'aluminium a mis en évidence non seulement des perturbations au niveau du métabolisme mais également une diminution de l'activité de la glutathion-péroxydase (Jia *et al.*, 2001a) et une augmentation de l'activité catalase (Flora *et al.*, 2003) comme le montrent également Ali *et al.*, (2012), chez des mollusques d'eau douce *Lymnaea luteola* après leur exposition aux particules de ZnO. De plus, Fahmy *et al.*, (2014) mentionnent une induction de l'activité catalase au niveau des tissus d'escargot *Biomphalaria alexandrina* après trois semaines d'exposition aux NPs de zinc.

Buffet *et al.*, (2011, 2014) notent une augmentation de l'activité CAT au niveau de la glande digestive chez le mollusque bivalve *Scrobicularia plana* exposé dans des mesocosmes aux NPs d'argent et de CuO pendant 14 et 21 jours.

Il en est de même concernant les travaux de Cid *et al.*, (2015) qui signalent que l'activité catalase tend à augmenter significativement chez les bivalves d'eau douce *Corbicula fluminea* exposés à des concentrations croissantes des NPs de diamant pendant 14 jours. Selon Ali *et al.*, (2014, 2015) l'activité catalase augmente chez *Lymnaea luteola* traités par les plus fortes concentrations de TiO₂ NPs. Cette activité est plus importante au niveau de la glande digestive de la moule bleue *Mytilus edulis* exposée aux nanoparticules de dioxyde de titane (Tedesco *et al.*, 2008 ; Farkas *et al.*, 2015). Gomes *et al.*, (2014) notent également que chez les moules *Mytilus galloprovincialis* traitées par les NPs d'argent (Ag NPs) pendant 15 jours, la SOD et

CAT augmentent significativement au niveau de la glande digestive et les branchies. Une augmentation de l'activité de catalase a été signalée chez les vers de terre *Eisenia foetida*, exposées à 1g/kg de TiO₂ pendant une période de sept jours (Hu *et al.*, 2010).

Canesi *et al.*, (2014) notent qu'il n'y a aucun changement de l'induction des activités spécifiques des enzymes antioxydantes catalase chez le bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposé aux NPs de TiO₂.

Selon Chandran *et al.*, (2005) l'activité catalase au niveau de l'hépatopancréas et le rein chez l'escargot *Achatina fulica* est inhibée en présence de cadmium et de zinc. Au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* également, l'inhibition de l'activité catalase est de l'ordre de 76 % en présence d'ions métalliques (Ramos-Vasconcelos *et al.*, 2005), une diminution de 73.53 % de l'activité catalase a été enregistrée au niveau de l'hépatopancréas et de 90.73 % au niveau du rein chez la même espèce traitée par la poussière métallique pendant sept jours (Grara *et al.*, 2012a). Sarkar et Sil, (2014) mentionnent également que l'augmentation des ROS est accompagnée d'une diminution de la CAT au niveau des hépatocytes isolées des souris exposées au Fe₂O₃. L'effet de l'exposition aux nanoparticules d'argent sur des vers de terre, *Eisenia foetida* se traduit également par une diminution de l'activité catalase (Tsyusko *et al.*, 2012 ; Gomes *et al.*, 2015). Une diminution de l'ordre de 35% de l'activité catalase a été enregistré après quatre jours de traitement par les doses 10 et 100 µg/l de CeO₂ chez les deux mollusque d'eau douce, *Dreissena polymorpha* et *Gammarus roeseli* (Garaud *et al.*, 2015). Ali *et al.*, (2014) ont également observé une diminution de la catalase chez l'escargot d'eau douce *Lymnea Luteola* exposé aux NPs d'argent, une altération de l'activité CAT a été observé chez les huîtres *Crassostrea virginica* contaminés avec des concentrations croissantes de 0.02 à 20 µg/l de NPs d'argent (McCarthy *et al.*, 2013).

Fahmy *et al.*, (2014) mentionnent une inhibition de l'activité CAT et SOD au niveau de l'hémolymphe chez l'escargot *Biomphalaria alexandrina* traité par les concentrations 7 et 35 µg/ml de ZnO.

L'activité CAT chez les invertébrés varie selon les espèces, le mode d'exposition, et même au sein d'un même organisme (Regoli *et al.*, 2006). L'intensité des effets toxiques exercée par des xénobiotiques est liée à la concentration de l'agent polluant dans le tissu ou l'organe cible. La durée au cours de laquelle ces effets se manifestent dépend de la période pendant laquelle l'espèce toxique est en contact avec ce tissu ou cet organe.

Par ailleurs, de nombreuses études montrent que l'exposition d'un individu à deux substances ayant le même potentiel toxique et à des concentrations identiques ne se traduit pas nécessairement par les mêmes réponses de chacune d'elles au niveau de la cible cellulaire (Rozman et Klaassen, 1996). Ce phénomène est souvent dû au métabolisme respectif des deux substances qui peut être différent. Ainsi, c'est le métabolisme qui détermine le devenir d'une substance dans l'organisme, parce qu'il est le résultat des processus d'absorption, de distribution et d'élimination (biotransformation et excrétion) qui gouvernent son cheminement dans les divers compartiments de l'individu (Bend et Sinal, 1998; Brodeur et Tardif, 1998).

Les réactions de la phase II ont pour but de fixer à des molécules hydrosolubles les substances xénobiotiques modifiées lors de la phase I afin de les excréter ou de les stocker. Le poids moléculaire et le caractère hydrophile des molécules conjuguées vont être augmentés ce qui limite leurs possibilités de diffusion. Les glutathion-S-transférases (GST) font partie des enzymes du cytosol, des mitochondries et des microsomes (Hayes *et al.*, 2005), ubiquistes dites de conjugaison phase II (Elia *et al.*, 2003; Lesser, 2006; Kim *et al.*, 2009), elles sont impliquées dans la détoxification des xénobiotiques, la protection contre les

dommages oxydatifs et le transport intracellulaire d'hormones (Kim *et al.*, 2009 ; Zhou *et al.*, 2009).

En effet, la GST joue un rôle primordial dans le mécanisme de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la régulation de l'équilibre redox (Konings et Penninga, 1985; Siritantikorn *et al.*, 2007), elle intervient également dans la destruction des peroxydes et des époxydes provenant de l'oxydation non enzymatique des acides gras (Valko *et al.*, 2006). D'autres études ont montré que le H₂O₂ peut également induire la GST (Hayes et Pulford, 1995; Solé *et al.*, 2004), cette enzyme catalyse la réaction d'addition entre ces composés et le groupement -SH du glutathion générant ainsi des composés plus hydrosolubles par neutralisation des sites électrophiles des xénobiotiques, facilitant ainsi son expulsion hors de la cellule par les pompes membranaires à GS- (Salinas et Wong, 1999 ; Hayes *et al.*, 2005).

Dans notre travail, nous avons indiqué une augmentation dose-dépendante de l'activité GST au niveau des deux organes cibles (hépatopancréas et rein) chez les traités par les trois xénobiotiques testés. Cette augmentation pourrait être expliquée par la mise en place de mécanismes de détoxification afin de neutraliser la pénétration cellulaire des ETM et des NPs de fer et d'alumine.

Une induction de l'activité GST est signalée chez l'escargot *Helix aspersa* exposé à l'insecticide imidaclopride (Radwan et Mohamed, 2013), et au spinosad (Belhaouchet *et al.*, 2012). Une augmentation de l'induction de l'activité GST a été enregistrée chez *Helix aperta* et *Helix aspersa* récoltée à proximité d'un complexe siderurgique (El-Hadjar) (Hamdi-Ourfella et Soltani, 2014 ; Larba et Soltani, 2014).

Mouneyrac *et al.*, (2014) notent que les effets des nanoparticules métalliques (Ag, Au, CuO, Cds et ZnO) sur le mollusque *Scrobicularia plana* et sur le polychète *Hediste diversicolor* se manifestent par une induction importante de l'activité GST. Le même phénomène observé chez les bivalves *Corbicula fluminea* exposés aux NPs de diamant (Cid *et al.*, 2015), et également observé chez la moule *Mytilus galloprovincialis*

traitée par les différentes nanoparticules (fullerène (C₆₀), dioxyde de titane (TiO₂) et dioxyde silice (SiO₂)) (Canesi *et al.*, 2010). Cependant, Bigorgne *et al.*, (2012) révèlent une augmentation d'expression d'ARNm-GST suite à l'exposition aux concentrations croissantes des NPs de TiO₂ chez les vers de terre *Eisenia fetida*.

Des fluctuations de l'induction de l'activité GST ont été mentionnées par les travaux de Regoli *et al.*, (2006), Boshoff *et al.*, (2015) sur *Helix aspersa* et *Cepaea nemoralis* récoltés dans des sites pollués par les ETM.

Aucun changement n'a été signalé concernant l'induction de l'activité enzymatique GST chez *Mytilus galloprovincialis* exposée aux NPs de TiO₂ (Canesi *et al.*, 2014). Garaud *et al.*, (2015) mentionnent également que l'exposition de deux invertébrés d'eau douce *Dreissena polymorpha* et *Gammarus roeseli* aux nanoparticules de l'oxyde de cérium (CeO₂) n'affectent pas d'induction de l'activité GST.

Tandis que, Fahmy *et al.*, (2014) révèlent une diminution de l'activité GST au niveau de l'hémolymphe et du tissu mou d'escargot d'eau douce *Biomphalaria alexandrina* traité par les NPs de ZnO. Il en est de même après une exposition aux NPs Ag chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Gomes *et al.*, 2013), chez le ver de terre *Eisenia foetida* (Gomes *et al.*, 2015), et également chez l'escargot *Lymnaea luteola* (Ali *et al.*, 2012, 2014). Ainsi, Cui *et al.*, (2010) ont indiqué une diminution de l'expression d'ARNm-GST chez des souris exposées aux NPs de TiO₂.

Les principales fonctions du GSH intracellulaire résident d'une part, dans la protection cellulaire contre les agents oxydants d'origine métallique, le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction (Dianzani et Ugazio, 1978; Christova *et al.*, 2003), et d'autre part, dans son implication dans les voies de détoxification des xénobiotiques (Arrigo, 1999).

Concernant l'effet du traitement par les poussières métalliques sur l'escargot *Helix aspersa*, nos résultats montrent une diminution dose-dépendante du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas et du rein. Cette déplétion peut être expliquée

par la liaison directe du glutathion au métal, comme le stipule Barillet (2007), les ETM sont caractérisés par leurs fortes affinités vis-à-vis des groupements thiols et forment des complexes avec ces entités chimiques (Viarengo, 1994). Cependant, la synthèse de GSH en présence de cadmium est un mécanisme de protection dans lequel le métal se fixe aux groupements thiols du GSH, prévenant ainsi les dommages cellulaires (Hatcher *et al.*, 1995; Shukla *et al.*, 2000). En effet, grâce à la fonction thiol de sa cystéine, il agit comme un tampon "antioxydant" et pendant ce cycle, le GSH est oxydé en glutathion disulfure (GSSG) qui est réduit rapidement à son tours en GSH par l'action de la glutathion réductase en présence de NADPH (Filomeni *et al.*, 2002) tout en maintenant la proportion GSH /GSSG à 99%. De ce fait, Leomanni *et al.*, (2015), montrent que l'activation précoce de GPx joue un rôle dans la baisse anticipée de la GSH/GSSG chez l'escargot *Cantareus apertus* exposé au carbaryl. Une déficience en GSH expose les cellules à un risque de dommage oxydatif (Droge, 2002).

Plusieurs études confirment nos résultats obtenus et aide à mieux expliquer la relation entre la diminution du taux de GSH et même temps l'augmentation de l'activité GST chez les individus exposés aux différents xénobiotiques.

Les études de Atailia (2009), Boucenna (2010) et de Grara (2011) indiquent l'implication du système GSH/GST chez l'escargot *Helix aspersa* traité par les poussières métalliques, et chez les taités par méthomyl et le chlorpyrifos (Salama *et al.*, 2005).

Une diminution de 55 à 82% du taux de GSH a été enregistrée au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* exposé à des concentrations croissantes d'aluminium (Boukhessaim, 2013). Il en est de même chez l'escargot *Achatina fulica* exposé aux cadmium et zinc (Chandran *et al.*, 2005). Canesi *et al.*, (1998) et Torres *et al.*, (2002) constatent également une diminution du taux de GSH au niveau de la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* après trois jours d'exposition au cuivre.

La diminution du taux de GSH a été démontrée par El-Gendy *et al.*, en 2009 au niveau de la glande digestive de *Theba pisana* après traitement aux pesticides, et également chez les traités par le cuivre, le plomb et le zinc (Radwan *et al.*, 2010).

Notre étude d'évaluation des effets du traitement par les nanoparticules métalliques sur la variation des taux du GSH indique également une diminution dose dépendante au niveau des glandes digestives et du rein, ces résultats vont dans le même sens que ceux de Gomes *et al.*, (2015) et Fahmy *et al.*, (2014) qu'ils ont signalé une diminution du taux du glutathion chez l'escargot *Biomphalaria alexandrina* exposé aux NPs de zinc, ainsi que chez le ver de terre *Eisenia foetida* traité par NPs d'argent. Sarkar et Sil, (2014) révèlent une augmentation des ROS et une diminution du taux de GSH chez les souris traitées par les NPs de fer (Fe₂O₃), une diminution dose-dépendante du taux de GSH (jusqu'à 42%) a été observé dans les cultures cellulaires des souris après une exposition combinée de UVB et l'oxyde de fer (Murray *et al.*, 2013).

Le taux de GSH a subit également une diminution chez le bivalve *Lymnaea luteola* traité par Ag NPs (Ali *et al.*, 2014), le même phénomène a été observé chez les huîtres *Crassostrea virginica* après leurs expositions aux NPs Ag (McCarthy *et al.*, 2013), et chez la moule d'eau douce *Unio tumidus* traitée par les NPs de Zn (Falfushynska *et al.*, 2015). Une baisse du taux de GSH total est observée au niveau des branchies des poissons exposés à des concentrations sublétales des NPs de TiO₂ (Ramsden *et al.*, 2013).

Les résultats de la présente étude ont confirmé également le constat de Xiong *et al.*, (2011) et Ali *et al.*, (2012), suggérant que la diminution des taux du GSH dans la glande digestive semble être une réponse commune des mollusques à l'exposition aux nanoparticules métalliques, qui s'explique en partie par la forte affinité de ces derniers pour le GSH.

Les motoneurones cholinergiques sont considérés comme des récepteurs spécifiques à l'acétylcholine chez les mollusques et les gastéropodes (Carpenter *et al.*, 1977; Weiss *et al.*, 1993). Les acétylcholinestérases sont des enzymes qui catalysent l'acétylcholine en choline et acide acétique (Matozzo *et al.*, 2005), elles sont utilisées comme biomarqueur d'exposition aux pesticides chez les mollusques (Mazzia *et al.*, 2011), elles sont considérées aussi comme étant la cible principale des ETM (Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2009 ; Belabed et Soltani, 2013).

L'inhibition de l'AChE par de nombreux neurotoxiques, tels que les ETM provoque une transmission permanente de l'influx nerveux causant de nombreuses anomalies pouvant aller jusqu'à la paralysie et la mort (Vidal, 2001 ; Matozzo *et al.*, 2005). La stimulation intense des récepteurs muscariniques du fait de cette hyperexcitation conduit à une inhibition de type feedback visant à arrêter la transmission cholinergique (Salmon *et al.*, 2005).

Selon Grara *et al.*, (2012a), l'inhibition de l'activité AChE est de l'ordre de 96% après 7 jours d'exposition d'*Helix aspersa* aux poussières métalliques, une inhibition de 10% a été également indiquée après 7 jours d'exposition des escargots au diméthoate, il en est de même après traitement topique au méthomyl et au carbofuran (Salama *et al.*, 2005), au Spinosad (Belhaouchet *et al.*, 2012), et récemment chez les traités par l'insecticide Imidaacloprod (Radwan et Mohamed, 2013).

Les travaux de Maas *et al.*, (2010) et Larba et Soltani (2014) ont également rapporté l'inhibition de l'AChE chez *Helix aspersa* récoltée à proximité d'un complexe siderurgique (El-Hadjar).

L'altération des activités enzymatiques telles que l'AChE par les ETM a été observée chez le mollusque *Cerastoderma glaucum* (Mashreki-Ajmi *et al.*, 2008), chez *Ruditapes decussatus* exposé au cuivre (Hamza-Chaffai *et al.*, 1998), et chez *Mytilis trossulus* exposé à différents métaux (Cu, Pb, Ni, Zn, et Hg) (Kopecka *et al.*, 2004).

Nos résultats corroborent ces travaux, puisque nous avons mis en évidence une corrélation négative de l'activité AChE après exposition des escargots à des concentrations croissantes de poussières métalliques. Le suivi de ce biomarqueur révèle une diminution de 25% de l'activité de l'AChE, or une réduction de l'activité de l'AChE de 20% ou plus reflète la présence d'effet toxicologique significatif l'USEPA (1998).

Le malonedialdéhyde (MDA) est le produit final de la dégradation des lipides et dont la teneur est en relation étroite avec les dégradations de la membrane cellulaire, ce paramètre est le biomarqueur de choix d'un stress oxydant (Nesto *et al.*, 2007; Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2009). Les radicaux libres oxygénés sont à l'origine d'une dégradation des lipides, à travers la β oxydation (Aurousseau, 2002). De plus, les ETM comme le cuivre et le fer sont largement utilisés comme des agents initiateurs de l'oxydation des lipides (Nzengue, 2008). L'attaque radicalaire se manifeste à l'échelle cellulaire par une peroxydation lipidique induisant des perturbations prononcées du fonctionnement cellulaire (Lawton et Donaldson, 1991 ; Halliwell et Chirico ,1993).

Nos résultats montrent une augmentation du taux du MDA au niveau de l'hépatopancréas et du rein d'*Helix aspersa* exposé aux poussières métalliques. Ces résultats sont en accord avec ceux de Grara *et al.*, (2012a). Klobucar *et al.*, (1997) ont mis en évidence la production de MDA chez le gastéropode pulmoné *Planorbarius corneus* exposé aux PCP. Un taux en MDA élevé a été observé chez des poissons et des moules après exposition au paraquat, au Cu et au Hg (Bano et Hasan, 1989) et à des sédiments contaminés par diverses substances dont des hydrocarbures (Livingstone *et al.*, 1993). Selon Chandran *et al.*, (2005) les taux de MDA sont élevés au niveau de l'hépatopancréas et du rein d'*Achatina fulica* lorsqu'elle est exposée à des concentrations élevées de cadmium et de zinc.

Cette augmentation du taux en MDA chez les organismes contaminés par les particules métalliques peut être expliquée par le fait que les ETM engendrent la production de radicaux libres dans la cellule ce qui entraîne différentes conséquences cytotoxiques, dont l'inactivation des systèmes enzymatiques et surtout la détérioration de la membrane cellulaire par attaque de ses acides gras constitutifs, ce qui se traduit par des phénomènes de peroxydation lipidique.

Dans notre travail, nous avons également mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez les organismes exposés aux NPs de fer et d'aluminium.

L'exposition aux NPs de Ti, Cu, Si et Fe est à l'origine d'une peroxydation lipidique dans des cellules épidermiques en culture (Shukla *et al.*, 2011). Jia *et al.*, (2001a) ont également mis en évidence une augmentation des malondialdéhydes chez des souris et des rats exposés aux sels d'aluminium. Il en est de même pour des vers de terre *Eisenia foetida* et des moules *Mytilus galloprovincialis* exposés aux nanoparticules d'argent (Gomes *et al.*, 2014, 2015), ou encore au niveau de l'hémolymphe et des tissus mous des escargots *Biomphalaria alexandrina* traités par les NPs de zinc (Fahmy *et al.*, 2014) et l'hémolymphe de *Lymnaea luteola* traités par les NPs Ag (Ali *et al.*, 2014), ainsi que chez les mollusques bivalves *Scrobicularia plana* placés dans des mesocosmes pendant 21 jours (Buffet *et al.*, 2014).

Le taux de MDA est également élevé au niveau du foie, des branchies et dans les tissus du poisson *Cyprinus carpio* après une exposition aux NPs de titane TiO₂ (Linhua *et al.*, 2009). L'exposition des souris aux mêmes nanoparticules pendant deux semaines induit une augmentation significative de taux de MDA au niveau du foie (Abdel-Azim *et al.*, 2015). Des taux de MDA élevés ont été enregistrés aussi au niveau des hépatocytes des souris exposées au Fe₂O₃ (Sarkar et Sil, 2014).

Par ailleurs, la peroxydation des lipides peut être stimulée non seulement par divers cations inorganiques (Geret *et al.*, 2002), mais aussi par les substances chimiques et organiques (Livingstone *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2004). Cependant, d'un

point de vue toxicologique, le MDA est un marqueur peu spécifique puisque sa production peut résulter de stress variés en dehors de toute contamination du milieu en plus de l'exposition à divers types de polluants, métalliques et organiques (Mora, 1998). Ainsi, Salama *et al.*, (2005) ont montré que les pesticides n'affectaient pas le taux de MDA chez l'escargot *Helix aspersa*. Aucune relation n'a été déterminée entre les concentrations en MDA et les teneurs cytosoliques en cuivre et en zinc chez *Pyganodon grandis* (Bonneris *et al.*, 2005). De plus, les études *in vivo* réalisées sur les bivalves dulcicoles *Corbicula sp* exposés à des solutions enrichies en uranium et en plomb ont montré que le taux de MDA était inférieur à celui des témoins (Labrot *et al.*, 1996). Dans le même ordre des idées, Golub et Germann, (2000), signalent que l'exposition des souris et des rats aux sels d'aluminium provoque également une diminution du taux de MDA. Ils expliquent cette diminution par le fait que les escargots traités par une forte concentration d'oxyde d'aluminium, mobilisent leurs systèmes de défense et de tolérance.

Ces effets toxiques ne peuvent avoir lieu que si ces particules métalliques pénètrent dans les cellules et s'y accumulent. Aussi avons-nous jugé de nous intéresser dans cette partie de notre travail au phénomène d'accumulation des particules testées notamment les NPs au niveau des tissus de l'hépatopancréas et du rein des escargots. Dans notre travail, nous avons mis en évidence une accumulation importante des NPs d'aluminium particulièrement au niveau de l'hépatopancréas des escargots. Ces résultats concordent avec ceux de Eybe *et al.*, (2013) qui ont mis en évidence une accumulation de NPs de chrome et de platine sous forme de petites vésicules de 2 à 4 µm au niveau des cellules à calcium et des cellules basophiles de la glande digestive chez l'escargot *Helix aspersa*. Il en est de même pour les travaux de Shoults-Wilson *et al.*, (2011a), de Yeo et Nam, (2013), et ceux d' El-Ramady *et al.*, (2015). Par ailleurs, Morsy *et al.*, (2013a) ont indiqué que la bioaccumulation de NPs est en relation étroite avec la durée, la concentration, et évidemment l'organe cible, alors que Jakubiak *et al.*, (2014) indiquent que le phénomène d'accumulation des

nanoparticules dépend uniquement de la durée de l'exposition. Cependant, la bioaccumulation des nanoparticules peut être influencée par la voie d'exposition comme le suggèrent les travaux de Stebounova *et al.*, (2011), Cho *et al.*, (2013) dont les résultats révèlent que les propriétés des nanoparticules sont modifiées et considérablement altérées après leur pénétration et interactions avec les systèmes biologiques .

La bioaccumulation des NPs de titanes et des nanotubes de titane (TiO₂-NT) est observé chez l'escargot terrestre *Cipangopaludina chinensis* après une exposition de dix-sept jours (Yeo et Nam, 2013). Une forte accumulation de nano-Fe₂O₃ et Fe₃O₄ a été déterminé chez le poisson *Danio rerio* (Zhang *et al.*, 2015).

Les algues *Pleurotus eryngii* et le champignon *Trametes versicolor* ont présenté une grande capacité d'accumulation des Al₂O₃ (Jakubiak *et al.*, 2014), Park *et al.*, (2015) ont montré également la bioaccumulation des nanoparticules d'alumine après 13 semaines de traitement des souris.

Starnes *et al.*, (2015) révèlent une bioaccumulation des NPs d'argent chez les nématodes *Caenorhabditis elegans*, et chez les vers de terre *Eisenia fetida* (Shoultz-Wilson *et al.*, 2011a). le même phénomène a été signalé chez les annélides polychète *Nereis diversicolor* après une exposition aux NPs d'argent et de cuivre (Rainbow *et al.*, 2009 ; Thit *et al.*, 2015). Ramskov *et al.*, 2015 mentionnent également l'accumulation des différents forme de nanoparticules de cuivre au niveau du tissu mou et de la coquille d'escargot d'eau douce *Potamopyrgus antipodarum* exposé aux sédiments mélangé avec NPs de Cu pendant 14 jours. De plus, Gomes *et al.*, (2012, 2013) ont constaté l'accumulation des NPs de CuO au niveau de la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* exposé pendant 15 jours, la glande digestive de la même espèce accumule des concentrations importantes des NPs de titane comparativement à celles observées au niveau des branchies (Canesi *et al.*, 2014).

Par ailleurs, Farkas *et al.*, (2015) n'ont signalé aucune trace de dioxyde de titane au niveau des branchies, de la glande digestive et dans tout le reste du tissu mou des moules *Mytilus edulis*. Il en est de même concernant les travaux de Falfushynska *et al.*, (2015), sur la moule *Unio tumidus* exposée à de faibles concentrations des nanoparticules de ZnO ne ou encore ceux de Tian *et al.*, (2014) avec les particules de TiO₂ chez les bivalves *Scapharca subcrenata*.

La glande digestive ou l'hépatopancréas - similaire dans sa fonction au pancréas et au foie chez l'homme - est considérée comme le principal organe cible dans les processus d'absorption et de stockage ETM chez les mollusques (Dallinger et Wieser, 1984; Boucenna *et al.*, 2015). Cette glande est responsable de la production de l'enzyme digestive, l'absorption des nutriments, l'endocytose de certaines particules, et également le stockage de la nourriture et l'excrétion (Owen, 2012). Chez les gastéropodes, la glande digestive est considérée comme l'un des organes les plus importants impliqués dans la détoxification des polluants (Ismert *et al.*, 2002). Aussi toute atteinte de leur intégrité aura pour conséquence des perturbations de leur fonctionnement avec toutes les conséquences toxicologiques qui peuvent s'en suivre. De ce fait, les changements histologiques et histochimiques sont considérés comme des biomarqueurs de l'exposition au cuivre par exemple (Snyman *et al.*, 2009), au Cd (Chabicoovsky *et al.*, 2004).

Dans notre travail, notre étude histologique a révélé des dommages tissulaires au niveau de la glande digestive et du rein d' *Helix aspersa* en réponse à la toxicité de toutes les particules métalliques testées.

En effet, les ETM détériorent la dynamique des cellules et endommagent leurs membranes. De ce fait, l'échange intercellulaire et la fluidité sont perturbés. Par conséquent, la diffusion des ETM augmente dans les cellules causant ainsi une nécrose cellulaire (Yager et Harry, 1963). Le même phénomène est observé par Osterauer *et al.*, (2010) au niveau de la glande digestive de l'escargot ramshorn

(*Marisa cornuarietis*), avec une augmentation du nombre de vacuoles dans les cellules digestives. Gust *et al.*, (2011) ont rapporté que les lésions histologiques dans la glande digestive de l'escargot *Potamopyrgus antipodarum* exposé aux ETM se manifeste par une hypertrophie des cellules à calcium et vacuolisation de cellules digestives. Une accumulation de granulés noirs de taille variable, avec une dilatation des cellules digestives a été observée au niveau de la glande digestive de *Pomacea canaliculata* après exposition aux sédiments contaminés par les ETM (Fe, Zn, Pb, Cr, Cu, Ni, et Cd) (Kruatrachue *et al.*, 2011), et également chez l'escargots géants *Archachatina marginata* traité par le Cu et le Pb (Otitoloju *et al.*, 2009).

Tous les examens histopathologiques du rein d'*Helix aspersa* ont révélé des réponses adaptatives à l'exposition aux concentrations croissantes de poussières métalliques. Ces résultats sont en accord avec ceux de Russell *et al.*, (1981), Kambale et Potdar (2011) chez les escargots *Helix aspersa* et *Bellamya bengalensis* traités par le Cd. Chabicovsky *et al.*, (2003) expliquent ces effets par une diminution de l'expression génique Cd-MT chez les cellules renales de l'escargot traité par le Cu.

L'examen histologique du foie de la carpe juvénile *Cyprinus carpio* exposée aux NP-TiO₂, montre des pathologies telles que l'hyperplasie, la vacuolisation cytoplasmique des cellules hépatiques et l'apparition des granules éosinophiles ainsi qu'une condensation du noyau de l'hépatocyte, indiquant le démarrage de la première étape de l'apoptose (Lee *et al.*, 2012). Rajkumar *et al.*, (2015) indiquent des dommages au niveau du tissu hépatique avec apparition de vacuoles chez le poisson *Labeo rohita* traité par les NPs d'argent.

Thit *et al.*, (2013, 2015) indiquent que le traitement de *Xenopus laevis* par les NPs de Cu provoque une apoptose des cellules épithéliales rénales. Cependant, l'exposition combinée aux NPs de ZnO et un pesticide entraîne chez des moules *Unio tumidus* une inflammation et une destruction cellulaire conduisant à la nécrose (Falfushynska *et al.*, 2015). Tandis que, Radziun *et al.*, (2011) n'ont signalé aucun effet

cytotoxique significatif sur les cultures cellulaires de mammifères traitées par les NPs d'Al₂O₃.

Les nanoparticules induisent la libération des ROS à l'extérieur et l'intérieur des cellules, perturbant ainsi des organites tels que les mitochondries, les lysosomes, et les noyaux et même les voies de signalisation cellulaire, provoquant une mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Marano *et al.*, 2011). Le processus d'internalisation des nanoparticules peut être induit par différents mécanismes, y compris la phagocytose, la pinocytose, et l'endocytose (Di Virgilio *et al.*, 2010; Thit *et al.*, 2013), l'effet cytotoxique est causé principalement par la propagation de l'inflammation ou l'induction du stress oxydatif au niveau des cellules exposées aux NPs (Dey *et al.*, 2008; Oesterling *et al.*, 2008).

L'apoptose et la nécrose sont considérées comme des mécanismes de réponse sévères liés à la toxicité d'aluminium chez les rats (Brenner, 2002), des lésions histopathologiques ont été observées au niveau du foie et du rein de souris après 13 semaines de traitement par l'oxyde d'aluminium (Park *et al.*, 2015). Hsieh *et al.*, (2015) mentionnent que les nanoparticules de fer entraînent une apoptose chez des cultures cellulaires (3T3, RAW264.7 et MCF7). Il en est de même pour des rats traités par les NPs d'argent et d'or (Rathore *et al.*, 2014).

Conclusion générale et perspectives

La présente étude concerne l'évaluation de la toxicité de certaines nano et microparticules métalliques sur un modèle d'organisme bioaccumulateur/bioindicateur et ce à travers le suivi de certains paramètres biochimiques tels que les principaux métabolites, et les biomarqueurs du stress oxydatif. Cette étude a été complétée par l'évaluation des concentrations des nanoparticules métalliques accumulées au niveau de l'hépatopancréas et du rein.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que l'exposition à des concentrations croissantes de poussières métalliques durant deux semaines est à l'origine de perturbations métaboliques assez importantes chez *Helix aspersa* avec un taux de protéines totales et de glucides qui tendent à augmenter d'une manière dose-dépendante au niveau de l'hépatopancréas. Par ailleurs, le taux de lipides ne semble pas affecté par ce traitement.

D'un autre côté, les poussières métalliques et les nanoparticules de fer et d'aluminium semblent avoir un effet sur certains biomarqueurs, indiquant ainsi un état de stress. Ainsi, nos résultats ont mis en évidence une induction de l'activité catalase au niveau de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités par les micro et nanoparticules métalliques beaucoup plus marquée au niveau du rein.

Il en est de même concernant l'activité GST parallèlement à une diminution du taux de GSH.

L'analyse de la regression linéaire révèle un profil de décroissance significatif de l'activité acétylcholine-estérase (AChE) chez *Helix aspersa* exposé aux concentrations croissantes de poussières métalliques.

Le traitement par ces xénobiotiques est également à l'origine de l'installation d'un stress oxydant confirmé par une augmentation du taux de MDA, avec une forte corrélation avec les concentrations de particules métalliques testées.

Concernant la bioaccumulation, nos résultats ont mis en évidence un fort potentiel bioindicateur d'*Helix aspersa* pour les NPs, avec des relations linéaires entre les concentrations des NPs dans l'alimentation et celles retrouvées dans l'hépatopancréas et le rein des escargots.

On a pu démontrer que l'escargot *Helix aspersa* a développé un système adaptatif de tolérance vis-à-vis de l'exposition aux NPs de fer et d'aluminium à travers l'accumulation des concentrations importantes et dose-dépendantes de ces NPs au niveau des deux organes testés.

Enfin, l'étude histopathologique révèle que la toxicité des particules métalliques se manifeste entre autres par des nécroses cellulaires.

En perspectives, il serait judicieux d' :

- ✓ Etudier la relation Nanotoxicité/Variation des propriétés des NPs (la taille et la taille des agglomérats, la composition, chimie de la surface, forme, stabilité, solubilité et la structure cristalline).
- ✓ Elargir les dosages des biomarqueurs (GPx, LDH et MTs) et micronoyau pour mieux comprendre les mécanismes d'adaptation et de résistance aux xénobiotiques nanométriques.
- ✓ Evaluer la génotoxicité et embryotoxicité des NPs.

Références Bibliographiques

1. Abdel-Azim, S.A., Darwish, H.A., Rizk, M.Z., Ali, S.A., & Kadry, M.O. (2015). Amelioration of titanium dioxide nanoparticles-induced liver injury in mice: Possible role of some antioxidants. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(4), 305–314.
2. Aebi, H. (1984). Catalase *in Vitro*. *Method Enzym* 105, 121-126.
3. Aitken, R.J., Chaudhry, M.Q., Boxall, A.B.A., & Hull, M. (2004). Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends". *Occup. Med.*, 56, 300-306.
4. Al-Fahmie, Z.H. (2012). Using the Biochemical and Histological Changes of Terrestrial Snail (*Eobania vermiculata*) as Biomarker Indicators of Pollution for Some Heavy Metals. M.Sc. Thesis, Faculty of Science, Taif University.
5. Ali, D., Alarifi, S., Kumar, S., Ahamed, M., & Siddiqui, M.A. (2012). Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. *Aquatic Toxicology*, 124-125, 83-90.
6. Ali, D., Ali, H., Alarifi, S., Kumar, S., Serajuddin, M., Mashih, A.P., Ahmed, M., Khan, M., Adil, S.F., Shaik, M.R., & Ansari, A. A. (2015). Impairment of DNA in a Freshwater Gastropod (*Lymnaea luteola* L.) After Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(3), 543–552.
7. 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.
8. Ansari, S.A., & Hussain, Q. (2011). Immobilization of *kluveromyces lactis* b galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles—its future aspects in biosensor applications. *J. Mol.Catal. B. Enzymatic*. 70, 119–126.

9. Ansari, S.A., Hussain, Q, Qayyum, S., & Azam, A. (2011). Designing and surface modification of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. *Food Chem Toxicol* 49, 2107–2115.
10. Arasta, T., Bais, V.S., & Thakur, P. (1996). Effect of Nuvan on some biological parameters of Indian catfish, *Mystus vittatus*, *J. Environ. Biol.*, 17, 167-169.
11. Ariga, K. (2015). From Nanotechnology to Nanoarchitectonics. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 25(2), 177–178.
12. Arrigo A.P. (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biology & Medicine.*, 27, 936-944.
13. Aruoja, V., Dubourguier, H.-C., Kasemets, K., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.* , 407, 1461-1468.
14. Asagba, S.O., Eriyamremu, G.E., & Igberaese, M.E. (2008). Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem.* 34, 61–69.
15. ASTM. (2006). Standard terminology Relating to Nanotechnology, Norme ASTM E2456-06, 4 p.
16. Atailia, A. (2009). Effet des poussières métalliques d'origine industrielles sur un organisme animal bio indicateur / bioaccumulateur de pollution : *Helix aspersa*. Mémoire de magister, Université Badji Mokhtar, Annaba. 45 p.
17. ATSDR. (1999). Toxicological Profiles for aluminium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S department of Health and Human Services, Public Health Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>.
18. Arousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux : Conséquence sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod.Anim.* 15(1), 67-82.

19. Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M.J., & Cazenave, J. (2014). Combined toxicological effects of pesticides: a fish multi-biomarker approach. *Ecol. Indic.* 36, 532–538.
20. Baize, D. (1997). Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. INRA Edition. Paris. 409p.
21. Bano, Y., & Hasan, M. (1989). Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxydation in different body organs of catfish *Heteropneustes fossilis*. *J. Environ. Sci. Health.* 24 B, 145-166.
22. Barillet, S. (2007). Toxicocinetique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz, France. 476 p.
23. Barker, G.M., (2001). The biology of terrestrial mollusks. Wallingford U.K, C.A.B International.
24. Barky, F.A., Hala, A., Abdelsalam, H.A., Mahmoud, M.B., & Hamdi, S.A.H. (2012). Influence of Atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104, 9-18.
25. Barnett, C.M., Gueorguieva, M., Lees, M.R., McGarvey, D.J., Darton, R.J., & Hoskins, C. (2012). Effect of the hybrid composition on the physicochemical properties and morphology of iron oxide-gold nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(10).
26. Baurand, P.-E., Capelli, N., Scheifler, R., & de Vaufleury, A. (2014a). An assessment of the embryotoxicity of cadmium in the terrestrial mollusk *Cantareus aspersus*: From bioaccumulation to impacts at different levels of biological organization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110, 89–94.
27. Baurand, P.-E., Pedrini-Martha, V., de Vaufleury, A., Niederwanger, M., Capelli, N., Scheifler, R., & Dallinger, R. (2015). Differential Expression of Metallothionein

- Isoforms in Terrestrial Snail Embryos Reflects Early Life Stage Adaptation to Metal Stress. *Plos One*, 10(2).
28. Baurand, P-E., de Vaufleury, A., Scheifler, R., & Capelli, N. (2013). Coupling of random amplified polymorphic DNA profiles analysis and high resolution capillary electrophoresis system for the assessment of chemical genotoxicity. *Environ.Sci. Technol.* 47, 9505–9513.
 29. 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.
 30. Beeby, A., & Richmond, L. (1989). The shell as a site of lead deposition in *Helix aspersa*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 623-628.
 31. Beeby, A., Richmond, L., & Herpé, F. (2002). Lead reduces shell mass in juvenile garden snails (*Helix aspersa*). *Environmental Pollution* 120, 283-288.
 32. Belabed, S., & Soltani, N. (2013). Acute toxicity of cadmium on *Donax trunculus*: acetylcholinesterase, glutathione S-transferase activities and pattern of recovery. *European Journal of Experimental Biology*, 3 (2), 54-61.
 33. Belhaouchet, N., Djebar, M.R., Meksem, L., Grara, N., Zeriri, I., & Berrebbah, H. (2012). Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide: The Spinosad on an alternate model: *Helix aspersa*. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(8) 4199-4206.
 34. Bend, J. & Sinal, C.J. (1998). Biotransformation, *Encyclopedia of Toxicology*, P. Wesler (rédacteur), vol. 1, Academic Press, San Diego.
 35. Berger, B., Dallinger, R., Felder, E., & Moser, J. (1993). Budgeting the flow of cadmium and zinc through the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. In *Ecotoxicology of Metals in Références bibliographiques 153 Invertebrates* (Eds R. Dallinger et R. Rainbow). *Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA*, 291-313.
 36. Bigorgne, E., L. Foucaud, C. Caillet, L. Giamberini, J. Nahmani, F. Thomas, F. Rodius. (2012). Cellular and molecular responses of *E. fetida* cœlomocytes exposed to TiO₂ nanoparticles. *J Nanopart Res*, 14, 959.

37. Bocquené, G. (1996). L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Thèse Doctorat, Ecole Pratique des Hautes Etudes : 250p.
38. Bonnemain, B. (1998). Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: Physicochemical characteristics and clinical applications – a review. *J. Drug Target* 6, 167-174.
39. Bonneris, E., Perceval, O., Masson, S., Hare, L., & Campbell, P.G.C. (2005). Sub-cellular partitioning of Cd, Cu and Zn in tissues of indigenous unionid bivalves living along a metal exposure gradient and links to metal-induced effects. *Environ. Pollu.*, 135, 195-208.
40. Boshoff, M., Jordaens, K., Baguet, S., & Bervoets, L. (2015). Trace metal transfer in a soil–plant–snail microcosm field experiment and biomarker responses in snails. *Ecological Indicators*, 48, 636–648.
41. Bottero, J.-Y., Auffan, M., Borschnek, D., Chaurand, P., Labille, J., Levard, C., Masion, A., Tellab, M., Rose, J., & Wiesner, M.R. (2015). Nanotechnology, global development in the frame of environmental risk forecasting. A necessity of interdisciplinary researches. *Comptes Rendus Geoscience*, 347, 35–42.
42. Bouaricha, H. (2013). Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium sp.*). Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba. 148p.
43. Boucenna, M. (2010). Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les aciéries 1 et 2 du complexe sidérurgique d'EL-Hadjar sur un modèle bioaccumulateur *Helix aspersa*. Mémoire de magister, Université Badji Mokhtar, Annaba. 74 p.
44. Boucenna, M., Berrebbah, H., Atailia, A., Grara, N., & Djebbar, M. R. (2015). Effects of metal dust on functional markers and histology of gland digestive and kidney of the Land Snails (*Helix aspersa*) in the North East of Algeria, 14(2), 189–198.
45. Boukhessaim, S. (2013). Propriétés de Microstructure et Toxicologie des Alliages Aluminium-Titane. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba. 111p.

46. Bourrelier, P-H., Berthelin, J., & Pedro, G. (1998). Contamination des sols par les éléments en traces les risques et leur gestion. Tec & doc Lavoisier, Paris Londres New York.
47. Bouwmeester, H., Lynch, I., Marvin, H.J.P., Dawson, K.A., Berges, M., Braguer, D., Byrne, H.J., Casey, A., Chambers, G., Clift, M.J.D., Elia, G., Fernandes, T.F., FjellsbÃ, L.B., Hatto, P., Juillerat, L., Klein, C., Kreyling, W.G., Nickel, C., Riediker, M., & Stone, V. (2011). Minimal analytical characterization of engineered nanomaterials needed for hazard assessment in biological matrices. *Nanotoxicology*, 5(1), 1–11.
48. Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S. (2007). Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 531–539.
49. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principe of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 278-254.
50. Brain, R.A., & Cedergreen, N. (2008). Biomarkers in aquatic plants: selection and utility. In: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 198, 49–109.
51. Brenner, S. (2002). Aluminum neurotoxicity is reduced by dantrolene and dimethyl sulfoxide in cultured rat hippocampal neurons. *Biol Trace Elem Res.*, 86, 85–89.
52. Brodeur, J., & Tardif R. (1998). Absorption, Distribution, Excretion. Dans P. Wexler (rédacteur) *Encyclopedia of Toxicology*, 1, 1 - 7, 500-503.
53. Brown, P.J., Long, S.M., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., & Hankard, P.K. (2004). Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a noncarcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere.* 57, 1675-1681.

54. BSI. (2005). British Standards Institution. Vocabulary. Nanoparticles. PAS 71. BSI, London.
55. Buffet, P. E., Tankoua, O. F., Pan, J. F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L.,... Mouneyrac, C. (2011). Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 84(1), 166–174.
56. Buffet, P.E., Zalouk-Vergnoux, A., Châtel, A., Berthet, B., Perrein-Ettajani, H., Poirier, L., Luna-Acosta, A., Thomas-Guyon, H., .., & Mouneyrac, C. (2014). A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: the ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusk *Scrobicularia plana*. *Science of the Total Environment*, 470-471, 1151–1159.
57. Bulla, L.A. & Cheng, T.C. (1997). Biochemical and ultrastructural evidence for the double role of phagocytosis in molluscs: defense and nutrition. *Comparative pathobiology*, 3, 21-30.
58. Burnol, A., Duro, L., & Grive, M. (2006). Eléments traces métalliques. Guide méthodologique. Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. Rapport INERIS.
59. Calisi, A., Zaccarelli, N., Lionetto, M.G., & Schettino, T. (2013). Integrated biomarker analysis in the earthworm *Lumbricus terrestris*: Application to the monitoring of soil heavy metal pollution. *Chemosphere*, 90(11), 2637–2644.
60. Campion, M. (1961). The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 102, 195-216.
61. Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Malatesta, M., Gazzanelli, G., & Gallo, G. (1999). Growth factors stimulate the activity of key glycolytic enzymes in isolated digestive gland cells from mussels (*Mytilus galloprovincialis*) through tyrosine kinase mediated signal transduction. *Gen.Comp. Endocrinol.* 116, 241–248.

62. Canesi, L., Ciacci, C., Piccoli, G., Stocchi, V., Viarengo, A., & Gallo, G. (1998). *In vitro* and *in vivo* effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 120(2), 261–268.
63. Canesi, L., Fabbri, R., Gallo, G., Vallotto, D., Marcomini, A., Pojana, G. (2010). Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquatic Toxicology* 100, 168-177.
64. Canesi, L., Frenzilli, G., Balbi, T., Bernardeschi, M., Ciacci, C., Corsolini, S., Della Torre, C., Fabbri, R., Faleri, C., Focardi, S., Guidi, P., Kocan, A., Marcomini, A., Mariottini, M., Nigro, M., Pozo-Gallardo, K., Rocco, L., Scarcelli, V., Smerilli, A., Corsi, I. (2014). Interactive effects of n-TiO₂ and 2,3,7,8-TCDD on the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 153, 53–65.
65. Carefoot, T.H., Qian, P.Y., Taylor, B.E., West, T. & Osborne, J. (1993). The effects of starvation on energy reserves and metabolism in the northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*. *Aquaculture* 118, 315–325.
66. Carlton, C.E., & Ferreira, P.J. (2012). *In situ* TEM nanoindentation of nanoparticles. *Micron*, 43, 1134–1139.
67. Carpenter, D.O. (1994). The public health significance of metal neurotoxicity. *Cell .Mol.Neurobiol*, 6, 591-597.
68. Carpenter, D.O., Swann, J.W., & Yarowsky, P.J. (1977). Effect of curare on responses to different putative transmitters in *Aplysia* neurons. *J Neurobiol*, 8 (2), 119-132.
69. CERADEL. (2012). Fiche d'information produit : d'oxyde fer rouge. FDS N°: P018. Version: 01/2012. 1–10.
70. Chabicovsky, M., Klepal, W., & Dallinger, R. (2004). Mechanisms of cadmium Toxicity in terrestrial pulmonates programmed cell death and métallothionéines overload. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 648- 655.

71. Chabicoovsky, M., Niederstaetter, H., Thaler, R., Hödl, E., Parson, W., Rossmanith, W., & Dallinger, R. (2003). Localization and quantification of Cd and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 190 (1), 25-36.
72. Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Singh, G., & Maity, J.P. (2014). Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100(1), 61–68.
73. Chandran, R., Sivakumar, A., Mohandass, S., & Aruchami, M. (2005). Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140, 422–426.
74. Chen, L., Liu, R.M., Huang, Q., Chen, Y.X., Gao, S.H., Sun, C.C., & Shen, Z.Y. (2013). Integrated assessment of nonpoint source pollution of a drinking water reservoir in a typical acid rain region. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10(4), 651–664.
75. Chen, S., Zhang, X., Liu, Y., Hu, Z., Shen, X., & Ren, J. (2015). Simulated acid rain changed the proportion of heterotrophic respiration in soil respiration in a subtropical secondary forest. *Applied Soil Ecology*, 86, 148–157.
76. Cheng, T.C., & Sullivan, J.T. (1984). Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research*, 14, 305-315.
77. Chevallier, H. (1982). Facteurs de croissance chez des gastéropodes pulmonés terrestres paléarctiques en élevage. *Haliotis* 12, 29-46.
78. Chevallier, H. (1992). L'élevage des escargots. Production et préparation du petit-gris. Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort.
79. Cho, W.-S., Kang, B.-C., Lee, J. K., Jeong, J., Che, J.-H., & Seok, S. H. (2013). Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 9.

80. Christova, T.Y., Gorneva, G.A., Taxirov, S.I., Duridanova, D.B., & Setchenska, M.S. (2003). Effect of cisplatin and cobalt chloride on antioxidant enzymes in the livers of Lewis lung carcinoma-bearing mice: protective role of heme oxygenase. *Toxicol Lett*, 138(3), 235-42.
81. Cid, A., Picado, A., Correia, J.B., Chaves, R., Silva, H., Caldeira, J., ... Diniz, M.S. (2015). Oxidative stress and histological changes following exposure to diamond nanoparticles in the freshwater Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Journal of Hazardous Materials*, 284, 27–34.
82. Coeurdassier, M. (2001). Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnaea stagnalis* et *Lymnaea palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques organiques. Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté, Besançon, France, 297 p.
83. Coeurdassier, M., Gomot de Vaufleury, A., Saint-Denis, M., Ribera, D., Narbonne, J.F., & Badot, P.M. (2002b). Effects of dimethoate on snail B-esterase and growth as a function of dose, time and exposure route in a laboratory bioassay. *Biomarkers* 7(2), 138-150.
84. Coeurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A., Lovy, C., & Badot, P.M. (2002a). Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53, 425-431.
85. Coïc, Y., & Coppenet, M. (1989). Les oligo-éléments en agriculture et élevage. INRA- ISBN 2-7380-0138-6,114 p.
86. Collins, A.R. (2005). Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Am. J Clin. Nutr.*, 81, 261 S-267S.
87. Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., & Wiegand, C. (2009). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157, 57–63.

88. Cortet, J., Gomot-de Vaufleury, A., Poinot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., & Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutants effects. *European Journal of Soil biology*, 35, 115-134.
89. Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., & Vasseur, P. (1997b). Mechanisms de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. In: Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. et Ramade, F. (Eds), 125-148, *Masson*, Paris.
90. Cui, Y., Gong, X., Duan, Y., Li, N., Hu, R., Liu, H., Hong, M., Zhou, M., Wang, L., Wang, H., & Hong, F. (2010). Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *J. Hazard. Mater.*, 183 (1-3), 874-880.
91. Curtin, J. F., Donovan, M., & Cotter, T. G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of immunological methods*, 265, 49-72.
92. Da Silva, A.R., Aucélio, R.Q., Rodríguez-Cotto, R.I., Ortiz-Martínez, M.G., Rivera-Ramírez, E., Frias, D.P., & Gioda, A. (2014). Physicochemical properties and toxicological assessment of modified CdS nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(10).
93. Da Silva, B.F., Perez, S., Gardinalli, P., Singhal, R.K., Mozeto, A.A. & Barcelo, D. (2011). Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments. *Trend Anal. Chem.*, 30, 528-540.
94. Dallinger, R. (1993). Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates* (Eds R. Dallinger et R. Rainbow), *Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA*, p. 245-289.
95. Dallinger, R., & Wieser, W. (1984a). Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd, and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* 79C, 117-124.
96. Dallinger, R., Berger, B., Tribskorn-Köhler, R., & Köhler, H. (2001). Soil biology and ecotoxicology, in: *Barker, G.M. (Ed.), and the biology of terrestrial molluscs*. *CABI, Wallingford*, 489-525.

97. Dallinger, R., Chabicovsky, M., Lagg, B., Schipflinger, R., Weirich, H.G., & Berger, B. (2004). Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 902-910.
98. De Kerney, M. P., Cameron, R. A. D., & Bertrand, A. (1999). Guide des Escargots et Limaces d'Europe. Delachaux & Niestlé, Paris.
99. Depledge, M.H. (1994). The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In Non Destructive Biomarkers in Vertebrates (Eds M.C. Fossi et C. Leonzio), *Lewis, Boca Raton*. 271 -295.
100. Desouky, M.M.A. (2012). Metallothionein is up-regulated in molluscan responses to cadmium, but not aluminum, exposure. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 65, 139–143.
101. Dey, S., Bakthavatchalu, V., Tseng, M.T., Wu, P., Florence, R.L., Grulke, E.A., Yokel, R.A., Dhar, S.K., Yang, H.S., Chen, Y., & St Clair, D. K. (2008). Interactions between SIRT1 and AP-1 reveal a mechanistic insight into the growth promoting properties of alumina (Al₂O₃) nanoparticles in mouse skin epithelial cells. *Carcinogenesis*, 29(10), 1920–1929.
102. Dhawan, A., Sharma, V., & Parmar, D. (2009). Nanomaterials: a challenge for toxicologists. *Nanotoxicology*, 3, 1-9.
103. Dianzani, M.U., & Ugazio, G. (1978). Lipid peroxydation. In Biochemical mechanisms of liver injury. *Salter T.F Ed. Academic press. London*. pp 669.
104. Di-Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M., Lorenzo, F., de Mele, M. (2010). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of Hazardous Materials*, 177, 711–718.
105. Donaldson, K., Stone, V., Tran, C., Kreyling, W., & Borm, P.J.A. (2004). Nanotoxicology Occup. *Environ. Med.* 61, 727-728.

106. Draper, H.H., & Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421–431.
107. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82(1), 47–95.
108. Druart, C., Scheifler, R., Millet, M., & De Vaufleury, A. (2012). Land snail eggs bioassays: A new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. *Applied Soil Ecology*, 53(1), 56–64.
109. Duchateau, G., & Florin, M. (1959). For trehalose in insects and its significance. *Arch. Insect. Physiol. Biochem* 67, 306-314.
110. Eghtesadi-Aragh, P., & Bastami, K.D. (2011). An integrated approach on interconnected effects between selected environmental parameters and fatty acid composition in Mollusk. *Res. J. Environ. Sci.* 5, 310–315.
111. El Badawy, A., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., & Tolaymat, T.M. (2011). Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 283-287.
112. El- Gendy, K.S., Radwan, M.A., & Gad, A.F. (2009). *In vivo* evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. *Chemosphere*, 77, 339-344.
113. El Gohary, L.R., & Genena, M.A. (2011). Biochemical effect of three molluscicide baits against the two land snails, *Monacha cantiana* and *Eobania vermiculata* (Gastropoda: Helicidae). *Int. J. Agric. Res.* 6, 682–690.
114. Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dörr, A.J.M., & Mantilacci, L. (2003). Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55, 162–167.
115. Ellman, G.L., Courtney K.D., Andres V., & Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology.* 7, 88-95.

116. El-Ramady, H.R., Domokos-szabolcsy, É., & Shalaby, T.A. (2015). Selenium in Agriculture: Water, Air, Soil, Plants, Food, Animals and Nanoselenium. *CO₂ Sequestration, Biofuels and Depollution* (5). 153-232.
117. El-Shenawy, N.S., Mohammadden, A., & Al-Fahmie, Z.H. (2012). Using the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system of the land snail *Eobania vermiculata* as biomarkers of terrestrial heavy metal pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 347-354.
118. El-Wakil, H.B., & Radwan, M.A. (1991). Biochemical studies on the terrestrial snail, *Eobania vermicular* (Muller) treated with some pesticides. *J.Environ .sci .Health,B* 26, 479-489 .
119. Eybe, T., Audinot, J. N., Udelhoven, T., Lentzen, E., El Adib, B., Ziebel, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2013). Determination of oral uptake and biodistribution of platinum and chromium by the garden snail (*Helix aspersa*) employing nano-secondary ion mass-spectrometry. *Chemosphere*, 90(6), 1829–1838.
120. Fahmy, S.R., Abdel-Ghaffar, F., Bakry, F.A., & Sayed, D.A. (2014). Ecotoxicological Effect of Sublethal Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles on Freshwater Snail *Biomphalaria alexandrina*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(2), 192–202.
121. Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., & Wood, W. (2007). Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 145-227.
122. Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Sokolova, I., & Stoliar, O. (2015). The effects of zinc nanooxide on cellular stress responses of the freshwater mussels *Unio tumidus* are modulated by elevated temperature and organic pollutants. *Aquatic Toxicology*, 162, 82–93.
123. Farkas, J., Bergum, S., Nilsen, E. W., Olsen, a. J., Salaberria, I., Ciesielski, T. M., ączek, T. B Konieczna, L., Salvenmoser, W., & Jenssen, B.M. (2015). The impact of TiO₂ nanoparticles on uptake and toxicity of benzo (a) pyrene in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Science of The Total Environment*, 511, 469–476.

124. Ferin, J, Oberdörster, G., Penney, D.P., Soderholm, S.C., Gelein, R., & Piper, H.C. (1990). Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? I. Particle clearance, translocation, morphology. *J. Aerosol. Sci.* 21, 381–384.
125. Ferreira-Cravo M, Welker Alexis F, & Hermes-Lima M. (2010). The connection between oxidative stress and estivation in gastropods and anurans. *Prog Mol Subcell Biol* 49, 47–61.
126. Filomeni, G., Rotilio, G., & Ciriolo, M.R. (2002). Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol*, 64 (5-6), 1057-1064.
127. Fisichella, M., Berenguer, F., Steinmetz, G., Auffan, M., Rose, J., & Prat, O. (2014). Toxicity evaluation of manufactured CeO₂ nanoparticles before and after alteration : combined physicochemical and whole-genome expression analysis in Caco-2 cells, 1–15.
128. Flora, S.J., Mehta, A., Satsangi, K., Kannan, G.M., & Gupta, M. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in rat brain: response to combined administration of citric acid and HEDTA. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 134(3), 319-328.
129. Forbes, V.A., Forbes, T.L., & Rivière J-L. (1997). Écotoxicologie: théorie et applications. Editions Quae, Paris. 424 p.
130. Franco, A.A., Odom R.S., & Rando, T.A. (1999). Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 27 (9-10), 1122-1132.
131. Franklin, N.M., Roger, N.J., Apte, S.C., Batley, G.E., Gadd, G.E., & Case, P.S. (2007). Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO and ZnCh to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environ. Sei. Technol.*, 41, 8484-8490.
132. Franzellitti, S., & Fabbri, E. (2005). Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem Biophys Res Commun*, 336(4), 1157-1163.

133. Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., & Giamberini, L. (2015). Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. *Aquatic Toxicology*, 158, 63–74.
134. Gecheva, G., & Yurukova, L. (2014). Water pollutant monitoring with aquatic bryophytes: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 12(1), 49–61.
135. Geret, F., Jouan, A., Turpin, V., Bebianno, M.J., & Cosson, R.P. (2002). Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalves mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 15, 61–66.
136. GIEC. (2007). Bilan 2007 des changements climatiques : Un Rapport du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat. *Rapport de synthèse* 114p.
137. Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Perceval, O., Hare, L., Pinel-Alloul, B., & Pellerin, J. (2003). Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.* 64, 185-200.
138. Gimbert, F. (2006). Cinétique de transfert de polluants métalliques du sol à l'escargot. Thèse de doctorat, Université de Franche Comté, France.192 p.
139. Gimbert, F., de Vaufleury, A., Douay, F., Coeurdassier, M., Scheifler, R., & Badot, P.-M. (2008). Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 70, 138–146.
140. Gimbert, F., De Vaufleury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., & Badot, P.-M. (2006). Modelling chronic exposure to contaminated soil: A toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environ. Int.*, 32, 866–875.
141. Goldsworthy, G.J., Mordue, W., & Guthkelch, J. (1972). Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol* 18 (3), 545.
142. Golub, M.S., & Germann, S.L. (2000). Long-term consequences of developmental aluminum (Al) in mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 22 (3), 460.

143. Gomes, S. I. L., Hansen, D., Scott-Fordsmand, J. J., & Amorim, M. J. B. (2015). Effects of silver nanoparticles to soil invertebrates: Oxidative stress biomarkers in *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 199, 49–55.
144. Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A. C., Cravo, A., & Bebianno, M. J. (2013). Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 84, 51–59.
145. Gomes, T., Pereira, C. G., Cardoso, C., Pinheiro, J. P., Cancio, I., & Bebianno, M. J. (2012). Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 118-119, 72–79.
146. Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Pinheiro, J.P., & Bebianno, M.J. (2014). Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 101, 208–214.
147. Gomes, T., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Pereira, C.G., Cardoso, C., & Bebianno, M.J. (2011) Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Sci Technol*, 45 (21), 9356–9362.
148. Gomot, A., & Pihan, F. (1997). Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38, 85-94.
149. Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., & Bruckert, S. (1989). Influence of soil on the growth of the land snail *Helix Aspersa*. An experimental study of the absorption route for the stimulating factors. *J. Molluscan Stud.* 55, 1–7.
150. Gomot, L., & Enée, J. (1980). Biologie de la reproduction de l'escargot *Helix aspersa* Müller : les phases de la croissance et de la différenciation sexuelle. *Atti. Accad. Fisiocrit. Siena*, 37, 73-85.
151. González, C.M., & Aristizábal, B.H. (2012). Acid rain and particulate matter dynamics in a mid-sized Andean city: The effect of rain intensity on ion scavenging. *Atmospheric Environment*, 60, 164–171.

152. Goth, L. (1991a). Serum catalase: Reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clin Chem*, 37(12), 2043-2047.
153. Goth, L. (1991b). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 196, 143–152.
154. Grara, N. (2011). Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux .Thèse de doctorat de l'université de Annaba. 120p.
155. Grara, N., Atilia, A., Boucenna, M., Khaldi, F., Berrebbah, H., & Djebbar, M.R. (2012c). Effects of heavy metals on the snail *Helix aspersa* bioindicators of the environment pollution for human health. *Int. Conf. Appl. Life Sci.*, 241–246.
156. Grara, N., Berrebbah, H., Rouabhi, R., Atilia, A., & Djebbar, M.R. (2009). Impact of Pollution by Industrial Metallic Dust on Bio-Accumulator Organism *Helix aspersa*. *Global Veterinaria*, 3(4): 276-280.
157. Grara, N., Boucenna, M., Atilia, A., Berrebbah, H., & Djebbar, M.R. (2012a). Stress oxydatif des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-Est Algérien) chez l'escargot *Helix aspersa*. *Environ. Risque Sante.*, 11, 221-229.
158. Grara, N., Boucenna, M., Atilia, A., Berrebbah, H., & Djebbar, M.R. (2012b). Etude expérimentale de la bioaccumulation des éléments traces métalliques Cd, Cu, Zn et Pb chez l'escargot *Helix aspersa*. *Bulletin de l'Institut Scientifique*, Rabat, section Sciences de la Vie, 34 (2), 183-1 87.
159. Gratzel, M. (2001). Photoelectrochemical cells. *Nature*, 414, 338-344.
160. Gupta, A.K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995–4021.
161. Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Coquery, M., Mons, R., Abbaci, K., Giamberini, L., & Garric, J. (2011). Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Aquatic Toxicology*, 101(1), 100–108.
162. Gutteridge, J. (1992). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm*, 19, 598-620.

163. Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, W.B. (1974). Glutathion-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139.
164. Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57, 715-724.
165. Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
166. Hamdi-Ourfella, A. N., & Soltani, N. (2014). Qualité des sols dans deux sites du Nord-Est Algérien: utilisation d'une espèce bioindicatrice de la pollution des sols. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (S2) 2527-2533.
167. Hameed Hyder, M.A. (2003). *Nanotechnology and environment: potential applications and environmental implications of nanotechnology*. Master's Thesis, Technische Universität Hamburg-Harburg, Allemagne.
168. Hamza-Chaffai, A., Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., & El Abed, A. (1998). Effects of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61, 397-404.
169. 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, 205-213.
170. Hashimoto, M., & Imazato, S. (2015). Cytotoxic and genotoxic characterization of aluminum and silicon oxide nanoparticles in macrophages. *Dental Materials*, 31(5), 556-564.
171. Hatcher, E.L., Chen, Y., & Kang, Y.J. (1995). Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free radical biology & medicine*, 19, 805-812.

172. Hayes, J.D., & Pulford, D.J. (1995). The Glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30, 445-600.
173. Hayes, J.D., Flanagan, J.U., & Jowsey, I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.
174. Hedberg, Y., Gustafsson, J., Karlsson, H. L., Möller, L., & Odnevall Wallinder, I. (2010). Bioaccessibility, bioavailability and toxicity of commercially relevant iron- and chromium-based particles: *in vitro* studies with an inhalation perspective. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, 23.
175. Heikens, A., Peijnenburg, W.J.G.M. & Hendriks, A.J. (2001). Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution*, 113, 385-393.
176. Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H-C. & Kahru, A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71, 1308-1316.
177. Heusser, S., & Upuy, H.G. (2011). De la structure tissulaire à la réalisation des fonctions chez les gastéropodes pulmonés (I) Elément d'histologie et de physiologie des espèces *Helix aspersa* et *Helix pomatia*. *Folia conchyliologica*, 10, 1-26.
178. Hirrlinger, J., Resch, A., Gutterer, J.M., & Dringen, R. (2002). Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *J. Neurochem.* 82, 635–644.
179. Hirsch, V., Kinnear, C., Moniatte, M., Rothen-Rutishauser, B., Clift, M.J.D., & Fink, A. (2013). Surface charge of polymer coated SPIONs influences the serum protein adsorption, colloidal stability and subsequent cell interaction *in vitro*. *Nanoscale*. 5: 3723–3732.
180. Hispard, F., Schuler, D., de Vaufleury, A., Scheifler, R., Badot, P.M., & Dallinger, R. (2008b). Metal distribution and metallothionein induction after cadmium

- exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (gastropoda, pulmonata). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1533-1542.
181. Hispard, F., Schuler, D., De Vaufleury, A., Scheifler, R., Badot, P-M., & Dallinger, R. (2008). Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1533–1542.
 182. Hondow, N., Wang, P., Brydson, R., Holton, M., Rees, P., & Summers, H. (2012). TEM analysis of nanoparticle dispersions with application towards the quantification of *in vitro* cellular uptake. *Journal of physics: conference series*. IOP Publishing; 2012012020.
 183. Hopkin, S.P. (1989). Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. *Elsevier Applied Science*, NY, USA, 366 p.
 184. Hristozov, D.R., Gottardo, S., Critto, A., & Marcomini, A. (2012). Risk assessment of engineered nanomaterials: a review of available data and approaches from a regulatory perspective. *Nanotoxicology.*, 0, 1-19.
 185. HSDB. (2003). Aluminum. Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine. <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.
 186. Hsieh, H.-C., Chen, C.-M., Hsieh, W.-Y., Chen, C.-Y., Liu, C.-C., & Lin, F.-H. (2015). ROS-induced toxicity: exposure of 3T3, RAW264.7, and MCF7 cells to superparamagnetic iron oxide nanoparticles results in cell death by mitochondria-dependent apoptosis. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2).
 187. Hu, C.W., Li, M., Cui, Y.B., Li, D.S., Chen, J., & Yang, L.Y. (2010). Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol Biochem*, 42(4), 586–591.
 188. Hu, J., Wang, D.M., Wang, J.T., Wang, J.M. (2012). Bioaccumulation of Fe₂O₃ (magnetic) nanoparticles in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Pollut.* 162, 216 –222.
 189. Hussein, A.K. (2015). Applications of nanotechnology in renewable energies—A comprehensive overview and understanding. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 460–476.

190. Ingersoll, C.G., MacDonald, D.D., Wang, N., Crane, J.L., Field, L.J., Haverland, P.S., Kemble, N.E., Lindskoog, R.A., Severn, C., & Smorong, D.E. (2000). Prediction of sediment toxicity using consensus-based freshwater sediment quality guidelines, U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), Chicago.
191. Ireland, M.P. (1982). Sites of water, zinc and calcium uptake and distribution of these metals after cadmium administration in *Arion ater* (Gastropoda: Pulmonata). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73A, 217-221.
192. IRSTEA. (2010). Glossaire et index des sigles. *Sciences Eaux et Territoires*, 1, 55-60.
193. Iscan, M., Coban, T., & Eke, B.C. (1994). Differential combined effect of cadmium and nickel on hepatic and renal glutathione S-transferase of the guinea pig. *Environ Health Perspect* 102: 69-72.
194. 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.
195. IUCLID. (2000). Aluminum. International Uniform Chemical Information Database, European Commission ISPRA.
196. Jia, Y., Zhong, C., & Wang, Y. (2001a). Effects of aluminum on amino acid neurotransmitters in hippocampus of rats. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 35(6):397-400.
197. Jakubiak, M., Giska, I., Asztemborska, M., & Bystrzejewska-Piotrowska, G. (2014). Bioaccumulation and biosorption of inorganic nanoparticles: factors affecting the efficiency of nanoparticle mycoextraction by liquid-grown mycelia of *Pleurotus eryngii* and *Trametes versicolor*. *Mycological Progress*, 13(3), 525–532.
198. Kabata-Pendias, A., & Pendias, H. (2001). Trace elements in soils and plants. CRC Press.
199. Kambale, N.A., & Potdar, V.V. (2011). Metallic concretions in the nephrocytes of freshwater snail *Bellamya bengalensis*. *Bionano Frontier*, 4 (2), 264-266.
200. Kerney, M., & Cameron, R.A.D. (2006). A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Delachaux et Niestlé SA, Paris. 97 p.

201. Kim, J.H., Kim, J.H., Kim, K.-W., Kim, M.H., & Yu, Y.S. (2009). Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood-retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity. *Nanotechnology*, 20, 1-8.
202. Kim, M., In-Young Ahn, Cheon, J., & Park, H. (2009). Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione-S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 152, 207–213.
203. Klobucar, G.I.V., Lajtner, J. & Erben, R. (1997). Lipid peroxydation and histopathological changes in the digestive gland of a freshwater *Planorbis corneus* L. (Gastropoda: Pulmonata) exposed to chronic and sub-chronic concentrations of PCP. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 128-134.
204. Koedrith, P., Boonprasert, R., Kwon, J. Y., Kim, I.-S., & Seo, Y.R. (2014). Recent toxicological investigations of metal or metal oxide nanoparticles in mammalian models *in vitro* and *in vivo*: DNA damaging potential, and relevant physicochemical characteristics. *Molecular & Cellular Toxicology*, 10(2), 107–126.
205. Koh, W.T.H., & Wong, P.K. (2005). Competing at the frontier: the changing role of technology policy in Singapore's economic strategy, *Technol. Forecast. Soc. Chang.* 72 255–285.
206. Konings, A.W., & Penninga, P. (1985). On the importance of the level of glutathione and the reactivity of the pentose phosphate pathway in heat sensitivity and thermotolerance. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 48, 409–422.
207. Kopecka, J., Rybakovas, A., Barsiene, J., & Pempkowiak, J. (2004). AChE levels in mussels and fish collected of Lithuania and Poland (southern Baltic). *Oceanologia.*, 46, 405–418.
208. Kourtidis, A., Drosopoulou, E., Nikolaidis, N., Hatzi, V.I., Chintiroglou C.C., & Scouras, Z.G. (2006). Identification of several cytoplasmic HSp70 genes from the

- Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and their long-term evolution in Mollusca and Metazoa. *J Mol Evol*, 62, 446-459.
209. Kruatrachue, M., Sumritdee, C., Pokethitiyook, P., & Singhakaew, S. (2011). Histopathological effects of contaminated sediments on golden apple snail (*Pomacea canaliculata*, Lamarck 1822). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(6), 610–614.
210. Krug, H.F., & P. Wick. (2011). Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge. *Angew. Chem.Int. Ed.*, 50, 1260-1278.
211. l'USEPA. (1998). Toxicological review of hexavalent chromium. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS) .CAS No. 18540-29-9.
212. La Rocca, B.V. (2004). Mise au point et validation, sur sites contaminés, (ETM-HAP) d'un test de biosurveillance en microcosme : croissance et bioaccumulation par le gastéropode terrestre *Helix aspersa aspersa*. Thèse de doctorat, l'université de Metz, 266p.
213. Labrot, F., Ribera, D., Saint-Denis, M., & Narbonne, J.F. (1996). *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*. 1, 21-28.
214. Ladhar-Chaabouni, R, Smaoui-Damak, W., & Hamza-Chaffai, A. (2009). *In vivo* variation of some biomarkers with time and cadmium concentration in the cockle *Cerastoderma glaucum*. *Marine biology research*, 5 (5), 478-486.
215. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., & Ramade, F. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Paris, Masson, 418 p.
216. Larba, R., & Soltani, N. (2014). Use of the land snail *Helix aspersa* for monitoring heavy metal soil contamination in Northeast Algeria. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(8), 4987–4995.

217. Lawton, L.J., & Donaldson, W.E. (1991). Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research*, 28, 83–97.
218. Lee, B. C., Kim, K. T., Cho, J. G., Lee, J. W., Ryu, T. K., Yoon, J. H., & Choi, K. H. (2012). Oxidative stress in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to TiO₂ nanoparticles. *Molecular & Cellular Toxicology*, 8(4), 357–366.
219. Lee, B.I., Qu, L., & Copeland, T. (2005). Nanoparticle for materials design: present and future. *J. Ceram. Process. Res.*, 6, 31–40.
220. Leomanni, a., Schettino, T., Calisi, A., Gorbi, S., Mezzelani, M., Regoli, F., & Lionetto, M.G. (2015). Antioxidant and oxidative stress related responses in the Mediterranean land snail *Cantareus apertus* exposed to the carbamate pesticide Carbaryl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 168, 20–27.
221. Lesser, M.P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology, *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 253–278.
222. Linhua, H., Zhenyul, W., & Baoshan, X. (2009). Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J. Environ. Sci.*, 21, 1459–1466.
223. Liu, Y., Zhou, Q.X., Xie, X.J., Lin, D.S., Dong, L.X. (2010). Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene. *Ecotoxicology* 19, 1551–1559.
224. Livingstone, D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
225. Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L.D., Bucke, D., & Law R.J. (1993). Prooxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Marine Pollution Bulletin.*, 26, 602-606.

226. Logothetidis, S. (2011). Focus on the multidisciplinary of nanosciences & nanotechnologies. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, 176(19), 176.
227. Lohmann, R., Breivik, K. Dachs, J. & Muir, D. (2007). Review: Global fate of POPs: Current and future research directions. *Environ Pollut.* 150, 150–165.
228. Lu, L., Sui, M. L., & Lu, K. (2000). Superplastic extensibility of nanocrystalline copper at room temperature. *Science*, 287(5457), 1463–1466.
229. Ma, R., Levard, C., Marinakos, S.M., Cheng, Y., Liu, J., Michel, F.M., Brown Jr. G.E., & Lowry, G.V. (2012). Size-Controlled Dissolution of Organic-Coated Silver Nanoparticles. *Environ. Sei. Technol.*, 46, 752-759.
230. Maas, S., Scheifler, R., Benslama, M., Crini, N., Lucot, E., & Brahmis, Z. (2010). Spatial distribution of heavy metal concentrations in urban, suburban and agricultural soils in a Mediterranean city of Algeria. *Environmental Pollution*, 158, 2294–2301.
231. Macary, F., Morin, S., Probst, J.L. & Saudubray, F. (2014). A multi-scale method to assess pesticide contamination risks in agricultural watersheds. *Ecol. Indic.* 36, 624–639.
232. Makarucha, A.J., Todorova, N. & Yarovsky, I. (2011). Nanomaterials in biological environment: a review of computer modelling studies *Eur. Biophys. J.*, 40, 103-115.
233. Manzl, C., Krumschnabel, G., Schwarzbaum, P.J., & Dallinger, R. (2004). Acute toxicity of cadmium and copper in hepatopancreas cells from the Roman snail (*Helix pomatia*). *Comp. Biochem. Physiol.* 138 C, 45-52.
234. Marano, F., Hussain, S., Rodrigues-Lima, F., Baeza-Squiban, A., & Boland, S. (2011). Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol.*, 85, 733–741.
235. Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., & Giamberini, L. (2002). Cellular and Subcellular. Distribution of Metals in Molluscs. *Microscopy Research and Technique*, 56, 358-392.

236. Markert, B., Breure, A., Zechmeister, H. (Eds) (2003a). Bioindicators and biomonitors. Principles, concepts and applications. *Elsevier, Amsterdam, the Netherlands*.
237. Markert, B., Oehlmann J., & Roth, M. (1997). General aspects of heavy metal monitoring by plants and animals. In: Subramanian G, Iyengar V (Eds) Environmental biomonitoring–exposure assessment and specimen banking, ACS Symposium, 654. American Chemical Society, Washington, DC.
238. Martin, A.W., & Deyrup-Olsen, I. (1986). Function of the epithelial channel cells of the body walls of a terrestrial slug, *Ariolimax columbianus*. *Journal of Experimental Biology* 121, 301-314.
239. Martoja, R., & Martoja, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, 347pages.
240. Martynova, M.G., Bystrova, O.A., Shabelnikov, S.V., Margulis, B.A., & Prokofjeva, D.S., (2007). Hsp70 in the atrial neuroendocrine units of the snail, *Achatina fulica*, *Cell Biology International*, 31, 413-419.
241. Matès J.M. (2000). Effect of antioxidant enzyme in the molecular control of reactive oxygen species. *Toxicology* 153, 83-104.
242. Matozzo, V., Tomei, A., & Marin, M.G. (2005). Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1686–1693.
243. Mazzia, C., Capowiez, Y., Sanchez-Hernandez, J.C., Köhler, H.-R., Triebskorn, R., Rault, M. (2011). Acetylcholinesterase activity in the terrestrial snail *Xeropicta derbentina* transplanted in apple orchards with different pesticide management strategies. *Environmental Pollution.*, 159 (1), 319-323.
244. McCarthy, M.P., Carroll, D.L., & Ringwood, A.H. (2013). Tissue specific responses of oysters, *crassostrea virginica*, to silver nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, 138-139, 123–128.

245. 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.
246. Miller W.G. (2014). Openstat. Free statistical software written, in Free Statistics Programs and Materials by Bill Miller.
247. Mora, P. (1998). Caractérisation des cholinestérases de trois mollusques bivalves : *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et *Corbicula fluminea*. Contribution au développement d'un biomarqueur de contamination des milieux marins et dulçaquicoles. Rapport de Thèse N° 1912, Université Bordeaux I, Bordeaux.
248. Morsy, G.M., Abou El-Ala, K.S., & Ali, A.A. (2013a). Studies on fate and toxicity of nanoalumina in male albino rats: lethality, bioaccumulation and genotoxicity. *Toxicology and Industrial Health*.
249. Mortimer, M., Kasemets, K., & Kahru, A. (2010). Toxicity of Znü and Cuü nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophile*. *Toxicology*, 269, 182-189.
250. Mouneyrac, C., Buffet, P.E., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Guibbolini, M., Faverney, C.R. De, ... Valsami-Jones, E. (2014). Fate and effects of metal-based nanoparticles in two marine invertebrates, the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* and the annelid polychaete *Hediste diversicolor*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(13), 7899–7912.
251. Mukherjee, S.P., Davoren, M., & Byrne, H.J. (2010). *In vitro* mammalian cytotoxicological study of PAMAM dendrimers - towards quantitative structure activity relationships. *Toxicol. in vitro*, 24, 1169-1177.
252. Murray, A. R., Kisin, E., Inman, A., Young, S. H., Muhammed, M., Burks, T., & Shvedova, A. a. (2013). Oxidative Stress and Dermal Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles *In Vitro*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67(2), 461–476.
253. Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K. Nakazato, Y., Arimori, A., Isobe, M., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Yamashita, T. Yamashita, K.,

- Yoshida, T., Nagano, K. Abe, Y., Yoshioka, Y., Kamada, H., Imazawa, T., Itoh, N., Tsunoda, S.-I., & Tsutsumi, Y. (2010). Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie*, 65, 199-201.
254. Nagajyoti, C.P., Lee D.K., & Sreekanth, M.V.T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8, 199–216.
255. Naha, P.C., Davoren, M. Casey, A. & Byrne, H.J. (2009). An Ecotoxicological Study of Poly (amidoamine) Dendrimers toward quantitative structure activity relationships. *Environ. Sei. Technol.*, 43, 6864-6869.
256. Nasrolahi, A., Smith, B.D., Ehsanpour, M., Afkhami, M., & Rainbow, P.S. (2014). Biomonitoring of trace metal bioavailabilities to the barnacle *Amphibalanus amphitrite* along the Iranian coast of the Persian Gulf. *Marine Environmental Research*, 101, 215–224.
257. Neoh, K.G. Wang, R., & Kang. E.T. (2015). Surface nanoengineering for combating biomaterials infections. *Biomaterials and Medical Device - Associated Infections*, 133-161.
258. Nesto, N., Romano, S., Moschino, V., Mauri, M., & Da Ros, L. (2007). Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 55(10-12), 469–484.
259. Nica, D.V., Bura, M. Gergen, I., Harmanescu, M., & Bordean, D-M. (2012). Bioaccumulative and conchological assessment of heavy metal transfer in a soil-plant-snail food chain. *Chemistry Central. Journal.*, 6, 55.
260. Niska, K., Santos-Martinez, M. J., Radomski, M. W., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2015). CuO nanoparticles induce apoptosis by impairing the antioxidant defense and detoxification systems in the mouse hippocampal HT22 cell line: Protective effect of crocetin. *Toxicology in Vitro*, 29(4), 663–671.

261. 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.
262. Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., & Aerts, R. (2006). Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the land snail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. *Ecotoxicology* 15, 295-304.
263. Nzengue, Y. (2008). Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de P53. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier – Grenoble 1, France .299 pages.
264. Oberdorster, G. (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 74, 1–8.
265. Oberdorster, G., Ferin, J. Finkelstein, J., Wade, P., & Corson, N. (1990). Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? II. Lung lavage studies. *J Aerosol. Sci.*, 21, 384- 387.
266. Oberdorster, G., Ferin, J. Gelein, R. Soderholm, S.C., & Finkelstein, J. (1992). Role of the alveolar macrophage in lung injury: Studies with ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, 97, 193-197.
267. Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
268. OCDE. 2012. Guidance Document on Standardized Test for Evaluating Chemicals for Endocrine, Séries sur essais l'évaluation n° 150 OCDE. Paris.
269. Oesterling, E., Chopra, N., Gavalas, V., Arzuaga, X., Lim, E.J., Sultana, R., Butterfield, D.A., Bachas, L., & Hennig, B. (2008). Alumina nanoparticles induce expression of endothelial cell adhesion molecules. *Toxicology Letters*, 178, 160–166.
270. OMS IPCS. (1997). Environmental Health Criteria 194: Aluminum. World Health Organisation, International Programme on chemical Safety. <http://www.inchem.org/fullist.htm>.

271. OMS. (2014). Organisation Mondiale de la Santé, Air pollution estimates, March 2014. www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/fr. Consulté le 24/02/2015.
272. Osterauer, R., Köhler, H.R., & Triebkorn, R. (2010). Histopathological alterations and induction of hsp70 in ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to PtCl₂. *Aquatic Toxicology*, 99, 100-107.
273. Otitolaju, A.A., Ajikobi, D.O., Egonmwan, R.I. (2009). Histopathology and bioaccumulation of heavy metals (Cu & Pb) in the giant land snail, *Archachatina marginata* (Swainson). *The Open Environmental Pollution and Toxicology*, 1, 79–88.
274. Owen, G. (2012). Digestion. In: Wilbur, K.M., Yonge, C.M. (Eds.), *Physiology of Mollusca*. Academic Press, New York, pp. 53-96.
275. Ozden, S., Catalgol, B., Gezginci-Oktayoglu, S., Karatug, A., Bolkent, S., Alpertunga, B. (2013). Acute effects of methiocarb on oxidative damage and the protective effects of vitamin E and taurine in the liver and kidney of Wistar rats. *Toxicol. Ind. Health* 29, 60–71.
276. Padjama, R.J., & Rao, M.B. (1994). Effect of an organochloric and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of freshwater snail, *Bellamyia dissimilis* (Müller). *Bull Environ Contam Toxicol*, 53, 142-148.
277. Padovani, S., Sada, C., Mazzoldi, P., Brunetti, B., Borgia, I., Sgamellotti, A., Giulivi, A., D'Acapito, F., & Battaglin, G. (2003). Copper in glazes of renaissance luster pottery: Nanoparticles, ions, and local environment. *Journal of Applied Physics*, 93(12), 10058–10063.
278. Pandey, L. K., Kumar, D., Yadav, A., Rai, J., & Gaur, J.P. (2014). Morphological abnormalities in periphytic diatoms as a tool for biomonitoring of heavy metal pollution in a river. *Ecological Indicators*, 36, 272–279.

279. Park, E.-J., Sim, J., Kim, Y., Han, B.S., Yoon, C., Lee, S., & Kim, J.-H. (2015). A 13-week repeated-dose oral toxicity and bioaccumulation of aluminum oxide nanoparticles in mice. *Archives of Toxicology*, 89(3), 371–379.
280. Pautrat, J.L. (2011). Nanosciences: Evolution or revolution? *Comptes Rendus Physique*, 12(7), 605–613.
281. Peakall, D.B. (1994). Biomarkers, the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News*, 1, 55-60.
282. Peijnenburg, W., Baerselman, R., de Groot, A., Jager, T., Leenders, D., Posthuma, L. & Van Veen, R. (2000). Quantification of metal bioavailability for Lettuce (*Lactuca sativa* L.) in field soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39, 420-430.
283. Pradell, T., Molera, J., Smith, A. D., & Tite, M. S. (2008). The invention of lustre: Iraq 9th and 10th century's ad. *Journal of Archaeological Science*, 35(5):1201–1215.
284. Prevodnik, A., Gardestrom, J., Lilja, K., Elfwing, T., McDonagh, B., Petrovic, N., et al. (2007). Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. *Aquat Toxicol* 82, 63–71.
285. Prokop, G., Schamann, M., Edelgaard, I., Gentile, A.R. & Agency, E.E. (2000). Management of contaminated sites in Western Europe. Office for official publications of the European communities, Copenhagen [Denmark]; Luxembourg; Lanham MD.
286. Pujalté, I., Passagne, I., Brouillaud, B., Tréguer, M., Durand, E., Ohayon-Courtès & C., L'Azou, B. (2011). Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Part. Fibre Toxicol.*, 8, 1-16.
287. Qi, H.J., Teo, K.B.K., Lau, K.K.S., Boyce, M.C., Milne, W.I., Robertson, J., & Gleason, K.K. (2003). Determination of mechanical properties of carbon nanotubes and vertically aligned carbon nanotube forests using nanoindentation. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 51(11-12), 2213– 2237.

288. Rabitsch, W.B. (1996). Metal accumulation in terrestrial pulmonates at a lead / zinc smelter site in Arnoldstein, Austria. *Bull Environ Contam Toxicol*; 56, 734-741.
289. Radi, F., Beckman, J.S., Busch, K.N., & Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J.Biol.Chem.*, 266 4244-4250.
290. 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.
291. Radwan, M.A., El-Gendy, K.S., & Gad, A.F. (2010). Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere.*, 79 (1), 40-46.
292. Radwan, M.A., Essawy, A.E., Abdelmeguid, N.E., Hamed, S.S., & Ahmed, A.E. (2008). Biochemical and histochemical studies on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90, 154-167.
293. Radziun, E., Dudkiewicz Wilczyńska, J., Ksiazek, I., Nowak, K., Anuszewska, E. L., Kunicki, A., Olszyna, A., & Zabkowski, T. (2011). Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1694–1700.
294. Rainbow, P.S. & Dallinger, R. (1993). Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. In: Dallinger, R., Rainbow, P.S., Eds. *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 119–131.
295. Rainbow, P.S. (2002). Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: Why and so what? *Environmental Pollution* 120, 497-507.
296. Rainbow, P.S., Smith, B.D., & Luoma, S.N. (2009). Biodynamic modelling and the prediction of Ag, Cd and Zn accumulation from solution and sediment by the polychaete *Nereis diversicolor*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 390, 145-155.

297. Rajkumar, K. S., Kanipandian, N., & Thirumurugan, R. (2015). Toxicity assessment on haematology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-exposed freshwater fish *Labeo rohita*. *Applied Nanoscience*.
298. Ramos-Vasconcelos, G.R., Cardoso, L.A., & Hermes-Lima, M. (2005). Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140, 165–174.
299. Ramsden, C.S., Henry, T.B., Handy, R.D. (2013). Sub-lethal effects of titanium dioxide nanoparticles on the physiology and reproduction of zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 126, 404–413.
300. Ramskov, T., Croteau, M., Forbes, V.E., & Selck, H. (2015). Biokinetics of different-shaped copper oxide nanoparticles in the freshwater gastropod, *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology*, 163, 71–80.
301. Rathore, M., Mohanty, I. R., Maheswari, U., Dayal, N., Suman, R., & Joshi, D. S. (2014). Comparative *in vivo* assessment of the subacute toxicity of gold and silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(4), 1–12.
302. Ratner, M., & Ratner, D. (2003). Nanotechnologies La révolution de demain, Paris, France, Campus Press, 191 p.
303. Regoli, F., & 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.
304. 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.
305. Ren, G., Hu, D., Cheng, E.W.C, Vargas-Reus, M.A., Reip, P., & Allaker, R.P. (2009). Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 33, 587–590.

306. Ribera, D., Narbonne, J.F., Michel, X., Livingstone, D.R. & O'hara, S. (1991). Responses of antioxydants and lipid peroxydation in mussels to oxydative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 100, 178-181.
307. Roberts, R.D., & Johnson, M.S. (1978). Dispersal of heavy metals from abandoned mine workings and their transference through terrestrial food chains. *Environ. Pollut.*, 16, 293- 310.
308. Roco, M.C. (2001). International strategy for nanotechnology research and development. *J Nanopart. Res.*, 3, 353-360.
309. Rodriguez-Ariza, A., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J.R., Abril, N., Dorato, G., Toribio, F., Bárcena, J.A., Peinado, J., Pueyo, C., & López-Barea, J. (1993). Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Science of the Total Environment. (Suppl.)*, 109-116.
310. Roth, U, Von Roepenack-Lahaye, E., & Clemens, S. (2006). Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺. *Journal of Experimental Botany* 57 (15), 4003-4013.
311. Rozman, K., & Klaassen, C.D. (1996). Absorption, distribution, and excretion of toxicants, dans C.D. Klaassen (rédacteur) *Casarett and Doull's Toxicology. The Basis Science of Poisons*, 5^e édition, Mc Graw - Hill, New York, p 50-87.
312. Russell, L.K., DeHaven, J.I. & Botts, R.P. (1981). Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, 634-640.
313. Safruk, A.M., Berger, R.G., Jackson, B.J., Pinsent, C., Hair, A.T., & Sigal, E.A. (2015). The bioaccessibility of soil-based mercury as determined by physiological based extraction tests and human biomonitoring in children. *Science of The Total Environment*, 518-519, 545–553.
314. Sakai, N., Matsui, Y., Nakayama, A. Tsuda, A., & Yoneda, M. (2011). Functional-dependent and size-dependent uptake of nanoparticles in PC 12. *J. Phys. Conf. Ser.*, 304, 012049.

315. Salama, A.K., Osman, K.A., Saber, N.A., & Sliman, S.A. (2005). Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8(1) 92-96.
316. Salinas, A.E., & Wong, M.G. (1999). Glutathione S-transferases – a review. *Curr. Med. Chem.*, 4, 279–309.
317. Salmon, A., Erb, C., Meshorer, E., Ginzberg, D., Adani, Y., Rabinovitz, I., Amitai, G., & Soreq, H. (2005). Muscarinic modulations of neuronal anticholinesterase responses. *Chemico-Biological Interactions*, 157-158, 105–113.
318. Sarkar, A., & Sil, P. C. (2014). Iron oxide nanoparticles mediated cytotoxicity via PI3K/AKT pathway: Role of quercetin. *Food and Chemical Toxicology*, 71, 106–115.
319. Scheifler, R., de Vaufléury, A., Coeurdassier, M., Crini, N., & Badot, P-M. (2006). Transfer of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25, 815–822.
320. Scheifler, R., de Vaufléury, A., Coeurdassier, M., Crini, N., & Badot, P.M. (2006). Transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: a microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 815-822.
321. Scheifler, R., Gomot-de Vaufléury, A., Toussaint, M.L., & Badot, P-M. (2002b). 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.
322. Scherrer, P. (1918). *Gttinger Nachrichten*, 298.
323. Schnieder, T., Jansson, A, Jensen, K.A., Kristjansson, V., Luotamo, M., Nygren, O., Savolainen, K., Skaug, V., Thomassen, Y., Tossavainen, A., Tuomi, T. & Wallin, H. (2007). Evaluation and control of occupational health risks from nanoparticles, Nordic Council of Ministers, *Copenhagen, TemaNord*, 581, 96 p.
324. Senesi, G.S., Baldassarre, G., Senesi, N., & Radina, B. (1999). Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere*, 39(2), 343-377.

325. Shaw, J.P., Large, A.T., Donkin, P., Evans, S.V., Staff, F.J., Livingstone, D.R., Chipman, J.K., & Peters, L.D. (2004). Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 67, 325–336.
326. Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyek, C., Newhall, A., & Freidman, L. (1966). A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt. Biochem*, 19, 415-428.
327. Shoults-Wilson, W.A., Reinsch, B.C., Tsyusko, O.V., Bertsch, P.M., Lowry, G.V., & Unrine, J.M. (2011a). Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*). *Nanotoxicology* 5, 432-444.
328. Shukla, R. K. S. Sharma, V., Pandey, A.K., Singh, S., Sultana, S., & Dhawan, A. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicology in Vitro*, 25 (1), 231–241.
329. Shukla, G.S., Shukla, A., Potts, R. J., Osier, M., Hart, B.A., & Chiu, J.F. (2000). Cadmiummediated oxidative stress in alveolar epithelial cells induces the expression of gammaglutamylcysteine synthetase catalytic subunit and glutathione S-transferase alpha and pi isoforms: potential role of activator protein-1. *Cell biology and toxicology*, 16, 347- 62.
330. Sies, H. (1991). Oxidative stress introduction. In: Sies H. (ed.), Oxidative stress oxidants and antioxidants, *Academic Press, San Diego*, 1-15.
331. Simkiss, K., & Mason, A. Z. (1983). In *The Mollusca: Environmental Biochemistry and Physiology*; Hochachka, P. W., Ed.; *Academic Press: New York, NY*, 101-163.
332. Simkiss, K., & Taylor, M.G. (1989). Metal fluxes across the membrane of aquatic organisms. *Reviews in Aquatic Sciences* 1, 173-188.
333. Siritantikorn, A., Johansson, K., Ahlen, K., Rinaldi, R., Suthiphongchai, T., Wilairat, P., & Morgenstern, R. (2007). Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355, 592–596.

334. Solé, M., Potrykus, J., Fernandez-Dias, C., & Blasco, J. (2004). Variations on stress defences and metallothionien levels in the Senegal sole, *Solea senegalensis*, during early larval stage. *Fish Physiol. Biochem.*, 30, 57-66.
335. Sonavane, G., Tomoda, K., Sano, A., Ohshima, H., Terada, H., & Makino, K. (2008). *In vitro* permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloid Surface B*, 65, 1-10.
336. Sonvico, F., Dubernet, C., Colombo, P., & Couvreur, P. (2005). Metallic colloid nanotechnology, applications in diagnosis and therapeutics. *Curr Pharm Des* 11, 2095-2105.
337. Staniek, K., & Nohl, H. (2000). Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochimica Biophysica. Acta* 1460, 268-275.
338. Staniek, K., & Nohl, H. (2000). Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochimica Biophysica Acta* 1460, 268-275.
339. Stankovic, S., & Jovic, M. (2012). Health risks of heavy metals in the Mediterranean mussels as seafood. *Environ Chem Lett* 2, 119–130.
340. Stankovic, S., & Stankovic, R.A. (2013). Bioindicators of toxic metals. In: Lichtfouse E et al (Eds) Environmental chemistry for a sustainable world, vol 2, chap 5. Springer, Berlin, p 80.
341. Stankovic, S., Jovic, M., Stankovic, R.A., & Katsikas, L. (2011a). Heavy metals in seafood mussels. In: Lichtfouse E et al (Eds) Risks for human health in: environmental chemistry for a sustainable world: Volume 1. , Chapter 9, pages 64, pp 311–375.
342. Starnes, D. L., Unrine, J. M., Starnes, C. P., Collin, B. E., Oostveen, E. K., Ma, R., Lowry, G.V., Bertsch, P.M., & Tsyusko, O. V. (2015). Impact of sulfidation on the bioavailability and toxicity of silver nanoparticles to *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 196, 239–246.
343. Stebounova, L.V., Guio, E., & Grassian, V.H. (2011). Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. *J Nanopart Res* 13, 233–244.

344. Steel R.G.D., & Torrie, J.H. (1982). Principles and Procedures of Statistics. 3rd Edn., *McGraw-Hill International Book Co.*, London.
345. Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., & Van Veld, P.A. (1992). Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In "*Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*". R. Huggett, R.K., P. Mehrle and H. Bergman (Eds.). Boca Raton, FL, Lewis, 235-335.
346. Steinnes, E., Rambæk, J.P., & Hanssen, J.E. (1992). Large scale multi-element survey of atmospheric deposition using naturally growing moss as biomonitor. *Chemosphere* 25 (5), 735-752.
347. Stern, S. T., Adisheshaiah, P. P., & Crist, R. M. (2012). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*, 9(1), 20.
348. Studer, A.M., Limbach, L.K., Van Duc, L., Krumeich, F., Athanassiou, E.K., Gerber, L.C., Moch, H., & Stark, W.J. (2010). Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol Lett.*, 197, 169-174.
349. Sunderman, F.W., Marzouk, A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Reid, M.C. (1985). Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 15, 229-236.
350. Suntres, Z.S. (2002). Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*, 180, 65–77.
351. Suresh, K., & Mohandas, A. (1990). Effect of sublethal concentrations of copper on hemocyte number in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55, 325-331.
352. Suter, G.W. (1993). Ecological Risk Assessment, *Lewis Publishers*, Chelsea, Michigan, 196-215.

353. Swaileh, K.M. & Ezzughayyar, A. (2000). Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the land snail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47, 253-260.
354. Tadjine, A., Djebar, H., & Courtois, A. (2008). Toxicité des poussières rejetées par le complexe sidérurgique d'Annaba sur quelques paramètres hématologiques du lapin *Europeus*. *Environnement, Risques et Sante*, 7(3), 209–215.
355. Tedesco, S., Doyle, H., Redmond, G., & Sheehan, D. (2008). Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 66, 131-133.
356. Thit, A., Banta, G. T., & Selck, H. (2015). Bioaccumulation, subcellular distribution and toxicity of sediment-associated copper in the ragworm *Nereis diversicolor*: The relative importance of aqueous copper, copper oxide nanoparticles and microparticles. *Environmental Pollution*, 202, 50–57.
357. Thit, A., Selck, H., & Bjerregaard, H. F. (2013). Toxicity of CuO nanoparticles and Cu ions to tight epithelial cells from *Xenopus laevis* (A6): Effects on proliferation, cell cycle progression and cell death. *Toxicology in Vitro*, 27(5), 1596–1601.
358. Tiede, K., Boxall, A.B.A., Tear, S.P., Lewis, J., David, H., & Hassellöv, M. (2008). Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit Contam Part A*; 25, 795–821.
359. Torres, M.A., Testa, C.P., Gaspari, C., Masutti, M.B., Panitz, C.M.N., Curi-Pedrosa, R., Almeida, E.A., Mascio, P.D., & Filho, D.W. (2002). Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull*, 44, 923-932.
360. Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., & Schiestl, R.H. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. *Cancer Research* 69, 8784-8789.
361. Tsyusko, O.V., Hardas, S.S., Shoults-Wilson, W.A., Starnes, C.P., Joice, G., Butterfield, D.A., & Unrine, J. M. (2012). Short-term molecular-level effects of silver nanoparticle exposure on the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 171, 249–255.

362. Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L., Mikecz, A.V., Grether-Beck, S., & Schins, R.P.F. (2007). Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1(1): 52-71.
363. Valko, M., Morris, H., & Cronin, M.T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 12(10): 1161-1208.
364. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
365. Van der Oost R., Beyer J., & Vermeulen N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13 (2), 57-149.
366. Van Straalen, N.M., Butovsky, R.O., Pokarzhevskii, A.D., Zaitsev, A.S., & Verhoef, S.C. (2001). Metal concentrations in soil and invertebrates in the vicinity of a metallurgical factory near Tula (Russia). *Pedobiologia*, 45(5), 451-466.
367. Van Straalen, N.M., Donker, M.H., Vijver, M.G., & Van Gestel, C.A.M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136, 409-417.
368. Veltman, K., Huijbregts, M.A.J., & Hendriks, A.J. (2008). Cadmium bioaccumulation factors for terrestrial species: Application of the mechanistic bioaccumulation model OMEGA to explain field data. *Science of the Total Environment*, 406, 413-418.
369. Viard, B., Pihan, F., Promeyrat, S., & Pihan, J.C. (2004). Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: Bioaccumulation in soil, Gramineae and land snails. *Chemosphere*, 55, 1349-1359.
370. 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.
371. Vidal, M.L. (2001). Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalves d'eau douce *Corbicula fluminea*(Muller)- Purification et

caractérisation des Glutathion-S-Transferases .Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux. 267 p.

372. Wagner, B., Vogel, H., Zanchetta, G., & Sulpizio, R. (2010). Environmental change within the Balkan region during the past ca. 50 ka recorded in the sediments from lakes Prespa and Ohrid, *Biogeosciences*, 7, 3187–3198.
373. Walker, C., S. Hopkin, Sibly, R., & Peakall, D. (1996). Principles of ecotoxicology. Comparison of speciation and bioavailability of rare earth elements between wet rhizosphere soil and airdried bulk soil, *J. Analytica Chimica Acta*, 441, 147-156.
374. Wang, W.X., & Xu, P.J. (2009). Research progress in precipitation chemistry in China. *Prog. Chem.* 21, 266–281.
375. Weckberker, G., & Cory, G. (1988). Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells *in vitro*. *Cancer letters* 40, 257-264.
376. Wegener, J.W.M., Van Schaik, M.J.M., & Aiking, H. (1992). Active biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons by means of mosses. *Environmental Pollution*, 76 (1), 15-18.
377. Weiss, K.R., Brezina, V., Cropper, E.C., Heierhorst, J., Hooper, S.L., Probst, W.C., Rosen, S.C., Vilim, F.S., & Kupfermann, I. (1993). Physiology and biochemistry of peptidergic cotransmission in *Aplysia*. *J Physiol*, 87, 141 -151.
378. Wilkinson, K.J. (2012). Emerging issues in ecotoxicology: Characterization of (metallic) nanoparticles in aqueous media. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Editeurs, J.F. Féraud et C. Blaise, 13 p.
379. Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., & Zhu, W. (2011). Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci Total Environ*, 409, 1444–1452.
380. Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., & Jones, K.C. (2015). Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and

- soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of The Total Environment*, 511, 123–137.
381. Yager, C.M., & Harry, H.W. (1963). The uptake of radioactive zinc, cadmium and copper by the freshwater snail *Taphius glabratus*. *Malacologia*, 1, 339-53.
382. Yang, X., Feng, Y., He, Z., & Stoffella, P.J. (2005). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18, 339-353.
383. Yeo, M. K., & Nam, D. H. (2013). Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm: A comparison of TiO₂ nanoparticles and nanotubes. *Environmental Pollution*, 178, 166–172.
384. Zhan, G.D., Kuntz, J.D., Garay, J.E., & Mukherjee, A.K. (2003a). Electrical properties of nanoceramics reinforced with ropes of single-walled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters*, 83(6), 1228–1230.
385. Zhang, Q., Wang, C., Liu, W., Zhang, X., & Zhuang, S. (2012a). Evidence for DNA–diquat interaction and cytotoxicity *in vitro* in rat cells. *Environmental Chemistry Letters* 10, 35–39.
386. Zhang, Y., Zhu, L., Zhou, Y., & Chen, J. (2015). Accumulation and elimination of iron oxide nanomaterials in zebrafish (*Danio rerio*) upon chronic aqueous exposure. *Journal of Environmental Sciences*, 30, 223–230.
387. Zhao, F., Meng, H., Yan, L., Wang, B., & Zhao, Y. (2015). Nanosurface chemistry and dose govern the bioaccumulation and toxicity of carbon nanotubes, metal nanomaterials and quantum dots *in vivo*. *Science Bulletin*, 60(1), 3–20.
388. Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C., & Zhao, Y. (2011b). Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small*, 7(10), 1322–1337.
389. Zhong, X. H. Wang, R., Liu, L.B., Kang, M., Wen, Y.Y., Hou, F., Feng, J.M., & Li, Y.L. (2012). Structures and characterizations of bundles of collapsed double-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology* 23, 505712.

390. Zhou, J., Wang, W.N., Wang, A.L., He, W.Y., Zhou, Q.T., Liu, Y., & Xu, J. (2009). Glutathione-S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* Characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 150, 224-230.
391. Zhou, Y., Li, N., Zhuang, W., *et al.* (2009). Glutathione-S-transferase P1 gene polymorphism associated with gastric cancer among Caucasians. *Eur J Cancer*, 45, 1438-1442.

Effects of Metal Dust on Functional Markers and Histology of Gland Digestive and Kidney of the Land Snails (*Helix aspersa*) in the North East of Algeria

^{1,2}Mounir Boucenna, ²Houria Berrebbah, ²Amira Atailia,
²Nedjoud Grara and ²Mohamed Reda Djebar

¹Biology and Animal Physiology Department,
Faculty of Life and Natural Sciences, Ferhat Abbas Setif 1 University, Setif, Algeria
²Laboratory of Toxicology, Department of Biology,
Faculty of Sciences, Annaba University, BP 23000, Algeria

Abstract: The effect of metal dust on the terrestrial snail *Helix aspersa*, collected from an uncontaminated site in *Guelma city* (North east of Algeria) was investigated. Herein, snail *Helix aspersa* was treated with various doses 100, 500, 1000 and 1500 µg of industrial metal dust/g of diet, for a total duration of two weeks. The obtained results showed that metal dust treatment caused a significant increase in the levels of total protein, carbohydrate and lipids in the digestive gland, along with less effect on the carbohydrates in kidney when compared with their controls. Histological changes which observed in the selected organs following treatment with 1000 and 1500 µg of metal dust/g of diet were atrophy of the connective tissue, membrane destruction, cell necrosis, the appearance of inflammatory infiltrates. All these effects could be attributed in the first biological response of *Helix aspersa* to various pollutants.

Key words: *Helix aspersa* • Metal dust • Digestive gland • Kidney • Histopathology

INTRODUCTION

Trace metals (TMs) are naturally present in the environment but soils can exhibit extremely high levels of these persistent pollutants, often due to anthropogenic activities and such contamination may lead to harmful effects on wildlife [1-2]. World mining activities are known to release significant amounts of toxic metals into the surrounding environment [3]. Having such individual tolerance to metal-induced stress, allows some individuals to be more competitive than non-tolerant ones under polluted environments [4].

Land snails have an ecological role and importance as the most species-rich group of terrestrial mollusks; their ecological and biological attributes closely adhere to the preconditions of serving as suitable bioindicators. These ubiquitous and sinantropic mollusk species (*Helix aspersa*) are abundant in Northeast Algeria [5].

Snails are a good bio-accumulator of metals, may provide main links in transfer of chemicals from vegetation or plant litter to carnivores. Such transfer along food

chain is an important aspect of ecotoxicology. Snails are able to accumulate bioavailable metals in their organs and they present an important organotropism for the digestive gland and the kidney [6,7]. Using snails in toxicity bioassays is an attractive method, since snails are easy to culture in the laboratory and can be fed on artificial diets with the desired amounts of metals and they respond quickly to metal contamination in the range of sublethal doses [8,9]. This is due to their physiological particularities leading to pollutant accumulations through multiple routes of exposure: oral, dermal and respiratory [10].

Several studies have reported the crucial role of the anti-oxidant defense system in attenuating oxidative threat due to various chemicals [11]. Organisms can be tolerant to metal exposure following two main processes: acclimatization, adaptation, or both [12].

The digestive gland (or hepatopancreas) was chosen as a target organ in metal toxicity evaluations; this is due to its ability to uptake and to concentrate the contaminants by 5-10 folds higher than other organs [13].

Additionally, it's involved in accumulation and storage of metals [14-15] and in detoxification processes [16]. Changes in digestive cell structure and function, as a result of metal accumulation, have been well documented [14,17].

Gastropod epithelium consists of three cell types: excretory, calcium and digestive cells, the latter of which is the most abundant cell type [18]. The digestive glands also possess connective tissue, which is composed of pigment cells, rhogocytes (pore cells) and fibroblasts among other tissue types [19].

The kidney is rapidly accumulated Al and Fe but the increase was short-lived. The kidney may therefore be involved in elimination of metal not incorporated into the digestive gland [20]. Matricon-Gondran [21] indicted that the main region of the kidney characterized by epithelial folds of nephrocytes, the very proximal part has a reticular aspect due to the presence of large hemal spaces surrounded by podocyte-like cells.

The severity effects cell membranes of the apex and the microvilli, as well as the appearance of the cytoplasm, the nucleus, mitochondria, vacuole, endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus could be semi-quantitatively evaluated, allowing to identify three physiological states of the animal state "control" for unexposed animals, compensation status characterized by symptoms of reaction indicates that animals are able to tolerate sublethal poisoning by activating detoxification process and the status of non-compensation with symptoms of destruction that correspond to intracellular structures with visible damage due to toxic effects[22].

The aim of the current study was to evaluate the effects of industrial metal dust on the two target organs (digestive gland and kidney), following some biochemical parameters (metabolic) and histopathology studies of the land snail (*Helix aspersa*) exposed to metal dust in a dose dependent manner.-

MATERIALS AND METHODS

Snail's Collection: Gastropod terrestrial snails (*Helix aspersa*) were collected from an uncontaminated site of *Guelma city* (Northeast Algeria). Snails (10.5±0.26 g) were raised in the following optimal environmental conditions: photoperiod 18h light/24h, temperature (20±2°C), humidity 80 to 95% wheat flour in food. The animals were divided into transparent polystyrene boxes (25 x 15 x 15 cm) with perforated lid; each box contains a wet sponge to retain humidity. During the exposure period food is supplied in petri dishes regularly every day [23].

Chemical Equipment: Metal dust used in this study was collected from steel complex of El-Hajar (13km from the city of Annaba on the road N°. 44 (Northeastern Algeria)). Dust composition was chemically analyzed, using atomic absorption technique, allowing us to determine at least the presence of 07 trace metals (Table 1).

Treatment Mode: Processing snails was made by adding various concentrations of metal dust (100, 500, 1000, 1500 mg /g diet such as wheat flour). Snails were divided into 5 groups of 10 snails in each and they were undergone a daily treatment for two weeks [23].

Dissection and Tissue Preparation: After two weeks of treatment, the snails were sacrificed after freezing (-80°C), without prior fasting which could alter the expression levels of molecules sought. After dissection and removal of the two organs (digestive gland and kidney), from five randomly chosen snails of each experimental group, we evaluated some of biochemical parameters; total proteins, carbohydrates and lipids. From another five snails, we performed the chosen organ histopathological studies, following the usual technique of histology.

Measurement of Biochemical Parameters: The extraction of metabolites in both organs was performed according to the method of Shibko [25] that which total proteins are quantified by the Bradford method [26], the determination of carbohydrates was performed according to the method of Duchateau and Florkin [27]. Lipids were determined by the method of Goldsworthy [28].

Histopathological Study: Sections of the digestive gland and kidney from exposed and control animals were dissected and immediately fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h, processed by using a graded ethanol series and then embedded in paraffin. The paraffin sections were cut into 5µm thick slices and stained with hematoxylin and eosin for light microscopic examination. The sections were viewed and photographed. [29].

Statistical Data Analysis: The results obtained were subjected to analysis by ANOVA one way (treatment Doses), the analysis over treatments was also performed by using SAS (1999). Significant difference between two means was measured using Fisher's test (LSD_{5%}). The linear regressions were performed with Microsoft excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA.) [30].

Table 1: Composition in ppm Dust rejected by the Steelworks 1 and Steelworks 2 of the steel complex of El Hajar-Annaba [24].

Sample	Cu	Zn	Pb	Cr	Ni	Mn	Fe
Dust Steelworks 1	3.70	240	24.00	10	1.20	320	3000
Dust steelworks 2	7.00	480	62.40	12	1.30	540	3600
Total	10.70	720	88.40	22	2.50	860	6600

RESULTS

As shown in Table 2, proteins, carbohydrates and lipid levels were significantly increased ($P < 0.001$) in the digestive glands of treated snails with various concentrations of metal dust, when compared with control group.

In regard to the proportioning effect of total protein in the digestive gland, Table 3 shows that the minimum and maximum values content was registered at the control individuals with 1.62 ($\mu\text{g/g}$ fresh weight) and 3.92 ($\mu\text{g/g}$ fresh weight) as the highest dose respectively (Table 3).

Fisher's test revealed four homogeneous groups for the carbohydrate parameters. The group (a) includes the D3 and D4 doses with 28.26 and 30.52 ($\mu\text{g/g}$ fresh weight) respectively (Table 3). The group (b) is presented by snails exposed to 500 μg of metal dust/g of diet. The lowest rate of carbohydrates is observed in the control snails with 16.27 $\mu\text{g/g}$ of fresh weight (group (c)). The last group has an overlap between the two latter (b and c) for the 100 $\mu\text{g/g}$ (Table 3).

The average rate of lipids in the digestive gland is estimated at 0.37 ($\mu\text{g/g}$ of fresh weight), 0.16 and 0.81 ($\mu\text{g/g}$ of fresh weight) are the minimum and the maximum values noted at 100 $\mu\text{g/g}$ and 1000 $\mu\text{g/g}$ respectively (Table 3).

The statistical analysis (ANOVA) showed a significant difference in the levels of total proteins and lipids (Table 4), along with a slight significant difference at the 5% threshold ($\text{LSD}_{5\%} = 0.40$) for a dose of 5.13 $\mu\text{g/g}$ fresh weight. The maximum value was noticed in the total protein levels of the snail kidney (*Helix aspersa*). However, 3.20 $\mu\text{g/g}$ fresh weight was noted as a minimum value (Table 4). The lipid rate exhibited a low value (1.58 $\mu\text{g/g}$ fresh weight) in a dose of 1500 $\mu\text{g/g}$, whereas 2.17 $\mu\text{g/g}$ fresh weight is recorded as the maximum value (Table 5).

The analysis of variance showed a high significant dose effect for carbohydrate rates (Table 4). The maximum value 14.85 $\mu\text{g/g}$ fresh weight is obtained in snails treated with 1500 $\mu\text{g/g}$, while the minimum value is 6.26 $\mu\text{g/g}$ fresh weight in the control snails (Table 5).

The Figure 1 illustrates that total protein levels are strongly correlated with doses of metal dust in the digestive gland ($R^2 = 0.83^{**}$). Whilst, the total proteins were less correlated with increasing doses in the kidney of treated snails ($R^2 = 0.0017^{ns}$).

The rate of carbohydrates is positively and significantly correlated with treatment doses where $R^2 = 0.96^{**}$ and $R^2 = 0.78^{**}$ in the digestive gland and kidney, respectively (Figure 2).

Table 2: Statistical analysis of the functional biochemical markers of digestive gland in control and treated land snails (*Helix aspersa*)

Source of variation	Proteins				Carbohydrates			Lipids		
	DF	SS	MS	F	SS	MS	F	SS	MS	F
Doses	4	13.21	3.30	46.93***	672.00	168	40.82***	1.23	0.30	182.38***
Error	15	1.05	0.07		61.73	4.11		0.02	0.001	
Total	19	14.27			733.73			1.25		
C.V %		9.08			8.99			10.92		

df = degrees of freedom, SS = sum of squares, MS = means square, C.V: coefficient of variation, Level of significance: $p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$, $p < 0.001 = ***$, $p < 0.0001 = ****$.

Table 3: Biochemical parameter averages in the digestive gland of the snail (*Helix aspersa*).

Doses	Proteins	Carbohydrates	Lipids
D0=0 $\mu\text{g/g}$	1.62 (d)	16.27 (c)	0.24 (c)
D1= 100 $\mu\text{g/g}$	2.38 (c)	17.32 (bc)	0.16 (d)
D2=500 $\mu\text{g/g}$	3.29 (b)	20.32 (b)	0.17 (d)
D3=1000 $\mu\text{g/g}$	3.36 (b)	28.26 (a)	0.81 (a)
D4=1500 $\mu\text{g/g}$	3.92 (a)	30.52 (a)	0.49 (b)
Means	2.92	22.54	0.37
Minimum	1.62	16.27	0.16
Maximum	3.92	30.52	0.81
Standard deviation (δ)	0.86	6.21	0.25
$\text{LSD}_{5\%}$	0.40	3.05	0.06

Table 4: Statistical analysis (ANOVA test) of the biochemical markers in kidney of the land snail (*Helix aspersa*) treated with metallic dust

Source of variation	Proteins				Carbohydrates			Lipids		
	DF	SS	MS	F	SS	MS	F	SS	MS	F
Doses	4	8.22	2.05	3.60*	179.55	44.88	28.12****	0.93	0.23	2.38*
Error	15	8.56	0.57		23.94	1.60		1.48	0.099	
Total	19	16.78			203.50			2.42		
C.V %		18.70			11.00			17.86		

df = degrees of freedom, SS = sum of squares, MS = means square, C.V: coefficient of variation, Level of significance: p<0.05=*, p<0.01=**, p<0.001=***, p<0.0001=****

Table 5: Statistical analysis (Average comparison) of the biochemical markers in kidney of the land snail (*Helix aspersa*) treated with metallic dust.

Doses	Proteins	Carbohydrates	Lipids
D0=0 µg/g	3.20 (b)	6.26 (c)	1.61 (b)
D1= 100 µg/g	5.13 (a)	10.75 (b)	1.66 (b)
D2=500 µg/g	3.64 (b)	11.65 (b)	2.17 (a)
D3=1000 µg/g	4.07 (ab)	13.86 (a)	1.74 (ab)
D4=1500 µg/g	4.12 (ab)	14.85 (a)	1.58 (b)
Minimum	3.20	6.26	1.58
Maximum	5.13	14.85	2.17
Means	4.03	11.48	1.75
Standard deviation (δ)	0.94	3.27	0.35
LSD 5%	1.13	1.90	0.47

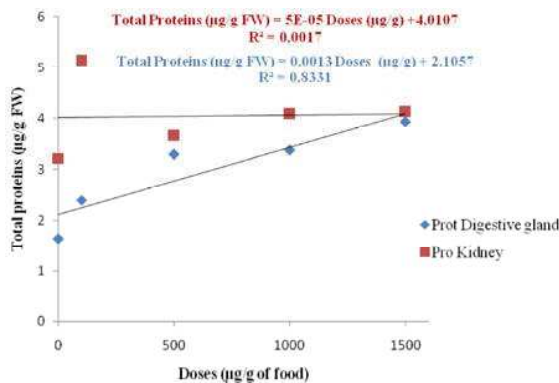


Fig. 1: Variation of total protein rate in the digestive gland and kidney of the snails (*Helix aspersa*) exposed to various doses of metal dust

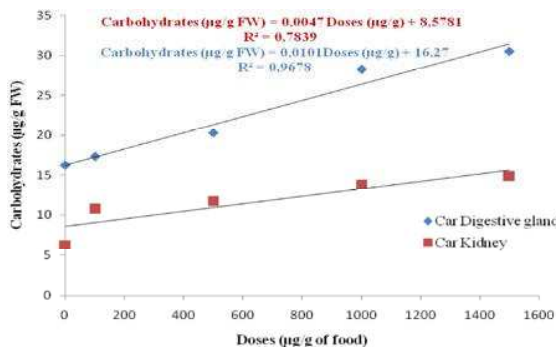


Fig. 2 : Variation of carbohydrate rates in the digestive gland and kidney of the snails (*Helix aspersa*) exposed to various doses of metal dust

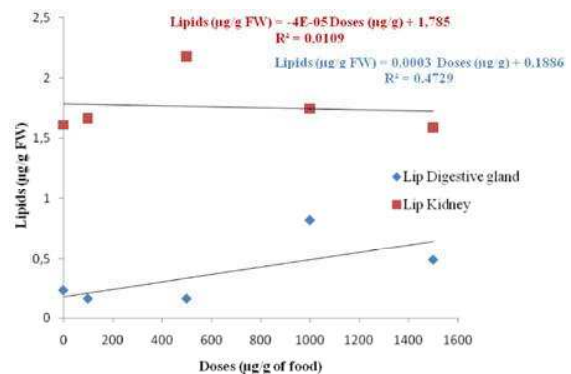


Fig. 3: Variation of lipids in the digestive gland and kidney of the snails (*Helix aspersa*) exposed to various doses of metal dust

The lipids in the digestive gland have low correlations with treatment doses which $R^2 = 0.47$, on the other hand, the change in lipids is not very linked to different treatment doses in the kidney ($R^2 = 0.0109$) (Figure 3).

Microscopic Examination of Histological Sections of the Digestive Gland: The digestive gland of control group of snails (Fig. 4A) consists of a digestive epithelium composed of lobules of acinus forming a coherent maintained by connective tissue. The epithelium contain three types of cells and each cell has the essential components (membrane and nucleus) digestive cells DC

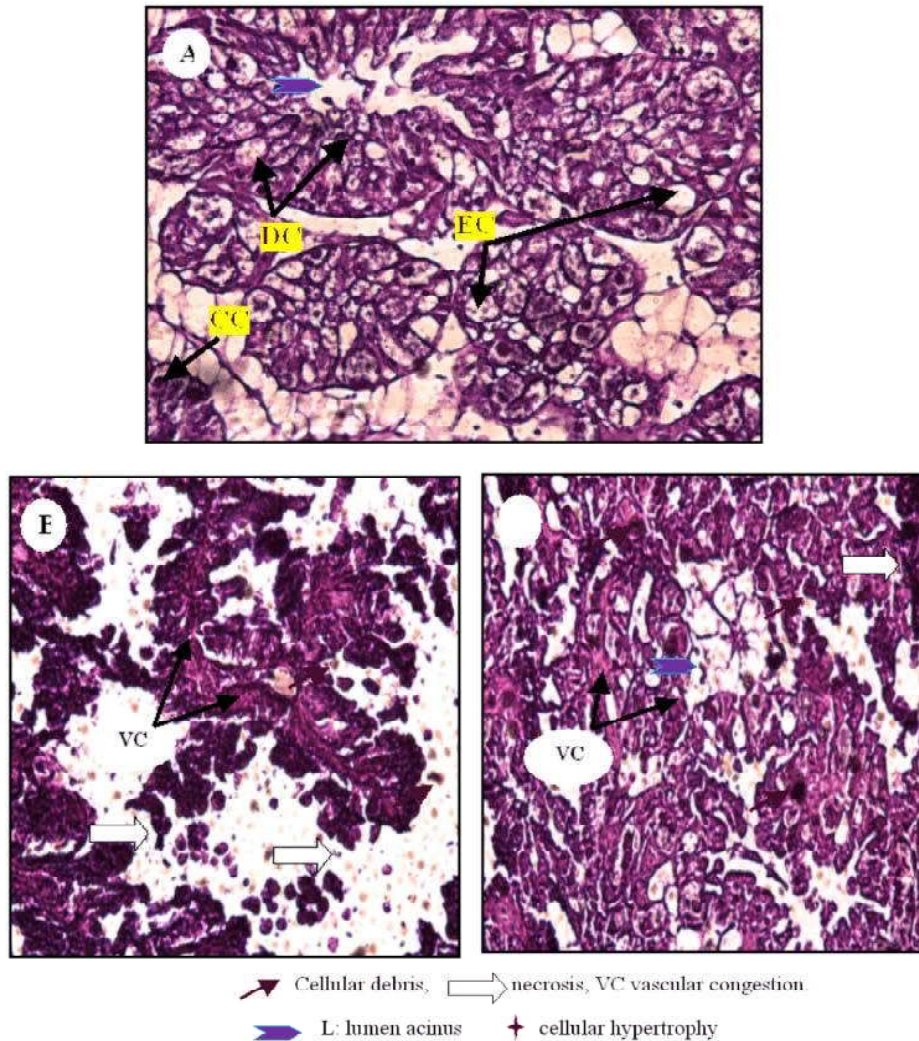


Fig. 4: Histological sections of digestive gland of *Helix aspersa* control group (A) and treated with doses 1000 ($\mu\text{g/g}$ of food) (B), and 1500 ($\mu\text{g/g}$ of food) (C). (DC: digestive cell, EC: excretory cell, CC: calcium cell, L: lumen acinus)

(most abundant), EC excretory cells and the calcium cells (CC). However, among treated groups of this cellular structure present visible alterations manifested by vascular congestion (VC) of acinus with lumen expanded and necrosis cell structures especially in snails treated with dose 1000 ($\mu\text{g/g}$ of food) (Fig. 4B). The microscopic observation of organ histology of treated animals with the dose of 1500 $\mu\text{g/g}$ of food (Fig. 4C) illustrates the destruction of the parenchyma of the acinus, irregular lumen with cellular debris, the disappearance of the digestive cells and a decrease in the thickness of the epithelium confirmed the necrosis phenomenon.

Histological Examination of the Kidney: Kidney of control snails (Fig. 5A) showed an epithelium-lined

excretory kidney sections, connective acinus incorporated columnar cells with a brush border. The kidney epithelium contains only one type of cells named excretory cells, which have a nucleus and a granular membrane, as well as they are subdivided into two other cell types known as rod and ciliate cells.

The histological weathering induced by the presence of metal particles (Fig. 5B) result following change as a response in renal tissue: hypertrophy epithelia, necrosis with irregular lumen obstructed by cell debris. Similarly, histological examination of snails treated with dose 1500 ($\mu\text{g/g}$ of food) (Fig. 5C) shows the disappearance of the excretory cell membranes, following their destruction and proliferation of connective tissue.

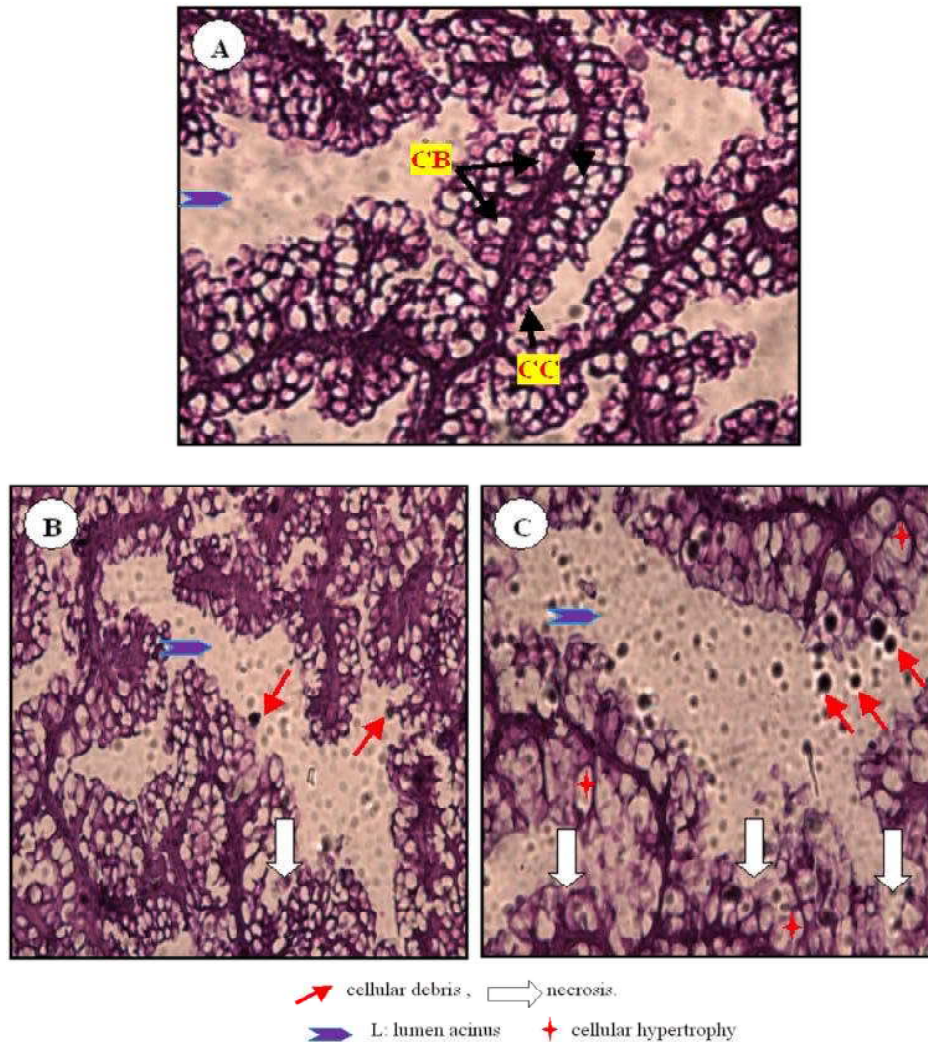


Fig. 5: Histological sections of the kidney of *Helix aspersa* control group (A) and treated with doses 1000 ($\mu\text{g/g}$ of food) (B), and 1500 ($\mu\text{g/g}$ of food) (C).

DISCUSSION

Several studies have shown that most heavy metal toxicities are strongly associated to over production of intracellular reactive oxygen species (ROS) in biological systems [31]. Oxidative stress defines the potential of ROS to damage cellular components such as biomembranes, proteins, DNA and RNA [32]. In mollusks heavy metals can induce a state of general stress, resulting in the reduction of their ability to adapt to hypoxia.

Our study showed that the protein levels in both organs increased in metal dust exposure following dose-dependent manner, which is agreed with those of Gara *et al.* [33]. Here, *Helix aspersa* were exposed for a

period of 28 days to a various metals (Cu, Zn, Ni and Pb). The results showed a significant increase in total protein content. Alike, Radwan and Mohamed [34] observed a significant increase in protein rate in the same species treated with 0.6 LD₅₀ of imidacloprid. While El Gohary and Genena, [35] was found to decrease the level of total protein. Heavy metal storage in mollusks is often due to the increase of low molecular weight proteins belonging to the metallothionin family (MTs), which play a major role in metal homeostasis. Three isoforms of MTs are known [36] and one of them (CdMT) is induced by Cd.

Carbohydrates are the primary and immediate source of energy. Under stress conditions, carbohydrate reserves are depleted to meet increased an energy demand [37]. Our results show a significant elevation of carbohydrates

rates at two organs tested. In the study of Barky *et al.* [38-39] toxic effect of Atrazine caused increase in glucose concentration in *Biomphalaria alexandrina* snails. Unlike, the work of Radwan *et al.* [40] indicated a significant decrease in carbohydrate rate.

Lipids are also a main source of metabolic energy and essential component for the formation of cells and tissue membrane [41]. The total lipid was significantly increased in the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails that was collected from polluted areas [42], unlike the work of Grara *et al.* [33] which recorded a significant decrease in lipid concentration.

The kidney lipid levels did not show any significant difference, similar results were noted by Boshoff *et al.* [7] indicating that the biomarker concentrations (lipids, glycogen, proteins), were not related to the metal concentrations in digestive gland of *Cepaea nemoralis* snails.

The midgut gland or digestive gland or hepatopancreas, similar in its function than the pancreas and liver for humans, is a major organ involved in metal uptake and storage in molluscs. This gland is responsible for digestive enzyme production, nutrient absorption, endocytosis of certain food ingredients and also food storage and excretion [43]. The digestive glands are the most important gastropod organs involved in pollutant detoxification [44]. The histological and histochemical changes are expected to be useful biomarkers of copper exposure [14]. The histopathological responses of several organs (digestive gland and kidney) in *Helix aspersa* exposed to increasing concentrations of Cd in food occur by reactions involving epithelial hyperplasia at the lowest doses tested cell destruction and important is accompanied by a proliferation of connective tissue and necrosis at high concentrations [45].

Our histological study establishes the tissue damage in the digestive gland and kidney of *Helix aspersa* in response to the toxicity of the metal particles which could result in visible structural changes in snails treated with high doses. Further histological examination showed revealed dilation hemolymphatic spaces between the tubules, cellular degeneration, with a more expanded lumen, cell necrosis, with atrophy of the connective tissue of the digestive gland and desquamation of epithelial cells, accompanied by hypertrophy in calcium cells. Furthermore, TMs deteriorate the dynamics of cells and damage their membranes. Therefore, the intercellular exchange and fluidity are disrupted. Accordingly, the diffusion of heavy metals increases in cells causing cellular necrosis [46]. According to Osterauer *et al.* [47],

the changes in digestive gland of ramshorn snails (*Marisa cornuarietis*) were characterized by large hemolymph spaces between the tubules, enlarged tubule lumen, flattened epithelia, irregular shape of cells, cytoplasmic protuberances of digestive cells, increased amount of vacuoles in digestive cells and rarely, necrosis of digestive and basophilic cells at 50 and 100 g/l of PtCl₂. The same results were observed in *Planorbarius corneus* exposure to 0.4 mg/l of endosulfan [48]. Thus in adult of *Helix aspersa* fed a copper-contaminated diet exhibited significant effects of copper dose on the height of hepatopancreatic epithelium cells and digestive glandular epithelium area [14].

Gust *et al.* [49] reported histological lesions of the digestive gland which were observed with hypertrophy of calcium cells and vacuolization of digestive cells. In the mud snail *Potamopyrgus antipodarum* exposed to complex field poly-metallic pollution. Contrary, Bacchetta *et al.* [50], where found no histological damage on the hepatopancreas of the snail *Physa fontinalis* even after 14 days of exposure to 0.500 mg/l of Paraquat. No histopathological change (necrosis) was observed and evidence of programmed cell death was very rarely observed in the midgut gland of *Helix pomatia* [51].

The kidney of gastropods is a blind sac located along the dorsal region of the mantle cavity. The wall of the kidney has a uniform structure with epithelial infoldings, the cells of which, called nephrocytes, are characterized by apical microvilli forming a brush border, a large apical vacuole containing a spherocrystal and a basal labyrinth consisting of intricate cytoplasmic processes associated with mitochondria [21].

As reported previously, the kidney is defined as a sac of some gastropods [52]; they may play a part in the regulating of the paracellular pathway followed by some molecules and ions.

In the kidney of *Helix aspersa* treated with increasing doses of metal dust, the histopathological examinations revealed the following changes like adaptive responses: structural integrity of the kidney epithelium is not preserved and cellular debris accumulates in the enlarged lumen, cellular hypertrophy, cell necrosis and widespread proliferation of excretory cells. These results are in agreement with those of Russell [53] observed in Cd-treated *Helix aspersa*. Histopathological analysis revealed significantly enhanced metallic concretion in nephrocyte of snail's kidney *Bellamya bengalensis* exposed to copper sulfate (3CuSO₄.5H₂O) and tubule enlargement, destructed epithelial lining of tubule with luminal spaces filled by metallic concretion as well as cellular debris [54].

Unlike, Chabicovsky *et al.* [55] indicated that feeding snails on Cu-enriched diet resulted in a decrease of Cd-MT gene expression in the snail kidney, whilst, a very low Cd concentrations were detected. While snail's kidney does not play a major role in the accumulation and excretion of Cd and the specific function in metal metabolism however remains unknown.

CONCLUSION

The present study provided a convenient experimental design which can be useful for easy and quick assessment of metal exposure, under laboratory conditions. We are interested in the changes of some biochemical parameters and in the second part to the histopathological study of the metal dust toxicities. The results of this study showed a significant increase of the rate of total protein, carbohydrate and lipids in the digestive gland, unlike the kidney that does not respond to increasing doses of different metal dusts, except carbohydrates which recorded a slight increase compared to the control group.

Moreover, toxic effects of metal dust induced histopathological alterations of snail target organs were evidenced by dilated hemolymphatic spaces between the tubules, cellular degeneration, with an enlarged lumen, cell necrosis, with atrophy of the connective tissue of the digestive gland and desquamation of epithelial cells, accompanied by hypertrophy in calcium cells in the tissues of the land snails tested. Cellular debris accumulates in the enlarged lumen, cellular hypertrophy; cell necrosis characterized the kidney epithelium after tow week of expose to dust metal. Finally, the usefulness of the terrestrial snail *Helix aspersa* as a potential bioindicator species of environmental contamination becomes a topic of great interest.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank Faouzi Dahdouh for his help and Hind Nouar for achieving statistical treatment.

REFERENCES

1. Fairbrother, A., R. Wenstel, K. Sappington and W. Wood, 2007. Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 68: 145-227.
2. Smith, R., S.J.T. Pollard, J.M. Weeks and C.P. Nathanail, 2006. Assessing harm to terrestrial ecosystems from contaminated land. *Soil Use Manage*, 21: 527-540.
3. Nriagu, O.A., 1996. A history of global metal pollution. *Science*, 272: 223-224.
4. Posthuma, L. and N.M. Van Straalen, 1993. Heavy metal adaptation in terrestrial invertebrates -A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comp. Biochem. Physiol. C* 106: 11-38.
5. Larba, R. and N. Soltani, 2013. Diversity of the terrestrial gastropods in the Northeast Algeria: spatial and temporal distribution. *European Journal of Experimental Biology*, 3(4): 209-215.
6. Notten, M.J., A.J. Oosthoek, J. Rozema and R. Aerts, 2005. Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environ. Pollut.*, 138(1): 178-190.
7. Boshoff, M., K. Jordaens, S. Bagnuet and L. Bervoets, 2015. Trace metal transfer in a soil-plant-snail microcosm field experiment and biomarker responses in snails. *Ecological Indicators*, 48: 636-648.
8. Gomot-de Vaufleury, A. 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46: 41-50.
9. Grara, N., H. Berrebbah, R. Rouabhi, A. Atailia and M.R. Djebar. 2009. Impact of Pollution by Industrial Metallic Dust on Bio-Accumulator Organism *Helix aspersa*. *Global Veterinaria*, 3(4): 276-280, 2009.
10. Pauget, B., F. Gimbert, M. Coeurdassier, R. Scheifler and A. De Vaufleury, 2011. Use of chemical methods to assess Cd and Pb bioavailability to the snail *Cantareus aspersus*: a first attempt taking into account soil characteristics. *J. Hazard Mater*, 192: 1804-1811.
11. Leomanni, A., T. Schettino, A. Calisi, S. Gorbi, M. Mezzelani, F. Regoli and M.G. Lionetto, 2015. Antioxidant and oxidative stress related responses in the Mediterranean land snail *Cantareus apertus* exposed to the carbamate pesticide Carbaryl. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 168: 20-27.
12. Morgan, A.J., P. Kille and S.R. Sturzenbaum, 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environ. Sci. Technol.*, 41: 1085-1096.
13. Beeby, A. and L. Richmond, 2003. Do the soft tissues of *Helix aspersa* serve as a quantitative sentinel of predicted free lead concentrations in soil? *Appl. Soil Ecol.*, 22: 159-165.
14. Snyman, R.G., S.A. Reinecke and A.J. Reinecke, 2009. Quantitative changes in digestive gland cells and oocytes of *Helix aspersa*, as biomarkers of copper oxychloride exposure under field conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 83(1): 19-22.

15. Boshoff, M., K. Jordaens, T. Backeljau, S. Lettens, F. Tack, B. Vandecasteele, M. De Jonge and L. Bervoets, 2013. Organ- and species-specific accumulation of metals in two land snail species (Gastropoda, Pulmonata). *Sci. Total Environ.*, 449 : 471-481.
16. Itziou, A. and V.K. Dimitriadis, 2009. The potential role of cAMP as a pollution biomarker of terrestrial environments using the land snail *Eobania vermiculata*. Correlation with lysosomal membrane stability. *Chemosphere*, 76: 1315-1322.
17. Sawasdee, B., H. Köhler and R. Triebkorn, 2011. Histopathological effects of copper and lithium in the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (gastropoda, prosobranchia). *Chemosphere*, 85: 1033-1039.
18. Sumner, A.T., 1965. The cytology and histochemistry of the digestive gland cells of *Helix*. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 106: 173-192.
19. Amaral, A.F.S., H. Anselmo, R.M.P.T. Tristão Da Cunha and A.S. Rodrigues, 2004. The connective tissue index of *Helix aspersa* as a metal biomarker. *Biometals*, 17(6): 625-629.
20. Brooks, A.W., K.N. White and S.E.R. Bailey, 1992. Accumulation and excretion of aluminum and iron by the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Camp. Biochem. Physiol.*, 103(3): 577-583.
21. Matricon-Gondran, M., 1990. The site of ultrafiltration in the kidney sac of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. *Tissue and Cell*, 22(6): 911-923.
22. Coeurdassier, M., 2001. Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnaea stagnalis* et *Lymnaea palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques. Thèse de doctorat, université de franche comté, France. 281p.
23. Coeurdassier, M., M. Saint-Denis, A. Gomot-de Vaufléury, D. Ribera and P.M. Badot, 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 1951-1957.
24. Kléche, M., 2002. Etude de la pollution des poussières aciéries du complexe sidérurgique d'EL Hadjar sur la germination et le métabolisme respiratoire des végétaux. Mémoire d'ingénieur Université d'Annaba. pp: 35.
25. Shibko, S., P. Koivistoinen, C. Tratyneck, A. Newhall and L. Freidman, 1966. A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt. Biochem.* 19: 415-428.
26. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
27. Duchateau, G. and M. Florkin, 1959. For trehalosemie of insects and its signification. *Arch. Insect. Physiol. Biochem.*, 67: 306-314.
28. Goldsworthy, G.J., W. Mordue and J. Guthkelch, 1972. Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 18(3): 545.
29. Martoja, R. and M. Martoja, 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. MI: Masson, pp: 345.
30. SAS. Institute, 1999. SAS/STAT user's guide.8. Version. SAS Institute Inc. Cary. NC
31. Valko, M., H. Morris and M.T. Cronin, 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 12(10): 1161-1208.
32. Radwan, M.A., K.S. El-Gendy and A.F. Gad, 2010. Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of *Theba pisana* exposed to heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 58(3): 828-835.
33. Grara, N., A. Atailia, M. Boucenna, F. Khaldi, H. Berrebbah and M.R. Djebar, 2012. Effects of heavy metals on the snail *Helix aspersa* bioindicators of the environment pollution for human health. In the Proceedings of the 2012 Int. Appl. Life Sci. Conference, pp: 241-246.
34. Radwan, M.A. and M.S. Mohamed, 2013. Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95: 91-97.
35. El Gohary, L.R. and M.A. Genena, 2011. Biochemical effect of three molluscicide baits against the two land snails, *Monacha cantiana* and *Eobania vermiculata* (Gastropoda: Helicidae). *Int. J. Agric. Res.*, 6: 682-690.
36. Baurand, P.E., N. Capelli, R. Scheiffler and A. De Vaufléury, 2014. An assessment of the embryotoxicity of cadmium in the terrestrial mollusk *Cantareus aspersus*: From bioaccumulation to impacts at different levels of biological organization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110: 89-94.

37. Arasta, T., V.S. Bais and P. Thakur, 1996. Effect of Nuvan on some biological parameters of Indian catfish, *Mystus vittatus*, J. Environ. Biol., 17: 167-169.
38. Barky, F.A., A. Hala, H.A. Abdelsalam, M.B. Mahmoud and S.A.H. Hamdi, 2012. Influence of Atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. Pesticide Biochemistry and Physiology, 104: 9-18.
39. Bakry, F.A., 2009. Use of some plant extracts to control *Biomphalaria alexandrina* snails. World Applied Sciences Journal, 6: 1335-1345.
40. Radwan, M.A., A.E. Essawy, N.E. Abdelmeguid, S.S. Hamed and A.E. Ahmed, 2008. Biochemical and histochemical studies on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. Pesticide Biochemistry and Physiology, 90: 154-167.
41. Eghtesadi-Aragh, P. and K.D. Bastami, 2011. An integrated approach on interconnected effects between selected environmental parameters and fatty acid composition in Mollusk. Res. J. Environ. Sci., 5: 310-315.
42. El-Shenawy, N.S., A. Mohammadden and Z.H. Al-Fahmie, 2012. Using the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system of the land snail *Eobania vermiculata* as biomarkers of terrestrial heavy metal pollution. Ecotoxicology and Environmental Safety, 84: 347-354.
43. Owen, G., 2012. Digestion. In: Wilbur, K.M. Yonge, C.M. (Eds.), Physiology of Mollusca. Academic Press, New York, pp: 53-96.
44. Ismert, M., T. Oster and D. Bagrel, 2002. Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic metabolizing enzymes in the snail *Helix aspersa*. Chemosphere, 46(2): 273-280.
45. Chabicoovsky, M., W. Klepal and R. Dallinger, 2004. Mechanisms of cadmium Toxicity in terrestrial pulmonates programmed cell death and metallothioneines overload. Environmental Toxicology and Chemistry, 23: 648- 655.
46. Yager, C.M. and H.W. Harry, 1963. The uptake of radioactive zinc, cadmium and copper by the freshwater snail *Taphius glabratus*. Malacologia, 1: 339-53.
47. Osterauer, R., H.R. Köhler and R. Triebkorn, 2010. Histopathological alterations and induction of hsp70 in ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to PdCl₂. Aquatic Toxicology, 99: 100-107.
48. Otludil, B., E.I. Cengiz, M. Zeki Yildiril, Ö. Ünver and E. Ünlü, 2004. The effects of endosulfan on the great ramshorn snail *Planorbium corneum* (Gastropoda, Pulmonata): a histopathological study. Chemosphere, 56: 707-716.
49. Gust, M., T. Buronfosse, O. Geffard, M. Coquery, R. Mons, K. Abbaci, L. Giamberini and J. Garric, 2011. Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). Aquatic Toxicology, 101: 100-108.
50. Bacchetta, R., P. Mantecca and G. Vailati, 2002. Oocyte degeneration and altered ovipository activity induced by Paraquat in the freshwater snail *Physa fontinalis* (Gastropoda: Pulmonata). J. Moll. Stud., 18: 58-61.
51. Włostowski, T., P. Kozłowski, B. Łaszkiwicz-Tiszczenko, E. Olenska and O. Aleksandrowicz, 2014. Accumulation of Cadmium in and Its Effect on the Midgut Gland of Terrestrial Snail *Helix pomatia* L. from Urban Areas in Poland. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 93: 526-531.
52. Sanchez-Aguayo, I., F. Ballesteros, J. Hidalgo and J.L. Lopez-Campos, 1987. Epithelial cell types of the primary ureter of *Helix aspersa*: ultrastructural and cytochemical characteristics. Tissue & Cell, 19(2): 265-273.
53. Russell, L.K., J.I. DeHaven and R.P. Botts, 1981. Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 26: 634-640.
54. Kambale, N.A. and V.V. Potdar, 2011. Metallic concretions in the nephrocytes of freshwater snail *Bellamya bengalensis*. Bionano Frontier, 4(2): 264-266.
55. Chabicoovsky, M., H. Niederstaetter, R. Thaler, E. Hödl, W. Parson, W. Rossmanith and R. Dallinger, 2003. Localization and quantification of Cd and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 190 (1): 25-36.