

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار — عنابة



Badji Mokhtar-Annaba
University

Université Badji mokhtar
Annaba

FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie

Option : Ecotoxicologie

THÈME

**Evaluation de la toxicité des poussières métalliques
rejetées par les aciéries 1et 2 du complexe
sidérurgique d'EL-Hadjar sur un modèle
bioaccumulateur *Helix aspersa***

Présenté Par : *BOUCENNA Mounir*

Devant le jury composé de :

Directrice du mémoire : Mme. BERREBBAH H. Pr. Univ. Annaba

Président : M. SOLTANI .N Pr. Univ. Annaba

Examineur : M. DJEBAR .M. R. Pr. Univ. Annaba

Examinatrice : Mme. DAAS .O M.C Univ. Annaba

2009/2010

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de toxicologie cellulaire de l'université d'Annaba.

Je souhaite exprimer ici mon plus profond respect et ma reconnaissance à Monsieur le professeur Soltani. N Professeur à l'université d'Annaba, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Mes sincères remerciements vont à Madame le professeur Berrebbah. H directrice du mémoire, sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Ses connaissances en toxicologie, sa confiance et sa disponibilité, les nombreuses discussions scientifiques, stimulantes et constructives, nous ont permis d'élaborer chacune des étapes de ce travail, et m'ont initié à la recherche, de la définition d'une problématique jusqu'au compte rendu écrit des résultats.

J'ai également pu bénéficier des conseils critiques et de l'enthousiasme scientifique du Monsieur le professeur Djebbar. M.R, mais aussi de ses gentils mots ... et de sa bonne humeur, pour l'accueil chaleureux qu'il ma réservé au sein du laboratoire de toxicologie cellulaire, et pour avoir accepté d'examiner ce mémoire Je tiens à le remercier du fond de mon cœur.

Je remercie vivement Madame Daas Ouided, maitre de conférences à l'université d'Annaba et responsable de la Post graduation d'Ecotoxicologie, pour avoir accepté d'être examinatrice de ce travail, et de faire partie de ce jury.

Enfin, je suis reconnaissant à toutes les personnes qui m'ont épaulé et aidé au cours de cette année Melle GRARA Nadjoud maitre assistant à l'université de Souk Ahras toujours à mes côtés , mes parents et ma famille, mes collègues et amis les membres du laboratoire de toxicologie cellulaire Zoubir, Kamel, Faouzi, Amira et tous les autres que j'ai pu oublier.

Merci à tous

Résumé

Dans le but d'évaluer la toxicité des particules métalliques d'origine industrielles, nous avons effectué un travail de recherche au sein du laboratoire de toxicologie cellulaire sur 35 escargots adulte *Helix aspersa* provenant d'une région considérée comme non polluée Boumahra Ahmed (wilaya de Guelma).

Nos résultats mettent en évidence des perturbations physiologiques concernant le poids des escargots traités se caractérisant par un déficit de l'ordre de 5% particulièrement chez les traités aux fortes concentrations. Parallèlement les modifications métaboliques indiquent une augmentation du taux de protéines, et une diminution du taux des lipides et glucides (dose dépendante).

De plus, les ETM affectent le système antioxydant par des modifications corrélées avec une diminution du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas formant des complexes SH-métal. Parallèlement à cela, une synthèse de GST traduit un mécanisme de détoxication des ETM au niveau de deux organes cibles (l'hépatopancréas et le rein). Cela est suivi par une augmentation de l'activité enzymatique Catalase (phase I) constituant un des mécanismes de défense cellulaire contre la présence des particules métalliques.

Nos résultats montrent aussi l'existence d'une induction du taux de malondialdéhyde (MDA) biomarqueur de la peroxydation lipidique. L'étude histologique vient confirmer l'atteinte tissulaire et les changements observés au niveau des structures cellulaires de l'hépatopancréas et du rein.

Mots clés : *Helix aspersa*, ETM, poussières métalliques, CAT, GST, GSH, MDA, histologie, système antioxydant, biomarqueurs, rein, hépatopancréas.

Abstract

In order to evaluate the toxicity of metal particles of industrial origin, we conducted a research in the toxicology laboratory cell of 35 adult snails *Helix aspersa* from a region considered unpolluted Boumahra Ahmed (wilaya of Guelma).

Our results highlight the physiological disturbances on the weight of the snails treated characterized by a deficit of around 5% in the treated particularly at high concentrations. In parallel the metabolic changes indicate an increase in protein levels, and decreased levels of lipids and carbohydrates (dose dependent).

Indeed, the ETM affect the antioxidant system by changes correlated with decreased levels of GSH in the hepatopancreas forming HS-metal complexes. Along side this, a synthesis of GST a mechanism of detoxification of the ETM at two target organs (hepatopancreas and kidney). This is followed by an increase in enzyme activity of catalase (Phase I) constituting one of the mechanisms of cellular defense against the presence of metal particles.

Our results also show the existence of an induction rate malondialdehyde (MDA) biomarker of lipid peroxidation. The study confirms the histological damage observed in tissue and changes in cellular structures of the hepatopancreas and kidney.

Keywords: *Helix aspersa*, ETM, metal dust, CAT, GST, GSH, MDA, histology, antioxidant system, biomarkers, kidney, hepatopancreas.

SOMMAIRE		PAGE
CHAPITRE 1 <i>Introduction Générale</i>		
1. GENERALITES.....		01
2. Origines des substances toxiques.....		03
2.1. Effets moléculaires et biochimiques des contaminants.....		03
2.1.1. Effets directs.....		03
2.1.2. Effets moléculaires indirects : le stress oxydant.....		03
3. ELEMENTS TRACES METALLIQUES « ETM ».....		04
3.1. Les ETM essentiels et non essentiels		05
3.2. Pollution des sols.....		05
4. TOXICITE DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES.....		07
4.1. Transfert des ETM vers les organismes animaux		07
4.2. Transfert des ETM dans les relations proie – prédateur.....		08
5. BIOACCUMULATION ET DEVENIR DES ETM CHEZ L'ESCARGOT.....		08
5.1. Sources et voies d'exposition et d'absorption.....		08
5.2. Devenir des ETM dans l'organisme		10
5.3. Des exemples des effets toxiques sur l'escargot.....		10
6. BIOMARQUEURS : NOTIONS ET CONCEPTS		11
6.1. Biomarqueurs d'exposition, d'effet, de susceptibilité.....		11
7. UTILISATION Des Escargots Dans L'étude De La Contamination Par ETM...		13
7.1. L'anatomie de l'escargot.....		13
7.2. Reproduction.....		14
7.3. Les escargots indicateurs de contamination par les ETM.....		15
 CHAPITRE 2 Matériel Et Méthodes		
1. Matériel et méthodes		16
1.1. Méthode d'échantillonnage.....		16
1.2. Matériel biologique		17

2. Matériel chimique	19
2.1. Les rejets métalliques utilisés	19
3. Conditions D'élevage.....	29
3.1. Mode de traitement.....	20
3.2. Dissection et prélèvement de l'hépatopancréas et le rein.....	21
4. Paramètres étudiés	22
4.1. Paramètres physiologiques : Le poids relatif	22
4.2. Paramètres biochimiques.....	22
4.2.1 Dosage des métabolites	22
4.2.1.1. Extraction des métabolites.....	22
4.2.2. Dosage de glucides totaux	24
4.2.3 Dosage de lipides totaux	24
4.2.4. Dosage de protéines totales.....	24
4.3. Dosage du taux de Glutathion(GSH).....	25
4.4. Mesure de l'activité Glutathion S-transférase(GST).....	26
4.5. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	27
4.6. Mesure de l'activité Catalase	29
5. Etude Histologie.....	31
6. Etude statistique	31
 CHAPITRE 3 Résultats	
1. Effet des rejets métalliques sur l'évolution du poids relatif.....	32
2. Effet des particules métalliques sur les Paramètres biochimiques.....	33
2.1. Évolution du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas.....	33
2.2. Évolution de taux de protéines totales au niveau du rein.....	34
2.3. Évolution du taux des lipides totaux au niveau de l'hépatopancréas.....	35
2.4. Évolution du taux des lipides totaux au niveau du rein	36
2.5. Évolution du taux de glucides totaux au niveau de l'hépatopancréas	37
2.6. Évolution du taux de glucides totaux au niveau du rein.....	38

3. EFFETS DES PARTICULES METALLIQUES SUR LES BIOMARQUEURS	39
3. 1. Évolution de l'activité catalase CAT au niveau de L'hépatopancréas.....	39
3. 2. Évolution de l'activité catalase CAT au niveau du rein.....	40
3. 3. Évolution du taux de glutathion (GSH) au niveau de l'hépatopancréas	41
3. 4. Évolution du taux de glutathion (GSH) au niveau du rein	42
3. 5. Évolution de l'activité GST au niveau d'hépatopancréas	43
3. 6. Évolution de l'activité GST au niveau du rein	44
3.7. Évolution du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas	45
3.8. Évolution du taux de MDA au niveau du rein.....	46
4. ETUDE HISTOLOGIQUES	47
4.1. Examen des coupes histologiques au niveau de l'hépatopancréas	48
4.2. Examen des coupes histologiques au niveau du rein	50
CHAPITRE 4 DISCUSSION ET CONCLUSION.....	51
CHAPITRE 5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	60

LISTE DES ABREVIATIONS

- AND:** Acide désoxyribonucléique
- CAT :** Catalase
- Cd :** Cadmium
- Cr :** Chrome
- Cu :** Cuivre
- DO :** Densité optique
- DTNB :** Dithiobisnitrobenzoate
- EDTA :** Acide éthylène-diamine-tétraacétique
- ETM :** Élément Trace Métallique
- FAO :** Formes actives de l'oxygène
- FBA**s : Facteur(s) de bioaccumulation
- Fe :** Fer
- GPx :** Glutathion peroxydase
- GSH :** Glutathion réduit
- GSSG :** Glutathion disulfide
- GST :** Glutathion S transférase
- H₂O₂ :** Peroxyde d'hydrogène
- Hg :** Mercure
- HSP**s : Hydrocarbure(s) aromatique polycyclique
- MDA:** Malonedialdéhyde
- MFO :** Monooxygénase à fonction multiple
- Mn :** Manganèse
- MT**s : Métallothionéines
- Ni :** Nickel
- O₂·- :** Radical superoxyde
- OH· :** Radical hydroxyde
- Pb :** Plomb
- PCP**s : Polychlorophénols
- ROS :** Espèce réactive oxygène
- SOD :** Superoxyde dismutase
- Zn :** Zinc

Liste des tableaux et des figures

Liste Des Tableaux :

N°	titres des tableaux	Page
01	Principaux éléments métalliques essentiels et non-essentiels (Hopkin, 1989).	05
02	Principales voies d'exposition des invertébrés aux polluants (adapté de Walker et <i>al.</i> , 1996)	07
03	Description des 4 phases de croissance d' <i>Helix aspersa</i> (Gomot et Enée, 1980).	18
04	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 Kleche 2001 (2001-2002).	19
05	Répartition des concentrations de poussières métalliques.	20
06	Protocole utilisé pour le dosage de l'activité Catalase.	30

Liste des figures

N°	titres des figures	Page
01	Processus de dépôt des polluants.	06
02	Voies et sources d'exposition (et de transfert potentiel) des mollusques gastéropodes aux polluants (Scheifler, 2002).	09
03	Représentation graphique des niveaux de réponses attendus en fonction du niveau d'exposition à un facteur de stress (d'après van der Oost et <i>al.</i> , 2003).	12
04	Anatomie de l'escargot.	14
05	Localisation du site d'échantillonnage « Boumahra Ahmed »	16
06	<i>Helix aspersa aspersa</i> adulte	18
07	Dissection de l'escargot	21
08	Principales étapes d'extraction des métabolites : protéines, glucides, lipides	23
09	Evolution des poids relatifs d' <i>Helix aspersa</i> traités par différentes concentrations de particules métalliques en fonction du temps.	32
10	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de protéines totales au niveau de L'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> .	33
11	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de protéines totales au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i> .	34
12	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux des lipides totaux au niveau de L'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> .	35
13	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux des lipides totaux au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i> .	36
14	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de glucides totaux au niveau de L'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> .	37

15	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de glucides totaux au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i> .	38
16	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution de l'activité CAT au niveau de L'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> .	39
17	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution de l'activité CAT au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i> .	40
18	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de GSH au niveau de L'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> .	41
19	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de GSH au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i> .	42
20	Effet de concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution de l'activité GST au niveau de L'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> .	43
21	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution de l'activité GST au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i> .	44
22	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de MDA au niveau de L'hépatopancréas d' <i>Helix aspersa</i> .	45
23	Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de MDA au niveau du rein d' <i>Helix aspersa</i> .	46
24	coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 1000 µg/g (B), et 1500 µg/g(C).	47
25	coupes histologiques du rein des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 1000 µg /g (B), et 1500 µg/g(C).	49

1. GENERALITES :

Depuis le début du siècle, l'environnement (atmosphérique, terrestre et aquatique) a été soumis à la pression croissante des activités industrielles et humaines dont les effets se sont fait rapidement sentir.

Ces activités émettent dans l'atmosphère des polluants tels que les oxydes de soufre et d'azote, le monoxyde et dioxyde de carbone, les poussières, les éléments traces, etc. L'atmosphère joue donc un rôle capital dans le cycle biogéochimique de ces éléments, d'une part en participant à la redistribution de ces derniers dans les différents compartiments environnementaux et d'autre part en étant le lieu de processus physiques et photochimiques qui conditionnent leur devenir dans l'environnement.

L'augmentation des concentrations en éléments traces métalliques dans les sols est principalement due à la pollution urbaine liée aux activités humaines (Nriagu et Pacyna, 1988), a fait l'objet de nombreuses études sur les risques de leurs transferts, ces risques paraissent d'autant plus grands que les ETM, contrairement à la plupart des composés organiques, ne sont pas dégradés dans l'environnement.

La réponse biologique à des contaminants métalliques à l'échelle individu est caractérisée par une perturbation de la physiologie cellulaire qui peut se traduire par la manifestation d'effets sur le comportement, la survie, la croissance et la reproduction, la façon dont la présence de contaminants, dans les tissus se répercute sur ces variables individuelles dépend des caractéristiques biologiques et écologiques des espèces (Koeman, 1991), ces caractéristiques interviennent dans le niveau d'exposition des individus au contaminant, et dans sa cinétique dans l'organisme (Escher et Hermens, 2002), ainsi que leur capacité d'élimination ou de stockage sous forme moins toxique.

D'un autre côté, la manifestation d'une perturbation du fonctionnement de la cellule est le résultat de l'interaction entre les biomolécules cellulaires et les contaminants. Cette interaction est très spécifique. Elle se mesure en étudiant la présence et la concentration de

molécules qui ont pénétré dans la cellule ou qui sont produites en réaction à l'exposition ou à l'effet des contaminants sur la cellule (biomarqueurs).

Ce travail a pour objectif la mise en évidence des capacités du gastéropode *Helix aspersa* à s'adapter à un stress chimique en présence d'une forte concentration de poussières métalliques rejetées par le complexe sidérurgique. Pour cela nous nous proposons de suivre les paramètres physiologiques métaboliques (poids, lipides, glucides, et protéines) et de certains biomarqueurs du déclenchement des systèmes de détoxification à savoir le système GSH-GST ainsi que le taux de malondialdéhyde (MDA) connus comme un excellent biomarqueur d'une peroxydation lipidique conséquence d'un stress oxydatif.

2. Origines des substances toxiques :

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

2.1. Effets moléculaires et biochimiques des contaminants

2.1.1. Effets directs :

Les contaminants ont des cibles moléculaires de différentes natures, on distingue ainsi:

- ❖ Les composés neurotoxiques agissant sur le système nerveux des vertébrés et des invertébrés en perturbant la transmission normale des influx nerveux.
- ❖ Les composés génotoxiques qui agissent sur l'ADN au niveau moléculaire (adduits, liaisons entre bases), génique (mutation) ou structural (aberrations chromosomiques). Ils peuvent être à l'origine du développement de tumeurs malignes, parmi les polluants génotoxiques, on peut par exemple citer certains hydrocarbures polycycliques aromatiques, ou certains ETM (Hg^{2+} , Cr^{6+} , Cd^{2+} ...).
- ❖ Les composés qui réagissent avec les groupes thiols des protéines en formant des ponts disulfures qui entraînent un changement de conformation spatiale des protéines exposant aux Hg^{2+} , Cd^{2+} , et composés organométalliques.

2.1.2. Effets moléculaires indirects : le stress oxydant

Les composés métalliques et organiques peuvent également avoir des effets moléculaires indirects dus à la formation d'espèces d'oxygène réactives qui sont

potentiellement préjudiciables pour l'intégrité de certains compartiments cellulaires. Le stress oxydant correspond à l'ensemble des effets néfastes liés aux formes actives de l'oxygène (FAO) (Narbonne, 1994). Les FAO dérivent de l'oxygène moléculaire (O_2) par réduction électronique univalente (radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$), divalente (peroxyde d'hydrogène H_2O_2) ou trivalente (radical hydroxyde OH^{\cdot}).

Les oxyradicaux sont produits continuellement par les systèmes biologiques et les mécanismes responsables de leur production impliquent des molécules endogènes ou des molécules exogènes (Ribera, 1998). Au cours de la phase I du métabolisme des polluants organiques, les enzymes microsomiques (en particulier les MFO à cytochrome P450) peuvent induire la production d'oxyradicaux en liaison avec les activités NADH et NADPH-cytochrome réductase (Ribera, 1998). Ce métabolisme peut également aboutir à la formation directe de métabolites radicalaires capables d'activer l'oxygène pour produire « $O_2^{\cdot-}$ » ou « H_2O_2 », Certains métaux peuvent également induire la formation de FAO en cassant la liaison O-O de la molécule de peroxyde d'hydrogène (Aust et Thomas 1985; Winston et Di Giulio, 1991).

3. ELEMENTS TRACES METALLIQUES « ETM » :

La convention de Genève désigne par les termes « métaux lourds » les éléments possédant une masse volumique supérieure ou égale à $4,5 \text{ g/ Cm}^3$. Cependant, ce terme est souvent remplacé par « éléments traces métalliques » (ETM). Les métaux lourds sont dits à l'état de trace lorsque leur concentration est inférieure à 1 g/kg de matière sèche dans la croûte terrestre ou inférieure à $0,1 \text{ g/kg}$ de matière sèche chez les êtres vivants (Boutonnet, 2000).

La plupart des ETM ne sont que très faiblement volatils et ne sont pas biodégradables. Ces deux principales caractéristiques confèrent aux ETM un grand pouvoir d'accumulation dans tous les compartiments de la biosphère. Ainsi, même si nombre d'entre eux sont indispensables dans les différentes étapes des divers cycles métaboliques (Cu, Fe, Mn, Mo, Zn), l'augmentation de leur concentration dans l'environnement, associée à leur

capacité d'accumulation, induisent des risques pour le développement des différents organismes.

3.1. ETM essentiels et non essentiels :

Certains de ces ETM sont des oligo-éléments qui à faibles doses sont bénéfiques mais deviennent toxiques à doses trop élevées ; c'est le cas du cuivre, du zinc, du manganèse, du sélénium (Baize, 1997).

Les métaux non essentiels n'ont, à l'inverse des précédents, aucun rôle biologique actuellement connu. C'est le cas du : Hg, Ag, Cd et Pb (Mason & Jenkins, 1995). Ils sont considérés comme néfastes dès qu'ils sont présents dans le milieu et entraînent des effets biologiques délétères à de très faibles concentrations. Le tableau (01) regroupe les principaux ETM essentiels et non essentiels.

Tableau 01: Principaux éléments métalliques essentiels et non-essentiels (Hopkin, 1989).

Eléments essentiels majeurs	Oligo-éléments essentiels	Eléments "essentiels" en ultra trace	Eléments non-essentiels
calcium, phosphore, potassium, magnésium, sodium, chlore, soufre	fer, iode, cuivre, manganèse, zinc, cobalt, molybdène, sélénium, chrome, nickel, vanadium, silicone, arsenic	lithium, fluor, aluminium, étain, plomb, (<i>cadmium</i>)* * <i>essentiel si déficit de zinc</i>	cadmium, mercure

3.2. Pollution des sols :

Les éléments trace métalliques dans les sols proviennent de différentes sources, Les ETM endogènes sont hérités du matériau parental, redistribués par les processus pédogénétiques et constituent le fond pédogéochimique (Baize, 1997). La concentration naturelle de ces éléments dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation, son âge et la nature de l'élément.

Cependant, les ETM exogènes peuvent être d'origine naturelle (érosion, émissions volcaniques, feux de forêt) (Garrett, 2000) ou anthropiques (Senesi et *al.*, 1999). Trois principaux types de pollutions anthropiques sont responsables de l'augmentation des flux de métaux.

la pollution industrielle qui émet dans l'environnement (air, sol, eau) de nombreux ETM provenant principalement des activités métallurgiques telles que le traitement des minerais, le recyclage du plomb des batteries ou la fabrication de peintures.

- la pollution liée aux activités agricoles via l'application de produits ou substances destinés à améliorer les propriétés physico-chimiques du sol, de plus les produits phyto-sanitaires comme le Cu dans la bouillie bordelaise (Morgan et Taylor, 2004), les lisiers « Cu, Zn, Cd », (Moore et *al.*, 2006).
- la pollution urbaine qui regroupe des émissions atmosphériques liées au trafic routier à l'incinération des ordures ménager (Denison et Silbergeld, 1988), ces différentes pollutions sont précisées dans la figure (01).

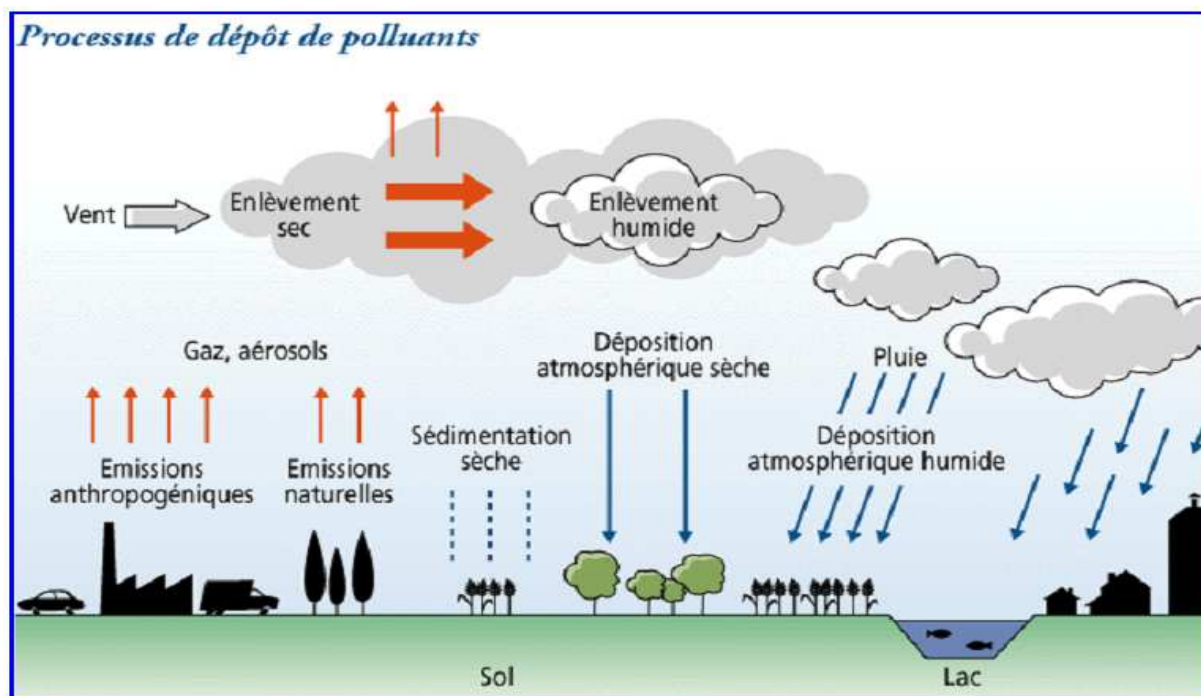


Figure 01 : Processus de dépôt des polluants D'après Maystre et *al.*, (1988)

4. TOXICITE DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES:

4.1. Transfert des ETM vers les organismes animaux :

L'ensemble des auteurs s'accorde à considérer que les différences de régime alimentaire (déterminant l'exposition des organismes) et de physiologie digestive représentent les principaux facteurs expliquant les variations de concentrations observées chez les différents groupes (Hopkin et *al.*, 1985).

Toutes les études constatent que la concentration en ETM n'est pas obligatoirement liée à la position de l'organisme étudié dans la chaîne trophique, que ce soit dans des écosystèmes contaminés (Hunter et *al.*, 1987b; Laskowski et Maryanski, 1993; Rabitsch 1994 ; Mackay et *al.*, 1998) ou dans des écosystèmes présumés non-pollués (Knutti et *al.*, 1988; Scharenberg et Ebeling, 1996), les concentrations en ETM dans les organismes ne sont pas corrélées avec leur masse corporelle.

Les gastéropodes comme les isopodes, parmi les organismes qui accumulent le plus les différents ETM (Dallinger, 1993), cet auteur a classé les espèces en fonction des FBAs (macroconcentrateurs : FBAs > 2, microconcentrateurs : FBAs < 2 et déconcentrateurs : FBAs < 1) pour les différents ETM et les gastéropodes dont *Helix aspersa* sont macroconcentrateurs pour le Cd, le Cu et le Zn, le tableau (02) montre les principales voies d'exposition des invertébrés aux polluants.

Tableau 02. Principales voies d'exposition des invertébrés aux polluants

(Adapté par Walker et *al.*, 1996)

Invertébrés terrestres	Système digestif	Nourriture et eau
	Epithélium, cuticule	Environnement contaminé (sol, substrat, plantes...)
	Surface respiratoire	Polluants sous forme gazeuse, particulaire ou de gouttelettes

4.2. Transfert des ETM dans les relations proie – prédateur :

Les fortes capacités d'accumulation des ETM des mollusques gastéropodes ont alerté les chercheurs sur le risque qu'ils représentaient en terme de transfert dans les chaînes alimentaires, Laskowski et Hopkin, (1996a) soulignent également le rôle possible des escargots dans l'intoxication de prédateurs. Ces auteurs constatent que les concentrations de Cd et de Cu dans les tissus d'escargots sont toujours supérieures à celles de leur nourriture. Pour le Pb et le Zn, les concentrations sont inférieures dans les tissus lorsque la nourriture est fortement contaminée.

5. BIOACCUMULATION ET DEVENIR DES ETM CHEZ L'ESCARGOT :

Selon Ramade (1993), la bio-accumulation est un phénomène par lequel une substance, présente dans un biotope, s'accumule en surface et/ou pénètre dans un organisme même si elle n'a aucun rôle métabolique, voire même si elle est toxique à l'organisme.

5.1. Sources et voies d'exposition et d'absorption :

Une fois libérés dans l'environnement, les ETM sont soumis à des processus de transport et de dispersion complexes à l'intérieur et entre les différents compartiments de la biosphère. L'exposition dépend donc à la fois de la physico-chimie du milieu et de la biologie de l'organisme considéré (Van Straalen et Van Gestel, 1998).

A l'interface sol-plante-atmosphère, l'escargot intègre plusieurs sources de contaminations accessibles via différentes voies d'exposition (**Figure 02**).

- ✓ digestive par ingestion de nourriture (plante mais également particules de sols, Gomot et *al.*, 1989),
- ✓ cutanée par diffusion des polluants du sol à travers l'épithélium du pied (Coeurdassier et *al.*, 2002 ; Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2002),
- ✓ respiratoire par inhalation de gaz et/ou de particules atmosphériques (Ismert et *al.*, 2002, Regoli et *al.*, 2006).

De même, chez *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 auxquels ils sont liés 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), ces différentes voies sont illustrées dans la figure (02).

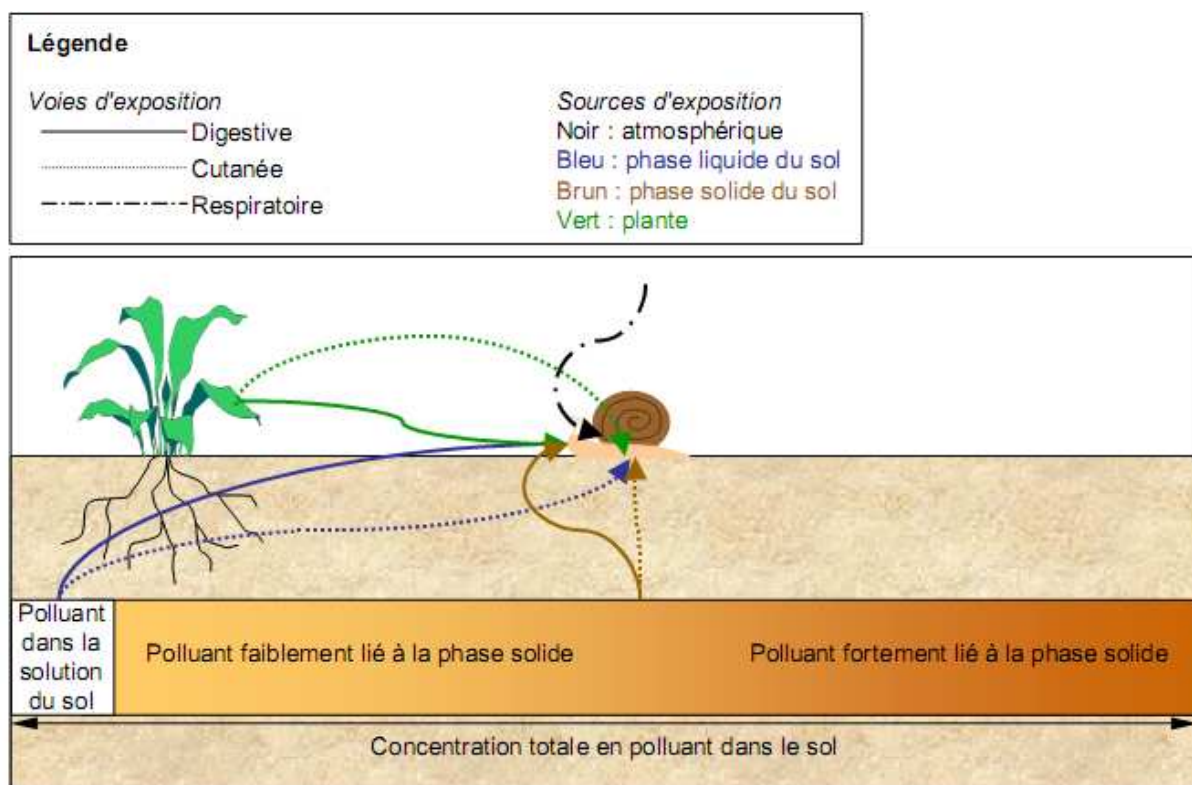


Figure 02 : Voies et sources d'exposition (et de transfert potentiel) des mollusques gastéropodes aux polluants (Scheifler, 2002).

5.2. Devenir Des ETM Dans L'organisme :

L'accumulation dans les organismes est le résultat net des processus d'absorption/assimilation, de distribution, de stockage et d'excrétion (Dallinger, 1993). Les mollusques gastéropodes sont connus pour leur grande capacité d'accumulation des ETM les plus fréquents, à savoir le Cd, le Cu, le Pb et le Zn. Cette propriété a été mise à profit pour utiliser les escargots comme bioindicateurs de pollution par les ETM (Beeby et Richmond, 2002 ; Viard *et al.*, 2004 a ; Notten *et al.*, 2005).

Dans toutes les espèces étudiées à ce jour, la glande digestive (ou hépatopancréas) contient systématiquement les plus fortes concentrations en Cd, Pb et Zn (Cooke *et al.*, 1979; Dallinger et Wieser, 1984a ; Cantu Medellin *et al.*, 2009). Le tube digestif semble également jouer un rôle dans le stockage du Cd, le pied apparaissant plus comme un site d'accumulation transitoire en liaison 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). La coquille des escargots n'est pas un site de stockage important pour le Cd et le Zn.

Des escargots (*Helix aspersa*), prélevés dans des zones hautement contaminées, présentent des concentrations de l'ordre de 1 µg/g (Cooke *et al.*, 1979). Seul le Pb a été retrouvé dans la coquille mais à des quantités n'excédant pas 3% des quantités totales accumulées dans l'organisme (Beeby et Richmond, 1989 ; Beeby *et al.*, 2002).

5.3. Des exemples des effets toxiques sur l'escargot :

Une étude récente a démontré que l'exposition *in vitro* au Zn, Cu et Cd provoque une inhibition des activités des nucléotidases dans l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* mais n'altère pas l'activité des cholinestérases (De Sousa *et al.*, 2006), (Chabicoovsky *et al.*, 2004) ont montré qu'une exposition de long terme (supérieure à 40 jours) à de la laitue enrichie à 270 µg Cd/g provoquait à partir d'une concentration interne de 450 µg Cd/g, une surcharge des MT dans l'hépatopancréas d'*Helix pomatia* à l'origine d'apoptoses cellulaires et d'une mortalité supérieure à 10% chez les individus exposés.

Chez la même espèce, (Manzl et *al.*, 2004) ont également observé la toxicité aiguë du Cd et du Zn sur les cellules de l'hépatopancréas. A l'échelle de l'organe, des concentrations de 200 (µg) de Cd par 1 (g) de nourriture provoquent une inhibition importante du développement du tractus génital chez *Helix aspersa* (Gomot-de Vaufleury et Kerhoas, 2000).

Beeby et *al* (2002) ont montré, en exposant en laboratoire des escargots *Helix aspersa* à la nourriture contaminée au Pb, une diminution de 15 à 25% de la masse de la coquille. Jordaens et *al* (2006) n'ont cependant pas trouvé de relation significative entre la pollution des sols par les ETM (Cd, Cr, Pb et Zn) et la solidité et la morphologie des coquilles de populations de l'escargot *Cepea nemoralis* prélevées *in situ*. De plus une diminution de l'activité reproductrice, du nombre de pontes et de la fécondité chez *Helix aspersa* (Russell et *al.*, 1981 ; Laskowski et Hopkin, 1996 a ; Gomot et Kerhoas, 2000).

6. BIOMARQUEURS :

Le biomarqueur utilise dans un sens très large, incluant quasiment toutes les mesures reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel, ce danger pouvant être chimique, physique, ou biologique (WHO, 1993).

6.1. Biomarqueurs d'exposition, d'effet, de susceptibilité :

En écotoxicologie, trois types de biomarqueurs: les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique, les biomarqueurs d'effet de l'exposition et les biomarqueurs de sensibilité aux effets (Lagadic et *al.*, 1997 ; Van der Oost et *al.*, 2003).

- Les biomarqueurs d'exposition sont des indicateurs de la contamination des systèmes biologiques par un (des) xénobiotique(s). Ils peuvent être le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et/ou dans des liquides corporels.
- L'utilisation des biomarqueurs d'effet permet de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et, qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, a exercé un effet toxique sur une cible critique.

- Les biomarqueurs de susceptibilité indiquent quant à eux la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre au stress induit par l'exposition à un xénobiotique. Cette catégorie de biomarqueurs peut donc notamment inclure des facteurs génétiques, leur intérêt principal pourrait résider dans leur capacité à fournir un éclairage nouveau sur l'interprétation collective des biomarqueurs d'exposition et d'effet, ce qui encourage leur développement (Livingstone, 1993 ; Depledge et *al.*, 1993; Lagadic et *al.*, 1994), et la figure (03) représente les niveaux de réponse par les biomarqueurs .

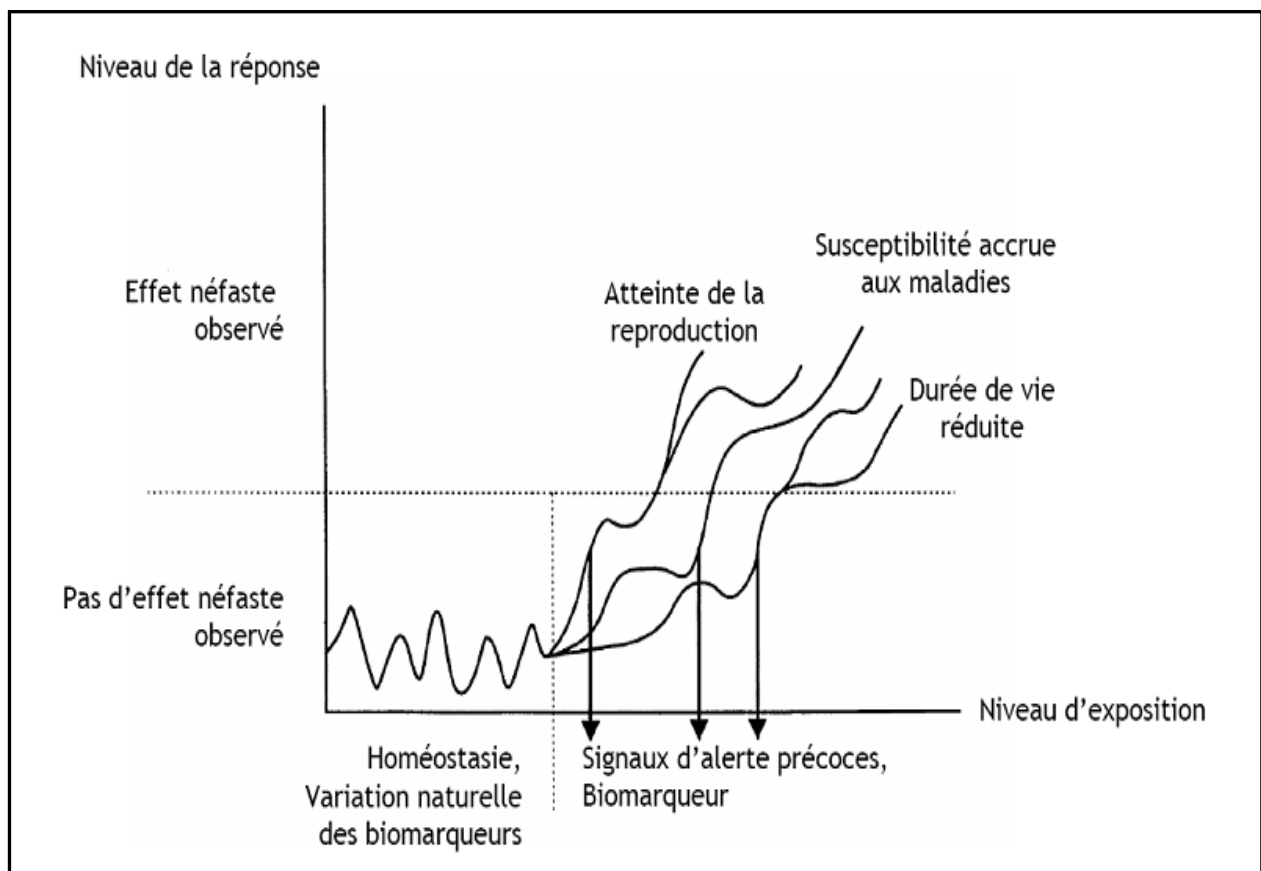


Figure 03 : Représentation graphique des niveaux de réponses attendus en fonction du niveau d'exposition à un facteur de stress (Van der Oost et *al.*, 2003).

7. UTILISATION DES ESCARGOTS DANS L'ETUDE DE LA CONTAMINATION PAR LES ETM :

Les escargots sont des mollusques gastéropodes pulmonés terrestres à activité nocturne qui synchronise avec la photopériode. Ils sont fortement influencée par les conditions environnementales, notamment l'hygrométrie du sol et de l'air (activité au dessus de 80% d'humidité), la température (inactivité pour des températures nocturnes inférieures à 9°C) et l'intensité lumineuse (Chevallier, 1982), Ils détestent les terrains argileux, acides et marécageux. La coquille est constituée de quelques tours de spires s'enroulant dans le sens des aiguilles d'une montre, autour d'un ombilic prononcé pour *Helix aspersa*.

7.1. Anatomie de l'escargot :

Le corps d'un escargot consiste en un pied unique, une tête et une masse viscérale enroulée placée dans la coquille.

Le mouvement a lieu grâce à l'expansion et l'extraction de muscles dans le pied, des glandes de mucus sur le reste du corps protégeant l'escargot contre la perte d'eau. Deux paires de tentacules placées sur la tête. La paire supérieure porte les yeux. La coquille est sécrétée par un épais pli de peau, appelé le manteau, cette dernière est reliée au corps par un puissant muscle qui est attaché au columella.

Des "ramifications" à la tête et aux tentacules, la contraction de ce muscle permet à l'escargot de se retirer dans sa coquille. À l'intérieur de la coquille, se trouve la cavité du manteau, qui contient le cœur, le rein et le poumon, la figure (04) montre l'anatomie d'*Helix aspersa*.

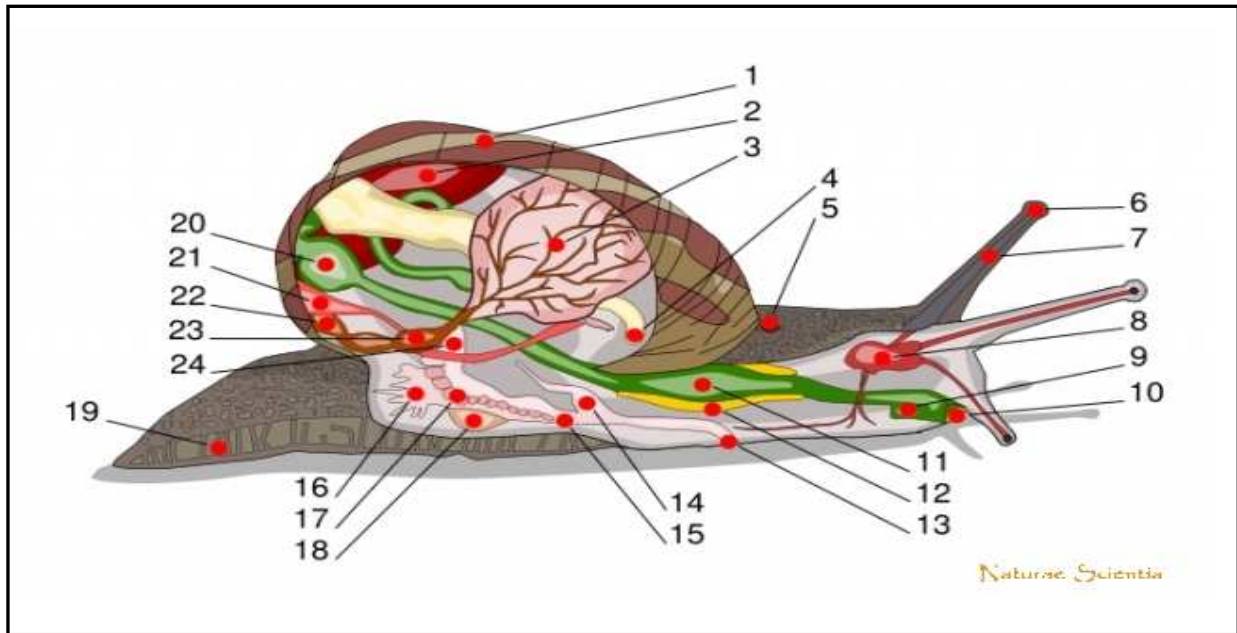


Figure 04 : Anatomie de l'escargot (www.naturae-scientia.com)

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

7.2. Reproduction :

Les escargots sont hermaphrodites, mais doivent s'accoupler car ils ne peuvent pas s'autoféconder. Ils sont tous équipés d'un pénis et de l'organe réceptif correspondant.

La fécondation est réciproque par échange de spermatophores entre les 2 partenaires, certains individus peuvent toutefois se comporter uniquement comme mâle ou comme femelle. L'autofécondation, qui existe chez les limaces et les achatines, est rarement observée chez les escargots du genre *Helix* et n'a jamais été rapportée pour *Helix aspersa* (Gomot, 1980). La durée entre l'accouplement et la ponte est d'environ 10 jours en conditions optimales mais peut atteindre 1 voire 2 mois lorsque les conditions de l'environnement sont défavorables.

Les œufs (entre 80 et 130) sont déposés dans une cavité creusée à quelques cm sous la surface du sol, cavité qui est ensuite rebouchée. L'incubation dure de 12 jours à 20°C

à environ 22 jours à 15°C. Le nombre moyen de ponte par reproducteur est de 1,3 et le nombre d'infantiles produits est de 75 à 85 (Madec, 1983).

7.3. Les escargots indicateurs de contamination par ETM :

Les escargots peuvent pour partie refléter la qualité de leur environnement en accumulant certains polluants ou toxiques naturellement présents dans leur milieu, dans leur chair, ou dans leurs coquilles. Leur mucus les protège des agressions extérieures, bactériennes et fongiques notamment. la question a été posée de leur capacité à abriter une partie du cycle du virus grippal dont la cible est l'acide sialique.

Les escargots (Mollusques, Gastéropodes, Pulmonés). Sont reconnus comme des indicateurs écologiques pertinents (Berger et Dallinger, 1993 ; Cortet et *al.*, 1999), car :

- ✓ ils représentent une biomasse significative au sein de la communauté des invertébrés du sol (Dallinger et *al.*, 2001),
- ✓ ils occupent une situation privilégiée à l'interface sol-plante-atmosphère (Barker, 2001),
- ✓ ils intègrent des sources et voies de contamination multiples (Scheifler et *al.*, 2006),
- ✓ ils possèdent des capacités de bioaccumulation importantes pour de nombreux polluants métalliques (Brooks et *al.*, 1992 ; Menta et Parisi, 2001 ; Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2002 ; Viard et *al.*, 2004) et organiques (Coourdassier et *al.*, 2001 ; Sverdrup et *al.*, 2006),
- ✓ ils présentent des réponses physiologiques telle que l'inhibition de croissance, et de reproduction (Gomot-de Vaufleury et Bispo, 2000 ; Swaileh et Ezzughayyar, 2001 ; Notten et *al.*, 2006) et biochimiques (Coourdassier et *al.*, 2001 ; Ismert et *al.*, 2002 ; Regoli et *al.*, 2006) quand ils sont exposés aux contaminants,
- ✓ ils constituent un élément des réseaux trophiques qui contribue au transfert des polluants du sol et/ou des plantes aux prédateurs (Beeby, 1985 ; Laskowski et Hopkin, 1996b ; Scheifler et *al.*, 2002a).

1. Matériel et méthodes :

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de toxicologie cellulaire d'université Badji Mokhtar – ANNABA, sur 35 escargots *Helix aspersa*. Ces escargots utilisés au cours des expérimentations proviennent d'une population originaire d'une région non polluée à Boumahra Ahmed wilaya de Guelma (Nord-est de l'Algérie), et la situation géographique de la région de collecte des escargots est illustrée dans la figure (05).

1.1. Méthode d'échantillonnage :

Collecte des échantillons :

La collecte de l'escargot *Helix aspersa* a été effectuée au mois d'octobre 2008 dans des jardins de la région de Boumahra Ahmed « GUELMA », de façon aléatoire. Les escargots collectés sont maintenus pendant 15 jours pour l'acclimatation aux conditions de laboratoire avant le traitement.

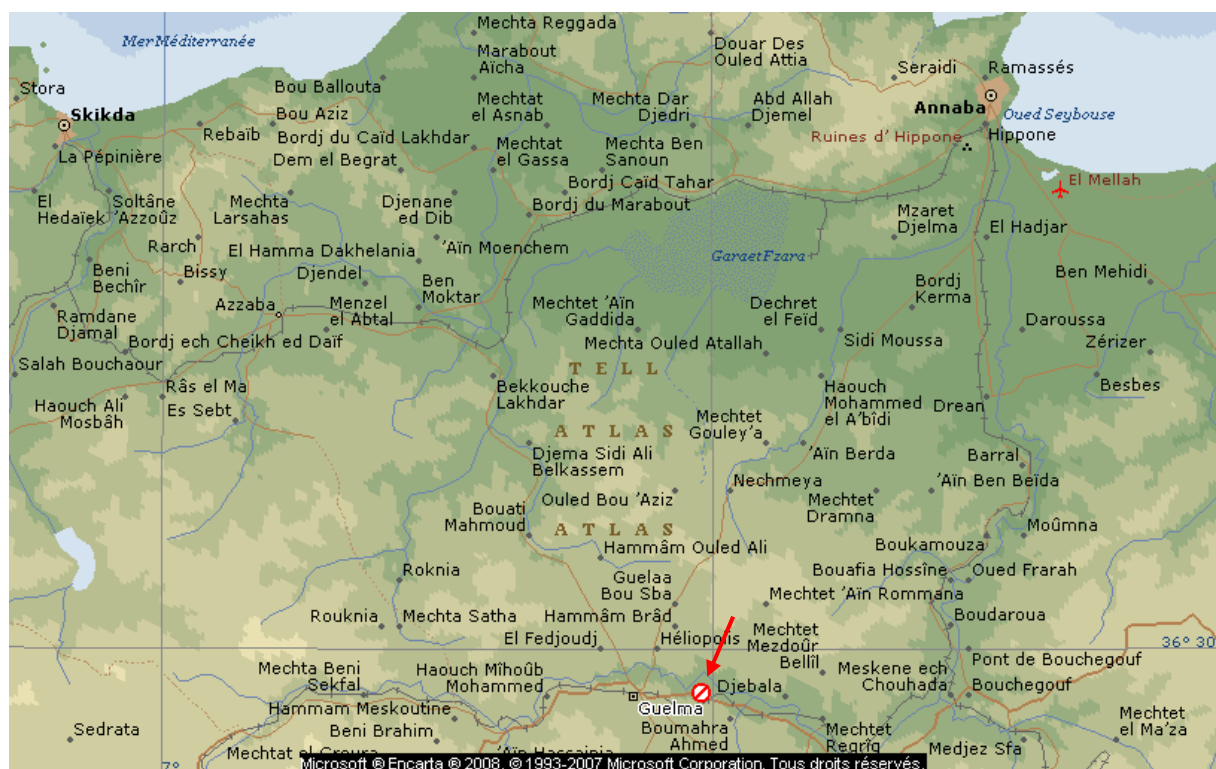


Figure 05 : localisation du site d'échantillonnage à « Boumahra Ahmed »

(Encarta 2008)

1.2. Matériel biologique :

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est l'escargot petit gris : *Helix aspersa* dont la position systématique est la suivante : (Bonnet et Vrillon, 1990.)

Règne : Animalia

Embranchement : Mollusca

Classe : Gasteropoda

Ordre : Stylommatophora

Famille : Helicidae

Genre : *Helix*

Espèce : *aspersa*

Sous-espèce : *aspersa*

Helix aspersa (**petit-gris**) : Les escargots utilisés dans nos travaux appartiennent à l'espèce *Helix aspersa aspersa* Müller (1774), également nommés *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* dans la nomenclature récente, (Barker, 2001), son nom vernaculaire est Petit gris. Ce sont des mollusques gastéropodes pulmonés terrestres stylommatophores (**Figure 6 a.b**). Le genre *Helix* compte de nombreuses espèces européennes et méditerranéennes (avec une limite altitudinale située à 1000 m environ) mais l'espèce *aspersa* a colonisé les régions atlantiques et a été introduite hors de son aire de répartition européenne (Chevallier 1992; De Kerney et al., 1999).

Leur croissance en milieu naturel (de l'éclosion jusqu'à la maturité sexuelle) s'effectue par pallier (en fonction des alternances de périodes d'activité et des estivations/hibernations), généralement en 2 ans. La longévité de cette espèce en milieu naturel est de 6 à 7 ans, et le tableau (3) montre les phases de croissance d'*Helix aspersa*.

Tableau (03) : Description des 4 phases de croissance d'*Helix aspersa* (Gomot et Enée 1980).

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

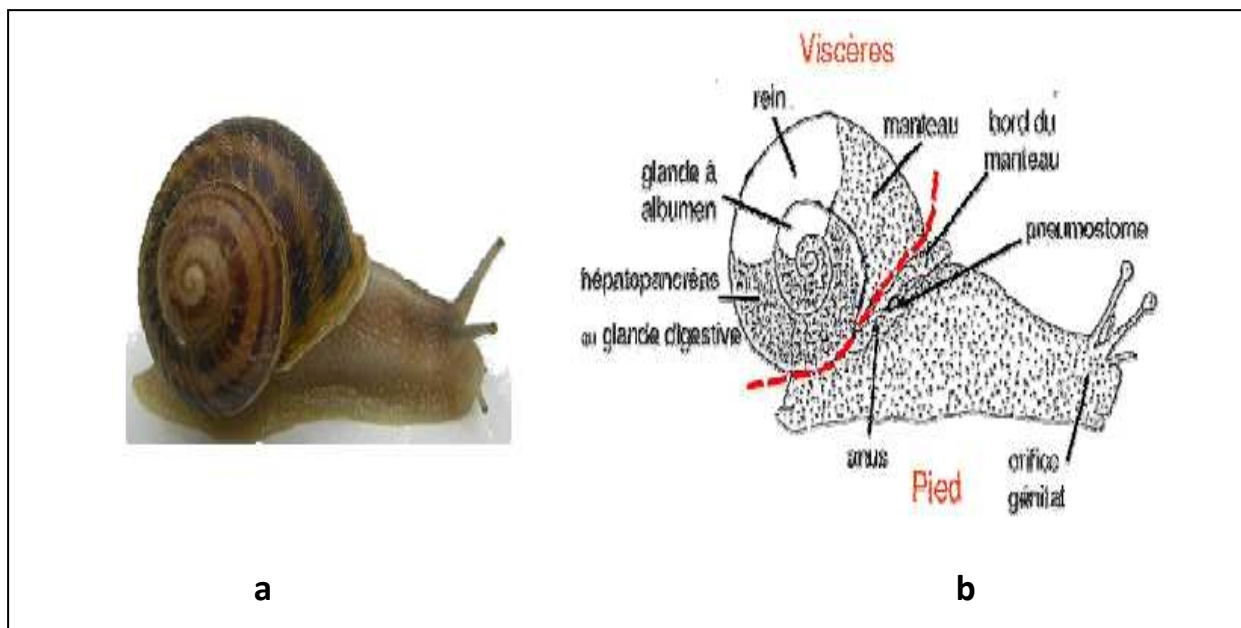


Figure 6 : *Helix aspersa aspersa* adulte (Masse fraîche : 8-12 g ; Diamètre coquille : 30-40 mm). **a** : photographie ; **b** : schéma de l'escargot sorti de sa coquille. Les pointillés rouges symbolisent la ligne de dissection séparant le pied des viscères (Daguzan, 1983).

2. Matériel chimique :

2.1. Les rejets métalliques utilisés :

Les poussières métalliques utilisées dans notre étude ont été collectées au complexe sidérurgique d'El-Hadjar à Annaba ; une analyse chimique par absorption atomique a été réalisée pour déterminer la composition de ces poussières. Cette analyse a déterminé la présence de 07 métaux lourds (Klèche, 2002), dont le Cu, Zn, Pb, Cr, Ni, Mn, Fe, tableau (04).

Tableau (04) : 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 (2001-2002), (Klèche, 2002).

Echantillon	Cu	Zn	Pb	Cr	Ni	Mn	Fe
Poussières ACE1	3,7	240	24	10	1,2	320	3000
Poussières ACE 2	7	480	62,4	12	1,3	540	3600
Total	10,7	720	88,4	22	2,5	860	6600

3. Conditions d'élevage :

Les escargots utilisés dans notre expérimentation sont des adultes, leurs poids moyen est $(10 \pm 0.35g)$.

Les escargots sont élevés dans les conditions d'environnement optimales suivantes :

Photopériodes 18h de lumière / 24h, température $20 \pm 2^\circ C$, humidité relative 70-80 % (Gomot de vaufleury, 2000).

Les escargots sont répartis dans des boites de plastique transparentes (23,5 × 16,5 × 10,5 Cm) « 4071 ,37 Cm³ » avec couvercle perforé, et chaque boite contient une éponge humide pour maintenir le taux d'humidité, l'alimentation « farine de blé » est fournie dans des boites de pétrie. Les boites de plastiques sont quotidiennement nettoyées l'après midi, et on renouvelant l'alimentation quotidiennement.

3.1. Mode de traitement :

Le traitement des animaux à été effectué par addition des concentrations croissantes de poussières métalliques dans l'alimentation. Nous avons retenu 4 concentrations croissantes.

Les escargots sont répartis en 5 lots de {7 escargots / lot.} (Tableau 05)

Tableau (05) : Répartition des concentrations de poussières métalliques.

Lots	Nombre d'Escargots	Concentration en µg poussière/ g d'aliment sec (farine de blé)
T	07	0
1	07	100
2	07	500
3	07	1000
4	07	1500

Le traitement se déroule pendant deux semaines pour les 5 lots.

3.2. Dissection et prélèvement de l'hépatopancréas et le rein :

Après deux (2) semaines les escargots sont pesés, mis à jeun pendant 48 h pour vider leur tube digestif, puis disséqués.

Après la 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 du glutathion (GSH).
- ❖ Un échantillon pour le dosage de la glutathion-s-transférase (GST).
- ❖ Un échantillon pour le dosage de la catalase.
- ❖ Un échantillon pour le dosage de malondialdehyde (MDA).

Un dernier échantillon conservé dans une solution de Bouin alcoolique pour l'étude histologique.

Les mêmes étapes de dissection ont été suivies afin d'effectuer sur les reins, avec comme objectif les mêmes dosages effectués pour l'hépatopancréas, et la figure (07) montre la dissection des deux organes (hépatopancréas et rein).



Figure 07 : La dissection de l'escargot

4. Paramètres étudiés :

4.1. Paramètres physiologiques : Le poids

Les escargots sont pesés individuellement avant le traitement et répartis en 5 lots de poids moyen de $10 \pm 0,35$ g.

Le suivi de poids durant notre traitement se fait le septième puis quatorzième jour à la fin du traitement. Le poids moyen de chaque lot est calculé et comparé avec les poids initiaux mesurés avant traitement aux poussières métalliques.

4.2. Paramètres biochimiques :

4.2.1 Dosage des métabolites :

4.2.1.1. 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 08).

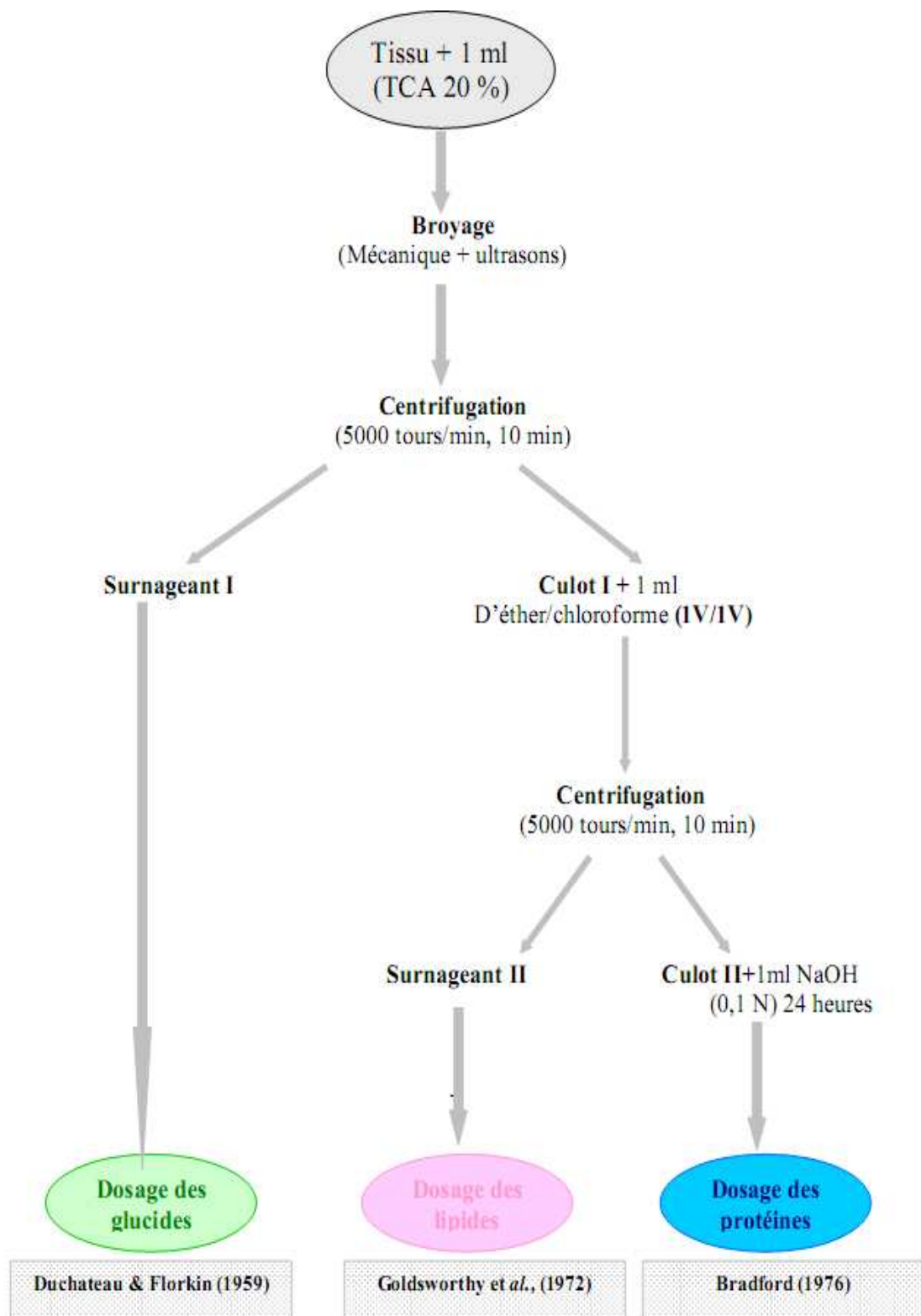


Figure 08: Principales étapes d'extraction des métabolites : **protéines, glucides, lipides**

(Shibko *et al.*, 1966).

4.2.2. Dosage des glucides totaux :

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

4.2.3 Dosage des lipides totaux :

La concentration des lipides totaux a été estimée selon *Glodsworthy et al (1972)* utilisant le réactif sulfophosphanillinique (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 (Cevital) 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 sulfophosphanillinique et on agite. 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.

4.2.4. 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 50 µl du surnageant ou de la gamme étalon, 200µl de réactif Bradford dans 750 µl d'eau distillée. La présence des protéines dans l'échantillon se

révèle par une coloration bleue. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir de la solution de Bradford.

4.3. Dosage du Glutathion (GSH):

Le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, cystéine et de glycine. 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), et 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), dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5-mercaptopurique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm.

Le dosage s'effectue après 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 du 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 :

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

Taux du GSH : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines

($\mu\text{M/mg}$ 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.

4.4. Mesure de l'activité glutathion-S-transférase (GST) :

La mesure de l'activité 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 :

$$\text{Activité GST } (\mu\text{mol /mn /mg prot}) = \frac{(\Delta \text{ DO } \times \text{ Vt})}{(9,6 \times d \times \text{ Vs } \times \text{ mg de prot})}$$

Taux de GST : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (µM/mn/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.

4.5. Dosage du malondialdéhyde (MDA) :

Le malondialdéhyde MDA, "messager 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.*, 1997). 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 & Hadley (1990) basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm.

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 μ l 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 la quelle 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 :

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

Taux du MDA : 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.

156 : coefficient d'extinction molaire du TBA.

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

V_s : volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0,5 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

4.6. Mesure 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 (H_2O_2). Le protocole le plus couramment utilisé est le plus direct (Aebi, 1984; Goth 1991a, b).

Cette enzyme intervient dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique en eau et en oxygène (Regoli et Principato, 1995).



L'activité 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 (H_2O_2) ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en faisant réagir dans 100Mm de tampon phosphate pendant 1mn à pH 7,5 100 μl de H_2O_2 (500 mM) sur 20 μl d'homogénat, à une température d'incubation de 25°C. Les résultats sont exprimés en μmol d' H_2O_2 par minute et par mg de protéines.

Tableau (06): Protocole utilisé pour le dosage de l'activité Catalase

	Essai μl	Blanc μl
Tampon phosphate (100 mM ; pH 7,5)	780	800
H ₂ O ₂ (500 mM)	200	200
Homogénat	20	0

L'activité de la CAT est plus sensible décroît rapidement, après 15 secondes de délai durant 60 secondes de mesure. Le coefficient d'extinction est de $0,0040 \text{ m M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et l'activité CAT est calculée par la formule suivante :

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

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

ΔDO : 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.

5. Etude histologique :

Les échantillons sont fixés dans le liquide de Bouin alcoolique pendant 48h. Puis déshydratés dans l'éthanol 95° au moins deux fois pour éliminer l'excès d'acide picrique. Après déshydratation, les pièces sont conservées dans du butanol. Après imprégnation dans la paraffine (3 bains de 24 h.) les pièces sont coupées (2µm) à l'aide d'un microtome Anglia scientific 0325, étalées avec l'eau gélatinée et séchées à l'étuve (37 °C) pendant au moins 48 h. 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 observations des coupes sont effectuées avec une photo microscope LEICA DM 1000.

6. Etude statistique

L'analyse statistique des données est effectuée par le test de student qui sert à comparer entre deux échantillons (Témoin et traité). Ce test est réalisé à l'aide d'un logiciel d'analyse des données: Minitab (Version 14.0) (Dagnelie, 1999).

1. Effets de particules métalliques sur l'évolution du poids relatif des escargots :

La figure (09) met en évidence l'évolution de poids relatif des escargots après deux semaines d'exposition aux particules métalliques. Ainsi l'exposition des escargots pendant une semaine ne semble avoir aucun effet sur le poids relatif des animaux et ce pour toutes les concentrations testées, avec une prise moyenne de poids d'environ 0,05 g pour tous les traités.

Cependant après deux semaines de traitement, les variations du poids relatif chez les lots traités aux plus fortes concentrations (500, 1000 et 1500 $\mu\text{g/g}$) montrent une nette diminution de l'ordre de (0,12 g, et 0,41 g) par rapport au poids initial des escargots et les témoins.

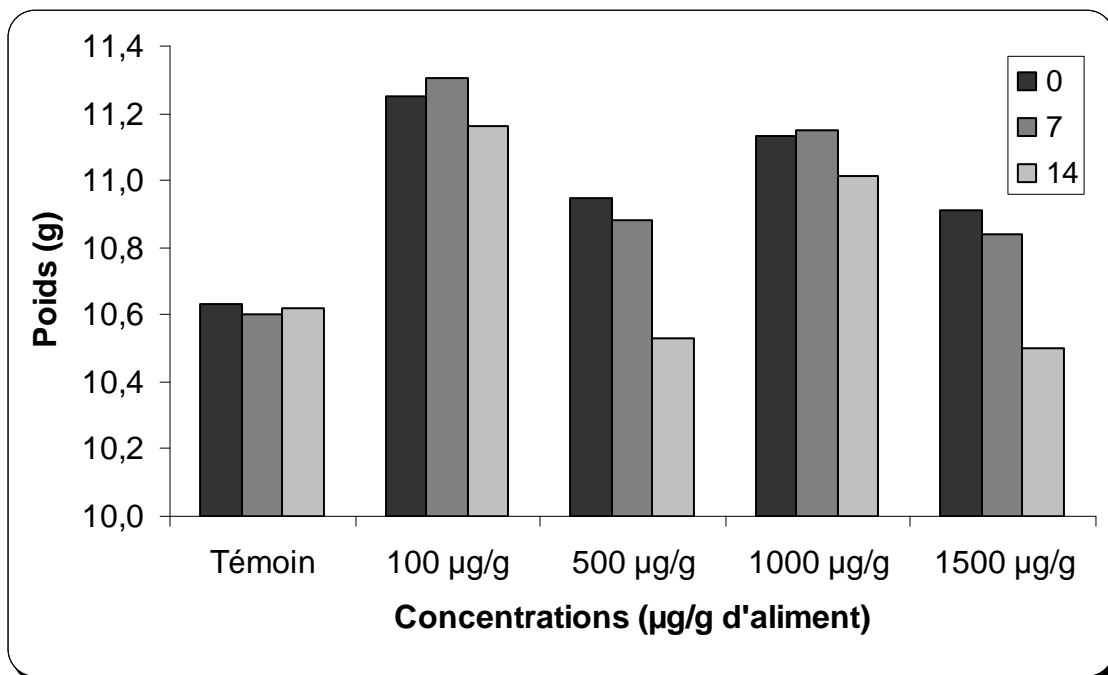


Figure 09 : Evolution des poids relatifs d'*Helix aspersa* traités par différentes concentrations de particules métalliques en fonction du temps.

2. Effets de particules métalliques sur l'évolution des Paramètres biochimiques :

2.1. Évolution du taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas :

La figure (10) montre l'effet des particules métalliques sur le taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*. Ainsi nous remarquons que le taux de protéines totales tend à augmenter pour les plus fortes concentrations (500, 1000 et 1500 $\mu\text{g/g}$) d'une manière hautement significative avec ($p=0,003$ et $p=0,006$) respectivement. Cette augmentation est de l'ordre de 50% par rapport aux témoins.

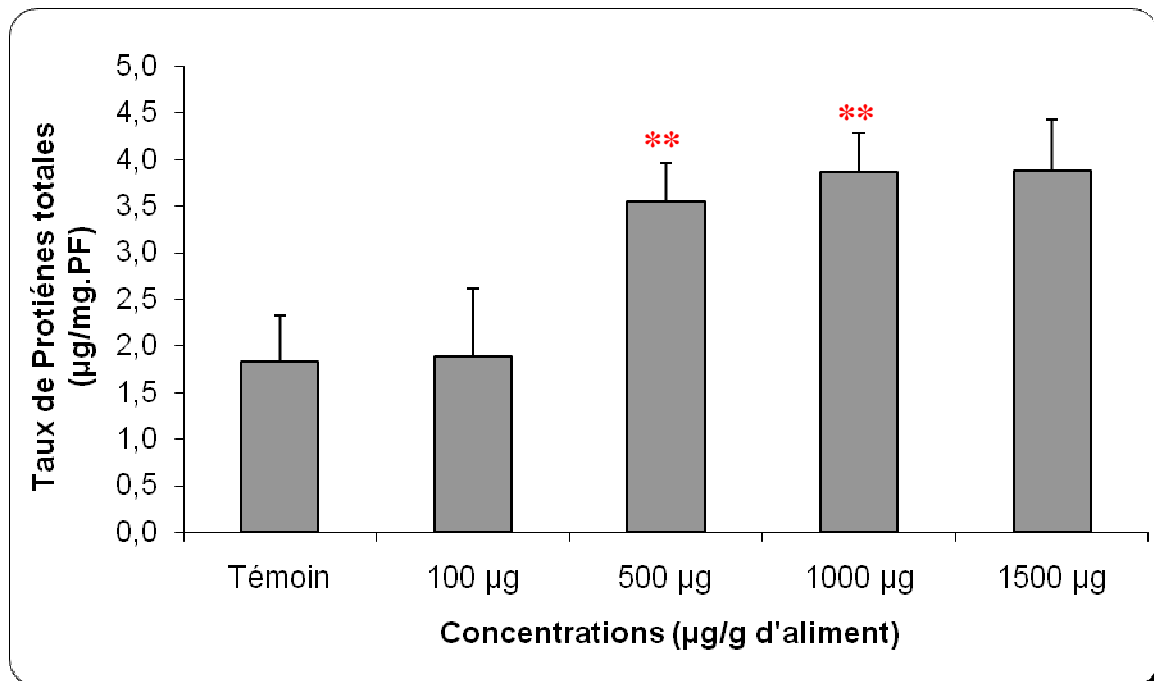


Figure 10: Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de protéines au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

2.2. Évolution de taux de protéines totales au niveau du rein:

La figure (11) illustre l'évolution du taux de protéines totales au niveau du rein. Nous ne constatons aucune différence significative entre le taux de protéines totales des témoins et les traités par les différentes concentrations de particules métalliques puisque ce taux est stable et il est de l'ordre de 3,5 $\mu\text{g}/\text{mg.PF}$ aussi bien chez les témoins que chez les traités.

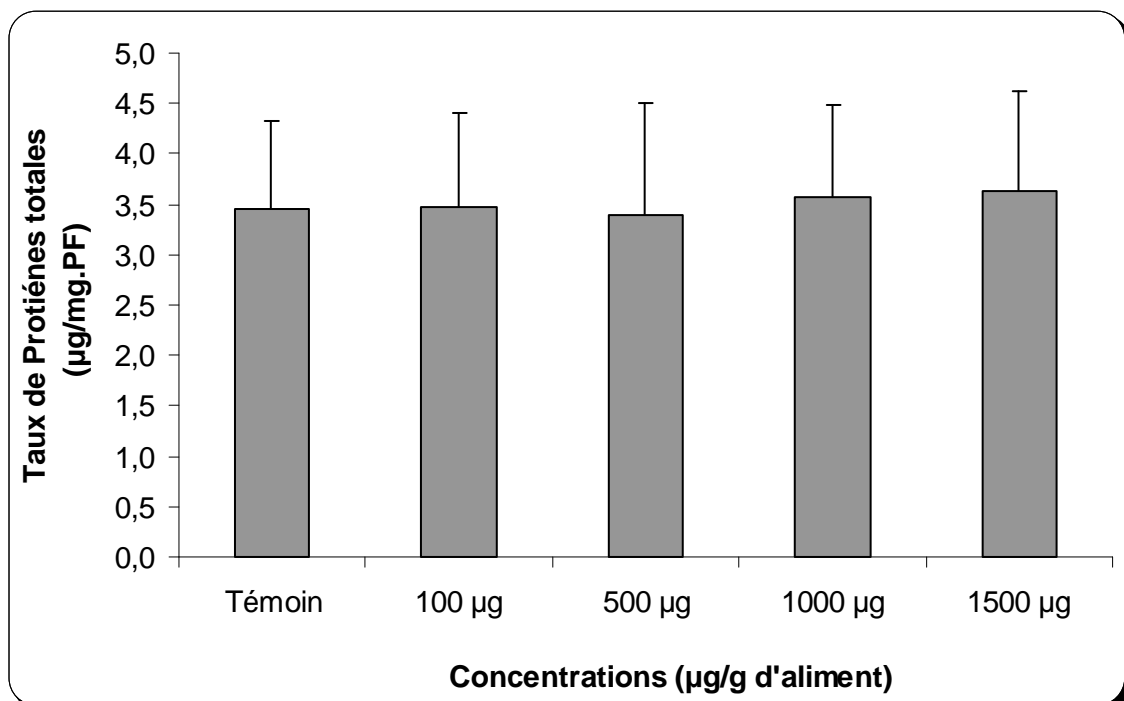


Figure 11: Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de protéines totales au niveau du rein d'*Helix aspersa*.

2. 3. Évolution du taux des lipides totaux au niveau de l'hépatopancréas :

La figure (12) illustre les variations du taux de lipides totaux au niveau de l'hépatopancréas. Nous constatons que chez les animaux traités avec différentes concentrations de xénobiotiques, le taux de lipides diminue d'une manière dose-dépendante. Ainsi l'analyse statistique révèle une différence significative entre le taux des lipides chez les traités par les concentrations 100 et 1000 $\mu\text{g/g}$ et les témoins avec $P=0,016$ et $p=0,015$ respectivement, la différence est aussi hautement significative chez les escargots traités par la concentration 500 $\mu\text{g/g}$ et très hautement significative pour les traités par la concentration 1500 $\mu\text{g/g}$ avec ($p=0,000$) toujours par rapport aux témoins.

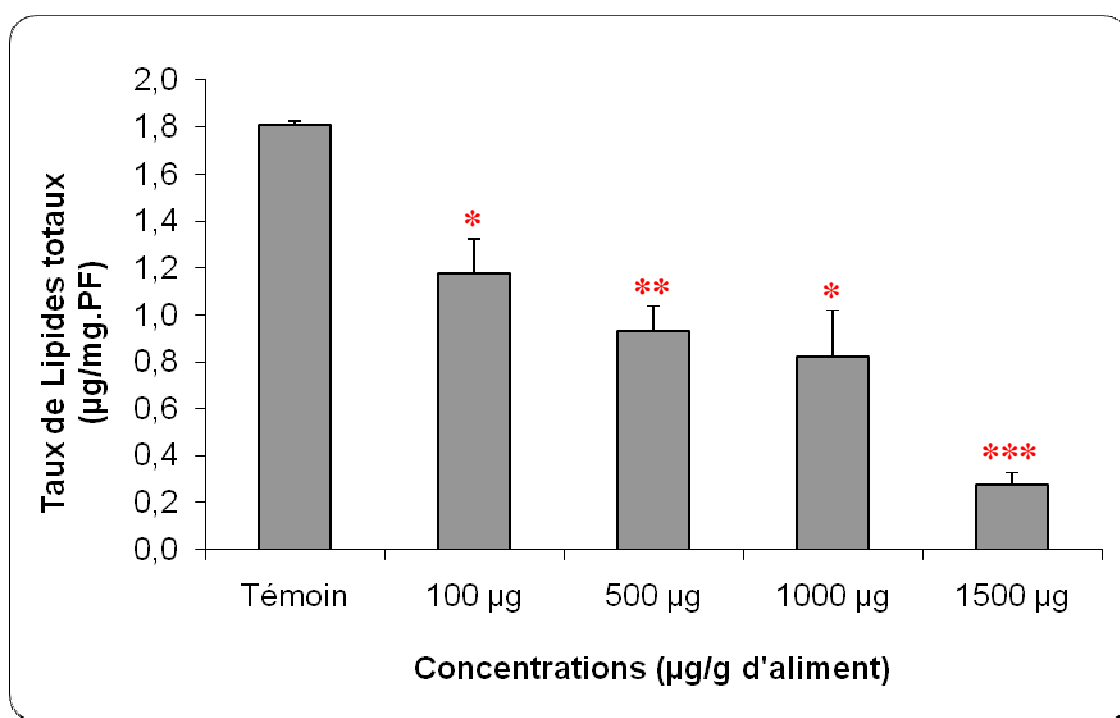


Figure 12: Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux des lipides totaux au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

2. 4. Évolution du taux des lipides totaux au niveau du rein:

La figure (13) montre l'évolution du taux des lipides totaux au niveau du rein, chez les escargots traités avec des concentrations croissantes de particules métalliques. Nous constatons que ce taux de lipides tend à diminuer d'une manière dose-dépendante chez tous lots traités.

L'analyse statistique révèle une différence significative entre le lot traité par la concentration 100 $\mu\text{g/g}$ avec ($p=0,012$) et le témoin, notons aussi une différence très hautement significative chez les traités par les plus fortes concentrations (500, 1000) et 1500 $\mu\text{g/g}$ avec ($P=0,000$), par rapport aux témoins.

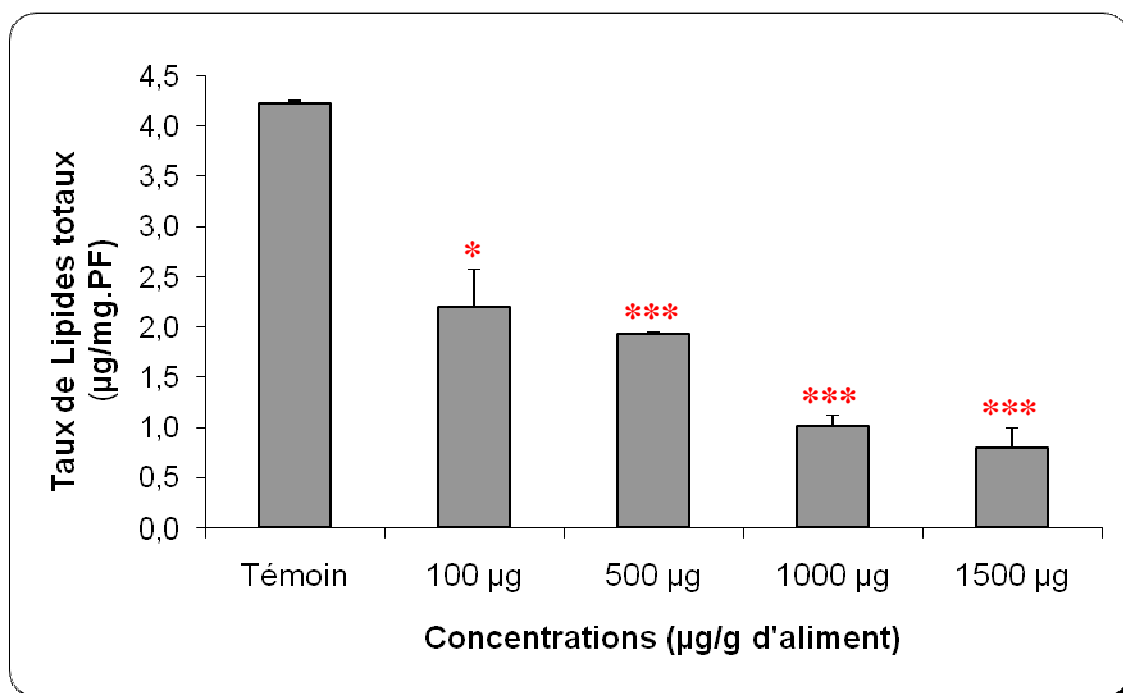


Figure13 : Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux des lipides totaux au niveau du rein d'*Helix aspersa*.

2. 5. Évolution du taux de glucides totaux au niveau de l'hépatopancréas :

La figure (14) illustre les variations du taux de glucides totaux au niveau de l'hépatopancréas des escargots traités avec des concentrations croissantes de particules métalliques. On remarque que le taux de glucides chez les escargots traités par la concentration (100 et 500 $\mu\text{g/g}$) est stable par rapport aux témoins. Cependant le taux de glucides diminue significativement d'une manière dose – dépendante chez les traités par les fortes concentrations (1000 et 1500 $\mu\text{g/g}$), avec ($P=0,012$) et ce par rapport aux témoins.

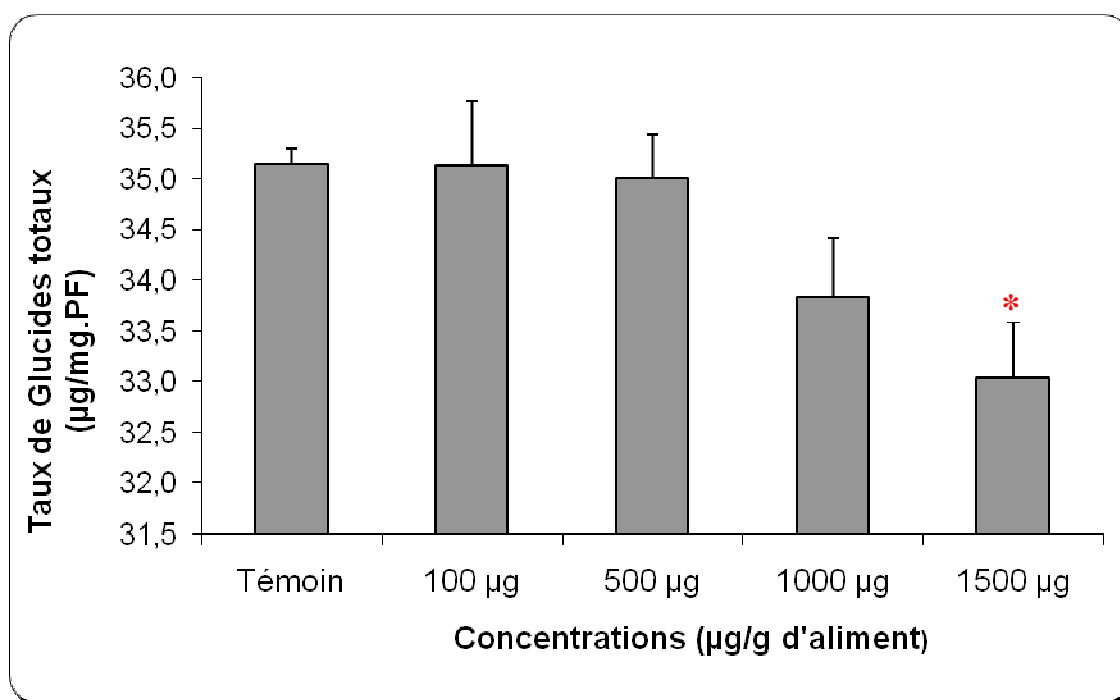


Figure 14 : Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de glucides totaux au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

2. 6. Évolution du taux de glucides totaux au niveau du rein :

La figure (15) illustre les variations du taux de glucides au niveau du rein, chez les escargots traités avec des concentrations croissantes de particules métalliques. Ainsi nous constatons que le taux de glucides totaux diminue d'une manière dose – dépendante chez les traités. L'analyse statistique révèle une différence significative entre les traités par la concentration 100 $\mu\text{g/g}$ par rapport aux témoins avec ($P=0,011$) et une différence hautement significative entre le taux de glucides chez les témoins et les traités par les concentrations (500, 1000 et 1500 $\mu\text{g/g}$).

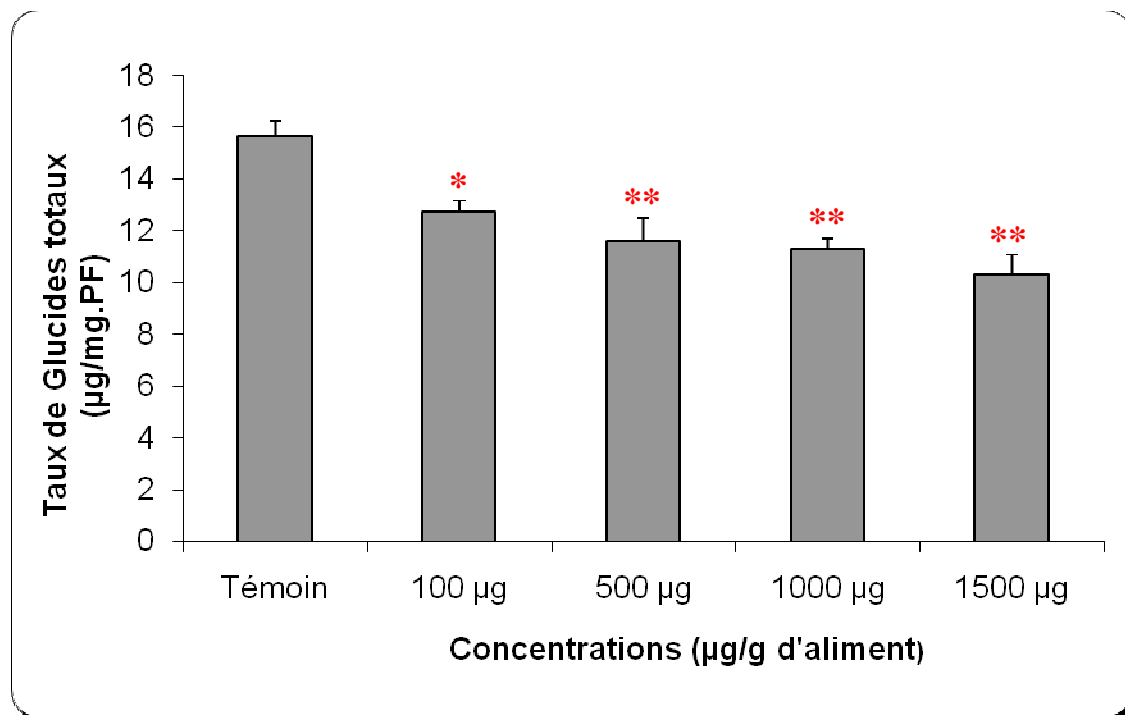


Figure 15 : Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de glucides totaux au niveau du rein d'*Helix aspersa*.

3. EFFETS DE PARTICULES METALLIQUES SUR LES BIOMARQUEURS :

3. 1. Évolution de l'activité Catalase (CAT) au niveau de l'hépatopancréas:

La figure (16) montre l'évolution de l'activité catalase au niveau de l'hépatopancréas des escargots traités par les concentrations croissantes de particules métalliques, les résultats ainsi obtenus révèlent une augmentation dose-dépendante. L'analyse statistiquement révèle une différence très hautement significative entre tous les lots traités par rapport aux témoins avec ($p=0,000$).

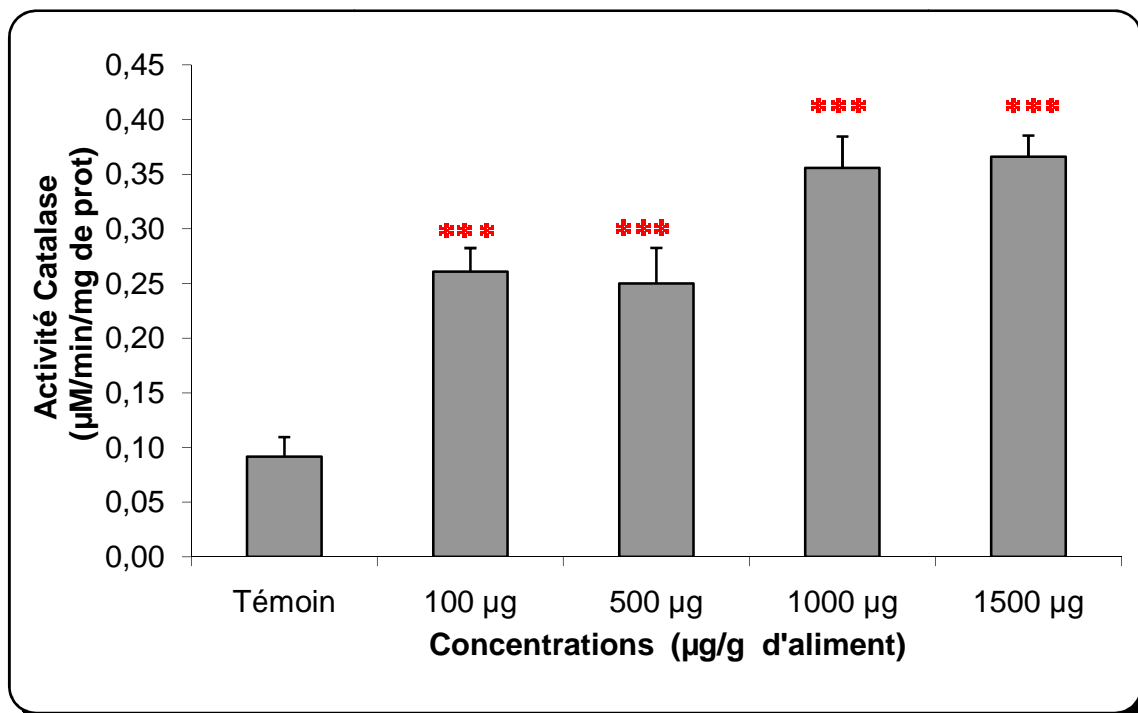


Figure 16 : Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution de l'activité catalase au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

3. 2. Évolution de l'activité Catalase (CAT) au niveau du rein:

La figure (17) met en évidence l'effet des rejets métalliques sur l'activité CAT au niveau du rein, l'activité catalase semble équivalente entre les lots témoins et les traités par la concentration 100 $\mu\text{g/g}$, alors que chez les lots traités par les fortes concentrations cette activité enzymatique est deux fois plus élevée que chez les témoins, en effet elle est de l'ordre de 0,07 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines pour les traités avec 500 $\mu\text{g/g}$ et de 0,03 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines pour les témoins. La différence entre les lots traités et le lot témoin est significative à hautement significative avec $p=0,041$ et $p=0,006$.

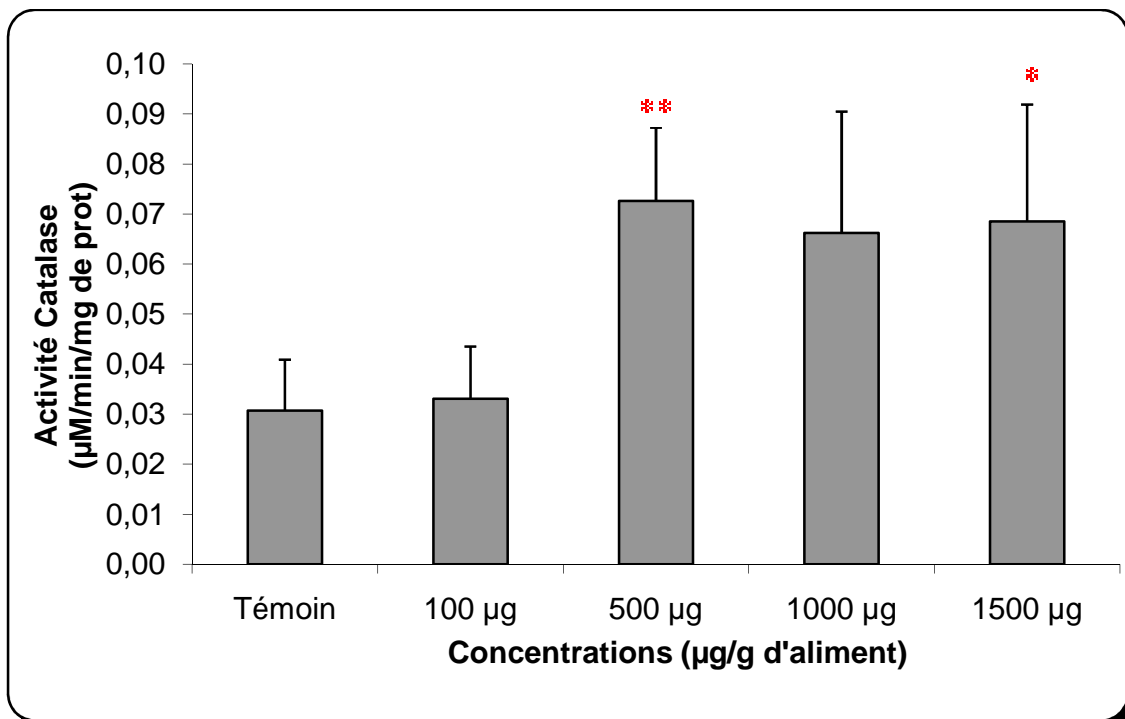


Figure 17 : Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution de l'activité catalases au niveau du rein d'*Helix aspersa*.

3. 3. Évolution du taux de glutathion (GSH) au niveau de l'hépatopancréas :

La figure (18) illustre l'évolution du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas chez *Helix aspersa* en réponse à un traitement avec des concentrations croissantes de particules métalliques. Nous constatons que chez les traités, le taux de GSH tend à diminuer d'une manière dose dépendante. En effet le taux de GSH chez les témoins est de 3,40 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines, alors que chez les traités à la plus forte concentration par exemple le taux de GSH est de l'ordre de 2,10 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines. L'étude statistique met en évidence différence significative entre les lots traités avec 500 $\mu\text{g}/\text{g}$ soit ($p=0,008$) par rapport aux témoins et une différence très hautement significative entre les traités par les concentrations 1000 et 1500 $\mu\text{g}/\text{g}$ et les témoins avec ($p=0,000$).

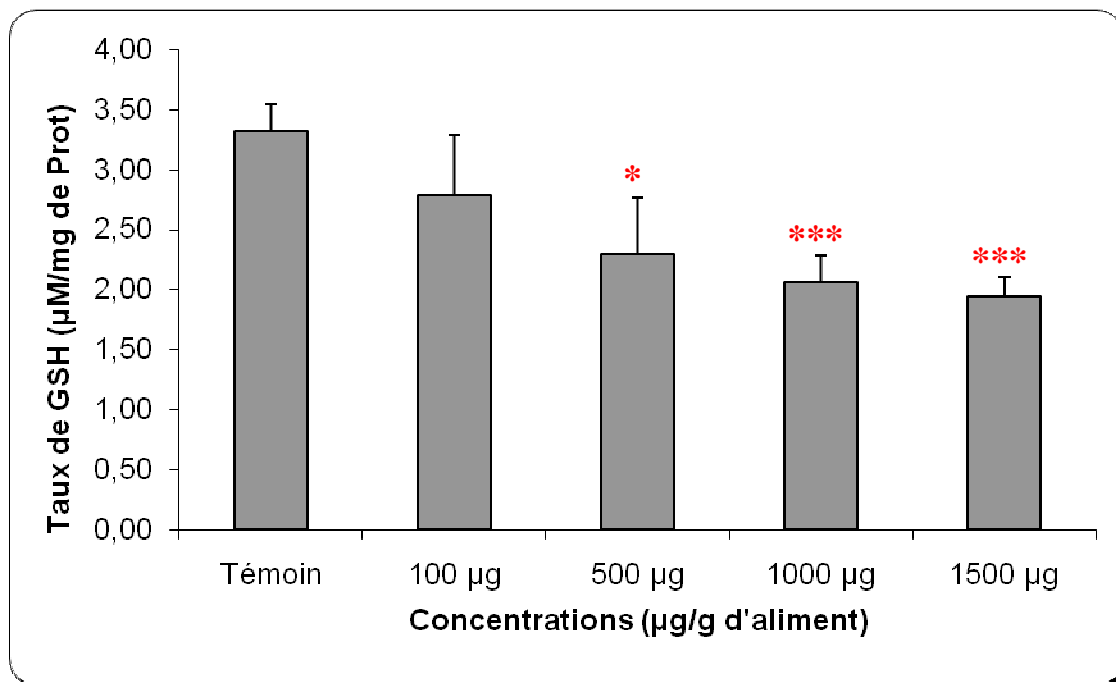


Figure 18: Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

3. 4. Évolution du taux de glutathion (GSH) au niveau du rein :

La figure (19) met en évidence l'évolution du taux de GSH au niveau du rein chez *Helix aspersa* traités avec des concentrations croissantes de particules métalliques. Nos résultats révèlent une légère déplétion du taux de GSH chez les escargots traités par rapport aux témoins. En effet pour les lots traités avec la plus forte concentration de particules métalliques 1500 µg/g le taux de GSH est d'environ 1,2 µM/mg de protéines, alors que pour les lots témoins ce taux est d'environ 1,5 µM/mg de protéines.

L'analyse statistique révèle une différence significative entre le taux de GSH chez les témoins par rapport aux escargots traités par la concentration 1000 µg /g avec ($p=0,049$).

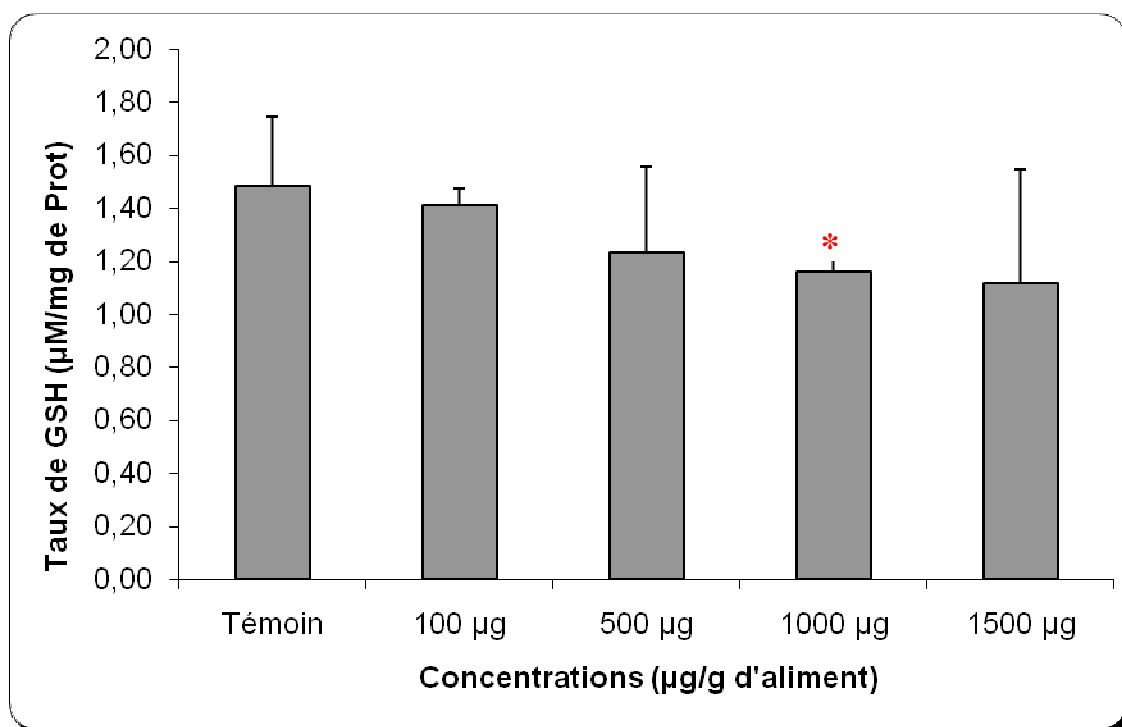


Figure 19 : Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de GSH au niveau du rein d'*Helix aspersa*.

3. 5. Évolution de l'activité Glutathion -S- Transférase (GST) au niveau d'hépatopancréas:

D'après la figure (20) nous constatons que le traitement des escargots par des concentrations croissantes de particules métalliques provoque une augmentation dose dépendante de l'activité GST par rapport aux lots témoins. Ainsi pour la plus concentration de particules métalliques l'activité GST est de l'ordre de 3,5 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, alors que pour la plus faible concentration de particules métalliques l'activité est de l'ordre de 1,2 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, comparativement aux témoins ou l'activité GST que ne dépasse pas 0,5 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. L'analyse statistique révèle une différence significative entre les témoins et les traités par les concentrations 100 $\mu\text{g}/\text{g}$, soit ($p=0,019$) et 500 $\mu\text{g}/\text{g}$, soit ($p=0,040$) et très hautement significative ($p=0,000$) pour les escargots traités par 1000 et 1500 $\mu\text{g}/\text{g}$ par rapport aux témoins.

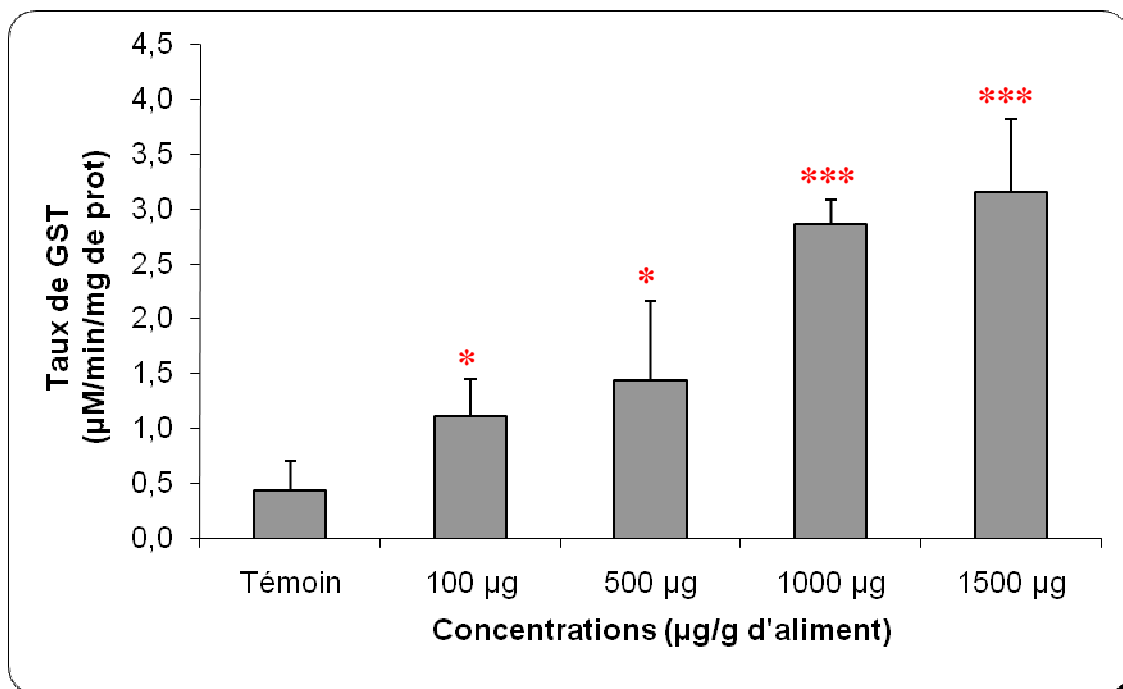


Figure 20 : Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution de l'activité GST au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

3. 6. Évolution de l'activité Glutathion -S- Transférase (GST) au niveau du rein:

La figure (21) illustre l'évolution l'activité GST au niveau du rein chez les escargots traités avec des concentrations croissantes de particules métalliques. Nos résultats mettent en évidence une augmentation progressive et dose dépendante de l'activité GST chez les lots traités par rapport aux témoins. Ainsi chez les lots traités avec la plus forte concentration de xénobiotiques, l'activité GST est de l'ordre de 0,12 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, alors que chez les témoins l'activité ne dépasse pas 0,08 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

L'analyse statistique met en évidence une différence significative à très hautement significative entre les témoins et les traités avec respectivement $p=0,011$, $p=0,012$, $p=0,014$ et $p=0,000$.

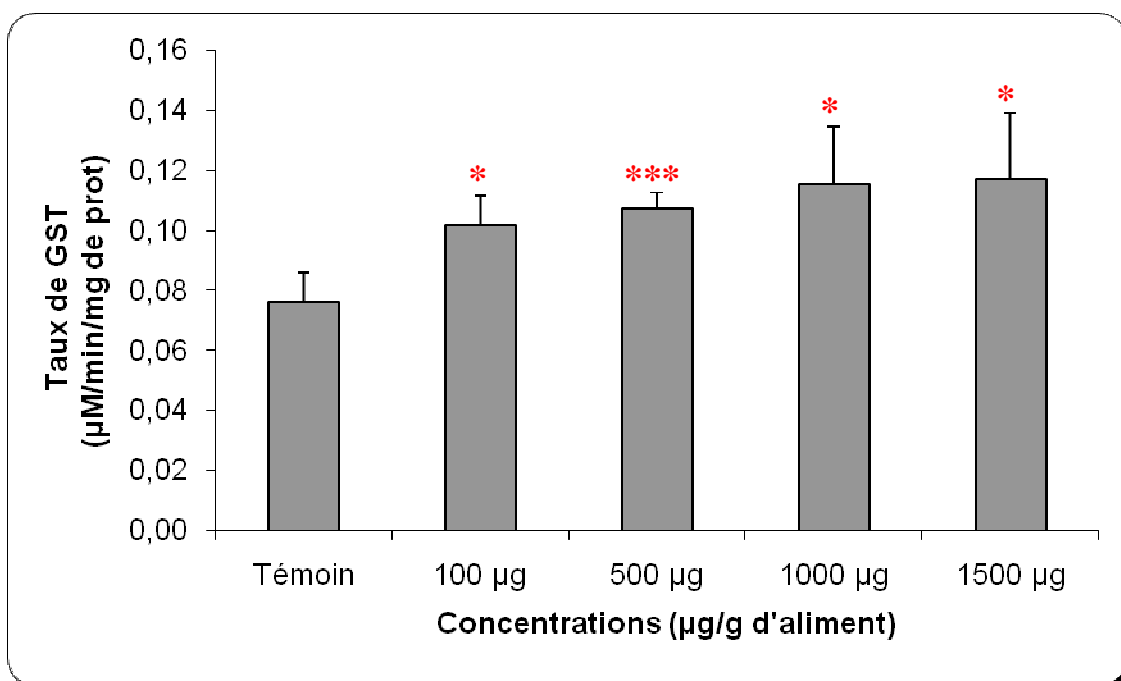


Figure 21 : Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution de l'activité GST au niveau du rein d'*Helix aspersa*.

3.7. Évolution du taux de malondialdéhyde (MDA) au niveau de l'hépatopancréas :

La figure (22) illustre l'évolution le taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas, ce taux tend à augmenter de façon dose- dépendante en réponse à la toxicité des particules métalliques et ce par rapport aux témoins. L'étude statistique met en évidence une différence significative à hautement significative entre les lots témoins et les lots traités avec $p=0,022$, $p=0,002$ et $p=0,003$.

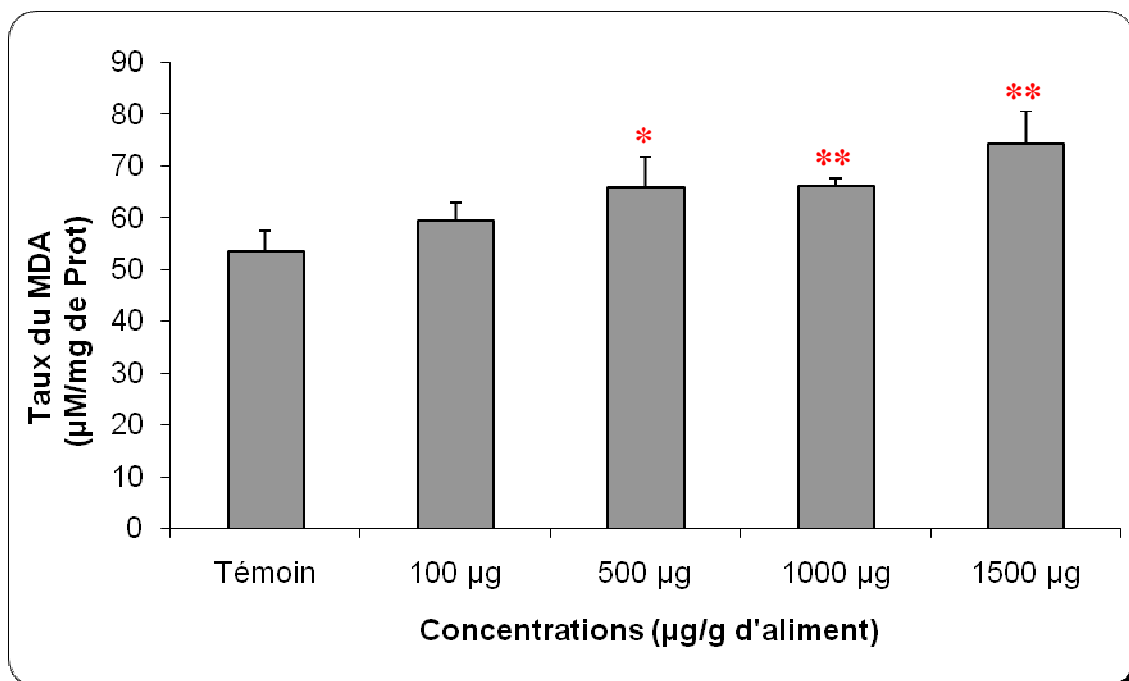


Figure 22 : Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa*.

3.8. Évolution du taux de malondialdéhyde MDA au niveau du rein :

La figure (23) illustre l'évolution le taux de MDA au niveau du rein chez *Helix aspersa* traités avec des concentrations croissantes de particules métalliques. Nous constatons une augmentation progressive et dose-dépendante du taux de MDA chez les escargots traités par rapport aux témoins. L'analyse statistique met en évidence une différence significative à hautement significative et évidemment très hautement significative par rapport aux témoins avec $p=0,015$, $p=0,025$, $p=0,004$ et $p=0,000$.

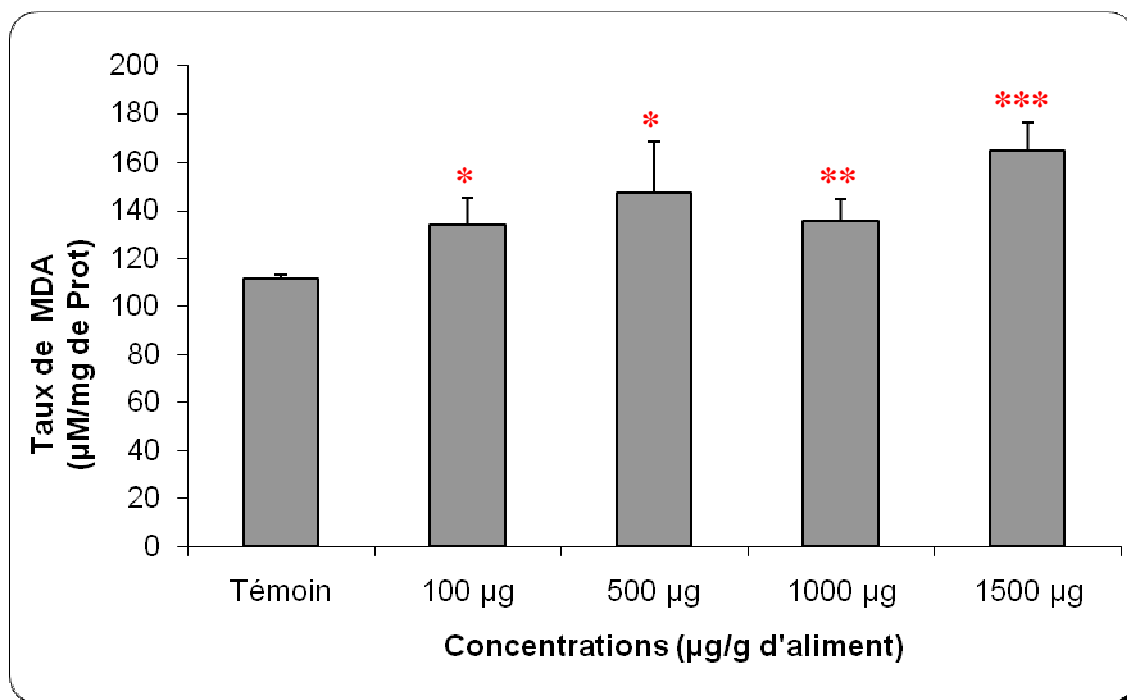


Figure 23 : Effet du traitement par des concentrations croissantes de particules métalliques sur l'évolution du taux de MDA au niveau du rein d'*Helix aspersa*.

4. Etude histologique :

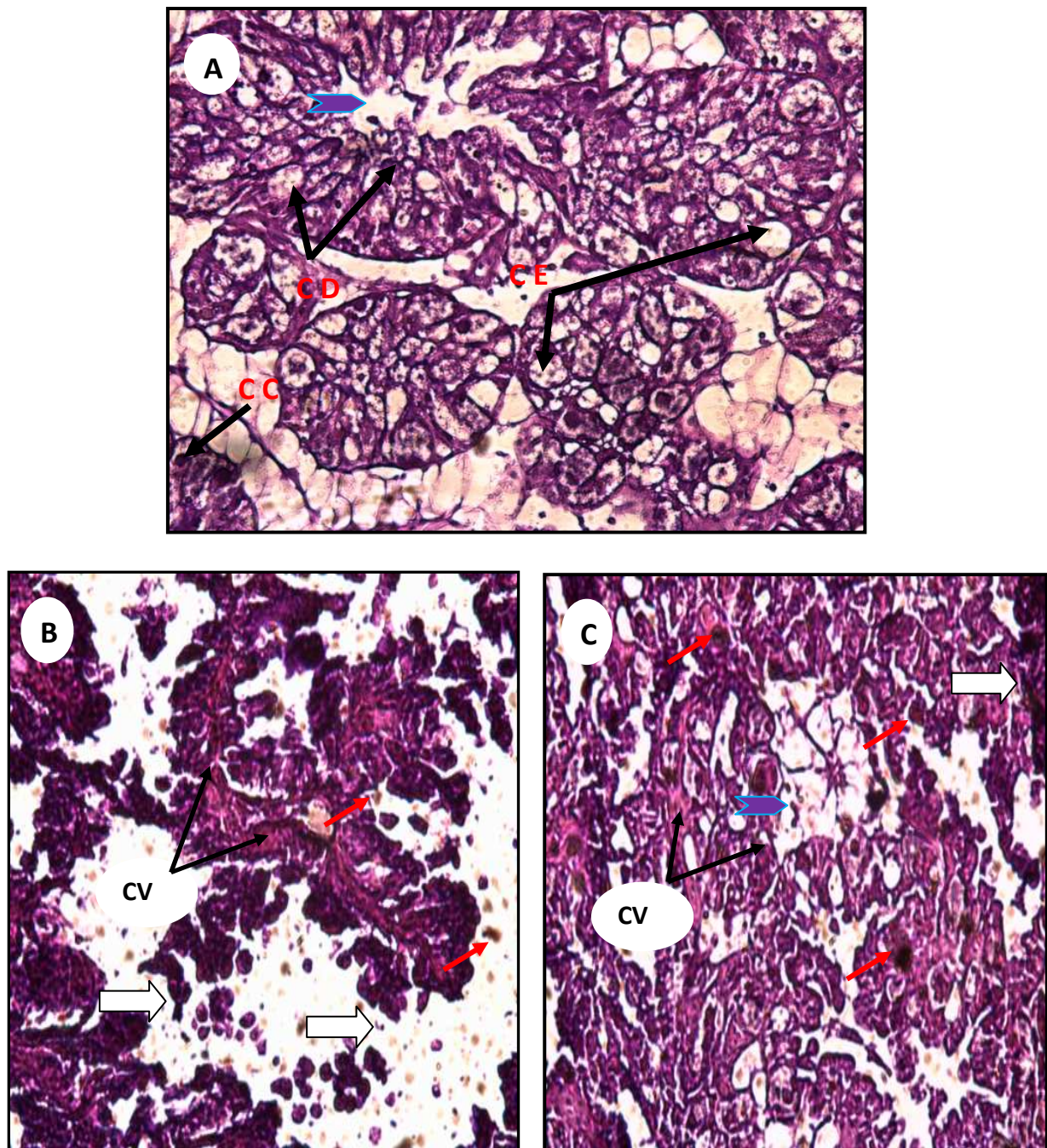


Figure 24 : coupes histologiques de l'hépatopancreas des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 1000 µg/g (B), et 1500 µg/g(C), (G × 40).

CD : Cellule digestive, CE : Cellule excrétrice, CC : Cellule à Calcium, L : Lumière de l'acini

➤ Débris cellulaire, ➡ Nécrose, (CV) congestion vasculaire.
➤ L : Lumière de l'acini ★ Hypertrophie cellulaire

4.1. Examen des coupes histologiques au niveau de l'hépatopancréas :

La figure (24), montre des coupes histologiques effectuées au niveau de l'hépatopancréas, témoin et traités.

L'hépatopancréas normal des escargots témoins (**Fig 24.A**) est constitué d'un épithélium digestif constitué des lobules formant un ensemble d'acini maintenus cohérents par un tissu conjonctif. L'épithélium renferme 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.

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 $\mu\text{g/g}$ (**Fig 24 .B**)

L'observation microscopique des tissus des traités avec la concentration 1500 $\mu\text{g/g}$ (**Fig 24.C**) illustre une destruction du parenchyme de l'acini, la lumière irrégulière avec des débris cellulaires, ainsi qu'une forte congestion (couleur rouge foncé), la disparition des cellules digestives et une diminution de l'épaisseur de l'épithélium confirme le phénomène de nécrose.

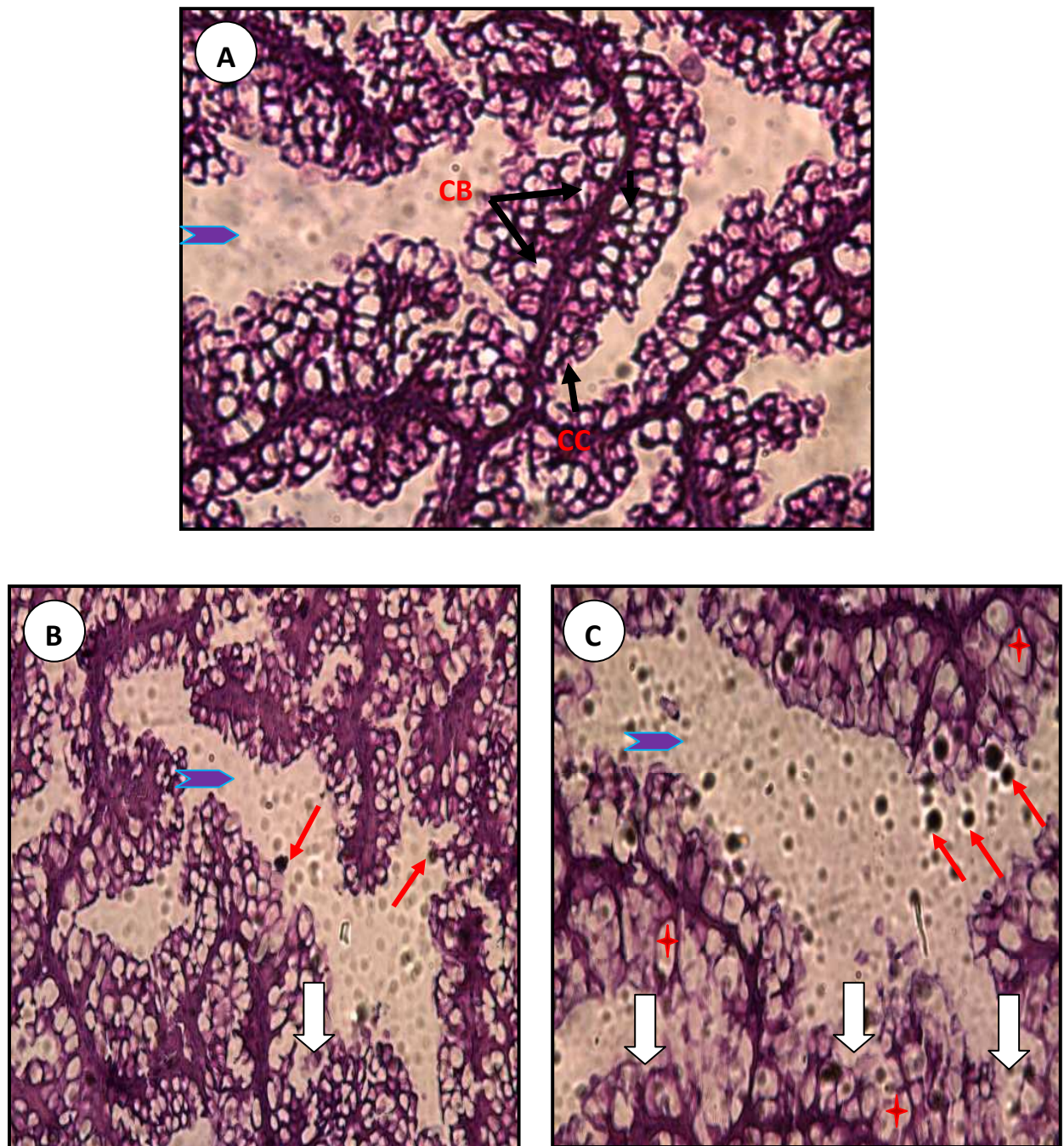


Figure 25: coupes histologiques au niveau du rein des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 1000 µg /g (B), et 1500 µg/g(C), (G × 40).

CB : cellules à bâtonnet, CC : cellules ciliées.

→ Débris cellulaire, → Nécrose
→ L : Lumière de l'acini ★ Hypertrophie cellulaire

4.2. Examen des coupes histologiques au niveau du rein :

La figure (25), montre des coupes histologiques effectuées au niveau des reins d'*Helix aspersa*, témoins et traités.

Le rein des escargots témoins (**Fig 25. A**) est constitué d'un épithélium excréteur tapissé de lamelles rénales, lamelles conjonctives creuses, de sinus sanguin et de fibres musculaires lisses, constituées en cellules prismatiques avec une bordure en brosse. 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.

Les manifestations histologiques induites par la présence des particules métalliques (**Fig 25.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 (**Fig 25.C**) illustre la disparition des membranes des cellules excrétrices suite à leur destruction et la prolifération du tissu conjonctif avec une hypertrophie.

Discussion Générale

Les bioindicateurs de pollution environnementale, ont fait l'objet des nombreux travaux chez les gastéropodes particulièrement. Ainsi ces espèces sont sensibles aux variations physicochimiques de leur milieu, notamment la température, (Bride et *al.*, 1993), les fréquences électromagnétiques (Regoli et *al.*, 2005) et à toute forme de pollution urbaine (Resal et *al.*, 2006), mais ils sont également sensibles vis-à-vis des xénobiotiques variés tels que les hydrocarbures (Ismart et *al.*, 2002) ou encore les éléments traces métalliques (Manzl et *al.*, 2004). Plusieurs études récentes 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 ; Rainbow, 2006).

Toutes les études sur les bioindicateurs, convergent vers l'idée que les espèces *Helix* sont d'excellents modèles biologiques pour toutes les études toxicologiques et pour la compréhension des mécanismes d'action des xénobiotiques *in situ*.

C'est dans ce contexte que se situe notre travail.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'effet des poussières métalliques (rejetées dans l'atmosphère par les aciéries 1 et 2 du complexe sidérurgique) sur l'évolution du poids des escargots. En effet La modification du comportement ainsi que la diminution des taux de survie, de croissance et de reproduction peuvent conduire à une modification de la dynamique d'une population, voire à la disparition de l'espèce dans l'habitat pollué (Caswell, 2001). Ainsi dans notre travail, l'exposition des escargots à des concentrations croissantes de poussières métalliques en fonction du temps a mis en évidence une diminution importante du poids relatif des escargots traités particulièrement à la plus forte concentration de poussières, selon Hames et hopkin, (1989) ceci pourrait être dû à la variation des sécrétions d'enzymes digestives. Par ailleurs Hopkin et *al* (1995) et Bibic et *al* (1997) stipulent que dans un environnement pollué, l'animal se met dans un état de jeûn prolongé pour éviter la nourriture souillée, hypothèse confirmée par Notton et *al*

(2006) ou encore Gimbert et *al* (2008) sur la croissance des juvéniles d'*Helix aspersa* et tout récemment Hispard (2008) et Atilia (2009) sur la même espèce.

L'équilibre entre absorption et élimination est étroitement associé aux effets toxiques des ETM difficilement ou lentement régulés (Peijnenburg et *al.*, 1997). Si cet équilibre est modifié par une augmentation du flux d'absorption (lié à une modification de l'exposition), l'excès d'ETM libres dans l'organisme est susceptible d'engendrer une perturbation des processus physiologiques (Rainbow, 2006). Aussi avons-nous jugé nécessaire de nous intéresser aux mécanismes de détoxications mis en jeu par *Helix aspersa* durant cette étude.

Deux principaux types de structures de détoxication et de stockage ont été identifiés chez les escargots : les métallothionéines (MTs) et les granules. Chabicovsky (2003) a démontré l'induction de Cd-MTs dans le cytoplasme des cellules à Calcium. Les MTs constituent une superfamille de métalloprotéines 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 d'ETM essentiels comme le Zn ou le Cu (Dallinger, 1993), d'un autre côté l'induction des gènes HSPs est également rapportée chez quelques invertébrés, y compris les mollusques, Il a été prouvé que divers facteurs, tels que le choc thermique ou l'exposition aux ETM, activaient les gènes Hsp70 chez *Mytilus galloprovincialis* (Franzellitti et Fabbri, 2005), (Kourtidis et *al.*, 2006), et récemment chez l'escargot *Achatina fulica* (Martynova et *al.*, 2007). Cette double compétence « MTs, HSPs » probablement présente chez *Helix aspersa*, pourrait expliquer en partie l'induction et l'augmentation du taux protéines totales au niveau de l'hépatopancréas et du rein en présence de particules métalliques. Ainsi nos résultats abondent dans le même sens que les travaux précédemment cités et confirment donc une augmentation du taux de protéines totales chez les escargots traités aux poussières métalliques puisque les MTs font partis de ce pool de protéines.

Concernent l'effet des particules métalliques sur la variation du taux de lipides totaux et de MDA, ainsi, selon Arousseau (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 *Bellamyia dissimilis* exposé aux pesticides. Le taux de lipides peut être également affecté par le mode de nutrition de l'escargot qui est semis herbivore dans les écosystèmes terrestre (Beeby, 1985). Parallèlement à cette perturbation lipidique, les radicaux libres produits entraînent également des désordres structuraux et fonctionnels dans la cellule. L'attaque radicalaire des membranes provoque des perturbations de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (Lawton et Donaldson, 1991), tous les composants peuvent être touchés : lipides, protéines et donc la membrane dans son ensemble (Radi et al., 1991 ; Halliwell et Chirico, 1993), touchant aussi l'ADN et provoquant des pathologies (Curtin et al., 2002; Gutteridge, 1992). Witt (1992), Huang et Fwu (1993) et Schelling et al (1995) 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 (Halliwell et Chirico, 1993). Le taux du MDA est considéré comme un biomarqueur spécifique (Del Rio et al., 2005; Box et al., 2007; Nesto et al., 2007). Nos résultats sont en accord avec ceux cités précédemment avec en l'occurrence une diminution du taux de lipides accompagnée par une augmentation du taux de MDA. Nos résultats mettent en évidence une diminution significative du taux de lipide d'une manière dose-dépendante au niveau des deux organes testés (hépatopancréas et rein), parallèlement nous avons noté une augmentation du taux de MDA, indiquant ainsi un processus de peroxydation lipidique enclenché en présence de particules métalliques.

Notre hypothèse est basée sur la production et l'augmentation hautement significative du taux MDA dans l'hépatopancréas et le rein d'*Helix aspersa*, pouvant être liée à la peroxydation lipidique des membranes en présence de particules métalliques, cette hypothèse est en accord avec les travaux de Ercal et al (2001) et de Tweeddale et al (2007). Les métaux comme le cuivre et le fer ont été largement utilisés comme des agents initiateurs de l'oxydation des lipides par l'intermédiaire de la réaction de Fenton. En effet, Klobucar et al (1997) ont mis en évidence la production de MDA chez le gastéropode pulmoné *Planorbarius corneus* exposé au PCP. Un taux en MDA élevé a été observé chez des poissons ou des moules après exposition au paraquat, au Cu ou au Hg (Bano et Hasan, 1989) et à des sédiments contaminés par diverses substances dont des hydrocarbures

(Di Giulio et al., 1993 ; Livingstone et al., 1993), selon Chandran et al (2005) les taux du MDA sont supérieurs dans l'hépatopancréas et le rein d'*Achatina fulica* lorsqu' il est exposé à des concentrations élevées de Cadmium et de Zinc. D'ailleurs, la peroxydation des lipides peut être stimulée non seulement par de divers cations inorganiques (Viarengo et al., 1990 ; Geret et al., 2002) mais également par les produits chimiques organiques (Livingstone et al., 2000 ; Shaw et al., 2004).

En revanche, Salama et al (2005) ont montré que les pesticides n'affectaient pas le taux du MDA chez l'escargot *Helix aspersa*. 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 inférieure à celui des témoins (Labrot et al., 1996). 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).

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) serait dû à l'utilisation directe du glycogène pour la régénération d'énergie, ou suite à une l'hypoxie induite par les pesticides. Les glucides sont les sources d'énergie primaires et immédiates, en état d'effort des réserves glucidiques sont épuisées pour satisfaire des demandes énergétiques accrues. 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, selon Canesi et al (1998), les ETM sont susceptibles d'inhiber l'hexokinase de la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis*. Dans notre travail nous avons noté que le taux des glucides diminue d'une manière dose-dépendante en présence de poussière métalliques au niveau des deux organes choisis (hépatopancréas et rein), ces résultats sont en accord avec ceux cités ci-dessus et témoignent d'une perturbation du métabolisme glucidique sous l'effet d'un stress métallique comme l'indiquent les travaux de Nzengue (2008), le dosage

du taux d'aldéhyde ou de peroxyde d'Hydrogène en cours de réalisation pourrait confirmer cette hypothèse.

Dans la seconde partie de notre travail nous nous sommes intéressés à la réponse enzymatique de l'organisme chez *Helix aspersa* face au stress métallique auquel nous l'avons soumis. Nous avons ciblé un certain nombre d'activités enzymatiques pouvant être modifiées et /ou perturbées lors d'une toxicité.

Ainsi, les enzymes antioxydantes permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal. La catalase et la GPx appartiennent au mécanisme de défense primaire contre les espèces réactives de l'oxygène « ERO » en catalysant la conversion du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en H₂O (Chance et al., 1979 ; Franco et al., 1999), de plus, selon Manzl et al (2004) les cellules de l'hépatopancréas d'*Helix pomatia* sont capables d'augmenter la formation des espèces réactives de l'oxygène quand elles sont exposées à des concentrations élevées de Cu (100 µM).

Dans notre travail, l'activité catalase au niveau de l'hépatopancréas et le rein tend à augmenter de façon dose-dépendante chez tous les lots traités, ce résultat est en accord avec ceux de Stohs et Bagchi (1995) et Cossu et al (1997) qui montrent que la production de peroxyde d'hydrogène est induite par la présence de composés exogènes à l'organisme comme les métaux .

L'activité CAT chez les invertébrés varie selon le mode d'exposition, les espèces et au sein même de l'organisme. Toujours, selon Regoli et al (2006) les polluants dégagés par les véhicules induisent une augmentation de l'activité CAT au niveau de la glande digestive d'*Helix aspersa* , chez la même espèce elle ne change pas lorsqu'elles sont exposées aux champs électromagnétiques (Regoli et al., 2005), alors que les variations saisonnières peuvent affecter la catalase (Ramos-Vasconcelos et al., 2005). En revanche Chandran et al (2005) montrent que l'activité catalase est inhibée en présence de Cadmium et de Zinc chez l'escargot *Achatina fulica* et ce au niveau des deux organes cibles « hépatopancréas et rein ». Ainsi au niveau de l'hépatopancréas d'*Helix aspersa* l'inhibition de l'activité catalase est de l'ordre de 76 % en présence d'ions métalliques(Ramos-Vasconcelos et al.,2006).

Le GSH, est le thiol cellulaire le plus abondant, il est impliqué dans des processus métaboliques et de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques d'une série de composés endogènes et exogènes, y compris des espèces réactives de l'oxygène et les ETM (Meister et Anderson, 1983 ; Sies et Ketterer, 1988 ; Taniguchi et *al.*, 1989). Les fonctions du GSH sont principalement dues à son caractère nucléophile. En effet, sa conjugaison aux composés électrophiles rend ceux-ci plus hydrosolubles et donc plus facilement transportables donc excrétables de la cellule. De cette façon, il est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques, et joue notamment un rôle central dans la défense cellulaire contre le stress oxydant et les xénobiotiques (Choi et *al.*, 1997).

Les GSTs sont une grande famille d'isoenzymes, faisant partie de la classe II des enzymes de détoxification (Lukkari et *al.*, 2004 ; Kim et *al.*, 2009). En effet, elles catalysent la conjugaison du GSH aux composés électrophiles cytotoxiques. Les composés ainsi conjugués au GSH sont souvent moins toxiques, plus hydrosolubles et peuvent ensuite être expulsés plus facilement de la cellule (Salinas et Wong, 1999).

Dans notre travail nous avons montré que l'effet des particules métalliques sur l'escargot *Helix aspersa* provoquent une diminution du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas, et le rein, de manière dose-dépendante. Cette déplétion peut être expliquée par la liaison directe du glutathion au métal, comme le stipule Barillet (2007) les ETM sont caractérisés par leur forte affinité vis-à-vis des groupements thiols et forment des complexes avec ces entités chimiques (Viarengo et Nott, 1993 ; Viarengo, 1994), la synthèse de GSH en présence de Cadmium serait 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 disulfide (GSSG), qui est réduit rapidement à son tour en GSH par l'action de la glutathion réductase en présence de NADPH (Filomeni et *al.*, 2002) maintenant ainsi la proportion GSH /GSSG à 99 %.

La mise en place des mécanismes de détoxification des ETM suggère la mobilisation de GSH par la GST ce qui représente probablement la voie principale de la diminution du taux de glutathion dans les tissus de moules exposées au Cu (Canesi et *al.*, 1999). Plusieurs études

ont mis en évidence une diminution du GSH en réponse à la toxicité des Cadmium et Zinc chez l'escargot *Achatina fulica* (Chandran et al., 2005), ou encore en réponse à l'effet électromagnétique sur *Helix aspersa* (Regoli et al., 2005). Conjointement à la diminution de GSH dans l'hépatopancréas et le rein d'*Helix aspersa* nos résultats révèlent une augmentation progressive de l'activité GST chez tous les escargots traités par les poussières métalliques. Les travaux de Hamed et al (2006) mettent en évidence une augmentation l'activité GST chez *Biomphalaria alexandrina* suite à un traitement par le principe actif de la plante toxique l'*Agave attenuata*. L'activité de GST est multipliée (3.4 et 4.2) au niveau des tissus de la glande digestive de la moule *Laternula elliptica* respectivement (Park et al., 2008).

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), cette enzyme peut être affectée par des facteurs biotiques et abiotiques, elle est définie comme un biomarqueur de contamination par les ETM (Cantu-Medelli et al., 2009), et les hydrocarbures aromatiques (Pennec et Pennec, 2003). La mise en place de mécanismes de détoxification nécessite la présence de la GST pour neutraliser les effets toxiques des ETM, nos observations viennent appuyer nos résultats.

Afin de mieux étayer les mécanismes biochimiques mis en jeu lors d'un stress aux métaux chez *Helix aspersa*, nous avons jugé utile d'effectuer une recherche des perturbations tissulaires au niveau des deux organes cibles (hépatopancréas et rein).

Les travaux de Marigomez et al (1996) et (1998) et Zaldibar et al (2007a), ont mis en évidence chez les lingots terrestres soumis à un stress chimique (métallique ou autre) un nombre relatif élevé des cellules à calcium et une hypertrophie des espaces intercellulaires au niveau de la glande digestive. Notre étude histologique permet de situer les atteintes tissulaires de l'hépatopancréas et du rein d'*Helix aspersa* en réponse à la toxicité des particules métalliques qui pourraient se traduire par des changements structurels visibles chez lots traités par les fortes concentrations. De plus l'examen histologique, a mis en évidence une dilatation des espaces hemolympatiques entre les tubules, une

dégénérescence cellulaire, avec une lumière plus élargies, la nécrose cellulaire, avec une atrophie du tissu conjonctif de la glande digestive, et une desquamation des cellules épithéliales, accompagnée d'une hypertrophie des cellules à calcium, Ces résultats vont dans le même sens que ceux cités précédemment.

Par ailleurs les ETM détériorent la dynamique de cellules et endommagent leurs membranes. De se fait, l'échange intercellulaire et la fluidité sont perturbées. En conséquence, la diffusion des ETM augmente dans les cellules causant ainsi une nécrose cellulaire (Yager et Harry, 1963).

D'autre part, les coupes au niveau du rein d'*Helix aspersa* traités avec des concentrations croissantes de particules métalliques, mettent en évidence une hyperplasie de l'épithélium dès les plus faibles concentrations, des cellules nécrosées et une prolifération étendue des cellules excrétoires, ces résultats sont en accord avec ceux de Russell et *al* (1981) observés chez *Helix aspersa* traité au Cd.

Conclusion

Au terme de ce travail, nous avons pu confirmer la qualité exceptionnelle d'*Helix aspersa* en tant qu'organisme bioaccumulateur/ bioindicateur et ce à travers, toutes les modifications physiologiques, le poids notamment et le comportement alimentaire (résultat non montré), semble d'adapter aux conditions défavorables du milieu ainsi que les perturbations métaboliques mis en évidence par le biais des activités de certains enzymes de la phase I (Catalase) et de la phase II GST/ GSH qui confirment l'aptitude du gastéropode à déclencher les mécanismes de détoxications en présence de fortes concentrations des particules métalliques .

Néanmoins, et toujours aux plus fortes concentrations de ces métaux, la déplétion en enzymes de détoxication semble à l'origine d'une augmentation des radicaux libres oxygénés, avec pour conséquence une fixation sur les macromolécules cellulaires notamment les lipides d'où cette augmentation du taux de malondialdéhyde (MDA) observée dans notre travail.

L'observation microscopique des coupes histologiques ne fait que confirme les altérations tissulaires suite à cette toxicité.

En fin, la présente étude toxicologique a permis de mettre en évidence d'une part des perturbations physiologiques, biochimiques et des atteintes tissulaires et d'autre part une activation des biomarqueurs protégeant ainsi ces cellules par le déclenchement du système de détoxification. Enfin, un phénomène d'adaptation d'Hélix au xénobiotique utilisé est mis en évidence protégeant ainsi l'animal en assurant sa survie à travers la bioaccumulation des ETM.

En perspective, il serait judicieux d'étudier les phénomènes de compétition entre les ions Ca et certains métaux notamment le Cd, de rechercher l'impact des ETM sur la capacité de reproduction de l'animal, et d'assurer le suivi des juvéniles après l'élevage d'individus préalablement traités par les ETM.

Références Bibliographiques

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 pages.

Aurousseau, 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.

Aust, S.D. et Thomas, R.L. 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. *Free. Rad. Biol. Med.*, **1**, 3-25.

Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA, Paris, 408 pages.

Bano, Y., et 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.

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 pages.

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

Beeby, A., 1985. The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfer of lead through a polluted ecosystem. *Journal of Applied Ecology* **22**, 267-275.

Beeby, A. et Richmond, L., 1989. The shell as a site of lead deposition in *Helix aspersa*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **18**, 623-628.

Beeby, A., Richmond, L., 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators* **1**, 261-270.

Beeby, A., Richmond, L., Herpé, F., 2002. Lead reduces shell mass in juvenile garden snails (*Helix aspersa*). *Environmental Pollution* **120**, 283-288.

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.

Beyer, W. N., Pattee, O. H., Sileo, L., Hoffman, D. J., et Mulhern, B. M., 1985. Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. *Environ. Pollut.* **38**, 63-86.

Bibic, A., Drobne, D., Strus, J. and Byrne, A.R., 1997. 'Assimilation of zinc by *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) exposed to Zinc', *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58**, 814–821.

Bonnet, C., 2000. Développement de bioessais sur sédiments et applications à l'étude, en laboratoire, de la toxicité de sédiments dulçaquicoles contaminés. Thèse, Université de Metz, Metz, France, 309 pages.

Boutonnet, F., 2000. Rapport de réseau de surveillance de la qualité de l'air. Université d'Orléans. 5 pages.

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.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**:278-254.

Brooks, A.W., White, K.N., Bailey, S.E.R., 1992. Accumulation and excretion of aluminium and iron by the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **103 C**, 577-583.

Cairns, J. et Mount, D.I. 1990. Aquatic toxicology. *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 154-161.

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* Lam) through tyrosine kinase mediated signal transduction. *Gen.Comp. Endocrinol.* **116**, 241–248.

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. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.* **120**, 261–268.

Cantu-Medellin, N., Olguin-Monroy, N.O., Mendez-Rodriguez, L.C., Zenteno-Savin, T., 2009. Antioxidant Enzymes and Heavy Metal Levels in Tissues of the Black Chocolate Clam *Megapitaria squalida* in Bahia de La Paz, Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol* **56**:60–66.

Carefoot, T.H., Qian, P.Y., Taylor, B.E., West, T. and Osborne, J., 1993. The effects of starvation on energy reserves and metabolism in the northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*. *Aquaculture* **118**, 315–325.

Caswell H. 2001. Matrix Population Models: construction, analysis, and interpretation, second edition, Sinauer Associates (Eds.), Sunderland, Massachusetts, USA, 722 pages.

Chabicovsky, M., Klepal, W., Dallinger, R., 2004. Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates: programmed cell death and metallothionein overload. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**, 648-655.

Chabicovsky, M., Niederstätter, 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*. *Toxicology and Applied Pharmacology* **190**, 25-36.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527–605.

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.

Chevalier, L., Desbuquois, C., Le Lannic, J., et Charrier, M., 2001. Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata). *C.R. Acad. Sc. Paris* **324**, 979-887.

Chevallier, H. 1982. Facteurs de croissance chez des gastéropodes pulmonés terrestres paléarctiques en élevage. *Haliotis* **12**, 29-46.

Chevallier, H., 1992. L'élevage des escargots. Production et préparation du petit-gris. Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort.

Choi, J., Liu, R.M., and Forman, H.J., 1997. Adaptation to oxidative stress: quinone-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells. *Biochem Pharmacol*, **53 (7)**, 987-993.

Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M., 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 1951-1957.

Coeurdassier, M., 2001. Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnaea stagnalis* et *Lymnaea palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques organiques. Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté, Besançon, France, 297 pages.

Coeurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A., Lovy, C., Badot, P.M., 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **53**, 425-431.

Coeurdassier, M., Gomot-deVaufleury, A., et Badot, P.-M. 2000. Dose-dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa aspersa*. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2571-2578.

Cooke, M., Jackson, A., Nickless, G., Roberts, D.J., 1979. Distribution and speciation of cadmium in the terrestrial snail *Helix aspersa*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **23**, 445-451.

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.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C. et Vasseur, P., 1997. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. In Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects Fondamentaux (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard et F. Ramade), 149-163. Masson, Paris.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipid peroxidation in fresh water bivalves *Unio tumidus* as biomarker of aquatic contamination in field studies. Ecotoxicol Environ Saf, **38**: 122– 131.

Coughtrey, P.J. et Martin, M.H., 1976. The distribution of Pb, Zn, Cd, and Cu within the pulmonate mollusc *Helix aspersa* Müller. Oecologia, **23**, 315-322.

Curtin, J. F., Donovan, M., and Cotter, T. G., 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. Journal of immunological methods, **265**, 49-72.

Dagnelie, P., 1999. Statistiques théoriques et appliquées. Tome 2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Univ De BOECK et LARCIER, 659 pages.

Daguzan, J., 1983. Principales caractéristiques biologiques et écophysologiques de l'escargot. In: Daguzan, J. (Ed.). L'escargot et l'Héliciculture. Informations techniques des services vétérinaires, Paris, 207 pages.

Dallinger, R. et Wieser, W., 1984 a. 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.

Dallinger, R., 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In Ecotoxicology of metals in invertebrates (Eds R. Dallinger, et R. Rainbow), 245-289. Lewis, Boca Raton.

Dallinger, R., Berger, B., Triebkorn, R., Köhler, H., 2001. Soil biology and ecotoxicology. In: Barker, G.M. (Ed.). The biology of terrestrial molluscs. CAB International, Oxon, Wallingford, UK, 489-525.

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.

De Kerney, M. P., Cameron, R. A. D., et Bertrand, A., 1999. Guide des Escargots et Limaces d'Europe. Delachaux & Niestlé, Paris.

De Souza Dahm, K.C., Rückert, C., Tonial, E.M., Bonan, C.D., 2006. *In vitro* exposure of heavy metals on nucleotidase and cholinesterase activities from the digestive gland of *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **143 C**, 316-320.

Del Rio,D., Stewart,A.J., Pellegrini,N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **15**, 28–316.

Denison, R.A. et Silbergeld, E.K., 1988. Risks of municipal solid waste incineration: an environmental perspective. *Risk analysis* **8**, 343-355.

Depledge, M.H., Amaral-Mendes J.J., Daniel B., 1993. The conceptual basis of the biomarker approach, in D. B. Peakall, and L. R. Shugart, eds., *Biomarkers. Research and application in the assessment of environmental health: NATO Advanced Science Institutes Series*, v. H **68**: Berlin, Springer Verlag, 15-29.

Di Giulio, R.T., Habig, C., et Gallagher, E.P., 1993. Effects of black rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.* **26**, 1-22.

Draper, H. H. and Hadley,M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* **186**, 421–431.

Duchateau, G., and Florkin ., 1959. For trehalose in insects and its significance. *Arch. Insect. Physiol. Biochem* **67**: 306-314.

EL –wakil , H.B .,Radwan ,M.A., 1991. Biochemical studies on the terrestrial snail, *Eobania vermicula* (Muller) treated with some pesticides , *J.Environ .sci .Health* ,**B 26**, 479-489 .

Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**, 529–539.

Escher B.I. & Hermens J.L.M., 2002. Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects, *Environmental Science and Technology*, **36**, 4201-4217.

- Ferreira, M.V.R., Alencastro, A.C.R., Hermes-Lima, M., 2003.** Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in freshwater snails *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Can. J. Zool.* **81**, 1239–1248.
- Filomeni, G., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R., 2002.** Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol*, **64** (5-6), 1057-1064.
- Förstner, U, Wittmann GTW., 1979.** Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag. New-York. 475 pages.
- Franco A. A., Odom R.S., and 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.
- 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.
- Garret, R.R., 2000.** Natural sources of metals to the environment. *Human and Ecological Risk Assessment* **6**, 945-963.
- 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.
- Gimbert.F., Annette de Vaufleury., Douay.F., Coeurdassier.M., Scheifler.R., Badot.P.M., 2008 .** Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70** 138–146.
- Goldsworthy, G.J., Mordue, W., and Guthkelch, J., 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol* **18** (3): 545.
- Gomot, A. et Pihan, F., 1997.** Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**, 85-94.
- Gomot, A., 1997.** Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**, 209–216.
- 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 route for the stimulating factors. *Journal of Molluscan Studies* **55**, 1-7.
- Gomot, L. et 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.

Gomot-de Vaufleury, A. et Bispo, A., 2000. Method for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. 1. Sublethal effects on growth. *Environmental Sciences and Technology* **34**, 1865-1870.

Gomot-de Vaufleury, A. et Kerhoas, I., 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **64**, 434-442.

Gomot-de Vaufleury, A. et Pihan, F., 2002. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: metal bioavailability and bioaccumulation. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 820-827.

Goth, L., 1991 a. Serum catalase: Reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clin Chem*, **37(12)**: 2043-2047.

Goth, L., 1991 b. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* **196**: 143–152.

Gutteridge, J., 1992. Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm*, **19**, 598-620.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 7130-7139.

Halliwell, B., and Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition* **57**, 715S-724S; discussion 724 S-725 S.

Hamed, R.R., Maharem, T.M., Farid, N.M., Ramadan, Kh., Abdel Aziz, M.H., 2006. Effect of *Agave attenuata* extracts on detoxification enzymes of *Biomphalaria alexandrina*. *Environmentalist* **26**:157–164.

Hames,C.A.C. and Hopkin, S.P., 1989. ‘The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods’, *J. Zool. (Lond.)* **217**, 599–627.

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 spin-trapping technique. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **295**, 205-13.

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 Radic. Biol. Med.* **19**, 805–812.

Hispard ,F., de Vaufleury, A., Cosson R.P., S. Devaux ., Scheifler , R., Cœurdassier, M., Gimbert,F., Martin,H., Richert, L., Berthelot, A., Badot, P.M., 2008. Comparison of transfer

and effects of Cd on rats exposed in a shortexperimental snail–rat food chain or to CdCl₂ dosed food. *Environment International*, **34**, 381–389.

Hopkin, S. P., 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates.* Elsevier Applied Science, NY, USA, 366 pages.

Hopkin, S. P., Martin, M. H., et Moss, S. J., 1985. Heavy metals in isopods from the supra-littoral zone on the southern shore of the Severn estuary UK. *Environ. Pollut.* **9**, 239-254.

Hopkin, S.P., 1995. Deficiency and excess of essential and non-essential metals in terrestrial insects, In: Harrington, R., Stork,N.E., (Eds.), *Insects in a Changing Environment*, AcademicPress, London 251-270.

Hunter, B. A., Johnson, M. S., et Thompson, D. J. 1987 b. Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem.II. Invertebrates. *J. Applied Ecol.* **24**, 587-589.

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.

Jordaens, K., de Wolf, H., Vandecasteele, B., Blust, R., Backeljau, T., 2006. Associations between shell strength, shell morphology and heavy metals in the land snail *Cepaea nemoralis* (Gastropoda, Helicidae). *Science of the Total Environment* **363**, 285-293.

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.

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'ingéniorat. Université d'Annaba.*

Klobucar, G.I.V., Lajtner, J. et 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.

Knutti, R., Bucher, P., Stengl, M., Stolz, M., Tremp, J., Ulrich, M., et Schlatter, C.,1988. Cadmium in the invertebrate Fauna of unpolluted forest in Switzerland. *Environ. Tox. Ser.* **2**, 171-191.

Koeman, J.H., 1991. From comparative physiology to toxicological risk assessment, *Comparative Biochemistry and physiology*, **100**, 7-10.

Konings, A.W., Penninga, P., 1985. On the importance of the level of glutathione and the activity of the pentose phosphate pathway in heat sensitivity and thermotolerance. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **48**, 409–422.

Kourtidis A, Drosopoulou E, Nikolaidis N, Hatzi VI, Chintiroglou CC, Scouras ZG., 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.

Labrot, F., Ribera, D., Saint-Denis, M., et 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.

Lagadic, L., Caquet T. et Amiard J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions, in Masson, ed., *Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux*: Paris, 1-10.

Lagadic, L., Caquet T. et Ramade F., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment. (5) Invertebrate populations and communities, *Ecotoxicology*, **3 (3)**: 193-208

Laskowski, R. et Hopkin, S. P., 1996 a. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **34**, 59-69.

Laskowski, R. et Hopkin, S.P., 1996b. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail *Helix aspersa*: implications for predators. *Environmental Pollution* **91**, 289-297.

Laskowski, R., et Maryanski, M., 1993. Heavy metal in epigeic fauna: Trophic-level and physiological hypotheses. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **50**, 232-240.

Laurent, J., Deray, A., et Grimard, A. M., 1984. Influence de la photopériode, du degré d'hétérogénéité de la population sur la dynamique de croissance et la maturité sexuelle de l'escargot *Helix aspersa*. *C. R. Soc. Biol.* **178**, 421-441.

Lawton, L.J., Donaldson, W.E., 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research*, **28**, 83–97.

Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L., Bucke, D. et Law, R.J., 1993. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar. Poll. Bull.* **26**, 602-606.

Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **57 (3)** : 195-211.

Livingstone, D.R., Mitchelmore, C.L., O'Hara, S.C., Lemaire, P., Sturve, J., Förlin, L., 2000. Increased potential for NAD(P)H-dependent reactive oxygen species production of hepatic subcellular fractions of fish species with *in vivo* exposure to contaminants. *Mar. Environ. Res.* **50**, 57–60.

Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M., Oikari, A., Haimi, J., 2004. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure, differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environ. Pollut.* **129**,377–386.

Mackay, W. P., Mena, R., Gardea, J., et Pingatore, N., 1998. Lack of bioaccumulation of heavy metals in an arthropod community in the northern Chihuahuan desert. *J. Kansas Entomol. Soc.* **70**, 329-334.

Madec, L., 1983. Importance des conditions climatiques et de l'origine des individus pour la reproduction de l'escargot petit-gris en élevage sous bâtiment contrôlé. Session ITAVI, Rennes, France.

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.

Marigomez, I., Kortabitarte, M., Dussart, G.B.J., 1998. Tissue-level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **34**, 167–176.

Marigomez, I., Orbea, A., Olabarrieta, I., Etxeberria, M., Cajaraville M.P., 1996. Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in mussel-watch programmes. *Comp Biochem Physiol.* **113 C**: 291-297.

Martoja, R., Martoja, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. *Masson et Cie*, 347pages.

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.

Mason, A.Z. and K.D. Jenkins. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms, p. 479-582. In : A.Tessier and D.R. Turner (eds.) *Metal Speciation and bioavailability in Aquatic Systems.* Wiley and Sons, Chichester.

Maystre, L.Y., Martin, J.M. 1988. Santé et pollution de l'air, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.

Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Ann. Rev.Biochem.* **52**, 711–760.

Menta, C. et Parisi, V., 2001. Metal concentrations in *Helix pomatia*, *Helix aspersa* and *Arion rufus*: a comparative study. *Environmental Pollution* **115**, 205-208.

Moore, P.A. Jr, Joern, B.C., Edwards, D.R., Wood, C.W., Daniel, T.C., 2006. Effects of manure amendments on environmental and production problems. In: Rice, J.M., Caldwell.

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.

Morgan, A. J., Morris, B., James, N., Morgan, J. E., et Leyshon, K., 1986. Heavy metals in terrestrial macroinvertebrates: species differences within and between trophic levels. *Chem. Ecol.* **2**, 319-334.

Morgan, R.K., Taylor, E., 2004. Copper Accumulation in Vineyard Soils in New Zealand. *Environmental Sciences* **1**, 139-167.

Moriarty F., 1990. Ecotoxicology. The study of pollutants in Ecosystems. Academic Press, London, 289 pages.

Narbonne, J.F. 1994. Toxicité de l'oxygène et bioindicateurs. *Anal. Mag.*, **22**, 16-17.

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. *Mar. Pollut. Bull.* **55**, 84-469.

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.

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.

Nriagu, J.O. et Pacyna, J.M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, **333**: 134-139.

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.

- Padmaja ,M.B ., Rao,1994** . Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose ,glycogen lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail , *Bellamya dissimillis* (Muller) , *bull.environ.contam.toxicol.***53**,142-148.
- Park, H., Ahn, I.Y., Lee, H.E., Park, K.I., Hyun, S.H., 2008.** Response of antioxidant defensesystems to thermal stress in the Antarctic clam *Laternula elliptica*. Antarct.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., Eijsackers, H.J.P., Allen, H.E., 1997.** A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* **37**, 163–172.
- Pennec, G.L., Pennec, M.L., 2003.** Induction of glutathione-S-transferasesin primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquat. Toxicol.* **64**, 131–142.
- Rabitsch, W. B., 1994.** Metal accumulation in arthropods near a lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria. *I. Environ. Pollut.* **90**, 221-237.
- Rainbow P.S. 2002.** Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ Pollut*, **120**:497-507.
- Rainbow, P.S., Poirier, L., Smith, B.D., Brix, K.V., Luoma, S.N., 2006.** Trophic transfer of trace metals: subcellular compartmentalization in a polychaete and assimilation by a decapod crustacean. *Marine Ecology Progress Series*, **308**, 91–100.
- 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.
- Ramos-Vasconcelos, G.R., Hermes-Lima, M., 2003.** Hypometabolism,antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *J. Exp. Biol.* **206**, 675– 685.
- Regoli, F., and Pricipato, G., 1995.** Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **31**: 143-164.
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., 2004.** Timecourse variation in oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat Toxicol* **68**, 167-178.
- 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.

Regoli, F., Gorbi, S., Machella, N., Tedesco, S., Benedetti, M., Bocchetti, R., et al., 2005. Prooxidant effects of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EM) in the land snail *Helix aspersa*. *Free Radic Biol & Med* **39**: 1620–1628.

Ribera, D. 1998. Habilitation à Diriger des Recherches (HDR). Rapport N° 126, Université Bordeaux I.

Ribera, D., Narbonne, J.F., Michel, X., Livingstone, D.R. et O'hara, S., 1991. Responses of antioxydants and lipid peroxydation in mussels to oxydative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **100**, 178-181.

Russell, L. K., DeHaven, J.I., and Botts, R.P., 1981. Toxic Effects of Cadmium on the Garden Snail (*Helix aspersa*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **26**, 634-640.

Salama,A.K., Osman,,K.A.,Saber ,N.A., and 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.

Salinas, A.E., Wong, M.G., 1999. Glutathione S-transferases – a review. *Curr. Med. Chem.* **4**, 279–309.

Scharenberg, W., et Ebeling, E., 1996. Distribution of heavy metals in a woodland food web. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 389-396.

Scheifler, R., 2002. Evaluation de la biodisponibilité et des transferts de polluants métalliques et organiques dans les réseaux trophiques “sol-plante-invertébrés”. Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté, Besançon, France, 196 pages.

Scheifler, R., de Vaufleury, 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.

Senesi, G.S., Baldassare, G., Senesi, N., Radina, B., 1999. Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implication for human health. *Chemosphere* **39**, 343-377.

Shaw, J.P., Large, A.T., Donkin, P., Evans, S.V., Staff, F.J., Livingstone, D.R., Chipmanb, 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.

- Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyeck, C., Newhall, A., and Freidman, L., 1966.** A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt. Biochem*, **19**, 415-428.
- Shukla, G. S., Shukla, A., Potts, R. J., Osier, M., Hart, B. A., and Chiu, J. F., 2000.** Cadmium mediated 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- 362.
- Sies, H., Ketterer, B., 1988.** Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance. Academic Press, London, 480 pages.
- 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 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 592–596.
- Speiser, B., 2000.** Food and Feeding Behaviour. In *The Biology of Terrestrial Molluscs* (Ed G. M. Barker), pp. 259-288. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Stohs, S.T., Bagchi, D., 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metals. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 321–326.
- Sverdrup, L.E., de Vaufleury, A., Hartnik, T., Hagen, S.B., Loibner, A.P., Jensen, J., 2006.** Effects dans uptake of polycyclic aromatic compounds in snails (*Helix aspersa*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 1941-1945.
- Swaileh, K. M. et 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.
- Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., Meister, A., 1989.** Glutathione Centennial: Molecular Perspectives and Clinical Applications. Academic Press, London, 441 pages.
- Tweeddale, H.J., Kondo, M., Gebicki, J.M., 2007.** Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **459**, 151–158.
- Van der Oost R., Beyer J. et Vermeulen N.P.E., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13 (2)**: 57-149.
- Van Straalen, N.M. et van Gestel, C.A.M., 1998.** Soil invertebrates and micro-organisms. In: *Calow, P.* (Ed). *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science, Oxford, 251-277.

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.

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

Viarengo, A., 1994. Heavy metal cytotoxicity in marine organisms: effects on Ca²⁺ homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* **20**, 85–110.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M., 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Physiol. C* **97**: 37–42.

Viarengo, A., Nott, J., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.* **104**, 355–372.

Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environmental Science and Technology* **38**, 4705-4712.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M. et Peakall, D.B. 1996. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, London.

Weckberker, G. and Cory, G., 1988. Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells *in vitro*. *Cancer letters* **40**: 257-264.

WHO, 1993. Biomarkers and risk assessment : Concepts and principles, Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety IPCS. *Environmental Health Criteria* 155.

Winston, G.W. et Di Giulio, R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, **19**, 137-161.

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.

Zaldibar, B., Cancio, I., Soto, M., Marigo ´mez, I., 2007a. Digestive cell turnover in digestive gland epithelium of slugs experimentally exposed to a mixture of cadmium and kerosene. *Chemosphere* **70**, 144–154.

www.naturae-scientia.com