

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS
DÉPARTEMENT D'ÉCOLOGIE ET GÉNIE DE L'ENVIRONNEMENT



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie - Ecologie

Spécialité/Option : Microbiologie de l'environnement: Santé, Eau et Environnement

Thème :

Evaluation de la toxicité de certaines nanoparticules métalliques (ZnO , Fe_2O_3 et Al_2O_3) sur un animal bioindicateur de pollution (*Helix aspersa*)

Présenté par : - BENDOKHANE Wafa

-GOUNACHE Sabrine

-MEZRICHE Saida

Devant le jury composé de :

Président : M^{me} ZERGUINE Karima.

(M.C.B Université de Guelma)

Examinatrice : M^{lle}.ZIDI Sourour.

(M .A.A Université de Guelma)

Encadreur : M^{lle} GRARA Nadjoud.

(M.C.A Université de Guelma)

Juin 2013

Remerciement

Nos remerciements s'adressent spécialement :

A Mon dieu qui nous a aidé à finir ce travail.

Tout d'abord à «Dr.Grara Nedjoud » C'est une chance pour nous de vous avoir eu comme encadreuse. Merci pour votre disponibilité votre efficacité et surtout votre rigueur scientifique merci pour votre implication, vos corrections et vos conseils qui ont été toujours riches et pertinents On n'oubliera pas les nombreuses discussions que nous avons eues vous avez toujours su trouver les mots pour nous guider dans notre travail. Ce fut un immense plaisir de travailler à vos côtés. Et malgré vos nombreuses activités, vous avez toujours trouvé le temps de répondre à nos questions .Pour tout cela nous vous remercions énormément.

Nous tenons particulièrement à remercier les membres du jury :

Nous adressons nos sincères remerciements à Madame Zerguine Karima pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire, et aussi d'avoir être avec nous au laboratoire malgré sa charge de travail respective.

A Melle Zidi Sourour, qui a accepté d'examiner ce travail et participer à ce jury

Merci aux personnes du labo et collègues qui ont contribué par des aides techniques, (les techniciennes Houria , Wafa , Hassiba , Ratiba) ou tout simplement par des conseils avisés à ce travail.

On exprime notre gratitude au : Chef service d'anapath M^{eme} Kharate Samira de l'hôpital IBEN ZAHR de Guelma qui a fait nos coupes histologiques.

On tient à remercier toutes les étudiantes de l'université de la wilaya de Souk-Ahras surtout Zenir.Z pour son aide précieuse et pour ses conseils objectifs.et toutes les personnes qui nous ont permis de bien mener ce travail sont assurées de notre gratitude.

Nous n'oublierons pas dans nos remerciements l'ensemble de nos enseignants pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous dispensé, pour leur tolérance et leur amabilité.

A tous ceux que nous n'avons pas nommés, mais qui nous ont aidés

A vous tous, merci de nous avoir permis de réaliser un de nos rêves.

Dédicace

Ce mémoire représente l'aboutissement du soutien spirituel, moral et matériel et des encouragements qu'ils ont prodigués tout au long de notre scolarité

On ne pourrait imaginer combien on est fière de dédier notre mémoire à tous Ceux qui de près ou de loin. Et qu'ils en soient remerciés par cette modeste dédicace

Nous dédions ce travail à nos précieux et aimables chers parents pour avoir soutenu et écouté avec tout leur cœur au cours de ces années d'études. Vous avez toujours su nos montrer le côté positif des choses pour avancer, même quand c'était difficile. Que le Tout Puissant t'assiste davantage. Merci d'avoir été des parents aussi disponibles et ouverts à toutes nos envies. Merci enfin de m'avoir transmis votre amour pour la mère. Votre tâche n'a pas toujours été aisée, J'espère aujourd'hui vous être source de fierté.

Puisse Dieu vous donne une longue vie afin que tu jouisses des fruits de tes efforts.

A nos chères sœurs et nos chers frères Dans tous les cas, nous souhaitons une bonne continuation dans votre vie professionnelle que dans votre vie personnelle.

Sans oublier tous les membres de nos familles .

A toutes nos amies c'est avec un petit pincement au cœur que nous écrivons ces quelques lignes ; vous comprendrez aisément que c'est difficile de trouver les mots exacts pour exprimer tous nos remerciements Mais nous allons résumer en vous adressant un immense

MERCI.

Enfin nous souhaitons une bonne soutenance et aussi bonne continuation pour nos collègues étudiants

Merci à tous et bonne chance pour l'avenir

Sommaire

Résumé

Abstrat

Liste des Figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Liste des planches

Introduction Générale

Chapitre I : Etat de l'art

1. les nanoparticules manufacturées.....	03
2. Effet des nanoparticules sur l'environnement et la santé humaine.....	03
2.1. Effet des nanoparticules sur l'environnement.....	03
2.1.1. Voie de contamination de l'environnement et distribution dans les différents compartiments écologique.....	03
2.1.2. Risque pour les écosystèmes et les organismes vivants les constituant.....	05
2.2. Effet des nanoparticules sur la santé humaine.....	06
2. 2. 1. Voies d'entrée dans l'organisme.....	06
2. 2. 1. 1. L'appareil respiratoire.....	06
2. 2. 1. 2. Le tractus digestif	07
2. 2. 1. 3. La voie cutanée.....	07
3. Choix d'un modèle animal : les gastéropodes pulmonés.....	08
3. 1. Place des gastéropodes dans les écosystèmes terrestres.....	08
3. 2. Utilisation des escargots dans l'étude de la contamination des sols par les métaux.....	09
3.3. Bioaccumulation et devenir des éléments métalliques chez l'escargot.....	09
3.3. 1. Sources et voies d'exposition et d'absorption	09

Chapitre II : Matériel et méthode

1. Matériel et méthodes.....	13
1.1 Méthode d'échantillonnage.....	13
1.2. Matériel biologique.....	14
1.2.1. Anatomie d' <i>Helix. Aspersa</i>	15

1.2.2. L'espèce en milieu naturel.....	15
1.2.3. Rythme d'activité.....	16
1.2.4. Estivation et hibernation.....	16
1.2.5. Croissance.....	16
2. Matériel chimique.....	17
3. Méthode d'exposition.....	17
3.1. Remise en activité des animaux avant les tests de toxicité.....	17
3. 2. Conditions expérimentales.....	17
3.3. Exposition d' <i>Helix aspersa</i> à la nourriture.....	18
3.4. Dispositifs expérimentaux et durée d'exposition.....	18
3.5. Dissection et prélèvement des organes.....	20
4. Recherche des biomarqueurs physiologiques.....	20
4.1. Mortalité.....	20
4.2. Croissance.....	20
4.3. La consommation alimentaire et les déchets.....	22
4.4. Effets comportementaux.....	22
5. Analyse statistique des résultats.....	23
6. Etude Histologique	23

Chapitre III : Résultat et discussion

1. Résultat	25
1.1. Effet des nanoparticules de ZnO , Fe ₂ O ₃ , et d'Al ₂ O ₃ sur les biomarqueurs physiologique.....	25
1.1.1 Effet des nanoparticules sur l'évolution du poids moyen des escargots.....	25
1.1.2 Effet dose-réponse des Nps sur la croissance des escargots.....	27
1.1.3. Effet du ZnO , Fe ₂ O ₃ et d'Al ₂ O ₃ sur le poids de la coquille.....	32
1.1.4. Effet du ZnO, Fe ₂ O ₃ et d'Al ₂ O ₃ sur l'évolution des diamètres (D, L) de la coquille des escargots.....	33
1.1.5. Effet du ZnO, Fe ₂ O ₃ et d'Al ₂ O ₃ sur le poids des tissus moux.....	37
1.1.6. Effet du ZnO, Fe ₂ O ₃ , et d' Al ₂ O ₃ sur le poids des organes (hépatopancréas, pied, poumons et rein).....	37
1.1.7. Effet du ZnO, Fe ₂ O ₃ et d'Al ₂ O ₃ sur le poids moyen de la consommation alimentaire.....	40

1.1.8. Effet du ZnO, Fe ₂ O ₃ , et d'Al ₂ O ₃ sur le poids des déchets sec.....	42
1.1.9. Effet du ZnO, Fe ₂ O ₃ , et Al ₂ O ₃ sur le comportement.....	44
1.1.10. Effet du ZnO, Fe ₂ O ₃ et d'Al ₂ O ₃ sur le taux de mortalité.....	54
1.2. L'aspect des coupes histologique	56
1.2.1. Aspects du tissu de l'hépatopancréas après traitement par les différentes concentrations de ZnO.....	56
1.2.2 Aspects du tissu de l'hépatopancréas après traitement par les différentes concentrations de Fe ₂ O ₃	57
1.2.3 Aspects du tissu de l'hépatopancréas après traitement par les différentes concentrations d'Al ₂ O ₃	58
1.2.4. Aspects du tissu rénal après traitement par les différentes concentrations de ZnO.....	60
1.2.5. Aspects du tissu rénal après traitement par les différentes concentrations de Fe ₂ O ₃	61
1.2.6. Aspects du tissu rénal après traitement par les différentes concentrations d'Al ₂ O ₃	62
1.2.7. Aspects du tissu pédieux après traitement par les différentes concentrations de ZnO.....	64
1.2.8. Aspects du tissu pédieux après traitement par les différentes concentrations de Fe ₂ O ₃ ...	65
1.2.9. Aspects du tissu pédieux après traitement par les différentes concentrations d'Al ₂ O ₃	66
2. Discussion.....	68

Conclusion Générale.

Perspective.

Références Bibliographiques.

Résumé

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'impact des nanoparticules métalliques (ZnO , Fe_2O_3 et Al_2O_3) et leurs effets sur un organisme bioaccumulateur et bioindicateur de pollution de l'environnement et un indicateur d'état sanitaire le gastéropode *Helix aspersa* pour la préservation de la santé de l'Homme. Il s'agit d'une étude de toxicité subchronique par la voie d'absorption digestive.

La toxicité des NPs est déterminée chez l'escargot *Helix aspersa* grâce à un biotest réalisé en laboratoire sur des animaux exposés à des concentrations croissantes des NPs (100 μ g/g, 500 μ g/g, 1000 μ g/g, 5000 μ g/g).

Les premiers résultats montrent que la présence des NPs métalliques à base de (ZnO , Fe_2O_3 et Al_2O_3) provoquait une inhibition de croissance dose-dépendante, les concentrations estimées qui inhibent 50%, 75%, 90% et 100% de la croissance ont été calculés pour les (4) semaines et qui sont les suivantes :

pour la première semaine $EC_{50} = 1375,94 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 3638,04 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 4995,30 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 5900,15 \mu\text{g/g}$, pour la deuxième semaine $EC_{50} = 667,37 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 2580,94 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 3729,08 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 4494,51 \mu\text{g/g}$, pour la troisième semaine $EC_{50} = 765,80 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 2181,60 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 3031,08 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 3597,39 \mu\text{g/g}$ et pour la quatrième semaine $EC_{50} = 993,33 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 2975,28 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 4164,46 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 4957,24 \mu\text{g/g}$. pour ceux traités par le ZnO .

Pour ceux traités par le Fe_2O_3 : pour la première semaine $EC_{50} = 1620,48 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 3814,08 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 5130,24 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 6007,68 \mu\text{g/g}$, pour la deuxième semaine $EC_{50} = 844,51 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 2673,66 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 3771,15 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 4502,81 \mu\text{g/g}$, pour la troisième semaine $EC_{50} = 1527,33 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 2619,73 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 3275,16 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 3712,12 \mu\text{g/g}$ et pour la quatrième semaine $EC_{50} = 205,08 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 746,73 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 1317,82 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 1698,55 \mu\text{g/g}$.

Pour ceux traité par l' Al_2O_3 : pour la première semaine $EC_{50} = 2167,70 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 3968,64 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 5049,20 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 5769,57 \mu\text{g/g}$, pour la deuxième semaine $EC_{50} = 1316,52 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 2985,83 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 3987,42 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 4655,14 \mu\text{g/g}$, pour la troisième semaine $EC_{50} = 1389,38 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 2470,71 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 3119,50 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 3552,03 \mu\text{g/g}$ et pour la quatrième semaine $EC_{50} = 466,11 \mu\text{g/g}$, $EC_{75} = 1408,16 \mu\text{g/g}$, $EC_{90} = 1973,40 \mu\text{g/g}$, $EC_{100} = 2350,21 \mu\text{g/g}$.

De plus , la plus forte concentration qui n'a pas d'effet (NOEC) est 1000 µg/g et la plus faible concentration qui a eu un effet (LOEC) est 500 µg/g

L'inhibition de la croissance est également représenté par une perte du poids chez l'escargot, une réduction dose – dépendante du poids des tissus moux et des organes moux en particulier (hépatopancréas, rein, poumon), une diminution du diamètre de la coquille et de son poids, ainsi qu'une réduction dose - dépendante du taux de la consommation alimentaire et du poids sec des déchets ainsi que des perturbations comportementales ont été noté.

En ce qui concerne l'examen histopathologique qui a montré clairement des altérations tissulaires très importantes, en particuliers au niveau de l'hépatopancréas, rein, pied et poumon.

Mots clés: escargot *Helix aspersa* , NPs métalliques , ZnO , Fe₂O₃ , Al₂O₃ , Histologie, bioaccumulation, croissance, hépatopancréas , pied , poumon , Rein .

Abstract:

In this study we were interested in assessing the impact of (ZnO, Fe₂O₃ and Al₂O₃) based metal nanoparticles and their effects on body bioindicator of environmental pollution and an indicator of health status *Helix aspersa* for the preservation of human health. This is subchronic (28 days) btime absorption y means of digestive absorption.

The toxicity of NPs is determined in the snail *Helix aspersa* using a bioassay conducted on laboratory animals exposed to increasing concentration of NPs (100 µg/g, 500 µg/g, 1000 µg/g, 5000 µg/g).

Initial results show that the presence of metallic NPs to (ZnO, Fe₂O₃ and Al₂O₃) growth caused an inhibition dose-dependent, the estimated concentrations that inhibit 50%, 75%, 90% et 100% of growth were calculated for the (4) weeks and are as follows:

For the first week EC₅₀ = 1375,94 µg/g, EC₇₅ = 3638,04 µg/g, EC₉₀ = 4995,30 µg/g, EC₁₀₀ = 5900,15 µg/g, for the second week EC₅₀ = 667,37 µg/g, EC₇₅ = 2580,94 µg/g, EC₉₀ = 3729,08 µg/g, EC₁₀₀ = 4494,51 µg/g, for the third week EC₅₀ = 765,80 µg/g, EC₇₅ = 2181,60 µg/g, EC₉₀ = 3031,08 µg/g, EC₁₀₀ = 3597,39 µg/g and for the fourth week EC₅₀ = 993,33 µg/g, EC₇₅ = 2975,28 µg/g, EC₉₀ = 4164,46 µg/g, EC₁₀₀ = 4957,24 µg/g.

For the treated with the Fe₂O₃: For the first week EC₅₀ = 1620,48 µg/g, EC₇₅ = 3814,08 µg/g, EC₉₀ = 5130,24 µg/g, EC₁₀₀ = 6007,68 µg/g, for the second week EC₅₀ = 844,51 µg/g, EC₇₅ = 2673,66 µg/g, EC₉₀ = 3771,15 µg/g, EC₁₀₀ = 4502,81 µg/g, for the third week EC₅₀ = 1527,33 µg/g, EC₇₅ = 2619,73 µg/g, EC₉₀ = 3275,16 µg/g, EC₁₀₀ = 3712,12 µg/g et g and for the fourth week EC₅₀ = - 205,08 µg/g, EC₇₅ = 746,73 µg/g, EC₉₀ = 1317,82 µg/g, EC₁₀₀ = 1698,55 µg/g.

For the treated with the Al₂O₃: For the first week EC₅₀ = 2167,70 µg/g, EC₇₅ = 3968,64 µg/g, EC₉₀ = 5049,20 µg/g, EC₁₀₀ = 5769,57 µg/g, for the second week EC₅₀ = 1316,52 µg/g, EC₇₅ = 2985,83 µg/g, EC₉₀ = 3987,42 µg/g, EC₁₀₀ = 4655,14 µg/g, for the third week EC₅₀ = 1389,38 µg/g, EC₇₅ = 2470,71 µg/g, EC₉₀ = 3119,50 µg/g, EC₁₀₀ = 3552,03 µg/g and for the fourth week EC₅₀ = 466,11 µg/g, EC₇₅ = 1408,16 µg/g, EC₉₀ = 1973,40 µg/g, EC₁₀₀ = 2350,21 µg/g. Moreover, the highest concentration that has no effect (NOEC) is 500 µg/g and the lowest concentration that had an effect (LOEC) is 1000 µg/g.

Loss of weight in snails and a decrease in shell diameter and weight. The growth inhibition is also represented by a loss of weight in the snail, a reduction dose-dependent on the weight of soft tissues and organs especially Soft (hepatopancreas and Kidney), and reduced dose-dependent consumption rate and dry weight of the waste and behavioral disturbances were noted.

Regarding histopathological examination which showed clearly very important tissue alteration, in particular at the hepatopancreas, kidney, lung and foot.

Key words: *Helix aspersa*, metal NPs, ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃, indicator of health status, bioaccumulation, growth, hepatopancreas, kidney, lung, foot.

ملخص

في هذه الدراسة اهتمنا بتقييم تأثير الجسيمات النوية المعدنية المكونة من (أكسيد الزنك ZnO، ثاني أكسيد الحديد Fe₂O₃ وثاني أكسيد الألمنيوم Al₂O₃) و تأثيرها على الحيوان *Bioaccumulateur Helix aspersa* و مؤشر للتلوث البيئي *Bioindicateur* ومؤشرا للحالة الصحية، للحفاظ على الصحة العامة للإنسان، مدة المعالجة هو 28 يوما عن طريق امتصاص الجهاز الهضمي.

يتم تحديد سمية (أكسيد الزنك ZnO، ثاني أكسيد الحديد Fe₂O₃ وثاني أكسيد الألمنيوم Al₂O₃) في الحلزون *Helix aspersa* باستخدام اختبار إحيائي و التي أجريت على الحيوانات المختبرة و التي عرضت لمستويات متزايدة من سمية الجسيمات النوية المعدنية (100 ميكروغرام/غرام و 500 ميكروغرام/غرام و 1000 ميكروغرام/غرام و 5000 ميكروغرام/غرام).

تظهر النتائج الأولية أن وجود مصادر الطاقة النووية القائمة على المعادن (ZnO, Al₂O₃, Fe₂O₃) تسبب تثبيط النمو تعتمد على الجرعة، وتركيزات التقديرية التي تمنع 50%، 75%، 90% و 100% من نمو كان يحسب خلال (4) أسابيع وذلك على النحو التالي:

للاُسبوع الأول EC50 = ميكروغرام / غرام 1375.94 ، ميكروغرام / غرام 3638.04 = EC75 ، EC90 = 4995.30 ميكروغرام / غرام ، ميكروغرام / غرام 5900.15 = EC100 للاُسبوع الثاني EC50 = 667.37 ميكروغرام / غرام ، ميكروغرام / غرام 2580.94 = EC75 ، ميكروغرام / غرام 3729.00 = EC90 ، EC100 = 4494.51 ميكروغرام / غرام للاُسبوع الثالث EC50 = 765.80 ميكروغرام / غرام ، ميكروغرام / غرام 2181.60 = EC75 ، ميكروغرام / غرام 3031.08 = EC90 ، EC100 = 3597.39 ميكروغرام / غرام وللأسبوع الرابع EC50 = ميكروغرام / غرام 993.33 ، ميكروغرام / غرام 2975.28 = EC75 ، ميكروغرام / غرام 4164.46 = EC90 ، EC100 = 4957.24 ميكروغرام / غرام مع أكسيد الزنك. مع Fe₂O₃ ، للاُسبوع الأول EC50 = 1620.48 ميكروغرام / غرام ، ميكروغرام / غرام 3814.08 = EC75 ، ميكروغرام / غرام 5130.24 = EC90 ، ميكروغرام / غرام 6007.00 = EC100 للاُسبوع الثاني EC50 = 844.51 ميكروغرام / غرام ، ميكروغرام / غرام 2673.66 = EC75 ، EC90 = 3771.15 ، ميكروغرام / غرام 4502.81 = EC100 ميكروغرام / غرام للاُسبوع الثالث ، ميكروغرام / غرام 1527.33 = EC50 ، EC75 = ، ميكروغرام / غرام 2619.73 = EC90 ، ميكروغرام / غرام 3275.16 ، EC100 = 3712.12 ملغ / غم وللأسبوع الرابع - EC50 = 205.08 ميكروغرام / غرام ، ميكروغرام / غرام 746.73 = EC75 ، ميكروغرام / غرام 1317.82 = EC90 ، EC100 = 1698.55 ميكروغرام / غرام.

مع الألومينا Al₂O₃: للاُسبوع الأول EC50 = 2167.70 ميكروغرام / غرام ، EC75 = ميكروغرام / غرام 3968.64 ، EC90 = 5049.20 ميكروغرام / غرام ، EC100 = 5769.57 ميكروغرام / غرام للاُسبوع الثاني ميكروغرام / غرام 1316.52 = EC50 ، EC75 = 2985.83 ميكروغرام / غرام ، EC90 = 3987.42 ميكروغرام / غرام ، EC100 = 4655.14 ميكروغرام / غرام للاُسبوع الثالث ميكروغرام / غرام 1389.38 = EC50 ، ميكروغرام / غرام 2470.71 = EC75 ، EC90 = 3119.50 ميكروغرام / غرام ، ميكروغرام / غرام 3552.00 = EC100 للاُسبوع

الرابع $EC50 = 466.11$ ميكروغرام / غرام ، $EC75 = 1408.16$ ميكروغرام / غرام ، $EC90 = 1973.40$ ميكروغرام / غرام ، $EC100 = 2350.21$ ميكروغرام / غرام .

وبالإضافة إلى ذلك، فإن أعلى تركيز له أي تأثير (NOEC) هو 500 ملغ / غ و بأقل تركيز التي كان لها تأثير (LOEC) هو 1000 ميكروغرام / غرام

فقدان الوزن عند الحلزون و انخفاض وزن القواقع و قطريها. و تمثل أيضا إعاقة النمو بسبب فقدان الوزن في الحلزون، تخفيض- يعتمد على جرعة على وزن الأنسجة الرخوة و خاصة الأجهزة اللينة(البنكرياس الكبدية و الكلى)، و لوحظ تخفيض- يعتمد على جرعة في معدل الاستهلاك و الوزن الجاف للفضلات و كما لوحظ اضطرابات سلوكية. بشأن فحص الأنسجة التي أظهرت فيها التغيرات بوضوح و التي كانت معتبرة، و لاسيما في البنكرياس الكبدية و الرئة و الكلى و القدمين.

كلمات البحث *Helix aspersa* ، الجسيمات النونية المعدنية، أكسيد الزنك، أكسيد الألمينيوم، أكسيد الحديد

مؤشرا على الحالة الصحية

Liste des Figures

N°	Titres des Figures	Pages
01	Contamination et devenir des nanoparticules dans l'environnement.	05
02	Les Principaux effets des nanoparticules sur la santé humaine.	08
03	Différentes voies de contamination d' <i>Helix aspersa aspersa</i> .	11
04	localisation du site d'échantillonnage à «Bouati Mahmoud»	13
05	Escargot <i>Helix aspersa</i> .	15
06	Anatomie de l'escargot	15
07	Exposition d' <i>Helix aspersa</i> à la nourriture au laboratoire.	19
08	Mesure des deux diamètres D et L d' <i>Helix aspersa</i> .	22
09	Effet du ZnO sur l'évolution du poids moyen des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	26
10	Effet du Fe ₂ O ₃ sur l'évolution du poids moyen des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	26
11	Effet d' Al ₂ O ₃ sur l'évolution du poids moyen des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	27
12	Coefficient de croissance de <i>Helix aspersa</i> en fonction en fonction du temps(ZnO)	27

13	Coefficient de croissance de <i>Helix aspersa</i> en fonction en fonction du temps(Fe_2O_3)	29
14	Coefficient de croissance de <i>Helix aspersa</i> en fonction en fonction du temps(Al_2O_3)	30
15	Evolution du poids moyen de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction des concentrations croissante en (ZnO ; Fe_2O_3 ; Al_2O_3)	32
16	Effet du ZnO sur l'évolution du diamètre moyen « D » de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	34
17	Effet du ZnO sur l'évolution du diamètre moyen « L » de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	34
18	Effet du Fe_2O_3 sur l'évolution du diamètre moyen « D » de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	35
19	Effet du Fe_2O_3 sur l'évolution du diamètre moyen « L » de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	35
20	Effet du Al_2O_3 sur l'évolution du diamètre moyen « D » de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	36
21	Effet du Al_2O_3 sur l'évolution du diamètre moyen « L » de la coquille des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	36
22	Evolution du poids moyen des tissus moux des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction des concentrations croissante en (ZnO ; Fe_2O_3 ; Al_2O_3)	37

23	Evolution du poids moyen des poumons des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction des concentrations croissante en (ZnO ;Fe ₂ O ₃ ;Al ₂ O ₃)	38
24	Evolution du poids moyen d'hépatopancréas des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction des concentrations croissante en (ZnO ;Fe ₂ O ₃ ;Al ₂ O ₃)	39
25	Evolution du poids moyen des reins des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction des concentrations croissante en (ZnO ;Fe ₂ O ₃ ;Al ₂ O ₃)	39
26	Evolution du poids moyen des pieds des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction des concentrations croissante en (ZnO ;Fe ₂ O ₃ ;Al ₂ O ₃).	40
27	Effet du ZnO sur la consommation alimentaire des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps	41
28	Effet du Fe ₂ O ₃ sur la consommation alimentaire des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	41
29	Effet du Al ₂ O ₃ sur la consommation alimentaire des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction du temps.	42
30	Effet du ZnO sur le poids moyen des déchets sec en fonction du temps	43
31	Effet du Fe ₂ O ₃ sur le poids moyen des déchets sec en fonction du temps	43
32	Effet d' Al ₂ O ₃ sur le poids moyen des déchets sec en fonction du temps	44

33	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration de ZnO après une semaine d'exposition	48
34	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration de Fe ₂ O ₃ après une semaine d'exposition.	49
35	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration de Al ₂ O ₃ après une semaine d'exposition.	49
36	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration de ZnO après deux semaines d'exposition.	50
37	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration de Fe ₂ O ₃ après deux semaines.	50
38	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration d'Al ₂ O ₃ après deux semaines d'exposition.	51
39	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration de ZnO après trois semaines d'exposition.	51

40	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration de Fe ₂ O ₃ après trois semaines d'exposition.	52
41	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration d'Al ₂ O ₃ après trois semaines.	52
42	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration de ZnO après quatre semaines d'exposition.	53
43	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration de Fe ₂ O ₃ après quatre semaines d'exposition.	53
44	Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots <i>Helix aspersa</i> pour chaque concentration d'Al ₂ O ₃ après quatre semaines.	54
45	Pourcentage cumulatif de mortalité des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction des concentrations croissantes de ZnO.	55
46	Pourcentage cumulatif de mortalité des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction des concentrations croissantes de Fe ₂ O ₃ .	55
47	d'Al ₂ O ₃ Pourcentage cumulatif de mortalité des escargots <i>Helix aspersa</i> en fonction des concentrations croissantes.	55

Liste des tableaux

N°	Titres des Tableaux	Pages
01	Concentration estimées de ZnO qui inhibent la croissance des escargot de 50% (EC50), de 75% (EC75), de 90% (EC90), de 100% (EC100) au cours des quatre semaines de l'expérience.	28
02	Concentration estimées de Fe ₂ O ₃ qui inhibent la croissance des escargot de 50% (EC50), de 75% (EC75), de 90% (EC90), de 100% (EC100) au cours des quatre semaines de l'expérience.	29
03	Concentration estimées de Al ₂ O ₃ qui inhibent la croissance des escargot de 50% (EC50), de 75% (EC75), de 90% (EC90), de 100% (EC100) au cours des quatre semaines de l'expérience.	31

Liste des planches

N°	Titres des Planches	Pages
01	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de ZnO 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E). (Gx10)	56
02	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de Fe ₂ O ₃ 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 10000 µg/g (E). (Gx10)	57
03	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations d'Al ₂ O ₃ 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E). (Gx10)	58
04	Coupes histologiques du rein des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de ZnO 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E). (Gx10)	60
05	Coupes histologiques du rein des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de Fe ₂ O ₃ 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 10000 µg/g (E). (Gx10)	61
06	Coupes histologiques du rein des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations d'Al ₂ O ₃ 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E). (Gx10)	62
07	Coupes histologiques du pied des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de ZnO 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E). (Gx10)	64

08	Coupes histologiques du pied des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de Fe ₂ O ₃ 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 10000 µg/g (E). (Gx10)	65
09	Coupes histologiques du pied des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations d'Al ₂ O ₃ 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E). (Gx10)	66

Liste des abréviations

Al₂O₃ : Alumine ou Oxyde d'aluminium.

CA : Actif en position haute.

CE₅₀ : Concentration efficace 50%.

CE₇₅ : Concentration efficace 75%.

CE₉₀ : Concentration efficace 90%.

CE₁₀₀ : Concentration efficace 100%.

CE : Cellule excrétoire.

CC : Cellule à Calcium.

CD : Cellule digestive.

CPA : Inactif en position haute.

CG : Cellule glandulaire.

CR : Cellule du revêtement.

Fe₂O₃ : Oxyde de fer.

LOEC : Lowest Observed Effect Concentration (Concentration minimale avec effet observé).

NOEC : No Observed Effect Concentration (Concentration maximale sans effet observé).

NPs : Nanoparticules.

r² : Coefficient de détermination.

SA : Actif sur le substrat.

SpA : Inactif sur le substrat.

ZnO : Oxyde de Zinc.

Introduction :

Le développement des nanotechnologies est en plein essor depuis une dizaine d'années. En effet, les nanomatériaux manufacturés présentent de nouvelles propriétés physico-chimiques qui permettent leur utilisation dans un grand nombre de produits. Ainsi, les nanoparticules présentent des propriétés photocatalytiques et d'absorption des UV élevées, ce qui justifie leur incorporation dans les textiles, les peintures, les ciments et verres auto nettoyants mais aussi leur utilisation pour la remédiassions des sols pollués (Angélique,2008).

Le développement croissant des équipements incorporant des nanomatériaux, la dispersion inévitable des nanoparticules dans l'environnement nécessite donc d'évaluer leur impact sur l'Homme et l'environnement (Bigorgne,2011).La toxicité des nanoparticules métalliques fait intervenir une dissolution des nanoparticules et donc une toxicité chimique associée aux ions libérés avec une génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Angélique, 2008).

La pollution environnementale par les métaux est devenu un des problèmes les plus important dans le monde .Ce phénomène a augmenté dans les dernières décennies à cause de l'utilisation étendue des métaux lourds en agriculture, chimie et en industriels (Mule et Lomte, 1994). Les métaux lourds, ont souvent des influences néfastes sur la santé des êtres vivants et en particulier de l'homme (Carpenter, 1994) et les effets délétères directs et/ou indirects peuvent se manifester depuis le niveau moléculaire jusqu'aux communautés et écosystèmes (Chandran et *al.*, 2005).

L'importance des invertébrés dans la structure des communautés et le fonctionnement des écosystèmes terrestres et aquatiques justifie l'intérêt d'étendre les recherches et les procédures écotoxicologiques à ces groupes d' animaux (Ramade ,1992). Les approches actuelles tendent à étudier les interactions entre les contaminants et une grande diversité d'organismes animaux afin d'évaluer l'impact des contaminants sur l'ensemble des communautés animales (Coeurdassier, 2001).

Il est donc nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement à travers des organismes ou un ensemble d'organismes que l'on utilise comme sentinelles en étudiant les modifications physiologiques, biochimiques et écologiques qui les affectent. Ces êtres vivants très sensibles aux contaminants présentent l'intérêt de se prêter plus facilement que

l'homme aux études des effets des polluants et permettent de mettre en évidence des pollutions chroniques ou brutales (Echaubard, 1995 ; Hellowell, 1986).

Le transfert de polluants dans les réseaux trophiques ne se limite pas aux composés organiques, l'augmentation des concentrations des nanoparticules métalliques dans les sols, principalement due aux activités humaines suscite de nombreuses études sur les risques de leurs transferts. Ces risques paraissent d'autant plus grands que les métaux (Zn : La toxicité des nanoparticules à base de ZnO est toujours comparée à celle des ions Zn^{2+} ,.....) contrairement à la plupart des composés organiques, ne sont pas dégradés dans l'environnement (Gomot, 1997a).

L'objectif de ce travail vise à étudier les effets des nanoparticules métalliques (ZnO, Al_2O_3 et Fe_2O_3) sur un organisme bioaccumulateur et bioindicateur de pollution de l'environnement pour la préservation de la santé de l'homme après exposition sub-Chronique, le gastéropode terrestre *Helix aspersa* à travers la contribution d'une voie d'exposition (voie digestive), une voie représentative dans la détermination de la bioaccumulation et des effets toxiques des contaminants les organismes terrestres (les gastéropodes pulmonés).

Dans le présent travail, sera tout d'abord présenté un état de l'art donnant une vue générale sur tous qui concernent les nanoparticules et les gastéropodes pulmonés. Après avoir présenté les objectifs et la démarche retenue pour l'étude, matériel et méthodes utilisés seront décrits. Les résultats obtenus seront ensuite détaillés et discutés. Pour finir, une conclusion générale pour l'étude sera présentée.

1. les nanoparticules manufacturées :

Les nanoparticules sont des objets relativement fréquents. Il existe en effet différentes sources de production des nanoparticules : les sources naturelles (incendies, éruptions volcaniques ...), les sources accidentelles (feux de bois, gaz d'échappement de véhicule, freinage,...) et les sources industrielles (nanoparticules manufacturées intentionnellement par l'homme).

On distingue trois types de nanoparticules en fonction de leur provenance :

- les nanoparticules d'origine naturelle résultant essentiellement des phénomènes de nucléation et de condensation des gaz et vapeurs dans l'atmosphère.
- les nanoparticules d'origine anthropogénique non-intentionnelle issues des procédés chauds tels que le soudage ou encore de la combustion des moteurs.
- les nanoparticules d'origine anthropogénique intentionnelle ou nanoparticules manufacturées (Angélique, 2008).

2. Effet des nanoparticules sur l'environnement et la santé humaine :

2.1. Effets des nanoparticules sur l'environnement :

2.1.1. Voies de contamination de l'environnement et distribution dans les différents compartiments écologiques:

Les nanoparticules manufacturées sont susceptibles de se retrouver dans tous les compartiments physiques et/ou biologiques de l'environnement.

Les apports potentiels à l'environnement de nanoparticules, fonctionnalisées ou non, sont étroitement liés au cycle de vie des nanomatériaux : production, usages, résidus ultimes, et il est prévisible que le développement des nanotechnologies donnera lieu à un accroissement de ces apports, en quantité et diversité (Owen et Depledge, 2005).

Actuellement des utilisations aboutissent à la dispersion de nanoproducts dans les écosystèmes (cosmétiques, encres...) et d'autres applications sont à l'étude, telles que l'emploi de nanoparticules pour la dépollution des sols contaminés et des eaux souterraines ou de nanotubes de carbones fonctionnalisés possédant des propriétés « antisalissures » utilisables dans les peintures antisalissures marines (Siron, 2009).

Les nanoparticules peuvent ainsi se retrouver dans l'air que nous respirons, dans l'eau que nous buvons, dans les produits que nous utilisons et que nous consommons, Pourtant, les études montrent de plus en plus que les nanoparticules manufacturées se retrouvent, en grand

nombre, présentes dans notre milieu de vie et constituent des dangers permanents ((Hervé,2006).

L'évaluation des conséquences environnementales futures doit prendre en considération, la nature et l'importance des sources, les mécanismes et voies de transfert (atmosphère, eaux de ruissellement, rejet direct), les compartiments de stockage (eau, sols, sédiments), les espèces cibles et leurs interrelations (proie-prédateur) (Owen et Depledge, 2005), les effets sur les différentes populations exposées (Colvin, 2003). Les conditions de persistance ou de dégradation des nanoparticules (Angélique, 2008).

Les nanoparticules dans l'eau et le sol :

Les particules retrouvées dans les eaux de surface proviennent surtout de la pluie et du lessivage de sols contaminés.

Une fois dans l'eau, leur sort dépendra d'un certain nombre de facteurs tels que la présence de matière organique naturelle, la force ionique et le pH. Par exemple, la présence de matière organique naturelle a un effet stabilisateur et empêche l'agrégation des nanoparticules (INERIS, 2008). Les nanoparticules sont a priori peu ou pas solubles dans cet élément, cela semble donc limiter leur dispersion dans l'environnement. Cependant, il n'est pas exclu que de par leur petite taille, les nanoparticules puissent aussi très bien se disperser dans l'environnement et ainsi interagir avec celui-ci. Certaines nanoparticules d'oxyde métallique ont une dispersion stable dans l'eau malgré le fait qu'elles soient partiellement agglomérées (Ferin et *al.*, 1992).

Il est communément admis que c'est sous la forme dissoute dans l'eau que beaucoup de substances ont le maximum d'impact sur l'environnement. En effet c'est sous cette forme qu'elles sont le plus susceptibles d'être transportées, accumulées, dégradées et transformées (Siron, 2009).

D'autre part, des nanoparticules manufacturées pourraient être rejetées dans les eaux et les sols de manière intentionnelle. En effet, de nombreuses études décrivent l'utilisation de nanoparticules comme dépolluant (Liu and Zhao, 2007; Theron et *al.*, 2008).

Les particules ultrafines dans l'air :

L'aérosol atmosphérique contient des nanoparticules qui sont alors appelées particules ultrafines. Actuellement, ces particules ultrafines résultent essentiellement de la conversion gaz-particules, elles constituent la fraction majoritaire en nombre et en surface des particules (Angélique, 2008).

La taille des nanoparticules facilite leur diffusion dans l'air du fait de leur très faible masse et leur considérable surface spécifique, peuvent transporter de grandes quantités de

contaminants tels que l'arsenic ou les pesticides et favorisent ainsi le transport de polluants habituellement peu mobiles (Ferin et *al.*, 1992). Les nanoparticules peuvent être très facilement dispersées dans le milieu atmosphérique et ainsi parcourir de longues distances avant de se déposer, des distances qui dépendront de la taille des nanoparticules (Warheit et *al.*, 2005 ; Hervé, 2006).

En règle générale, il y a variabilité de la concentration en particules ultrafines dans l'air, en fonction des sources de pollution et des conditions météorologiques (Kulmala et *al.*, 2004).

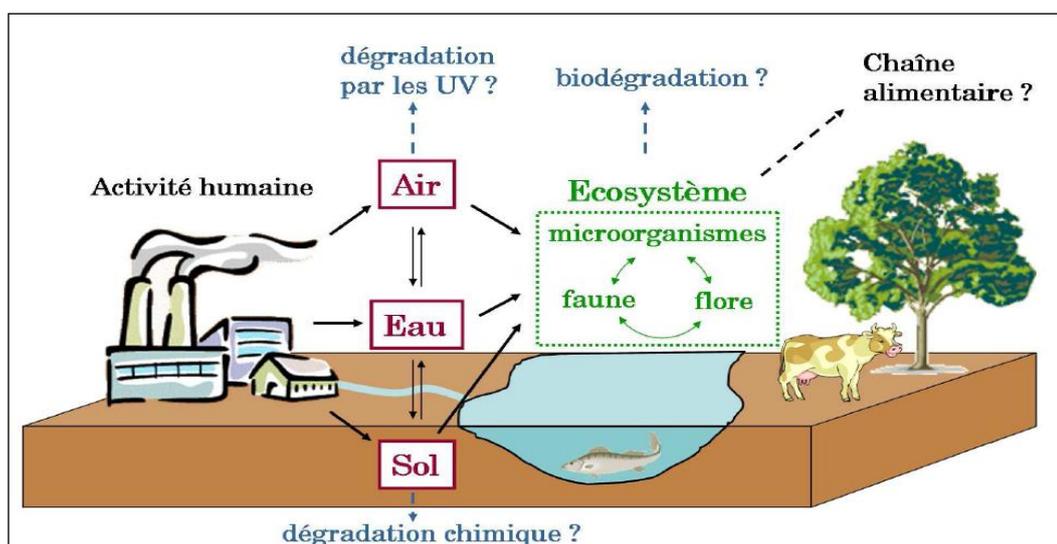


Figure 01 : Contamination et devenir des nanoparticules dans l'environnement.

(En rouge sont indiquées les voies de contaminations primaires et en bleu les voies de dégradation hypothétiques) (Angélique, 2008).

2.1.2. Risque pour les écosystèmes et les organismes vivants les constituant :

Les voies d'exposition des organismes aux nanoparticules diffèrent selon les espèces considérées, les nanoparticules peuvent avoir des effets néfastes sur la faune et la flore aquatique (Hund-Rinke and Simon, 2006). De même les nanoparticules peuvent aussi avoir des effets sur la croissance des végétaux terrestres. En effet, les nanoparticules d' Al_2O_3 et de Zn ou ZnO sont capables d'inhiber la croissance de différentes espèces de plantes, cette inhibition dépendant du surfactant utilisé (Yang and Watts, 2005).

Certaines nanoparticules peuvent avoir un effet bactéricide sur différentes souches bactériennes. Il est donc tout à fait envisageable que ces mêmes nanoparticules puissent inhiber la croissance de souches naturelles et ainsi déséquilibrer les écosystèmes. Plusieurs

facteurs sont impliqués dans la toxicité, telles que l'attachement des nanoparticules, la localisation intracellulaire, les changements dans l'expression des gènes et des protéines, des organites et le cycle de structure de la membrane, la viabilité et de la cellule (Nanna, 2011).

On peut envisager deux types d'impacts des nanoparticules industrielles sur les organismes vivants :

- un effet direct lié à une toxicité intrinsèque (assimilation cellulaire directe des nanoparticules par les différents organismes).
- un effet indirect lié à la présence de polluants adsorbés à leur surface (oxydes, phosphates, silicates) ou dans leur structure (nanotubes de carbone, fullerènes, etc.) (Kahru et *al.*, 2008).

Enfin, certaines nanoparticules peuvent fixer d'autres polluants à leur surface, ce qui dans certains cas rend moins toxique le polluant et dans d'autres cas augmente l'effet toxique (Navarro et *al.*, 2008). Ainsi, ces nanoparticules peuvent avoir un impact sur les écosystèmes. Cependant, pour la plupart d'entre elles, des effets sont observés à des concentrations élevées qui ne reflètent probablement pas les conditions environnementales (Angélique, 2008).

2.2. Effets des nanoparticules sur la santé humaine :

2.2.1. Voies d'entrée dans l'organisme :

L'homme peut entrer en contact avec les nanoparticules de trois façons : en les touchant (voie cutanée), en les ingérant (voie digestive) ou en les respirant (voie respiratoire). Cette dernière est probablement la plus conséquente et donc la plus étudiée (Siron, 2009).

Chacun présentant une barrière à cette pénétration. Néanmoins, ces barrières peuvent se révéler insuffisantes et certaines particules avoir des effets toxiques sur l'organisme (Kahru et *al.*, 2008).

Le contact avec ces nanoparticules peut se faire de différentes façons :

- directement à partir de nanoparticules contenues par exemple dans des poudres ;
- indirectement par la libération de nanoparticules, constituants des objets ou des matériaux nanométriques (Angélique, 2008).

2.2.1.1. L'appareil respiratoire :

La présence de particules ultrafines dans l'air ambiant pouvait conduire à des impacts respiratoires et cardiovasculaires. La localisation de ce dépôt dépend de la taille, de la forme et de l'état d'agglomération des particules.

-L'intensité du dépôt en fonction de leur taille a pu être modélisée dans les différentes régions du tractus respiratoire (la région extra-thoracique, l'arbre trachéo-bronchique et la région alvéolaire) (Witschger and Fabries, 2005).

Suite au dépôt dans les voies respiratoires, l'organisme peut mettre en œuvre différents mécanismes d'élimination des nanoparticules en fonction de leur localisation mais aussi de leur taille et de leur nature (Buzea et al., 2007). Les macrophages alvéolaires sont les acteurs principaux de l'élimination des particules dans la région alvéolaire. Il s'agit aussi de la première barrière empêchant les nanoparticules de transloquer à travers la barrière épithéliale (Yang et al., 2008).

Des effets sur le système cardiovasculaire (notamment des marqueurs sanguins de coagulation, d'inflammation systémique et sur la capacité de diffusion pulmonaire) suite à des expositions à des particules ultrafines carbonées (Kahru et al., 2008). Le dépôt des nanoparticules dans l'appareil respiratoire se fait essentiellement par diffusion. La localisation de ce dépôt dépend de la taille, de la forme et de l'état d'agglomération des particules (Valérie, 2009).

2.2.1.2. Le tractus digestif :

Le tractus digestif constitue une autre voie d'entrée des nanoparticules qui peuvent avoir deux origines :

-les premières : qui peuvent être ingérées directement avec l'eau, les aliments ou les médicaments,

-les secondes : qui sont éliminées de l'appareil respiratoire (par l'escalier mucociliaire).

Les nanoparticules sont éliminées rapidement avec peu de passage à travers la barrière intestinale (Jani et al., 1994; Yamago et al., 1995).

2.2.1.3. La voie cutanée :

L'exposition par voie cutanée est probablement faible en raison du temps de dépôt long des nanoparticules sur les surfaces. Cependant elle ne peut pas être négligée dans le cas de manipulations directes des nanoparticules au poste de travail ou encore lors de l'utilisation de crèmes cutanées contenant des nanoparticules telles que les crèmes solaires.

Du fait de leur taille réduite, les nanoparticules pourraient avoir plus de facilité à passer la barrière cutanée pour atteindre le derme qui est riche en (Vaisseaux sanguins, lymphatiques, nerfs sensitifs et cellules dendritiques) (Lademann et al., 1999).

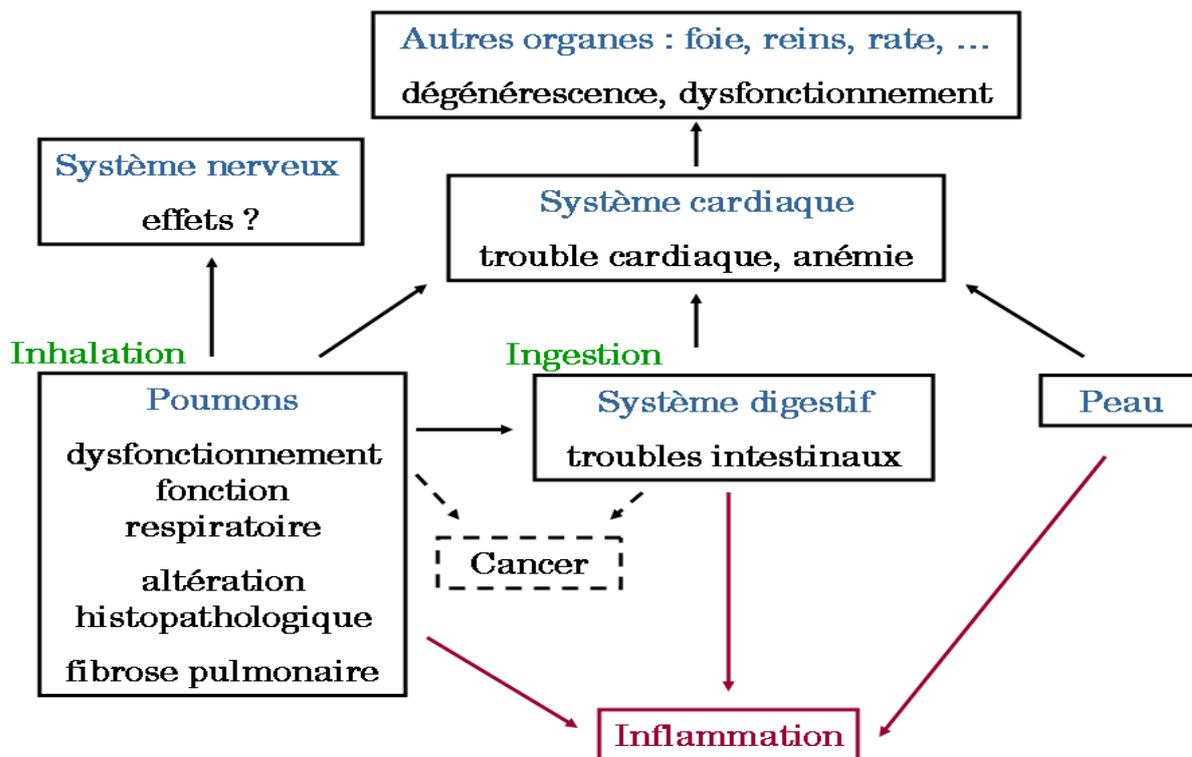


Figure 02 : Les Principaux effets des nanoparticules sur la santé humaine. (Ostiguy et *al.* , 2008).

3. Choix d'un modèle animal : les gastéropodes pulmonés :

3.1. Place des gastéropodes dans les écosystèmes terrestres :

Les mollusques gastéropodes occupent une place importante dans la structure des communautés d'invertébrés du sol et le fonctionnement des écosystèmes terrestres. (Barker ,2001) estime qu'il existe mondialement environ 35000 espèces. En Europe, plus de 300 espèces sont actuellement décrites et se répartissent dans 150 genres (Kerney et *al.*, 1999). Les gastéropodes terrestres sont très largement répartis dans tous les continents incluant l'Arctique, les hautes montagnes (plus de 3000 m) et les déserts arides qu'ils peuvent coloniser à des densités relativement élevées (Dallinger et *al.*, 2001). Leur répartition est déterminée par des conditions régionales et stationnelles impliquant le climat et la nature de l'habitat notamment au niveau des caractéristiques édaphiques comme la concentration en Calcium du milieu (Peake, 1978).

3.2. Utilisation des escargots dans l'étude de la contamination des sols par les métaux :

Un indicateur biologique peut être défini comme une espèce reflétant l'état du milieu dans lequel elle vit. Il doit pour cela répondre à un certain nombre de critères (Hopkin, 1993 ; Edwards et *al.*, 1996) :

- ✓ participer activement au fonctionnement de l'écosystème,
- ✓ être sédentaire, largement distribué et facile à identifier et à échantillonner,
- ✓ être bioaccumulateur,
- ✓ être tolérant aux fortes contaminations de l'environnement,
- ✓ leur écologie et physiologie doivent être connues.

3.3. Bioaccumulation et devenir des éléments métalliques chez l'escargot :

3.3.1. 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. La répartition des contaminants à l'intérieur d'un écosystème donné dépend de leurs propriétés intrinsèques ainsi que des caractéristiques biotiques et abiotiques du milieu (Coeurdassier, 2001).

Les propriétés physico-chimiques et la stabilité des composés toxiques, la nature du compartiment contaminé et les rythmes d'apports influencent la contamination des milieux et l'exposition des organismes. L'exposition peut être définie comme la coïncidence dans l'espace et dans le temps d'un récepteur et d'un "stresseur" qui entrent en contact et interagissent. Dans le contexte de la contamination des milieux, les stresseurs sont les polluants chimiques (dont les ETM), les récepteurs incluent toutes les espèces identifiées au niveau d'un site tandis que le contact et les interactions sont représentés par l'accumulation des contaminants dans les organismes (Chapman et *al.*, 2003).

L'exposition des organismes est généralement exprimée comme une concentration. Cependant, l'importance du facteur temps dans l'accumulation et l'induction d'effets toxiques à l'échelle de l'organisme conduit à exprimer l'exposition comme une dose (Suter, 1993). L'exposition doit également être examinée à l'échelle du site ou de la parcelle, considérant la variabilité spatiale de la contamination (Kooistra et *al.*, 2001). 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 3) :

- 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, 2000),
- Respiratoire par inhalation de gaz et/ou de particules atmosphériques (Ismert et *al.*, 2002, Regoli et *al.*, 2006).

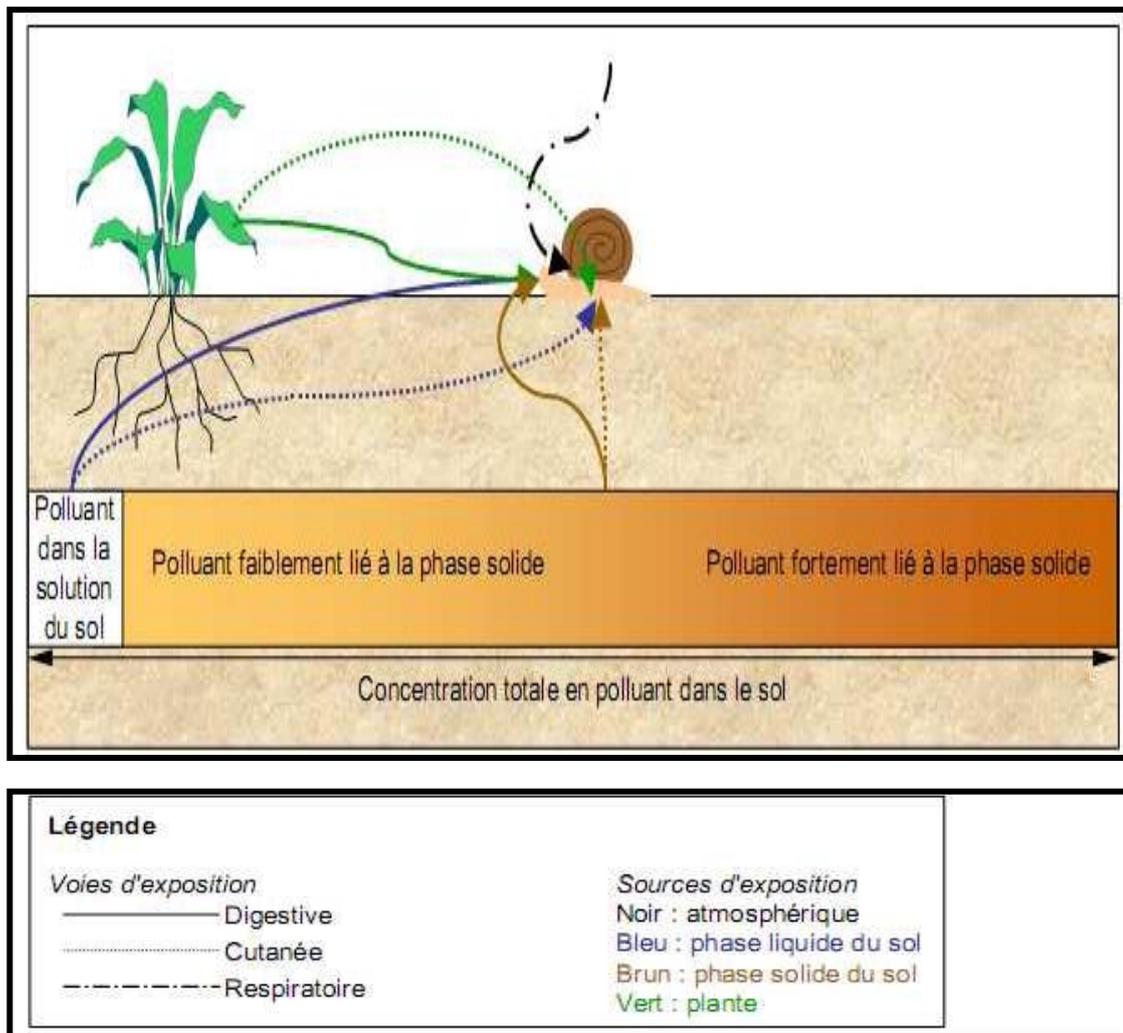


Figure 03 : Différentes voies de contamination d'*Helix aspersa aspersa* (Viard, 2009).

L'absorption des métaux par les invertébrés est étroitement liée à la fréquence et à la durée de l'exposition, aux interactions entre le milieu et l'élément considéré, qui conditionnent sa biodisponibilité, et aux caractéristiques des différentes sources d'exposition (Descamps et *al.*, 1996). Chez de nombreux invertébrés du sol intégrant plusieurs sources de contamination (sol et nourriture), l'exposition liée à la phase solide du sol contribue principalement à l'absorption des métaux par rapport à la nourriture (Crommentuijn et *al.*, 1997 ; Vijver et *al.*, 2006b).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le passage des ions métalliques à travers les membranes biologiques : diffusion passive sous forme ionique ou sous forme de complexes organométalliques lipophiles, canaux et pompes ioniques, passage facilité par des transporteurs membranaires et endocytose (Simkiss et Taylor, 1989b ; Rainbow et Dallinger, 1993).

D'une manière générale, les éléments métalliques sont absorbés passivement depuis l'épithélium tégumentaire et/ou branchial grâce au gradient de concentration qui existe entre le milieu environnant et les tissus des organismes aquatiques. Cependant, Timmermans (1993) suggère que la contribution de la voie digestive dans l'absorption des métaux est sous-évaluée chez les organismes aquatiques car peu étudiés. On considère généralement que les invertébrés terrestres absorbent la quasi-totalité des métaux par l'épithélium du tube digestif (Hopkin, 1989 ; Phillips, 1998).

1. Matériel et méthodes

Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire d'écologie, de l'université 8 mai 1945 Guelma. Sur les escargots du genre *Helix aspersa*. Ces escargots utilisés au cours des expérimentations proviennent d'une population originaire d'une région non polluée à Bouati Mahmoud de la wilaya de Guelma (Nord-Est de l'Algérie), et la situation géographique de la région de collecte des escargots est illustrée dans la figure (04)

1.1 Méthode d'échantillonnage :

Collecte des échantillons :

La collecte de l'escargot *Helix aspersa* a été effectuée au mois d'octobre 2013 dans des jardins de la commune de Bouati Mahmoud «GUELMA», de façon aléatoire. Les escargots collectés sont maintenus pendant 15 jours pour l'acclimatation aux conditions de laboratoire avant le traitement.



Figure 04 : localisation du site d'échantillonnage à «Bouati Mahmoud» [1]

1.2 Matériel biologique :

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

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

- ✓ Ce sont des mollusques gastéropodes de la sous-classe des pulmonés. Ces animaux sont dotés d'un "poumon" constitué par un épithélium vascularisé tapissant la cavité palléale dans laquelle l'air atmosphérique pénètre par un orifice appelé pneumostome (Coeurdassier, 2001).
- ✓ Les escargots du genre *Helix* appartiennent à la famille des Hélicidés qui comprend de nombreuses espèces européennes et méditerranéennes à l'exception notable de *Helix aspersa* qui a également colonisé les régions atlantiques et a été introduit hors de l'Europe.

L'espèce *Helix aspersa* présente plusieurs sous-espèces dont les principales sont *Helix aspersa aspersa*, *Helix aspersa elata* et *Helix aspersa maxima* (Bonnet et Vrillo, 1990).



Figure 05 : Escargot *Helix aspersa*. (Annegret Nicolai , 2010)

1.2.1 Anatomie d'*Helix Aspersa* :

Le corps d'un escargot consiste en un pied unique, une tête et une masse viscérale enroulée placée dans la coquille, la Figure (06) montre l'anatomie d'*Helix aspersa*.

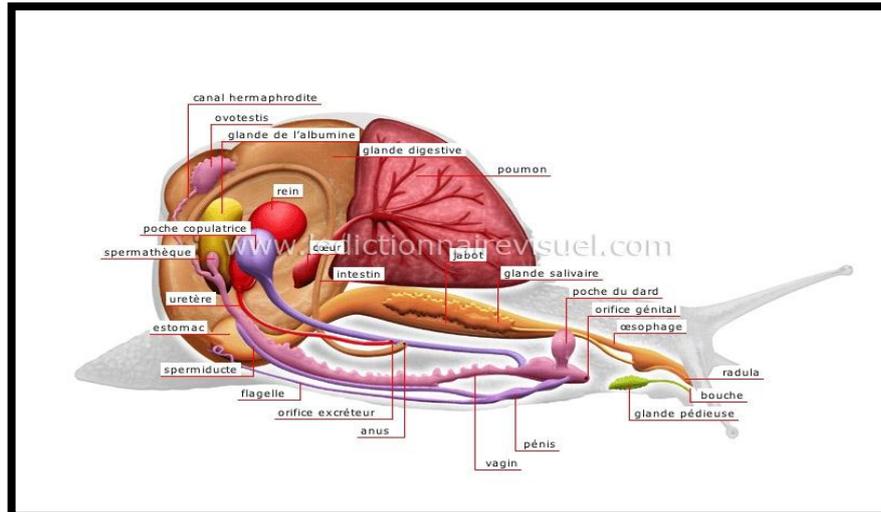


Figure 06 : Anatomie de l'escargot [2]

1.2.2 L'espèce en milieu naturel:

Cette espèce ubiquiste peut s'adapter à des biotopes, des sols et des climats variés. Elle a besoin d'abris pour son repos diurne mais semble préférer les milieux ouverts. Elle se nourrit

principalement de plantes vivantes ou mortes (Iglesias et Castillejo, 1999) aux quelles s'ajoutent des quantités plus ou moins importantes du sol (Gomot et *al.*, 1989).

1.2.3 Rythme d'activité:

L'activité des escargots petit-gris est préférentiellement nocturne. Elle se synchronise avec la photopériode naturelle et débute au coucher du soleil avec un maximum six heures après celui-ci (Chevallier, 1992).

Les trois facteurs qui influencent cette activité sont l'hygrométrie du milieu (air et sol), la température et l'intensité lumineuse, les escargots sont actifs si l'humidité relative de l'air est supérieure à 80% et si la température minimale nocturne n'est pas inférieure à 9° C (Chevallier, 1982).

1.2.4 Estivation et hibernation:

Une absence prolongée d'humidité provoque l'estivation d'*Helix aspersa* l'animal se fixe alors sur un support en fermant l'ouverture de sa coquille par un voile de mucus solidifié : l'épiphragme. Il reprend son activité lorsque les conditions environnementales sont plus favorables. Lorsque la température moyenne devient inférieure à 15° C, les escargots se mettent en hibernation en se "collant" sur un support ou en s'enfouissant dans le sol et secrètent un épiphragme d'hiver. Dans une atmosphère humide, le processus d'hibernation s'effectue en-dessous de 5° C. Le raccourcissement de la durée de jour semble avoir également une action sur la mise en hibernation (Bailey, 1981 ; Chevallier, 1982).

1.2.5 Croissance:

Quatre phases de croissance ont été définies en fonction de la taille et de la masse des animaux mais aussi de leur différenciation sexuelle (Gomot, 1997 b) :

- ✓ Phase infantile durant laquelle le tractus génital est non-différencié chez des animaux de 0,02 à 0,6 g,
- ✓ Phase juvénile relative à un tractus génital qui s'organise et à une gamétogenèse active. La masse est comprise entre 0,6 et 6,0 g.

- ✓ Phase de maturation sexuelle ou phase préadulte durant laquelle les glandes annexes femelles se développent. Elle concerne des escargots non bordés (absence d'épaississement du péristome) de plus de 6 g.
- ✓ La phase adulte à croissance nulle durant laquelle les animaux sont aptes à se reproduire. Ils sont alors bordés et pèsent entre 6 et 14g.

2. Matériel chimique

Les matériaux chimiques utilisés ce sont des nanoparticules (ZnO, Al₂O₃, Fe₂O₃), Ces molécules sont synthétisées par la méthode de Co-précipitation (Bouloudenine,2006)

3. Méthode d'exposition

3.1. Remise en activité des animaux avant les tests de toxicité :

Sept jours avant le début des expérimentations, les individus adultes en estivation sont remis en activité par pulvérisation d'eau distillée dans une boîte plastique. L'humidité est maintenue à un niveau élevé à l'aide d'une éponge mouillée. Une boîte de Pétri contenant de la nourriture (farine de blé) est placée au fond de la boîte en plastique (Coourdassier, 2001).

3. 2. Conditions expérimentales :

Tous les essais sur *Helix aspersa*, adultes, sont réalisés dans les mêmes conditions environnementales que celles décrites pour l'élevage :

- Photopériodes 18 h de lumière / 24 h, Eclairage assuré par des tubes néon de type "lumière du jour"
- Température $20 \pm 2^\circ \text{C}$,
- Hygrométrie : 80 % à 95 %.

Les escargots sont réparties dans des boîtes de plastique transparentes (23,5 X 16,5 X 10,5 cm) avec couvercle perforé, et chaque boîte contient une éponge mouillée pour maintenir l'humidité, l'alimentation est fournie dans des boîtes de pétrie. Les boîtes sont nettoyées régulièrement tous les 3 jours (Gomot, 1997 ; Coourdassier, 2001).

3.3. Exposition d'*Helix aspersa* à la nourriture :

La "farine de blé" est utilisée dans toutes les expériences d'intoxication des escargots par la nourriture. La contamination est réalisée le jour précédant la mise en route des expérimentations les nanoparticules de (ZnO, Al₂O₃, Fe₂O₃) sont ajoutées à la farine sous forme d'une fine poudre. Dans tous les cas, la nourriture est ensuite homogénéisée manuellement. La nourriture ainsi contaminée est conditionnée dans des boîtes en plastique ou dans des bêchers en verre puis conservée à l'obscurité (Coeurdassier, 2001).

3.4 Dispositifs expérimentaux et durée d'exposition :

Nous avons retenu 4 concentrations des Nps (ZnO Al₂O₃, Fe₂O₃) : 100 ; 500 ; 1000 ; 5000 µg/g d'alimentation et un milieu témoin, les escargots sont répartis en 5 , 12 escargots/ pour chaque traitement; ils sont individualisés en fonction de la matrice d'exposition à tester (on a retenu un traitement de quatre semaines pour chaque molécule (EL-Gendy et *al.*, 2011).

✓ Dans tous les cas, la nourriture apportée est renouvelée, qu'elle soit contaminée ou non, tous les (03) jours au moment du nettoyage des boites d'élevage. Ce nettoyage est fait, autant que possible, à heure fixe. Il comprend un lavage des couvercles et des parois des boites à l'eau distillée, un changement de l'éponge absorbante au fond de la boîte ou un ramassage des fèces des escargots déposés sur le substrat. Ensuite, l'ensemble des récipients d'essai est humidifié à l'eau distillée (Coeurdassier et *al.* , 2001).



Figure 07: Exposition d'*Helix aspersa* à la nourriture au laboratoire.

3.5 Dissection et prélèvement des organes :

Après la période du traitement, les escargots sont mis à jeûn pendant 48 heures afin que le contenu de leur tube digestif soit vide. Ceci évite d'éventuelles interférences entre les contaminants présents dans l'aliment ingéré et les quantités de contaminants réellement accumulées dans les tissus. Les boîtes où ils jeûnent sont lavées à l'eau des récipients changée après 24 heures pour éviter la réingestion des fèces (Coeurdassier, 2001).

Les animaux sont ensuite sacrifiés par congélation à -20°C puis disséqués, les coquilles sont enlevées, le rein, la glande digestive, le poumon et le pied ont été excisés, lavés avec l'eau physiologique (Coeurdassier, 2001).

4. Recherche des biomarqueurs physiologiques :

4.1 Mortalité :

Le contrôle de la vitalité des individus d'*Hélix aspersa* au cours des essais au laboratoire est effectué au moment des renouvellements de nourriture trois fois par semaine du test. Dans tous les cas, les individus morts sont évacués des enceintes d'essai.

La mort d'un individu est généralement facile à déterminer : le pied flasque et jaunâtre est le plus souvent sorti de la coquille, la sole pédieuse n'adhère à aucune surface. Le corps luisant et très visqueux indique que la liquéfaction des tissus est en cours. L'odeur nauséabonde que dégage l'escargot est également un indicateur. En cas de doute, le pied est stimulé à l'aide d'une aiguille ou d'une paire de pinces brucelles, l'absence de réaction permet de conclure à la mort de l'individu. (Coeurdassier, 2001).

4.2 .Croissance :

La croissance des animaux exposés aux différentes concentrations de contaminants est suivie à partir d'un ou plusieurs critères morphologiques. Les mesures réalisées sont individuelles mais sont généralement utilisées pour déterminer un coefficient de croissance moyen à l'ensemble des n individus placés dans un même récipient d'essai (lot). Les résultats finaux sont exprimés en terme de coefficient de croissance afin de prendre en compte uniquement l'accroissement corporel des individus pendant la durée du test (Coeurdassier, 2001).

$$Y_t = [(w_t - w_0) / w_0] \times 100$$

Avec : Y_t = coefficient de croissance moyen des escargots exposés à C $\mu\text{g.g}^{-1}$ d'une substance (x).

W_0 = moyenne de la masses fraîches totales ou masses sèches des tissus mous des escargots d'un même lot exposés à C $\mu\text{g.g}^{-1}$ d'une substance (x) au début du test.

W_t = moyenne de la masses fraîches totales ou masses sèches des tissus moux des escargots du même lot après (t) jours d'exposition (Coourdassier, 2001).

Trois critères peuvent être utilisés pour évaluer la croissance des individus :

- La **masse fraîche de l'escargot** (tissus moux + coquille) est mesurée à l'aide d'une balance de précision (10^{-1} g). Ce critère est recommandé pour évaluer de façon hebdomadaire les effets de ZnO, Al_2O_3 , Fe_2O_3 sur les escargots *Helix aspersa*, les pesées sont toujours réalisées avant le nettoyage de l'enceinte d'essai (Gomot, 1997a).

- Le **diamètre de la coquille** est mesuré avec un pied à coulisse (avec une précision de 10^{-1} mm), la mesure doit se faire délicatement pour éviter d'endommager le bord des coquilles des escargots, très fragile chez les animaux en croissance, Comme la masse fraîche, les mesures du diamètre de la coquille permettent d'évaluer la croissance des animaux à tout moment. Ce paramètre permet de suivre la croissance des individus depuis le stade infantile jusqu'au stade adulte (Chevallier, 1992).

-Le poids frais de la coquille, des tissus moux et le poids frais des organes (glande digestive, rein, le pied et le poumon) peut être seulement effectué après le sacrifice des animaux à la fin de chaque période de traitement à l'aide d'une balance de précision (Coourdassier, 2001).

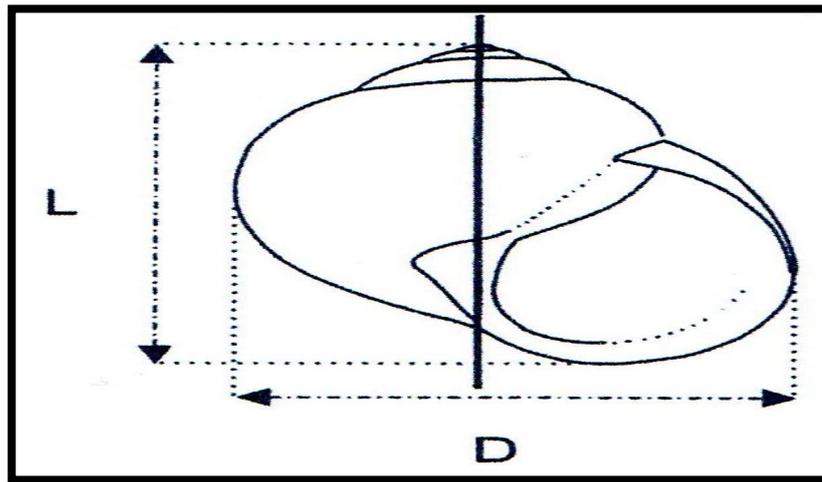


Figure 08 : Mesure des deux diamètres D et L d'*Helix aspersa* (Coeurdassier, 2001).

4.3. La consommation alimentaire et les déchets :

Les déchets et la farine consommés séchés à l'étuve à 37°C pendant 2h sont pesés à l'aide d'une balance de précision. Les pesées sont toujours réalisées avant le nettoyage de l'enceinte d'essai (El Gendy et *al.*, 2011).

4.4. Effets comportementaux :

Au cours de ces travaux, nous avons également cherché à caractériser les effets des contaminants sur les comportements plus ou moins perturbés d'*Helix aspersa*. Lorsqu'il est inactif, nous avons observé qu'*Helix aspersa* a tendance à se réfugier sur des supports situés à quelques cm du sol (ou de l'alimentation) (Chevallier, 1992).

A partir de ces observations, 4 comportements sont définis en fonction de l'activité des animaux et de leur position spatiale dans l'enceinte d'essai (Coeurdassier, 2001) :

- 1- Actif en position haute (CA)
- 2- Inactif en position haute (CpA)
- 3- Actif sur le substrat (SA)
- 4- Inactif sur le substrat (SpA).

Ces comportements sont "échantillonnés" individuellement, à heure fixe, les jours de changement de nourriture soit 3 séries d'observations par semaine. La lumière du local de test

s'allume à 6 heures (matin) et les observations s'étalent entre 9h30 et 10h30. L'ordre des observations pour les différents lots est choisi au hasard. Si la position dans les enceintes peut être facilement relevée, l'activité des animaux est notée de la façon suivante. La boîte est ouverte et le couvercle retourné est posé sur la paillasse. Après une minute, les escargots en mouvement sont considérés comme actifs, ceux qui restent immobiles sont inactifs. Cette méthode est retenue plutôt qu'une observation directe sans ouverture de la boîte (pourtant possible en raison des enceintes transparentes) car les escargots ont une activité plutôt nocturne si bien qu'au moment des observations, la quasi-totalité des escargots sont "inactifs". L'activité ainsi observée représente donc plutôt un état de réceptivité et une capacité à réagir à une stimulation mécanique (déplacement et ouverture de la boîte). Les résultats sont exprimés en % d'observations hebdomadaires de chaque comportement à une concentration donnée par rapport au nombre total d'observations hebdomadaires à la même concentration (Coeurdassier, 2001).

5. Analyse statistique des résultats :

L'analyse statistique des données est effectuée par le test de Student qui sert à comparer entre deux échantillons indépendants (Témoin et traité), Ce test est réalisé à l'aide d'un logiciel d'analyse des données: Minitab (Version 16) (Dagnelie , 1999)

6. Etude Histologique :

Trois escargots par traitement sont retenus pour l'étude histologique, les escargots sont directement disséqués, les coquilles sont enlevées délicatement, la glande digestive, le rein, le pied et le poumon sont excisés.

Les fragments d'organes vont entrer dans un circuit de conditionnement nécessaire pour l'examen au microscope. Ils sont tout d'abord plongés dans un liquide (formol) qui conservera les cellules sans les altérer. On évite ainsi qu'elles soient desséchées. Au bout d'un délai qui va d'une à quarante huit heures, selon la taille de l'organe, les petits échantillons de tissus sont disposés dans des cassettes en plastique pour être protégés et identifiés par un numéro. Ces cassettes sont placées dans un appareil appelé « automate à inclusion » permettant la préparation chimique des fragments avant qu'ils soient enrobés dans un bloc de paraffine durcie et coupés en fines lamelles de 5 microns, à l'aide d'un appareil qu'on appelle le « microtome ». Ces fines lamelles sont déposées sur des plaquettes de verre (lames) déposés

sur une plaque chauffante dont le but d'enlever les plis, puis ils sont déposés dans l'étuve à 140°C pour enlever le reste de la paraffine pour l'obtention d'un tissu. Ensuite ils sont colorés à l'hémalin (pour colorer le noyau) et l'éosine (pour colorer le cytoplasme) qui permet une coloration différentielle. Les pièces sont montées à l'aide du baume de Canada. Les observations des coupes sont effectuées avec un photo-microscope LEICA DM 1000 (Gx40) (Martoja et Martoja, 1967).

1. Résultat

1.1 Effets des nanoparticules (ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃) sur les biomarqueurs physiologique

1.1.1 Effet des nanoparticules sur l'évolution du poids moyen des escargots :

Les Figures (09) (10) (11) mettent en évidence respectivement l'évolution du poids moyen des escargots en fonction du temps en présence du (ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃).

Nous remarquons qu'en présence du ZnO, le poids des escargots tend à diminuer d'une manière dose-dépendante avec le temps, cette diminution est significative pour ceux traités par les concentrations (1000,5000µg/g) à la 1^{ère} semaine et la concentration 100µg/g à la 4^{ème} semaine et une différence hautement significative pour ceux traités par les concentration 5000µg/g à la 2^{ème} semaine ainsi qu'une différence très hautement significative pour ceux traités par les concentrations 5000µg/g à la 3^{ème} semaine et à la 4^{ème} semaine.

Nous constatons qu'en présence d'Al₂O₃, le poids moyen des escargots tend à diminuer d'une manière dose-dépendante en fonction du temps et hautement significative pour ceux traités par la concentration 5000µg/g à la 1^{ère} semaine et à la 2^{ème} semaine et 100µg/g à la 4^{ème} semaine ainsi qu'une diminution très hautement significative pour ceux traités par la concentration 5000µg/g à la 3^{ème} et à la 4^{ème} semaine et ceux toujours par rapport aux témoins.

Nous constatons qu'en présence de Fe₂O₃, le poids tend à diminuer d'une manière dose-dépendantes et en fonction du temps .Cette diminution est non significative pour ceux traité par rapport aux témoins.

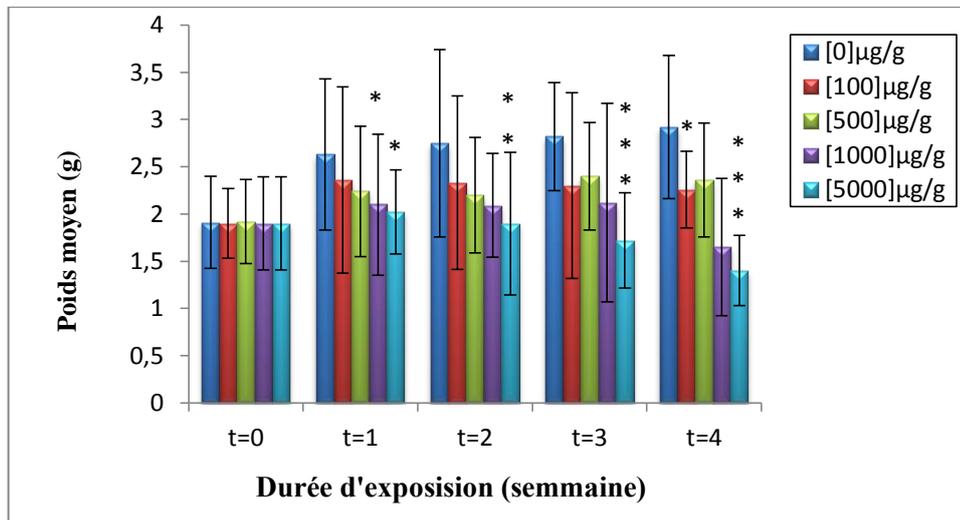


Figure 09 : Effet du ZnO sur l'évolution du poids moyen des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

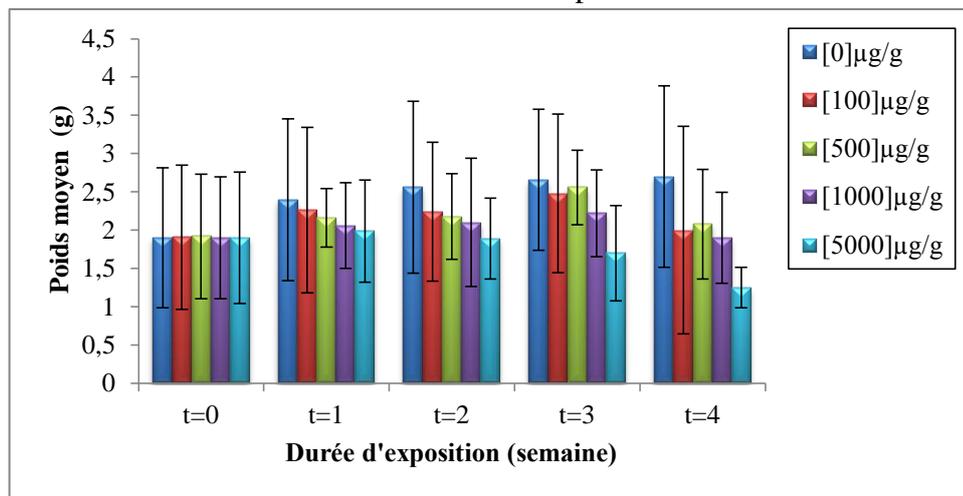


Figure 10 : Effet du Fe₂O₃ sur l'évolution du poids moyen des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

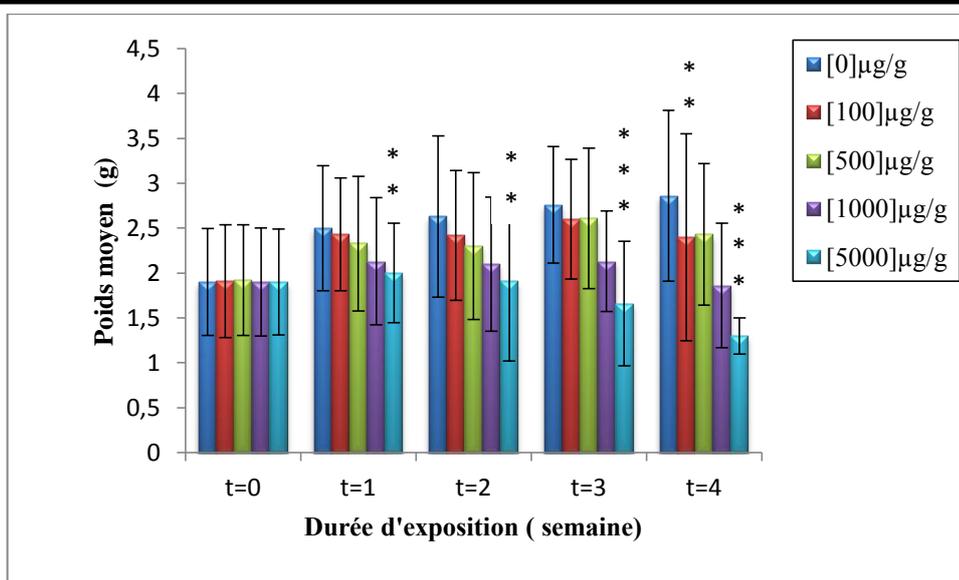


Figure11: Effet d' Al_2O_3 sur l'évolution du poids moyen des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

1.1.2. Effet dose-réponse des Nps sur la croissance des escargots :

Les concentrations estimés des Nps qui inhibent la croissance des escargot de 50% (EC50) ,de 75% (EC75), de 90% (EC 90) et 100% (EC100) au cour des quatres semaines de taitement sont représenté dans les tableau (01) (02) (03)et les figures (12) (13) (14).

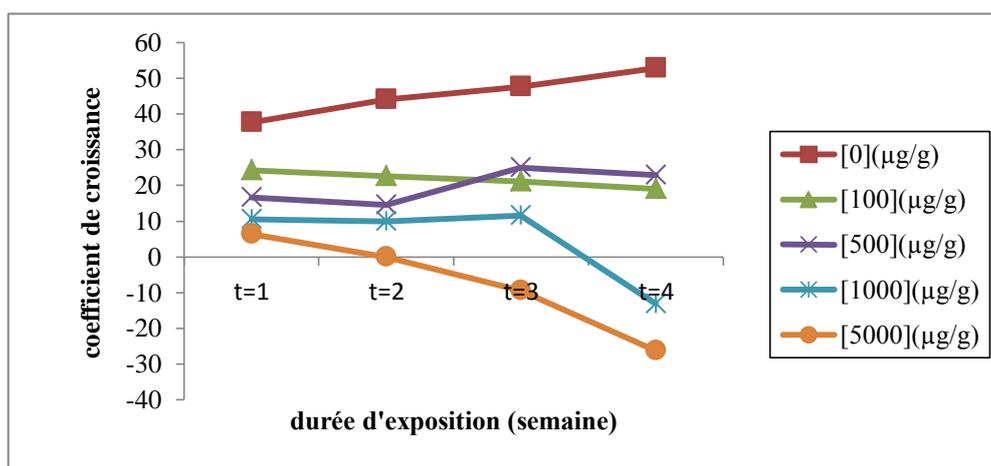


Figure 12 : Coefficient de croissance de *Helix aspersa* en fonction du temps (ZnO).

Tableau 01 : Concentration estimées de ZnO qui inhibent la croissance des escargot de 50% (CE50), de 75% (CE75), de 90% (CE90), de 100% (CE100) au cours des quatre semaines de l'expérience.

Temps	Concentration de ZnO ($\mu\text{g/g}$)
Semaine 1	LOEC= 500 $\mu\text{g/g}$; NOEC= 1000 $\mu\text{g/g}$ l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante : $Y = 24,5763 - 0,004 * X ; (r^2 = 0,50)$ EC50 = 1375,94 $\mu\text{g/g}$; EC75 = 3638,04 $\mu\text{g/g}$ EC90 = 4995,30 $\mu\text{g/g}$; EC100 = 5900,15 $\mu\text{g/g}$
Semaine 2	LOEC= 500 $\mu\text{g/g}$; NOEC= 1000 $\mu\text{g/g}$ l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante : $Y = 25,8187 - 0,005 * X ; (r^2 = 0,53)$ EC50 = 667,37 $\mu\text{g/g}$; EC75 = 2580,94 $\mu\text{g/g}$ EC90 = 3729,08 $\mu\text{g/g}$; EC100 = 4494,51 $\mu\text{g/g}$
Semaine 3	LOEC= 500 $\mu\text{g/g}$; NOEC= 1000 $\mu\text{g/g}$ l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante : $Y = 30,2621 - 0,008 * X ; (r^2 = 0,72)$ EC50 = 765,80 $\mu\text{g/g}$; EC75 = 2181,60 $\mu\text{g/g}$ EC90 = 3031,08 $\mu\text{g/g}$; EC100 = 3597,39 $\mu\text{g/g}$
Semaine 4	LOEC= 500 $\mu\text{g/g}$; NOEC= 1000 $\mu\text{g/g}$ l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante : $Y = 33,0594 - 0,007 * X ; (r^2 = 0,60)$ EC50 = 993,33 $\mu\text{g/g}$; EC75 = 2975,28 $\mu\text{g/g}$ EC90 = 4164,46 $\mu\text{g/g}$; EC100 = 4957,24 $\mu\text{g/g}$

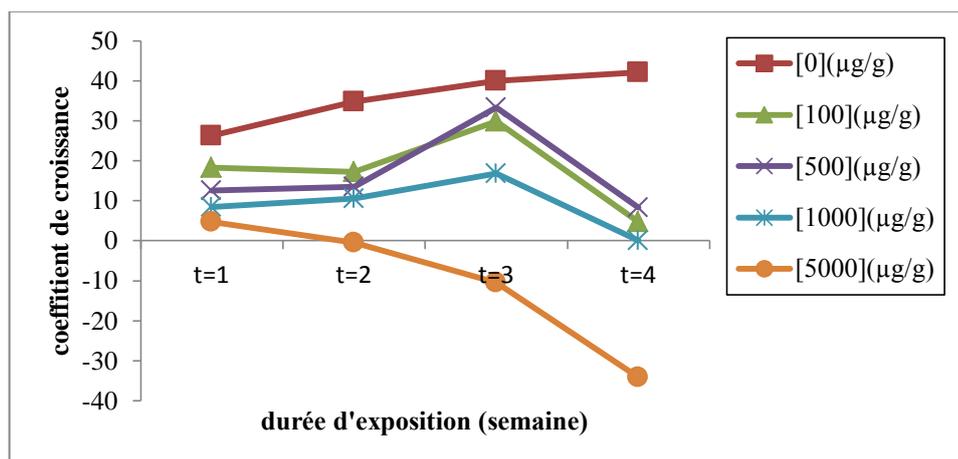


Figure 13 : Coefficient de croissance de *Helix aspersa* en fonction du temps (Fe_2O_3).

Tableau 02 : Concentration estimées de Fe_2O_3 qui inhibent la croissance des escargot de 50% (CE50), de 75% (CE75), de 90% (CE90), de 100% (CE100) au cours des quatre semaines de l'expérience.

Temps	Concentration de Fe_2O_3 ($\mu g/g$)
Semaine 1	NOEC= 500 $\mu g/g$; LOEC= 1000 $\mu g/g$ l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante : $Y = 18,0140 - 0,002 * X ; (r^2 = 0,54)$ EC50 = 1620,48 $\mu g/g$; EC75 = 3814,08 $\mu g/g$ EC90 = 5130,24 $\mu g/g$; EC100 = 6007,68 $\mu g/g$
Semaine 2	NOEC= 500 $\mu g/g$; LOEC= 1000 $\mu g/g$ l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante : $Y = 21,3736 - 0,004 * X ; (r^2 = 0,60)$ EC50 = 844,51 $\mu g/g$; EC75 = 2673,66 $\mu g/g$

	EC90 = 3771,15 µg/g ; EC100 = 4502,81 µg/g
Semaine 3	<p>NOEC= 500µg/g ; LOEC= 1000 µg/g</p> <p>l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante :</p> $Y = 33,9815 - 0,009 * X ; (r^2 = 0,92)$ <p>EC50 = 1527,33 µg/g ; EC75 = 2619,73 µg/g</p> <p>EC90 = 3275,16 µg/g ; EC100 = 3712,12 µg/g</p>
Semaine 4	<p>NOEC= 500µg/g ; LOEC= 1000 µg/g</p> <p>l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante :</p> $Y = 18,7822 - 0,011 * X ; (r^2 = 0,73)$ <p>EC50 = - 205,08 µg/g ; EC75 = 746,73 µg/g</p> <p>EC90 = 1317,82 µg/g ; EC100 = 1698,55 µg/g</p>

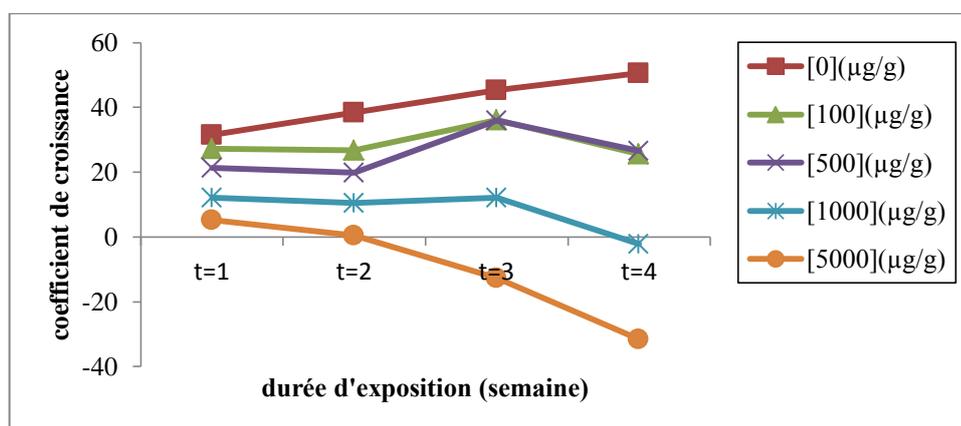


Figure 14 : Coefficient de croissance de *Helix aspersa* en fonction en fonction du temps (Al_2O_3).

Tableau 03 : Concentration estimées d'Al₂O₃ qui inhibent la croissance des escargot de 50% (CE50), de 75% (CE75), de 90% (CE90), de 100% (CE100) au cours des quatre semaines de l'expérience.

Temps	Concentration d'Al ₂ O ₃ (µg/g)
Semaine 1	<p>LOEC= 500µg/g ; NOEC= 1000 µg/g</p> <p>l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante :</p> <p>$Y = 25,2848 - 0,004 * X ; (r^2 = 0.72)$</p> <p>EC50 = 2167,70 µg/g ; EC75 = 3968,64 µg/g</p> <p>EC90 = 5049,20 µg/g ; EC100 = 5769,57 µg/g</p>
Semaine 2	<p>LOEC= 500µg/g ; NOEC= 1000 µg/g</p> <p>l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante :</p> <p>$Y = 26,7851 - 0,006 * X ; (r^2 = 0.68)$</p> <p>EC50 = 1316,52 µg/g ; EC75 = 2985,83 µg/g</p> <p>EC90 = 3987,42 µg/g ; EC100 = 4655,14 µg/g</p>
Semaine 3	<p>LOEC= 500µg/g ; NOEC= 1000 µg/g</p> <p>l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante :</p> <p>$Y = 37,1685 - 0.010 * X ; (r^2 = 0.86)$</p> <p>EC50 = 1389,38 µg/g ; EC75 = 2470,71 µg/g</p> <p>EC90 = 3119,50 µg/g ; EC100 = 3552,03 µg/g</p>

Semaine 4	<p>LOEC= 500µg/g ; NOEC= 1000 µg/g</p> <p>l'inhibition de la croissance suivant l'équation de régression suivante :</p> <p>$Y = 31,5091 - 0,013 * X; (r^2 = 0.80)$</p> <p>EC50 = 466,11 µg/g ; EC75 = 1408,16 µg/g</p> <p>EC90 = 1973,40 µg/g ; EC100 = 2350,21 µg/g</p>
-----------	---

1.1.3 Effet des Nps sur le poids de coquille :

La figure (15) illustre les variations du poids moyen de la coquille en présence des Nps métalliques (ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃). On remarque que le poids de la coquille tend à diminuer d'une manière dose-dépendante et non significative chez les escargots traités par le ZnO, et une différence significative par la plus forte concentration 5000µg/g chez les traités par Al₂O₃, cette diminution est hautement significative pour ceux traités par la concentration (500,1000 et 5000µg/g) pour ceux traités par Fe₂O₃.

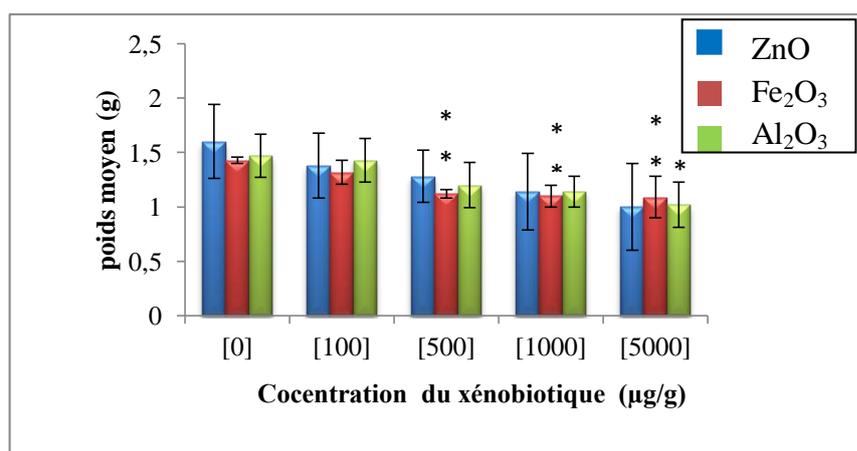


Figure 15 : Evolution du poids moyen de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissantes en (ZnO ; Fe₂O₃ ; Al₂O₃).

1.1.4 Effet des Nps sur l'évolution des diamètres (D, L) de la coquille des escargots :

Les figures (16) (17), (18) (19), (20) (21), illustrent respectivement l'évolution des diamètres D et L des escargots traité respectivement par les Nps de ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃.

Nous constatons qu'en présence des différentes concentrations du ZnO les deux diamètres de la coquille évoluent d'une manière non significative chez les escargots traités par les différentes concentrations.

Nous constatons en présence des différentes concentrations du Fe₂O₃, le diamètre (D) tend à diminuer d'une manière dose-dépendantes et significativement pour ceux traité par la concentration (5000µg/g) à la 3^{ème} semaine et la 4^{ème} semaine de traitement.

Le diamètre (L) tend à diminuer d'une manière dose-dépendantes et significative pour ce traité par la concentration 5000µg/g à la 1^{ère} semaine et hautement significative pour ce traité par les concentrations 5000µg/g à la 2^{ème}, la 3^{ème} et à la 4^{ème} semaine et ceux toujours par rapport aux témoins.

Concernant l'Al₂O₃, le diamètre (D) tend à diminuer d'une manière dose-dépendant et hautement significative pour ceux traites par la concentration 5000µg/g à la 2^{ème}, 3^{ème} et à la 4^{ème} semaine.

Le diamètre (L) tend à diminuer d'une manière significative pour ceux traites par la Concentration 5000µg/g à la 2^{ème} semaine et hautement significative pour ceux traité par la même concentration respectivement à la 3^{ème} semaine et à la 4^{ème} semaine et hautement significative pour ceux traité par les concentrations (1000 et 5000µg/g).

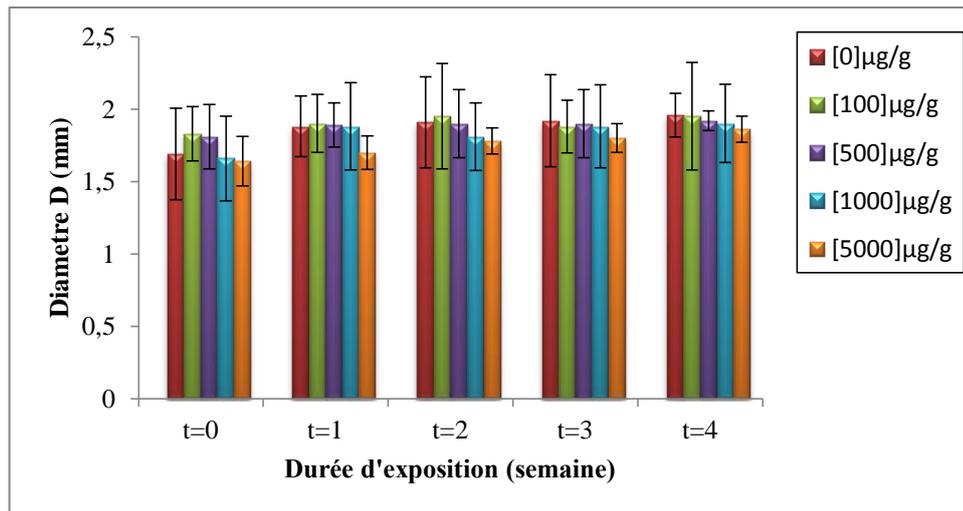


Figure 16 : Effet du ZnO sur l'évolution du diamètre moyen « D » de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

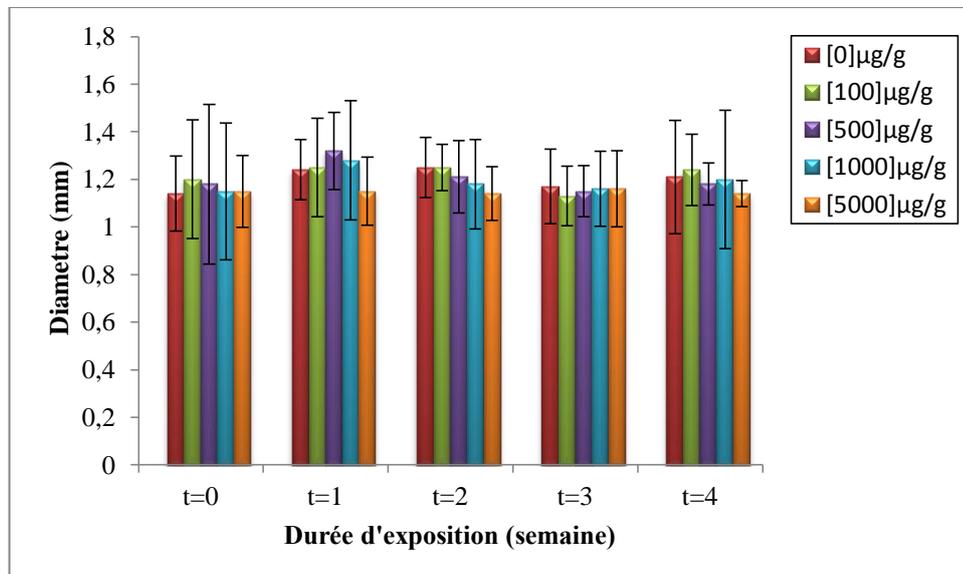


Figure 17 : Effet du ZnO sur l'évolution du diamètre moyen « L » de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

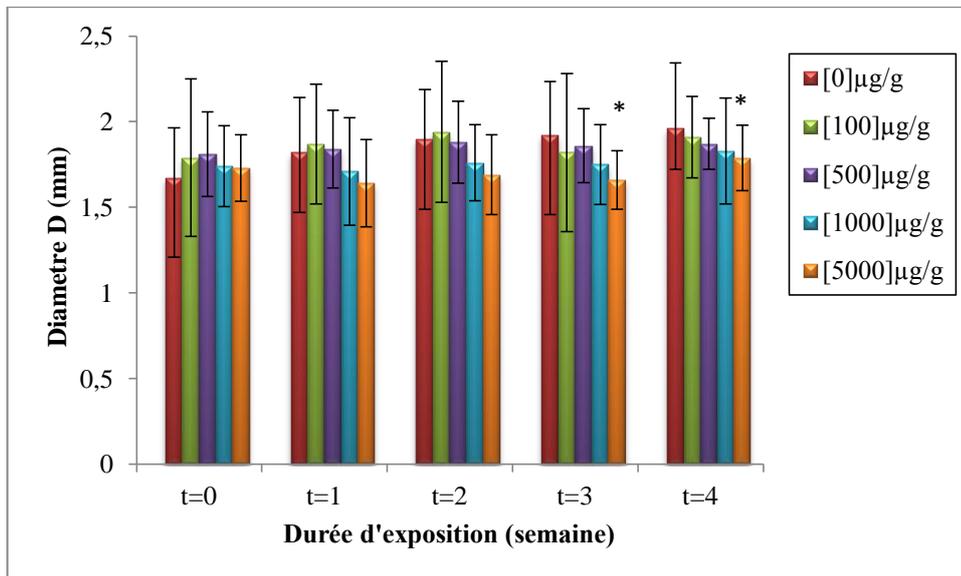


Figure 18 : Effet du Fe_2O_3 sur l'évolution du diamètre moyen « D » de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

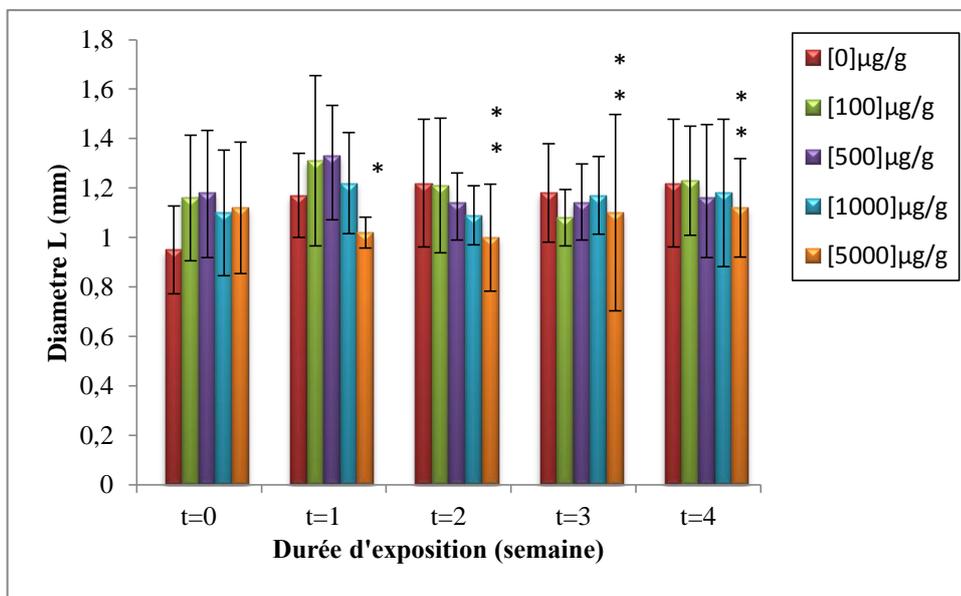


Figure 19 : Effet du Fe_2O_3 sur l'évolution du diamètre moyen « L » de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

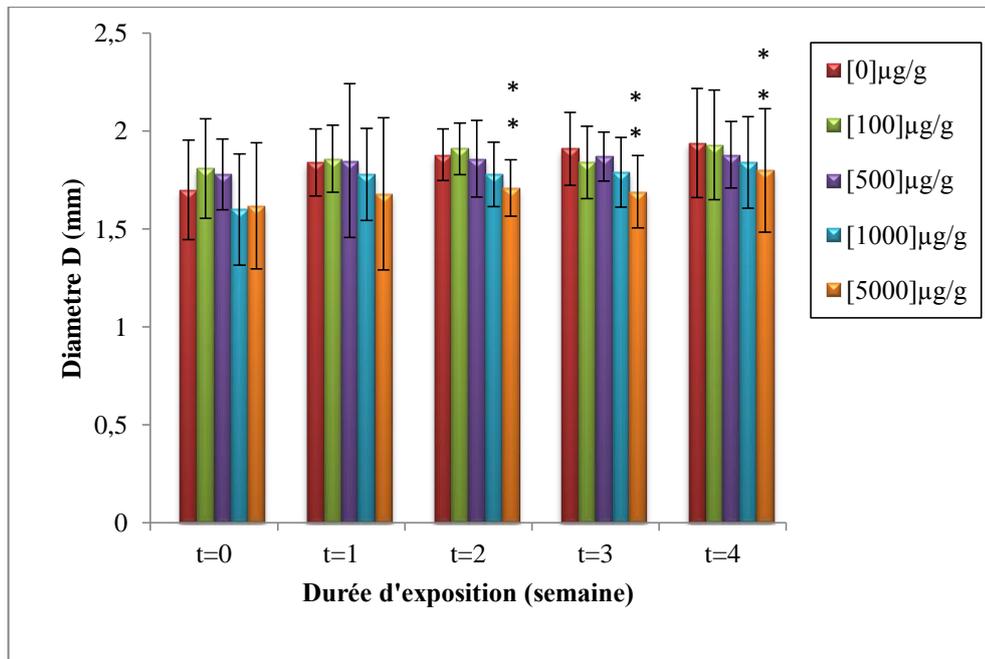


Figure 20 : Effet du Al_2O_3 sur l'évolution du diamètre moyen « D » de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

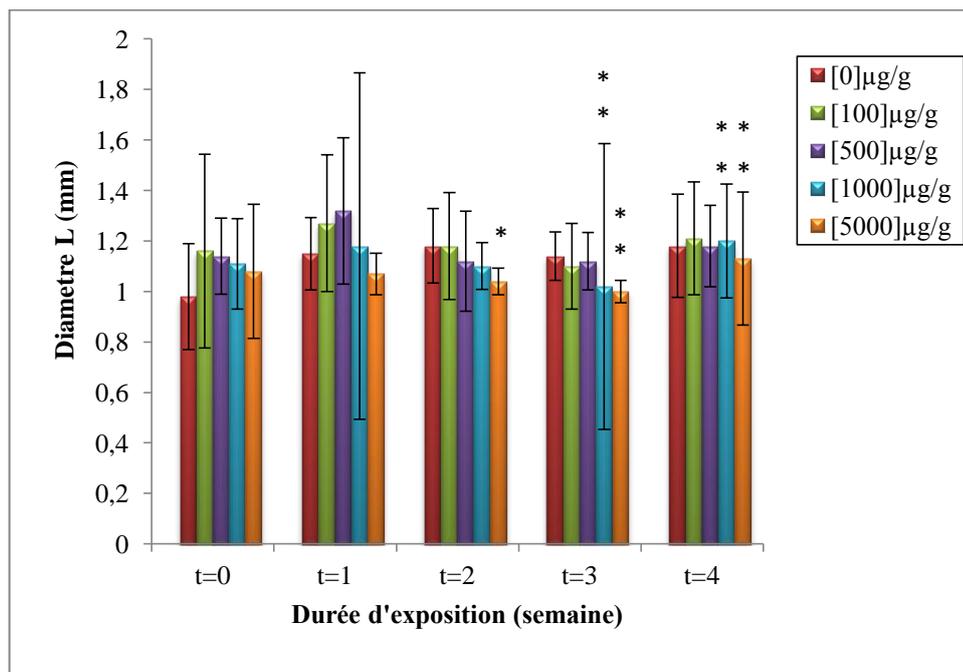


Figure 21 : Effet d' Al_2O_3 sur l'évolution du diamètre moyen « L » de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

1.1.5 Effet des nanoparticules sur le poids des tissus mous :

la figure (22) illustre les variations du poids du tissu mou en présence de (ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃). Nous constatons une diminution dose-dépendante du poids des tissus mous pour toutes les molécules testées.

Cette diminution est hautement significative pour ceux traités par les concentrations (500 ; 1000 µg/g) et très hautement significative pour ceux traités par les concentrations 5000 µg/g en présence du ZnO et non significative pour ceux traités par les différentes concentrations en présence du Fe₂O₃ et d'Al₂O₃.

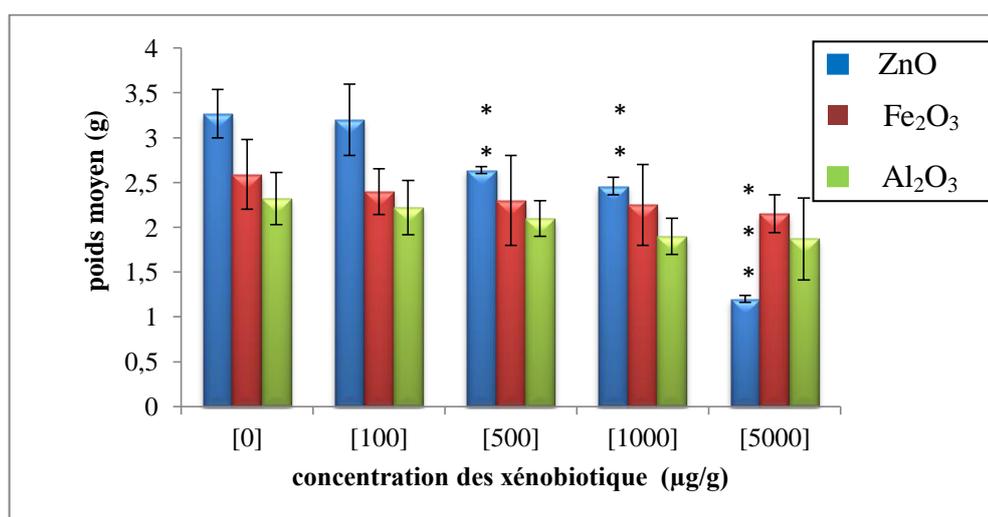


Figure 22 : Evolution du poids moyen des tissus mous des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissantes en (ZnO ; Fe₂O₃ ; Al₂O₃)

1.1.6 Effet des nanoparticules sur le poids des organes (poumon, hépatopancréas, pied et rein):

Les figures (23), (24) et (25) illustrent respectivement les variations du poids moyen des poumons, de l'hépatopancréas, du rein et du pied en présence des nanoparticules métalliques (ZnO, Fe₂O₃ et Al₂O₃).

Nous constatons que le poids des poumons tend à diminuer d'une manière dose-dépendante et non significative pour ceux traités par les concentrations (500, 1000 et 5000 µg/g) des Nps métalliques.

Nous constatons aussi que le poids de l'hépatopancréas tend à diminuer d'une manière dose-dépendante pour ceux traités par les concentrations (500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$), cette diminution est hautement significative pour ceux traités par les concentrations (500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) en présence du ZnO, non significative pour ceux traités par les concentrations (500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) en présence du Fe₂O₃ et très hautement significative pour ceux traités par la concentration 5000 $\mu\text{g/g}$ en présence d'Al₂O₃.

Nous constatons aussi que le poids du rein tend à diminuer d'une manière dose dépendante pour ceux traités par les concentrations (500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) en présence de toutes les molécules testées. Cette diminution est hautement significative pour ceux traités par la concentration 5000 $\mu\text{g/g}$ en présence d'oxyde Zinc, non significative pour ceux traités par les concentrations (500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) en présence de l'oxyde de Fer et significative pour ceux traités par la concentration 1000 $\mu\text{g/g}$, hautement significative pour ceux traités par la concentration 500 $\mu\text{g/g}$ et très hautement significative pour ceux traités par la concentration 5000 $\mu\text{g/g}$. en présence d' Al₂O₃.

Nous constatons aussi que le poids du pied tend à diminuer d'une manière dose dépendante et non significative pour ceux traités par les concentrations (500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) en présence des Nps testées (ZnO, Fe₂O₃ et Al₂O₃).

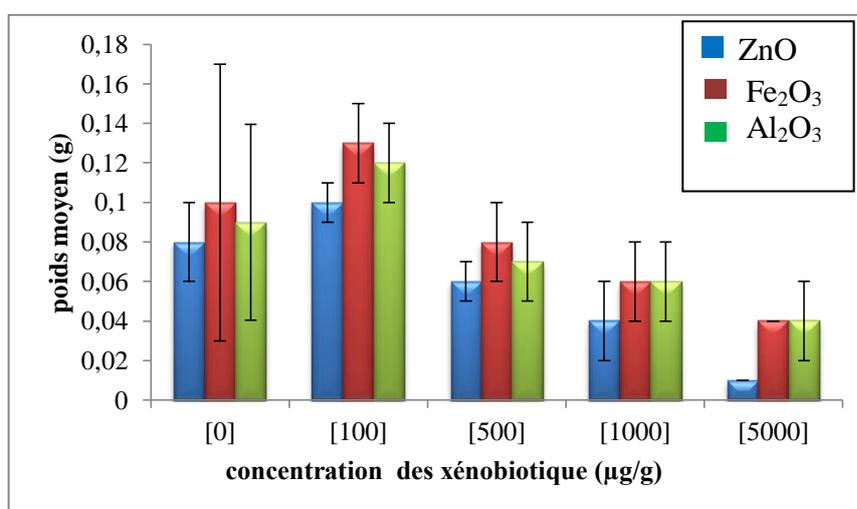


Figure 23 : Evolution du poids moyen des poumons des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissantes en (ZnO ;Fe₂O₃ ;Al₂O₃).

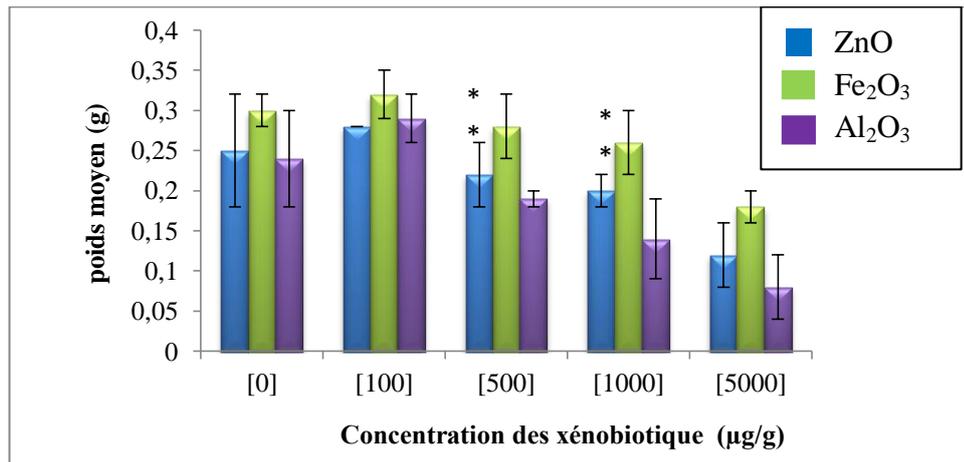


Figure 24 : Evolution du poids moyen d'hépatopancréas des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissantes en (ZnO ;Fe₂O₃ ;Al₂O₃).

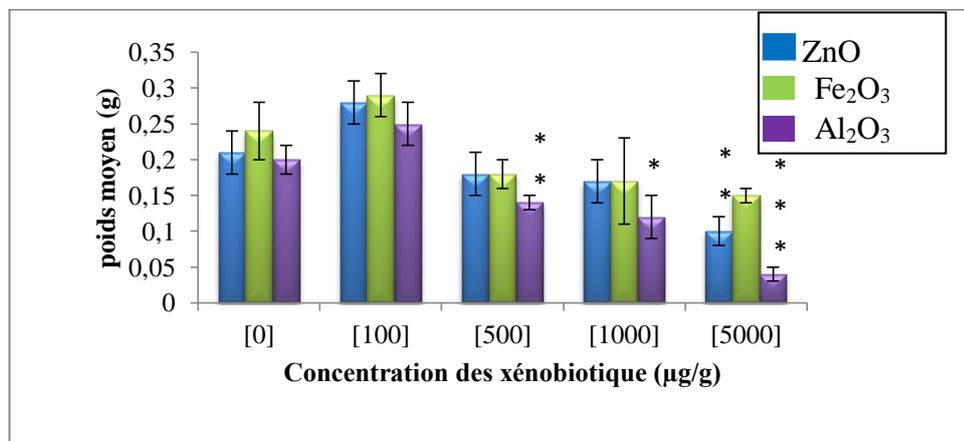


Figure 25 : Evolution du poids moyen des reins des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissantes en (ZnO ;Fe₂O₃ ;Al₂O₃).

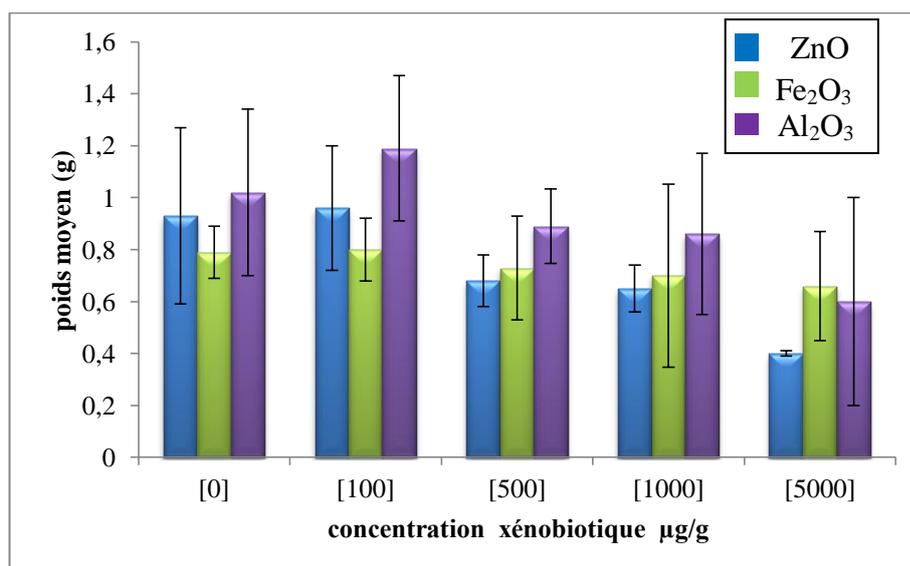


Figure 26 : Evolution du poids moyen des pieds des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissante en (ZnO ;Fe₂O₃ ;Al₂O₃).

1.1.7. Effets des nanoparticules sur la consommation alimentaire:

Les figures (27) (28) et (29) illustrent respectivement les variations du poids moyen de la consommation alimentaire des escargots traités par le ZnO, Fe₂O₃ et Al₂O₃ en fonction du temps.

Nous constatons qu'en présence des Nps, le poids moyen de la consommation alimentaire tend à diminuer d'une manière dose dépendante dès la 1^{ère} semaine. Cette diminution est très hautement significative pour ceux traités par la plus forte concentration en présence des Nps testées pendant les quatre semaines.

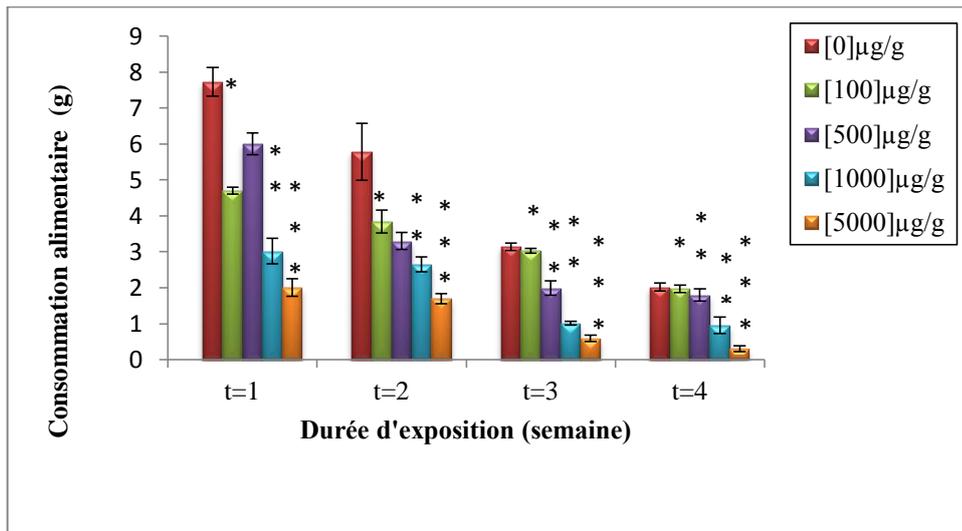


Figure 27 : Effet du ZnO sur la consommation alimentaire des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

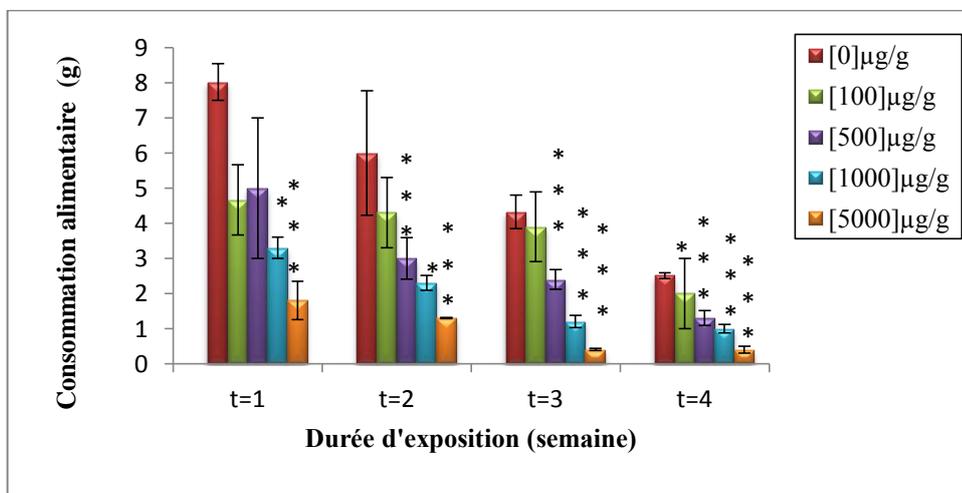


Figure 28 : Effet du Fe₂O₃ sur la consommation alimentaire des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

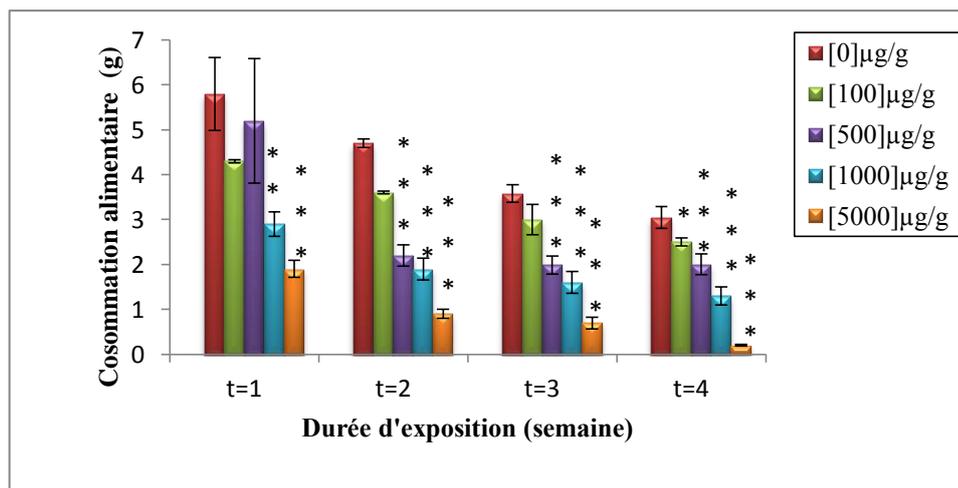


Figure 29 : Effet du Al_2O_3 sur la consommation alimentaire des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

1.1.8 Effets des nanoparticules sur le poids des déchets sec:

Les figures (30) (31) et (32) illustrent respectivement le poids sec des déchets sec des escargots en fonction du temps.

Nous constatons une diminution dose dépendante dose- dépendante du poids sec des déchets des la 1^{ère} concentration en présence des nanoparticules métalliques (ZnO , Fe_2O_3 et Al_2O_3). Cette diminution est très hautement significative pour ceux traités par la concentration 5000 μg/g après la 4^{ème} semaine de traitement par l'oxyde de zinc et l'oxyde de fer et hautement significative pour ceux traités par la même concentration après la 4^{ème} semaine de traitement par l' Al_2O_3 .

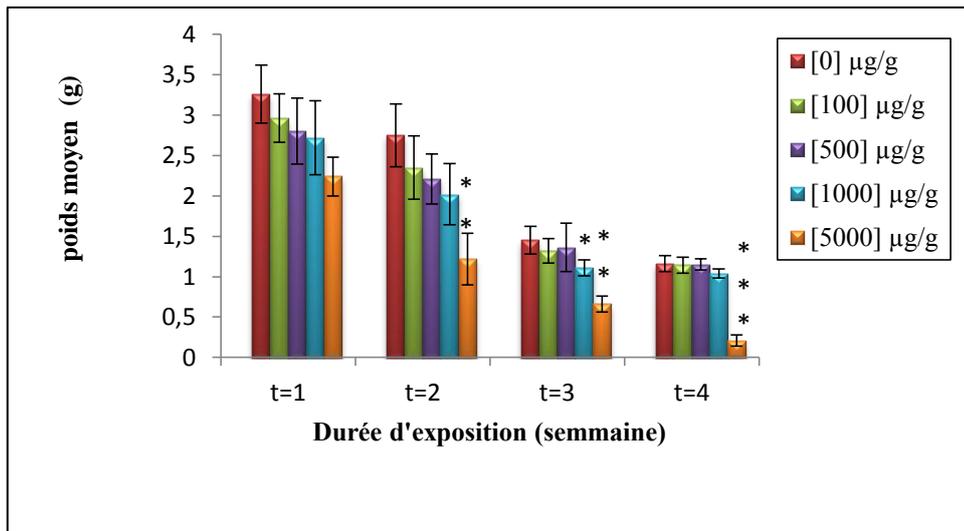


Figure 30 : Effet du ZnO sur le poids moyen des déchets sec en fonction du temps.

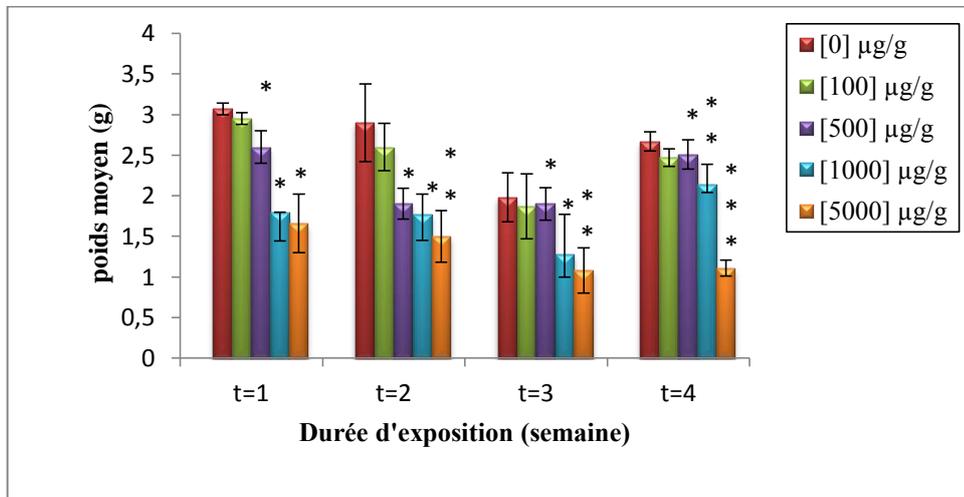


Figure 31 : Effet du Fe₂O₃ sur le poids moyen des déchets sec en fonction du temps.

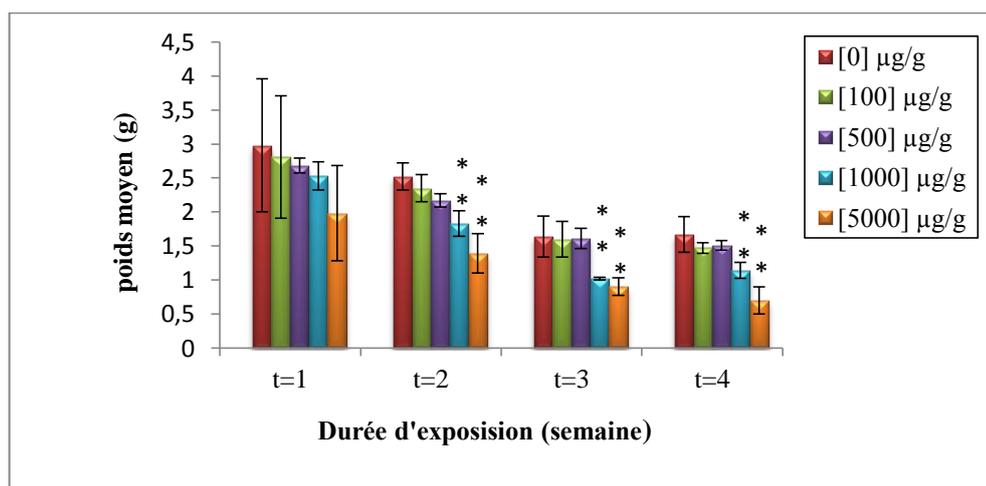


Figure 32: Effet d' Al₂O₃ sur le poids moyen des déchets sec en fonction du temps.

1.1.9 Effet des nanoparticules sur le comportement:

Les résultats relatifs aux proportions hebdomadaires de chaque comportement aux différentes concentrations des Nps testées (ZnO, Fe₂O₃ et Al₂O₃) après une, deux, trois et quatre semaine d'exposition sont présentées respectivement par les figures (33 à 44).

- ✓ Au cours de la première semaine d'exposition, les escargots ont tendance à être en position haute :

Les individus sont observés en activité sur le couvercle de la boîte(CA) avec environ 32, 34%,30 %chez les témoins et 28%, 17% ,30% respectivement chez les traités par la plus forte concentration 5000µg/g respectivement pour ceux traités par le ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃.

L'analyse statistique révèle une différence significative pour ceux traités par les concentrations (500, 1000 et 5000µg/g) chez les traités par le Fe₂O₃.

Soit inactif sur le couvercle de la boîte(CPA) avec environ (40%), (30%) et (39%), chez les témoins et (38%), (40%), (40%) chez les traités par la plus forte concentration respectivement pour ceux traités par le ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃.

Une différence significative à très hautement significative chez les traités respectivement par la concentration 100 et 5000µg/g du Fe₂O₃.

Les individus présents sur le substrat ont tendance à être:

Inactifs sur le substrat (SPA) avec environ 13%,17%,12% chez les témoins et 31%,35% ,25% respectivement pour ceux traités par la concentration 5000 $\mu\text{g/g}$ du ZnO, Al₂O₃ et le Fe₂O₃.

L'analyse statistique révèle une différence significative chez les traités par la concentration 100 $\mu\text{g/g}$, hautement significative pour ceux traités par les concentrations (500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) en présence de ZnO et Al₂O₃ .

Une différence hautement significative pour ceux traité par la concentration 100 $\mu\text{g/g}$ et très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) en présence de Fe₂O₃.

✓ Au cours de la deuxième semaine d'exposition, les individus :

Sont inactifs sur le substrat (SpA) avec environ 22 %, 26% ,30% chez les témoins et 64%,65%,60% chez les traités respectivement par la plus forte concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO, Fe₂O₃ , et d'Al₂O₃ .

L'analyse statistique révèle une différence très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (100,500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃.

Ceux qui sont actif sur le substrat (SA) avec environ 8%,12% et 16% chez les témoins et 8% ,7%,6% chez les traités respectivement par la plus forte concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) par de ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃, une différence significative chez les traités par les concentration (100,500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par le ZnO, l'Al₂O₃ et hautement significative pour ce traité par les concentration (500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par le Fe₂O₃.

Les individus actifs sur le couvercle (CA) avec environ 32%,30% et 28% chez les témoins et 18% ,14% et 16% respectivement chez les traités par la plus forte concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃.

Une différence significative à hautement significative chez les traités par les concentration (100,500, 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par le ZnO, Fe₂O₃, et l'Al₂O₃ .

Ceux qui sont inactifs en position haute (CpA) avec environ 38% ,28% et 40% chez les témoins et 10% ,14% et 18% respectivement chez les traités par la plus forte concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃.

Une différence significative chez les traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) de chez les traités par le ZnO, hautement significative chez les traités par la concentration 5000 $\mu\text{g/g}$ de Fe₂O₃, et très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (1000 ,5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par l'Al₂O₃.

- ✓ Au cours de la troisième semaine d'exposition, les escargots ont tendance à être en position haute :

Les individus sont actifs sur le couvercle de la boîte (CA) avec environ 9% ,16% et 16% chez les témoins et 24%,32% et 27% respectivement chez les traités par la plus forte concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃. Une différence significative pour ceux traités par la concentration (100 $\mu\text{g/g}$) et hautement significative pour ceux traités par les concentrations (500 ,1000 ,5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par le ZnO et le Fe₂O₃.

Une différence hautement significative pour ceux traités par les concentrations (100 ,500 $\mu\text{g/g}$) et très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (1000 ,5000 $\mu\text{g/g}$) d'Al₂O₃.

Ceux qui sont inactifs sur le couvercle de la boîte (CpA) avec environ 45% ,40% et 34% chez les témoins et 38% ,30% et 36% respectivement chez les traités par la plus forte concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃.

Une différence significative pour ceux traités par les concentrations (500,1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO et Fe₂O₃.

Une différence significative pour ceux traités par la concentration (100 $\mu\text{g/g}$) et hautement significative ceux traités par la concentration (500,1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par d'Al₂O₃.

Ceux qui sont inactifs sur le substrat (SpA) avec environs 39%,44% et 27% chez les témoins et 24%,16% et 11% respectivement chez les traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃ .Une différence hautement significative pour ceux traités par les concentrations (100 ,500,1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO .

Une différence hautement significative pour ceux traités par les concentrations (100,500 $\mu\text{g/g}$) et très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (1000,5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par d'Al₂O₃ et le Fe₂O₃.

Ceux qui sont actifs sur le substrat (SA) avec environ 7%,6% et 7% chez les témoins et 14%,22% et 26% chez les traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃.

Une différence significative pour ceux traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par l'Al₂O₃. Une différence significative pour ceux traités par la concentration (100 $\mu\text{g/g}$), hautement significative chez les traités par les concentrations (500,1000 $\mu\text{g/g}$), et très hautement significative pour ceux traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO.

Une différence significative pour ceux traités par la concentration (1000 $\mu\text{g/g}$) et hautement significative pour ceux traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) de Fe₂O₃.

✓ Au cours de la 4^{ème} semaine d'exposition :

Les individus actifs sur le couvercle de la boîte (CA) avec environ 28%,30% et 18% chez les témoins et 17%,7% et 10% respectivement chez les traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃.

Une différence hautement significative pour ceux traités par les concentrations (100,500 $\mu\text{g/g}$), très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (1000,5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par le ZnO.

Une différence hautement significative pour ceux traités par la concentration (500 $\mu\text{g/g}$), et très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (1000,5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par l'Al₂O₃, une différence significative pour ceux traités par les concentrations (100, 500,1000 $\mu\text{g/g}$) et hautement significative pour ceux traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par le Fe₂O₃.

- Ceux qui sont inactifs sur le couvercle (CpA) avec environ 40%,41% et 44% chez les témoins et 50%,39% et 32% respectivement chez les traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃.

Une différence très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (100, 500,1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par le ZnO, une différence très hautement significative respectivement pour ceux traités par les concentrations (1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités

par l' Al_2O_3 et une différence significative pour ceux traités par les concentrations (100,500, 1000,5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par le Fe_2O_3 .

- Ceux qui sont actifs sur le substrat (SA) avec environ 26%,20% et 17% chez les témoins et 16%,14% et 48% respectivement chez les traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO, Fe_2O_3 et l' Al_2O_3 .

Une différence hautement significative pour ceux traités par la concentration (100 $\mu\text{g/g}$) et très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (500,1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par le ZnO, une différence significative pour ceux traités par la concentration (500 $\mu\text{g/g}$) et hautement significative chez les traités par les concentrations (1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par d' Al_2O_3 et une différence significative pour ceux traités par les concentrations (500,1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) chez les traités par le Fe_2O_3 .

Ceux qui sont inactifs sur le substrat (SpA) avec environs 8%,18% et 4% chez les témoins et 45%,38% et 48% respectivement chez les traités par la concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO, Fe_2O_3 et l' Al_2O_3 .

Une différence très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (100, 500,1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$) de ZnO, Fe_2O et d' Al_2O_3 .

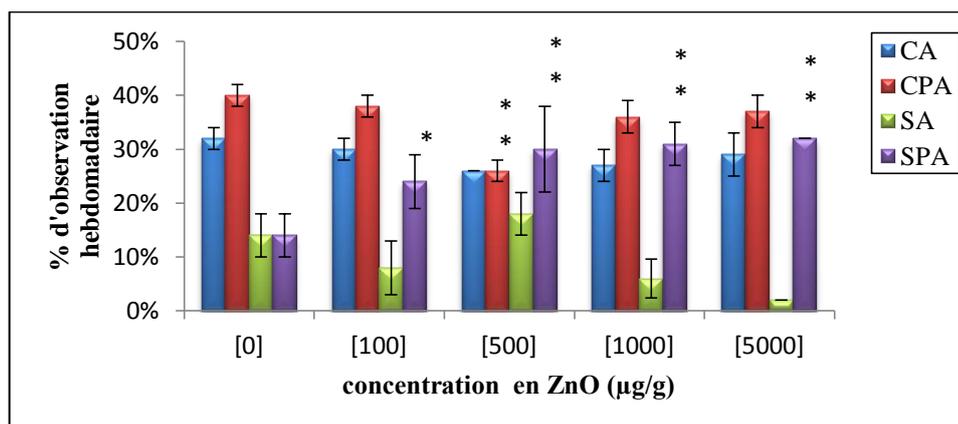


Figure 33 : Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de ZnO après une semaine d'exposition.

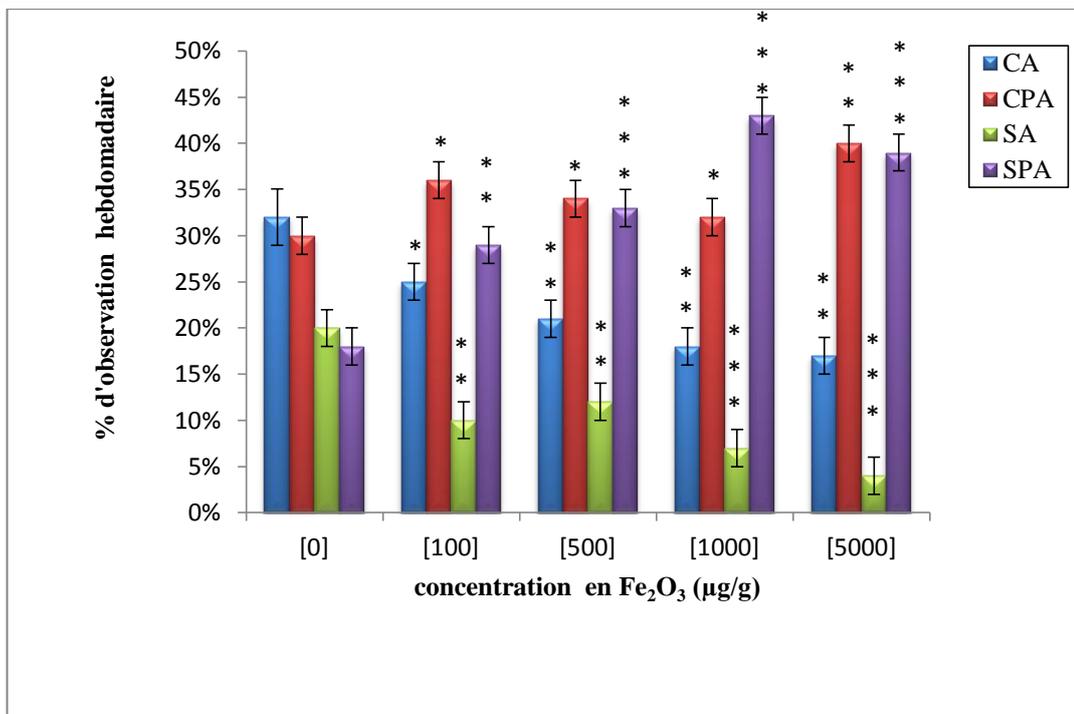


Figure 34 : Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de Fe_2O_3 après une semaine d'exposition.

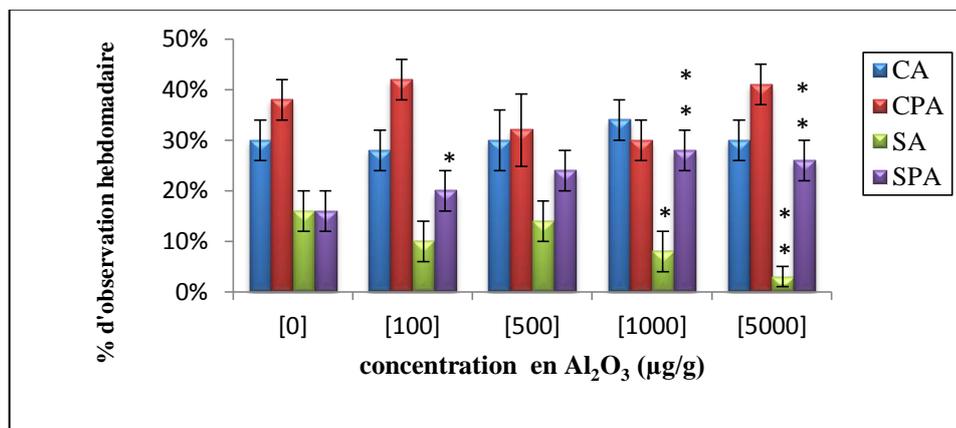


Figure 35: Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de Al_2O_3 après une semaine d'exposition.

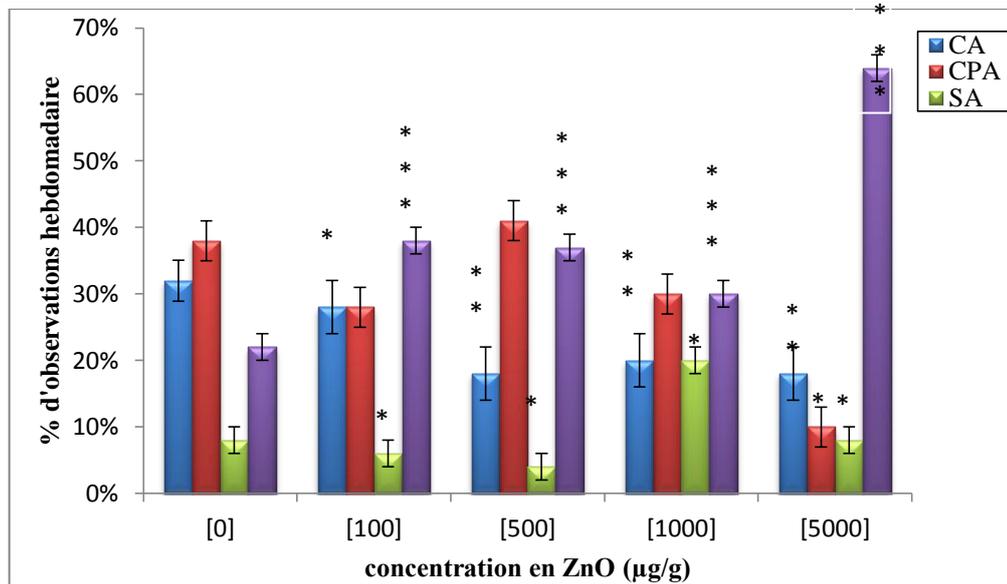


Figure 36: Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de ZnO après deux semaines d'exposition.

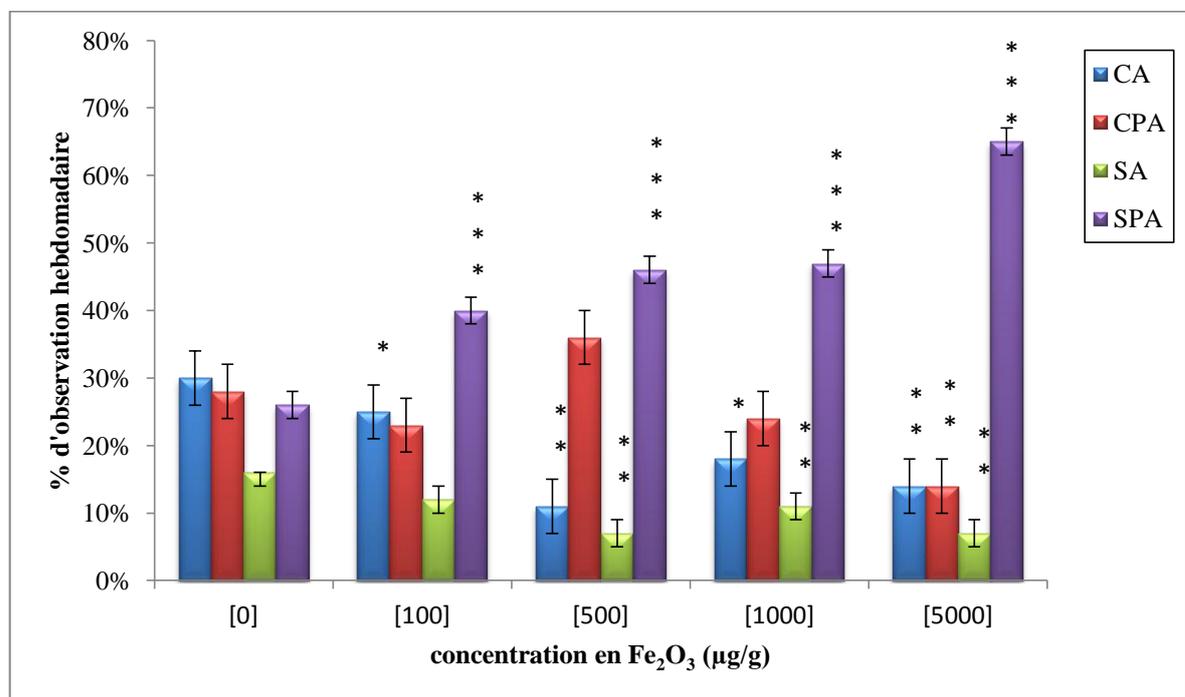


Figure 37 : Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de Fe₂O₃ après deux semaines .

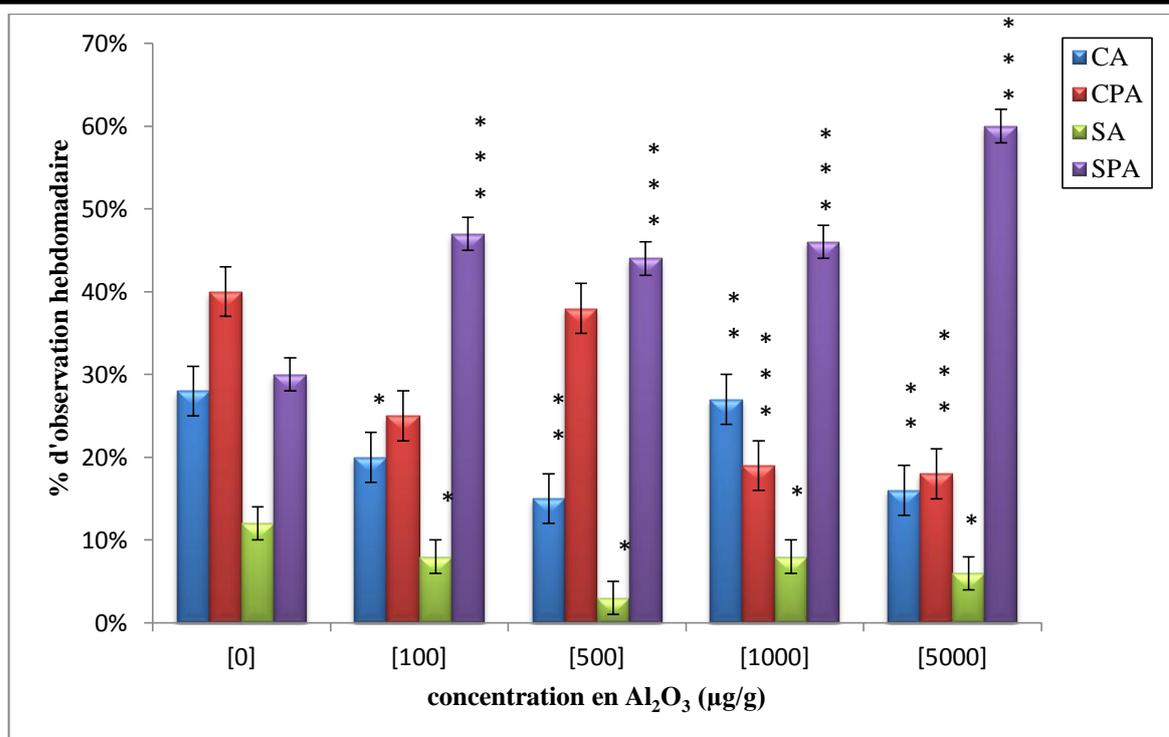


Figure 38 : Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration d'Al₂O₃ après deux semaines d'exposition.

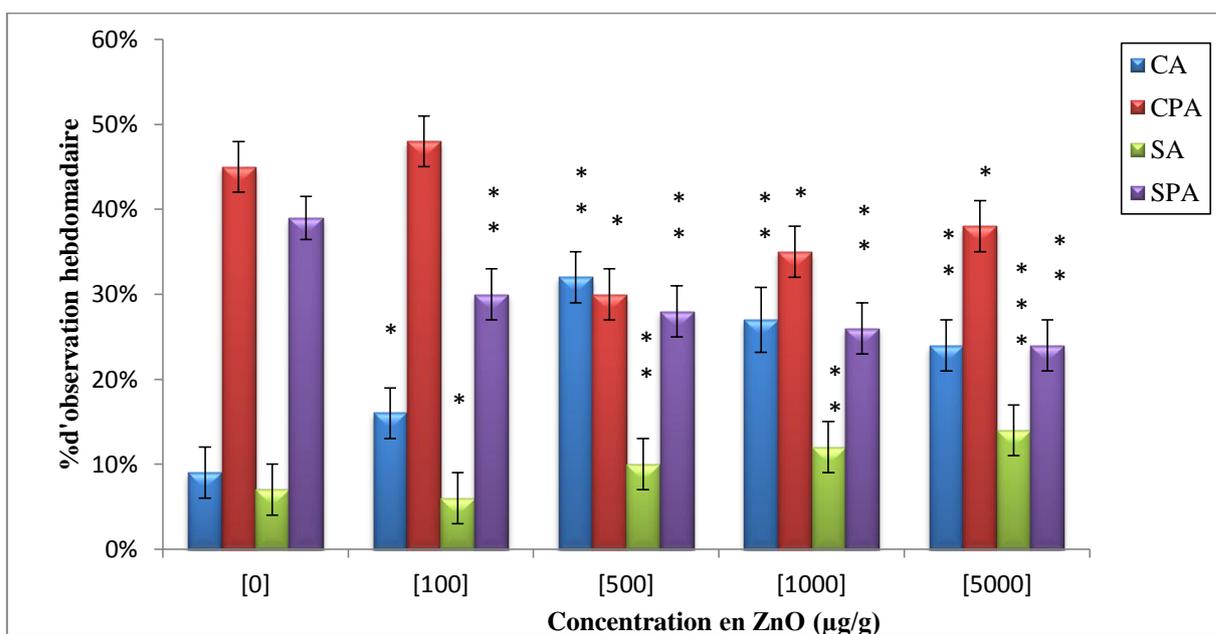


Figure 39 : Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de ZnO après trois semaines d'exposition.

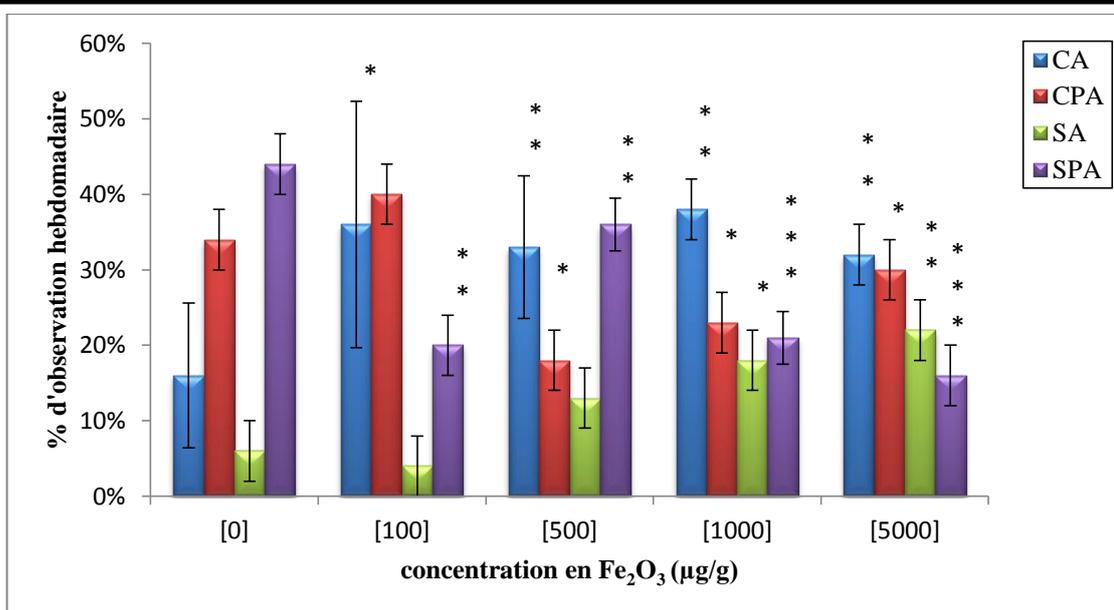


Figure 40 : Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de Fe_2O_3 après trois semaines d'exposition.

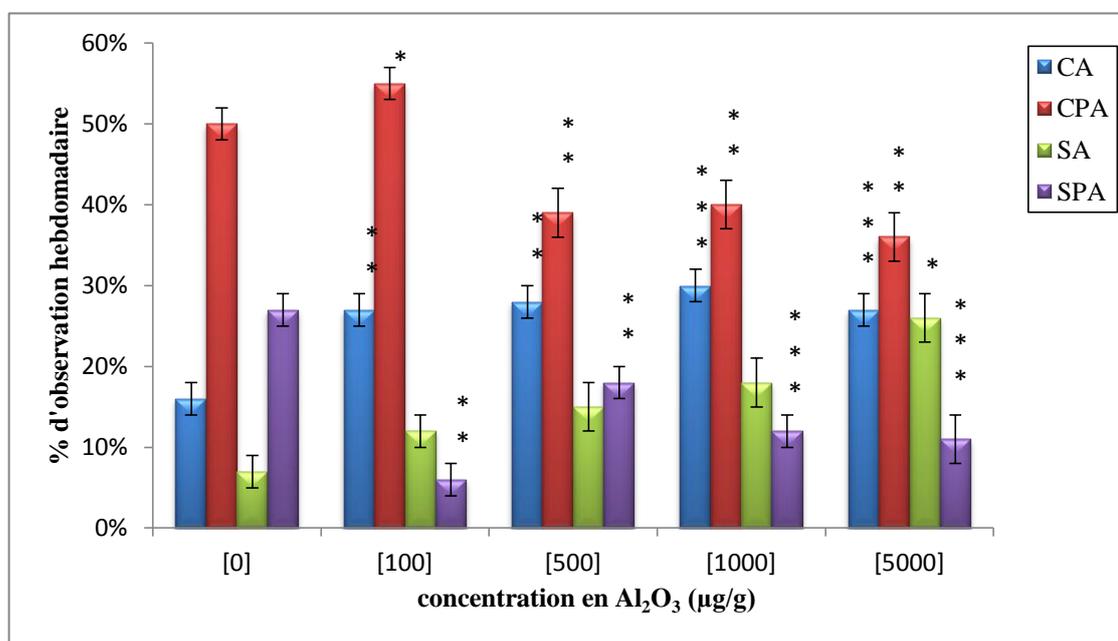


Figure 41 : Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration d' Al_2O_3 après trois semaines d'exposition.

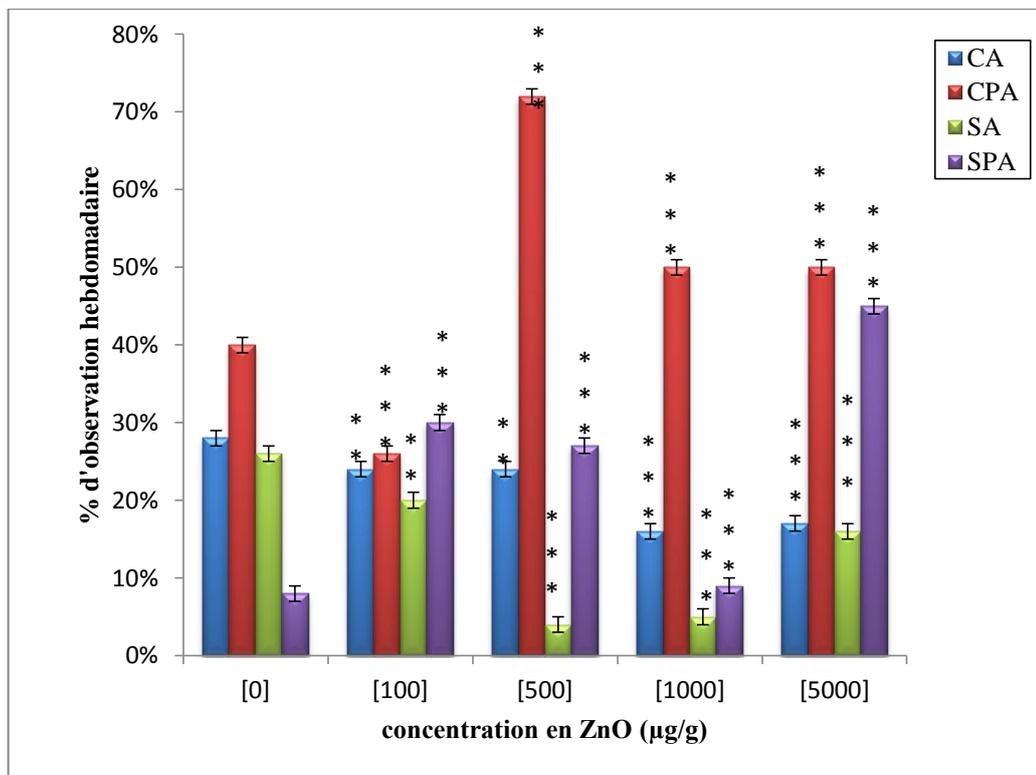


Figure 42 : Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de ZnO après quatre semaines d'exposition.

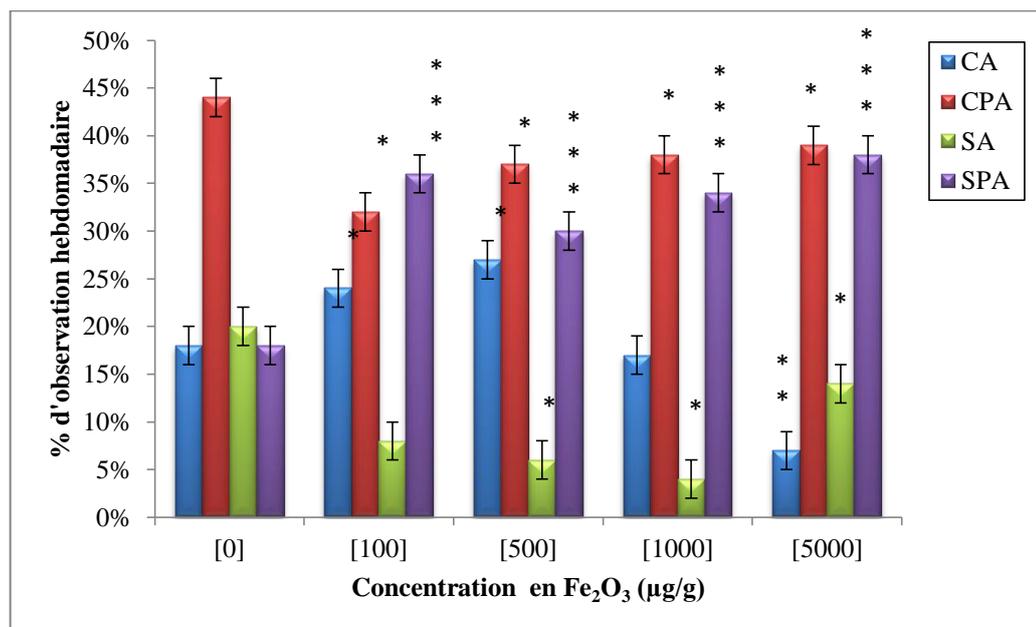


Figure 43 : Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de Fe₂O₃ après quatre semaines d'exposition.

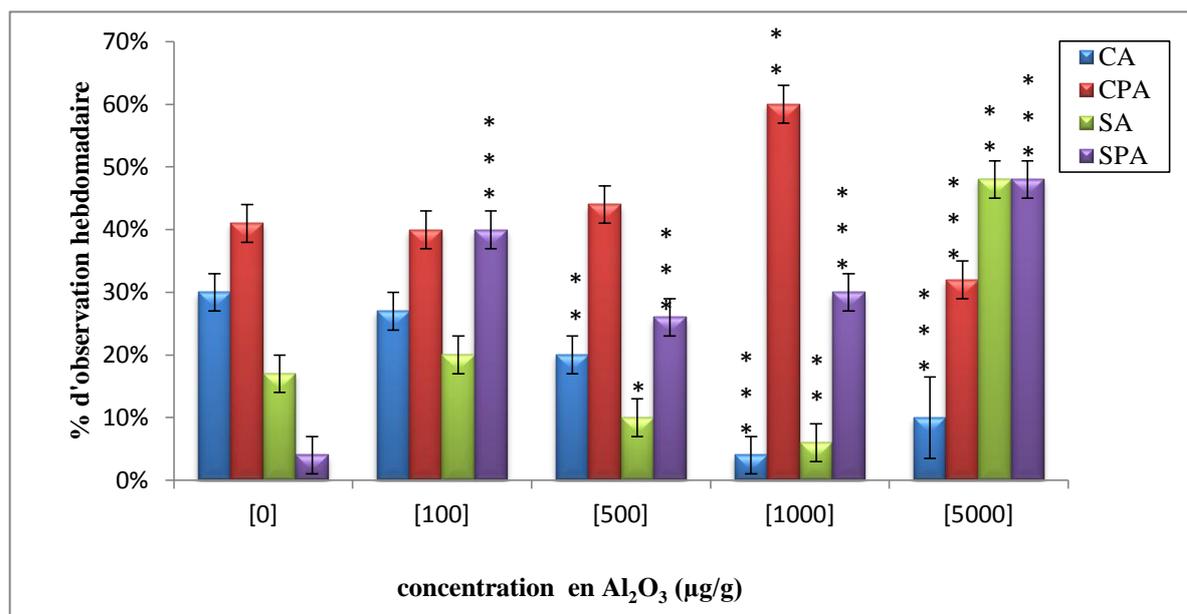


Figure 44 : Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration d' Al_2O_3 après quatre semaines d'exposition.

1.1.10. Effet des Nps sur le taux de mortalité :

Les pourcentages cumulatifs de mortalité des escargots traité par le ZnO pendant quatre semaines ont révélé que le pourcentage de mortalité augmente avec l'augmentation de la concentration de ZnO avec 10% et 50% de mortalité pour ceux traité par les concentrations 500,1000,et 5000 $\mu\text{g/g}$.

Concernant le pourcentage cumulatifs de mortalité des escargots traité par le Fe_2O_3 est de 10% pour ceux traité par la concentration 5000 $\mu\text{g/g}$.Le pourcentage cumulatif de mortalité des escargots traités par l' Al_2O_3 est de 10% et 20% pour ceux traité respectivement par les concentrations (1000,5000 $\mu\text{g/g}$).

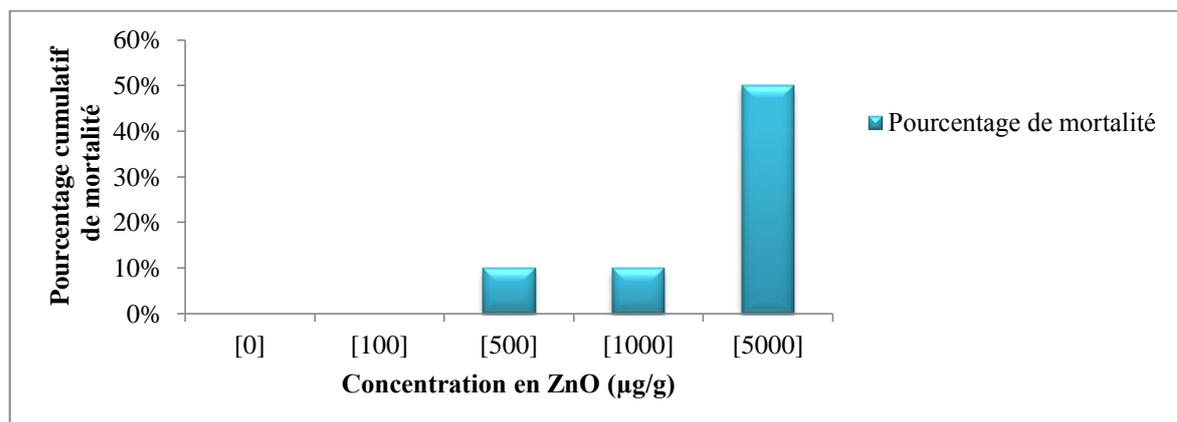


Figure 45 : Pourcentage cumulé de mortalité des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissantes de ZnO.

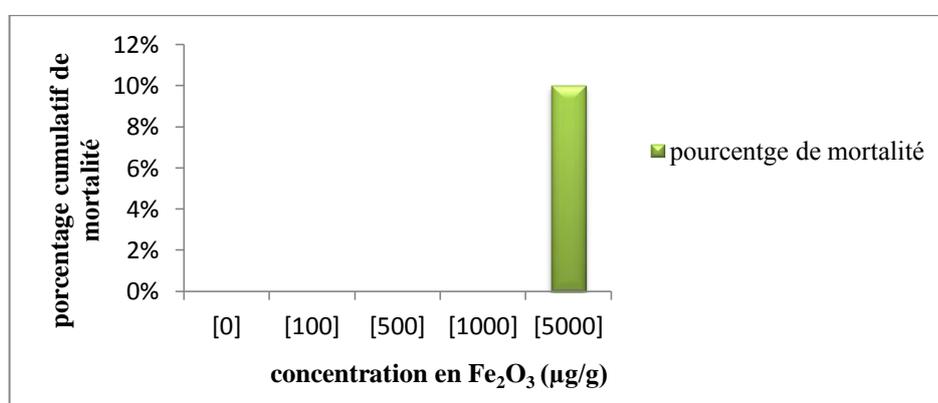


Figure 46 : Pourcentage cumulé de mortalité des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissantes de Fe₂O₃.

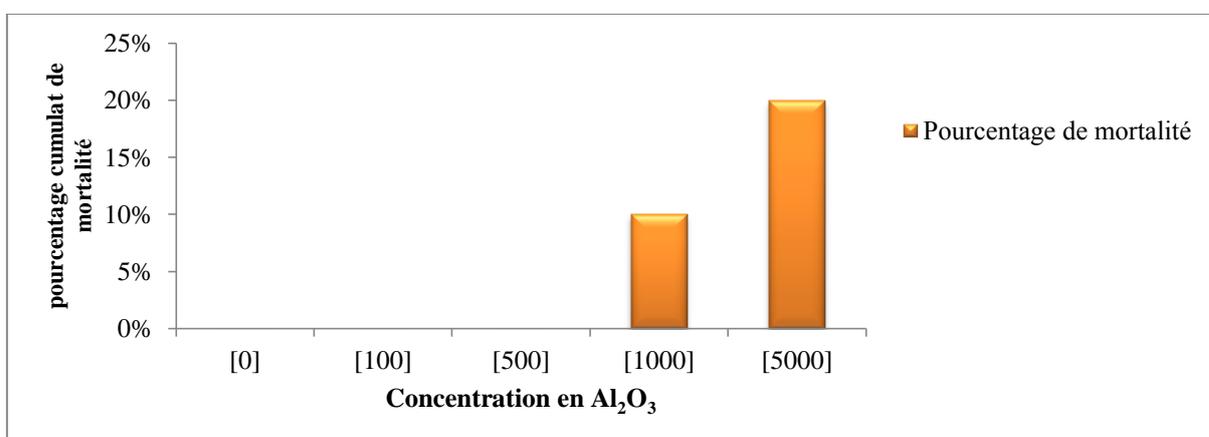


Figure 47 : Pourcentage cumulé de mortalité des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissantes de Al₂O₃.

1.2. L'aspects des coupes histologique :

1.2.1. Aspects du tissu de l'hépatopancréas après traitement par le ZnO :

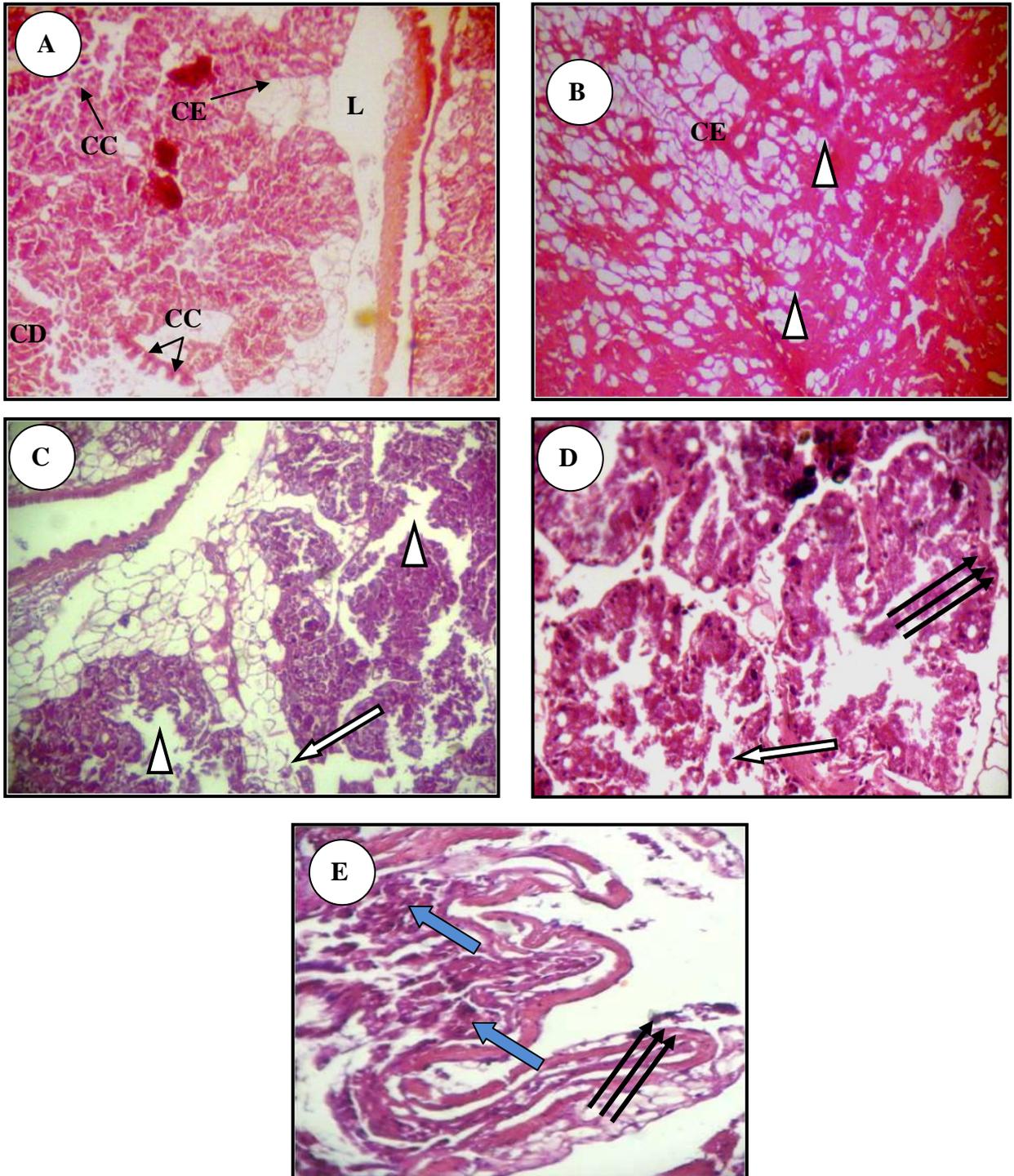


Planche 01 : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de ZnO 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E), (Gx40)

1.2.2.Aspects du tissu de l'hépatopancréas après traitement par les différentes concentrations de Fe_2O_3 :

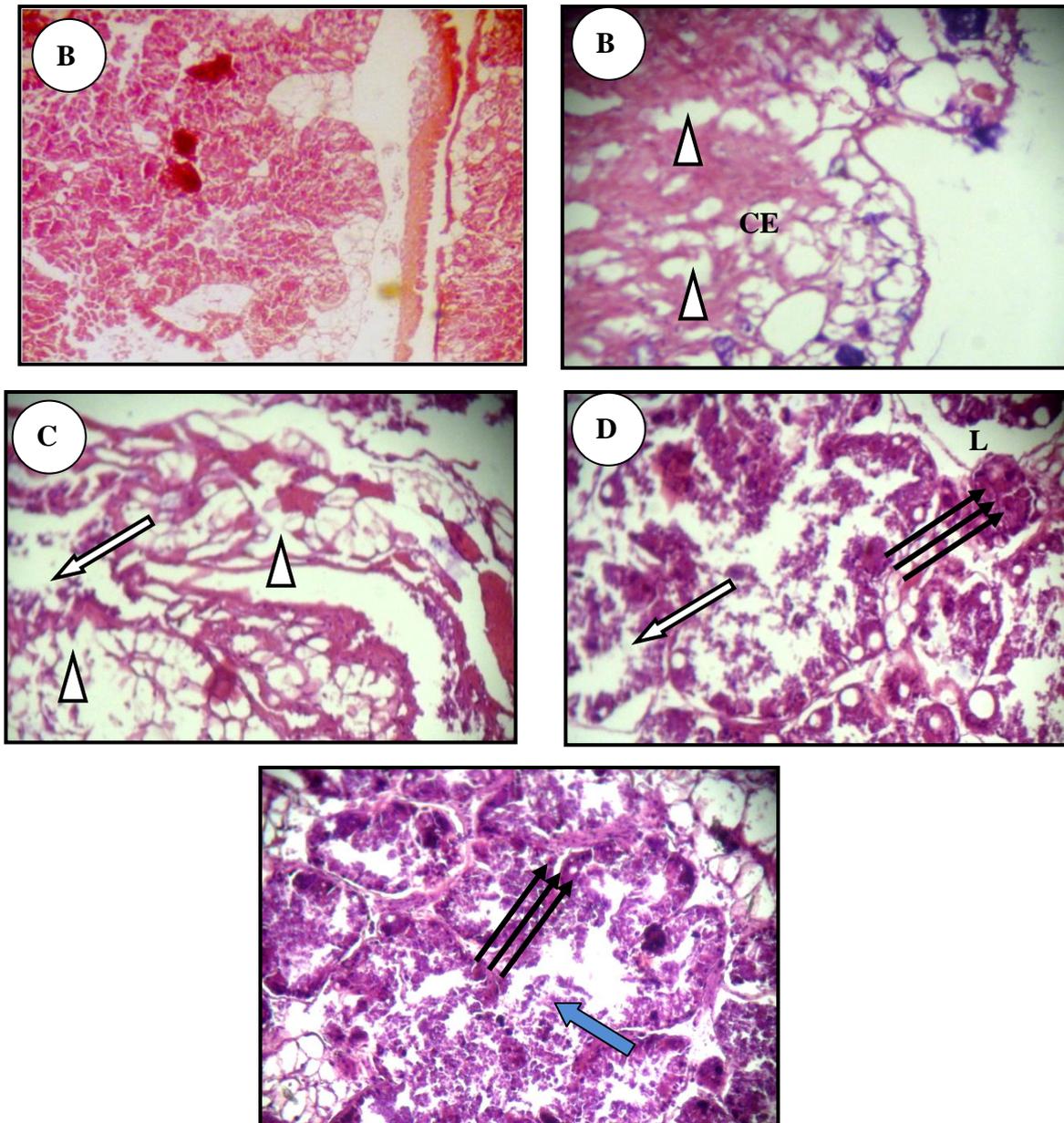


Planche 02 : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de Fe_2O_3 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E).
(Gx40)

1.2.3. Aspects du tissu de l'hépatopancréas après traitement par les différentes concentrations d' Al_2O_3 :

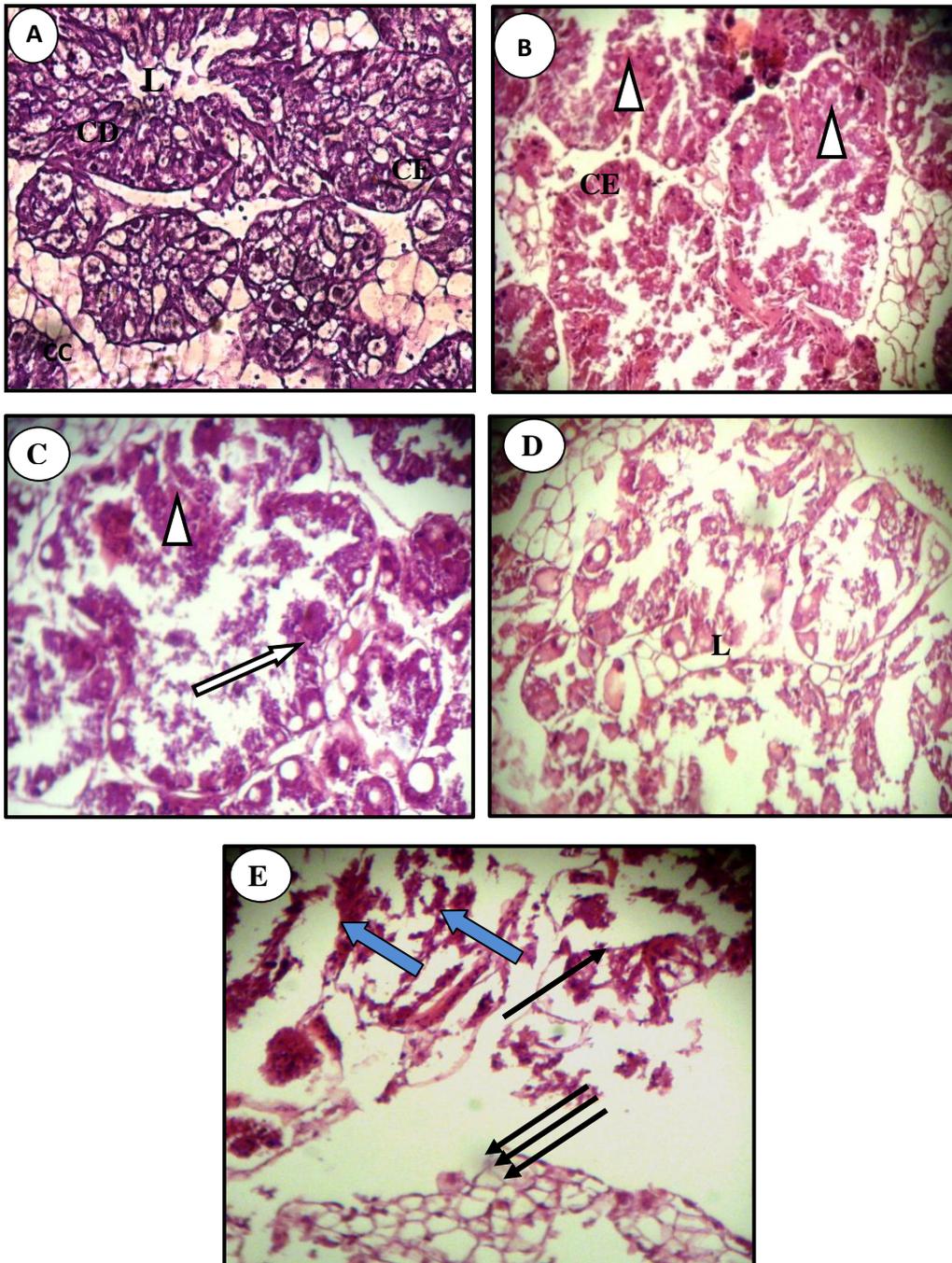


Planche 03 : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations d' Al_2O_3 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E). (Gx40)

Les planches (01),(02),(03), illustrent des coupes histologiques effectuées au niveau de l'hépatopancréas, chez les escargots témoins et traités. Ainsi, chez les témoins (A), l'hépatopancréas est constitué de lobules formés d'un ensemble d'acini maintenus cohérents par un tissu conjonctif. Ces acini renferment trois types de cellules : les cellules digestives (CD) (les plus abondantes), les cellules excrétoires (CE) et les cellules à calcium (CC) (Zaldibar et *al.*, 2008).

L'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots traités par la concentration 100 $\mu\text{g/g}$ (B) de Fe_2O_3 met en évidence des acini avec un contour irrégulier, accompagné d'une dégénérescence des cellules digestives; avec un aspect inflammatoire des tissus ainsi que la disparition de la lumière de l'acini. A la concentration 500 $\mu\text{g/g}$ (C), nous observons les mêmes altérations tissulaires accompagnées en plus d'une détérioration de la membrane basale de l'acini.

En ce qui concerne les traités par les concentrations 1000 et 5000 $\mu\text{g/g}$, l'examen histologique de l'hépatopancréas, met en évidence une destruction du parenchyme de l'acini, et plus particulièrement pour la forte concentration (5000 $\mu\text{g/g}$) avec une rupture de l'acini, une lumière plus large, des nécroses cellulaires et parfois une hyperplasie cellulaire.

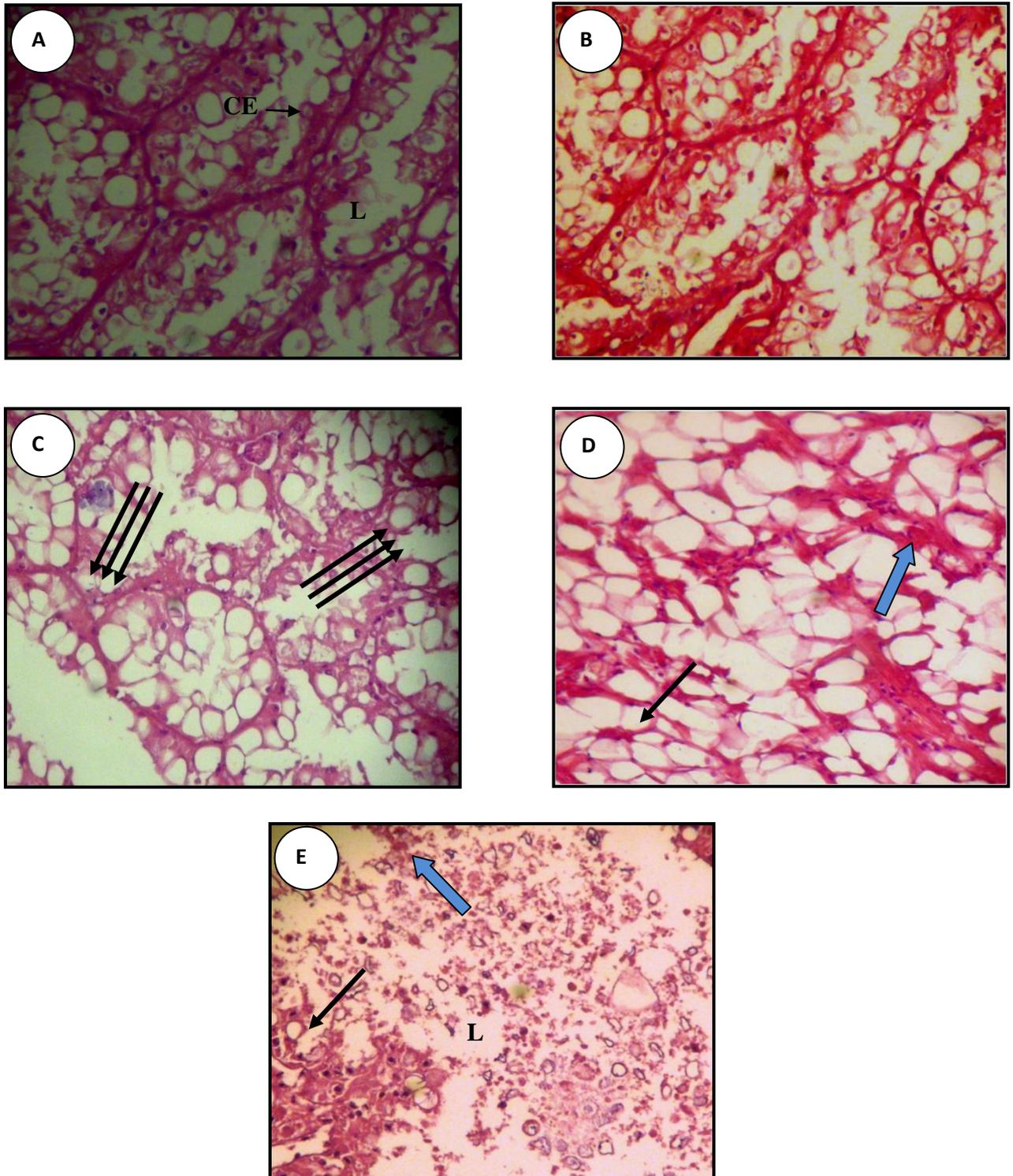
1.2.4. Aspects du tissu rénal après traitement par les différentes concentrations de ZnO :

Planche 04 : Coupes histologiques du rein des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de ZnO 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E).

(Gx40)

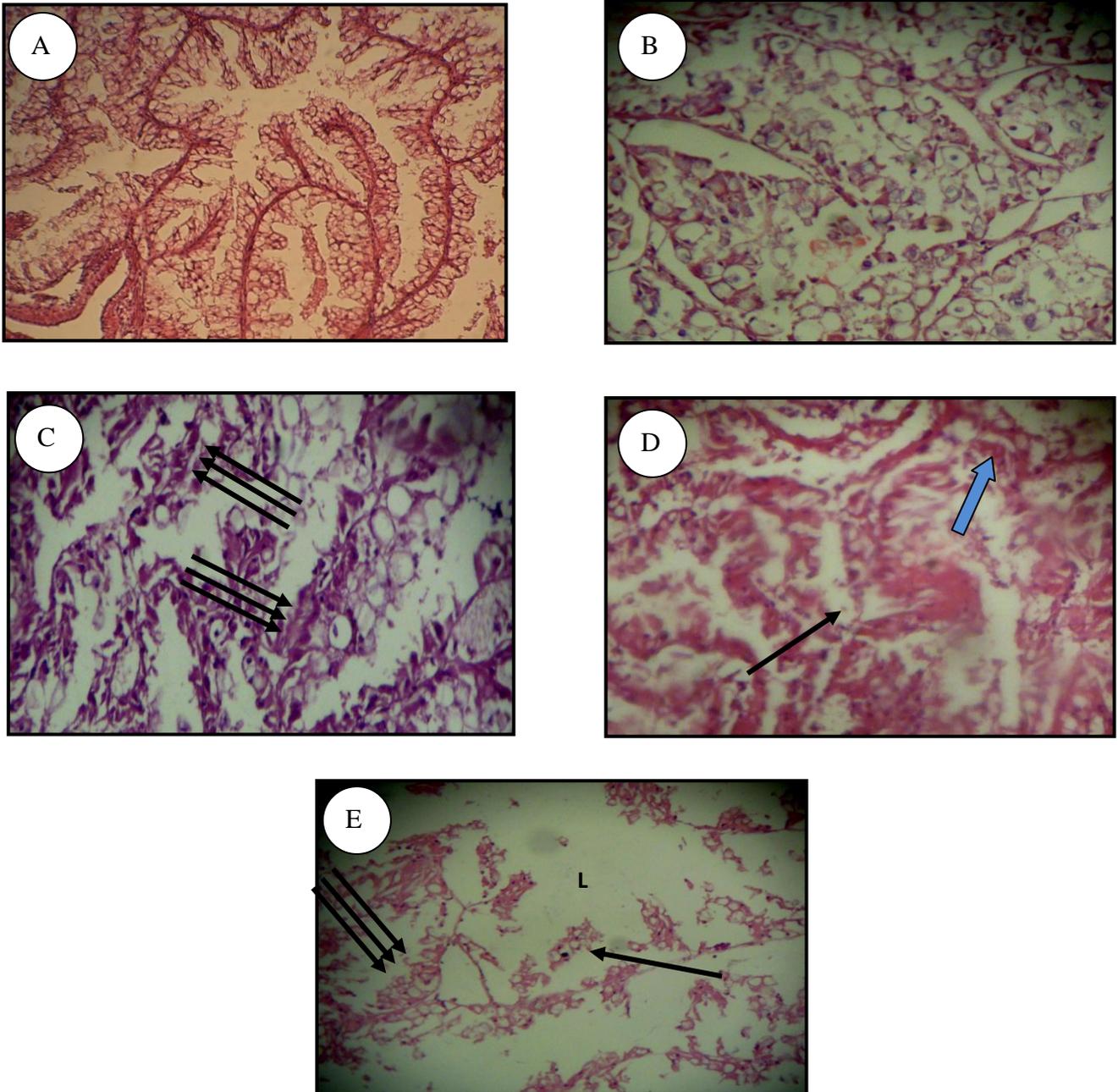
1.2.5. Aspects du tissu rénal après traitement par les différentes concentrations de Fe_2O_3 :

Planche 05 : Coupes histologiques du rein des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de Fe_2O_3 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E). (Gx40)

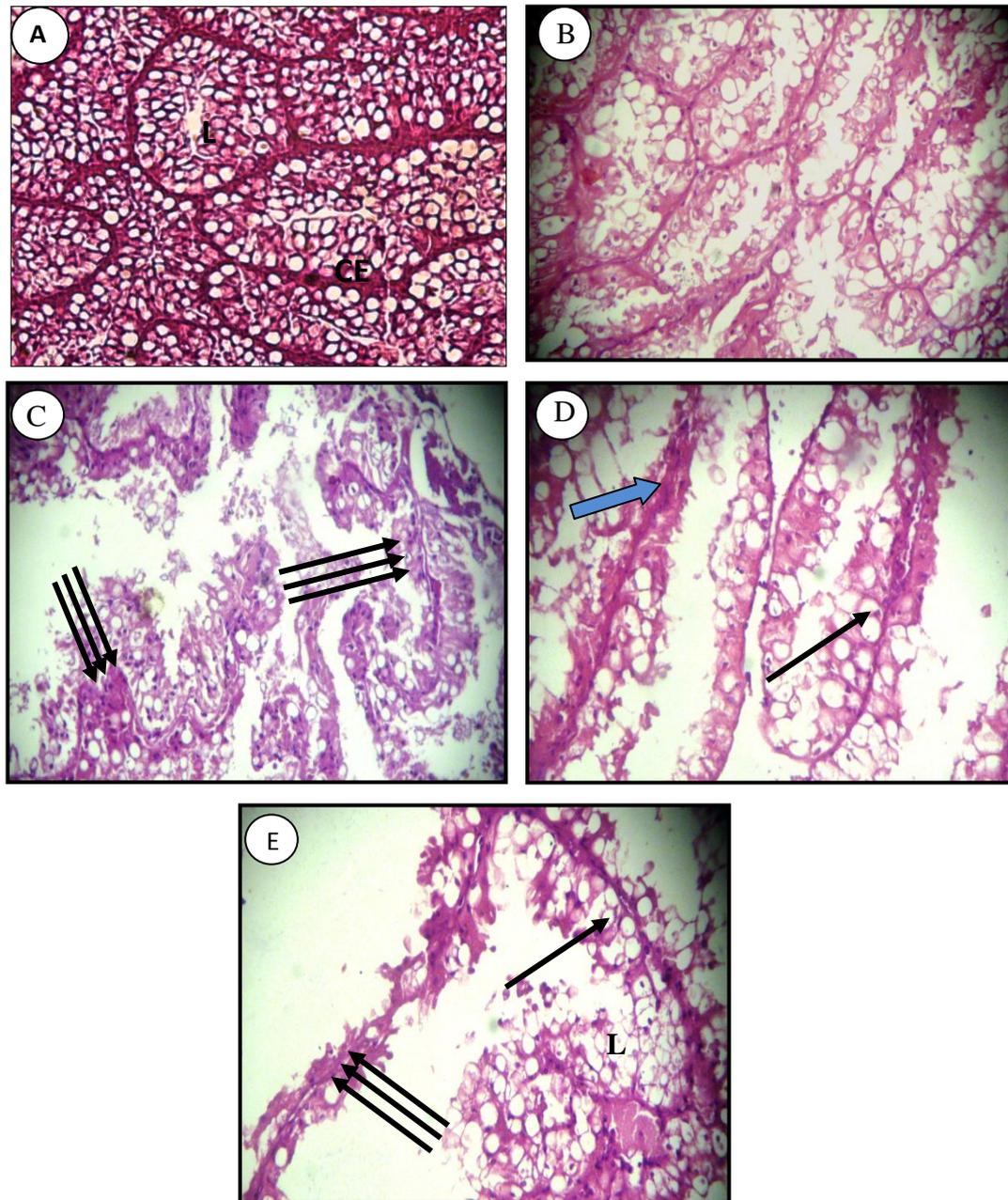
1.2.6. Aspects du tissu rénal après traitement par les différentes concentrations d' Al_2O_3 :

Planche 03 : Coupes histologiques du rein des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de ZnO 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E). (Gx40)

L'aspect du tissu rénal chez les escargots témoins et traité est illustré par les Planches (04), (05), (06), montrent des coupes histologiques effectuées au niveau des reins, témoins et traités. Ainsi, chez les escargots témoins (A), le rein est constitué d'un épithélium excréteur tapissé de lamelles rénales, lamelles conjonctives creuse, de sinus sanguin et dotées de fibres musculaires lisses, constitués en cellules prismatiques avec une bordure en brosse. L'épithélium renferme un seul type de cellules excrétrices avec un noyau et une membrane granulaire, ces cellules excrétrices ont des formes à bâtonnet (les plus nombreux) et ciliées (Chabicoovsky et *al.*, 2003).

L'examen histologique du rein des escargots traités par la concentration 100µg/g (B) et 500µg/g (C) de ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃ met en évidence des acini avec un contour irrégulier, accompagné d'une dégénérescence des cellules excrétoires, une hyperplasie du tissu conjonctif.

Concernant les tissus des traités par les concentrations 1000 µg/g (D) et 5000µg/g (E) de ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃, nous remarquons une hypertrophie des cellules excrétrices parallèlement à une prolifération du tissu conjonctif engendrant ainsi la disparition de leur membrane d'où la présence des débris et nécroses cellulaires (E).

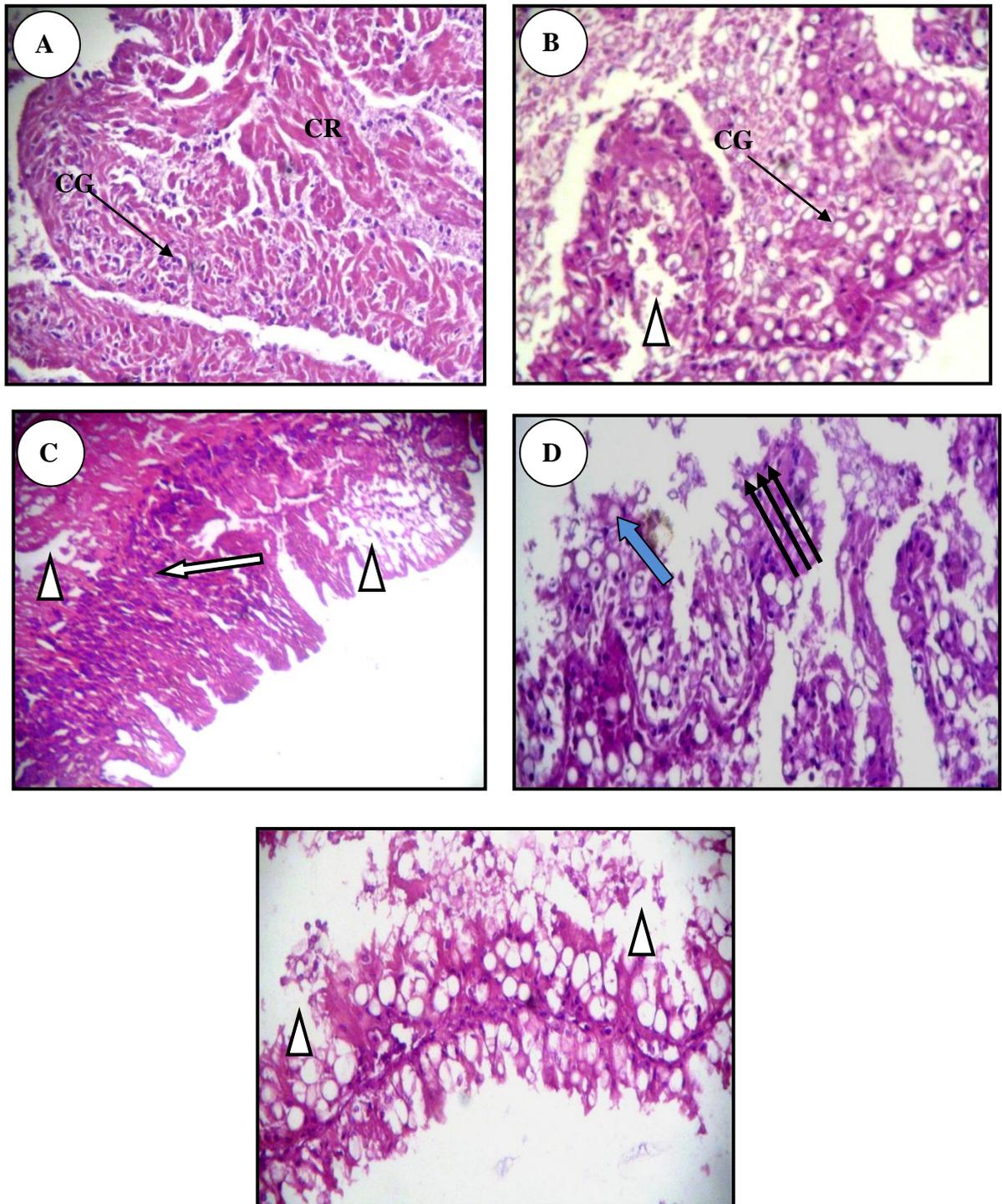
1.2.7. Aspects du tissu pédieux après traitement par les différentes concentrations de ZnO :

Planche 07: Coupes histologiques du pied des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de ZnO 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E), (Gx40)

1.2.8.Aspects du tissu pédieux après traitement par les différentes concentrations de Fe₂O₃:

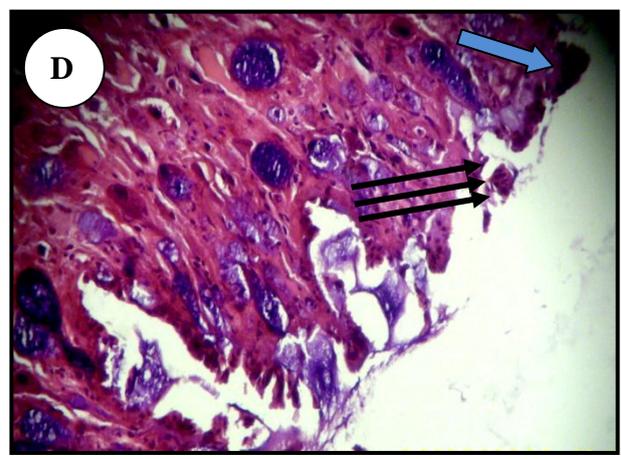
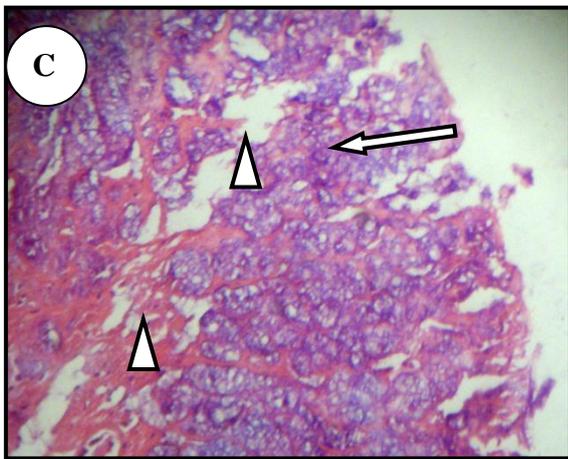
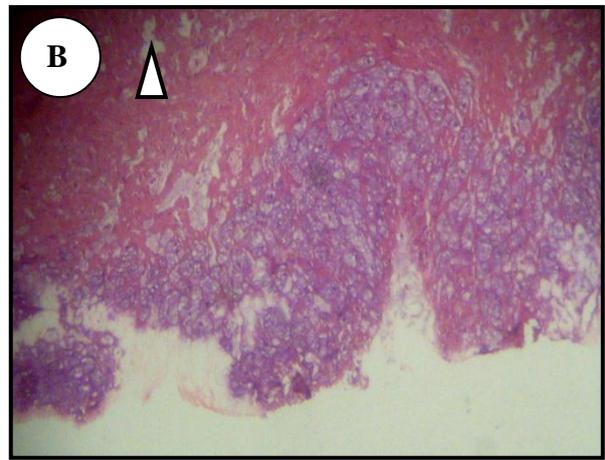
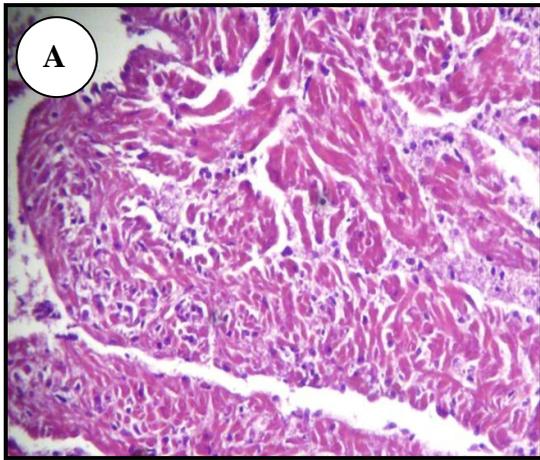


Planche 08: Coupes histologiques du pied des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de Fe₂O₃ 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E). (Gx40)

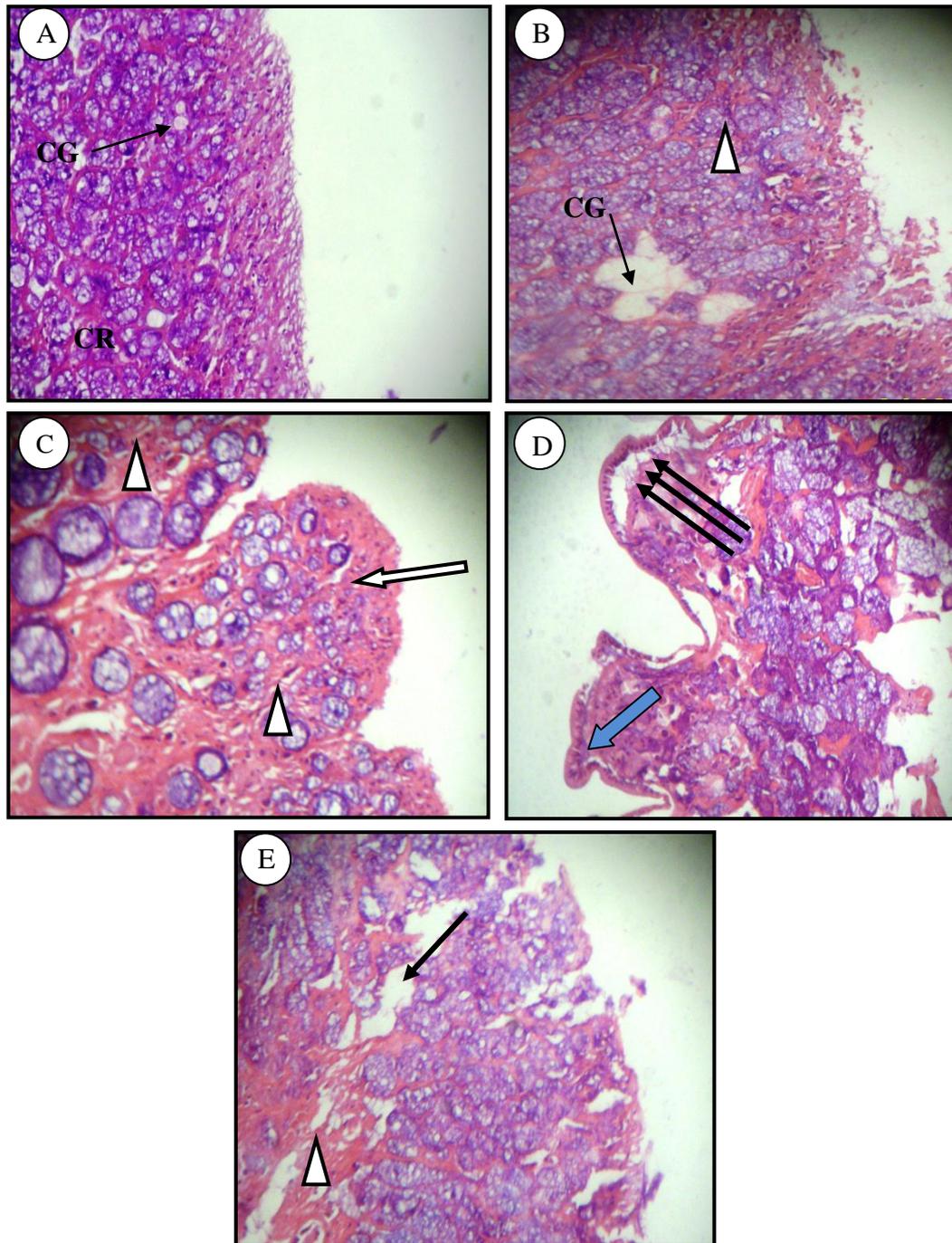
1.2.9. Aspects du tissu pédieux après traitement par les différentes concentrations d' Al_2O_3 :

Planche 03: Coupes histologiques du pied des escargots témoins (A) et les traités par les différentes concentrations de Al_2O_3 100 µg/g (B), 500 µg/g (C), 1000 µg/g (D), 5000 µg/g (E), (Gx40)

L'aspect du tissu pédieux chez les escargots témoins et traité est illustré Les planches (07), (08),(09), montrent des coupes histologiques effectuées au niveau du pied, témoins et traités. Ainsi, chez les escargots témoins (A), le tégument de la sole de reptation est typiquement constitué d'un épiderme simple, épithélium cilié cubique à prismatique, au sein duquel des cellules glandulaires muqueuses sont insérées.

Il surmonte un tissu conjonctif dans les espaces duquel circule l'hémolymphe, associé dans le pied à d'abondantes fibres musculaires lisses.

L'animal se déplace grâce à des contractions de la musculature longitudinale du pied, se propageant sous forme d'ondes, le mucus produit par la glande pédieuse et les cellules épidermiques glandulaires assurent la lubrification de la surface du pied au contact du substrat (Audibert, 2011).

L'examen histologique du pied des escargots traités par la concentration 100 µg/g (B) de ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃ met en évidence une dégénérescence partielle de quelques cellules du revêtement. Le nombre de ces dégénérescence a augmenté d'une façon dose-dépendante. Ainsi, à la concentration 500 µg/g (C) les mêmes altérations ont été observées, accompagnées d'un aspect inflammatoire des tissus.

En ce qui concerne les traités par les concentrations 1000 µg/g et 5000 µg/g, l'examen histologique du pied, met en évidence une dégénérescence très avancée, et plus particulièrement pour la plus forte concentration (5000 µg/g) avec un sévère endommagement tissulaire, des nécroses cellulaires et parfois une hyperplasie cellulaire.

Légende :

L : Lumière de l'acini . **CD** : Cellule digestive.**CE** : Cellule excrétoire.**CC** : Cellule à Calcium.**CR** : Cellule du revêtement.**CG** : Cellule glandulaire

(A) Témoin, (B) : Traité par la concentration 100 µg/g, (C) : Traité par la concentration 500 µg/g, (D) : Traité par la concentration 1000 µg/g, (E) : Traité par la concentration 5000 µg/g,

⇒ Infiltrat inflammatoire, → Débris cellulaires, △ Dégénérescence des cellules

⇒ Hypertrophie cellulaire , ↑ Nécrose

2. Discussion :

Cette discussion a pour objectif de faire la synthèse des résultats obtenus en les plaçant dans le contexte plus général de leur utilisation en biosurveillance et en évaluation des risques pour la santé des consommateurs en particulier l'homme.

Les nanoparticules peuvent se retrouver dans tous les compartiments environnementaux (eau, sol, air). Par conséquent, l'ensemble des espèces de la chaîne alimentaire, peut être exposé aux nanoparticules. Il est important d'évaluer le comportement des nanoparticules manufacturées dans les populations d'organismes constituant les premiers maillons de la chaîne alimentaire ((Thomann 1989 ; Angélique, 2008).

L'utilisation de l'escargot *Helix aspersa*, comme modèle d'étude de la toxicité des nanoparticules trouve ici un premier argument (valérie 2009 ; Scheifler ,2002) , l'escargot Petit Gris *Helix aspersa*, connu pour ses capacités à accumuler les polluants (Zn, Cu, Pb.....) à des concentrations importantes dans ses tissus Herbivore et détritivore, ce mollusque gastéropode pulmoné est exposé aux pollutions des sols, des végétaux et de l'atmosphère et représente de ce fait un modèle intégrateur complémentaire des organismes souterrains comme les annélides ou les organismes à régime strictement herbivore ou détritivore .Peut-être parce qu'il entre dans le régime alimentaire de l'homme, Il est considéré comme l'un des maillons de la chaîne trophique. Il est la proie de nombreux prédateurs tels que les mammifères, les oiseaux, etc. et peut donc être à l'origine de transferts des polluants (contaminants) (Grara et *al.*,2012 ; Coeurdassier et *al.*,2001).

La toxicité des nanoparticules est dus à leurs forme, en fonction de la taille ou de l'état d'agglomération (Pandy et *al.*,2007 ; Makhluif et *al.*, 2005), l'effet de la dissolution des nanoparticules, notamment pour les ZnO (Franklin et *al.*,2007, Zhang et *al.* 2007).

La toxicité des nanoparticules métalliques proviendrait de la libération des ions par exemple la toxicité d'oxyde de Zinc est liée à la libération des ions Zn^{2+} , la toxicité des nanoparticules métalliques sera comparée à celle des ions apportés. Ainsi, la forme, la taille, l'état d'agrégation et la chimie peuvent avoir des effets toxiques différents en fonction des organismes (animales, bactéries, cellules humaines...) avec lesquels les nanoparticules sont mises en contact (Franklin et *al.*, 2007 ; Zhang et *al.* 2007).

Dans ce travail, nous avons étudié la contribution d'une voie d'exposition des escargots, écologiquement représentatives, dans la détermination de la bioaccumulation et des effets toxiques des nanoparticules métalliques, Cette expérience nous a permis de mettre en évidence les relations entre la bioaccumulation des nanoparticules métalliques et les effets toxiques qu'ils induisent en fonction de la matrice d'exposition. Ensuite, nous avons complété les connaissances sur les effets des nanoparticules sur l'escargot *Helix aspersa* en recherchant des effets dose-dépendantes sur les paramètres morpho physiologiques (poids, coquille, organes) d'individus exposés aux nanoparticules métalliques.

Dans les écosystèmes terrestres, les gastéropodes sont exposés aux différents types de contaminants par plusieurs voies d'exposition qui impliquent l'ingestion d'aliments et de sols contaminés, le contact et l'absorption par l'épithélium du pied depuis des surfaces contaminées et l'inhalation de substances toxiques. Dans le cas de polluants métalliques, la voie digestive contribue pour une part très importante, probablement supérieure à 90% en milieu naturel, à l'absorption du Cd. Ceci est en accord avec les observations de Hopkin (1989) sur la prépondérance de la voie digestive dans l'intoxication des invertébrés terrestres par les polluants métalliques.

Les mollusques gastéropodes sont connus par leur grande capacité d'accumulation des polluants, cette propriété a été mise à profit pour utiliser les escargots comme bi indicateurs de pollution de l'environnement (Beeby et Richmond, 2002 ; Viard et *al.*, 2004). C'est pourquoi notre choix s'est porté sur ce modèle biologique afin de contribuer à l'étude du mécanisme cellulaire de la toxicité des nanoparticules métalliques (ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃) (Notten et *al.*, 2005).

Dans notre travail nous avons noté en premier lieu une diminution de la masse corporelle chez les animaux traités par les différentes concentrations des nanoparticules métalliques ce qui constitue un premier indice de toxicité. Ce résultat est en accord avec les travaux de Laskowski et Hopkin (1995 a) l'effet du Zn, Cu et Cd sur *Helix aspersa* et de Coeurdassier et *al.*, (2000) qui ont étudié l'effet du Chrome sur *Helix aspersa*. Cette perte de poids est expliquée par la diminution de la consommation alimentaire que nous avons constatée particulièrement chez les animaux traités par les différentes concentrations des nanoparticules métalliques (ZnO, Al₂O₃; Fe₂O₃) Comme le stipule Laskowski et Hopkin, (1995 b).

D'un autre côté, selon les travaux de (Cooke et *al.*, (1979) ; Dallinger et Wieser 1984 ; Blasco et Puppo, 1999), les ions métalliques s'accumulent à de très fortes concentrations, en particulier dans l'hépatopancréas des mollusques. Gomot-de Vaufleury et Pihan (2000) observent une réduction de la croissance des animaux placés sur des sites contaminés pendant 4 semaines sans pouvoir faire la part des effets dus à la pollution et des effets engendrés par des paramètres environnementaux sensiblement différents.

Gomot-de Vaufleury et Bispo (2000) s'intéressent aux effets de l'ingestion à partir d'un sol contaminé avec du pentachlorophénol, du trichlorophénol et du naphthalène ou de la pulvérisation de son lixiviat sur la croissance d'*Helix aspersa aspersa* et *Helix maxima* exposés pendant 28 jours. Une forte inhibition de croissance est observée chez *Helix aspersa* alors qu'elle ne l'est qu'aux plus fortes concentrations chez *Helix aspersa maxima*. Les 2 sous-espèces sont moins sensibles à l'exposition cutanée qui n'a aucun effet sur la croissance de *Helix maxima*.

Concernant le poids de la coquille, nous notons une diminution dose – dépendante en présence des nanoparticules métalliques. Les ions libérés (par exemple le Zn^{+2} libéré du ZnO) sont connus pour leur toxicité directe en liaison avec, par exemple, des dommages irréversibles sur certaines enzymes ou sur l'ADN, ils peuvent également perturber de manière indirecte des processus physiologiques importants en entrant en compétition avec certains éléments essentiels tels que le calcium (Ca) (Beeby et *al.*, 2002; Molnár et *al.*,2004). L'influence de ces interactions a été évoquée pour expliquer les inhibitions de croissance des escargots exposés aux sols artificiels contaminés par du Cd (Gomot, 1997a). Chez ces individus, la diminution des réserves en Ca, en liaison avec l'inhibition de croissance de la coquille, peut être responsable du décalage de quatre semaines dans le cycle de ponte, délai probablement nécessaire pour le réajustement des dynamiques du Ca (Coeurdassier ,2001).

Concernant l'évolution des deux diamètres de la coquille, nous notons une perturbation de ce facteur en présence des nanoparticules métalliques, ces résultats vont dans le sens de ceux de Coeurdassier et *al.* (2001), qui ont mis en évidence une perturbation des diamètres de la coquille des escargots après exposition au diméthoate (pesticide à base d'organophosphorés). D'autres travaux confortent nos résultats ceux de (Grara et *al.*, 2012 a) qui ont mis en évidence une diminution du poids de la coquille en présence des poussières métalliques.

L'autre facteur important pris en compte dans cette partie, concerne le suivi du poids des tissus moux, nous avons mis en évidence une diminution du poids des tissus moux en présence des nanoparticules métalliques ce qui peut être expliqué par la compétition entre les ions Calcium et les ions métalliques libérés des molécules étudiées comme le suggère Coeurdassier et *al.* (2001), qui a mis en évidence une inhibition du poids des tissus moux des escargots après exposition au diméthoate. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Grara et *al.*, 2012 a).

Afin de mieux étayer nos résultats, nous avons choisi de suivre l'évolution des principaux organes, à savoir l'hépatopancréas, le rein, poumon et le pied. Nos résultats mettent en évidence une diminution du poids de ces organes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Marigomez et *al.*, (1998) qui ont montré une réduction de 50 % du poids de la glande digestive des limaces en présence des xénobiotiques. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Grara et *al.*, 2012 a) qui ont mis en évidence une diminution des poids des deux organes (glande digestive et rein) en présence des poussières métalliques.

D'autre part, Gomot-de Vaufleury et Kerhoas, (2000) ont trouvé qu'à l'échelle de l'organe, des concentrations de 200 µg Cd provoquent une inhibition importante du développement du tractus génital chez *Helix aspersa*. Chez les mammifères, la présence de métaux serait à l'origine d'une diminution du poids des organes moux (foie et rein) notamment chez le lapin (Tadjine, 2007).

Dans notre travail nous avons noté une diminution de la consommation alimentaire chez les animaux traités par les différentes concentrations des nanoparticules métalliques (ZnO, Al₂O₃, Fe₂O₃). Cette diminution de la consommation alimentaire que nous avons constatée particulièrement chez les animaux traités par les plus fortes concentrations des Nps métalliques. Nos résultats sont en accord avec ceux de Laskowski et Hopkin, (1995 b).

D'autre part, Van Straalen et *al.* (1987) suggèrent que ces animaux sont capables de réguler la quantité de métaux ou les ions métalliques dans leur masse corporelle avec pour conséquence une diminution de la consommation alimentaire aux fortes doses des xénobiotiques. De plus, la diminution dose-dépendante de la prise de nourriture a été souvent relatée chez des gastéropodes terrestres nourris avec des aliments présentant des concentrations élevées en éléments métalliques toxiques (Swaileh et Ezzughayyar., 2001).

Gomot (1997a) observe une différence significative de prise alimentaire chez des individus juvéniles d'*Helix aspersa* exposés à 400 µg Cd dans l'aliment et les témoins dont la consommation alimentaire est importante.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de (El Gendy et al., 2011) qui ont trouvés une diminution de la consommation alimentaire du gastéropode *T. pisana* après un traitement de cinq semaines par les métaux (Zn, Cu, Pb). En plus, Lam (1996) observe une réduction dose-dépendante des coefficients de consommation et d'absorption de la nourriture chez des adultes de *Radix plicatulus* exposés au Cd. Ainsi tous ces résultats abondent dans le sens de nos résultats.

Dans notre travail nous avons noté une diminution du poids sec des déchets chez les animaux traités par les différentes concentrations des Nps métalliques. Cette diminution peut être expliquée par la diminution de la consommation alimentaire que nous avons constaté dès la première semaine de traitement. Ces résultats sont en accord avec les travaux de (Coourdassier et al., 2001) qui ont mis en évidence une diminution du poids sec des déchets chez des escargots après exposition de (28 jours) à un pesticide, le diméthoate à base d'organophosphorés.

Dans notre travail, les effets comportementaux significatifs sont observés aux différentes concentrations testées pendant les 4 semaines de traitement par les Nps métalliques. Cet effet est quantifié et associé à un comportement relatif aux déplacements d'escargots : Les Nps provoquent une inactivité marquée des escargots, surtout pendant les 2 premières semaines d'exposition, il apparaît une tendance évidente à la disparition de ces effets comportementaux tout au long du test, ce qui suggère à nouveau une atténuation des effets des Nps métalliques au cours de l'essai. Les implications potentielles de tels effets sont multiples, les Nps métalliques peuvent entraîner une incapacité des animaux à fuir le substrat contaminé et augmenter l'exposition comme démontré chez le collembole *F. fimetaria* (Petersen et Gjelstrup, 1998). En fonction de l'intérêt supposé du comportement de refuge des escargots en position haute, il est suggéré que les Nps métalliques peuvent empêcher les escargots de rechercher des conditions moins thermophiles en hauteur qui leur permettraient également d'éviter les prédateurs du sol (Coourdassier, 2001).

Nos résultats mettent en évidence que le pourcentage cumulatif de mortalité des individus exposés aux concentrations croissantes aux xénobiotiques testés est dose-dépendante.

Les résultats concernant les effets des Nps métalliques sur la mortalité et la croissance des escargots apportent des données originales sur la toxicité de ces molécules sur les gastéropodes terrestres exposés pendant plusieurs semaines (Coeurdassier et al., 2002) . Ces résultats sont en accord avec ceux de (El Gendy et al., 2011) qui ont mis en évidence qu' à des doses élevées, le pourcentage cumulatif de mortalité est prononcé pour *Theba pisana* traité par des concentration croissantes de Zn et Cu après exposition de (5semaines) (73.3%) contrairement aux travaux de Amusan et al., (2002) qui ont montré que le cuivre et le plomb à des faibles doses, aucun niveau de mortalité est observé chez le gastéropode *Limicolaria flammea* .

De plus, Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Swaileh, 2000) qui ont mis en évidence que les pourcentages cumulatifs de mortalité chez *H. engaddensis* adultes est de 1.7 % et de 50% respectivement après traitement par le Cu et Zn par voie digestive ainsi que les travaux de (El Gendy et al., 2011) qui ont mis en évidences que le pourcentage cumulatifs de mortalité est de 13.3% après traitement du gastéropode *Theba pisana* par le plomb.

D'autre part, Laskowski et Hopkin (1996) ont étudié les effets des métaux (Zn, Cu, Pb et Cd) chez l'escargot *H. aspersa*. Ils n'ont pas trouvé aucun rapport entre la mortalité des juveniles ou des adultes pour les concentrations de chaque métal ou bien des combinaisons des métaux. Le taux de mortalité était seulement de 6,7% pour les juveniles et de 1,9% pour les adultes pendant 4 mois de l'expérience. D'ailleurs, aucune réponse dans la mortalité n'a été trouvée par Marigomez et al., (1986) chez *Arion ater* après ingestion d'aliment contaminés par 1000 µg/g de Zn ou Cu.

Ces explications suggèrent que des mécanismes autres que la toxicité aiguë ou chronique peuvent être responsable de l'absence des escargots des emplacements contaminés (Laskowski et Hopkin 1996). D'autres facteurs qui peuvent être impliqués sont le comportement (actif ou inactif en position haute) avec une diminution de la consommation alimentaire aussi une inhibition de la croissance .Ces 'effets étaient démontré chez les escargots du genre *Helix* après ingestion d'un aliment contamination par un métal (Gomot de Vaufleury 2000 ; Swaileh and Ezzughayyar, 2000).

Les escargots sont des espèces comestibles par l'homme et peuvent occasionner des concentrations importantes en métaux, risquant de contaminer l'homme (Gomot,1989). Parmi les accidents invoqués, figure la catastrophe de Minamata (Japon), qui est un exemple du phénomène de transfert de polluant dans les chaînes alimentaires. Des quantités importantes de mercure ont été libérées par une papeterie industrielle dans les eaux de la baie de Minamata. Ce métal a été méthylié par des bactéries présentes dans les sédiments en un composé organométallique, le méthyl-mercure. Sous cette forme extrêmement mobile et toxique, le mercure a été transféré dans la chaîne alimentaire pour atteindre des concentrations très élevées dans la faune pisciaire. La population locale, dont le poisson constituait une part prépondérante de l'alimentation, a été fortement intoxiquée par le mercure ; plus de cent personnes sont décédées et un grand nombre a souffert de graves troubles et infirmités (Grara *et al.*,2012b ; Scheifler, 2002).

Plus récemment, le transfert de quantum dots à un organisme aquatique supérieur (rotifères), a été mis en évidence (Holbrook *et al.*, 2008). Ainsi l'interaction prédateur-proie est donc responsable du transfert de contaminants dans la chaîne alimentaire aux organismes aquatiques supérieurs et donc aux consommateurs. Par conséquent, la consommation des escargots par les consommateurs en particulier l'homme est à l'origine de la contamination de ce dernier par les nanoparticules métalliques (ZnO, Fe₂O₃, Al₂O₃) donc La voie digestive représente une importante voie d'entrée des NPs métalliques dans l'organisme via l'ingestion de produits alimentaires (les escargots contaminés, plantesetc) et d'eau contenant éventuellement des NPs métalliques (Pujalté, 2011).

L'absorption de NPs par ces cellules représente une voie d'entrée potentielle, où les NPs vont d'abord passer par le système lymphatique, pour ensuite rejoindre le système sanguin et les organes distants. D'autres voies de pénétration sont aussi suspectées, tel le passage à travers les jonctions épithéliales ou la transcytose de cellules épithéliales (Koeneman *et al.*, 2010) .

L'exposition aux nanoparticules métalliques peut causer des altérations cytologiques et ultra structurales très importantes au niveau de l'hépatopancréas, qui joue un rôle crucial dans la détoxification des polluants (Frías-Espericueta, *et al.*, 2008).

Les réponses histopathologiques de plusieurs organes (glande digestive, rein, ovaires...) de *Helix aspersa* exposé à des concentrations croissantes de Cd dans la nourriture se manifestent par des réactions qui impliquent une hyperplasie des épithéliums aux plus faibles concentrations testées et une destruction cellulaire importante qui s'accompagne d'une prolifération de tissus conjonctifs ainsi que des nécroses aux fortes concentrations (Radwan et al. 2008 ; Chabicoovsky et al.,2004).

Notre étude histologique montre que les nanoparticules de ZnO , Fe₂O₃ ,Al₂O₃ provoquent des atteintes tissulaires sans équivoque. En effet l'examen histologique de l'épithélium hépatopancréatique, rénal ; pédieux met en évidence l'apparition d'infiltrats inflammatoires Lymphoplasmocytaires dès la plus faible concentration, ceci pourrait être une première réponse biologique due à la présence des xénobiotiques, ces observations sont en accord avec les travaux de Tadjine, (2007), de Russell et al. (1981) et de Chabicoovsky et al.,(2004).

Nous avons également mis en évidence une déformation des acini, et une destruction des cellules digestives de manière dose - dépendante, conduisant à une perte très importante de ces cellules aux plus fortes concentrations. Ces résultats sont en accord avec ceux de Triebkorn et Köhler (1996) , Triebkorn et Köhler (1998) qui ont mis en évidence des altérations structurales et ultra structurales des cellules basophiles et digestives sont d'autant plus prononcées que les concentrations d'exposition en Zn, Cd et Pb sont élevées dans la glande digestive de la limace *D. reticulatum* exposée au Zn, Cd et Pb. Notons que les cellules digestives sont les plus abondantes dans l'épithélium de l'hépatopancréas, selon Porcel et al., (1996) et Chabicoovsky et al., (2004) , la perte des cellules digestives semble être une réponse générale après une exposition aux métaux lourds chez les gastéropodes terrestres et elle est reliée principalement à la détérioration du processus digestif provoqué par la présence des particules métalliques (Zaldibar et al., 2008; 2007).

Notre étude histologique montre que le ZnO, Fe₂O₃ ,Al₂O₃ provoque au niveau des reins une hypertrophie des cellules excrétoires et une déformation des acini suivi de nécroses cellulaires, en accords avec les travaux de (Russell et al. 1981; Chabicoovsky et al., 2004).

Notre étude histologique montre que le ZnO, Fe₂O₃ et l'Al₂O₃ provoque au niveau du pied des dégénérescences partielles de quelques cellules du revêtement aux faibles concentrations. Le nombre de ces dégénérescences augmente d'une façon dose-dépendante, nous avons également mis en évidence des nécroses cellulaires et parfois une hyperplasie cellulaire.

Ces résultats sont en accord avec ceux de (Russell et *al.* 1981) qui ont mis en évidence que toutes les réponses histopathologiques ont été observées dans la plupart des tissus examinés, y compris l'intestin, la glande digestive, les reins et le pied. Avec une hyperplasie de l'épithélium à des plus faibles concentrations en cadmium, avec une perturbation cellulaire, nécrose extensive et une prolifération du tissu conjonctif aux fortes concentrations.

Il semble donc évident que les nanoparticules de ZnO, Fe₂O₃, et d'Al₂O₃ ont un pouvoir cytotoxique très important.

Conclusion :

Ce travail a permis d'enrichir les connaissances sur les effets biologiques des nanoparticules métalliques sur une cible de la chaîne alimentaire (*l'escargot Helix aspersa*). Pour ce faire, des études *in vitro* ont été réalisées sur des animaux terrestres impliqués dans le régime alimentaire de l'Homme collecté de la région de Guelma (Bouati Mahmoud) (Nord-Est Algérien).

Dans les écosystèmes terrestres, les gastéropodes sont exposés aux différents types de contaminants par plusieurs voies d'exposition qui impliquent l'ingestion d'aliments et à partir de sols contaminés, le contact et l'absorption par l'épithélium du pied depuis des surfaces contaminées et l'inhalation de substances toxiques. Dans notre travail et concernant les polluants nanométriques métalliques, nous montrons que la voie digestive contribue pour une part très importante l'absorption de ces molécules.

Cette étude montre l'intérêt de *Helix aspersa* comme espèce modèle de gastéropode pulmoné terrestre pour l'évaluation de la toxicité des nanoparticules métalliques avec des tests de laboratoire et pour la surveillance des milieux terrestres récepteurs en utilisant ces organismes dans une démarche de bioindication active pour la préservation de la santé de l'homme.

Il apparaît clairement que l'espèce *Helix aspersa* est un excellent bio-indicateur de la dégradation du milieu, elle est particulièrement sensible à une pollution par les nanoparticules métalliques, Cette sensibilité se manifeste par une perturbation dans le développement des paramètres morpho physiologiques (diminution de la masse corporelle, diminution des deux diamètres de la coquille ainsi que de son poids, diminution du poids des tissus mous diminution des poids des organes, diminution du taux de consommation, diminution de poids sec des déchets et une perturbation comportementale).

L'étude histopathologique a confirmé cette sensibilité de l'espèce vis-à-vis des nanoparticules métalliques (ZnO) à travers des atteintes tissulaires bien visibles, particulièrement au niveau de l'hépatopancréas, du rein, du poumon et du pied.

De plus les NPs métalliques sont des polluants environnementaux bien connus par leurs effets particulièrement dangereux pour la santé humaine, En raison de leur large utilisation

dans beaucoup de branches industrielles, ils sont présent partout dans l'air, dans l'eau et dans les sols, certains sont purement toxiques pour les êtres vivants (les NPs de sulfure de Cadmium ; source d'un métal toxique le Cadmium), d'autres sont à l'origine des éléments essentiels à l'organisme et à l'entretien des fonctions biologiques (les NPs d'oxyde de Zinc : source d'un métal physiologique essentiel le Zn), les éléments métalliques, même essentiels, peuvent devenir toxiques s'ils sont présents en quantités excessives dans le milieu naturel et absorbés massivement par l'organisme. De ce fait, une étude de bioaccumulation/bioconcentration de certains métaux étudiés s'avère complémentaire et peut nous aider à élucider cette différence de toxicité.

En définitive, nos expériences montrent que les escargots répondent bien aux critères des bioindicateurs pour participer à la biosurveillance de l'environnement, en complément d'autres espèces des écosystèmes terrestres (oligochètes et arthropodes). De plus, comme ce sont des espèces comestibles pour l'homme, il convient d'être attentif sur l'origine des escargots récoltés dans la nature car les bords de routes à grande circulation, les voisinages d'usines ou la proximité de décharges peuvent occasionner des concentrations importantes en métaux dans leurs tissus, risquant alors de contaminer l'homme et être à l'origine de nombreuses maladies .

PERSPECTIVES

- Déterminer le taux des métaux lourds tels (Zn, Fe, Al...) au niveau des organes moux et la coquille d'*Helix aspersa* par Absorption atomique.
- Evaluation du Stress oxydant provoquer par ces molécules à travers le développer les des biomarqueurs (GSH, GST, CAT, MET, GPX, LDH, SOD.....ect).
- Réaliser une étude toxicologique sur les œufs et les juvéniles.
- Réaliser une étude sur les effets toxiques individuels des différents contaminants notamment sur des fonctions biochimiques (métabolisme cellulaire, synthèse protéique ...) et physiologiques (allocations énergétiques, processus neuronaux et neuroendocrines) et rechercher des corrélations multiparamétriques entre les effets à différents niveaux d'organisation.

Références Bibliographiques

- Amusan, A.A.S., Anyaele O.O., Lasisi A.A., 2002.** Effect of copper and lead on growth, feeding and mortality of terrestrial gastropod *Limicolaria flammea* (Muller, 1774). *Afr J Biomed Res* 5:47–50.
- Angélique, S. D., 2008.** Effets biologiques des nanoparticules manufacturées : influence de leur caractéristique. Thèse de Doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), France, 194P.
- Audibert, A., 2011.** *Folia conchyliologica n°10*, 68 rue Louis le Blanc ; 69006 Lyon, FRANCE. 5-18.
- Barker, G.M., ed., 2001.** The Biology of Terrestrial Molluscs. CABI Publishing, Oxon.
- Bailey, S.E.R., 1981.** Circannual and circadian rythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *J. Comp. Physiol.*, 142, 89-94.
- Beeby, A., Richmond, L., 2002.** Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators*, 1, 261-270.
- Bigorgne, I., 2011.** Ecotoxicite des nanoparticules et des sous produits d'alteration de dioxyde de titane sur le ver de terre, *Eisenia fetida*. Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine- Metz ,France,162P.
- Blasco, J., Puppo, J., 1999.** Effects of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine amino transferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol*, C 122, 253–263.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., Robbie, K., 2007.** Nanomaterials and nanoparticles : sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4):MR17–MR71.
- Bonnet, J. C., Vrillon, J. L., 1990.** L'escargot *Helix aspersa* biologie – élevage. Edition INRA, 14-15.
- Bouloudenine, M., 2006.** Elaborisation et caractérisation de semi-conducteurs magnétiques dilués de type $Zn_{1-x}Co_xO$ par voies chimiques. Thèse de Doctorat en Physique des Semi-conducteurs Thèse de Doctorat en Physique des Semi-conducteurs, Univ. Badji Mokhtar de Annaba, 186P.
- Carpenter, D.O., 1994.** The public health significance of metal neurotoxicity .*Cell .Mol.Neurobiol*, 6, 591-597.

Références Bibliographiques

Chabicoovsky, 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.

Chabicoovsky, M., Klepal, W., Dallinger, R., 2004. Mechanisms of cadmium Toxicity in terrestrial pulmonates programmed cell death and metallothioneins overload. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 648- 655.

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, 140*, 422 – 426.

Chapman, P.M., Wang, F., Janssen, C.R., Goulet, R.R., Kamunde, C.N., 2003. Conducting ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids: current status. *Human and Ecological Risk Assessment*, **9**, 641-697.

Chevallier, H., 1992. L'élevage des Escargots. Production et Préparation du Petit-Gris. 2ème édition. Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort.

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

Coeurdassier, M., 2001. Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnia stagnalis* et *Lymnia palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques. Thèse de doctorat, université de franche comté, France. 281p.

Coeurdassier, M., Gomot- de Vaufleury, A., Badot, P.M., 2000. Dose- Dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 2571-2578.

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**, 425-4.

Références Bibliographiques

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.

Cooke, M., Jackson, A., Nickless, G., Roberts, D.J., 1979. Distribution and speciation of cadmium in the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **23**, 445-451.

Crommentuijn, T., Doornekamp, A., van Gestel, C.A.M., 1997. Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Curr. Med. Chem*, **6**, 279– 309.

Dagnelie, P., 1999. Statistiques théoriques et appliquées. Tome 2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Univ De boeck et Larcier, 659p.

Dallinger, R., Berger, B., Triebkom, R., Kohler, H., 2001. Soil biology and ecotoxicology. In: Baker G.M. (Ed). The biology to terrestrial molluscs. *CAB International, Oxon, Wallingford, UK*, 489-525.

Dallinger, R. 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. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 245-289.

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

Descamps, M., Fabre, M.C., Grelle, C., Gerard, S., 1996. Cadmium and lead kinetics during experimental contamination and decontamination of centipede *Lithobius forficatus* L *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **31**, 350-353.

Edwards, C.A., Subler, S., Chen, S.K., Bogomolov, D.M., 1996. Essential criteria for selecting bioindicator species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems, *Kluwer Academic, Amsterdam*, 67-84.

Echaubard, M., 1995. Les animaux comme indicateurs biologique de pollution .ANPP.Colloque international marqueurs biologique de pollution/biological Markers of pollution .PSV Imprimerie, Cretiel, France, 335 -338.

Références Bibliographiques

El-Gendy, K. S., Radhwan. M. A., Gad.A .F., 2011. Feding and Growth Responses Of the Snail *Theba pisana* to Dietary Exposure. *Arch Environ Contam Toxicol*.

Ferin, J et al., 1992. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6 (5): 535-42.

Franklin, N., M. Rogers., N. J. Apte., S. C. Batley., G. E., Gadd., G. E., Casey., 2007.

Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology* 41(24) 8484-8490.

Frías-Espericueta, M., Abad-Rosales, S., Aidée ,C.N.V., IsidroOsuna ,L., Páez-Osuna.,F., Olvera , R.L., Voltolina,D ., 2008 . Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles, *Aquatic Toxicology*, 89,152157.

Gomot, A., 1997 a. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 33, 209-216.

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

Gomot, A., 1997b. Double labelling of neural grafts for identification of sites mediating growth in snails. *Biol. Cell*, 89, 133-140.

Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., Bruckert, S., 1989. Influence of soil on the growth on the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of absorption route for the stimulating factors. *J. Moll. Stud*, 55, 1-7.

Gomot-de Vaufleury, A., 2000 .Standardised growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb and pentachlorophenol) with *Helix aspersa* . *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46, 41-50.

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

Gomot-de Vaufleury, A., 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., Pihan, F., 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere*, 40, 275-284.

Références Bibliographiques

- Grara, N., Atailia, A., Boucenna, M., Berrebbah, H., Djebbar, M. R., 2012 a.** Toxicity of metal dust from Annaba steel complex (Eastern Algeria) on the morpho physiological parameters of the snail *Helix aspersa*. *Advances in Environmental Biology*. ISSN 1995-0756. 6(2): 605 - 611.
- Hellawell, J .M., 1986.** Biological indicators of freshwater pollution and environmental management .Elsevier Applied publishers, London and New –York, 530.
- Hervé-Bazin, B., 2006.** Nanoparticules : principales données toxicologiques actuelles, chargé de mission à la Direction scientifique, INRS VandoeuvrePafe. ADHYS, Paris, Page 1/14.
- Holbrook, D. R., Murphy, K. E., Morrow, J. B., Cole, K. D., 2008.** Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. *nature nanotechnology* 3(June 2008) 352-355.
- Hopkin, S.P., 1989.** Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier *Applied science*, NY, USA, 366 p.
- Hopkin, S.P., 1993.** In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. *Handbook of ecotoxicology*, 397-427.
- Hund-Rinke, K., Simon, M., 2006.** Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (tio₂) on algae and daphnids. *Environ Sci Pollut Res Int*, 13(4):225– 232.
- INERIS., 2008.** Associations La toxicité des nanomatériaux.
- 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.
- Jani, P., McCarthy, D., Florence, A., 1994.** Titanium dioxide (rutile) nanoparticle uptake from the rat gastrointestinal tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International journal of pharmaceuticals*, 105(2):157–168.
- Kahru, A., Dubourguier, H. C., Blinova, I., Ivask, A., Kasemets, K., 2008.** Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles: A Minireview.
- Kooistra, L., Leuven, R.S.E.W., Nienhuis, P.H., Wehrens, R., Buydens, L.M.C., 2001.** A procedure for incorporating spatial variability in ecological risk assessment of Dutch river floodplains. *Environmental Management*, 28, 359-373.
- Lademann, J., Weigmann, H.-J., Rickmeyer, C., Barthelmes, H., Schaefer, H., Mueller, G., Sterry, W., 1999.** Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 12:247–256.
- Lam, P.K.S., 1996 a.** Effects of cadmium on the consumption and absorption rates of a tropical freshwater snail *Radix plicatulus*. *Chemosphere*, 32, 2127-2132.
- Laskowski, R., Hopkin, P., 1995 a.** Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on Fitness in Snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34, 59-69.

Références Bibliographiques

- Laskowski, R., Hopkin, P., 1995 b.** Accumulation of Zn, Cu, Pb, and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): Implication for Predators. *Environmental Pollution*, 91, 289-297.
- Laskowski, R., Hopkin, P., 1996.** Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on Fitness in Snails (*Helix aspersa*) . *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34, 59-69.
- Lin, D., Xing, B., 2007.** Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut*, 150(2):243–250.
- Liu, R., Zhao, D., 2007.** Reducing leachability and bioaccessibility of lead in soils using a new class of stabilized iron phosphate nanoparticles. *Water research*, 41(12):2491–2502.
- Lovern, S. B., Klaper, R., 2006.** Daphnia magna mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem*, 25(4):1132–1137.
- Makhluf, S., Dror, R., Nitzan, Y., Abramovich, Y., Jelinek, R., Gedanken, A., 2005.** Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bactericide. *Advanced Functional Materials* 15(10) 1708-1715.
- 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, J.A., Angulo, E., Saez, V., 1986 c.** Feeding and growth responses to copper, zinc, mercury and lead in the terrestrial gasteropod *Arion ater* (Linné). *J. Moll. Stud.*, 52, 68-78.
- Martoja, R., Martoja, M., 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, 347.
- Molnár, G., Salánki, J., Kiss, T., 2004.** Cadmium inhibits GABA-activated ion currents by increasing intracellular calcium level in snail neurons. *Brain Res.* 1008, 205-211.
- Mule, M.B., Lomte, V.S., 1994.** Effect of heavy metals (CuSO₄ and HgCl₂) on the oxygen consumption of the freshwater snail *Thiara tuberculata*. *J. Environ. Biol.*, 15, 263– 268.
- Nanna, B. H., 2011.** Ecotoxicity of engineered nanoparticles to freshwater organisms PhD Thesis DTU Environment Department of Environmental Engineering Technical University of Denmark.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P. H., Sigg, L., 2008.** Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5):372–386.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., 2005.** Heavy metal concentration in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental pollution*, 138, 178-190.

Références Bibliographiques

- Ostiguy, C., Soucy, B., Lapointe, G., Woods, C., Ménard, L., 2008.** Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules. Technical report, IRSST – Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.
- Owen, R., Depledge, M., 2005.** Nanotechnology and environment: risks and rewards. *Marine Pollution Bulletin*. 50: 609-612.
- Pandey, S., Ahmad, I., Parvez, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2001:** Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channapunctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper pre-exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 41,345–352.
- Peake, J., 1978.** Distribution and ecology of stylommatophora. In *Pulmonates. Systematics, Evolution and Ecology* (Eds V. Fretter et J. Peake), Vol. 2A, Academic Press, London, 429-526.
- Petersen, H., Gjelstrup, P., 1998.** Effects of insecticide dimethoate on the behaviour of *Folsomia fimetaria* (L.) (Collembola: Isotomidae). *Appl. Soil. Ecol.*, 9, 389-392.
- Phillips, D.J.H., 1998.** Bioaccumulation. In *Handbook of Ecotoxicology* (ed P. Calow), Blackwell Science, Oxford, 378 -396.
- Porcel, D., Bueno, J.D., Almendros, A., 1996 .** Alterations in the digestive Gland and shell of the snail *Helix aspersa* Muller (Gastropoda, Pulmonata) after prolonged starvation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 115,11-17.
- Ramade, F., 1992.** Précis d'Ecotoxicologie. Masson, Paris.
- Rainbow, P.S., Dallinger, R., 1993.** Metal uptake, Regulation and Excretion in freshwater invertebrates, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 119-132.
- Russell, L.K., DeHaven, J.I., Botts, R.P., 1981.** Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol*, 26, 634-640.
- 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 p.
- Simkiss, K., Taylor, M.G., 1989.** Metal fluxes across the membrane of aquatic organisms. *Reviews in Aquatic Sciences*, 1, 173-188.
- Smith, C. J., Shaw, B. J., Handy, R. D., 2007.** Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*, 82(2):94–109.

Références Bibliographiques

- Swaileh, K.M., Ezzughayyar, A., 2000.** Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 47, 253-260.
- Swaileh, K.M., Ezzughayyar, A., 2001.** Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 47, 253-260.
- Tadjine, A., 2007.** Impact de la pollution atmosphérique d'origine particulaire sur deux modèles (le rat et le lapin). Approche histologique, biochimique, hématologique et toxicologique. Thèse de doctorat. Université de Annaba .104 p.
- Theron, J., Walker, J. A., Cloete, T. E., 2008.** Nanotechnology and water treatment: Applications and emerging opportunities. *Critical review in microbiology*, 34(1):43–69.
- Timmermans, K.R., 1993.** Accumulation and effects of trace metals in freshwater invertebrates. Lewis, Boca Raton, 134-147.
- Thomann, R. V., 1989.** Bioaccumulation model of organic-chemical distribution in aquatic food chains. *Environmental Science & Technology* 23 699-707.
- Triebkorn, R., Köhler, H.R., 1996.** The impact of heavy metals on the grey garden slug, *Deroceras reticulatum* (Müller): metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. *Environ. Pollut*, 93, 317-343.
- Triebkorn, R., Köhler, H.R., 1998.** Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. *Biomarkers*, 3, 109-127.
- Van Straalen, N.M., Burghouts, T.B.A., Doornhof, M.J., Groot, G.M., Janssen, M.P.M., Joosse, E.N.G., Van Meerendonk, J.H., Theeuwen, J.P.J.J., Verhoef, H.A., Zoomer, H.R., 1987.** Efficiency of lead and cadmium excretion in population of *Orcheslla cincta* (Collembola) from various contaminated forest soils. *J. Appl. Ecol.*, 24, 953-68.
- Van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M., 1998.** Soil invertebrates and micro-organisms. Blackwell Science, Oxford, 251-277.
- Viard, B., Maul, A., Pihan, J.C., 2004.** Standard use conditions of terrestrial gastropods in active bio monitoring of soil contamination. *Journal of Environmental Monitoring*, 6, 103-107.
- Viard - la rocca, B., 2009.** Mise au point et validation, sur sites contaminés, (ETM-HAP) d'un test de biosurveillance en microcosme : croissance et bioaccumulation par le gasteropode terrestre *Helix aspersa aspersa*. 21 p.

Références Bibliographiques

Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., Lanno, R.P., Peijnenburg, W.J.G.M., 2006b. Biological significance of metals partitioned to subcellular fractions within earthworms (*Aporrectodea caliginosa*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 807-14.

Witschger, O., Fabries, J. F., 2005a. Particules ultra-fines et santé au travail.1- Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *Hygiène et sécurité du travail*, 199 :ND2227.

Yamago, S., Tokuyama, H., Nakamura, E., Kikuchi, K., Kananishi, S., Sueki, K., Nakahara, H., Enomoto, S., Ambe, F., 1995. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem Biol*, 2(6):385–389.

Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., Xi, Z., 2008a. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials : The role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol*.

Yang, L., Watts, D. J., 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol Lett*, 158(2):122–132.

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

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

Zhang, Y., Chen, W., Zhang, J., Liu, J., Chen, G., Pope, C., 2007. In vitro and in vivo toxicity of CdTe nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 7, 497.

Références Bibliographiques

Webographie

[1]http://www.google.dz/search?q=carte+guelma&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=9qcUe_xEI3S4QT0oDQDw&sqi=2&ved=0CCsQsAQ&biw=1366&bih=632#imgrc=KaIiYK0JJZuCuM%3A%3BR_53jo3IU6kSM%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.dcwguelma.gov.dz%252Ffr%252Fimages%252Fstories%252Fguelma.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.dcwguelma.gov.dz%252Ffr%252Findex.php%252Fwilaya-guelma%3B1200%3B765.(03/03/2013)

[2]www.naturae-scientia.com.(20/02/2013).