



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCE

Spécialité: Biologie ANIMALE

Intitulé

**Impact de la pollution industrielle (métaux lourds) sur le développement et la reproduction de l'escargot *Helix aspersa*: Effets sur les biomarqueurs**

Présenté par: Melle. ATAILIA Amira

Membre de Jury:

DJEBAR Mohamed Réda (Professeur)	Président	Université d'Annaba
BERREBBAH Houria ( Professeur )	Directeur de thèse	Université d'Annaba
BOUSLAMA Zihad (Professeur)	Examineur	Université d'Annaba
ROUABHI Rachid ( Professeur )	Examineur	Université de Tébessa
TADJINE Aicha ( Professur)	Examineur	Université d'El Taref
KHATI Wyllia (M.C.A)	Examineur	Université d'El Taref

Année Universitaire: 2016/2017

## Remerciements

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

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

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

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

Mes sincères remerciements vont aussi à Madame TADJINE Aïcha Professeur à l'université D'El Tarf qui m'a fait l'honneur d'évaluer et d'examiner ce travail.

Mes sincères remerciements vont aussi à Monsieur Rouabhi Rachid Professeur à l'université de Tebessa qui m'a fait l'honneur d'évaluer et d'examiner ce travail.

Je remercie également Madame KHATI Wiliya, Maître de Conférences à l'université de El-Tarf d'avoir accepté de juger mon travail en qualité d'examinatrice.

Je remercie également mes collègues de l'université Badji Mokhtar Annaba et de l'université D'el Tarf .

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

Enfin, je tiens à remercier infiniment toute ma famille. Du fond du cœur, merci pour tous

## **Résumé :**

Le but de ce travail est d'évaluer les effets des poussières métalliques libérés par le complexe sidérurgique d'El Hadjar sur l'escargot terrestre *Helix aspersa* durant une exposition de long terme ( 12 semaines ) en laboratoire et *in situ* au niveau du site industriel d'El Hadjar.

Plusieurs paramètres sont testés : Les biomarqueurs de stress oxydant, l'accumulation du Fe et Pb, l'histopathologie, la croissance et le développement du tractus génital.

L'étude des biomarqueurs montre un état de stress oxydatif chez *Helix aspersa*, nos résultats révèlent une induction de la catalase et une inhibition de la GST ainsi qu'une diminution significative du taux de GSH, l'effet toxique des particules métalliques se traduit également par l'augmentation du taux de MDA, ces résultats sont observés chez les escargots transférés sur terrain et chez ceux exposés en laboratoire.

Le modèle biologique de la présente thèse montre un potentiel d'accumulation très important de métaux, en effet, l'hépatopancréas et le rein accumulent des quantités importantes de Fer et de Plomb. Cependant, nous avons mis en évidence une bioaccumulation élevée de Fer par rapport au Plomb.

L'aspect histologique de l'hépatopancréas et du rein et de la gonade a permis d'illustrer les atteintes tissulaires de l'exposition aux particules métalliques se manifestant par une hypertrophie cellulaire, des nécroses et une présence de particules sphériques sous forme d'amas confirmant ainsi la bioaccumulation des métaux .

Nous avons noté également un effet inhibiteur des poussières métalliques sur la croissance des escargots. Concernant la maturation du tractus génital des escargots, l'exposition à long terme aux poussières métalliques en laboratoire tend à diminuer le développement de la glande à albumen, de la gonade et du tractus génital.

**Mots clés :** *Helix aspersa* , CAT, GST, GSH, MDA, Bioaccumulation, , poussières métalliques, bio marqueurs.

**Abstract:**

The aim of this study was to evaluate the transfer and the effects of metal dust released by the steel complex of El Hadjar on the land snail *Helix aspersa* during long-term exposure (12 weeks) in the laboratory and *in situ* on the industrial site of El Hadjar. Several parameters are tested: The biomarkers of oxidative stress, the accumulation of Fe and Pb, histopathology, the growth and the development of genital tract. The biomarker shows a state of oxidative stress in *Helix aspersa*, our results indicate an induction of catalase and inhibition of GST as well as a significant decrease in the level of GSH, the toxic effect of metal particles also results by the increase in MDA levels, these results are observed in snails transferred to field and laboratory animals. The biological model of this work shows a potential of important accumulation of metals, indeed, digestive gland and kidney accumulate substantial amounts of Fe and Pb. However, we have demonstrated high bioaccumulation of Fe compared to Pb. Histopathology aspect of the digestive gland and kidney has illustrated the tissue damage from exposure to metal particles manifested by cellular hypertrophy, massive necrosis and presence of spherical particles form clusters confirming the bioaccumulation of metals. Regarding the growth of snails and maturation of the reproductive tract snails, long-term exposure to metal dust in the laboratory tends to decrease the development of snails and the albumen gland, gonad and genital tract.

**Keywords:** *Helix aspersa*, CAT, GST, GSH, MDA, bioaccumulation, metal dust, bio markers.

## الملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نقل وآثار الغبار المعدني الصادر عن مجمع الحديد والصلب بالحجار على حلزون الارضخلال التعرض لفترة طويلة (12 أسبوعا) في المختبر على موقع صناعي أرسيلورميتالتم اختبار العديد من المعلمات: المؤشرات الحيوية للأكسدة، وتراكم الحديد والرصاص، التثريح المرضي وتطور الجهاز التناسل تظهر العلامات البيولوجية حالة الأكسدة حيث أن نتائجا تشير إلى وجود نشاط في انزيمCAT وتثبيط نشاط GST.

فضلا عن انخفاض ملحوظ في مستوى الجلوتاثيون، والتأثير السام للجزيئات المعدنية يظهر أيضا من الزيادة في مستوياتMDA، ولوحظت هذه النتائج في حلزونات المخبر و حلزونات الموقع الصناعي.

النموذج البيولوجي لهذه الأطروحة يظهر إمكاناته الكبيرة في تكديس المعادن، في الواقع لاحظنا تراكم كبير للحديد و الرصاص على مستوى البنكرياس الكبدى و الكلى كما لاحظنا أن كميات الحديد مرتفعة مقارنة مقارنة بالرصاص.

التثريح المرضي للبنكرياس كبدى والكلى و الغدة التناسلية أظهر تلف الأنسجة نتيجة التعرض لجزيئات معدنية تجلى ذلك في تضخم الخلوي، نخر واسعة النطاق وجود جسيمات كروية تشكل مجموعات تؤكد التراكم البيولوجي للمعادن وفيما يتعلق بنمو الحلازونات وبنسوج الجهاز التناسلي، التعرض الطويل الأمد لغبار المعادن في المختبر يؤدي إلى تأخر نمو الحلزونات وتأخر تطور ، الغدد التناسلية والجهاز التناسلي.

**الكلمات الدالة :** CAT, GST, GSH, MDA *Helix aspersa*, حلزون تكديس حيوي, الغبار المعدني.

## Liste des Figures

N°	Titres des Figures	Pages
01	Modèle général décrivant le devenir des ETM. Adapté de (Walker et al., 2006).	6
02	Relations entre performance (P) (croissance, fécondité, survie, autres paramètres de santé...) et concentrations en élément essentiel (Ce) ou non-essentiel (Cne) dans la nourriture des organismes. Adapté de (Walker et al., 2006).	8
03	Différentes voies de contamination d' <i>Helix aspersa</i> (La Rocca, 2004)	13
04	Représentation graphique des niveaux de réponses attendus en fonction du niveau d'exposition à un facteur de stress (d'après van der Oost et al., 2003).	16
05	Schéma de l'appareil génital de l'escargot (Guyard, 2009).	22
06	<i>Helix aspersa</i> adulte a) photographie; b) Morphologie externe de l'escargot	24
07	Dispositif d'exposition des escargots <i>in situ</i>	26
08	Dispositif d'exposition des escargots en laboratoire	27
09	Anatomie de <i>Helix aspersa</i> sorti de sa coquille, avec représentation de la ligne de dissection séparant le pied des viscères et des principaux organes internes	28
10	Appareil génital de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	34
11	concentrations en Fer au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots <i>Helix aspersa</i> exposés aux poussières métalliques en laboratoire et les escargots placés sur terrain	45
12	concentrations en Plomb au niveau de l'hépatopancréas chez les escargots <i>Helix aspersa</i> exposés aux poussières métalliques en laboratoire et les escargots placés sur terrain	45
13	concentrations en Fer au niveau du rein chez les escargots <i>Helix aspersa</i> exposés aux poussières métalliques en laboratoire et les escargots placés sur terrain	47
14	concentrations en Plomb au niveau du rein chez les escargots <i>Helix aspersa</i> exposés aux poussières métalliques en laboratoire et les escargots placés sur terrain	47
15	Effet des poussières métalliques sur la croissance des escargots	57
16	Effet des poussières métalliques sur le développement de l'appareil génital d' <i>Helix aspersa</i>	59

## Liste des Planches

<b>1</b>	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 100 µg/g (B), 300 µg/g(C) , et 500 µg/g(D) de poussières métalliques.	<b>49</b>
<b>2</b>	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins du site de référence (A) et des escargots transférés sur le site industriel El Hadjar (B),	<b>50</b>
<b>3</b>	Coupes histologiques au niveau du rein des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 100 µg /g (B), 300 µg/g(C) 500 µg/g(D)	<b>52</b>
<b>4</b>	Coupes histologiques du rein des escargots témoins du site de référence (A) et des escargots transférés sur le site industriel El Hadjar (B)	<b>53</b>
<b>5</b>	Coupes histologiques de la Gonade des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 100 µg/g (B), 300 µg/g(C) , et 500 µg/g(D) de poussières métalliques	<b>55</b>
<b>6</b>	Coupes histologiques de la gonade des escargots témoins du site de référence (A) et des escargots transférés sur le site industriel El Hadjar (B)	<b>56</b>

## Liste des tableaux

N°	Titre des Tableaux	Pages
<b>01</b>	Classification des principaux ETM selon leur affinité pour des ligands oxygénés (classe A) , des ligands azotés ou soufrés (classe B ) et pour les deux types de ligands ( classe intermédiaires ) d'après (Nieboer et Richardson, 1980)	<b>1</b>
<b>02</b>	Composition en ppm des poussières rejetées par l'aciérie électrique 1 (ACE 1) et l'aciérie électrique 2 (ACE 2) du complexe sidérurgique d'El-Hadjar durant l'année (2008) (Tadjine et al., 2008).	<b>25</b>
<b>03</b>	Variations de l'activité GST au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez les escargots <i>Helix aspersa</i> exposés aux poussières métalliques en laboratoire .	<b>36</b>
<b>04</b>	Variations de l'activité GST au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez <i>Helix aspersa</i> du site de référence (Guelma) et des transférés sur le site industriel ( El Hadjar )	<b>37</b>
<b>05</b>	Variations de l'activité CAT au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez les escargots <i>Helix aspersa</i> exposés aux poussières métalliques en laboratoire .	<b>38</b>
<b>06</b>	Variations de l'activité CAT au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez <i>Helix aspersa</i> du site de référence (Guelma) et des transférés sur le site industriel ( El Hadjar )	<b>39</b>
<b>07</b>	Variations du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez les escargots <i>Helix aspersa</i> exposés aux poussières métalliques en laboratoire	<b>40</b>
<b>08</b>	Variations du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez <i>Helix aspersa</i> du site de référence (Guelma) et des transférés sur le site industriel ( El Hadjar )	<b>41</b>
<b>09</b>	Variations du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez les escargots <i>Helix aspersa</i> exposés aux poussières métalliques en laboratoire	<b>42</b>
<b>10</b>	Variations du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez <i>Helix aspersa</i> du site de référence (Guelma) et des transférés sur le site industriel ( El Hadjar )	<b>43</b>



## Liste des abréviations

Ag : Argent

BAF : Bioaccumulation factor

CAT : catalase

Cd : Cadmium

Cr : Chrome

Cu : Cuivre

ETM : Elément Trace Métallique

Fe : Fer

Fe<sup>2+</sup> : ion ferreux

Fe<sup>3+</sup> : ion ferrique

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GST : Glutathion S transférase

Hg : Mercure

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

LH : lysat hemocytaire

MDA: Malonedialdéhyde

Mn : Manganèse

MTs : métallothionéines

Ni : Nickel

OH• : Radical hydroxyle

O<sub>2</sub><sup>-•</sup> : Radical superoxyde

Pb : Plomb

ppm : Partie par million

ROS : Reactive oxygen species

SAA: Spectrophotométrie d'Absorption Atomique

SOD : Superoxyde dismutase

Zn : Zinc

# Sommaire

<b>Liste des tableaux</b>	<i>i</i>
<b>Liste des figures</b>	<i>ii</i>
<b>Liste des abréviations</b>	<i>iii</i>

## Chapitre I : Introduction Générale

1. Pollution des sols par les éléments traces métalliques (ETM)	1
2. Transfert des ETM dans les écosystèmes	2
3. Réponses des organismes aux ETM	5
3.1. Accumulation des ETM	5
3.2. Effets toxiques directs et indirects des ETM	7
3.2.1. Effets directs	7
3.2.2. Effets indirects	9
3.3. Les mécanismes de défenses	9
3.3.1. Elimination et séquestration	9
3.3.1.1. Granules	10
3.3.1.2. Protéines de liaison	11
3.3.1.3. Métallothionéines	11
3.3.1.4. Glutathion	12
4. Bioaccumulation et devenir des éléments trace métalliques chez l'escargot	12
4.1. Sources et voies d'expositions et d'absorption	12
5. La Bioindication	13
5.1. Bioindication passive et Bioindication active	15
6. Les Biomarqueurs: Définition , concepts et avantages	15
6.1. Définition	15
6.2. Biomarqueurs d'exposition, d'effet, de susceptibilité	17
6.3. Intérêt des biomarqueurs	18
7. Le Stress oxydant	18
7.1 . Différentes Formes de radicaux libres de l'oxygène (ROS)	18

7.2. Systèmes antioxydants	19
7.2.1 Systèmes antioxydants enzymatiques	20
7.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	20
8. L'utilisation de l'escargot en écotoxicologie	20
9. La reproduction de l'escargot <i>Helix aspersa</i>	21

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

1. Matériel biologique	24
2. Matériel chimique	24
3. Collecte et sélection des échantillons	25
4. Protocoles d'exposition	25
4.1. Exposition <i>in situ</i> : bioindication active	25
4.2. Exposition en laboratoire : Expérimentation en conditions contrôlée	26
5. Essais sur l'hémolymphe	27
6. Préparation et sacrifice des animaux	28
7. Méthodes de mesure des biomarqueurs biochimiques	28
7.1. Dosage de l'activité glutathion-S-transférase (GST)	28
7.2. Dosage de l'activité catalase	29
7.3. Dosage du Glutathion (GSH)	30
7.4. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	31
8. Détermination de la bioaccumulation des ETM par la (SAA)	32
8.1. Préparation des tissus et minéralisation	33
8.2. Dosage des éléments métalliques	33
9. Etude histologiques	33
10. Impact des poussières métalliques sur la croissance des juvéniles	34
11. Impact sur le développement du tractus génital des juvéniles	34
12. Analyse statistique des résultats	35

## **Chapitre III : Résultats**

1 .Effets des poussières métalliques sur les biomarqueurs biochimiques	<b>36</b>
1.1. Effet des rejets métalliques sur l'activité GST	<b>36</b>
1.2. Effet des rejets métalliques sur l'activité catalase	<b>38</b>
1.3. Effet des rejets métalliques sur le taux de glutathion (GSH)	<b>40</b>
1.4. Effet des rejets métalliques sur le taux du malondialdéhyde (MDA)	<b>42</b>
2. Bioaccumulation de Fer et de Plomb chez <i>Helix aspersa</i>	<b>44</b>
2.1 . Bioaccumulation de Fer et de Plomb au niveau de l'hépatopancréas	<b>44</b>
2.1 . Bioaccumulation de Fer et de Plomb au niveau du Rein	<b>46</b>
3. Etude Histopathologique	<b>48</b>
3.1. Au niveau de l'hépatopancréas	<b>48</b>
3.2. Au niveau du Rein	<b>51</b>
3.3. Au niveau de la Gonade	<b>54</b>
4 .Effet des poussières métalliques sur la croissance de <i>Helix aspersa</i>	<b>57</b>
5 .Effet des poussières métalliques sur le développement de l'appareil génital	<b>58</b>
<b>Chapitre IV .Discussion</b>	<b>60</b>
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>71</b>
<b>Références Bibliographiques</b>	<b>74</b>

## Introduction

Les problèmes posés par la dispersion de polluants dans l'environnement ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis maintenant de nombreuses décennies. La prise de conscience de la nécessité de préserver les écosystèmes terrestres et aquatiques a ainsi fait émerger certaines questions, notamment celles du devenir de ces polluants dans l'environnement ainsi que de leurs effets sur les communautés animales et végétales. Parmi les contaminants majeurs de l'environnement, les métaux lourds posent de sérieux problèmes écologiques, tant par le caractère ubiquiste de leur présence au sein de la biosphère que par leur forte rémanence et leur toxicité élevée

### 1. Pollution des sols par les éléments traces métalliques (ETM)

Les éléments trace sont les 68 éléments minéraux, constituants de la croûte terrestre, présentant une concentration inférieure à 0,1 % ( Alloway , 1995 ; Baize, 1997 ) . Ensemble ils ne représentent que 0,6 % du total des éléments. L'expression « éléments traces métalliques » fait référence aux métaux présents à l'état de trace tels que le cadmium (Cd) , le chrome (Cr) , le cuivre (Cu) , le nickel ( Ni) , le plomb (Pb) , le zinc ( Zn) .... Le terme « métaux lourds » basée sur la masse atomique de référence bien qu'il reste largement Utilisé , est sujet à discussion (Gimbert , 2006 ) , pour résoudre ces difficultés (Nieboer et Richardson, 1980 ) ont proposé une classification des ETM basée sur l'affinité des ETM avec certains ligands, plus précisément les ligands oxygénés (classe A), les ligands azotés ou soufrés (classe B) ou pour les 2 types de ligands (classe intermédiaire)

**Tableau 1.** Classification des principaux ETM selon leur affinité pour des ligands oxygénés (classe A) , des ligands azotés ou soufrés (classe B) et pour les deux types de ligands ( classe intermédiaires ) d'après (Nieboer et Richardson, 1980)

Classe A	Intermédiaire	Classe B
Calcium	Zinc	Cadmium
Magnésium	Plomb	Cuivre
Manganèse	Fer	Mercure
Potassium	Chrome	Argent
Strontium	Cobalt	
Sodium	Nickel	
	Arsenic	
	Vanadium	

Les sols peuvent présenter de fortes teneurs en ETM dues à des apports d'origine anthropique. Les principales sources de pollution des sols en ETM délibérées ou accidentelles sont : (1) les activités métallurgiques : activités minières, fonderie et industrie métallurgique, (2) les pratiques agricoles et horticoles (fertilisants, pesticides), (3) les boues d'épuration, (4) l'utilisation de combustibles fossiles, (5) l'industrie manufacturière et chimique, (6) les stockages de déchets, (7) les activités sportives de tir et pêche et (8) les zones d'entraînement militaire et les zones de combats (Van Den Hout et *al.*, 1999; Adriano, 2001).

Les sols sont affectés par des sources locales de polluants, le polluant est émis dans l'environnement à proximité (m à km) du sol où il sera retenu, ou depuis des sources éloignées (plusieurs km voire milliers de km). Lorsque des polluants (parmi lesquels les ETM) sont émis dans l'environnement, ils peuvent être transportés sur de larges distances et transférés entre l'atmosphère, l'hydrosphère la lithosphère et la biosphère. Le transport et le devenir des ETM à de larges échelles spatiales (échelles régionales et continentales) sont principalement contrôlés par les propriétés physico-chimiques du polluant lui-même mais aussi du média (atmosphère, océan...) et des surfaces de déposition (Van Den Hout et *al.*, 1999). Les sols pollués constituent une source d'ETM dans l'environnement, ils sont également un puits pour les ETM émis et constituent une source d'exposition majeure des organismes (Alloway, 1995)

## **2. Transfert des ETM dans les écosystèmes**

L'exposition d'un organisme est définie au sens strict comme le contact d'un organisme avec un agent chimique ou physique. L'exposition est donc le processus par lequel l'organisme acquiert une dose (USEPA, 1992; Suter II, 1993). Ainsi, l'exposition peut être définie comme la quantité d'un agent particulier qui atteint un organisme, système ou population cible à une fréquence spécifique pendant une durée définie (IPCS, 2004). L'exposition permet donc de décrire et quantifier le contact entre une cible (organisme) et un agent (polluant) et ainsi la possibilité et l'intensité du transfert du polluant du média (biotique ou abiotique) vers l'organisme, que ce soit par transfert non trophique ou trophique. Ce concept est essentiel en écotoxicologie puisqu'il est le déterminant du transfert des polluants

des compartiments abiotiques : l'environnement aux compartiments biotiques : organismes et entre compartiments biotiques (transfert trophique).

Les organismes sont exposés aux polluants lorsque le récepteur (organisme) et l'agent (polluant) co-existent dans le temps et l'espace et interagissent (Smith et *al.*, 2007). Cependant la co-occurrence est une condition nécessaire mais pas suffisante pour assurer l'exposition, et les interactions entre polluant et récepteur sont essentielles. Pour évaluer l'exposition passée, présente ou future d'un récepteur, il convient de caractériser l'intensité de l'exposition (souvent exprimée par la concentration de l'agent dans la ou les sources d'exposition pertinentes), la définir temporellement (fréquence et durée du contact...) et spatialement (usage de la zone, proximité de la source, surface exploitée...) (Fairbrother et *al.*, 2007; Smith et *al.*, 2007).

Les sources d'exposition sont les médias (compartiments biotiques et abiotiques) dans lesquels se trouve le polluant : l'eau, l'air, le sol ou les sédiments et la biomasse. Les voies d'absorption sont les voies par lesquelles le polluant pénètre dans le milieu intérieur. Le point d'exposition caractérise le lieu du contact entre polluant et cible. Enfin, la voie d'exposition peut être définie comme la voie de passage d'un polluant de la source vers une cible. Elle intègre donc la source d'exposition, le point d'exposition et la voie d'absorption, il s'agit de la description de la voie empruntée par le polluant depuis la source jusqu'à la cible (IPCS, 2004; Fairbrother et *al.*, 2007). Ainsi, lorsque l'on cherche à quantifier l'intensité de l'exposition d'un organisme, il convient de caractériser la voie d'exposition de l'organisme au polluant, en identifiant les quantités de polluant concernées dans la ou les sources pour chacune des voies d'exposition, à l'endroit où l'organisme et le polluant co-existent.

Par ailleurs, il convient de différencier la dose potentielle (quantité de polluant dans l'environnement aux lieux et temps d'exposition), la dose appliquée (quantité de polluant réellement en contact avec l'organisme), la dose interne (quantité de polluant qui traverse les barrières physiologiques et pénètre dans l'organisme) et enfin la dose biologique effective (quantité de polluant qui peut exercer un effet toxicologique) (USEPA, 1992).

Sur le terrain, il est en général possible de mesurer la dose potentielle (concentrations en polluant dans l'environnement) et la dose interne (quantité de polluant accumulé dans un organisme), des polluants persistants ou des polluants dont les mécanismes et les produits de

dégradation sont connus. L'évaluation de la dose appliquée et de la dose effective est plus compliquée, en raison des nombreuses variables environnementales et biologiques qui les influencent. En effet, de nombreux facteurs biologiques et écologiques modulent l'exposition des organismes en modifiant l'intensité, la durée et/ou la fréquence du contact avec le polluant (Peakall et Burger, 2003; Smith et *al.*, 2007). Ils sont notamment liés au mode de vie (milieu de vie, exploitation de l'habitat, taille du domaine vital...), au nourrissage (régime alimentaire, et comportement de nourrissage) et à différents traits d'histoire de vie (développement, reproduction) (Peakall et Burger, 2003; Smith et *al.*, 2007).

D'autre part, la contribution relative des voies d'exposition varie entre organismes et selon les sources de contamination et les polluants concernés. L'implication des différentes sources et voies et en conséquence les voies d'exposition peuvent varier drastiquement d'une situation à l'autre. Concernant plus précisément les polluants présents dans les sols, leur répartition verticale et horizontale conditionne les voies d'exposition mises en jeu. Par ailleurs, les contaminants présents dans les sols peuvent entraîner une exposition directe (contact, inhalation, consommation) ou indirecte par transfert dans les chaînes alimentaires.

Plus particulièrement, les mollusques gastéropodes terrestres peuvent être exposés via l'air, l'eau et le sol et la biomasse. Par exemple il a été montré que l'escargot petit gris *Helix aspersa* était exposé aux ETM par voie digestive, pulmonaire et tégumentaire (Gomot-de Vaufleury et Bispo, 2000; Coeurdassier et *al.*, 2002; Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2002; Regoli et *al.*, 2006; Scheifler et *al.*, 2006; Fritsch et *al.*, 2008). La contribution relative des différentes voies varie selon le polluant considéré et les conditions d'exposition. Les micromammifères sont soumis aux mêmes sources d'exposition que les escargots, mais leur principale source d'exposition aux polluants présents dans les sols est indirecte par l'ingestion de nourriture contaminée (Shore et Rattner, 2001; Smith et *al.*, 2007). L'ingestion accidentelle et l'inhalation de particules de sol peut aussi représenter une voie non négligeable, soit par ingestion de particules à la surface des aliments, ou encore lors du creusage d'un terrier ou de la toilette (McGeer et *al.*, 2004).

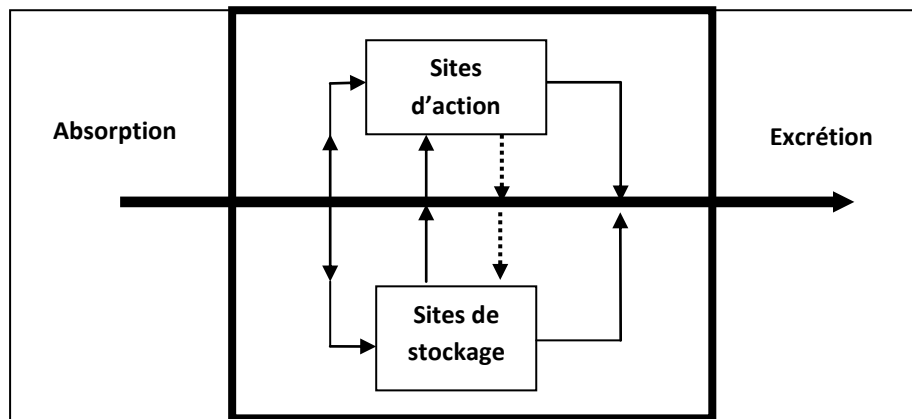


### 3. Réponses des organismes aux ETM

#### 3.1. Accumulation des ETM

Lorsque les métaux ont pénétré dans le milieu intérieur, par voie respiratoire, digestive ou cutanée, ils sont transportés via les fluides corporels (sang, lymphe, hémolymphe) ou par diffusion active ou passive à travers les membranes biologiques (Walker et *al.*, 2006; Fairbrother et *al.*, 2007). Concernant la voie d'exposition digestive, les métaux peuvent être éliminés sans passage dans le milieu intérieur, par évacuation directe via le transit intestinal. Après absorption, les métaux sont ensuite distribués dans les différents tissus de l'organisme. La distribution au sein de l'organisme dans le temps qui suit l'absorption dépend de la voie d'exposition, et varie ensuite au cours du temps selon les caractéristiques du métal et la physiologie de l'organisme ( Walker et *al.*, 2006). Les métaux peuvent alors être stockés dans des organes d'accumulation (souvent : os, foie, reins, hépatopancréas) et atteindre des organes cibles. Les organes d'accumulation sont parfois des organes cibles, mais pas nécessairement : par exemple, le Pb chez les mammifères a des effets neuro-, hépato- et néphro-toxiques alors que près de 90% est accumulé dans les os.

Le modèle général décrivant le devenir des polluants dans les organismes montre 4 sites d'interaction avec le métabolisme : les sites de stockage, les sites de métabolisation, les sites d'action et enfin l'excrétion . Le devenir des xénobiotiques métalliques diffère de celui d'autres xénobiotiques comme les composés organiques lipophiles dans la mesure où ils ne peuvent pas être métabolisés. Les métaux peuvent donc interagir avec le métabolisme par stockage, action ou excrétion (Figure 1)



**Figure 1. Modèle général décrivant le devenir des ETM. Adapté de (Walker et al., 2006).**

Les métaux peuvent être excrétés via les fèces ou l'urine après le passage dans le foie ou l'hépatopancréas en début de digestion (excrétion biliaire). L'excrétion peut aussi être réalisée par voie salivaire et par la sueur pour certains métaux chez les mammifères. Les ETM peuvent par ailleurs être éliminés par translocation et dépôt dans les éléments kératinisés (poils, griffes, plumes, exosquelette) qui seront remplacés au cours de la vie de l'organisme. Une élimination peut aussi exister par transfert dans le lait chez les mammifères, les œufs (oiseaux, reptiles, amphibiens, invertébrés) et le mucus chez les mollusques gastéropodes. Les ETM essentiels sont régulés par des mécanismes homéostatiques. Des mécanismes d'absorption, de stockage et d'excrétion leur sont donc dédiés, mais ces derniers peuvent également être « empruntés » par d'autres métaux dont les caractéristiques physico-chimiques sont suffisamment proches. Différents mécanismes d'antagonisme ou de synergie entre métaux peuvent intervenir durant l'absorption, le stockage ou l'excrétion des métaux (Walker et al., 2006; Fairbrother et al., 2007; Reeves et Chaney, 2008).

L'hypothèse générale concernant la toxicité des métaux est que les formes atteignant les sites d'action sont principalement des formes libres (formes ioniques), la détoxification des métaux étant majoritairement possible par séquestration sous des formes non toxicologiquement actives et non par métabolisation comme pour les polluants organiques (Paquin et al., 2002; Vijver et al., 2004). La toxicité, la compartimentation et les formes de stockage des métaux

dépendent non seulement de la physiologie des organismes mais également des caractéristiques physico-chimiques des métaux.

L'accumulation des métaux au sein de l'organisme est donc un processus dynamique, les concentrations internes représentant la balance entre l'absorption et l'élimination (Burger et *al.*, 2003; Luoma et Rainbow, 2005; Fairbrother et *al.*, 2007). Elle varie au cours du temps et peut être modélisé grâce à des approches toxicocinétiques (Loos et *al.*, 2009).

L'accumulation des ETM représente donc la première réponse des organismes à l'exposition aux ETM, et les concentrations accumulées représentent la dose interne appliquée à l'organisme et conditionnent les effets des ETM.

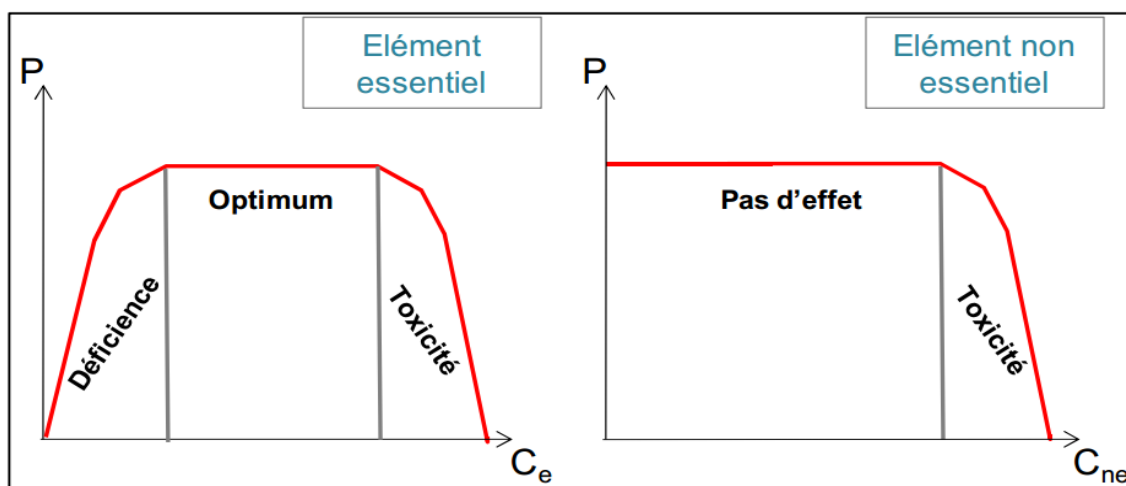
### **3.2. Effets toxiques directs et indirects des ETM :**

#### **3.2.1. Effets directs**

Les ETM induisent des effets toxiques chez les organismes vivants, c'est pourquoi ils sont reconnus au niveau international comme dangereux pour la santé des organismes et des écosystèmes (Baker et *al.*, 2003; Fairbrother et *al.*, 2007).

Les effets de l'exposition aux ETM peuvent être très variables selon le métal et l'organisme considéré ainsi que les doses mises en jeu. Il est cependant important de noter que des effets délétères peuvent intervenir à différents niveaux d'organisation biologique : effets sub-cellulaires, cellulaires, tissulaires, individuels, populationnels et communautaires (Albers et *al.*, 2000; Gomot-de Vaufleury et Kerhoas, 2000; Kammenga et Laskowski, 2000; Shore et Rattner, 2001; Peplow et Edmonds, 2005; Bertin et Averbeck, 2006; Walker et *al.*, 2006; Fairbrother et *al.*, 2007). En effet, les effets individuels peuvent se traduire par la mortalité des individus d'une part, mais aussi par un impact négatif sur les fonctions de reproduction ou encore génotoxiques, entraînant ainsi des modifications des dynamiques de populations. En conséquence, certaines espèces disparaissent des sites contaminés, d'autres sont sujettes à une réduction de l'abondance des individus, et ceci peut conduire à des modifications dans la structure et le fonctionnement des communautés.

Les réponses des organismes à l'exposition aux ETM sont fortement conditionnées par l'essentialité ou non des éléments, les éléments essentiels étant par définition nécessaires à la réalisation du métabolisme des êtres vivants. Ces derniers, s'ils ne sont pas présents en quantité insuffisante dans le milieu, la nourriture et/ou dans l'organisme peuvent induire des carences tandis que passé un certain seuil, ils peuvent devenir toxiques. Les éléments non-essentiels, en l'état actuel des connaissances, ne sont pas nécessaires aux organismes et peuvent être tolérés à des seuils traces puis devenir toxiques. Cette différence est capitale dans la mesure où elle implique que des mécanismes de régulation homéostatique existent pour gérer l'absorption, la distribution, la séquestration et l'élimination des métaux essentiels et maintenir de cette manière les concentrations internes à des niveaux optimaux.



**Figure 2. Relations entre performance (P) (croissance, fécondité, survie, autres paramètres de santé...) et concentrations en élément essentiel (C<sub>e</sub>) ou non-essentiel (C<sub>ne</sub>) dans la nourriture des organismes. Adapté de (Walker et al., 2006).**

Le Cd et le Pb sont des éléments non-essentiels pour les organismes, tandis que le Zn est un élément essentiel (Walker et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). Cependant, ces trois métaux peuvent être toxiques pour les organismes vivants selon les doses internes atteintes (Walker et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). La sensibilité des organismes aux ETM varie selon leurs caractéristiques physiologiques et génétiques, des différences de sensibilité peuvent donc être observées entre taxons, entre espèces et entre individus (Burger et al., 2003;

Peakall et Burger,2003). Cependant, le Cd et le Pb figurent parmi les éléments les plus toxiques pour de nombreux taxons.

### **3.2.2. Effets indirects**

Les effets délétères des ETM peuvent être indirects, et dû au coût métabolique induit par les mécanismes de régulation et de séquestration sous des formes non toxiques, et/ou par modification des ressources alimentaires notamment, en impactant l'abondance et la diversité des proies et/ou des compétiteurs. De la même manière que les effets toxiques directs, les effets indirects se traduisent à différents niveaux d'organisation biologique. Les effets des ETM sur le métabolisme peuvent être indirects lorsque la détoxification par excrétion ou stockage induit des coûts métaboliques perturbant les compromis énergétiques nécessaires pour assurer les fonctions métaboliques des organismes. Ainsi, le coût énergétique de l'excrétion et de la séquestration pourrait avoir une implication dans les allocations d'énergie des organismes et par conséquent sur la réalisation de leur métabolisme, leur santé et/ou leurs traits d'histoire de vie. Si conceptuellement il est admis que les mécanismes de défense représentent un coût métabolique et énergétique, peu de travaux ont démontré son impact et le coût de la tolérance à l'exposition aux ETM reste un sujet débattu (Kammenga et Laskowski, 2000). Si les causes ne peuvent pas être imputées de manière certaine aux coûts induits par la régulation, il apparaît que certaines espèces présentent une forte sensibilité à l'exposition aux polluants en ayant cependant de faibles concentrations internes. (Scheifler et *al.*, 2002)

## **3.3. Les mécanismes de défenses**

### **3.3.1. Elimination et séquestration**

Les réponses précoces des individus à la présence des ETM dans leurs tissus mettent en jeu des mécanismes biochimiques et physiologiques permettant l'élimination et/ou la séquestration des éléments.

Certains organismes présentent des capacités de régulation de leurs concentrations internes en ETM, en éliminant les ETM absorbés notamment par excrétion. Cette stratégie de régulation des concentrations internes permet de maintenir de faibles concentrations en ETM dans les tissus, limitant ainsi les possibilités d'interactions des ETM avec des sites de toxicité

D'autres organismes stockent les ETM dans leurs tissus sous des formes toxicologiquement inertes. Ce stockage constitue un mécanisme de tolérance qui peut permettre aux organismes de survivre dans des environnements contaminés en ETM. Les principales structures de séquestration sont des granules et des protéines, notamment des métalloprotéines dont les métallothionéines (MTs). Le stockage par séquestration dans des granules ou liaison à des protéines dépend principalement du métal concerné mais aussi des capacités physiologiques des organismes (Hopkin, 1989; Peakall et Burger, 2003; Vijver et *al.*, 2004; Walker et *al.*, 2006). Ainsi, le Cd et le Zn sont principalement stockés par liaison à des MTs bien que l'on puisse les trouver également dans des granules, tandis que l'inverse est observé pour le Pb.

La mise en place de mécanismes de défense contre les ETM, notamment l'induction de MTs, est considérée comme un marqueur d'exposition puisqu'elle constitue une réponse biochimique précoce des organismes à la présence d'ETM dans leurs tissus (Amiard et *al.*, 2006).

### **3.3.1.1. Granules**

Il existe plusieurs types de granules impliqués dans le stockage, le transport et l'excrétion des éléments (Brown, 1982; Hopkin, 1989; Dallinger et Rainbow, 1993; Vijver et *al.*, 2004; Walker et *al.*, 2006). On distingue 2 principaux types de granules impliqués dans la détoxification des métaux non-essentiels, les types A et B, qui sont des corpuscules d'inclusion intra-cellulaires. Les granules de type A sont constitués de couches concentriques de pyrophosphates et peuvent contenir des métaux de classe A et intermédiaire (Mn, Pb, Zn...). Leur rôle concerne la détoxification de certains métaux et l'excrétion, le stockage et la mobilisation d'éléments essentiels, et plus particulièrement du Ca. Les granules de type B proviennent du système lysosomal et contiennent de grandes quantités de soufre. Ils referment principalement des métaux des classes B et intermédiaire comme Cd, Cu, Hg, As et Zn mais aussi Pb. Ces granules proviendraient de la dégradation des MTs et semblent dédiés à la détoxification des métaux (Hopkin, 1989; Walker et *al.*, 2006). Chez des micromammifères, l'apparition de corps d'inclusion dans les reins est considérée comme une première manifestation toxique de l'exposition aux métaux (Shore et Douben, 1994; Shore et Rattner, 2001).

### 3.3.1.2. Protéines de liaison

Les métaux peuvent être liés à des protéines dans 2 cas principaux : les protéines qui requièrent un ion métallique comme part de leur structure (hémoglobine, hémocyanine...) et les protéines de transport/stockage. Les protéines de transport et/ou de séquestration jouant un rôle majeur dans les processus de régulation homéostatique ou de détoxification des ETM sont des métalloprotéines, liant plus ou moins spécifiquement certains métaux (par exemple protéines de liaison du Pb chez certaines espèces) et surtout des MTs.

### 3.3.1.3. Métallothionéines

Les MTs sont des protéines cytosoliques de faible poids moléculaire non-enzymatiques, riches en cystéine (donc en soufre), résistantes à la chaleur et observées dans tous les règnes du monde vivant (Dallinger et *al.*, 2000; Miles et *al.*, 2000; Vijver et *al.*, 2004; Amiard et *al.*, 2006; Klaassen et *al.*, 2009). Elles sont principalement impliquées dans les processus métaboliques d'absorption/excrétion et homéostatiques des métaux essentiels, la détoxification des métaux non-essentiels et la protection contre les radicaux libres (mécanismes anti-oxydants). Leur production est induite par de nombreux facteurs comme l'exposition aux ETM (Cd et Zn notamment, mais aussi Pb, Ni, Hg et Ag), des hormones, des cytokines, différents stress environnementaux et d'autres agents chimiques (xénobiotiques organiques par exemple) (Savva et *al.*, 2002; Swiergosz-Kowalewska et *al.*, 2007). Les inducteurs les plus puissants sont les métaux et les glucocorticoïdes. La synthèse des MTs est par ailleurs modulée par des facteurs liés au récepteur et à l'environnement comme la condition corporelle, le stade de développement, la température, les rayonnements ultra-violet, la photopériode ou encore la saison (Davis and Cousins, 2000; Miles et *al.*, 2000; Włostowski et *al.*, 2004; Swiergosz-Kowalewska et *al.*, 2007; Marques et *al.*, 2008). Les relations entre teneurs internes en ETM et MTs ont fait l'objet de nombreuses études et le rôle protecteur des MTs contre les effets délétères des ETM chez de nombreuses espèces est avéré. Ces études ont été menées tant en laboratoire qu'en milieu naturel chez les invertébrés (Włostowski et Krasowska, 1999; Park et *al.*, 2001; Amiard et *al.*, 2006; Klaassen et *al.*, 2009).

#### 3.3.1.4. Glutathion

Le glutathion (GSH) est le second composé hydrosulfure de faible poids moléculaire cytosolique majeur impliqué en tant que réactif cellulaire réducteur et ayant un rôle protecteur contre de nombreuses substances toxiques dont les ETM à travers son groupe de liaison SH (Swiergosz-Kowalewska, 2001). Le GSH semble agir de manière similaire aux MTs et joue un rôle dans la défense contre le stress oxydatif mais aussi d'autres fonctions cellulaires de détoxification des composés endogènes et exogènes (Swiergosz-Kowalewska, 2001).

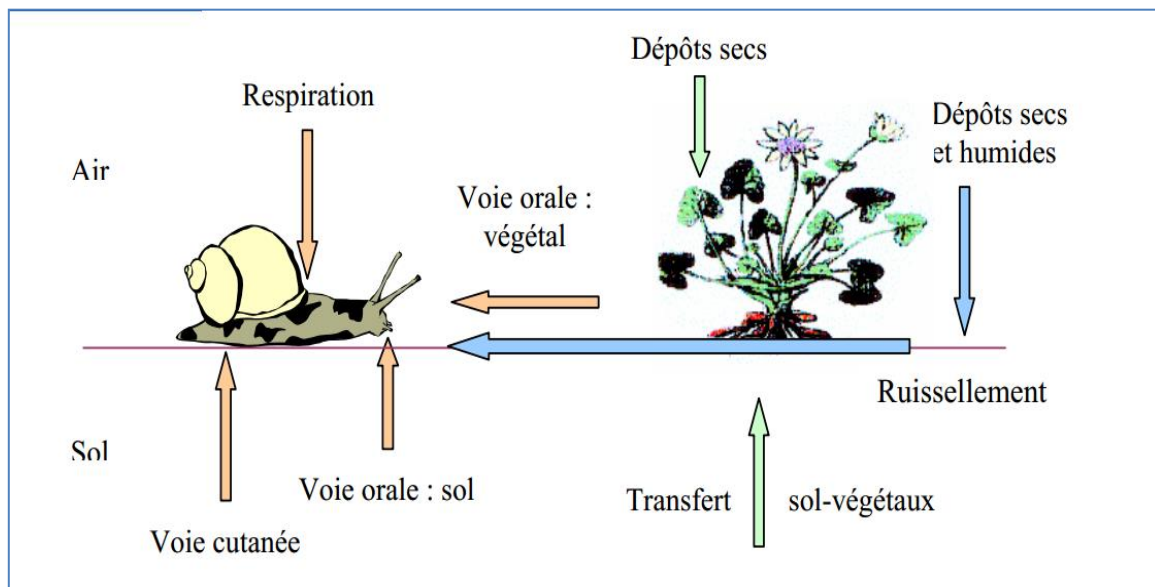
### 4. Bioaccumulation et devenir des éléments trace métalliques chez l'escargot

#### 4.1. Sources et voies d'expositions et d'absorption

A l'interface sol-plante-atmosphère, l'escargot intègre plusieurs sources de contaminations accessibles *via* différentes voies d'exposition :

- Digestive par ingestion de nourritures (plantes mais également particules de sols , (Gomot et *al.*, 1989) .
- Cutanée par diffusion des polluants du sol à travers l'épithélium du pied ( Coeurdassier et *al.* ,2002 ; Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2002 )
- Respiratoire par inhalation de gaz et /ou de particules atmosphériques ( Ismert et *al.* , 2002 ; Regoli et *al.*,2006)





**Figure 3 : Différentes voies de contamination d'*Helix aspersa* (La Rocca, 2004)**

Les fortes capacités d'accumulation des ETM chez les escargots sont liées à l'efficacité des systèmes de détoxification impliquant des structures de séquestration et compartimentation intracellulaire ( métallothionéines et granules ) mais aussi à leur capacités limités à excréter certains métaux , conditionnées notamment par la nécessité d'éviter la perte excessive d'eau (Dallinger et *al* ,2001)

## 5. La Bioindication

Les organismes vivants (plantes ou animaux) sont non seulement capables de donner des indications sur les caractéristiques « naturelles » d'un site mais donnent aussi des informations qualitatives et quantitatives sur les changements provoqués par les activités anthropiques (Markert, et *al.*, 1997). Blandin fut le premier, en 1986, à définir le concept de bioindicateur comme étant « un organisme ou un ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence, aussi précocement que possible, leurs modifications naturelles ou provoquées ».

La bioindication utilise des organismes animaux ou végétaux ; leur présence (espèces polluo-résistantes) ou leur absence (espèces polluo-sensibles) renseigne sur les caractéristiques écologiques de leur habitat. Le rôle d'organisme bioindicateur dépend des caractéristiques biodémographiques, du mode de vie et de la taille des organismes

Les gastéropodes terrestres, dont les escargots sont considérés comme des bioindicateurs pertinents car ils répondent parfaitement aux critères suivants

- présent dans les aires polluées et tolérance importante aux variations de l'environnement,
- facile à élever et à transférer,
- organismes sédentaire, à large répartition géographique,
- espèces abondante et facile à récolter,
- durée de vie assez longue,
- taille suffisante pour analyses in toto ou par organe.

Ils évoluent à la surface du sol en mangeant des végétaux et du sol et, de plus, une partie de leur cycle biologique (hivernation, ponte, développement embryonnaire) se déroule dans le sol à partir du quel ils absorbent alors les nutriments et les contaminants. Ils sont connus pour leur grande capacité d'accumulation des ETM et leur tolérance importante à de fortes concentrations dans l'environnement : ils appartiennent aux bioindicateurs par bioaccumulation. Cette résistance provient de leur capacité à retenir et inactiver les métaux toxiques, soit par compartimentalisation cellulaire (granules...) et excrétion, soit par liaison des métaux à des protéines, dont les métalloprotéines, pour de longues périodes ( Berger et *al.*, 1993 ; Dallinger, 1993 ; Gomot de Vaufleury, 2000).

Les teneurs retrouvées dans ces organismes sont, le plus souvent, en relation avec le niveau de contamination du milieu : ils sont donc utilisés comme bioindicateurs de contamination par les ETM. La plupart des métaux s'accumule principalement dans la glande digestive (Rabitsch, 1996 ; Berger et Dallinger, 1993, Dallinger, 1993), suivi par le rein et le pied. Seul le cuivre est distribué dans tous les organes car il intervient dans la composition de l'hémocyanine, protéine respiratoire transportant l'oxygène dans l'organisme (Rabitsch, 1996). Les niveaux de bioaccumulation en éléments métalliques dans différentes espèces de gastéropodes terrestres dépendent d'une part, des concentrations en ETM rencontrées sur les

sites à étudier, mais aussi des caractéristiques biologiques propres à chaque espèce : *Helix aspersa* est un macroconcentreur de cuivre (BAF compris entre 1,5 et 10) et de cadmium (BAF compris entre 3 et 8) et un microconcentreur de zinc (BAF compris entre 1 et 2) alors que *Helix pomatia* est un macroconcentreur de cadmium et de zinc et un microconcentreur de plomb ( La Rocca ,2004)

### **5.1. Bioindication passive et Bioindication active**

La bioindication passive est basée sur le prélèvement d'organismes sauvages autochtones exposés de manière chronique sur les sites pollués, tandis que la bioindication active consiste en l'exposition d'organismes naïfs par l'expérimentateur sur le site contaminé. Dans le premier cas, les mesures concernent une exposition chronique et à long terme donc une intégration temporelle des phénomènes d'exposition et d'effets, et permettent d'étudier les réponses des organismes dans des conditions écologiquement représentatives. Par contre, il n'est pas possible de connaître précisément le moment et/ou l'endroit de l'exposition au polluant .Dans le second cas, l'intérêt est de connaître le passé des individus, leur âge et autres caractéristiques individuelles pouvant influencer le niveau d'expression du paramètre mesuré, mais aussi de connaître le lieu et la durée d'exposition ce qui facilite l'interprétation des réponses observées et l'évaluation de relation dose/réponse.(Fritsch,2010)

## **6. Les Biomarqueurs: Définition , concepts et avantages**

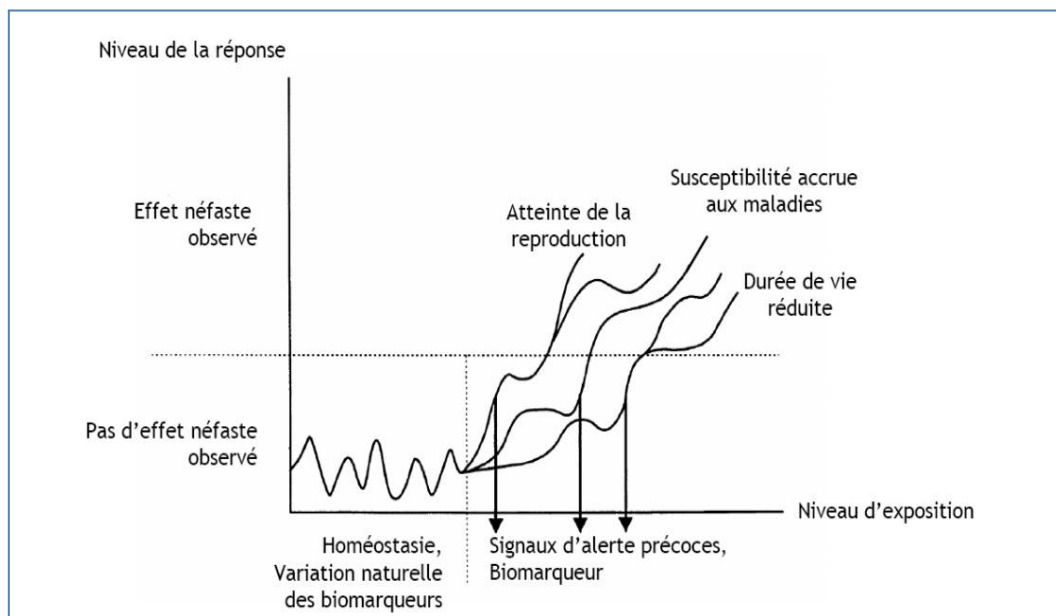
### **6.1. Définition**

Différentes définitions ont été données au terme "biomarqueur". Ce terme est généralement utilisé dans un sens très large, incluant quasiment toutes les mesures reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel ; ce danger pouvant être chimique, physique, ou biologique (Who, 1993).

La définition ayant été retenue par (Lagadic et *al.*,1997) est la suivante : un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant.

Ce changement peut alors être associé à l'exposition en elle-même, aux effets toxiques ou à la sensibilité vis-à-vis du contaminant environnemental (Peakall, 1994). Selon Depledge (1994), au delà d'une certaine pression toxique (exposition à des concentrations et/ou des durées importantes), on considère que le métabolisme basal des organismes suffit à assurer le maintien de leur homéostasie. En d'autres termes, le fonctionnement des différentes structures et activités biologiques "tamponne" l'action des polluants sur les individus lorsque celle-ci est relativement limitée. En effet, qu'elles soient spécifiquement impliquées dans la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures ou non, certaines molécules biologiques ont la particularité de réagir à la présence de toxiques dans le milieu.

Néanmoins, au-delà d'un certain seuil (en termes de concentration du contaminant ou de temps de contact), les capacités de maintien de l'homéostasie peuvent être dépassées, ceci pouvant finalement mener à la manifestation d'effets néfastes à des niveaux hiérarchiques supérieurs (Fig. 4). Ainsi, lorsque les capacités de compensation ne sont plus suffisantes pour limiter l'action des polluants toxiques, l'état de santé des individus contaminés peut évoluer vers une dégradation, réversible ou non selon le degré d'atteinte toxique.



**Figure 4. Représentation graphique des niveaux de réponses attendus en fonction du niveau d'exposition à un facteur de stress (d'après van der Oost et *al.*, 2003).**

## 6.2. Biomarqueurs d'exposition, d'effet, de susceptibilité

Il est classique, en écotoxicologie, de distinguer trois types de biomarqueurs: les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique, les biomarqueurs d'effet de l'exposition et les biomarqueurs de sensibilité aux effets (Lagadic *et al.*, 1997 ; van der Oost *et al.*, 2003).

Les biomarqueurs d'exposition sont des indicateurs de la contamination des systèmes biologiques par un (des) xénobiotique(s). Ils peuvent être le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et/ou dans des liquides corporels (métabolites spécifiques de la conjugaison au glutathion, adduits à l'ADN, etc.). Dans ce cas, leur suivi consiste en la détection au sein d'un individu de métabolites issus de la métabolisation du xénobiotique ou de produits issus de son interaction avec certaines biomolécules ou cellules cibles (adduits à l'ADN par exemple). Les biomarqueurs d'exposition peuvent également prendre la forme d'activités ou de quantités anormales d'enzymes (telles que celles impliquées dans les activités de biotransformation). En effet, certaines enzymes sont capables d'être induites ou activées par les polluants, cette induction pouvant revêtir un caractère plus ou moins spécifique d'un type de polluant donné.

L'utilisation des biomarqueurs d'effet permet de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et, qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, a exercé un effet toxique sur une cible critique. Il s'agit donc d'altérations (biochimiques, physiologiques ou autres) mesurables au sein des tissus ou des fluides corporels d'un organisme et pouvant être reconnues comme étant associées de manière avérée statistiquement ou possible du point de vue mécanistique à une pathologie ou un état sanitaire altéré.

Les biomarqueurs de susceptibilité indiquent quant à eux la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre au stress induit par l'exposition à un xénobiotique. Cette catégorie de biomarqueurs peut donc notamment inclure des facteurs génétiques. En effet, cette sensibilité individuelle peut résulter de polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (tels que les gènes codant pour les isoenzymes des mono-oxygénases à cytochrome P450, les glutathion-S-transférases, les N-acétyl-transférases) ou dans la réparation des lésions de l'ADN (tels que les gènes impliqués dans la réparation des bases et dans la réparation des cassures de brins). Néanmoins, malgré l'intérêt croissant suscité par le phénomène de variation d'origine génétique de la réponse à la contamination par les polluants, les études incluant le suivi de biomarqueurs de susceptibilité sont rares. Les

facteurs impliqués sont en effet très complexes tant au niveau de la multiplicité des nuisances rencontrées en milieu environnemental que de la multiplicité des voies métaboliques et des mécanismes de réponse (Depledge et *al.*, 1994; Lagadic et *al.*, 1994)

### **6.3. Intérêt des biomarqueurs**

Les biomarqueurs présentent l'avantage d'une évaluation intégrée dans le temps de l'exposition ou de l'effet des polluants environnementaux biodisponible, qu'ils agissent de molécules mères ou de produits de dégradation, seuls ou en mélange, ils restituent à un instant donné une image intégrative des variations qualitatives et quantitatives de la contamination. Ils sont susceptibles de refléter l'exposition des organismes à des polluants rapidement métabolisables et peu accumulables. Les espèces supports sélectionnées pour l'étude de la réponse des biomarqueurs peuvent en fonction de leur habitat et de leur position dans le réseau trophique, fournir des informations sur la façon dont se comportent les polluants des écosystèmes (Lagadic et *al.*, 1997 ; Stegeman et *al.*, 1992)

Les biomarqueurs présentent donc un caractère intégrateur important, ils permettent une évaluation géographique et temporelle de la contamination des milieux et des effets associés (Wilfried, 2007)

## **7. Le Stress oxydant**

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

### **7.1 . Différentes Formes De Radicaux Libres De L'oxygène (ROS)**

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule.

L'O<sub>2</sub> est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leur orbitale externe deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en O<sub>2</sub>•- puis en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS) L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde (O<sub>2</sub>•-), radical hydroxyle (OH•) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

L'anion superoxyde (O<sub>2</sub>•-) est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet O<sub>2</sub>•- entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production. Selon la réaction de Fenton, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>), en un ion OH<sup>-</sup> et un radical hydroxyle (OH•) [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> → OH• + OH<sup>-</sup> + Fe<sup>3+</sup>]. Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde (O<sub>2</sub>•-) qui régénère Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> selon la réaction d'Haber-Weiss [O<sub>2</sub>•- + Fe<sup>3+</sup> → O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup>]. Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), d'anion superoxyde (O<sub>2</sub>•-) et de fer permet la production de radical hydroxyle (OH•). L'OH•, avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L'OH• apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS (Gutteridge et Halliwell, 1992).

## 7.2. Systemes Anti-Oxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Dröge, 2002 ; Packer et al, 1997 ; Powers et Lennon, 1999).

### 7.2.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS

### 7.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C.

## 8. L'utilisation de l'escargot en écotoxicologie

L'escargot *Helix aspersa* juvéniles et adultes sont utilisés dans de nombreuses études écotoxicologiques. En effet, de par leur place au sein de l'écosystème terrestre, ils représentent une biomasse significative au sein de la communauté des invertébrés du sol (Dallinger et al., 2001)

Les petit-gris sont des bioindicateurs d'exposition et d'effets de polluants métalliques (Fritsch et al., 2011 ; Grara et al., 2009, 2012 ; Boucenna et al., 2015) ou organiques (Coeurdassier et al., 2002 ; De Vaufleury et al., 2006 ) et ce aussi bien dans les chaînes trophiques (Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2000; Hispard et al., 2008), que dans l'évaluation des cinétiques de transfert milieu-escargot (Gimbert et al., 2006, 2008).

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



## 9. La reproduction de l'escargot *Helix aspersa*

La reproduction des escargots a lieu au printemps et en été. Les escargots terrestres sont Hermaphrodites protandres (d'abord mâles puis femelles) et s'accouplent une ou plusieurs fois avant la ponte. Au cours de l'accouplement réciproque, ils vont échanger leurs spermatophores qui contiennent les spermatozoïdes. La fécondation croisée est la règle générale, l'autofécondation étant extrêmement rare. Lors de l'accouplement, il se peut qu'un seul des deux escargots reçoive un spermatophore du fait que les spermatozoïdes ne soient pas encore arrivés à maturation chez l'autre escargot. En effet, ils ne sont pas tous matures au même moment du fait de l'asynchronisme du développement du tractus génital pendant la Croissance (Bride et Gomot, 1991).

Avant l'accouplement, les deux escargots effectuent une parade amoureuse durant laquelle ils se touchent avec leurs tentacules puis pour initier l'accouplement, ils piquent le pied du partenaire avec un dard calcaire, fabriqué dans la poche du dard. Ils se placent ensuite tête-bêche pour que leurs orifices génitaux soient en vis-à-vis et permettent l'introduction réciproque des pénis.

L'accouplement peut durer plus de 12h. Les spermatozoïdes échangés, préalablement développés dans l'ovotestis (également appelé gonade), rejoignent le réceptacle séminal ou la spermathèque divisée en tubules où ils vont être conservés jusqu'à la maturation des ovules. La fécondation a lieu au niveau de la chambre de fertilisation, à la surface de la glande à albumen, généralement une quinzaine de jours après l'accouplement. Les ovocytes fécondés sont alors entourés d'albumen sécrété par la glande à albumen, qui constitue les réserves nutritives pour le développement embryonnaire, puis d'une coque calcaire. Pour pondre, l'escargot creuse avec sa tête une cavité d'une profondeur de 2-3 cm dans le sol, et y dépose une ponte constituée d'une centaine d'œufs en moyenne. La ponte peut durer jusqu'à 36 heures. Les œufs vont ensuite se développer pendant 12-15 jours avant d'éclore. Les escargots éclos remontent ensuite en surface, ce qui peut encore prendre 4 à 5 jours (Le Calve, 1989). Les jeunes éclos pèsent alors environ 25-35 mg.

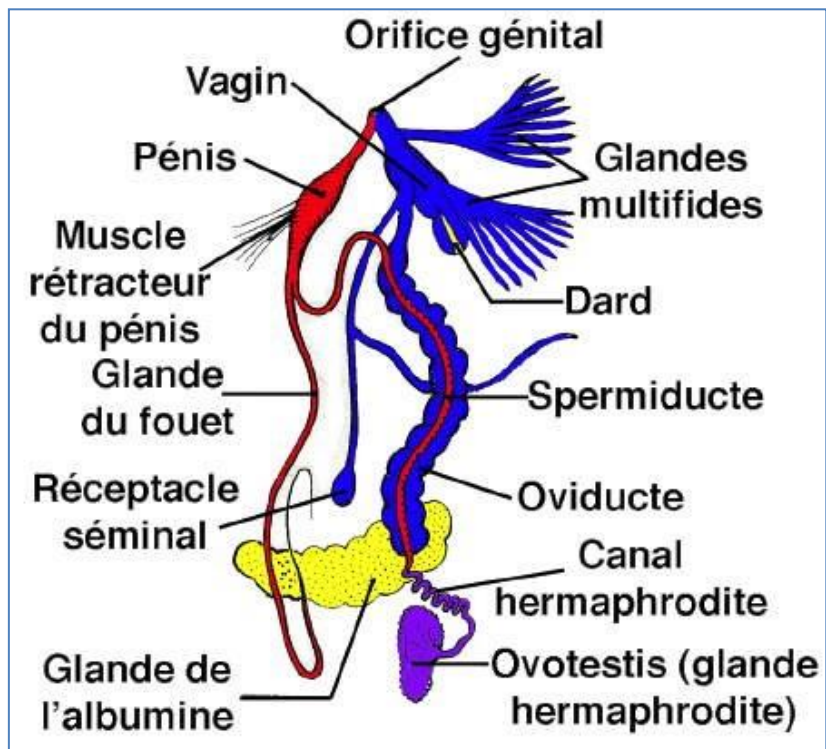


Figure 5 : Schéma de l'appareil génital de l'escargot (Guyard, 2009).

## Objectifs

L'objectif principal de ce présent travail est l'évaluation de la toxicité des poussières métalliques libérées par le complexe sidérurgique d'EL Hadjar .

Dans le but d'aborder au mieux cette étude, il nous a paru pertinent d'utiliser l'escargot terrestre *Helix aspersa* d'une part pour l'évaluation de la toxicité des ETM en laboratoire afin d'obtenir des données de relation dose/réponse , et d'un autre coté nous avons utilisés ces organismes dans la bio indication active , les escargots ont donc été implantés sur le site à étudier au niveau du complexe sidérurgique d'EL Hadjar , ce qui nous a permis d'évaluer les effets de la pollution métallique *in natura* en conditions réelles.

Un autre facteur souvent négligé dans la recherche écotoxicologique actuelle est le temps. La plupart des tests de toxicité actuels reposent sur des durées d'exposition courtes : de 24 à 96 heures pour les tests de toxicité aigue , généralement 28 jours pour les tests de toxicité subchronique. (Gimbert ,2006). si ces tests répondent aux exigences d'une utilisation en routine et s'ils apportent des informations nécessaires à la gestion des risques environnementaux, leur courte durée présente plusieurs inconvénients :

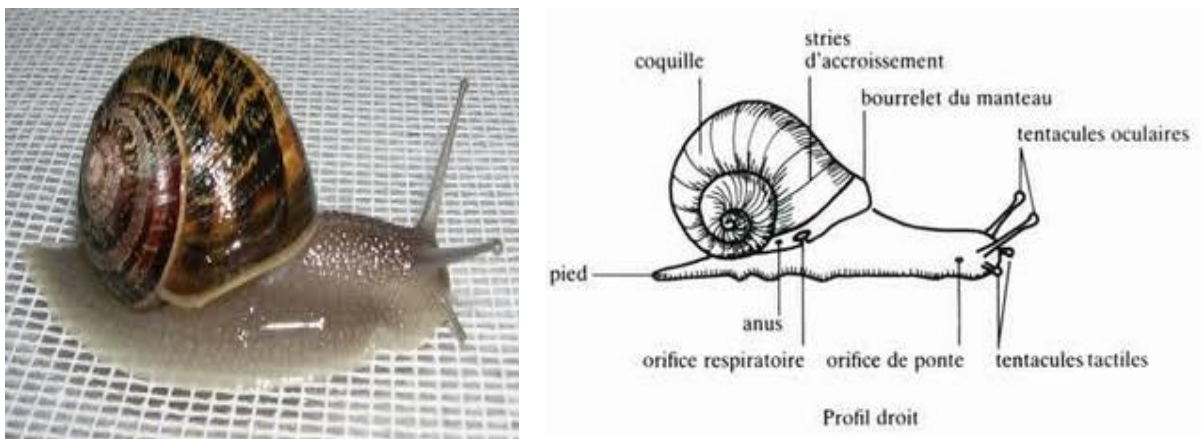
- ✓ L'observation d'effets toxiques nécessite l'exposition à des concentrations souvent élevés
- ✓ La dynamique physiologique de l'accumulation est occultée
- ✓ Les résultats ne sont très souvent pas représentatifs des situations observables en milieu naturel

La réalisation d'expositions chroniques à des concentrations réalistes au cours desquelles les concentrations internes et les réponses physiologiques sont mesurées doit permettre de pallier au moins en partie à ces défauts Cette thèse s'inscrit dans cette problématique.

Les bioessais de cette étude ont été réalisés au laboratoire de toxicologie cellulaire, du département de biologie, université Badji Mokhtar Annaba. L'étude de la bioaccumulation des poussières métalliques a été réalisée au laboratoire (Lab-Horizon) Annaba. Les coupes histologiques ont été réalisées au service d'Anatomo-pathologie de l'hôpital D' El Tarf.

### 1. Matériel biologique :

*Helix aspersa aspersa*, plus connu sous le nom d'escargot des jardins ou Petit-gris, utilisé au cours de nos expériences, est un mollusque gastéropode pulmoné stylomatophore appartenant à la famille des Helicidae. Adulte (Fig. 6), sa taille varie entre 25-35 X 25-40 mm, avec une coquille globuleuse brun pâle de 4,5 à 5 tours et un ombilic complètement fermé.



**Figure 6 : *Helix aspersa* adulte a) photographie; b) Morphologie externe de l'escargot (d'après Kerney *et al.*, 2006).**

### 2. Matériel chimique

Les poussières métalliques utilisées dans notre étude ont été collectées à partir du complexe sidérurgique d'El-Hadjjar (Annaba), une analyse chimique par absorption atomique a été réalisée pour déterminer la composition de ces poussières. Cette analyse a déterminé la présence de sept ETM indiqués dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

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

Echantillon	Cu	Zn	Pb	Cr	Ni	Mn	Fe
<b>Poussières ACE1</b>	3,7	240	24	10	1,2	320	3000
<b>Poussières ACE 2</b>	7	480	62,4	12	1,3	540	36000
<b>Total</b>	10,7	720	88,4	22	2,5	860	6600

### 3. Collecte et sélection des échantillons

Les escargots sont fournis par une ferme d'élevage d'escargots à Bouchegouf (Wilaya de Guelma) site de référence considéré comme non pollué. Les escargots adultes sont triés selon la taille et le poids. Nous avons choisi ceux dont le poids moyen est de l'ordre de  $9,5 \pm 0.15$ g,

### 4. Protocoles d'exposition

#### 4.1. Exposition *in situ* : bioindication active

Les escargots sont implantés sur le site d'étude situé au niveau du complexe sidérurgique d'EL-Hadjar.

Les escargots sont répartis en 2 lots de 40 individus et exposés en microcosmes ( cages métalliques  $45 \times 35 \times 25$  cm ). Ces cages sans fond sont placées sur le sol de manière à ce que les escargots puissent avoir accès à la nourriture présente sur le site pendant 12 semaines (Fig.7).



**Figure 7 : Dispositif d'exposition des escargots *in situ***

#### **4.2. Exposition en laboratoire : Expérimentation en conditions contrôlées :**

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

Ils sont répartis dans des boites en plastique transparentes (40 x35x15 cm), avec un couvercle perforé, chaque boite contient une éponge mouillée pour maintenir de l'humidité. L'alimentation (farine de blé) est fournie dans des boites de pétrie. Les boites sont nettoyées régulièrement tous les 2 jours.

Après 15 jours d'adaptation aux conditions de laboratoire, les animaux sont traités par addition de concentrations croissantes de poussières métalliques dans l'alimentation. Nous avons retenu 3 concentrations et un milieu témoin (100, 300, 500 µg/g d'aliment). Le traitement a duré 12 semaines (Fig. 8).



**Figure 8 : Dispositif d'exposition des escargots en laboratoire**

## **5. Essais sur l'hémolymphe**

### **a. Prélèvement de l'hémolymphe**

Après avoir pratiqué une fenêtre dans la coquille préalablement nettoyée à l'eau distillée, le vaisseau antérieur est atteint au niveau de l'emplacement du cœur. L'hémolymphe est ensuite prélevée à l'aide d'un capillaire biseauté selon la méthode de (Letellier, 2010), ainsi environ 300  $\mu$ l d'hémolymphe est obtenu à partir de chaque escargot.

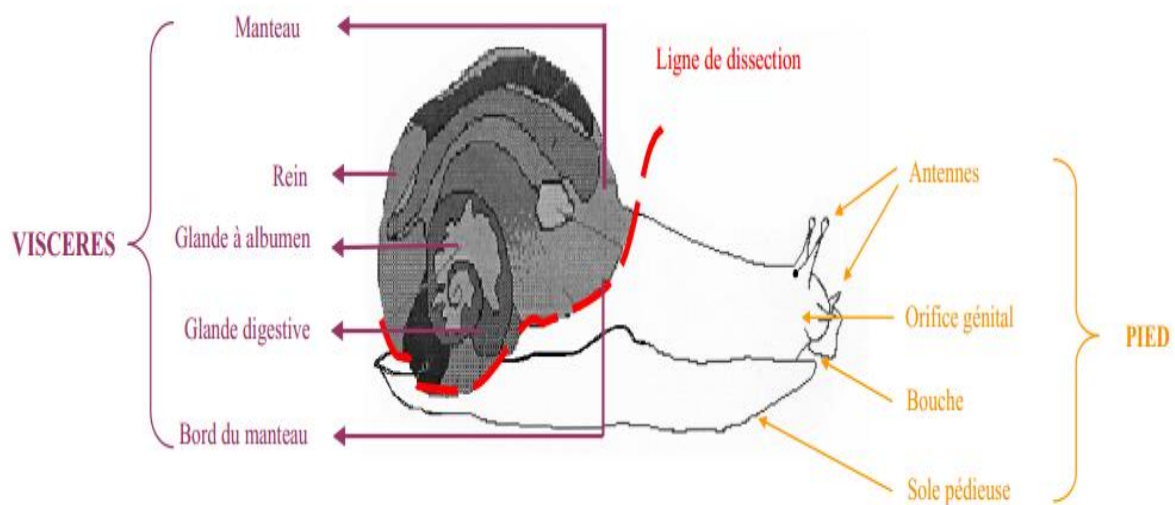
### **b. Séparation du plasma des hémocytes et préparation du lysat hémocytaire**

L'hémolymphe est centrifugée à 15000 rpm pendant 45 min à 4C° pour recueillir le sérum. le lysat hémocytaire (LH) est obtenu en suivant la même procédure que celle décrite par Gopalakrishnan et *al.* (2009,2011).



## 6. Préparation et sacrifice des animaux

Après exposition, les escargots sont soumis à un jeûn pendant deux jours afin d'éliminer la nourriture non absorbée et les fèces de leur tractus digestif. Les animaux sont ensuite sacrifiés par congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$ , La dissection des escargots permet de séparer le pied des viscères, au niveau du bord du manteau (Fig. 9).



**Figure 9 : Anatomie de *Helix aspersa* sorti de sa coquille, avec représentation de la ligne de dissection séparant le pied des viscères et des principaux organes internes (La Rocca ,2004)**

## 7. Méthodes de mesure des Biomarqueurs Biochimiques :

Les dosages des biomarqueurs sont effectués sur la glande digestive, le plasma et le lysat hémocytaire (LH)

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

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



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

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

$$\text{GST } (\mu\text{mol /mn /mg prot}) = \frac{(\Delta \text{DO} \times V)}{e \times d \times v \times \text{mg de prot}}$$

## 7.2. Dosage de l'activité catalase :

L'activité catalase (CAT) est mesurée selon la méthode de Regoli et Principato, (1995) par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ( $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) en faisant réagir dans 100 Mm de tampon phosphate pendant 1mn à pH 7,5 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 mM) sur 20 µl d'homogénat, à 25 °C. Les résultats sont exprimés en µmol d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minute et par mg de protéines.

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel contient 20 µl de surnageant, 200 µL de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) et 780 µL de tampon phosphate<sup>2</sup>. La réaction est déclenchée par l'addition de l'eau oxygénée. Le dosage s'effectue en suivant la cinétique de la réaction pendant 1 mn à la longueur d'onde 240 nm . L'activité spécifique de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante :

$$\text{Activité } (\mu\text{mol /mn /mg prot}) = \frac{(\Delta DO \times 10)}{(\epsilon \times L \times X \times X \times 0,05)}$$

**L** : Longueur de la cuve utilisée.

**X** : La lecture des protéines.

### 7.3. Dosage du Glutathion (GSH) :

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de Weckberker et Cory (1988), dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5-mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm.

Le dosage s'effectue après homogénéisation des échantillons dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Afin de protéger les groupements thiols du glutathion l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 25 % où 0,2 ml du ASS sont additionnés à 0,8 ml d'homogénat. Après agitation le mélange est plongé dans un bain de glace pendant 15 mn, puis centrifugé à 1000 tours/ mn pendant 5 mn.

Une aliquote de 500 µl du surnageant récupéré est ajoutée à 1 ml du tampon tris/EDTA (0,02 M, pH 9,6) et 0,025 ml de DTNB (0,01 M)]. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc où les 500 µl du surnageant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée.

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$\text{Taux du GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13,1 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg de protéine}}$$

( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines)

**DO** : densité optique.

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

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

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

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

**0,5** : Le volume du surnageant utilisé en ml.

**mg de protéines** : les protéines en mg.

#### 7.4. Dosage des malondialdéhydes (MDA)

Les malondialdéhydes (MDA) sont dosés selon la méthode de Draper et Hadley (1990) basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm.

Les fragments sont broyés aux ultrasons dans 1 ml de tampon tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Une fois l'homogénéisation réalisée, une centrifugation est effectuée pendant 10 mn à 10000 tours/mn et le surnageant récupéré servira au dosage du MDA. Le dosage est réalisé avec 500  $\mu\text{l}$  du surnageant additionnés de 2,5 ml de TCA. Après chauffage au bain marie à 100 °C pendant 15 mn et refroidissement dans la glace, une centrifugation est effectuée à 10000 tours/mn pendant 10 mn. Une fraction aliquote de 2 ml du surnageant est alors prélevée à laquelle on ajoute 1 ml de TBA. Après un second chauffage (100 °C, 15 mn) et refroidissement, 1,5 ml de butanol sont rajoutés. Après agitation, une dernière centrifugation (10000 tours/mn, 10 mn) est réalisée et le surnageant constitué de 1 ml de butanol renfermant les complexes

TBA/MDA est récupéré et une lecture des absorbances est effectuée à 532 nm contre un blanc où du tampon tris-HCl remplace le surnageant.

Le taux du MDA est déterminé selon la formule suivante :

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

**DO** : densité optique.

**156** : coefficient d'extinction molaire du TBA.

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

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

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

## 8. Détermination de la bioaccumulation des ETM par la spectrophotométrie d'Absorption atomique (SAA)

A la fin des traitements, 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 séjournent les animaux sont lavées après 24 heures pour éviter la réingestion des fèces. Les animaux sont ensuite sacrifiés après congélation à (-20° C) (Coourdassier ,2001).

### 8.1. Préparation des tissus et minéralisation

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

Après pesée des fragments secs, 4 ml d'acide nitrique 50% sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont fermés hermétiquement avec des bouchons à vis puis mis à l'étuve à 60° C jusqu'à digestion complète des tissus sous pression (environ 72 heures). Ensuite, chaque échantillon est complété à 19 ml avec de l'eau distillée puis conservé à 4° C jusqu'à l'analyse (Coeurdassier, 2001).

### 8.2. Dosage des éléments métalliques

Les concentrations en métaux dans les différents échantillons sont mesurées par spectrophotométrie d'absorption atomique (ICP-AES).

## 9. Etude histologique

Les échantillons sont fixés dans le formol. Puis déshydratés dans l'éthanol 95° au moins deux fois pour éliminer l'excès d'acide picrique. Après déshydratation, les pièces sont conservées dans du butanol. Après imprégnation dans la paraffine (3 bains de 24 h.) les pièces sont coupées (2 $\mu$ m) à l'aide d'un microtome Anglia scientifique 0325, étalées avec l'eau gélatinée et séchées à l'étuve (37 °C) pendant au moins 48 h. Les coupes sont par la suite déparaffinées avant d'être colorées à l'hémalum éosine (hématoxyline 1 g, iodate de sodium 0,2 g, chloral hydraté 150 g) qui permet une coloration différentielle. après déshydratation dans les bains suivants : éthanol 95°, éthanol à 95° et du xylène pur et enfin du xylène pur. Les pièces sont montées à l'aide du baume de Canada (Martoja et Martoja, 1967).

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

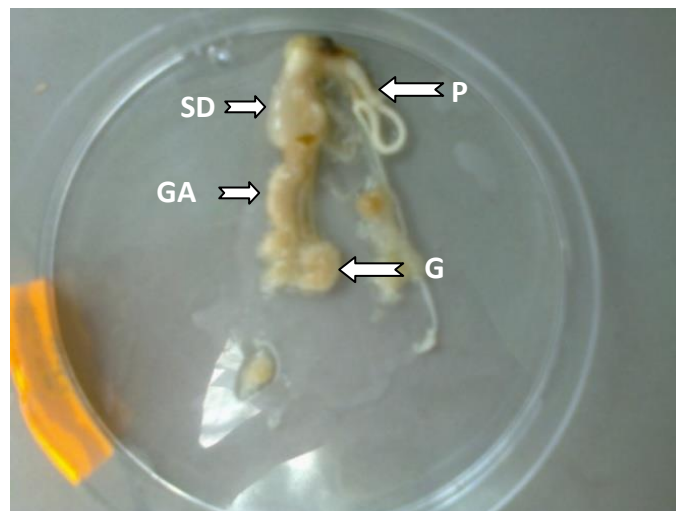
### 10. Impact des poussières métalliques sur la croissance des juvéniles

Des jeunes escargots d'un poids moyen de  $4,5 \pm 0.15g$ , obtenus de la ferme d'élevage des escargots à Bouchegouf Wilaya de Guelma Considéré comme site de référence. Sont exposés pendant 6 mois à de la nourriture contaminés par les poussières métalliques, suivant le protocole décrit précédemment selon la méthode de (Gomot de vaufleury, 2000). Nous avons retenu les mêmes concentrations (100, 300, 500  $\mu g/g$  d'aliment) et un lot témoin.

Le poids frais de l'escargot (tissus mous + coquille) est mesuré à l'aide d'une balance de précision avant le début de traitement et au cours de l'expérience après 3 mois et 6 mois de traitement.

### 11. Impact sur le développement du tractus génital des juvéniles :

A la fin du traitement les escargots sont sacrifiés et disséqués l'appareil génital est prélevé et pesé et la gonade et la glande à albumen sont pesés séparément. (Fig.10).



**Figure 10 : Appareil génital de l'escargot *Helix aspersa***

**P : pénis, G : gonade , SD : sac à dard ,GA : glande à albumen**

## **12 .Analyse statistique des résultats**

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

## 1 -Effets des poussières métalliques sur les Biomarqueurs Biochimiques

### 1.1. Effet des rejets métalliques sur l'activité GST

#### 1.1.1. En conditions contrôlées

Les variations de l'activité glutathion-s-transférase sont représentées dans le tableau (3). Les résultats obtenus nous révèlent que l'exposition au mélange de poussières métalliques induit une diminution significative de la GST chez les escargots traités par les concentrations (300 et 500µg /g) avec ( $P \leq 0,05$ ) au niveau de l'hépatopancréas et du sérum et une diminution significative au niveau du LH chez les traités par la concentration (500 µg/g) et ce par rapport aux témoins.

**Tableau 3 : Variations de l'activité GST au niveau de l'hépatopancréas, sérum et LH chez les escargots *Helix aspersa* exposés aux poussières métalliques en laboratoire, Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5.**

Tissus	Concentrations en µg/g			
	Témoin	100	300	500
Hépatopancréas	0,533 $\pm$ 0,11	0,333 $\pm$ 0,057	0,176 $\pm$ 0,03 *	0,156 $\pm$ 0,07 *
Sérum	0,068 $\pm$ 0,014	0,027 $\pm$ 0,014	0,015 $\pm$ 0,003 *	0,029 $\pm$ 0,004 *
LH	0,047 $\pm$ 0,011	0,053 $\pm$ 0,01	0,038 $\pm$ 0,008	0,0088 $\pm$ 0,0006 *

**GST : µmol /mn /mg de protéines**



### 1.1.2. En conditions non contrôlées

Dans le tableau (4) nos résultats ont mis en évidence une diminution significative de l'activité enzymatique ( $P \leq 0,05$ ) chez les escargots exposés dans le complexe sidérurgique par rapport aux lots provenant du site de référence (Guelma) que nous considérons comme peu ou pas pollué cette inhibition enzymatique est constatée aussi bien au niveau du tissu hépatique que du sérum et le LH.

**Tableau 4 : Variations de l'activité GST au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez *Helix aspersa* du site de référence (Guelma) et des transférés sur le site industriel ( El Hadjar ) Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5.**

Tissus	Sites	
	Guelma	El Hadjar
<b>Hépatopancréas</b>	0,341 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,04 *
<b>Sérum</b>	0,08 $\pm$ 0,009	0,033 $\pm$ 0,006 *
<b>LH</b>	0,049 $\pm$ 0,007	0,0096 $\pm$ 0,005 *

**GST :  $\mu$ mol /mn /mg de protéines**

## 1.2. Effet des rejets métalliques sur l'activité catalase

### 1.2.1. En conditions contrôlées

Le tableau (5) illustre les variations de l'activité Catalase, Nos résultats montrent une augmentation significative de l'activité catalase dans le LH chez les escargots exposés à la plus forte concentration de poussières métalliques (500 µg/g), en revanche l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative de l'activité catalase au niveau de l'hépatopancréas et le sérum entre les témoins et les traités par les différentes concentrations de poussières métalliques .

**Tableau 5 : Variations de l'activité CAT au niveau de l'hépatopancréas, sérum et LH chez les escargots *Helix aspersa* exposés aux poussières métalliques en laboratoire, Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD, n = 5**

Tissus	Concentrations en µg/g			
	Témoin	100	300	500
Hépatopancréas	1,108 ±0,533	1,112±0,273	2,556±1,181	1,32±0,98
Sérum	1,183±0,37	2,23±0,534	1,76±0,595	3,08 ±0,83
LH	2,56±0,595	2,218±0,773	5,02±1,2	7,27±0,591 *

**CAT : µmol /mn /mg de protéines**

### 1.2.2. En conditions non contrôlées

D'après le tableau (6) qui illustre les variations de l'activité Catalase, Nos résultats révèlent une augmentation significative de l'activité enzymatique au niveau de l'hépatopancréas, ainsi que dans le sérum et le LH chez les escargots provenant du site industriel d'EL Hadjar avec ( $P \leq 0,05$ ), comparé à ceux du site témoin .

**Tableau 6 : Variations de l'activité CAT au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez *Helix aspersa* du site de référence (Guelma) et des transférés sur le site industriel ( El Hadjar ) Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5.**

Tissus	Sites	
	Guelma	El Hadjar
<b>Hépatopancréas</b>	1,2 $\pm$ 0,337	3,94 $\pm$ 0,982 *
<b>Sérum</b>	1,13 $\pm$ 0,1	2,85 $\pm$ 0,59 *
<b>LH</b>	2,3 $\pm$ 0,245	4,25 $\pm$ 0,623 *

**CAT :  $\mu$ mol /mn /mg de protéines**

### 1.3. Effet des rejets métalliques sur le taux de glutathion (GSH)

#### 1.3.1. En conditions contrôlées

Le tableau (7) illustre les variations du taux de GSH, on note une diminution significative du GSH dans le sérum et le LH à la plus forte concentration (500 µg/g) par rapport aux témoins avec ( $P \leq 0.05$ ), au niveau de l'hépatopancréas l'analyse statistique révèle une diminution significative du taux de GSH chez les traités par la concentration (300µg/g) et une diminution hautement significative chez les traités par la concentration (500 µg/g) avec ( $p < 0,01$ ).

**Tableau 7 : Variations du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas, sérum et LH chez les escargots *Helix aspersa* exposés aux poussières métalliques en laboratoire, Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5.**

Tissus	Témoin	Concentrations en µg/g		
		100	300	500
Hépatopancréas	3,99 $\pm$ 0,486	1,83 $\pm$ 0,1	1,18 $\pm$ 0,05 *	0,87 $\pm$ 0,07 **
Sérum	0,251 $\pm$ 0,07	0,208 $\pm$ 0,04	0,205 $\pm$ 0,06	0,113 $\pm$ 0,018 *
LH	0,48 $\pm$ 0,043	0,374 $\pm$ 0,185	0,382 $\pm$ 0,17	0,258 $\pm$ 0,056 *

**GSH : µM/mg de protéines**

### 1.3.2. En conditions non contrôlées

Le tableau (8) montre une diminution significative du GSH chez les escargots du site contaminé d'EL Hadjar avec ( $P \leq 0,05$ ), comparé à ceux du site témoin et ce au niveau de l'hépatopancréas et du sérum, par contre l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative du taux du GSH dans le LH.

**Tableau 8 : Variations du taux de GSH au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez *Helix aspersa* du site de référence (Guelma) et des transférés sur le site industriel (El Hadjar) Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5.**

Tissus	Sites	
	Guelma	El Hadjar
<b>Hépatopancréas</b>	6,4 $\pm$ 0,866	3,81 $\pm$ 0,448 *
<b>Sérum</b>	0,33 $\pm$ 0,11	0,04 $\pm$ 0,005 *
<b>LH</b>	0,331 $\pm$ 0,058	0,25 $\pm$ 0,084

**GSH :  $\mu$ M/mg de protéines**

## 1.4. Effet des rejets métalliques sur le taux du malondialdéhyde (MDA)

### 1.4.1. En conditions contrôlées

Le tableau (9) illustre les variations du taux du MDA, nos résultats montrent que chez les escargots traités par les différentes concentrations de poussières métalliques on note une augmentation significative du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas chez les traités par les concentrations (300 et 500  $\mu\text{g/g}$ ), dans le sérum le taux de MDA augmente d'une manière hautement significative chez les traités par la plus forte concentration (500 $\mu\text{g/g}$ ) .

En revanche l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative du taux de MDA dans le LH les témoins et les traités par les différentes concentrations de poussières métalliques .

**Tableau 9 : Variations du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas, sérum et LH chez les escargots *Helix aspersa* exposés aux poussières métalliques en laboratoire , Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5.**

Tissus	Témoin	Concentrations en $\mu\text{g/g}$		
		100	300	500
Hépatopancréas	0,065 $\pm$ 0,019	0,046 $\pm$ 0,001	0,27 $\pm$ 0,07 *	0,262 $\pm$ 0,053 *
Sérum	0,053 $\pm$ 0,01	0,052 $\pm$ 0,024	0,137 $\pm$ 0,51	0,162 $\pm$ 0,011 **
LH	0,3 $\pm$ 0,193	0,311 $\pm$ 0,16	0,281 $\pm$ 0,167	0,504 $\pm$ 0,25

**MDA :  $\mu\text{M}$ /mg de protéines**

### 1.4.2. En conditions non contrôlées

D'après le tableau (10) nous constatons que le taux de MDA a augmenté d'une manière significative chez les escargots du site industriel d'EL Hadjar avec ( $P \leq 0,05$ ), comparé à ceux du site témoin et ce au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et LH.

**Tableau 10 : Variations du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas, le sérum et le LH chez *Helix aspersa* du site de référence (Guelma) et des transférés sur le site industriel ( El Hadjar ) Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD, n = 5.**

Tissus	Sites	
	Guelma	El Hadjar
<b>Hépatopancréas</b>	0,07 $\pm$ 0,005	0,156 $\pm$ 0,03 *
<b>Sérum</b>	0,05 $\pm$ 0,01	0,229 $\pm$ 0,06 *
<b>LH</b>	0,296 $\pm$ 0,132	0,637 $\pm$ 0,124 *

**MDA :  $\mu$ M/mg de protéines**

## 2. Bioaccumulation de Fer et de Plomb chez *Helix aspersa*

### 2.1 . Au niveau de l'hépatopancréas

Les figures (11) et (12) mettent en évidence les variations respectives des concentrations de fer et de plomb potentiellement accumulées au niveau de l'hépatopancréas. Nos résultats montrent que chez les escargots exposés aux concentrations croissantes de poussières métalliques les taux de Fer et de plomb accumulés au niveau de l'hépatopancréas augmentent de manière dose dépendante

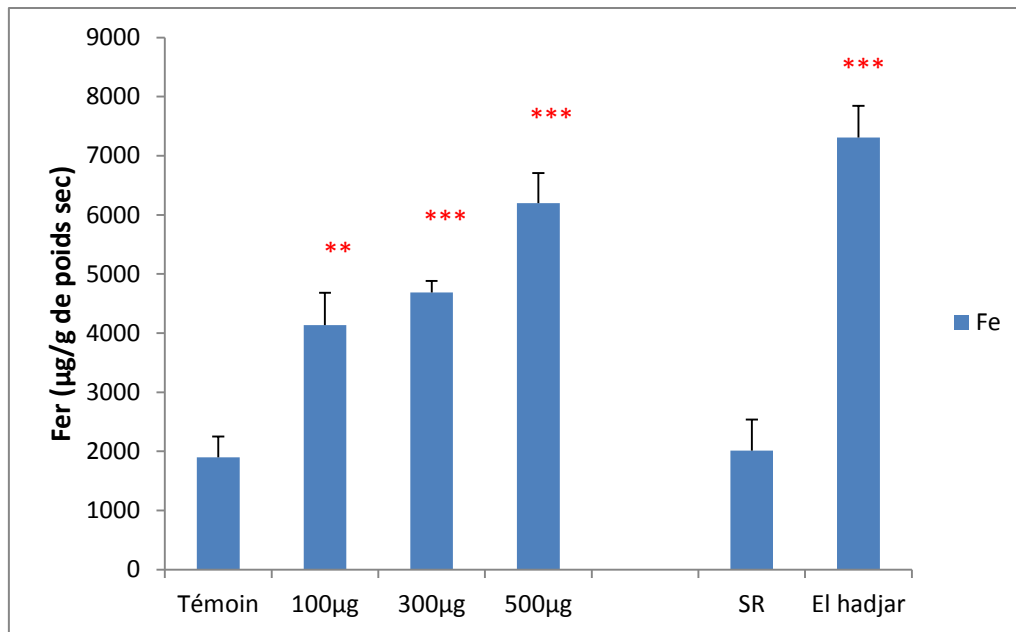
Ainsi, concernant le fer, l'augmentation est très hautement significative pour les traités par les concentrations (300 et 500  $\mu\text{g/g}$ ) avec ( $P \leq 0,001$ ) et ce par rapport aux témoins

D'un autre coté on note également une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) en fer chez les escargots exposés sur le site d'EL Hadjar comparé à ceux du site témoin.

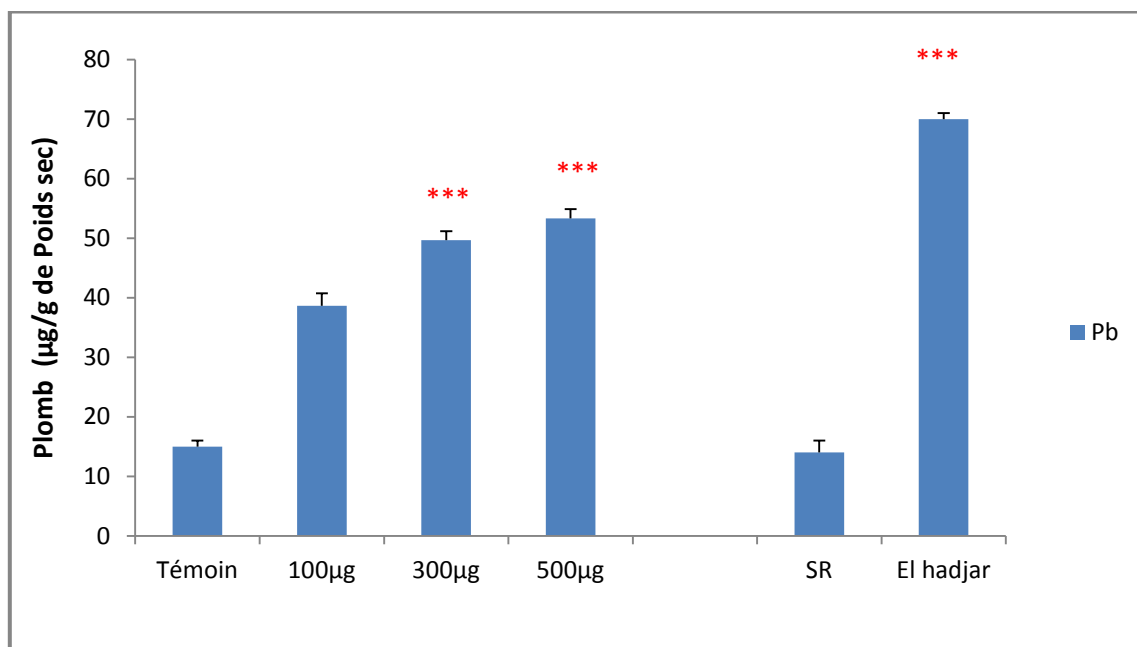
En ce qui concerne le plomb, nous constatons une augmentation dose- dépendante chez les escargots exposés aux différentes concentrations de poussières métalliques. Ainsi nos résultats mettent en évidence une augmentation très hautement significative de particules de plomb accumulées chez les traités par les concentrations ( 300 et 500  $\mu\text{g/g}$ ) avec ( $P \leq 0,001$ ) et ce par rapport aux témoins dont le taux ne dépasse pas 15 $\mu\text{g}$  alors que chez les traités par la plus forte concentration il atteint 53 $\mu\text{g}$  .

D'une autre part les escargots placés au sein du complexe sidérurgique ont tendance à accumuler fortement les particules de plomb et ce de manière très hautement significative avec ( $P \leq 0,001$ ) et ce par rapport à ceux du site témoin. Ainsi le taux de plomb accumulés atteint 70 $\mu\text{g}$  alors que chez les témoins il ne dépasse pas 14 $\mu\text{g}$ .





**Figure 11 : Concentrations en Fer au niveau de l'hépatopancreas chez les escargots *Helix aspersa* exposés aux poussières métalliques en laboratoire et les escargots placés sur terrain (SR: site de référence et El Hadjar)**



**Figure 12 : Concentrations en Plomb au niveau de l'hépatopancreas chez les escargots *Helix aspersa* exposés aux poussières métalliques en laboratoire et les escargots placés sur terrain (SR: site de référence et El Hadjar)**

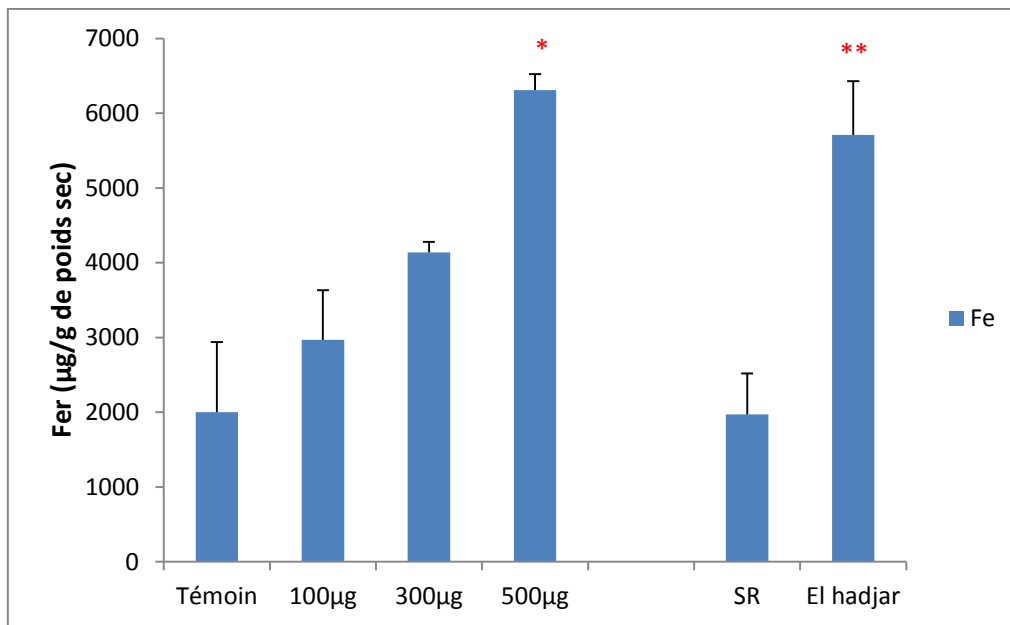
## 2.2 . Au niveau du Rein

Les figures (13) et (14 ) montrent respectivement les concentrations de fer et de plomb dans le Rein des escargots , Nos résultats montrent que la concentration en fer dans le rein est hautement significative chez les escargots exposés sur le site industriel d'EL Hadjar par rapport aux échantillons provenant du site de référence de Guelma .

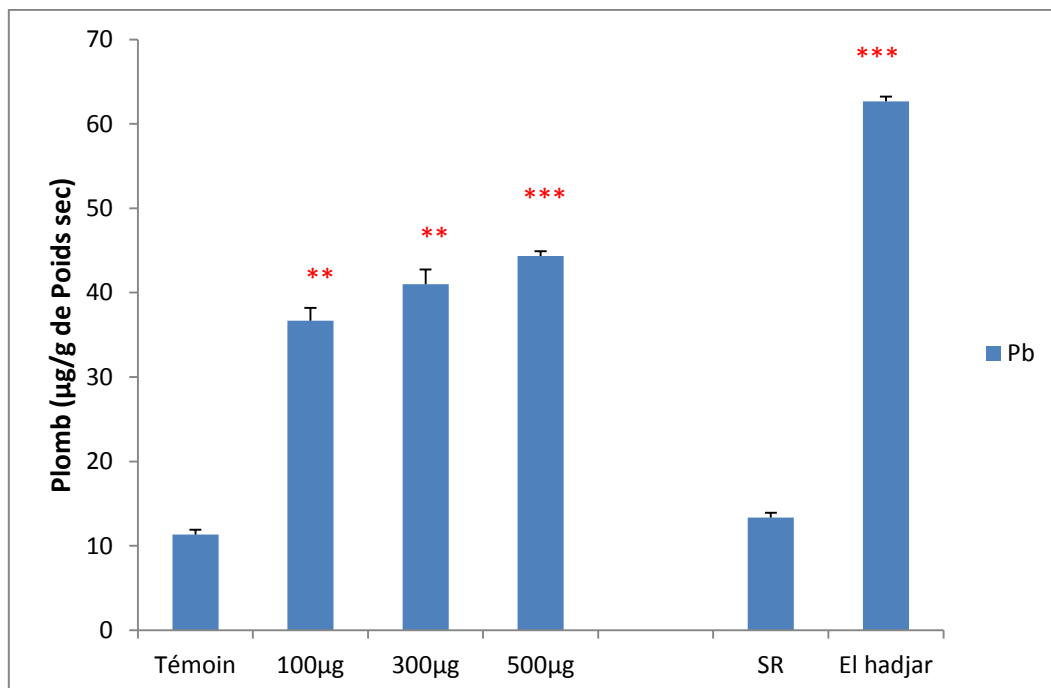
D'autre part, Nous constatons que chez les traités par les différentes concentrations de poussières métalliques la teneur en fer tend à augmenter de manière dose- dépendante Ainsi nos résultats mettent en évidence une augmentation significative ( $P \leq 0.05$ ) chez les traités par la concentration (500  $\mu\text{g/g}$ ) et ce rapport aux témoins dont le taux ne dépasse pas 2 mg alors que chez les traités par la plus forte concentration il atteint 6,31 mg.

Concernant le plomb les résultats obtenus montrent une augmentation hautement significative chez les escargots traités par les concentrations ( 100 et 300  $\mu\text{g/g}$ ) avec ( $P \leq 0,01$ ).et une augmentation très hautement significative chez les traités par la plus forte concentration (500  $\mu\text{g/g}$ ) ( $P \leq 0,001$ ) .

D'une autre part les escargots placés au sein du complexe sidérurgique ont tendance à accumuler fortement les particules de plomb et ce de manière très hautement significative avec ( $P \leq 0,001$ ) et ce par rapport à ceux du site témoin. Ainsi le taux de plomb accumulés atteint 62,66  $\mu\text{g}$  alors que chez les témoins il ne dépasse pas 13,33  $\mu\text{g}$  .



**Figure 13 : Concentrations en Fer au niveau du rein chez les escargots *Helix aspersa* exposés aux poussières métalliques en laboratoire et les escargots placés sur terrain (SR: site de référence et El Hadjar)**



**Figure 14 : Concentrations en Plomb au niveau du rein chez les escargots *Helix aspersa* exposés aux poussières métalliques en laboratoire et les escargots placés sur terrain (SR: site de référence et El Hadjar)**

### 3. Etude Histopathologique

#### 3.1. L'hépatopancréas

La planche ( 1 ), illustre des coupes histologiques effectuées au niveau de l'hépatopancréas, chez les escargots témoins et exposés aux différentes concentrations de poussières métalliques, Ainsi, chez les témoins (P1.A), l'hépatopancréas est constitué de lobules formés d'un ensemble d'acini maintenus cohérents par un tissu conjonctif. Ces acini sont constituées de trois types de cellules : les cellules digestives (CD) (les plus abondantes), les cellules excrétrices (CE) et les cellules à calcium (CC) (Zaldibar et *al.*, 2008).

L'examen histologique de l'hépatopancréas des escargots traités par la concentration 100µg/g (P1.B) de poussières métalliques met en évidence des acini avec un contour irrégulier et une membrane basale détériorée.

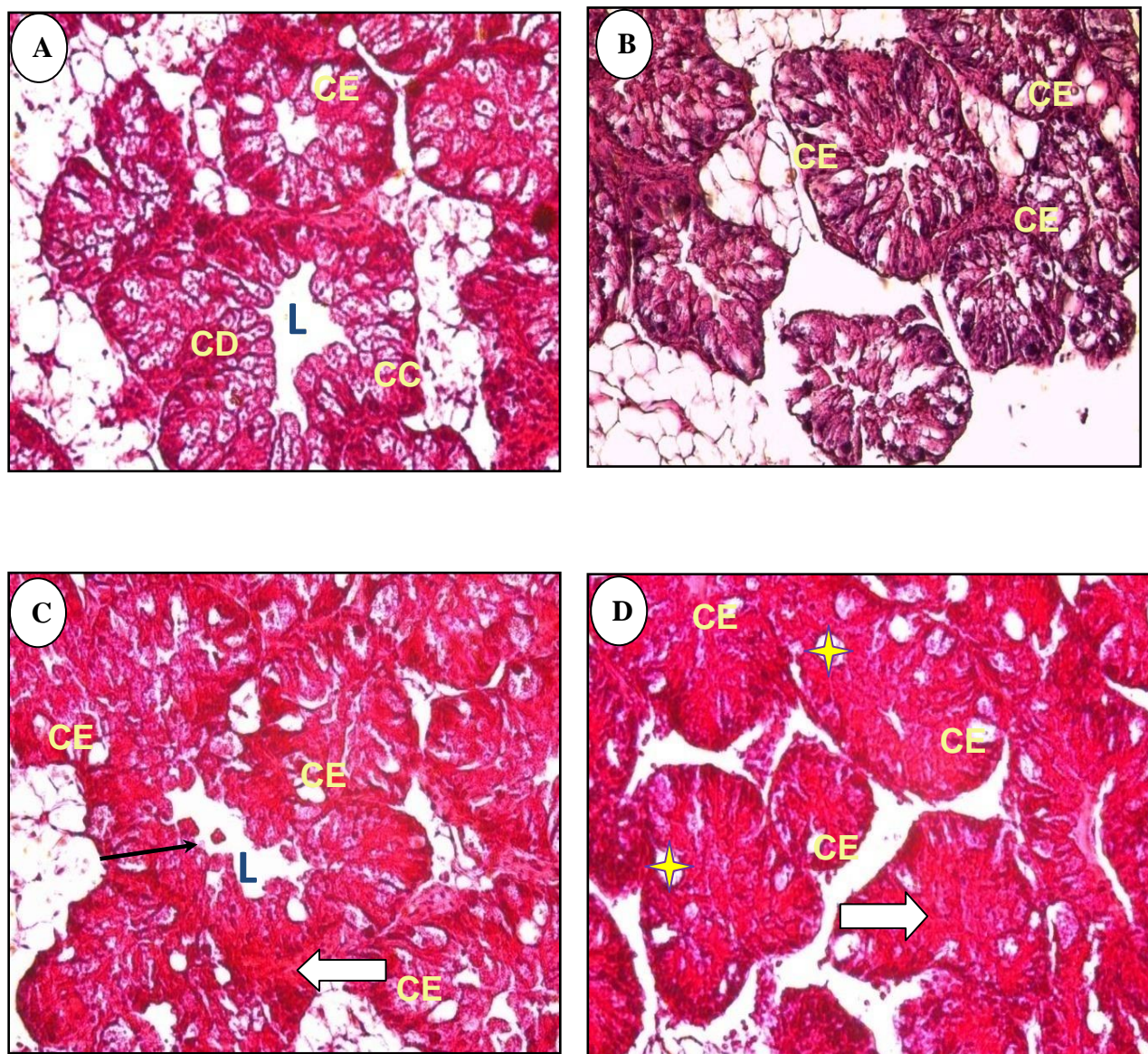
L'observation microscopique des tissus des traités par la concentration 300µg/g de poussières métalliques (P1.C) confirme l'aspect peu régulier des acini dont la lumière devient irrégulière contenant des débris cellulaires ; de plus nous notons la prolifération des cellules excrétrices .

En ce qui concerne les traités avec la concentration 500µg/g , L'examen histologique de l'hépatopancréas (P1.D) révèle une hypertrophie cellulaire , une dégénérescence des cellules digestives , la prolifération des cellules excrétrices, ainsi que la disparition de la lumière des acini dont la membrane basale est totalement détériorée.

La Planche (2 ), montre des coupes histologiques effectuées au niveau de l'hépatopancréas des escargots témoins du site de référence de Guelma et ceux transférés au sein du complexe sidérurgique d'El Hadjar. .

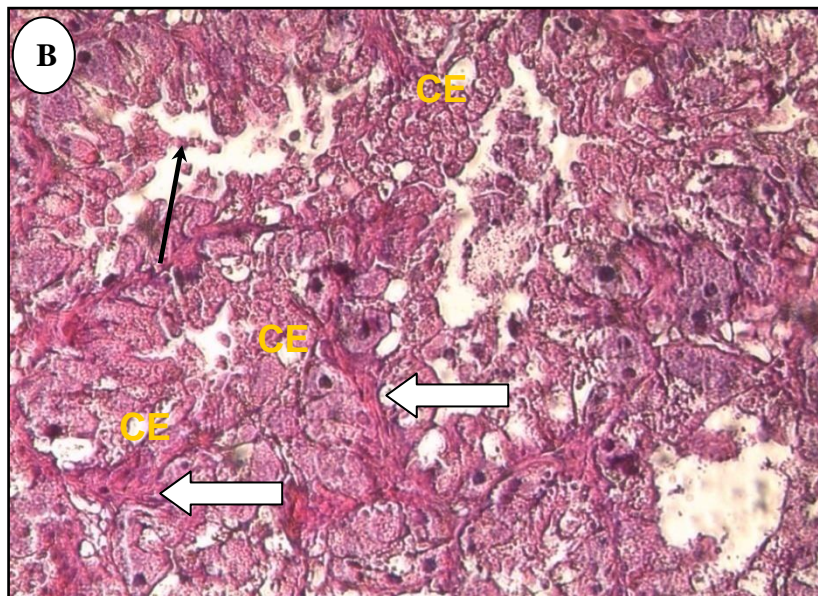
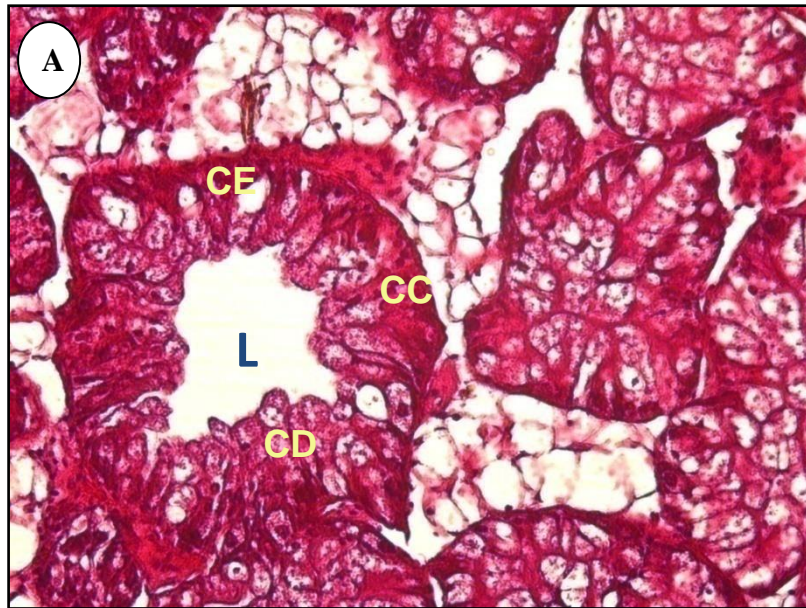
L'observation microscopique des tissus des escargots témoins montre un aspect normal de l'hépatopancréas constitué d'un ensemble d'acini maintenus par un tissu conjonctif, (P2.A)

Par contre, l'observation des tissus des escargots transférés sur le site du complexe industriel, met en évidence une altération des acini , la prolifération des cellules excrétrices et la dégénérescence des cellules digestives ainsi que l'apparition des structures cellulaires nécrosées (P2.B).



**Planche 1 : Coupes histologiques de l'hépatopancreas des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 100 µg/g (B), 300 µg/g(C) , et 500 µg/g(D) de poussières métalliques, (X 40).**





**Planche 2 : Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins du site de référence (A) et des escargots transférés sur le site industriel El Hadjar (B), (X 40).**

**L** : Lumière de l'acini, **CD** : Cellule digestive, **CE** : Cellule excrétrice,

**CC** : Cellule à Calcium,  Nécrose,  Hypertrophie cellulaire

 Débris cellulaire

### 3.2. Le Rein

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

L'épithélium renferme un seul type de cellules (cellules excrétrices) présentant un noyau et une membrane granulaire, ces cellules excrétrices sont subdivisées en cellules à bâtonnet et ciliées (P3.A).

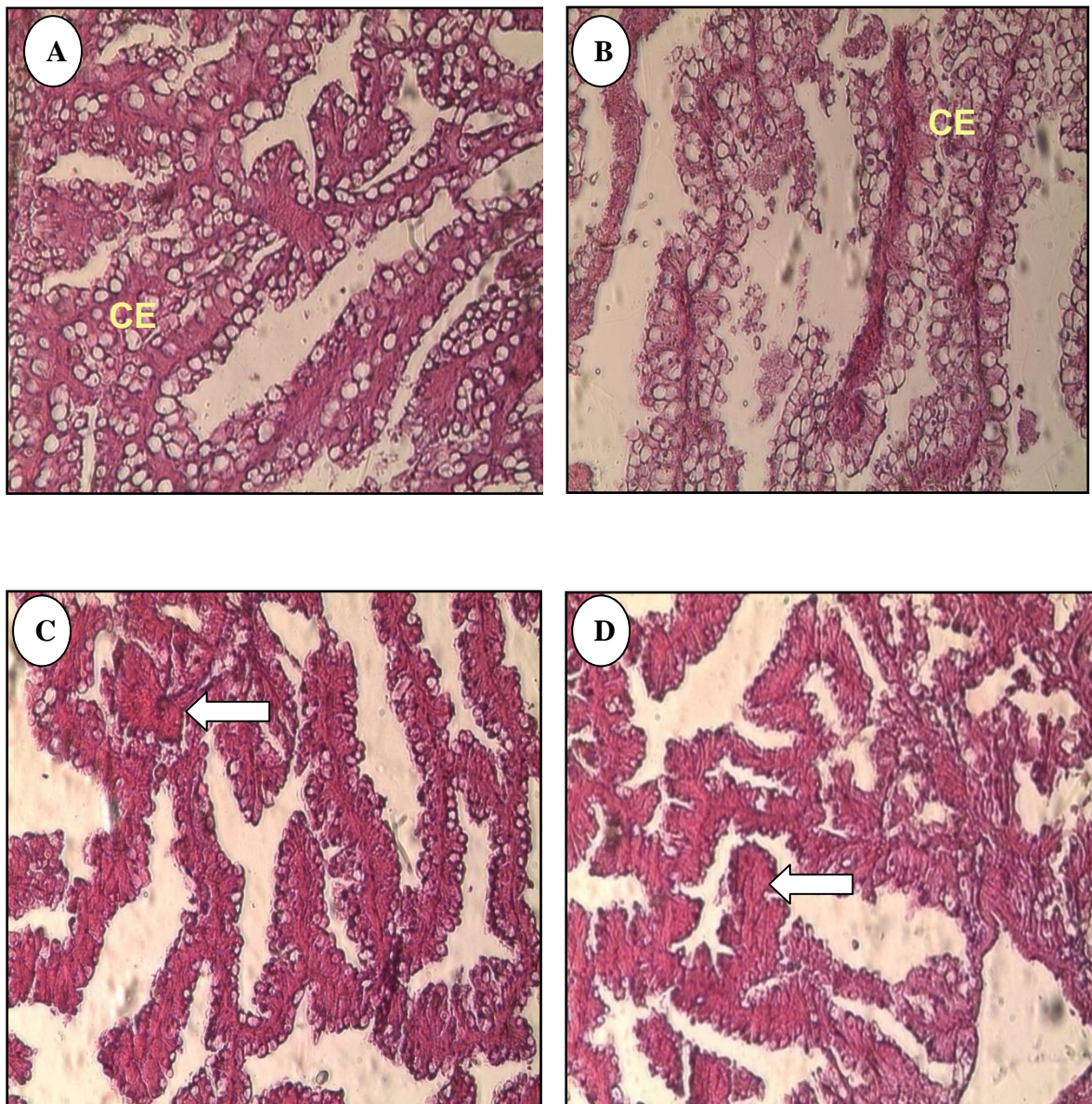
L'examen histologique du rein des escargots traités par les poussières métalliques (100µg/g) (P3.B) met en évidence une altération des membranes des cellules excrétrices ainsi qu'une prolifération du tissu conjonctif.

Concernant les traités par les plus fortes concentrations de poussières métalliques (300 µg et 500µg/g) (P3.C et D), nous remarquons que l'allure générale du tissu rénal est largement affectée, avec un quasi absence des cellules excrétrices et l'apparition de nécroses.

Concernant les escargots témoins du site de référence (Guelma) (P4.A), l'examen histologique du rein montre un aspect normal du tissu rénal avec un seul type de cellules excrétrices.

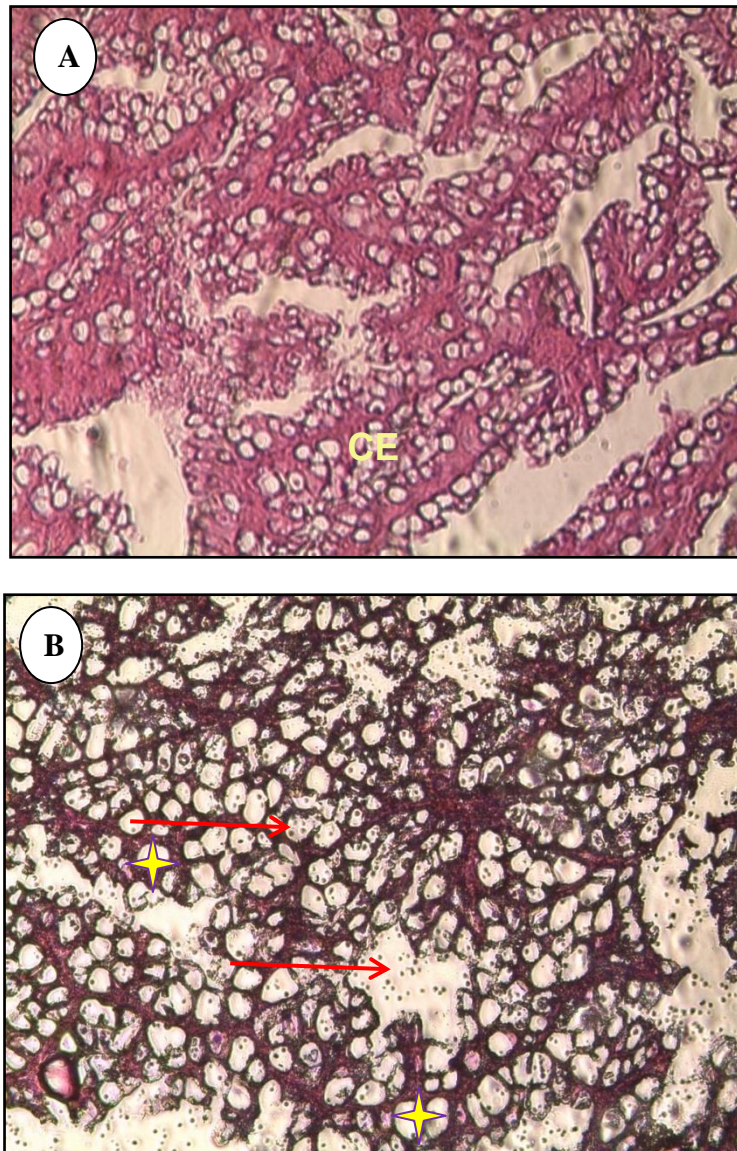
Parallèlement l'examen histologique du rein des escargots transférés sur le site d'El Hadjar, (P4.B) met en évidence une hypertrophie des cellules excrétrices, avec la présence de particules sphériques, probablement des particules métalliques.



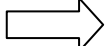




**Planche 3 : Coupes histologiques au niveau du rein des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 100 µg /g (B), 300 µg/g (C) de poussières et 500 µg/g (D) métalliques, (X 40).**





**Planche 4 : Coupes histologiques du rein des escargots témoins du site de référence (A) et des escargots transférés sur le site industriel El Hadjar (B), (X 40).**

CE : Cellule excrétrice,  Nécrose,  Hypertrophie cellulaire  
 Particules métalliques

### 3.3. La Gonade

L'escargot *Helix aspersa* possède une unique gonade localisée au sein de la masse viscérale, dans le tortillon entourée par l'hépatopancréas

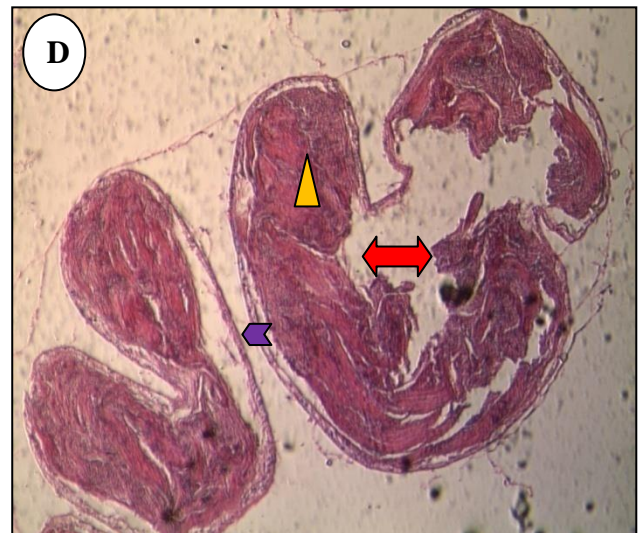
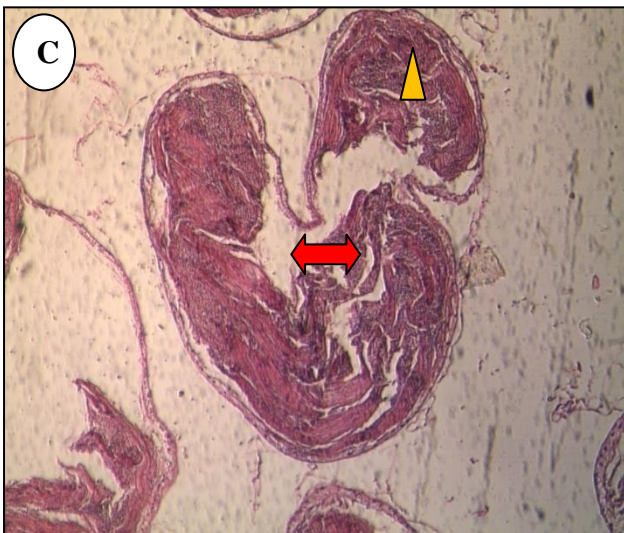
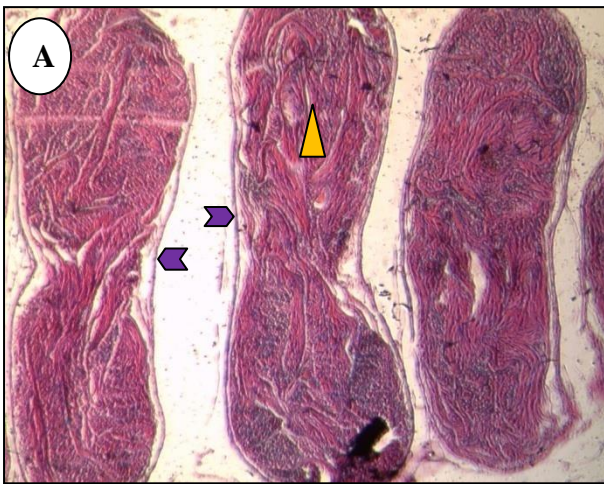
Elle apparait composée de tubules isolés par un tissu inter-tubulaire peu abondant et peu dense chaque tubule est délimité extérieurement par une lame basale formée de fibres collagènes, soutenant un épithélium germinatif (P5.A).

L'étude histologique révèle une déformation des tubules chez les escargots traités par la concentration (100µg/g) (P5.B).

Concernant les traités par la concentration (300 et 500µg/g) (P5 .C et D), nous notons également une déformation des tubules et une desquamation de l'épithélium germinatif (par rupture de celui-ci).

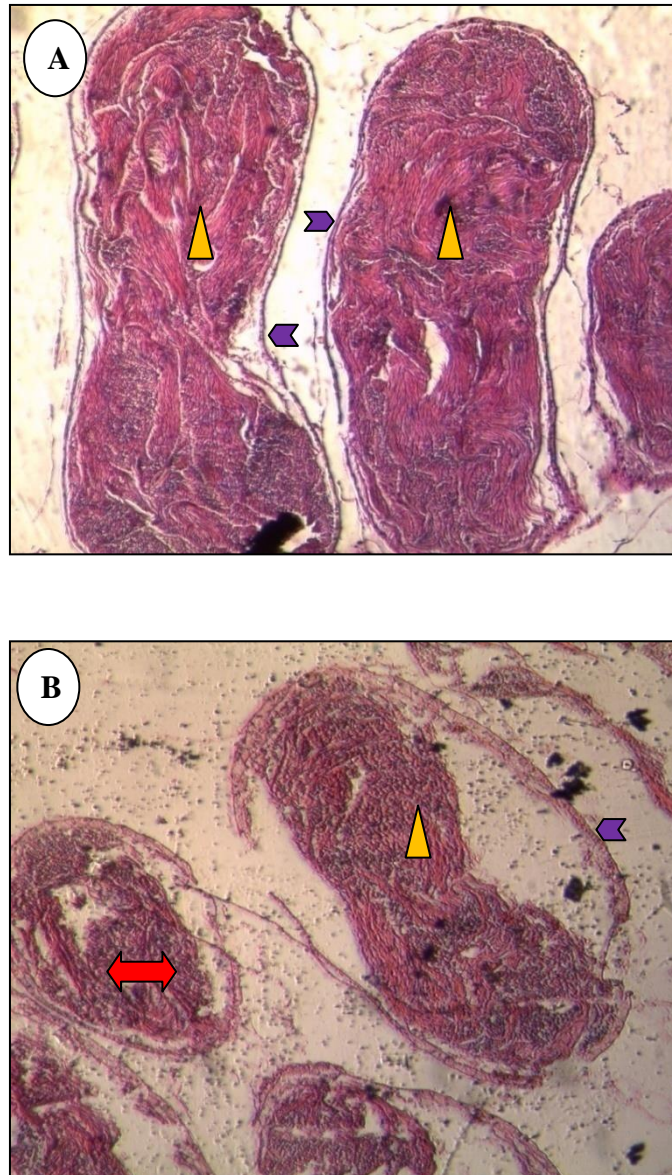
L'examen histologique de la Gonade des escargots provenant du site de référence (Guelma) (P6.A) met en évidence un aspect normal du tissu gonadique, avec un épithélium germinatif intact et des tubules de forme régulière.

Parallèlement l'examen histologique de la Gonade des escargots placés sur le site industriel d'El Hadjar (P6.B) met en évidence une déformation des tubules , une détérioration de l'épithélium germinatif , ainsi qu' un décollement de l'épithélium germinatif de la lame basale avec rupture de la lame basale.



**Planche 5 : Coupes histologiques de la Gonade des escargots témoins (A) et des traités par les concentrations 100 µg/g (B), 300 µg/g(C) , et 500 µg/g(D) de poussières métalliques, (X 40).**





**Planche 6 : Coupes histologiques de la gonade des escargots témoins du site de référence (A) et des escargots transférés sur le site industriel El Hadjar (B), (X 40).**

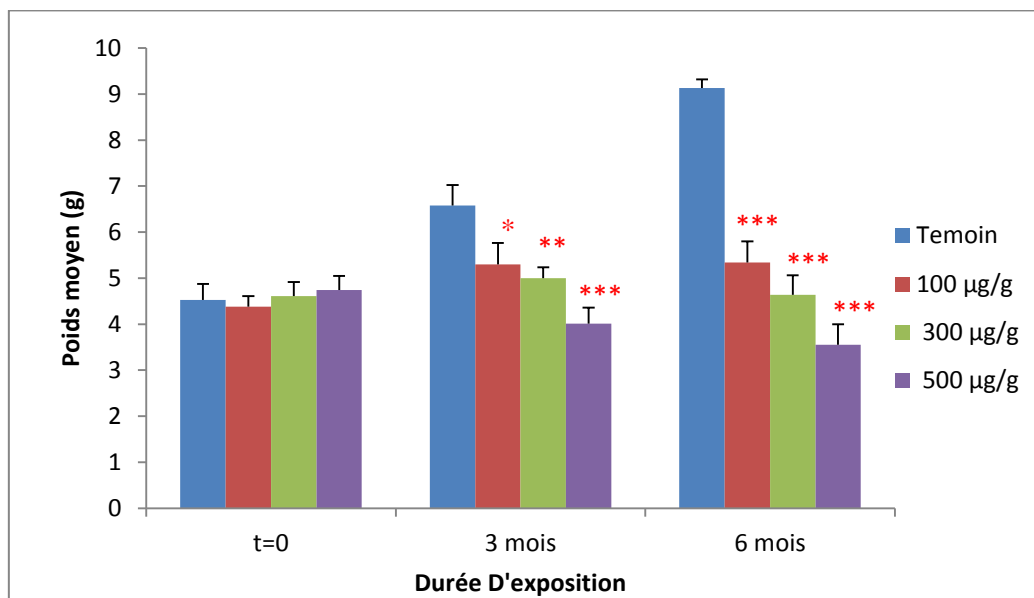
➡ Lamelle basale, ▲ Epithélium germinatif, ↔ Rupture de l'épithélium germinatif

#### 4 .Effet des poussières métalliques sur la croissance de *Helix aspersa*

L'évolution du poids des escargots au cours de l'exposition aux différentes concentrations de poussières métalliques est présentée dans la figure (15).

Nos résultats montrent une diminution dose-dépendante du poids des escargots après 3 mois d'exposition, ainsi la différence entre le poids des témoins et celui des traités par la concentration (100µg/g) est significative ( $P \leq 0,05$ ), et hautement significative chez les traités par la concentration (300µg/g) de poussières métalliques ( $P \leq 0,01$ ), cette différence devient très hautement significative chez les traités par la concentration (500µg/g) (avec  $p \leq 0,001$ ) En effet le poids des escargots passe de 6,58g chez les témoins à 5g et 4,01g chez les traités par les plus fortes concentrations.

Après 6 mois d'exposition nous avons également noté une inhibition de la croissance des escargots, l'examen statistique des données a révélé une différence très hautement significative entre les témoins et les traités par toutes les concentrations de poussières métalliques. En effet le poids des escargots passe de 9,13g chez les témoins à 3,55g chez les traités par la plus forte concentration.



**Figure 15: Effet des poussières métalliques sur la croissance des escargots**

### **5 .Effet des poussières métalliques sur le développement de l'appareil génital d' *Helix aspersa***

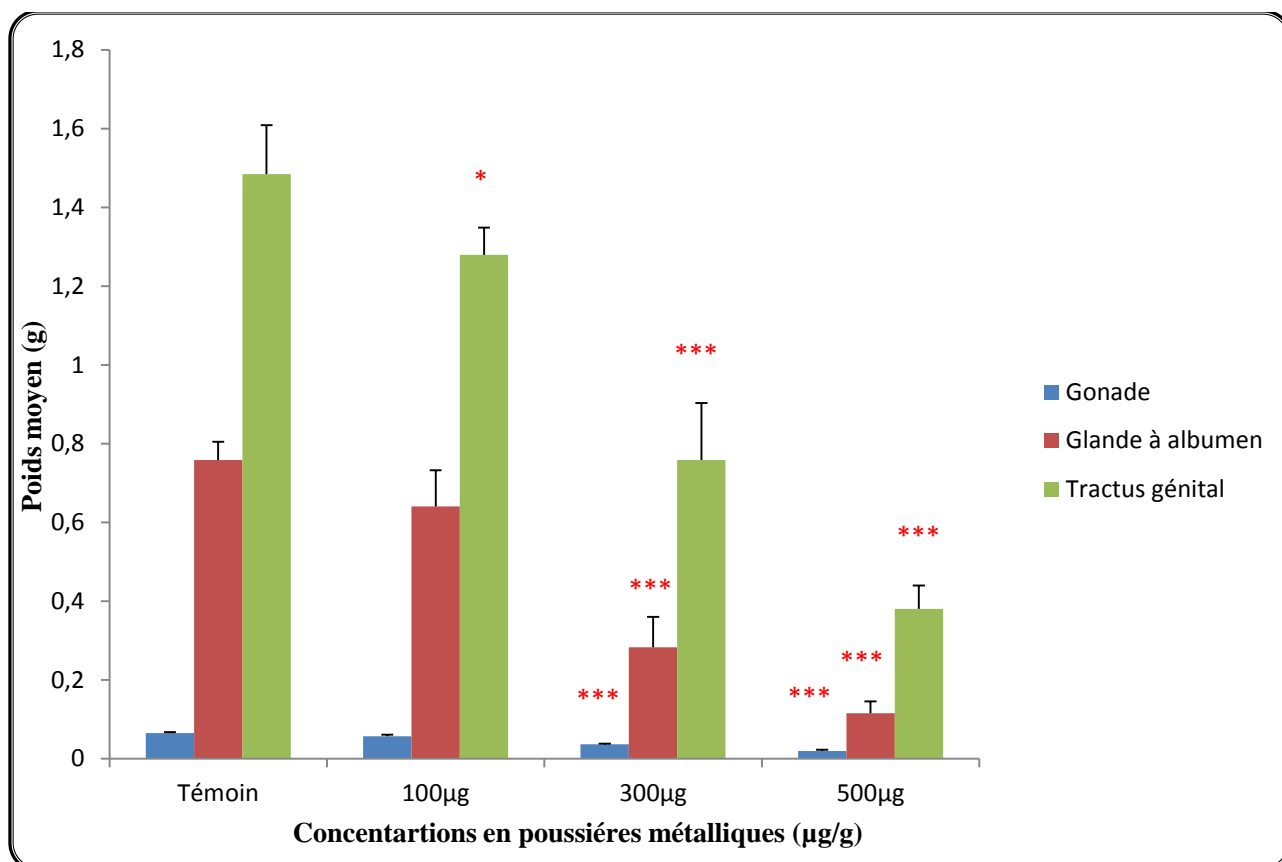
Le graphique décrivant l'effet des poussières métalliques sur le développement du tractus génital, la glande à Albumen et la gonade suite à l'exposition des escargots *Helix aspersa* aux différentes concentrations de poussières métalliques est présenté dans la Figure (16).

Nos résultats mettent en évidence un effet inhibiteur des poussières métalliques sur le développement du tractus génital, des gonades et de la glande à albumen.

Ainsi chez les traités par la concentration (100  $\mu\text{g/g}$ ) nous constatons une diminution significative du poids du tractus génital ( $P \leq 0,05$ ) et une diminution très hautement significative chez les traités par les concentrations (300 et 500  $\mu\text{g/g}$ ) avec ( $p \leq 0,001$ ), En effet le poids du tractus génital passe de 1,485 g chez les témoins à 0,759 g et 0,381g chez les traités par les plus fortes concentrations .

Nous notons également une diminution très hautement significative chez les traités par les plus fortes concentrations, ( $p \leq 0,001$ ), de la masse fraîche de la glande à albumen . En effet le poids de la glande passe de 0,759 g chez les escargots témoins à 0,283g et 0,116g respectivement pour les concentrations (300 $\mu\text{g/g}$  et 500  $\mu\text{g/g}$ ).

Nos résultats indiquent également une diminution très hautement significative de la masse fraîche de la gonade chez les escargots traités par les plus fortes concentrations de poussières métalliques ( $p \leq 0,001$ ) .En effet le poids de la gonade passe de 0,0657 g chez les témoins à 0,037 g et 0,02 g respectivement pour les concentrations (300 $\mu\text{g/g}$  et 500  $\mu\text{g/g}$ ).



**Figure 16 : Effet des poussières métalliques sur le développement du tractus génital, la glande à Albumen et la gonade**

## Discussion

Le but principal de cette étude est de mettre en évidence l'implication directe des ETM émis par le complexe sidérurgique d'EL Hadjar dans l'exacerbation de la pollution et l'amplification des atteintes sur les organismes vivants cibles ou non cibles. Pour cela nous nous sommes intéressés à un modèle animal invertébré connu comme étant un bioindicateur de la pollution particulièrement par le biais de ses aptitudes à accumuler divers xénobiotiques dans ses tissus. Plusieurs paramètres sont ainsi pris en compte à commencer par l'activité GST considérée comme biomarqueur sensible de l'exposition à une large gamme de contaminants (Faria et al., 2009, Cantu et al., 2009). En effet, La GST joue un rôle primordial dans le mécanisme de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Hayes et Pulford, 1995; Solé et al., 2004); la régulation de l'équilibre redox (Konings et Penninga, 1985; Siritantikorn et al., 2007), elle intervient également dans la destruction des peroxydes et des époxydes provenant de l'oxydation non enzymatique des acides gras (Valko et al., 2006), cette enzyme catalyse la réaction d'addition entre ces composés et le groupement -SH du glutathion générant ainsi des composés plus hydrosolubles par neutralisation des sites électrophiles des xénobiotiques, facilitant ainsi leur expulsion hors de la cellule par les pompes membranaires (Salinas et Wong, 1999; Hayes et al., 2005).

Selon Borkovic et al., (2013) qui ont exposé des mollusques bivalves à des polluants métalliques mettent en évidence une inhibition de l'activité GST. Ils stipulent que cette inhibition peut être directe sous l'action des ETM ou indirecte, par l'intermédiaire de la production de ROS qui interagissent avec l'enzyme, en diminuant son substrat le GSH. D'un autre côté, Roling et Baldwin (2006) attribuent cet effet des ETM sur la GST à l'inhibition des facteurs de transcription nucléaires (NF- $\kappa$ B, AP-1) soit par liaison directe au niveau de la région promotrice du gène, soit indirectement par l'intermédiaire des mécanismes qui impliquent la génération de ROS. **nos résultats sont en accord avec ceux cités ci-dessus, puisque nous avons mis en évidence une diminution de l'activité GST chez les escargots traités par concentrations croissantes de poussières métalliques (*in vitro*) ce résultat est également confirmé *in situ* (El Hadjar) suite à une exposition à long terme ( 12 semaines).** Cependant, les travaux de Grara (2011) et de Boucenna (2015) ont mis en évidence au contraire une induction de l'activité GST en raison de son implication dans le processus de détoxification. Cet effet contradictoire pourrait être du au temps d'exposition aux



polluants qui ne dépasse pas 28 jours laissant suggérer un potentiel effet génotoxique à long terme.

La Catalase est considérée comme un biomarqueur sensible du stress oxydatif mieux que la superoxyde dismutase (Wang et *al.*, 2012). En effet, l'activité Catalase consiste en une transformation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène moléculaire ( $O_2$ ), or la production de peroxyde d'hydrogène est induite par la présence de composés exogènes à l'organisme comme c'est notamment le cas pour les métaux (van der Oost et *al.*, 2003 ;Brown et *al.*, 2004) , ce dérivé réactif de l'oxygène peut entraîner l'oxydation des macromolécules (ADN, lipides et protéines) (Vlahogianni et *al.*,2007).

l'activité CAT n'est pas spécifique à un groupe de contaminants, mais au stress oxydatif et peut être induite par une large gamme de contaminants organiques et les métaux lourds (Livingstone, 2001; Roméo et *al.*, 2003).

**Nos résultats mettent en évidence une induction significative de l'activité catalase dans la glande digestive, le sérum et LH des escargots du site contaminé d'El Hadjar .** ce qui suggère une augmentation compensatoire de cet antioxydant pour faire face à la production accrue de  $H_2O_2$  induite directement ou indirectement par des contaminants présents sur le site pollué, selon Pellerin (1994) l'activité CAT est très sensible aux facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle, Il a été rapporté que l'exposition aux métaux lourds induit des enzymes antioxydantes comme la CAT pour neutraliser l'impact de la production des ROS (Wu et Yi, 2015). Selon Cossu et *al.*,( 1997) l'induction de l'activité catalase est considérée comme un comportement adaptatif à un environnement défavorable et c'est un important indicateur précoce de stress oxydatif.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Radwan et *al.*, (2010) et El-Shenawy et *al.*,(2012 ) qui ont révélé respectivement une induction de l'activité catalase chez les escargots terrestres *Theba pisana* et *Eobania vermiculata* collectés dans des zones polluées par les métaux lourds .

**D'autre part, chez les escargots exposés aux différentes concentrations de poussières métalliques *in vitro*, l'activité CAT ne semble pas affectée au niveau de la glande digestive et du sérum. En revanche, nous avons noté une induction importante de l'activité CAT dans le LH des individus traités par la plus forte concentration de poussières métalliques.**

Selon Gopalakrishnan et *al.*, (2013) les antioxydants produits par les hémocytes sont impliqués directement avec la réponse immunitaire, nos résultats sont en accord avec les travaux de Grara et *al.*, (2009) et Boucenna (2015) qui ont révélé une induction de l'activité catalase chez *Helix aspersa* traités par des ETM.

Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales, c'est le thiol cellulaire le plus abondant, impliqué dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, y compris les espèces réactives de l'oxygène et les métaux lourds (Dickinson et Forman, 2002), il est le cofacteur de nombreuses enzymes qui catalysent la détoxification et l'excrétion de plusieurs composés toxiques (Regoli et Principato, 1995).

**Dans notre travail, nous avons mis en évidence une diminution dose-dépendante du taux du GSH dans la glande digestive, le sérum et le LH chez les escargots exposés aux différentes concentrations de poussières métalliques *in vitro* et *in situ* (El Hadjar).** Ce résultat est en accord avec ceux de Hultberget *al.*, (2001) qui ont montré une diminution du taux de glutathion suite à une exposition métallique chronique, cette déplétion peut être expliquée par la liaison directe du glutathion au métal comme le stipule Barillet (2007) car le glutathion dispose d'un groupement acide carboxylique, d'un groupement amine, d'un groupement sulfhydryle (-SH) et de deux pontages peptidiques susceptibles d'être impliqués dans des réactions avec les métaux lourds. Son groupement fonctionnel -SH jouerait alors un rôle important dans la liaison au métal. En effet, de nombreux métaux sont caractérisés par une forte affinité vis-à-vis des groupements thiols et forment des complexes avec ces entités chimiques.

Selon El-Shenawy et *al.*, (2012) la diminution du taux de GSH est attribuée à la consommation accrue de ce peptide pour la synthèse des protéines de liaisons aux métaux lourds, comme les métallothionéines. De plus, Gopalakrishnan et *al.*, (2013) ont rapporté que la diminution du taux de GSH est due également à l'utilisation accrue de ce dernier par la GPx pour catalyser la réduction des  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . Leomanni et *al.*, (2015), montrent également que l'induction précoce de l'activité GPx joue un rôle dans la baisse anticipée de la GSH.

D'autre part les liaisons des métaux avec le glutathion se traduisent soit par la formation de complexes [ métal- GSH ] ou par l'oxydation du GSH (Regoli et Principato , 1995 ) , Selon Christie et Costa (1984 ) les métaux qui entraînent l'oxydation du GSH sont le Cu, le Co, le Mn, le Fe et le Cr , tandis que les complexes stables avec le GSH sont formés par le Zn, le Cd, le Hg, le Pb et le Ni, ces deux réactions pourraient expliquer la diminution du glutathion observée chez les escargots exposés aux métaux dans les conditions de laboratoire (*in vitro*) , et sur terrain (*in situ*) . Toutes ces perturbations semblent converger vers une atteinte radicalaire induisant des perturbations prononcées du fonctionnement cellulaire (Lawton et Donaldson, 1991 ; Halliwell et Chirico ,1993).

Les conséquences de cette toxicité se manifestent en premier lieu par une peroxydation des lipides membranaires avec le malonedialdéhyde (MDA) comme produit final et dont la teneur est en relation étroite avec les dégradations de la membrane cellulaire. Ce paramètre constitue un indicateur précoce d'une agression toxique et par conséquent il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydatif ( Funes et *al.*, 2005; Box et *al.*, 2007; Ladhar et *al.*, 2009).

Les radicaux libres oxygénés sont à l'origine d'une dégradation des lipides, à travers la  $\beta$  oxydation (Aurousseau, 2002). Ainsi, les ETM comme le cuivre et le fer sont largement utilisés comme agents initiateurs de l'oxydation des lipides (Nzengue, 2008).

La peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques (Bebianno et *al.*, 2005) ou d'autres éléments contenant des lipides (Al-Mutairi et *al.*, 2007) . Il s'ensuit une perte de la perméabilité, et une inactivation des récepteurs et des enzymes membranaires (Pampanin et *al.*,2005). Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules, Ainsi, la peroxydation lipidique est une source endogène des dommages de l'ADN ( Marnett, 2002).

**Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation du taux de MDA au niveau de l'hépatopancréas, du LH et du sérum chez les escargots *in situ* alors que chez les escargots traités par les concentrations croissantes d'ETM, nos résultats révèlent une importante augmentation du taux de MDA uniquement chez les escargots traités par les plus fortes concentrations de poussières métalliques au niveau de l'hépatopancréas et du sérum.**

L'augmentation du taux de MDA observée dans cette étude indique des dommages oxydatifs provoqués par les particules métalliques étudiées. Le niveau élevé de MDA indique que le système antioxydant n'a pas pu éliminer complètement l'anion superoxyde  $O_2^-$  (Tao et al., 2013), ainsi l'augmentation des concentrations en MDA chez les organismes contaminés par les particules métalliques peut être expliquée par le fait que les ETM engendrent la production de radicaux libres ce qui entraîne différentes conséquences cytotoxiques, dont la détérioration de la membrane cellulaire par attaque de ses acides gras constitutifs, ce qui se traduit par des phénomènes de peroxydation lipidique (Halliwell et Gutteridge, 1999)

Giarratano et al.,(2014) ont mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez les moules *Aulacomya atra atra* après exposition au Fe, Al et Cd, il en est de même pour les travaux de Fahmy et al., (2014) qui ont révélé une induction du taux de MDA dans l'hémolymphe et des tissus mous des escargots traités par le zinc., Radwan et al.,(2010) indiquent dans leurs étude qu'il existe une corrélation positive entre les métaux lourds et la peroxydation lipidique en raison de la présence des ions métalliques dans la glande digestive des escargots qui catalysent la réaction de Fenton et augmentent le risque des dommages cellulaires. Selon Giarratano et al.,(2014) la production accrue de radicaux lipidiques est liée à une teneur élevée en fer dans les tissus, en effet, le fer amorce la formation de radicaux hautement toxiques provenant du  $H_2O_2$  par des réactions de type Fenton qui accentuent la peroxydation lipidique (Puntarulo et Cederbaum,1988).

Nos résultats sont en accord avec les travaux cités précédemment puisque nous avons mis en évidence une forte augmentation du taux de MDA probablement accentuée par la forte concentration en fer présente dans les poussières métalliques testées.

A partir de ces résultats il nous a semblé nécessaire de suivre la capacité des animaux à accumuler ces particules métalliques. En effet l'évaluation de l'accumulation des ETM chez *Helix aspersa* repose sur la mesure des concentrations internes après une durée d'exposition donnée, généralement 28 jours. (Gimbert, 2006). Dans notre travail nous avons évalué l'accumulation à long terme de deux éléments métalliques le Fer et le Plomb chez *Helix aspersa* dans les conditions contrôlées de laboratoires et *in situ* sur le site du complexe métallurgique d'El Hadjar.

**Nos résultats montrent que les teneurs en Plomb et en Fer au niveau de la glande digestive et du rein augmentent d'une manière dose –dépendante en présence des poussières métalliques chez les escargots traitées dans les conditions contrôlées de laboratoire** , en effet les concentrations élevées en plomb et en fer retrouvées dans les organes des escargots indiquent une accumulation importante des métaux dû à la prise de nourriture contaminée par les ETM au cours de l'expérience .

selon Chabicovsky et *al.*,(2003) la grande affinité de la glande digestive vis-à-vis des métaux lourds est probablement liée à la capacité d'absorption et à la phagocytose possible des particules qui se produit dans la glande digestive. Après absorption, les gastéropodes terrestres accumulent d'importantes quantités d'éléments métalliques en les séquestrant dans des structures intracellulaires spécifiques dont la synthèse est induite par la présence des métaux, Ces deux grands types de structures de stockage sont les protéines de liaison et les granules lysosomaux (Coeurdassier, 2001). Cependant, Grara ,(2011), dans une étude sur les escargots traités par des ETM durant 4 semaines a mis en évidence une accumulation moins importante en ETM, au niveau de l'hépatopancréas et du rein bien que la concentration en poussières métalliques testée soit trois fois plus importante que la notre , ceci justifie le choix des concentrations testées dans notre travail, car la capacité des escargots de détecter de fortes concentrations en métaux dans leur source de nourriture a déjà été montrée par Simkiss et Watkins (1990), Swaileh et Ezzughayyar (2000) , selon Swaileh et *al.*,(2002) la répulsion de la nourriture entraîne un jeûne forcé des escargots qui entrent alors en estivation.

Concernant l'expérience de biosurveillance active, **nos résultats montrent une importante bioaccumulation des particules de Fer et de Plomb chez les escargots placés en microcosmes sur le site industriel.**

Les concentrations internes de ces deux éléments métalliques reflètent bien l'état de contamination du site, selon La Rocca, (2004) les escargots sont capables de refléter une contamination métallique de leur environnement. Ceci est confirmé par les travaux de Fritsch et *al.*,( 2010) qui ont montré que les concentrations internes en ETM chez les escargots sont proportionnelles aux concentrations totales en ETM des sols. Ainsi, les teneurs en Fer et en Plomb retrouvées au niveau de la glande digestive et du rein chez les escargots exposés de manière chronique sur le site industriel d'El Hadjar indiquent un niveau de contamination élevé par ces particules métalliques.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Viard *et al.*, (2004) qui ont mis en évidence une accumulation importante en ETM dans les viscères d'*Helix aspersa* transférés sur un site industriel en activité. Il en est de même concernant les travaux de Fritsch, (2010) dans une étude menée à proximité d'une fonderie qui a révélé une bioaccumulation de particules de plomb et de zinc dans les tissus mous des escargots.

Après avoir mis en évidence la toxicité des particules métalliques accumulées au niveau des organes mous de l'escargot, il s'est avéré nécessaire de mettre en évidence les altérations tissulaires potentielles.

Le premier tissu auquel nous nous sommes intéressés est le tissu hépato pancréatique. L'hépatopancréas est l'organe le plus important dans la détoxification des xénobiotiques chez les mollusques. Cet organe est responsable de la production d'enzymes digestives, l'absorption des nutriments et la digestion par endocytose de substances alimentaires, et de l'excrétion (Owen, 1996).

L'exposition aux métaux lourds peut causer des altérations cytologiques et ultrastructurales très importantes au niveau de l'hépatopancréas (Frías *et al.*, 2008). Ces altérations peuvent être utilisées en tant que bio marqueurs d'exposition aux métaux (Amaral *et al.*, 2004). Dans notre étude, nous avons mis en évidence au niveau de l'hépatopancréas des nécroses cellulaires ainsi qu'une prolifération des cellules excrétrices et une dégénérescence des cellules digestives chez les escargots exposés aux différentes concentrations de poussières métalliques ainsi que chez les escargots placés sur le site industriel. Selon Yager et Harry (1963), les ETM détériorent la dynamique des cellules et endommagent leurs membranes. De ce fait, l'échange intercellulaire et la fluidité sont perturbés. En conséquence, la diffusion des ETM augmente dans les cellules causant ainsi une nécrose cellulaire.

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). D'un autre côté selon Marigomez *et al.*, (1996,1998) la prolifération des cellules excrétrices et les changements dans leur proportion après exposition chronique à des polluants semblent être une réponse générale chez les mollusques.

Zaldibar et *al.*, (2008) ont rapporté que les cellules excrétrices sont cinq fois plus abondantes au niveau de l'hépatopancréas chez les limaces implantées sur un site pollué que chez ceux du site non pollué, tandis que le nombre des cellules digestives est passé de 80% chez les limaces du site témoin à 30% chez celles placées sur le site pollué.

Gust et *al.*, (2011) ont rapporté que les lésions histologiques dans la glande digestive de l'escargot *Potamopyrgus antipodarum* exposé aux ETM se manifeste par une hypertrophie des cellules à calcium et une vacuolisation et une dilatation des cellules digestives. Il en est de même concernant la glande digestive de *Pomacea canaliculata* après exposition au sédiments contaminés par les ETM (Fe, Zn, Pb, Cr, Cu, Ni, et Cd) (Kruatrachue et *al.*, 2011), et également chez les escargots géants *Archachatina marginata* traités par des particules de Cu et Pb (Otitoloju et *al.*, 2009).

Plus récemment, des études ont également permis de révéler la présence d'altérations au niveau du tissu hépato pancréatique chez les escargots exposés différents contaminants On peut ainsi citer l'étude de (Boucenna, 2015) menée sur les escargots *Helix aspersa* exposés aux métaux lourds et les travaux de (El-Khaya et *al.*, 2015) menés sur des escargots d'eau douce (*Biomphalaria alexandrina*) collectées au niveau d'un lac impacté par divers contaminants

L'épithélium rénal est également susceptible de subir les effets des xénobiotiques toxiques. C'est un tissu composé de néphrocytes, cellules hautes, qui présentent une polarité nette : elles possèdent un noyau basal associé à un cytoplasme chromophile, alors que leur région apicale est occupée par une volumineuse vacuole, la présence des vacuoles dans les néphrocytes indique que ces cellules sont impliquées dans l'excrétion des déchets et de la résorption des métabolites essentiels du liquide urinaire. (Kambale et Potdar, 2011).

Notre étude histologique a mis en évidence des atteintes tissulaires rénales avec un état nécrotique généralisé, chez les escargots exposés en conditions contrôlées de laboratoire, accompagnées d'une hypertrophie et d'une prolifération des cellules excrétrices.

Nous avons aussi noté l'apparition des particules métalliques au niveau de l'épithélium rénal chez les escargots placés sur le site du complexe sidérurgique d'El Hadjar confirmant ainsi la grande capacité de bioaccumulation de l'espèce étudiée.

Selon une étude menée par Kambale et Potdar ,(2011) sur l'escargot d'eau douce *Bellamy Abengalensis* les métaux s'accumulent sous forme de granules dans les néphrocytes par l'intermédiaire des protéines de liaison. Ce phénomène est observé chez plusieurs espèces telles que les bivalves *Mercenaria mercenaria* et *Mytilus edulis* exposées à un stress métallique (Regoli et al., 1992). Les travaux de Grara ,(2011) et Boucenna (2015) corroborent ces résultats avec la mise en évidence des nombreuses altérations structurales au niveau du tissu rénal de *Helix aspersa* suite à une exposition à des micro et nanoparticules métalliques.

D'un autre côté nous nous sommes intéressées aux altérations tissulaires potentielles sur un organe non cible en l'occurrence la gonade. , Nous avons mis en évidence de profondes altérations tissulaires qui se manifestent par la déformation des tubules et une desquamation de l'épithélium germinatif ce résultat est en accord avec ceux de Otitolaju et al.,( 2009) qui signalent des altérations au niveau du tissu gonadique chez l'escargot géants *Archachatina marginata* exposé au Pb et au Cu , de même que ceux de Snyman et al. ,(2005) qui confirment que le Cu s'accumule au niveau de la gonade et provoque des altérations cellulaires important chez *Helix aspersa*.

L'ensemble des observations réalisées sur les gonades révèle des anomalies suggérant que l'exposition aux particules métalliques pourrait perturber la spermatogénèse et l'ovogénèse, il semble donc évident que les métaux exercent un effet toxique sur la reproduction des escargots.

Un des objectifs de ce travail est de déterminer si la croissance des juvéniles est perturbée par une exposition prolongée et précoce aux métaux lourds. Ainsi, nos résultats ont mis en évidence une inhibition de la croissance des escargots dont le mécanisme, selon Gomot (1997), est difficile à identifier, il pourrait s'agir d'une inhibition de synthèse d'une hormone de croissance essentielle à la croissance des escargots.

D'un autre côté, Cette perte de poids peut être expliquée par la diminution de la consommation de la nourriture contaminée comme le stipulent Laskowski et Hopkin (1996) qui observent une forte réduction de la prise alimentaire chez des escargots juvéniles exposés à une nourriture contaminée par le Cd ,Cu, Zn ,et Pb .



Il est donc intéressant de s'interroger sur les causes possibles de cette inhibition. L'étude de Russel et *al.*, (1981) rend compte d'une corrélation positive entre la réduction de la prise de nourriture contaminée par le Cd et la perte de poids. D'autre part, Van Straalen et *al.* (1987) suggèrent que ces animaux sont capables de réguler la quantité de métaux dans leur masse corporelle avec pour conséquence une diminution de la consommation alimentaire aux fortes doses. Simkiss et Watkins (1990) rapportent qu'*Helix aspersa* est capable de détecter de fortes concentrations en zinc dans sa nourriture, entraînant une diminution du taux de consommation de la nourriture fortement contaminée. Nos résultats sont en accord avec ceux de Grara (2011) qui a mis en évidence une perte de poids chez *Helix aspersa* suite à une exposition subchronique aux particules métalliques.

Très peu d'études ont évalué les effets de l'exposition chronique aux métaux lourds sur le développement et la maturité l'appareil génital des escargots, Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes attachés à évaluer les effets de l'exposition à long terme aux particules métalliques sur le développement de l'appareil génital en particulier la gonade appelée aussi l'ovotestis qui produit à la fois des gamètes mâles (les spermatozoïdes) et des gamètes femelles (les ovules) et la glande à albumen qui produit du galactogène et des protéines qui se déposent autour des ovocytes fécondés. Ces deux substances constituent la couche périvitelline des œufs (Goudsmit, 1975).

L'exposition aux poussières métalliques tend à diminuer le développement de la glande à albumen, la gonade et l'appareil génital, en effet selon Laskowski et Hopkin (1996), l'exposition chronique des escargots à une nourriture contaminée par une mixture de métaux ((Cd, Cu, Pb et Zn) retarde la reproduction. De plus, Gomot-de Vaufleury et Kerhoas (2000) indiquent que l'exposition des escargots *Helix aspersa* à une nourriture contaminée par le cadmium (400µg/g) durant une période de 10 semaines tend à diminuer le développement de la glande à albumen (inhibition de 96%) de la gonade (inhibition de 50%) et du tractus génital (inhibition de 82%).

Nos résultats sont en accord avec ceux cités précédemment puisque nous avons mis en évidence une diminution de la masse fraîche de la gonade ainsi qu'une importante réduction de la masse fraîche de la glande à albumen, selon (Gomot de Vaufleury, 2001). Cette diminution est due probablement à une perturbation du système endocrinien ou

neuroendocrinien. D'autre part l'inhibition du développement de la glande à albumen empêche la formation des œufs entraînant une absence de pontes et une baisse de la fertilité ( Gomot-de Vaufleury, et Kerhoas,2000)

## Conclusion Général

Comme annoncé dans l'introduction du manuscrit l'objectif majeur de ce projet est d'évaluer les effets toxiques induits par une exposition chronique aux métaux lourds. Dans cette optique les expérimentations se sont attachées à déterminer l'impact des ETM sur l'escargot *Helix aspersa*

Le travail expérimental s'est déroulé en 2 étapes :

- Exposition contrôlée à une nourriture contaminée par des doses croissantes de métaux durant 12 semaines
- Exposition non-contrôlée à une pollution polymétallique sur un site industriel en activité durant 12 semaines

Dans le cadre de notre travail, nous avons étudié Plusieurs aspects possibles de l'expression de la toxicité des métaux : stress oxydant, bioaccumulation, altérations histologiques, croissance et reproduction.

Nos résultats montrent que l'exposition chronique à une pollution métallique dans des conditions contrôlées et non contrôlées provoque une inhibition de l'activité GST et une diminution du taux de GSH probablement en raison de son rôle dans la séquestration des particules métalliques.

Les principaux résultats obtenus indiquent une induction de l'activité catalase qui révèle l'induction du stress oxydatif dont le principal biomarqueur est la catalase.

Nous avons mis en évidence une augmentation du taux de MDA au niveau de la glande digestive, du lysat hémoducal et du sérum chez les escargots placés en conditions non contrôlées (sur le site industriel) ainsi que chez les escargots en conditions contrôlées (laboratoire).

L'analyse des données concernant la bioaccumulation confirment le fort potentiel bioindicateur d'*Helix aspersa* en ce qui concerne les éléments métalliques. Les résultats ont montré une forte accumulation du fer et du plomb dans les deux organes (hépatopancréas et rein) et ce à toutes les conditions d'élevage des escargots. Cette accumulation de particules métalliques est accompagnée d'atteintes histologiques sur tous les organes cibles et non cibles testés en plus l'inhibition de croissance des juvéniles et la perturbation du développement

des organes génitaux ( gonade , glande à albumen) et du tractus génital chez les escargots exposés aux différentes concentrations de particules métalliques entraînant ainsi une diminution de la reproduction et une baisse de la fertilité chez *Helix aspersa*

## Perspectives

Dans le cadre d'un travail futur, il serait souhaitable de :

- Réalisé des expériences de bio indication active sur une gamme plus diversifiée de sites (en milieu agricole ou autoroutier) présentant des contaminations en éléments métalliques et en hydrocarbures aromatiques polycycliques importantes.
- La mise au point d'un système de dosage des ROS ( $H_2O_2$  par exemple) semble une bonne perspective afin de déterminer leurs implications potentielles dans les effets toxiques mesurés à d'autres niveaux d'organisation biologique.
- la détermination de la capacité de transfert des métaux de l'adulte à l'œuf, puis à l'embryon.

## References Bibliographiques

- Abdel-Halim, K.Y., Abo El-Saad, A.M., Talha, M.M., Hussein, A.A., Bakry, N.M., 2013.** Oxidative stress on land snail *Helix aspersa* as a sentinel organism for ecotoxicological effects of urban pollution with heavy metals. *Chemosphere*, 93: 1131–1138.
- Adriano, D., 2001.** Trace elements in terrestrial environment: Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals, 2nd ed. Springer-Verlag, New-York, NY, USA.
- Albers, P., Heinz, G.H., Ohlendorf, H.M., 2000.** Environmental contaminants and terrestrial vertebrates: effects on populations, communities, and ecosystems. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)*, Pensacola, Florida.
- Alloway, B.J., 1995.** Heavy metals in soils. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
- Al-Mutairi, D. A., Craik, J. D., Batinic-Haberle, I., Benov, L. T., 2007.** Induction of oxidative cell damage by photo - treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. *Free radical research*, 41, 89-96.
- Amaral, A., da Cunha, H., Rodrigues, A ., 2004.** The connective tissue index of *Helix aspersa* as a metal biomarker. *BioMetals* 17: 625–629.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006.** Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* ,76, 160-202.
- Aurousseau, B., 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux : Conséquence sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim* , 15(1), 67-82.
- Aust, S.D., Thomas, R.L., 1985.** Role of metals in oxygen radical reactions. *Free. Rad. Biol. Med*, 1, 3-25.
- Baize , D., 1997 .** Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols ( France) .INRA, Paris ,408 p .
- Baker, S., Herrchen, M., Hund-Rinke, K., Klein, W., Kordel, W., Peijnenburg, W., Rensing, C., 2003.** Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 6-19.
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C., 2005.** Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol*, 140, 175–186.
- Barillet, S., 2007.** Toxicocinetique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz, France. 476p.

**Barjaktarovic, L., Elliott, J.E., Scheuhammer, A.M., 2002.** Metal and Metallothionein Concentrations in Scoter (*Melanittaspp.*) from the Pacific Northwest of Canada, 1989–1994. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* .43, 0486-0491.

**Baurand, P.-E., Capelli, N., Scheifler, R., & de Vauflery, A., 2014.** An assessment of the embryotoxicity of cadmium in the terrestrial mollusk *Cantareus aspersus*: From bioaccumulation to impacts at different levels of biological organization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110, 89–94.

**Baurand, P.-E., de Vauflery, A., Scheifler, R., & Capelli, N., 2013.** Coupling of random amplified polymorphic DNA profiles analysis and high resolution capillary electrophoresis system for the assessment of chemical genotoxicity. *Environ.Sci. Technol.* 47, 9505–9513.

**Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A., 2005.** Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathy-modiolusazoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol*, 75, 354–373.

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

**Berger, B. et Dallinger, R.,1993.** Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental pollution. *Environmental Monitoring Assessment*, 25: 65-84.

**Berger, B., Dallinger, R., Felder, E. et Moser, J., 1993.** Budgeting the flow of cadmium and zinc through the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L., In *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, Ed Dallinger R. and Rainbow P.S., 291-313.

**Bertin, G., Averbek, D., 2006.** Cadmium: cellular effects, modifications of a biomolecules, modulation of DNA repair and a genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549-1559.

**Borkovic Mitic ,S., Pavlovic, S.Z., Perendija, B., Despotovic ,S., Gavric ,J., Gacic´ , Z., Saicic ,Z.,2013.** Influence of some metal concentrations on the activity of antioxidantenzymes and concentrations of vitamin E and SH-groups in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* from the Serbian part of Sava River. *Ecological Indicators* 32, 212– 221.

**Boucenna , M., 2015 .** Etude de la toxicité des particules métalliques d’origine industrielle chez *Helix aspersa*. Evaluation nanotoxicologique du Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>et Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Thèse de doctorat université de Annaba. 165p.

**Boucenna, M., Berrebbah, H., Atailia ,A., Grara ,N., Djebar ,M.R.,2015.** Effects of Metal Dust on Functional Markers and Histology of Gland Digestive and Kidney of the Land Snails (*Helix aspersa*) in the North East of Algeria . *Global Veterinaria* 14 (2): 189-198.

**Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S.,2007.** Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 531–539.

**Bride ,J et Gomot , L.,1991.** "Asynchronous development of the genital-tract during growth and reproduction in the snail, *Helix aspersa*." *Reproduction Nutrition Development* 31(1): 81-96.

**Brown, B.E., 1982.** The form and function of metal-containing granules in invertebrate tissues. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 57, 621-667.

**Brown, P.J., Long, S.M., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., & Hankard, P.K.,2004.** Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a noncarcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*. 57, 1675-1681.

**Burger, J., Diaz-Barriga, F., Marafante, E., Pounds, J., Robson, M., 2003.** Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 20-31.

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

**Cavaletto,M., Ghezzi, A., Burlando,B., Evangelisti,V., Ceratto,N., Viarengo,A., 2002.** Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part*, 131, 447–455.

**Chabicovsky,M., Klepal,W., Dallinger,R.,2003.** 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 C140, 422–426.

**Chapman , P.M ., Wang ,F., Janssen,C.R., Kamunde, C.N., Goulet, R.R. ,**Conducting Ecological Risk Assessments of Inorganic Metals and Metalloids: Current Status. *Human and Ecological Risk Assessment*: Vol. 9, No. 4, pp. 641-697

**Christie, N.T., and M., Costa., 1984.** Review: In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothioneins and DNA. *Biol. Trace Elem. Res* 6, 139-158.

**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 Vaufléury, A., Saint-Denis, M., Ribera, D., Narbonne, J.F., & Badot, P.M., 2002.** Effects of dimethoate on snail B-esterase and growth as a function of dose, time and exposure route in a laboratory bioassay. *Biomarkers*. 7(2), 138-150.

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

**Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., & Vasseur, P., 1997.** Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. In: *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. et Ramade, F. (Eds), 125-148, Masson, Paris.

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

**Dallinger, R., 1993.** Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, Lewis Publishers, 245-289.

**Dallinger, R., Berger, B., Triebkorn-Köhler, R., & Köhler, H. 2001.** Soil biology and ecotoxicology, in: Barker, G.M. (Ed.), and the biology of terrestrial molluscs. *CABI, Wallingford*, 489–525.

**Dallinger, R., Berger, B., Gruber, C., Hunziker, P., Sturzenbaum, S., 2000.** Metallothioneins in terrestrial invertebrates: Structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cellular and Molecular Biology* .46, 331-346.

**Dallinger, R., Rainbow, P.S. (Eds.) , 1993.** Ecotoxicology of metals in invertebrates. Lewis publishers, Boca raton, Florida, USA.

**Damek-Poprawa, M., 2002.** The effect of heavy metal accumulation on metallothionein content in selected tissues of bank voles and yellow-necked mice caught near a steelworks and zinc smelter. *Folia Biologica* .50, 211-214.

**Davis, S.R., Cousins, R.J., 2000.** Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function. *Journal of Nutrition* 130, 1085-1088.

**De Vaufléury, A., Coeurdassier, M., Pandard, P., Scheifler, R., Lovy, C., Crini, N., Badot, P.-M., 2006.** How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* .25, 797–806.

**Depledge M.H., 1994.** The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools, in M. C. Fossi, and C. Leonzio, eds., *Nondestructive biomarkers in vertebrates*: Boca Raton.

**Dimitriadis VK., 2001.** Structure and function of the digestive system in *Stylommatophora* In: Barker GM, Ed. *The Biology of Terrestrial Molluscs*. *Wallingford: CABI Publishing*, 237– 257.

- Dickinson, D. A., Forman, H. J., 2002.** Cellular glutathione and thiols metabolism *Biochemical pharmacology*, 64, 1019-26.
- Draper, H.H., & Hadley, M.** 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 186, 421–431 FL, USA, Lewis Publishers, p. 261-285.
- Droge, W., 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82(1), 47–95.
- Druart, C., Scheifler, R., Millet, M., & De Vaufleury, A., 2012.** Land snail eggs bioassays: A new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. *Applied Soil Ecology*, 53(1), 56–64.
- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dörr, A.J.M., & Mantilacci, L. ,2003.** Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55, 162–167.
- El-Khayat, H., Abdel-Hamid, H., Gaber, H., Kadria, M., Fiefel, H., 2015.** Snails and Fish as Pollution Biomarkers in Lake Manzala and Laboratory A: Lake Manzala Snails. *Fish Aquac* • 2150-3508.
- El-Shenawy, S., Mohammadden, A., Al-Fahmie, Z., 2012.** Using the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system of the land snail *Eobania vermiculata* as biomarkers of terrestrial heavy metal pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84. 347–354.
- Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N., 2001.** Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6): 529-539.
- Fahmy, S.R., Abdel-Ghaffar, F., Bakry, F.A., & Sayed, D.A., 2014.** Ecotoxicological Effect of Sublethal Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles on Freshwater Snail *Biomphalaria alexandrina*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(2), 192–202.
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., 2007.** Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 68, 145-227.
- Frías, E., Abad, R., Aidée C., Nevárez, V, Isidro, L, Páez, O., Lozan, O., Domenico, V., 2008.** Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquatic Toxicology* .89 ,152–157.
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M., Bayona, J.M., Barata, C., 2009.** Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, 149: 281–288.
- Fritsch, C., 2010.** Utilisation intégrée de bioindicateurs pour la Surveillance des sols et des écosystèmes terrestres. Thèse de doctorat. Université de Franche-Comté. 346p.

**Fritsch, C., Coeurdassier, M., Giraudoux, P., Raoul, F., Douay, F., Rieffel, D., de Vaufleury, A., & Scheifler, R., 2011.** Spatially explicit analysis of metal transfer to biota: Influence of soil contamination and landscape. *PLOS ONE* 6, e20682.

**Fritsch, C., Scheifler, R., Beaugelin-Seiller, K., Hubert, P., Coeurdassier, M., de Vaufleury, A., Badot, P.-M., 2008.** Biotic interactions modify the transfer of cesium-137 in a soil-earthworm-plant-snail food web. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1698-1707.

**Funes, V., Alhama, J., Navas, J.I., López-Barea, J., & Peinado, J., 2005.** Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environmental Pollution*. 139(2):214-23.

**Giarratano, E., Mónica, N., Gil, G.M., 2014.** Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel *Aulacomya atra* (Nuevo Gulf, Northern Patagonia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107: 111–119.

**Gimbert, F., 2006.** Cinétiques de transfert de polluants métalliques du sol à l'escargot. University of Franche-Comté, Besançon, France, p. 192.

**Gimbert, F., de Vaufleury, A., Douay, F., Coeurdassier, M., Scheifler, R., & Badot, P.-M., 2008.** Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 70, 138–146.

**Gimbert, F., De Vaufleury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., & Badot, P.-M., 2006.** Modelling chronic exposure to contaminated soil: A toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environ. Int.*, 32, 866–875.

**Gimbert, F., Vijver, M.G., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Peijnenburg, W.J.G.M., Badot, P.M., de Vaufleury, A., 2008.** How subcellular partitioning can help to understand heavy metal accumulation and elimination kinetics in snails. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1284-1292.

**Gomot A., 1997.** Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 33: 209-216.

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

**Gomot-de-Vaufleury, A., 2000.** Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46:41-50.

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

**Gomot-De Vaufleury, A., & Pihan, F., 2000.** Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46, 41–50.

- Gomot-de Vaufleury, A., Bispo, A., 2000.** Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. 1. Sublethal effects on growth. *Environmental Science & Technology* 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., 2002.** Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: Metal bioavailability and bioaccumulation. *Environmental Toxicology and Chemistry* .21, 820-827.
- Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Huang, W.B., Wang, K.J., 2009.** Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* .75,389–397.
- Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Yi Chen, F., Jun, B., John P.G., 2013.** Modulation of immune-associated parameters and antioxidant responses in the crab (*Scylla serrata*) exposed to mercury. *Chemosphere*, 90: 917–928.
- Gopalakrishnan, S., Chen, F.Y., Thilagam, H., Qiao, K., Xu, W.F., Wang, K.-J., 2011.** Modulation and interaction of immune-associated parameters with antioxidant in the immunocytes of crab *Scylla paramamosain* challenged with lipopolysaccharides. *Aquat. Toxicol.* 64, 185-200.
- Goudsmit EM., 1975.** Neurosecretory stimulation of galactogen synthesis within the *Helix pomatia* albumen gland during organ culture. *J Exp Zool.* 191: 193-198.
- Grara, N., 2011.** Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux .Thèse de doctorat de L'université de Annaba. 120p.
- Grara, N., Atilia, A., Boucenna, M., Khaldi, F., Berrebbah, H., & Djebbar, M.R., 2012.** Effects of heavy metals on the snail *Helix aspersa* bioindicators of the environment pollution for human health. *Int. Conf. Appl. Life Sci.*, 241–246.
- Grara, N., Berrebbah, H., Rouabhi, R., Atilia, A., & Djebbar, M.R., 2009.** Impact of Pollution by Industrial Metallic Dust on Bio-Accumulator Organism *Helix aspersa*. *Global Veterinaria*, 3(4): 276-280.
- Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Coquery, M., Mons, R., Abbaci, K., Giamberini, L., Garric, J., 2011.** Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Aquatic Toxicology*, 101(1), 100–108.
- Gutteridge., JM ,and Halliwell., B ., 1992.** Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med* 12, 93-95.

**Guyard, A., 2009.** <http://baladesnaturalistes.hautetfort.com/archive/2009/10/11/1-escargot-anatomie-interne.html>.

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

**Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999.** Free radicals in Biology and medicine. Oxford University Press, 936 pp.

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

**Hayes, J.D., & Pulford, D.J., 1995.** The Glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemo protection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30, 445-600.

**Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005.** Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.

**Hispard, F., Schuler, D., de Vaufléury, A., Scheifler, R., Badot, P.M., & Dallinger, R., 2008.** Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1533-1542.

**Hopkin, S.P., 1989.** Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier, London, UK

**Hultberg, B., Andersson, A., Isaksson, A., 2001.** Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology*, 156: 93-100.

**IPCS., 2004.** Risk assessment terminology. World Health Organization, Geneva, Switzerland

**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.

**Kambale, N., Et Potdar, V., 2011.** Metallic Concretions In The Nephrocytes Of freshwater Snail *Bellamya Bengalensis*. *Bionano Frontier*, Vol. 4 (2).

**Kammenga, J., Laskowski, R. (Eds.), 2000.** Demography in ecotoxicology. John Wiley & Sons Chichester, UK.

**Kerney, M., & Cameron, R.A.D., 2006.** A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Delachaux et Niestlé SA, Paris. 97 p.

**Kim, J.H., Kim, J.H., Kim, K.-W., Kim, M.H., & Yu, Y.S., 2009.** Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood-retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity. *Nanotechnology*, 20, 1-8.

- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., 2009.** Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* ,238, 215-220.
- Kojadinovic, J., Bustamante, P., Le Corre, M., Cosson, R.P., 2007.** Trace elements in three marine birds breeding on Reunion Island (Western Indian Ocean): Part 2 - Factors influencing their detoxification. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 52, 431-440.
- Konings, A.W., Penninga, P.,1985.** On the importance of the level of glutathione and the reactivity of the pentose phosphate pathway in heat sensitivity and thermo tolerance. . *Chem. Med.*, 48, 409–422.
- Kooistra ,L., Leuven .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
- Kruatrachue, M., Sumritdee, C., Pokethitiyook, P., Singhakaew., S. 2011.** Histopathological effects of contaminated sediments on golden apple snail (*Pomacea canaliculata*, Lamarck 1822). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(6),610–614.
- Ladhar-Chaabouni, R, Smaoui-Damak, W., & Hamza-Chaffai, A.,2009.** In vivo variation of some biomarkers with time and cadmium concentration in the cockle *Cerastoderma glaucum*. *Marine biology research*, 5 (5), 478-486
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997 .** Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions (introduction). In: L. Lagadic , T. Caquet , J.C. Amiard , *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Masson , Londrs , Paris , New york ,pp. 1-9.
- LagadicL., Caquet T. et Ramade F., 1994.**The role of biomarkers in environmental assessment. (5) Invertebrate populations and communities, *Ecotoxicology*, 3(3): 193-208.
- La Rocca, B.V., 2004.** Mise au point et validation, sur sites contaminés, (ETM-HAP) d'un test de biosurveillance en microcosme : croissance et bioaccumulation par le gastéropode terrestre *Helix aspersa aspersa*. Thèse de doctorat, l'université de Metz, 266p
- Laskowski R., Hopkin S.P., 1996.** Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 34: 59-69.
- Lawton, L.J., Donaldson, W.E., 1991.** Lead- induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxydation. *Biol. !. Res.*, 28, 93-97.
- Le Bras G.J., 2007.** Ecotoxicologie et méthodes d'investigation « les bio-indicateurs » version 2.0, ISA & Université Catholique de Lille, p.91.
- Le Calve. D., 1989.** "Influence des conditions d'incubation des oeufs sur les six premières semaines de la croissance d'escargots petits-gris, *Helix aspersa* Müller (Gasteropode, Pulmone, Stylommatophore)." *Bulletin de la Société zoologique de France* **114**: 101-110.

- Leomanni, a., Schettino, T., Calisi, A., Gorbi, S., Mezzelani, M., Regoli, F., & Lionetto, M.G., 2015.** Antioxidant and oxidative stress related responses in the Mediterranean land snail *Cantareus apertus* exposed to the carbamate pesticide Carbaryl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 168, 20–27.
- Lesser, M.P., 2006.** Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology, *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 253–278.
- Letellier, C., 2010.** Capacité antioxydant variations intraspécifiques et interspécifiques chez les hélicidés, Master 2. Université de Rennes 1.
- Livingstone, D.R., 2001.** Contaminant -stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull*, 42, 656-666.
- Loos, M., Ragas, A.M.J., Tramper, J.J., Hendriks, A.J., 2009.** Modeling zinc regulation in small mammals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2378-2385
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M., Oikari, A., Haimi, J., 2004.** Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure, differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environ. Pollut.*, 129, 377–386.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005.** Why is metal bioaccumulation so variable Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology* 39, 1921-1931.
- 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. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 167e176.
- Marigomez, I., Soto, M., Kortabitarte, M., 1996.** Tissue-level biomarkers and biological effect of mercury on sentinel slugs, *Arion ater*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 54–62.
- Marnett, L.J., 2002.** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181-182, 219-222.
- Martoja, R., Martoja, M., 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, 347.
- Markert, B., Oehlmann, J. et Roth, M., 1997.** General aspects of heavy metal monitoring by plants and animals. *Environmental Biomonitoring*, 654: 19-29.
- Marques, C.C., Gabriel, S.I., Pinheiro, T., Viegas-Crespo, A.M., Mathias, M.d.L., Bebianno, M.J., 2008.** Metallothionein levels in Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to elemental pollution: An ecophysiological approach. *Chemosphere* .71, 1340-1347.
- McGeer, J.C., Henningsen, G., Lanno, R., Fisher, N., Sappington, K., Drexler, J., 2004.** Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals, in: Beringer, M. (Ed.). US *Environmental Protection Agency. Risk Assessment Forum, Washington DC, USA*, p. 126.

- Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H., Rodilla, V., 2000.** Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 35,35-70.
- Nieboer, E., Richardson, D.H.S., 1980.** The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*. 1, 3-26.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., & Aerts, R.,2006.** Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the land snail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. *Ecotoxicology* .15, 295-304.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2005.** Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution* .138, 178-190.
- Nzengue, Y., 2008.** Comparaison des mécanismes de toxicité redox du Cadmium , du cuivre et du zinc : place des métallo thionines et de P53 . Thèse de doctorat, Université JOSEPH FOURIER –GRENOBLE 1, France .299 p.
- Otitoloju, A.A., Ajikobi, D.O., Egonmwan, R.I.,2009.** Histopathology and bioaccumulation of heavy metals (Cu & Pb) in the giant land snail, *Archachatina marginata* (Swainson). *The Open Environmental Pollution and Toxicology*, 1, 79–88.
- Owen G.,1966** .Digestion. In: Wilbur KM, Yonge CM, eds.*Physiology of Mollusca*, Vol 2, New York: Academic Press:53–96.
- Packer,L, Tritschler,HJ and Wessel, K.,1997.** Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid.*Free Radic Biol Med* 22, 359-378.
- Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C., 2005.**Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilusgalloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Mar. Pollut. Bull* , 50, 1548–1557.
- Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., Gensemer, R.W., Goss, G.G., Hogstrand, C., Janssen, C.R., McGeer, J.C., Naddy, R.B.,Playle, R.C., Santore, R.C., Schneider, U., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., Wu, K.B., 2002.** The biotic ligand model:a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology C- Toxicology & Pharmacology* .133, 3-35.
- Park, J.D., Liu, Y., Klaassen, C.D., 2001.** Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology* .163, 93-100.
- Peakall, D., Burger, J., 2003.** Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* .56, 110-121.



- Peakall, D.W.,1994** . Biomarkers; the way forward in environmental assessment . *toxicology and Ecotoxicology News*. 1: 55-60.
- Pellerin, J.,2003**. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.* 64, 185-200.
- Pellerin-Massicotte, J.,1994**. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Aquat. Ecosyst. Health.* 3, 101-111.
- Peplow, D., Edmonds, R., 2005**. The effects of mine waste contamination at multiple levels of biological organization. *Ecological Engineering* .24, 101-119.
- Pihan, F., de Vaufleury, A., 2000**. The snail as a target organism for the evaluation of industrial waste dump contamination and the efficiency of its remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* .46, 137-147.
- Powers ,SK., Lennon, SL., 1999**. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-1033.
- Puntarulo, S. and Cederbaum, A.I., 1988**. Comparison of the ability of the ferric complexes to catalyze microsomal chemiluminescence, lipid peroxidation and hydroxyl radical generation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 264: 482–491.
- Rabitsch, W.B.,1996**. Metal accumulation in terrestrial pulmonates at a Lead/zinc smelter site in Arnoldstein, Austria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56:734-741.
- Radwan, M.A., El-Gendy, K.S., Gad, .A.F.,2010**. Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*, 79: 40–46.
- Reeves, P.G., Chaney, R.L., 2008**. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. *Science of the Total Environment* 398, 13-19.
- Regoli ,F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R. , Benedetti, M., Piva, F.,2006**. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environmental Health Perspectives* .114, 63-69.
- Regoli, F., Nigro, M. and Orlando, E.,1992**. Effects of copper and cadmium on the presence of renal concretions in the bivalve *Donacilla cornea*. *Comp Biochem Physiol.* 102C, 189-192.
- Regoli, F., Principato, G.,1995**. Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31, 143-164.

- Rogival, D., Van Campenhout, K., Infante, H.G., Hearn, R., Scheirs, J., Blust, R., 2007.** Induction and metal speciation of metallothionein in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a metal pollution gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry* .26, 506-514.
- Roling, J.A., Baldwin, W.S., 2006.** Alterations in hepatic gene expression by trivalent chromium in *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.* 62, 122–127.
- Roméo M., Hoarau P., Garello G., Gnassis-Barelli M., Girard J.P., 2003.** Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.*, 22: 369-378.
- Russell L.K., DeHaven J.I., Botts R.P., 1981.** Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 26: 634- 640.
- Saïdi, S.A., M.S, Azaza., P, Windmoldersc., J,van Pelt., A , El-Feki.,2013.** Cytotoxicity evaluation and antioxidant enzyme expression related to heavy metals found in tuna by-products meal: An in vitro study in human and rat liver cell lines. *Experimental and Toxicologic Pathology* . 65 1025– , 1033.
- Salinas, A.E., & Wong, M.G.,1999.** Glutathione S-transferases a review. *Curr. Med.Chem.*, 4, 279–309.
- Savva, D., Garcia-Aljaro, C., Lawes, K.P., Swiergosz-Kowalewska, R., 2002.** Characterisation of DNA probes for the analysis of metallothionein gene expression in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Environment International*. 28, 139-146.
- Scheifler, R., Gomot- de Vaufleury, A., Coeurdassier, M., Crini, N., Badot, P.M., 2006.** Transfer of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: A microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry* .25, 815-822..
- Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A., Toussaint, M., Badot, P.-M., 2002.** Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* . 48, 571-579
- Shore, R.F., Douben, P.E., 1994.** Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants onterrestrial small mammals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 134, 49-89.
- Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), 2001.** Ecotoxicology of Wild Mammals. John Wiley & Sons, London, UK.
- Sies., H. 1991.** Oxidative stress introduction. *In: Sies H. (ed.), Oxidative stress oxidants and antioxidants, Academic Press, San Diego*, 1-15.
- Siritantikorn, A., Johansson, K., Ahlen, K., Rinaldi, R., Suthiphongchai, T., Wilairat, P., Morgenstern, R. ,2007.** Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355, 592–596.
- Simkiss, K., Watkins, B., 1990.** The influence of gut microorganisms on zinc uptake in *Helix aspersa*. *Environmental Pollution*, 66(3): 263-271.

**Smith, P.N., Cobb, G.P., Godard-Codding, C., Hoff, D., McMurry, S.T., Rainwater, T.R., Reynolds, K.D.,2007.** Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environmental Pollution* .150, 41-64.

**Snyman, R.G., Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., 2005.** Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to fungicide copper oxychloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety* .60, 47-52.

**Solé, M., Potrykus, J., Fernandez-Dias, C., & Blasco, J.,2004.** Variations on stress defences and metallothionien levels in the Senegal sole, *Solea senegalensis*, during early larval stage. *Fish Physiol. Biochem.*, 30, 57-66.

**Stegeman J.J., Brouwer M., Richard T.D.G.,1992.** Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress: Chelsea, MI, USA, Lewis Publishers, p. 235-335

**Suter II, G.W., 1993.** Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers.

**Swaileh, K. M., Ezzughayyar, A.,2000.** Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the land snail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* .47, 253-260.

**Swaileh K.M., Ezzughayyar A., 2001.** Dose-dependent effects of dietary Pb and Zn on feeding and growth rates of the land snail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 50: 9-14.

**Swaileh, K., Hussein, R. , Halaweh, N.,2002.** Metal accumulation from contaminated food and its effect on growth of juvenile land snails *Helix engaddensis*. *Journal of environmental science and health, part B*. 37(2): 151-159.

**Swiergosz-Kowalewska, R., 2001.** Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microscopy Research and Technique*. 55, 208-222.

**Swiergosz-Kowalewska, R., Bednarska, A., Callaghan,A., 2007.** Expression of metallothionein genes I and II in bank vole *Clethrionomys glareolus* populations chronically exposed in situ to heavy metals. *Environmental Science and Technology* .41, 1032-1037.

**Tadjine, A., Djebar, H., & Courtois, A.,2008.** Toxicité des poussières rejetées par le complexe sidérurgique d'Annaba sur quelques paramètres hématologiques du lapin *Europeus*. *Environnement, Risques et Sante*, 7(3), 209–215.

**Talmage, S., Walton, B., 1991.** Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Review of Environmental Contaminants and Toxicology* .119, 47-145.

**Tao,Y.,Pan, L., Zhang, H., Tian, S.,2013.**Assessment of the toxicity of organochlorine pesticide endosulfan in clams *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93: 22–30.

**USEPA., 1992.** Guidelines for exposure assessment. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 139.

**Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M.,2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.

**Van Den Hout, K.D., Bakker, D.J., Berdowski, J.J.M., Van Jaarsveld, J.A., Reinds, G.J., Bril, J., Breeuwsma, A., Groenenberg, J.E., De Vries, W., Van Pagee, J.A., Villars, M., Sliggers, C.J., 1999.** The impact of atmospheric deposition of non-acidifying substances on the quality of European forest soils and the North Sea. *Water Air and Soil Pollution* ,109, 357-396.

**Van der Oost R., Beyer J. et Vermeulen N.P.E., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2): 57-149.

**Van Straalen , N.M., 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., et Van Gestel ,C.A.M., 1998.** Soil invertebrates and micro-organisms. In Calow, P;(Ed) *.Handbook of Ecotoxicology .Blackwell Science .Oxford*, p.251-277.

**Vanparys, C., Dauwe, T., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., Eens, M., 2008.** Metallothioneins (MTs) and delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAd) as biomarkers of metal pollution in great tits (Parus major) along a pollution gradient. *Science of the Total Environment*, 401, 184-193.

**Veltman, K., Huijbregts, M.A.J., Hamers, T., Wijnhoven, S., Hendriks, A.J., 2007.** Cadmium accumulation in herbivorous and carnivorous small mammals: Meta-analysis of field data and validation of the bioaccumulation model optimal modeling for ecotoxicological applications. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26, 1488-1496.

**Viard, B., Pihan, F., Promeprat, S., & Pihan, J.C. ,2004.** Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: Bioaccumulation in soil, Gramineae and land snails. *Chemosphere*, 55, 1349-1359.

**Viarengo, A.,1994.** Heavy metal cytotoxicity in marine organisms: effects on Ca<sup>2+</sup>homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 20, 85–110

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

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

**Vlahogianni , T., Dassenakis, M. , Scoullou , M.J., Valavanidis, A., 2007.** Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals pollution in coastal areas From the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin* ,54, 1361-1371.

**Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2006.** Principles of ecotoxicology, Third ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA Wallingford, 489–525

**Wang, Z., C.Yan., C.D. Vulpe., Y, Yan., Q, Chi., 2012.** Incorporation of in situ exposure and biomarkers response in clams *Ruditapes philippinarum* for assessment of metal pollution in coastal areas from the Maluan Bay of China. *Marine Pollution Bulletin* .64, 90–98.

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

**Weckx JEJ, Clijsters HMM.,1997.** Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* Plant Physiology and Biochemistry35,405–410.

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

**Wijnhoven, S., Leuven, R., van der Velde, G., Jungheim, G., Koelemij, E., de Vries, F., Eijsackers, H., Smits, A., 2007.** Heavy-metal concentrations in small mammals from a diffusely polluted floodplain: importance of species- and location-specific characteristics. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 52, 603-613.

**Wilfried ,S .,2007 .**Approche multi-biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines ( *Gasterosteus aculeatus* L.) : Un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux, Thèse de doctorat , museum national d'histoire naturelle, 271p .

**Williamson, P., 1980.** Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepaea hortensis*Müller. *Oecologia* 44, 213-220.

**Wlostowski, T., Bonda, E., Krasowska, A., 2004.** Photoperiod affects hepatic and renal cadmium accumulation, metallothionein induction, and cadmium toxicity in the wild bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58, 29-36.

**Wlostowski, T., Krasowska, A., 1999.** Subcellular distribution of metallothionein and cadmium in the liver and kidneys of bank voles (*Clethrionomys glareolus*) exposed to dietary cadmium. *BioMetals*, 12, 173-179.

**Wu, G. and Yi, Y., 2015.**Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 167: 131–139.

**Yager, C.M., Harry, H.W.,1963.** The uptake of radioactive zinc, cadmium and copper by the freshwater snail *Taphius glabratus*. *Malacologia*,1, 339-53.

**Zaldibar, B., Cancio, I., Soto, M., Marigomez, I., 2007.** Digestive cell turnover 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 a chronically metal-polluted site. *Environmental Pollution* (156)367-379.

**Zhou, J., Wang, W.N., Wang, A.L., He, W.Y., Zhou, Q.T., Liu, Y., & Xu, J.,2009.** Glutathione-S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 150, 224-230.



## Biomarkers Responses of Land Snails *Helix aspersa* Exposed to Chronic Metal Pollution under Field and Laboratory Conditions

Amira Atailia<sup>†\*</sup>(\*\*), Houria Berrebbah\*\*, Mounir Boucenna\*\*, Amel Alayat\*\*, Rima Amamra\*\*, Nedjoud Grara\*\* and Mohamed Reda Djebbar\*\*

\*Biology Department, Faculty of Life and Natural Sciences, Chadli Ben Jdide University, El tarf 36000, Algeria

\*\*Laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba 23000, Algeria

<sup>†</sup>Corresponding author: Amira Atailia

Nat. Env. & Poll. Tech.  
Website: www.neptjournal.com

Received: 25-09-2015  
Accepted: 10-12-2015

### Key Words:

*Helix aspersa*  
Heavy metals  
Biomarkers,  
CAT, GSH, GST, MDA  
Pollution

### ABSTRACT

The effects of exposure to metals under field and laboratory conditions were investigated in the terrestrial land snail *Helix aspersa*. In this study, terrestrial snails, collected from an uncontaminated site in Guelma city (North east of Algeria) and transplanted at the industrial zone of El hadjar contaminated by several heavy metals. On the other hand groups of *Helix aspersa* were exposed to increasing concentrations of industrial metal dust (100, 300 and 500µg/g of diet) for a total duration of 12 weeks. A battery of non-enzymatic biomarkers malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and enzymatic biomarkers catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) were applied for the estimation of biochemical effects induced by the chronic exposure of snails to mixture of metal dust. Several responses have been revealed in digestive gland, serum and HLS. The results showed that CAT activity and MDA content were significantly higher in snails from the polluted site of El Hadjar and specimens exposed to high concentration of metal dust. In contrast GST activity and GSH level showed significant decrease in both transplanted and metal dust exposed snails. Therefore, our results showed the importance of *H. aspersa* as a sentinel organism for biomonitoring.

### INTRODUCTION

Environmental pollution by metals has become one of the most important problems in the world. Environmental poisoning by heavy metals has increased in the last decades due to extensive use of heavy metals in agriculture, chemical and industrial processes, becoming a threat to living organisms (Mule & Lomte 1994). *Helix aspersa* snails, whose biology and ecology are well known (Cain 1983, Barker 2001), are macro concentrators for several metals (Dallinger 1993) and one of the most commonly used species in ecotoxicological laboratory experiments (Laskowski & Hopkin 1996a, 1996b, Gomot 1997, Gomot-de Vaufleury 2000). *H. aspersa* snails have also been used as MTE bioindicators in polluted areas in passive (Beeby & Richmond 1998, Gomot-de Vaufleury & Pihan 2000) as well as active (Gomot-de Vaufleury & Pihan 2000) biomonitoring studies. Cell damage induced by heavy metals is commonly associated with the ROS formation (Leonard et al. 2004), which needs to be counteracted by defence systems. Thus, assessment of parameters related to oxidative stress in specific sentinel organisms could be included in studies of environmental pollution to predict the impact of pollutants present in the environment (Walker et al. 1976, Pellerin-Massicote 1994, Livingstone

2001). The use of a battery of biomarkers is more advantageous than the use of a single biomarker. Lipid peroxidation (LPO) of membrane lipids, or the oxidation of polyunsaturated fatty acids are observed and used as a biomarker to analyse the effect and exposure to metals (Winston & Di Giulio 1991, Romeo et al. 2000, Gravato et al. 2006). Enzymes of the detoxification machinery can serve as important markers of environmental pollution (Filho et al. 2001). One of the most abundant and ubiquitous detoxification enzyme families is the glutathione-S-transferase family. These enzymes play a pivotal role in inhibiting the cellular damage produced by a wide variety of structurally diverse carcinogens and endogenous toxins (Ansher et al. 1986, Rees 1993, Jaiswal. 1994). The utility of antioxidant enzymes as biomarkers of metal pollution was established by several investigators (Geret et al. 2002, 2003, Grara et al. 2012, Boucenna et al. 2015). This includes non-enzymatic parameters such as glutathione (Cossu et al. 1997, Fernandez-Checa 2003), and enzymatic parameters like catalase (CAT). Therefore, CAT is thought as a key enzyme of the antioxidant defence systems which can protect host cells by removing cytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bai et al. 1999, Bai & Cederbaum 2003).

The aim of this study was to assess the effect of the chronic exposure to the industrial metal pollution in land snails under field and laboratory conditions, by using a suite of biomarkers.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological Material

Gastropod terrestrial snails (*Helix aspersa*) (average weight of  $8.5 \pm 0.15$  g) were collected from an uncontaminated, site of Guelma city (Northeast Algeria) considered as reference site.

### Metal Releases

Metal dust used in this study was collected at steel complex EL-Hadjar and a chemical analysis by atomic absorption was made to determine the composition of this dust. This analysis identified the presence of 7 heavy metals listed in the Table (1).

### Exposure Modalities

**Field exposure:** Specimens of *Helix aspersa* were hand-picked from a relatively unpolluted site of Guelma (North-east Algeria) and transplanted in the city of El Hadjar in the surroundings of the steel complex EL-Hadjar. This steel complex generates considerable quantities of metal dust released in the atmosphere.

Gastropods *H. aspersa*, divided into 2 groups of 40 specimens, and settled in metallic cages (45×35×25 cm) excluding a direct contact with soil. After 12 weeks of exposure, snails were recovered and sacrificed.

**Experiment under laboratory conditions:** The experiment was performed over 12 weeks under controlled conditions at room temperature  $20 \pm 2^\circ$  and a 18/6-h light : dark cycle, humidity 80 to 95%. Animals were maintained in plastic boxes (40×35×15 cm).

Treatment of animals was performed by adding increasing concentrations of metal dust in the diet (wheat flour). We selected three concentrations and a control medium (100, 300, 500 µg/g of food). Snails were divided into 8 lots (15 snails/lot.)

### Collection of haemolymph, isolation of plasma and

**haemocytes and preparation of haemocyte lysate suspension (HLS):** Haemolymph was collected with a glass micro-pipette after puncturing the shell, and touching the foot with the point of a micro pipette tip, the snail was forced to retract deeply into its shell and haemolymph was extruded (Sminia & Barendsen 1980). In this way about 300 µL of haemolymph was obtained from each snail. The haemolymph was centrifuged at 15000 rpm for 45 min at 4C° to collect serum, and the haemocyte lysate suspension (HLS) was obtained followed the same procedure as that described by Gopalakrishnan et al. (2009, 2011).

**Tissue preparation and enzyme determination:** At the end of the experimental period the snails were killed by deep freezing. Shells were removed and digestive gland was excised. Digestive gland, serum and HLS were used for determination of responses to oxidative stress by measuring measures of lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes

Lipid peroxidation (LPO) was determined by the measuring of malondi-aldehyde (MDA) equivalents formed by reaction with thiobarbituric acid (Draper & Hadley 1990) and absorbance was measured at 532 nm. Catalase activity was determined according to the method of Regoli & Principato (1995).

Concentrations of GSH were estimated by the method of Weckberker & Cory (1988), by reading the O.D. of the yellow substance formed when 5,5-dithio-2-nitrobenzoic acid is reduced by glutathione at 412 nm.

Glutathione-S-transferase (GST) activity of the fraction obtained with the substrate 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene was measured spectrophotometrically by following conjugation of the acceptor substrate with glutathione as described in Habig et al. (1974).

### Statistical Data Analysis

The statistical analysis was performed using data analysis software: Minitab (Version 14.0). The mean values obtained in the different groups were compared by unpaired Student's *t*-test, A  $P < 0.05$  was considered statistically significant. The values of all biochemical parameters were expressed as mean  $\pm$  SE.

Table 1: Composition in ppm dust rejected by the steelworks 1 and steel works 2 of the steel complex of El Hadjar-Annaba (Tadjine et al. 2008).

Sample	Cu	Zn	Pb	Cr	Ni	Mn	Fe
Dust steelwork 1	3,7	240	24	10	1,2	320	3000
Dust steelwork 2	7	280	62,4	12	1,3	540	3600
Total	10,7	720	88,4	22	2,5	860	6600



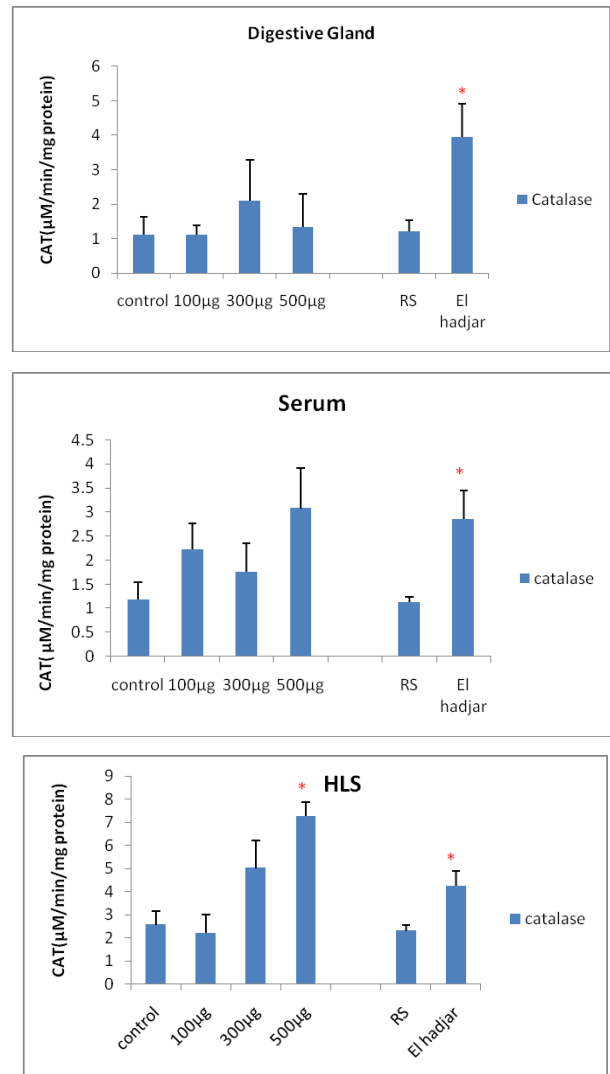
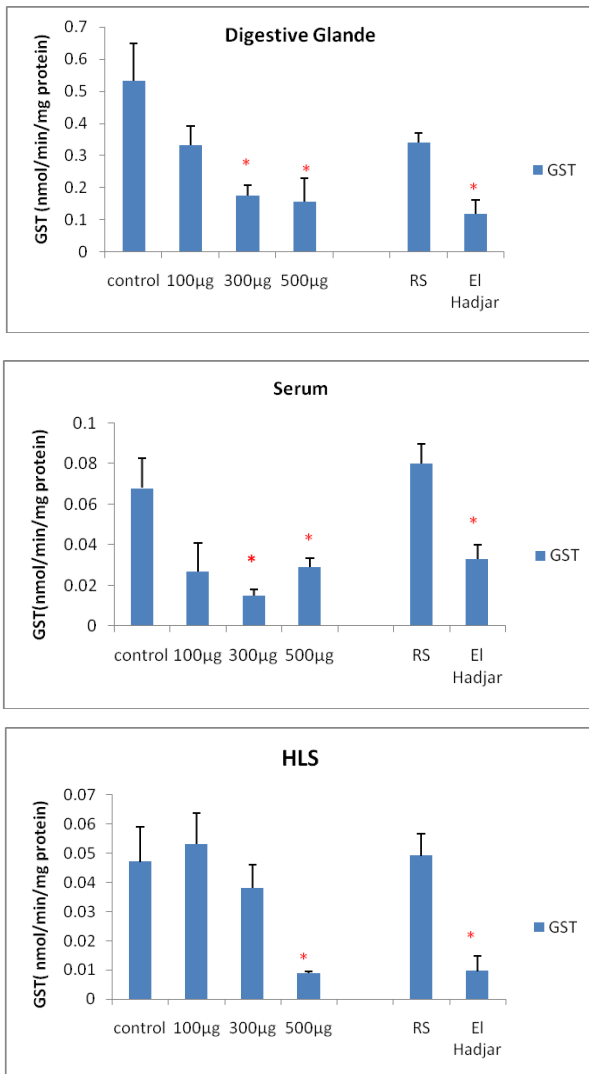


Fig. 1: Glutathione S-transferase activity in digestive gland, serum and HLS of the snails (*Helix aspersa*) exposed to metal dust in the laboratory condition and snails from field (RS: Reference site and El Hadjar). Data are reported as mean ± standard error. Asterisks indicate difference from control values (paired *t* test: \**P*<0,05, \*\**P*<0,01)

Fig. 2: Catalase activity in digestive gland, serum and HLS of the snails (*Helix aspersa*) exposed to metal dust in the laboratory condition and snails from field (RS: Reference site, and El Hadjar). Data are reported as mean ± standard error. Asterisks indicate difference from control values (paired *t* test: \**P*<0,05, \*\**P*<0,01).

**RESULTS**

Our results revealed significant differences in the oxidative stress and antioxidant defence system of the snails. GST activity (Fig. 1) was significantly less (*P* < 0.05) in HLS, serum and digestive gland of both caged snails in the contaminated site of El Hadjar and organisms exposed to the highest concentration of metal dust (300µg/g) and (500µg/g) compared respectively to samples from the reference site of Guelma and control snails under laboratory conditions.

Catalase activity reported in (Fig. 2) revealed a signifi-

cant increase in catalase activity (*P*<0.05) in HLS, serum and digestive gland in the snails from polluted site of El Hadjar compared to samples from the reference site. In contrast no significant differences were observed between control and exposed snails to metal under laboratory conditions, except in HLS of snails exposed to the highest metal concentration (500µg/g), which showed significant increase in CAT activity.

The level of glutathione in snails from field and laboratory conditions are reported in (Fig. 3). GSH content was significantly lower in digestive gland tissue and

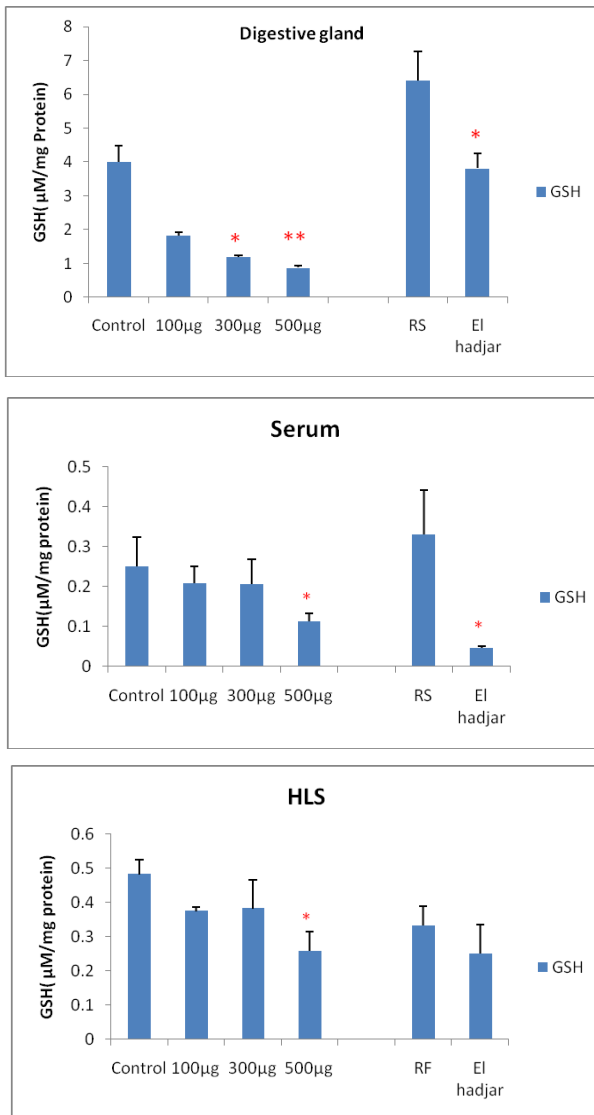


Fig. 3: Glutathione content in digestive gland, serum and HLS of the snails (*Helix aspersa*) exposed to metal dust in the laboratory condition and snails from field (RS: Reference site and El Hadjar). Data are reported as mean  $\pm$  standard error. Asterisks indicate difference from control values (paired *t* test: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ).

serum of snails from polluted site than the GSH level in animals from the reference site. However, concentration of GSH in HLS was not significantly different from that of snails from the reference site. On the other hand, our results showed that the concentration of GSH in snails exposed to the elevated concentrations of metal dust was significantly less than in the controls, the lowest level of GSH was found in digestive gland ( $p < 0.01$ ).

Oxidative damage in lipids (LPO) are presented in (Fig. 4). MDA levels in digestive gland, HLS and serum

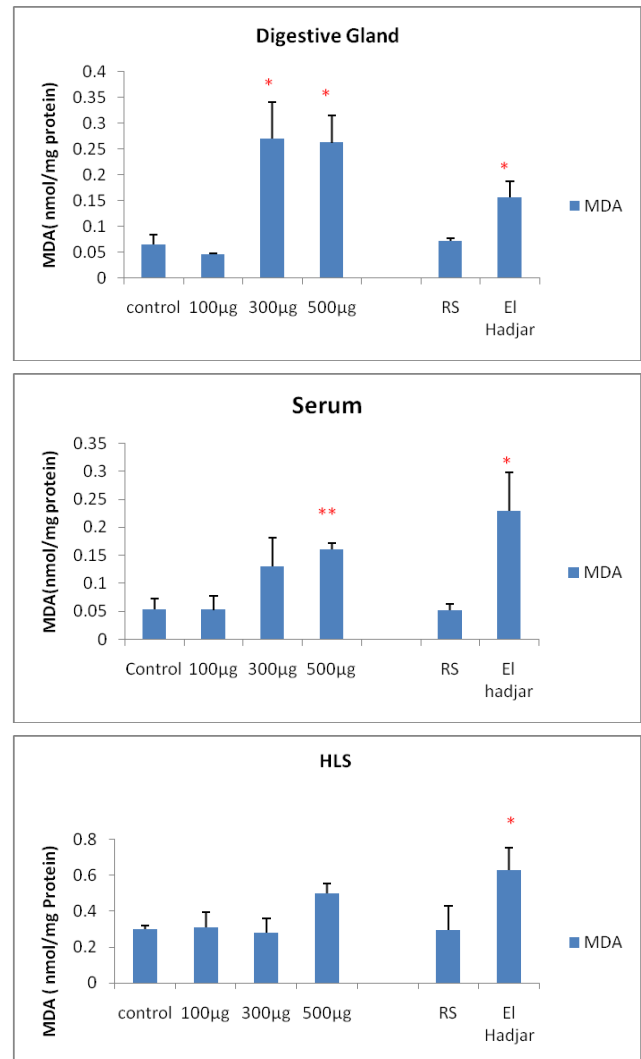


Fig. 4: Lipid peroxidation level content in digestive gland, serum and HLS of the snails (*Helix aspersa*) exposed to metal dust in the laboratory condition and snails from field (RS: Reference site and El Hadjar). Data are reported as mean  $\pm$  standard error. Asterisks indicate difference from control values (paired *t* test: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ).

were significantly higher in snails from the contaminated site of El Hadjar than in those from reference site. This parameter increased significantly in digestive gland and serum of the high-concentration treated groups compared with control group. However, in HLS of snails exposed to metal dusts which was not significant.

## DISCUSSION

The aim of this study was to examine effects of chronic exposure to metal dust released by the steel complex of El Hadjar. Our results can be used to explain the impact of

heavy metal toxicity on organisms. The oxidative effect of the metal dust on the snails *Helix aspersa* was investigated by the analyses of oxidative stress biomarkers (CAT, GSH, GST, MDA).

In our study the results demonstrate that GST activity decreased both in land snails treated with higher metal dust concentrations and in the specimens from the El Hadjar site. GST is known to play a major role in cell protection against the effects of toxic compounds and reactive metabolites produced during oxidative processes (Kamel et al. 2012). GST is considered as sensitive biomarker of exposure to a broad range of contaminants usually used in laboratory and field studies (Faria et al. 2009). The inhibition of GST during this exposure period may suggest failure of detoxification process and development of oxidative stress. This result agrees with data provided by (Borkovic-Mitic et al. 2013) who observed decreased GST in freshwater bivalve *Unio tumidus* exposed to metal pollution.

Borkovic-Mitic et al. (2013) reported that GST activity inhibition could occur either through direct action of the metal on the enzyme or indirectly, via the production of ROS that interact directly with the enzyme, deplete its substrate GSH, and/or through downregulation of GST genes. Thus after exposure to metals such as Cr, Cd, Hg, Zn and As the GST downregulation observed has been attributed to the inhibition of nuclear transcription factors (NF- $\kappa$ B, AP-1) binding to the gene promoter region, either directly or through indirect mechanisms that involve ROS generation (Roling & Baldwin 2006).

GSH, plays an important role in maintaining cellular redox status and protecting cells from oxidative injury (Dickinson & Forman 2002). It is the cofactor of many enzymes catalyzing the detoxification and excretion of several toxic compounds (Regoli & Principato 1995).

The decrease in GSH concentrations observed in HLS, serum and the digestive gland may be due to the high affinity of metals for this molecule. Gopalakrishnan et al. (2013) reported that the lesser concentration of GSH is consistent with greater utilization of GSH by GPx to catalyze the reduction of  $H_2O_2$  to  $H_2O$  and  $O_2$ . On the other hand the depletion of glutathione may be related to the formation of complexes GSH/metals or to the oxidation of GSH by metals (Regoli & Principato 1995). Both of these reactions could explain the observed decrease of glutathione content in snails exposed to metals under field microcosms and laboratory conditions. Quig (1998) and Hultberg et al. (2001) reported that GSH depletion is due to chronic metal exposure. These results agreed with the findings of Abdel-Halim et al. (2013) who showed that GSH depletion in the land snails *Helix aspersa* exposed to urban metal pollution.

Quantification of MDA as product of lipid peroxidation is a direct indicator of oxidative stress (Tao et al. 2013). In the present study, the level of LPO in digestive gland tissue, HLS and serum were significantly higher in the land snails from polluted site of EL Hadjar than other snails in the reference zone. On the other hand significant increased level of malondialdehyde was observed in land snails treated with higher metal dust concentrations, both in digestive gland and serum, greater concentration of MDA observed in this study indicate oxidative injury caused by metal bioaccumulation. It has been reported that, the high level of LPO indicating that the antioxidant enzymes system could not wholly eliminate  $O_2$  (Tao et al. 2013), also Giarratano et al. (2014) reported that the high lipid radical formation rate is related to an elevated content of Fe in tissues. Fe initiates formation of highly toxic radicals from  $H_2O_2$  via Fenton-type reactions and, moreover, exacerbates lipid peroxidation (Punta rulo & Cederbaum 1988), therefore the high increase of MDA content showed in our results may be due to the high concentration of Fe in the metal dust.

These results are in agreement with the findings of Radwan et al. (2010) who indicated that metals showed positive significant correlations with LPO, due to the presence of ionic metals in the digestive gland of snails which catalyze the Fenton reaction and increase the risk of cell damage.

The enzymatic antioxidant system SOD/CAT provides a first line of defence against ROS (Saïdi et al. 2013). However, CAT is better than SOD as a sensitive biomarker of oxidative stress (Wang et al. 2012). Catalase is an enzyme involved in antioxidant defence that eliminates hydrogen peroxide ( $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$ ).

Our results highlight a significant induction of catalase in digestive gland, serum and HLS of snails from field contaminated site. This rise in CAT activity can be an adaptive mechanism to prevent the accumulation of toxic reactive oxygen intermediates. It has been reported that heavy metal exposure induces antioxidant enzymes like CAT to neutralize the impact of the ROS generation (Wu & Yi 2015). Our results are in agreement with those of Radwan et al. (2010) and Wang et al. (2012) who found increase in CAT activity in different species of molluscs exposed to metal pollution.

On the other hand, the current study did not show any significant increase of CAT activity both in digestive gland and serum of snails exposed to metal contamination under laboratory conditions, but in contrast we observed a high level of CAT activity in HLS. Gopalakrishnan et al. (2013) reported that the antioxidants produced by haemocytes are likely involved with the immune response and might be com-

pensated for by other defence mechanisms.

## CONCLUSIONS

The obtained results from this study would provide baseline data for future impact assessments concerning industrial heavy metal pollution. The present study demonstrates that the chronic exposure of snails to mixture of metal dust cause changes in the non-enzymatic and enzymatic biomarkers, and also responsible for the development of oxidative stress, as shown by increased activity of catalase and lipid peroxidation, and the decrease of GST activity and GSH level. In addition, the same response was exhibited by snails from the contaminated site of El Hadjar and individuals exposed to the highest metal concentrations under laboratory conditions. This, suggests that the site of El Hadjar is heavily polluted by metals. *Helix aspersa* is a good tool for biomonitoring ecotoxicological effects. More studies must be done in El Hadjar region to know the bioaccumulation of metals to complete the information about the deleterious risk.

## REFERENCES

- Abdel-Halim, K.Y., Abo El-Saad, A.M., Talha, M.M., Hussein, A.A. and Bakry, N.M. 2013. Oxidative stress on land snail *Helix aspersa* as a sentinel organism for ecotoxicological effects of urban pollution with heavy metals. *Chemosphere*, 93: 1131-1138.
- Ansher, S.S., Dolan, P. and Bueding, E. 1986. Biochemical effects of dithiol-thiones. *Food. Chem.Toxicol.*, 24: 405-415.
- Bai, J. and Cederbaum, A.I. 2003. Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents by accelerating the degradation of p53. *J. Biol. Chem.*, 278(7): 4660-4667.
- Bai, J., Rodriguez, A.M., Melendez, J.A. and Cederbaum, A.I. 1999. Over expression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J. Biol. Chem.*, 274(37): 26217-26224.
- Barker, G.M. (ed.) 2001. *The Biology of Terrestrial Molluscs*. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Beeby, A. and Richmond, L. 1998. Variation in the mineral composition of eggs of snail, *Helix aspersa* between populations exposed to different levels of metal contamination. *Environmental Pollution*, 101: 25-31.
- BorkovicMitic, S., Pavlovic, S.Z., Perendija, B., Despotovic, S., Gavric, J., Gacic, Z. and Saicic, Z. 2013. Influence of some metal concentrations on the activity of antioxidant enzymes and concentrations of vitamin E and SH-groups in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* from the Serbian part of Sava River. *Ecological Indicators*, 32: 212-221.
- Boucenna, M., Berrebbah, H., Atailia, A., Grara, N. and Djebbar, M.R. 2015. Effects of metal dust on functional markers and histology of gland digestive and kidney of the land snails (*Helix aspersa*) in the North East of Algeria. *Global Veterinaria*, 14(2): 189-198.
- Cain, A.J. 1983. Ecology and ecogenetics of terrestrial molluscan populations. In: Russell-Hunter, W.D. (Ed.). *The Mollusca*. Academic Press, London, pp. 597-647.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A. and Vasseur, P. 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipid peroxidation in fresh water bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38: 121-131.
- Dallinger, R. 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Dallinger, R., Rainbow, P. (Eds.), *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 245-289.
- Dickinson, D.A. and Forman, H.J. 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 64: 1019-1026.
- Draper, H.H. and Hadley, M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 186: 241-431.
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M., Bayona, J.M. and Barata, C. 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 149: 281-288.
- Fernandez-Checa, J.C. 2003. Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304: 471-479.
- Filho, W.D., Tribess, T., Gaspari, C., Claudio, F.D., Torres, M.A. and Magalhaes, A.R.M. 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture*, 203: 149-158.
- Geret, F., Serafim, A., Barriera, L. and Bebianno, M.J. 2002. Effect of Cd on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussates*. *Biomarkers*, 7: 242-256.
- Geret, F., Serafim, A. and Bebianno, M.J. 2003. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapesdecussates*. *Ecotoxicology*, 12: 417-426.
- Giarratano, E., Mónica, N., Gil, G.M. 2014. Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* (Nuevo Gulf, Northern Patagonia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107: 111-119.
- Gomot, A. 1997. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33: 209-216.
- Gomot-de Vaufléury, A. 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 41-50.
- Gomot-de Vaufléury, A. and Pihan, F. 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere*, 40: 275-284.
- Gopalakrishnan, S., Huang, W., Wang, Q., Wu, M., Jie Liu and Wang, K.J. 2011. Effects of tributyltin and benzo[a]pyrene on the immune-associated activities of hemocytes and recovery responses in the gastropod abalone, *Haliotis diversicolor*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 154: 120-128.
- Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Yi Chen, F., Jun, B. and John, P.G. 2013. Modulation of immune-associated parameters and antioxidant responses in the crab (*Scylla serrata*) exposed to mercury. *Chemosphere*, 90: 917-928.
- Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Huang, W.B. and Wang, K.J. 2009. Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere*, 75: 389-397.
- Grara, N., Boucenna, M., Atailia, A., Berrebbah, H. and Djebbar, M.R. 2012. Stress oxydatif des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-Est algérien) chez l'escargot *Helix aspersa*. *Environ RisqueSante*. Vol. 11, n°83.
- Gravato, C., Teles, M., Oliveira, M. and Santos, M.A. 2006. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla Anguilla* L. the influence of pre-exposure to [beta] naphthoflavone. *Chemosphere*, 65: 1821-1830.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.

- Hultberg, B., Andersson, A. and Isaksson, A. 2001. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology*, 156: 93-100.
- Jaiswal, A.K. 1994. Antioxidant response element. *Biochem. Pharmacol.*, 48: 439-444.
- Laskowski, R. and Hopkin, S.P. 1996a. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail *Helix aspersa*: implications for predators. *Environmental Pollution*, 91: 289-297.
- Laskowski, R. and Hopkin, S.P. 1996b. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34: 59-69.
- Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.*, 37: 1921-1942.
- Livingstone, D.R. 2001. Contaminant stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 656-666.
- Mule, M.B. and Lomte, V.S. 1994. Effect of heavy metals (CuSO<sub>4</sub> and HgCl<sub>2</sub>) on the oxygen consumption of the freshwater snail *Thiaratuberculata*. *J. Environ. Biol.*, 15: 263-268.
- Kamel, N.M., Jebali, J., Banni, M., Ben Khedher, S., Chouba, L. and Boussetta, H. 2012. Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussates* after exposure to treated municipal effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 82: 40-46.
- Pellerin-Massicote, J. 1994. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J. Aquat. Ecosyst. Health.*, 3: 101-111.
- Puntarulo, S. and Cederbaum, A.I. 1988. Comparison of the ability of the ferric complexes to catalyze microsomal chemiluminescence, lipid peroxidation and hydroxyl radical generation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 264: 482-491.
- Quig, D. 1998. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern. Med. Rev.*, 3: 262-270.
- Radwan, M.A., El-Gendy, K.S. and Gad, A.F. 2010. Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*, 79: 40-46.
- Rees, T. 1993. Glutathione-S-transferase as a biological marker of aquatic contamination. M.Sc Thesis in Applied Toxicology, Portsmouth University, U.K.
- Regoli, F. and Principato, G. 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31: 143-164.
- Roling, J.A. and Baldwin, W.S. 2006. Alterations in hepatic gene expression by trivalent chromium in *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.*, 62: 122-127.
- Romeo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., La faurie, M. and Girard, J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat.Toxicol.*, 48: 185-94.
- Saïdi, S.A., Azaza, M.S., Windmoldersc, P., van Pelt, J. and El-Feki, A. 2013. Cytotoxicity evaluation and antioxidant enzyme expression related to heavy metals found in tuna by-products meal: An in vitro study in human and rat liver cell lines. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65: 1025-1033.
- Sminia, T. and Barendsen, L. 1980. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata* and *Bulinus truncatus*. *J. Morphol.*, 165: 31-39.
- Tadjine, A., Djebbar, H. and Courtois, A. 2008. Toxicité des poussières rejetées par le complexe sidérurgique d'Annaba sur quelques paramètres hématologiques du lapin Européen. *Environ. Risque.Sante.*, Volume 7, numéro 3.
- Tao, Y., Pan, L., Zhang, H. and Tian, S. 2013. Assessment of the toxicity of organochlorine pesticide endosulfan in clams *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93: 22-30.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M. and Peakall, D.B. 1976. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis, London. 321.
- Wang, Z., Yan, C., Vulpe, C.D., Yan, Y. and Chi, Q. 2012. Incorporation of in situ exposure and biomarkers response in clams *Ruditapes philippinarum* for assessment of metal pollution in coastal areas from the Maluan Bay of China. *Marine Pollution Bulletin*, 64: 90-98.
- Weckberker, G. and Cory, G. 1988. Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemial 1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40: 257-264.
- Winston, G.W. and Di Giulio, R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19: 137-161.
- Wu, G. and Yi, Y. 2015. Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 167: 131-139.

