



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث 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

Thèse En vue de l'obtention du Diplôme de DOCTORAT

Spécialité : BIOLOGIE ANIMALE

Intitulé :

**Evaluation de la toxicité des nanoparticules
d'oxyde de fer « Fe₂O₃ » sur un bioindicateur de
pollution terrestre : *Helix aspersa***

Présentée par : M^{me} BABOURI-BESNACI Sana

Membres de Jury :

M ^{me} BERREBBAH Houria (Professeur)	Présidente	Université de Annaba
M ^{me} DJEKOUN Samira (Professeur)	Directrice de thèse	Université de Annaba
M ^{me} KHATI Willya (M.C. A)	Examinatrice	Université d'El Tarf
M ^{me} BOURENANE Naziha (M.C. A)	Examinatrice	Université de Annaba
M ^{lle} GRARA Ndjoud (M.C. A)	Examinatrice	Université de Guelma
M ^r DJEKOUN Mohamed (M.C. A)	Examineur	Université de Guelma

Année universitaire : 2015/2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

SOMMAIRE

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale..... 1

PARTIE 1 : ETAT DE L'ART ET CHOIX METHODOLOGIQUES

1/ Les nanomatériaux.....	3
1.1/ Définitions origine et applications.....	3
1.1.1/ Définitions.....	3
1.1.2/ Origine et applications.....	4
1.2/ Cycle de vie des nanomatériaux et rejets dans l'environnement.....	5
1.3/ Mode et voies d'exposition.....	8
1.4/ Propriétés des NPs pouvant influencer leur toxicité.....	9
1.4.1/ Taille, forme et composition chimique.....	9
1.4.2/ Hydrophilie et charge.....	11
1.4.3/ Stabilité, agrégation et agglomération.....	12
2/ Nanotoxicologie et éconanotoxicologie.....	13
2.1/ Devenir des nanomatériaux dans les sols.....	14
2.1.1/ Transformations des nanomatériaux dans les sols.....	14
2.1.2/ Transport des nanomatériaux dans les sols.....	17
2.2/ Biodisponibilité et toxicité des nanomatériaux dans les sols.....	18
2.2.1/ Biodisponibilité des nanomatériaux dans les sols.....	18
2.2.2/ Toxicité des nanomatériaux dans les sols.....	19
2.3/ Évaluation du risque écotoxicologique.....	20
2.3.1/Evaluation du risque toxicologique des nanoparticules.....	21
2.3.1.1/ Modèles : sélection et utilisation.....	21

2.3.1.2/ Les déterminants de la toxicité des NPs.....	23
3/ Les nanoparticules de fer.....	24
3.1/ Nano-fer et leurs utilisations.....	24
3.2/ Toxicité.....	25
4/ Intérêt du modèle biologique et but du travail	26
4.1/ choix et intérêt.....	26
4.2/ Définition des objectifs.....	28

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : EMBRYOTOXICITE DES NPs Fe₂O₃

1/ Objectif du travail	29
2/ Matériel et méthodes	29
2.1/ Matériel	29
2.1.1/ Matériel chimique	29
2.1.2/ Matériel biologique	30
2.2/ Méthodes	34
2.2.1/ Elevage et application du traitement	34
2.2.2/ Pendant la phase embryonnaire	34
2.2.3/ Pendant la phase juvénile	36
2.2.4/ Analyse statistique.....	37
3/ Résultats.....	37
3.1/ Pendant la phase embryonnaire	37
3.1.1/ Suivi des œufs	38
3.1.2/ Comptage d'éclosion	41
3.1.3/ Mortalité.....	42
3.2/ Pendant la phase juvénile	42
3.2.1/ Poids frais	42
3.2.2/ Taille coquillère	42
4/ Discussion	44

5/ Conclusion	50
---------------------	----

CHAPITRE 2 : EFFETS DES NPs DU Fe₂O₃ SUR LES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES

1/ Objectif du travail	51
2/ Matériel et méthodes	51
2.1/ Elevage et suivi de l'essai	51
2.2/ Dissection des escargots et prélèvement des organes.....	52
2.3/ Effets comportementaux	53
2.4/ Taux de mortalité	54
2.5/ Pourcentage de consommation	54
2.6/ Evolution du poids des escargots et du diamètre coquillère	56
2.7/ Poids frais de l'hépatopancréas, de la masse moue et de la coquille	57
2.8/ Etude statistique	57
3/ Résultats	55
3.1/ Mortalité	55
3.2/ Pourcentage de consommation	55
3.3/ Effets sur le comportement	56
3.4/ Effets sur l'évolution du poids frais	56
3.5/ Effets sur le diamètre coquillère	57
3.6/ Effets sur le poids frais de la coquille	58
3.7/ Effets sur le poids frais de la masse moue	59
3.8/ Effets sur le poids frais de l'hépatopancréas	60
4/ Discussion	60
5/ Conclusion	64

CHAPITRE 3 : EFFETS DES NPs DU Fe₂O₃ SUR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET ENZYMATIQUES

1/ Objectif du travail.....	65
2/ Matériel et méthodes	66
2.1/ Sacrifice et dissection	66
2.2/ Extraction et dosage des métabolites.....	67

2.2.1/ Extraction des métabolites	67
2.2.2/ Dosages des glucides	67
2.2.3/ Dosages des lipides	67
2.2.4/ Dosages des protéines	68
2.3/ Dosages des paramètres du stress oxydant.....	70
2.3.1/ Préparation de l'homogénat	70
2.3.2/ Dosage du glutathion (GSH).....	70
2.3.3/ Dosage de l'activité Glutathion S-Transférase (GST).....	71
2.3.4/ Dosage de l'activité glutathion peroxydase (GPx).....	73
2.3.5/ Dosage de l'activité catalase (CAT).....	74
2.3.6/ Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	75
2.4/ Analyse statistique.....	76
3/ Résultats.....	77
3.1/ Les métabolites.....	77
3.1.1/ Concentrations des protéines.....	77
3.1.2/ Concentrations des glucides.....	77
3.1.3/ Concentrations des lipides.....	78
3.2/ Les paramètres du stress oxydant.....	79
3.2.1/Concentrations de glutathion hépatique(GSH).....	79
3.2.2/ Activités enzymatiques du glutathion S-transférase (GST).....	80
3.2.3/ Activités enzymatiques du glutathion peroxydase (GPx).....	81
3.2.4/ Activités enzymatiques de la catalase (CAT).....	81
3.2.5/ Concentrations du malondialdéhyde (MDA)	82
4/ Discussion.....	83
5/ Conclusion.....	94
 CHAPITRE 4 : ETUDE HISTOLOGIQUE DE L'EFFET DES NPs DE Fe₂O₃	
1/ Objectif du travail	95
2/ Matériel et méthodes	95
2.1/ Préparation des échantillons.....	95

2.2/ Préparation des coupes histologiques	96
2.2.1/ Fixation.....	96
2.2.2/ Inclusion.....	96
2.2.3/ Coupe.....	96
2.2.4/ Coloration.....	96
2.2.5/ Montage.....	97
2.2.6/ Observation.....	97
3/ Résultats.....	98
3.1/ Observations des coupes histologiques de l'hépatopancréas	98
3.2/ Observations des coupes histologiques du rein	101
3.3/ Observations des appareils génitaux	104
4/ Discussion.....	105
5/ Conclusion.....	108
Conclusion générale et perspectives.....	110

Références bibliographiques

Annexes : Courbes d'étalonnages

Résumés

REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à Allah qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement M^{me} DJEKOUN-BESOLTANE Samira, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Merci de m'avoir guidé pendant ces quatre années. Merci pour votre disponibilité, Ses précieux conseils, remarques et critiques pertinentes et constructives et pour tout le temps que vous m'avez consacré pour corriger ce manuscrit.

Mon respect, ma reconnaissance ainsi que mes vifs remerciements vont à M^{me} BERRABAH Houria, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba, d'avoir accepté de juger ce travail et m'honoré par La présidence de ce jury.

A M^{me} KHATI Willya, Maitre de conférences, Université Chadli Bendjedid d'El Tarf, pour avoir pris sur son temps et accepter d'examiner ce travail et participer à ce jury.

A M^{me} BOURANANE Naziha, Maitre de conférences, Université Badji Mokhtar Annaba, pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de consacrer son temps pour le juger. Je vous prie d'accepter mon profond respect.

A M^{me} GRARA Ndjoud, Maitre de conférences, Université de Guelma, pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail. Je la prie de recevoir toute ma gratitude pour avoir accepté de mettre son expérience à contribution afin de juger ce travail et je l'adresse mes sentiments les plus respectueux.

A M^r DJEKOUN Mohamed, Maitre de conférences, Université de Guelma, pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je suis honoré de sa présence. Qu'il soit assuré de ma sincère gratitude.

Je remercie vivement la technicienne de notre laboratoire M^{me} BOUKHALFA. S, pour sa bonne humeur, son aide précieuse, sa disponibilité, sa gentillesse. Je lui souhaite bonne chance pour sa carrière professionnelle. Je remercie également tous les membres du laboratoire.

Au D^r BOURBIA Yacine, médecin à l'hôpital El Hadjar CHU Annaba, pour son aide lors de la préparation et la réalisation des coupes histologiques.

Mes remerciements vont à M^r DJEKOUN A.Malik, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba, qui nous a fourni la poudre des nanoparticules d'oxyde de fer. Merci pour votre aide et votre soutien.

Pour finir ; mes pensées vont à ma famille

Ma mère : que tu sois ma mère cela me suffit. Tes prières de réussite pour moi m'inspirent,
ton affection me console. Merci pour tous, ma très chère maman.

Mon mari : merci pour tout mon chéri, ton amour, ta tolérance, ta confiance en mes capacités,
tes encouragements me comblent.

Mes fillettes : Hala Maram, Raoua et Djanna.

Ma très chère tante Fatima : pour le soutien moral et l'encouragement, ainsi que l'aide qu'elle
m'a donné pendant les différentes étapes de cette thèse.

Mes frères : Mohamed, Zoubir, Saber et Taki Eddine.

A toute ma famille Besnaci et aussi Babouri

Merci mes amis pour votre aide, votre soutien et votre amitié.

Durant l'ensemble de mon cursus, je pense que tous les gens qui m'ont entouré méritent mes
remerciements, ne serait-ce que de m'avoir aidé ou tout de moins supporté...

Dédicaces

Il y a des moments dans notre vie, où on aimerait ramener une personne en vie, une personne qui nous est très chère, pour passer juste une journée avec lui, faire juste un câlin, l'embrasser ou écouter juste sa voix ou son rire Très cher papa ; j'aurais bien aimé que tu sois à mes côtés en ce moment privilégié dans ma carrière car ton absence m'est tellement pénible.

A ton âme qui repose au paradis papa ; je dédie mon travail.

Liste des figures

N°	Figure	Page
01	Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux.	03
02	Cycle de vie des NMs manufacturés dans l'environnement, ENM : Engineered Nanomaterial.	06
03	Flux global des NMs en 2010 (tonne/an) depuis leur production à leur utilisation et jusqu'à leur éventuelle élimination ou rejet dans l'environnement.	07
04	Voies d'exposition de l'homme aux NPs (en rouge) et le devenir dans le corps humain (bleu).	08
05	Voies d'entrée hypothétiques des NPs à travers la peau.	09
06	Modes d'internalisation cellulaire des NPs en fonction de leur taille.	10
07	Charges de surface et potentiel zeta.	12
08	Agrégation et agglomération.	12
09	Évolution du nombre de journaux sur les nanotechnologies et leurs applications (a) et du nombre de publications relatives à la toxicité des NMs sur la santé et l'environnement (b).	13
10	Données disponibles sur les effets toxiques et écotoxiques de plusieurs types de NPs en Avril 2009.	14
11	Schéma de synthèse représentant les transformations chimiques.	15
12	Schématisation des processus clés déterminant le transport des colloïdes et NMs en milieu poreux.	18
13	Synthèse d'oxyde de fer nanométrique.	30
14	Classification de <i>Helix aspersa</i> .	30
15	Anatomie d'un escargot.	31
16	Reproduction chez l'escargot <i>Helix aspersa</i> .	33
17	Mode d'élevage.	34
18	Mode d'incubation des œufs de la ponte avant éclosion.	35
19	Transfert des juvéniles vers des boîtes en plastique.	36

20	Suivi des paramètres morphométriques.	36
21	Aspects des œufs au 5 ^{ème} jour.	38
22	Aspects des œufs au 8 ^{ème} jour.	38
23	Aspects des œufs au 10 ^{ème} jour.	39
24	Aspects des œufs au 12 ^{ème} jour.	40
25	Aspects des œufs au 14 ^{ème} jour.	41
26	Aspect d'un juvénile malformé, albinos traité avec la plus forte concentration (2mg/ml).	44
27	Boîtes d'élevage des escargots sous des conditions contrôlées.	52
28	Étapes de la dissection.	53
29	Séparation des différents constituants de l'escargot.	53
30	Effets des NPs du Fe ₂ O ₃ sur le poids frais moyen de la coquille des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement.	59
31	Effets des NPs du Fe ₂ O ₃ sur le poids frais moyen de la masse mous des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement.	59
32	Effets des NPs du Fe ₂ O ₃ sur le poids frais moyen de l'hépatopancréas des adultes de l'escargot <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement.	60
33	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants.	66
34	Protocole d'extraction et de dosage des métabolites.	69
35	Concentration des protéines hépatopancréatique de <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement avec les NPs d'oxyde de fer.	77
36	Concentration des glucides dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement avec les NPs d'oxyde de fer.	78
37	Concentration des lipides hépatopancréatique de <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement avec les NPs d'oxyde de fer.	79
38	Concentration du glutathion dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement avec l'oxyde de fer nanométrique.	80
39	Activité enzymatique du glutathion s-transférase dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement avec l'oxyde de fer nanométrique.	80

40	Activité enzymatique du glutathion peroxydase dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement avec l'oxyde de fer nanométrique.	81
41	Activité enzymatique Catalase dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement avec l'oxyde de fer nanométrique.	82
42	Concentration du MDA dans l'hépatopancréas de <i>Helix aspersa</i> après six semaines de traitement avec l'oxyde de fer nanométrique.	83
43	voies peroxydant des NPs « toxicité induite »: divers NPs présentent un stress oxydatif (toxicité dépendante).	93
44	Appareillage utilisé dans la réalisation des coupes histologiques.	97
45	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots témoins.	99
46	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités avec la dose 1 mg/g des NPs Fe ₂ O ₃ .	99
47	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités avec la dose 2 mg/g des NPs de Fe ₂ O ₃ .	100
48	Coupes histologiques de l'hépatopancréas des escargots traités avec la dose 3 mg/g des NPs de Fe ₂ O ₃ .	100
49	Coupes histologiques du rein des escargots témoins.	102
50	Coupes histologiques du rein des escargots traités par la dose 1 mg/g des NPs de Fe ₂ O ₃ .	102
51	Coupes histologiques du rein des escargots traités par la dose 2 mg/g des NPs de Fe ₂ O ₃ .	103
52	Coupes histologiques du rein des escargots traités par la dose 3 mg/g des NPs de Fe ₂ O ₃ .	103
53	Appareils génitaux de quatre escargots à partir de chaque lot.	104
54	Courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µl).	Annexe 01
55	Courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de solution mère des glucides (µl).	Annexe 02
56	Courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de solution mère des lipides (µl).	Annexe 03

Liste des tableaux

N°	Tableau	Page
01	Exemples d'applications de NMs manufacturés.	05
02	Synthèse des différents types de NPs de fer et leur potentielle utilisation.	25
03	Distribution des groupes selon les doses d'oxyde de fer nanométrique.	35
04	Nombre d'œufs éclos dans le 12 ^{ème} et le 14 ^{ème} jour après exposition aux différentes concentrations des NPs Fe ₂ O ₃ .	41
05	Pourcentage de mortalité pendant les 28 jours qui suivent l'éclosion après exposition aux différentes concentrations des NPs Fe ₂ O ₃ .	42
06	Résultats du suivi du poids des juvéniles après exposition aux différentes concentrations des NPs Fe ₂ O ₃ .	43
07	Résultats du suivi de la taille coquillère des juvéniles après exposition aux différentes concentrations des NPs Fe ₂ O ₃ .	43
08	Distribution des groupes selon les doses d'oxyde de fer nanométrique.	52
09	Taux de mortalité final pour chaque lot.	55
10	Pourcentages de consommation pour chaque lot.	56
11	Evolution du poids frais des escargots des 4 lots durant les six semaines de traitement.	57
12	Evolution du diamètre coquillère des escargots des 4 lots durant les six semaines de traitement.	58
13	Protocole utilisé pour le dosage du GSH.	71
14	Protocole utilisé pour le dosage du GST.	72
15	Réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines hépatopancréatiques.	annexe
16	Réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des glucides hépatopancréatiques.	//
17	Réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des lipides hépatopancréatiques.	//

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de NORmalisation

AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail.

Ag: argent

Al₂O₃: Oxyde d'aluminium

ANOVA: ANalysis Of VAriance

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ASTM : American Society of Mechanical Engineers

ATSM: American Traffic Safety Materials

BBC : Bleu Brillant de Commassie

[C] : Concentration

Cat : Catalase

Cd: Cadmium

CDNB: 1-Chloro2, 4-di nitrobenzene

CdSe : Cadmium Sélénium

CeO₂-NPs : Nanoparticules d'oxyde de cérium

CHUV : Centre Hospitalier Universitaire Vaudois

CL : Concentration Létale

CNT : Nanotube de carbone

CPA : Cellule Présentatrice d' Antigène

CSEM : Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique

CSST : Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail

Cu : Cuivre

D : Dose

DO : Densité Optique

DRX : Diffraction des Rayons X

DTNB : Acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque

EC : Effective Concentration

ED : Eau Distillée

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

ENM : Engineered Nanomaterial

EPFL : École Polytechnique Fédérale de Lausanne

ETM : Elément Trace Métallique

Fe₂O₃ NPs : Nanoparticules d'oxyde de fer

FETAX : Frog Embryos Test Teratogenesis Assay Xenopus

GPx: Glutathion peroxydase

GS-DNP: 1-S-Glutathionyl 2-4 Dinitrobenzene

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion-S-transférase

IL-8 : Interleukine 8

IR : Infra Rouge

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

LDH : Lactate déshydrogénase

LMS : Laboratoire de magnétisme et spectroscopie

LOEC : La plus faible concentration ayant un effet

LPO : Lipide peroxydation

MDA : Malondialdéhyde

MMP : Potentiel de Membrane Mitochondriale

NMs : Nanomatériaux

NOEC : Concentration sans effet observé

NOM : Natural Organic Matter

NPs : Nanoparticules

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

ONOO⁻ : Peroxynitrite

ONOOH : Acide peroxynitreux

P : Seuil de signification

Pb : Plomb

PEC : Concentrations prévisibles dans l'environnement

pH : Potentiel Hydrogène

PNEC : Concentration prévisible sans effet sur l'environnement

PVD : Dépôts physiques en phase vapeur

REACH: Registration Evaluation Authorization and restriction of CHemicals

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROS: Reactive Oxygen Species

-S° : Radicaux éthyles

SD : Déviation standard

-SH : Radicaux éthyles

SiO₂ NPs : Nanoparticules d'oxyde de silice

SnO₂-NPs : Nanoparticules d'oxyde d'étain

SOD : Syperoxyde dusmutase

SPION : Super Paramagnetic Iron Oxides Nanoparticl

SSA : Acide sulfosalicylique

T : Témoin

TBA : Acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloracétique

TiO₂ NPs : Nanoparticules d'oxyde de titane

USPION Ultrasmall Super Paramagnetic Iron Oxides Nanoparticl

UV : Ultraviolet

Zn : Zinc

ZnO NPs: Nanoparticules d'oxyde de zinc

α-Fe₂O₃ : Hématite

γ-Fe₂O₃ : Maghémite

Introduction

générale

80001970

Il y a plein de place en bas « There is plenty of room at the bottom », cette phrase est de Richard Feynman (prix Nobel de physique 1965), lancé au cours d'une conférence de presse en 1959, il a introduit à la communauté scientifique des nouvelles pistes de recherche. Ces nouvelles directions ouvrent la possibilité de stocker l'information ou de créer de nouveaux objets dans l'univers de l'infiniment petit. Mais les instruments nécessaires pour cela n'existaient pas encore (Larroutourou, 2005; Obadia, 2008). Il nous propose des ordinateurs plus performants, des moyens de communication plus rapides, des traitements médicaux plus efficaces, un environnement plus propre, un cadre de vie plus agréable, c'est le nano monde (Larroutourou, 2005).

Actuellement, la nanotechnologie est considérée comme la principale technologie du XXI^e siècle impliquant l'utilisation de nouveaux dispositifs pour étudier la matière à l'échelle moléculaire ou supramoléculaire : les échelles caractéristiques de la gamme des nanotechnologies sont de 1 à 100 nanomètres (nm). A ces échelles, la matière acquiert des propriétés inattendues. Ils sont considérés comme de nouveaux composés chimiques dont les caractéristiques et les toxicités sont différentes (Tsakalakos, 2003).

Elle est capable d'offrir des solutions aux problèmes contemporains à travers des matériaux plus petits, plus légers, plus rapides et plus efficaces. Les nanoparticules métalliques occupent une importance croissante dans les processus industriels et dans la recherche biomédicale. Cependant, les réponses cellulaires à ces nanoparticules (NPs) peuvent conduire à des phénomènes toxiques qui sont encore peu claires et doivent être étudiés en détail et cas par cas (Triboulet et *al.*, 2014).

Les données toxicologiques actuelles sur les NPs sont encore insuffisantes. Cependant, plusieurs études montrent que les NPs peuvent pénétrer dans le corps à travers plusieurs voies, pulmonaire, cutanée ou intestinale (Tinkle et *al.*, 2003; Hagens et *al.*, 2007; Mavon et *al.*, 2007; Buzea et *al.*, 2007); elles ont des effets toxiques systémiques (Kreuter et *al.*, 2001; Berry et *al.*, 2003; 2004; Chen et *al.*, 2006; Wang et *al.*, 2006) ; leurs utilisations exigent comme toute nouvelle technologie des études d'impact sur la santé des humains et des animaux. À l'heure actuelle, il n'y a pas de réglementation sur leur utilisation, et leur impact à long terme sur l'environnement et les humains est encore peu clair. Cependant, la communauté scientifique s'est concentrée très tôt sur ce sujet et elle a commencé à chercher des réponses (Simon-Deckers, 2008).

En raison de leur introduction potentielle dans le sol, ainsi que le milieu aquatique, l'inclusion d'un ensemble de tests d'écotoxicité dans la caractérisation des risques des NPs est nécessaire. Récemment, plusieurs chercheurs ont mis l'accent sur l'étude de leurs impacts sur les organismes terrestre (Scott-Fordsmand et *al.*, 2008; Hu et *al.*, 2010; Unrine et *al.*, 2010 a; b; Lapiéd et *al.*, 2010) et la littérature sur ce sujet reste limitée.

Parmi les oxydes métalliques, notre étude a porté sur l'oxyde de fer. La petite taille des particules lui confère des propriétés avantageuses, en particulier magnétique (Wang et *al.*, 2011) les rendant utiles dans de nombreuses applications. Ainsi, dans l'ordre du nanomètre, certaines structures d'oxyde de fer tel que la magnétite (Fe_2O_4) ou de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) présentent des propriétés superparamagnétiques. Il a exposé un grand potentiel pour leurs applications comme matériaux catalytiques, absorbantes dans le traitement des eaux usées, des pigments, des flocculants, des revêtements, capteurs de gaz, échangeurs d'ions, des dispositifs d'enregistrement magnétiques, dispositifs de stockage de données magnétiques, des toners et des encres pour la xérogaphie, l'imagerie par résonance magnétique, bioséparation et médecine (Jolivet et *al.*, 2002; 2003; Riviere et *al.*, 2005; Mohapatra et Anand, 2010) . Bien que le fer soit un élément essentiel pour la vie, une augmentation de la concentration en milieu cellulaire peut générer la formation des ROS (Alberts et *al.*, 1983).

Cependant, dans la plupart de leurs applications, les NPs d'oxyde de fer sont en contact avec les cellules ou le milieu intracellulaire. Donc il est probable que les interactions NPs d'oxyde de fer/cellules ne sont pas négligeables. C'est le cas des NPs de magnétite dont la toxicité envers des cellules humaines a été démontré (Berry et *al.*, 2003, Berry et *al.*, 2004 a, b). Les NPs d'oxyde de fer utilisées à des fins biomédicales (Gupta et *al.*, 2005 a, b) sont généralement fonctionnalisées à la surface cellulaire par greffage avec des composés organiques (Goetze et *al.*, 2002, Lacava et *al.*, 2002, Chunfu et *al.*, 2004, Xu et *al.*, 2005, Kim et *al.*, 2005), cette couche organique limite le contact direct entre les composants cellulaires et les NPs de fer qui peuvent induire des inflammations tissulaires par contact direct. Comme indiqué, la nature du revêtement joue un rôle important dans les effets biologiques des NPs.

Il est cependant possible que la plupart des NPs ne représentent pas un réel danger pour l'homme et l'environnement, mais en absence de données toxicologiques précises et spécifiques, le principe de précaution doit être appliqué (Zeyons, 2008).

PARTIE I :

**Etat de l'art et
choix**

méthodologiques

méthodologiques

1/ LES NANOMATERIAUX

1.1/ Définitions, origine et applications

1.1.1/ Définitions

Au sens strict une nanoparticule est un assemblage d'atome dont au moins une des dimensions est dans le domaine nanométrique ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). La limite admise est inférieure à 100 nm car c'est en général l'ordre de grandeur des longueurs caractéristiques des processus physico-chimiques (Fig. 1). En dessous de ces valeurs, les propriétés changent à cause des effets de confinement ou parce que la surface joue un rôle prépondérant (Pitkethly, 2003).

Selon la norme ISO/TS 27687:2008, les nano-objets sont définis comme des matériaux comportant au moins 1 dimension externe nanométrique. De cette définition découlent celles des NPs (3 dimensions externes $< 100 \text{ nm}$), nanofibres (2 dimensions externes $< 100 \text{ nm}$) et nanofeuillets (1 dimension externe $< 100 \text{ nm}$). Parmi les nanofibres, on distingue par ailleurs les nanofils (électriquement (semi)-conducteurs), nanotubes (creux) et nanotiges (pleines). De manière plus générale, les nano-objets rentrent dans la catégorie des matériaux nano-structurés, définis comme possédant une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique (norme ISO/TS 80004-4:2011) (Biola-Clier, 2016).

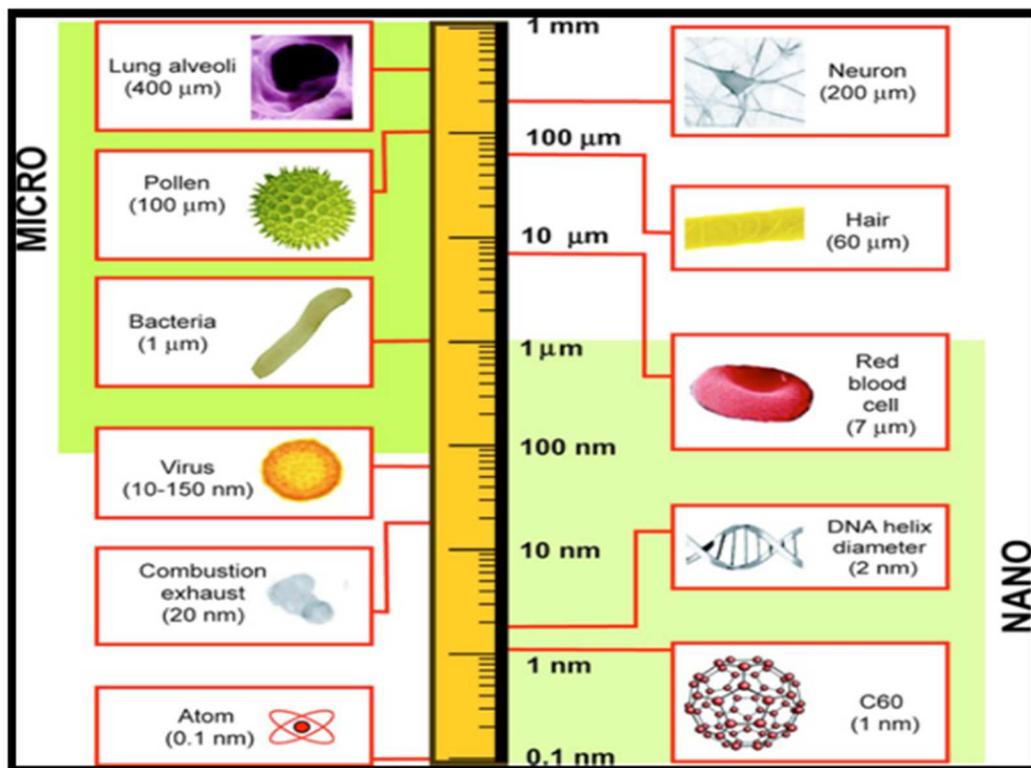


Figure 01 : Positionnement de la taille des NPs sur l'échelle du vivant et des matériaux (Commissariat à l'Énergie Atomique, 2005).

Alors que les différentes définitions des NMs s'accordent plutôt bien sur le critère de taille, on note de subtiles différences dans les éventuels autres critères (Lövestam et *al.*, 2010; Rauscher et Roebben, 2014; Roebben et *al.*, 2014). En Europe, dans le cadre du règlement relatif aux produits cosmétiques (N°1223/2009), indique que les NMs sont insolubles ou biopersistant et manufacturés intentionnellement. Par ailleurs la définition du seuil à partir duquel un mélange de particules de tailles diverses est considéré comme nanoparticulaire reste très floue à l'échelle internationale, ce qui pose problème pour la régulation de ces produits. Selon la recommandation de la Commission Européenne en 2011, un nanomatériau est un « matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm » (Biola-Clier, 2016).

1.1.2/ Origine et applications

Notre environnement contient de nombreux NMs de diverses origines. On distingue les NMs naturels (issus d'incendies de forêts, d'éruptions volcaniques, virus, etc.), des NMs anthropogéniques (issus de l'action de l'Homme) (Oberdörster et *al.*, 2005). Ces derniers peuvent être des sous-produits d'activités humaines diverses (incinérateurs, moteurs à combustion, friture, etc.) ou avoir été créés intentionnellement pour leurs propriétés intrinsèques. On estime que les concentrations de nano-objets dans l'air ambiant vont de 10 000 particules/mL (en pleine nature ou dans un environnement de bureaux) à 700 000 particules/mL sur le tarmac des aéroports, en passant par quelques dizaines de milliers de particules/mL à proximité des routes, 600 000 particules/mL dans les boulangeries et 400 000 particules/mL au niveau des postes de soudage (Tardif et *al.*, 2008; Meier et *al.*, 2015).

Si l'Homme cherche à créer des NMs, c'est parce qu'ils présentent des caractéristiques très intéressantes sur le plan industriel et ouvrent les portes à de vastes domaines d'applications (Tab. 1) (ANSES, 2014). En effet l'échelle nanométrique confère à ces matériaux des propriétés parfois absentes à des échelles plus grandes. C'est le cas par exemple pour les nano-catalyseurs dont le pouvoir de catalyse provient en grande partie de l'immense surface d'échange procurée par l'échelle nanométrique, car plus le diamètre d'une nanoparticule est petit, plus la proportion de molécules en surface est élevée (Oberdörster et *al.*, 2005).

Tableau 1 : Exemples d'applications de NMs manufacturés (ANSES, 2014).

Nanomatériaux	Applications	Exemples de produits finis
Nano-oxydes	Matériaux composites structuraux – Composants anti-UV – Polissage mécano-chimique des substrats dans la microélectronique – Applications photocatalytiques, BTP	Additifs alimentaires, peintures, cosmétiques, encres, pneumatiques
Matériaux nanométralliques	Secteurs antimicrobiens et/ou de la catalyse – Couches conductrices des écrans, les capteurs ou encore les matériaux énergétiques	Pansements, films alimentaires, revêtements (réfrigérateur), plans de travail, vitres ou murs autonettoyant, vêtements, matériaux en contact de denrées alimentaires, emballages alimentaires ingérables
Noirs de carbone	Transports, BTP, imprimerie	Pneumatiques, encres, peintures
Matériaux nanoporeux	Aérogels pour isolation thermique dans les domaines de l'électronique, de l'optique et de la catalyse – Domaine biomédical pour des applications de type vectorisation ou encore implants	Membranes de filtration de l'eau, peintures, colles, fertilisants
Nanotubes de carbone	Nanocomposites conducteurs électriques – Matériaux structuraux – nanoélectronique, biomédical	Raquette de tennis, écran souple, pare-chocs, phares, batteries, pneumatiques
Nanomatériaux massifs	Transports, BTP, équipements sportifs	Revêtements durs – Composants structuraux pour l'industrie aéronautique, l'automobile, les conduites pour les industries pétrolières et gazières, le domaine sportif ou encore le secteur anticorrosion
Dendrimères	Domaines médical et cosmétique	Administration de médicaments, détection rapide
Quantum dots	Applications optoélectroniques (écrans)	Cellules photovoltaïques, encres et peintures pour applications de type marquage anti-contrefaçon
Fullerènes	Sport (nanocomposites) et cosmétiques	Mascaras, crèmes de beauté, balles de golf
Nanofils	Electronique, optoélectronique, photovoltaïque	Applications dans les couches conductrices des écrans ou encore les cellules solaires ainsi que les dispositifs électroniques

Cependant cette réactivité accrue ne se limite pas au monde inerte mais s'étend également au monde vivant et il peut aussi bien en découler une action bénéfique que des effets toxiques. D'où la nécessité de caractériser l'effet des NMs sur les systèmes biologiques et en particulier sur la santé humaine (Biola-Clier, 2016).

1.2/ Cycle de vie des nanomatériaux et rejet dans l'environnement

L'utilisation croissante de NMs soulève des interrogations quant à leur rejet dans l'environnement au cours des différentes étapes de leur cycle de vie, depuis la production jusqu'au retraitement (Fig. 2).

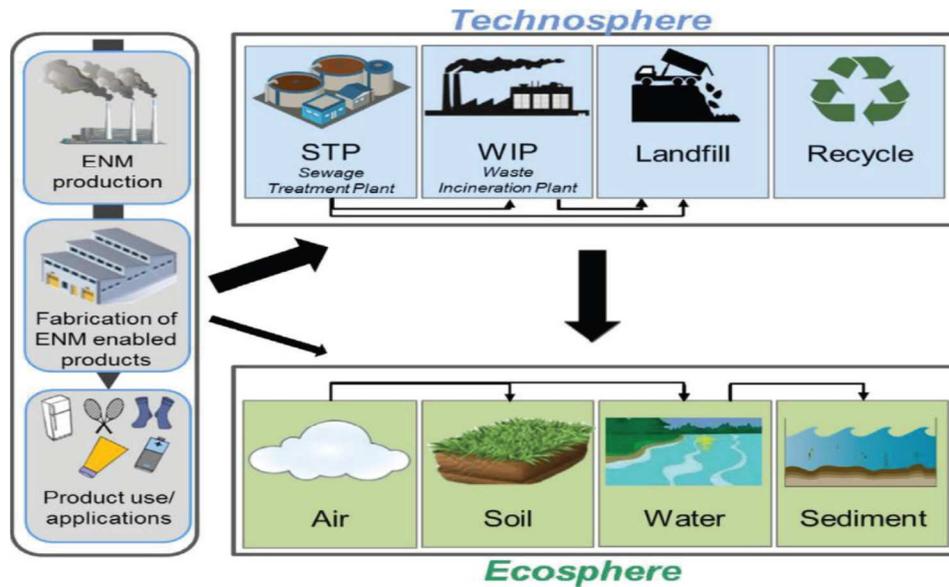


Figure 2 : Cycle de vie des NMs manufacturés dans l'environnement, ENM : Engineered Nanomaterial (Sun et al., 2014).

Som et al., (2010) ont souligné l'importance de considérer le cycle de vie des NMs pour chaque produit afin d'obtenir une évaluation fiable des risques environnementaux associés. En effet, la forme sous laquelle seront rejetés les NMs dépendra de l'étape du cycle de vie du produit concerné (Nowack et al., 2012) : (i) purs lors de la production, (ii) associés à d'autres composés lors de leur utilisation, (iii) associés à des composés environnementaux lors de leur entrée dans les écosystèmes.

Dans ce contexte, de nombreuses études ont été conduites pour étudier le vieillissement et les transformations des nano-produits au cours de leur cycle de vie (Mitrano et al., 2015). Plusieurs travaux ont mis en évidence que des NMs pouvaient être rejetés de manière involontaire dans l'environnement suite à leur utilisation dans des produits couramment utilisés comme les peintures, les textiles ou les cosmétiques (Labille et al., 2010; Nowack et al., 2012). Le relargage de TiO₂-NPs à partir des peintures appliquées sur des façades extérieures a été montré par Kaegi et al., (2008) qui ont mis en évidence un transfert de concentrations importantes (3,5 10⁷ TiO₂ particules/L de taille inférieure à 100 nm) vers les eaux de surfaces dans des conditions météorologiques naturelles. Il a été également estimé que 75 à 95% des NMs contenus dans les cosmétiques et crèmes solaires (e.g. TiO₂ et ZnO) étaient libérés dans l'environnement suite à une douche ou une baignade (Keller et al., 2013). Ces différents exemples suggèrent que les NMs entrent involontairement dans les écosystèmes aquatiques et terrestres où ils constituent des pollutions chroniques (Biola-Clier, 2016).

Il existe également des cas où l'environnement est exposé de manière volontaire à des nanoproduits, en particulier dans le cadre d'activités liées à l'agriculture ou à la remédiation des écosystèmes pollués. En effet, en agronomie de plus en plus de nanofertilisants et nanopesticides sont proposés sur le marché pour augmenter les rendements de production végétale et lutter contre des phytopathogènes (Liu et Lal, 2015; Servin et *al.*, 2015). Les NMs présentent également une grande efficacité pour la remédiation des écosystèmes contaminés aux métaux lourds, polluants organiques et substances biologiques (virus, bactéries, antibiotiques). Ils sont ainsi utilisés pour le traitement des eaux usées, des déchets industriels ou de l'air (Hua et *al.*, 2012; Khin et *al.*, 2012).

De plus, ces travaux montrent que les sols et les sites de stockage constituent les réceptacles environnementaux majoritaires alors qu'une fraction beaucoup plus faible est rejetée dans les écosystèmes aquatiques et dans l'air (Gottschalk et *al.*, 2009; Keller et *al.*, 2013; Sun et *al.*, 2014) (Fig. 3).

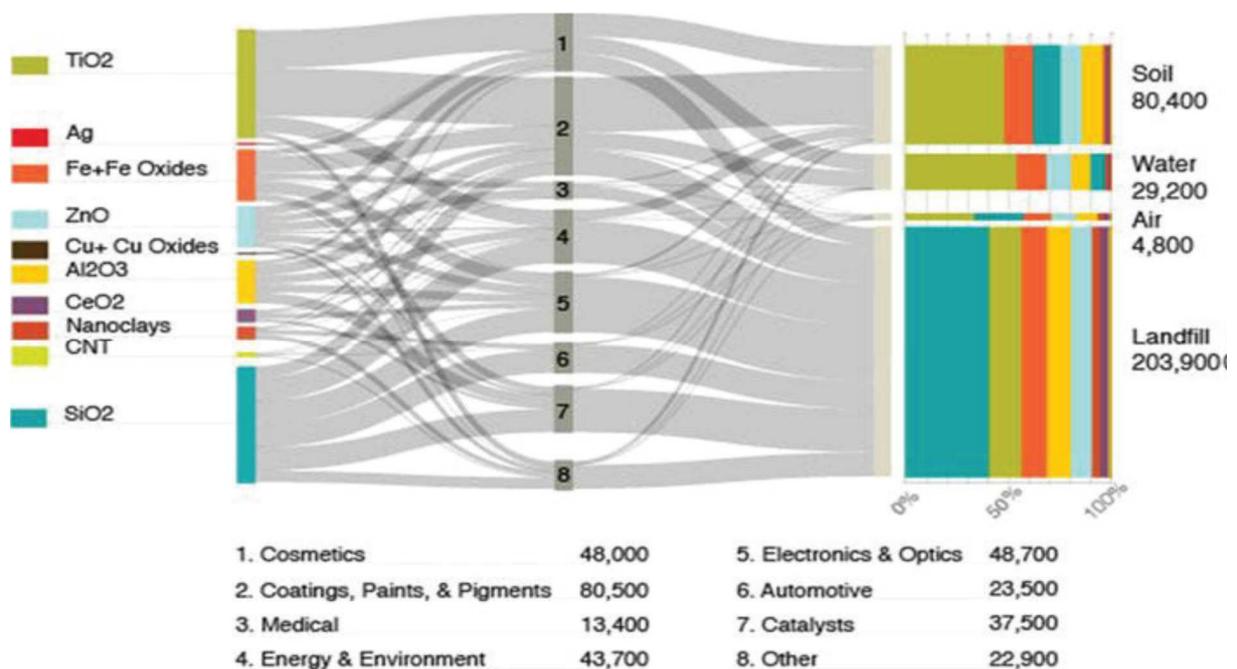
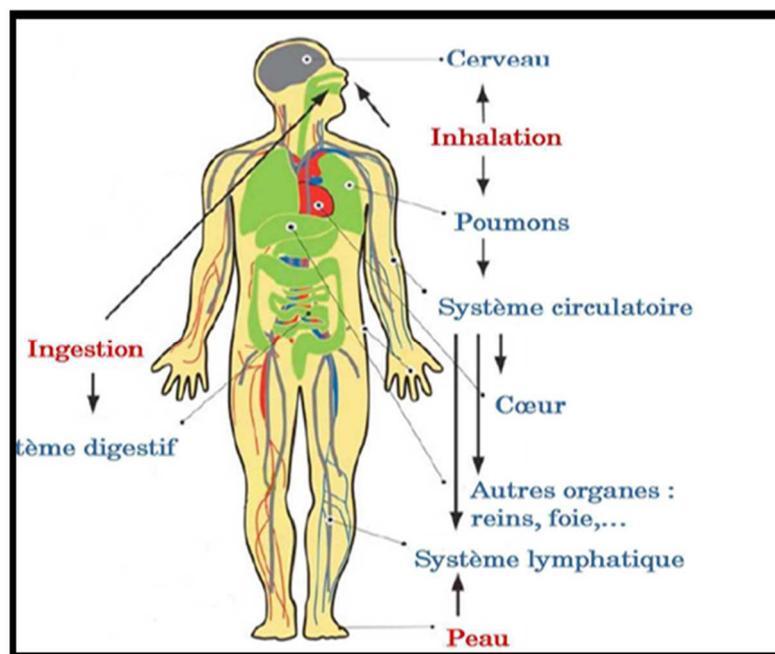


Figure 3 : Flux global des NMs en 2010 (tonne/an) depuis leur production à leur utilisation et jusqu'à leur éventuelle élimination ou rejet dans l'environnement (Keller et *al.*, 2014).

Les NMs peuvent atteindre les sols via les eaux usées utilisées pour l'irrigation et surtout à travers l'épandage de boues de stations d'épuration utilisées comme fertilisants des champs agricoles dans certains pays, dont la France (Kiser et *al.*, 2009; Sun et *al.*, 2014; Yang et *al.*, 2014). De plus, l'estimation de la production mondiale de NMs est encore mal évaluée (Piccinno et *al.*, 2012). Il est donc très probable que les concentrations prédites par ces modèles sous-estiment fortement les concentrations réelles dans certains sols agricoles (Biola-Clier, 2016).

1.3/ Modes et voies d'exposition

Le comportement et les effets des NPs dans l'organisme dépendent de la forme à laquelle celui-ci est exposé d'une part, et d'autre part de la voie de pénétration des NPs, ces deux aspects étant étroitement liés. En effet, les NPs peuvent se présenter sous la forme de particules libres dans l'air, susceptibles de pénétrer préférentiellement les voies respiratoires (Triboulet, 2013). En revanche, intégrées à la composition de produits manufacturés ou employées à des fins biomédicales, elles se présentent sous forme solide, gélifiée ou liquide, impactant alors directement la peau ou les voies digestives (Casals et *al.*, 2008; Crosera et *al.*, 2009; Li et *al.*, 2010; Fröhlich et Roblegg, 2012) (Fig. 4).



Figures 4 : Voies d'exposition de l'homme aux NPs (en rouge) et le devenir dans le corps humain (bleu) (Buzea et *al.*, 2007).

De plus, certains produits manufacturés, tels que les vêtements, pourraient libérer des NPs dans l'environnement, susceptibles de contaminer les sols et l'eau (Gottschalk et Nowack, 2011). Ceci soulève des questions supplémentaires quant à l'ingestion par l'Homme d'espèces animales ou végétales issues des environnements contaminés, qui pourraient constituer une source d'exposition indirecte (Gaiser et *al.*, 2009). Par ailleurs, si les tissus atteints sont vascularisés ou proches des systèmes vasculaire ou lymphatique, la dissémination systémique des NPs et l'atteinte de nombreux autres organes et tissus ne sont pas à exclure (Li et *al.*, 2010). En particulier, de nombreuses recherches s'intéressent à la toxicité des NPs sur le système nerveux

central ainsi qu'à leur rôle potentiel dans les pathologies neurologiques (Yang, 2010; Simko et Mattsson, 2010; Bondy, 2011). D'autres études démontrent également que certaines NPs sont capables de traverser la barrière placentaire, induisant ainsi un risque d'altération du développement fœtal (Kulvietis et *al.*, 2011).

Quelle que soit la voie d'exposition, il convient également de distinguer les expositions dites aiguës de celles dites chroniques.

1.4/ Propriétés des NPs pouvant influencer leur toxicité

1.4.1/ Taille, forme et composition chimique

La taille régit tout d'abord la profondeur d'atteinte des NPs dans l'organisme. Lors d'une exposition par voie aérienne, plus les particules sont petites, plus leur progression dans les voies bronchiques est facilitée, leur permettant ainsi d'atteindre les alvéoles pulmonaires. De même, dans le cas d'une exposition par voie cutanée, la faible taille des particules pourrait favoriser leur passage à travers la couche cornée, soit par voie inter- ou intracellulaire, soit via les pores dans glandes cutanées et follicules pileux. Leur progression dans l'épiderme puis le derme serait ainsi facilitée, et ce jusqu'à atteindre la circulation sanguine (Fig. 5) (Triboulet, 2013).

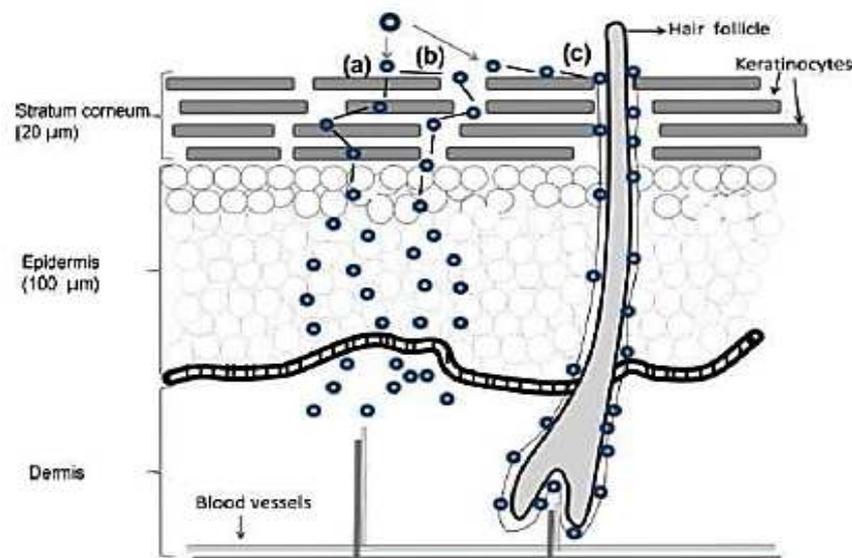


Figure 5 : Voies d'entrée hypothétiques des NPs à travers la peau (d'après Valenzuela et Simon, 2012).

Les NPs peuvent traverser la couche cornée (a) par voie intracellulaire, (b) par voie transcellulaire, ou (c) via les pores situés à proximité des follicules pileux (voie transappendagéale), pour atteindre l'épiderme, le derme et les vaisseaux sanguins. Au niveau cellulaire, la taille détermine également l'efficacité et la cinétique d'internalisation des NPs par

les cellules. Plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu : la phagocytose (les très grosses particules $\leq 20\mu\text{m}$), la pinocytose et la macropinocytose (spécifique aux fluides extracellulaires, mais aussi parfois de particules de l'ordre de quelques centaines de nanomètres à quelques μm de diamètre) et l'endocytose (les NPs de taille inférieure à 200 (Fig. 6) (Jiang *et al.*, 2008; Petros et De-Simone, 2010). Les interactions des NPs avec les protéines du milieu sont à considérer (Hervé-Bazin, 2006) : plus les particules sont grosses, plus les protéines du milieu de culture sont susceptibles d'avoir de points de fixation à leur surface, ce qui engendre des modifications des propriétés de la surface de NPs (notamment la charge) affectant leurs propriétés toxicologiques. La fixation des NPs sur les récepteurs membranaires est fonction de leur taille et sans doute aussi de leur structure. Cette fixation peut déclencher des phénomènes d'internalisation, mais pourrait aussi induire une activation des cascades de signalisation cellulaire ou des synthèses protéiques (ex. chlatrine) (Jiang *et al.*, 2008).

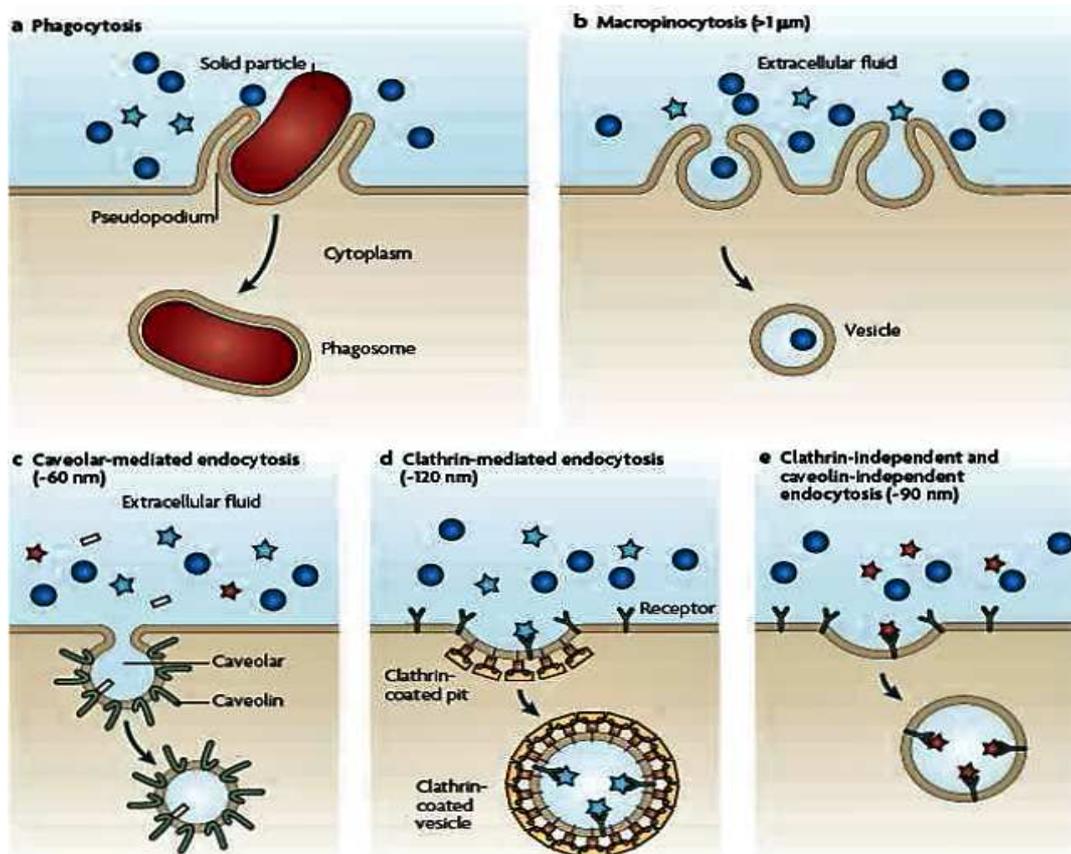


Figure 6 : Modes d'internalisation cellulaire des NPs en fonction de leur taille (d'après Petros et De-Simone, 2010).

La surface active spécifique joue en effet un rôle tout aussi important. Exprimée en m^2/g , elle est déterminée en fonction de la forme des particules, et de leur nombre par unité de masse. Ainsi, pour une masse donnée, une diminution de la taille, un degré de porosité important ou encore

une forme complexe, augmentent la surface spécifique, et donc la réactivité des NPs vis-à-vis des systèmes biologiques (Fubini et *al.*, 2010).

Enfin, la forme des NPs, qui peut être très variable, est aussi à prendre en compte. Il semblerait en effet que celle-ci joue également un rôle sur la cinétique d'internalisation des NPs par les cellules (Triboulet, 2013). Par exemple, des NPs de forme sphérique sont internalisées plus rapidement et en plus grande quantité que des particules sous forme de nanotubes de diamètre équivalent (Chithrani et *al.*, 2007). Des études réalisées sur différentes formes de NPs de TiO₂ et de ZnO montrent que les nano-sphères sont cependant moins toxiques et plus facilement éliminées que des nanotubes de diamètre équivalent (Hsiao et Huang, 2011; Porter et *al.*, 2012).

La composition chimique des NPs est elle aussi très variable étant donné que tous les groupes de matériaux ou presque sont concernés, bien que les NPs métalliques soient les plus représentées. Ceci contribue à rendre les études toxicologiques difficiles, puisque chaque groupe est associé à une chimie de surface particulière capable d'influencer la toxicité des NPs de façon spécifique (Triboulet, 2013). Cependant, certaines NPs à base de métaux s'avèrent plus toxiques que d'autres types de particules, en particulier les NPs comprenant du cuivre et du zinc (Karlsson et *al.*, 2008; Lanone et *al.*, 2009).

1.4.2/ Hydrophilie et charge

Les charges superficielles portées par les NPs, en particulier métalliques, ont un fort impact sur leur interaction avec les cellules. En effet, un état de charge élevé favorise l'adsorption des protéines membranaires. Les interactions les plus fortes sont cependant observées avec les NPs chargées positivement, qui peuvent se lier aux résidus négatifs présents à la surface des cellules, tels que des acides sialiques. L'internalisation de ce type de particules est donc favorisée (Fubini et *al.*, 2010; Fröhlich, 2012). De plus, les NPs fortement hydrophiles semblent être les plus toxiques vis-à-vis de différents types cellulaires. En particulier, elles pourraient induire une réaction inflammatoire et réduire les capacités d'internalisation des cellules, notamment la phagocytose (Fubini, et *al.*, 2010). L'état de charge est également étroitement lié au potentiel redox des NPs, en particulier métalliques, ainsi qu'à leur capacité de dissolution sous une forme ionique du métal correspondant. Il peut être déterminé par la mesure du potentiel zeta (mV), qui correspond à la différence de potentiel existante entre la surface de la particule et les couches stationnaires du milieu dans lequel elle est dispersée. Il est fonction de la distance entre la surface des particules et les points du milieu considérés (Fig. 7). La charge et le potentiel zeta jouent également sur l'état de dispersion ou d'agrégation des NPs (Eidi, 2011).

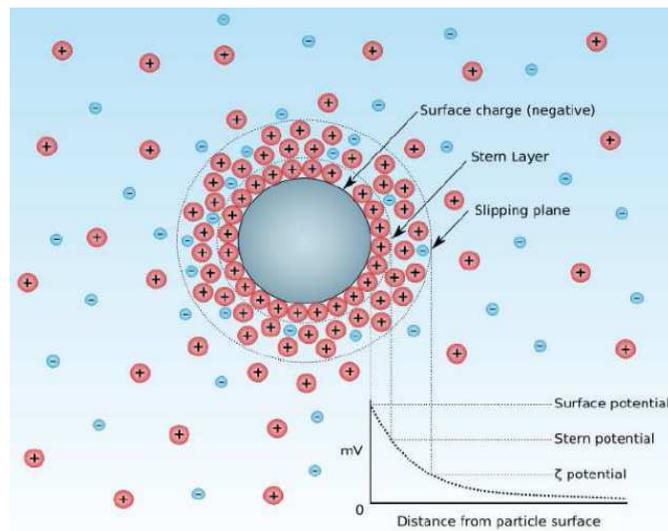


Figure 7 : Charges de surface et potentiel zeta (d'après Wikipédia, Février 2012).

1.4.3/ Stabilité, agrégation et agglomération

Un agrégat est un groupe de particules dont la cohésion relève de forces de *Van der Waal*, de forces électrostatiques ou des force développées par les tensions de surface facilement rompus notamment par sonication (Cronholm et *al.*, 2011), par opposition à un agglomérat où les particules sont plus fortement liées et ne peuvent donc plus se séparer. Une liaison forte se formant entre les particules primaires d'un agglomérat est suffisamment solide pour résister aux actions du fluide utilisé (Fig. 8) (Witschger et Fabriès, 2005). La formation d'agrégats/agglomérats est un facteur important qui peut transformer les NPs en structures micrométriques, donc en modifier considérablement le comportement : sédimentation, dépôts dans les voies aériennes et phagocytose par les macrophages.

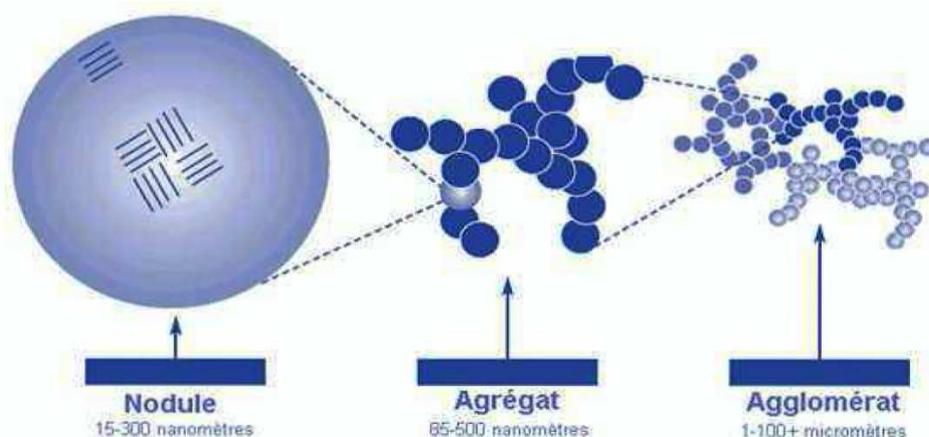


Figure 8 : Agrégation et agglomération. (D'après la Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail (CSST), Service du répertoire toxicologique, Noir de Carbone, 2006).

Ce phénomène diminue la surface de contact et modifie les interactions avec l'environnement ainsi que la toxicité (Eidi, 2011). Ceci peut être lié à la disparition de groupements réactifs tels que cela a été observé avec des NPs de TiO_2 (Oberdorster, 2001). Les mécanismes d'internalisation des NPs sont également altérés du fait de la modification de la surface et de la charge (AFSSET, 2006).

L'inclusion dans une matrice ou un liquide, ou encore l'utilisation d'agents d'enrobage (tensio-actifs par exemple), peuvent permettre de stabiliser les NPs (Witschger et Fabriès, 2005).

2/ NANOTOXICOLOGIE ET ECONANOTOXICOLOGIE

Afin de mieux répondre aux interrogations soulevées par l'utilisation croissante des NMs, la nanotoxicologie se développe parallèlement aux nanotechnologies, et vise à en étudier les risques éventuels sur l'environnement et la santé. Ainsi, dans le domaine de la recherche, l'évolution croissante des nanotechnologies est associée à la fois à une augmentation du nombre de journaux spécialisés sur le « nano-monde » (Fig. 9 a), et à une augmentation du nombre de publications de nanotoxicologie, domaine qui n'existait pas il y a encore dix ans (Fig. 9 b). Ainsi, les données sur la toxicité potentielle des NPs vis-à-vis des systèmes biologiques ne cessent de s'accroître (Triboulet, 2013).

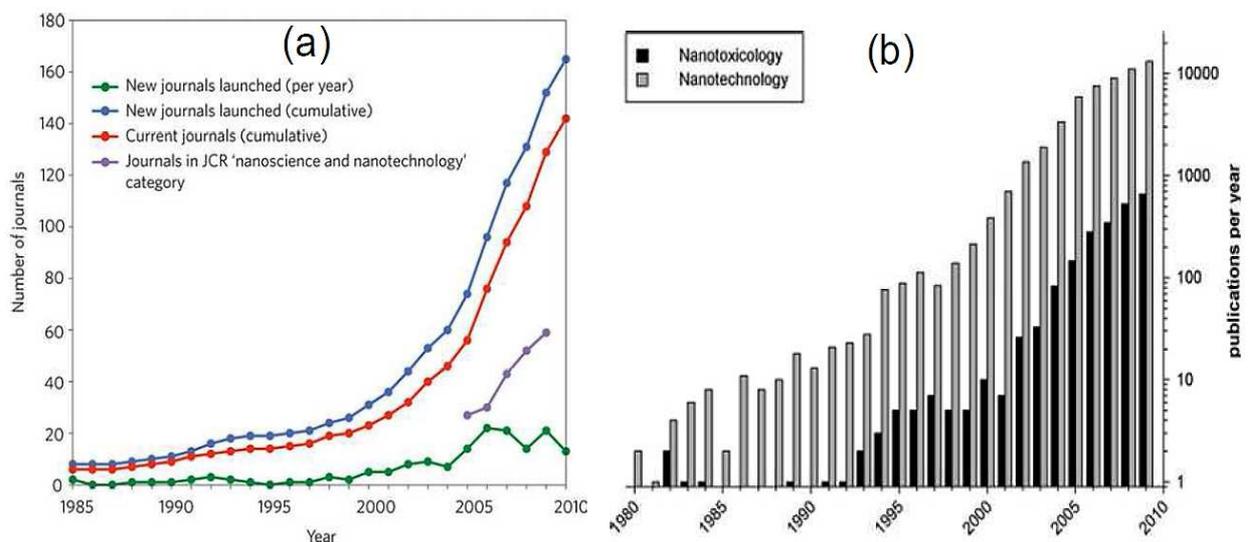


Figure 9 : Evolution du nombre de journaux sur les nanotechnologies et leurs applications (a) et du nombre de publications relatives à la toxicité des NMs sur la santé et l'environnement (b) (d'après Grieneisen, 2010 (a), et Sauer et al., 2011 (b)).

Cependant, si la nanotoxicologie générale prend de plus en plus d'ampleur, la nanoécotoxicologie se développe beaucoup moins rapidement, et peu de données concernent encore l'impact des NPs manufacturées sur l'environnement et les écosystèmes (Kahru et Savolainen, 2010). De plus, la majorité des études ne concernent que certains types de NMs, notamment les nanotubes de carbone, les fullerènes, l'argent, et le dioxyde de titane (Mueller et Nowack, 2008; Kahru et Dubourguier, 2010), et plus récemment et dans une moindre mesure les NPs à base de cuivre ou de zinc (Kahru et Ivask, 2012) (Fig. 10).

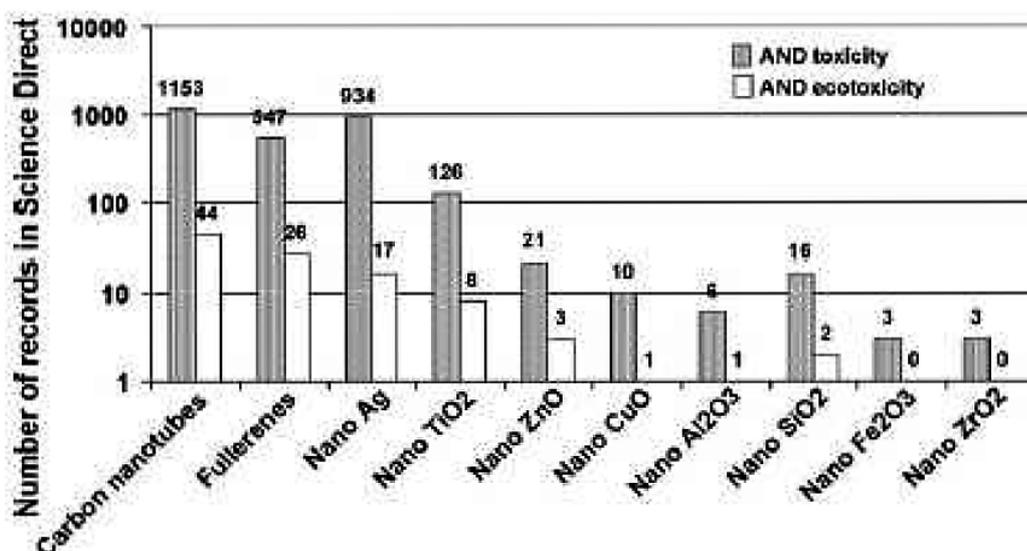


Figure 10 : Données disponibles sur les effets toxiques et écotoxiques de plusieurs types de NPs en Avril 2009 (d'après Kahru et Dubourguier, 2010).

Pourtant, le relargage non contrôlé et non intentionnel de nanomatériaux manufacturés dans l'environnement est désormais un fait établi. En effet, celui-ci peut se produire aussi bien lors de l'utilisation par les consommateurs de produits contenant des NPs (Triboulet, 2013). Les NMs peuvent ainsi contaminer les effluents industriels et les eaux de traitement des déchets, l'atmosphère via les gaz d'incinération, et les sols, à l'issue du dépôt des éléments contenus dans ces gaz ou au contact des eaux contaminées (Gottschalk et Nowack, 2011).

2.1/ Devenir des nanomatériaux dans les sols

2.1.1/ Transformations des nanomatériaux dans les sols

Le fort ratio aire de surface/volume des NMs entraîne une forte réactivité et des propriétés physico-chimiques très dynamiques dans un contexte environnemental (Lowry et *al.*, 2012). De ce fait, ces polluants émergents peuvent subir de nombreuses transformations lorsqu'ils sont en

contact avec les composés et les organismes du sol. Ces transformations sont susceptibles d'affecter leur devenir, leur mobilité et leur toxicité dans les sols (Pan and Xing, 2012). Les NMs peuvent subir 4 grands types de transformations dans l'environnement (Fig. 11). Ces différents processus peuvent conduire à des modifications d'agrégation (homo- et hétéroagrégation), à la dissolution de certains NMs et au vieillissement des enrobages (coating) qui peuvent leur être associés (Simonin, 2015).

Actuellement, les techniques disponibles pour caractériser les NMs sur la base de leur taille, charge et composition chimique ne sont applicables qu'en phase aqueuse (Dynamic Light Scattering, microscopie électronique à transmission et balayage, microscope à force atomique, EXAFS...) (Tourinho et al., 2012).

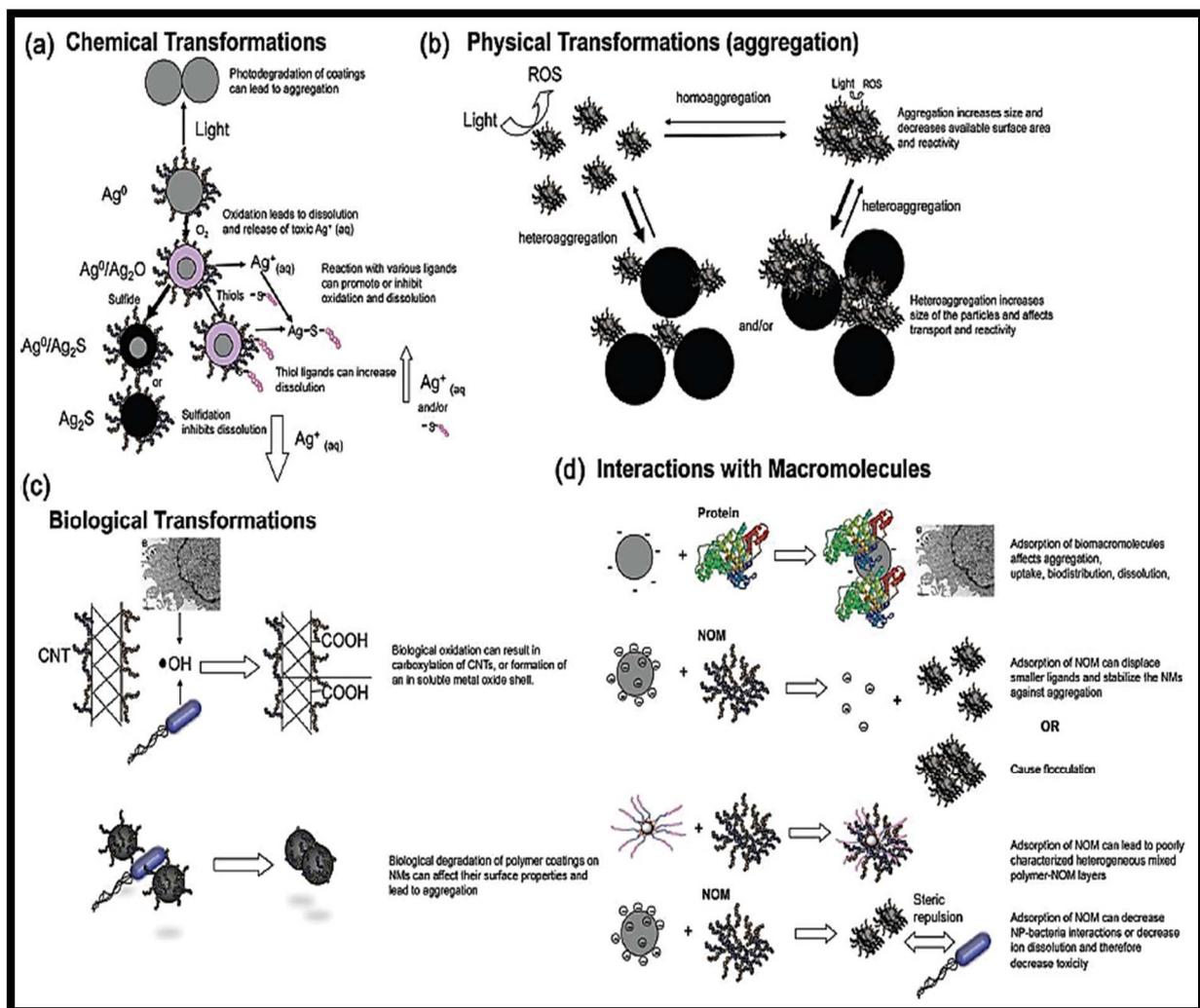


Figure 11 : Schéma de synthèse représentant les transformations chimiques (Lowry et al., 2012).

(a), physiques (b), biologiques (c) et les interactions avec les macromolécules que le NMs subissent dans l'environnement, NOM : Natural Organic Matter, ROS : Reactive Oxygen Species, CNT : Carbon Nanotube.

Plusieurs facteurs environnementaux sont bien connus pour modifier l'homoagrégation (Fig. 11b), les plus étudiés étant le pH et la force ionique (Cornelis et *al.*, 2014). En particulier, ces facteurs influencent les charges de surface. Une forte homoagrégation est observée au pH proche du point isoélectrique du nanomatériau et également pour une force ionique élevée jusqu'à la concentration critique de coagulation. Dans ce cas, l'agrégation n'augmente plus à cause de la diffusion (Darlington et *al.*, 2009; Thio et *al.*, 2011; Cornelis et *al.*, 2014).

Le processus physique susceptible d'être le plus courant dans les pores du sol est l'hétéroagrégation (Fig. 11b et 11d) (Cornelis et *al.*, 2011; Zhou et *al.*, 2012). Cette hypothèse est supportée par le fait que les hétéroagrégats de colloïdes naturels sont beaucoup plus fréquents dans les sols que les homoagrégats (Buffle et *al.*, 1998). L'hétéroagrégation est un phénomène beaucoup plus difficile à étudier expérimentalement que l'homoagrégation, particulièrement dans les sols car il existe une très grande variété de colloïdes ou particules (matière organique, argile, limon...) pouvant potentiellement interagir avec les NMs (Simonin, 2015). En milieu aquatique, les argiles de type montmorillonite entraînent une déstabilisation des NPs en suspension, qu'elles soient chargées positivement ou négativement (Ag et TiO₂) et les interactions NPs-argile sont dépendantes du pH et de la force ionique (Zhou et *al.*, 2012). Cornelis et *al.*, (2011) ont montré que du phosphate dissous pouvait s'adsorber en surface de CeO₂-NPs, mais aussi qu'une hétéroagrégation pouvait avoir lieu avec des argiles dans des conditions représentatives du sol. Dans une étude associée, les Ag-NPs chargées négativement s'adsorbaient préférentiellement sur les sites de surface en bordure des feuillets d'argile (oxyde de fer ou d'aluminium) qui sont chargés positivement (Cornelis et *al.*, 2011). En plus des processus d'homo- et hétéroagrégation, certains NMs peuvent aussi subir une dissolution (Fig. 11a) (Simonin, 2015). Les NMs constitués de métaux de classe B (eg : Ag, Zn) sont plus susceptibles de se solubiliser dans l'environnement car ils forment des oxydes métalliques partiellement solubles et ont une forte affinité avec les ligands inorganiques et organiques sulfurés (Lowry et *al.*, 2012). La dissolution des NMs entraîne le relargage d'ions métalliques connus pour être toxiques vis à vis des organismes du sol. Toutefois, ces données sont encore très limitées à cause des difficultés techniques pour séparer les fractions dissoutes et nanoparticulaires à partir des sols (Simonin, 2015). Vittori Antisari et *al.*, (2013) ont observé une faible dissolution des CeO₂, Fe₃O₄ et SnO₂-NPs dans un sol de texture équilibrée. En revanche, des Ag et ZnO-NPs peuvent se solubiliser de manière significative (Kool et *al.*, 2011; Shoults-Wilson et *al.*, 2011; Rousk et *al.*, 2012; Diez-Ortiz et *al.*, 2015), mais ce processus est limité par la présence d'un enrobage (Coutris et *al.*, 2012).

La modification des NMs suite aux activités biologiques est inévitable dans les sols en raison de la production de métabolites par les plantes et les microorganismes ou à l'ingestion par la faune. Ces transformations, qui concernent les NMs, sont notamment associées aux réactions redox en lien avec l'activité biologique (Lowry et *al.*, 2012). Il est vraisemblable que la biotransformation la plus courante soit l'adsorption de biomacromolécules à la surface des NMs (forme d'hétéroagrégation, Fig. 11c). La biodégradation des NMs à base de carbone est possible mais dépend du type de sol et des enzymes disponibles dans les pores du sol (Petersen et *al.*, 2011). Il a également été montré que les enrobages des NMs utilisés pour limiter leur homoagrégation et favoriser leur stabilité, comme le citrate, peuvent être facilement dégradés, en particulier par des ROS produites par des champignons (Navarro et *al.*, 2011).

2.1.2/ Transport des nanomatériaux dans les sols

Depuis une dizaine d'années, un grand nombre d'études a été consacré au transport des NMs en milieu poreux afin de prédire leur devenir dans les eaux souterraines et les sols.

En utilisant des systèmes simplifiés, plusieurs facteurs environnementaux affectant la mobilité des NMs ont été identifiés, en particulier la force ionique de la solution, le pH, la présence d'acides organiques, la concentration et la taille des NMs ou la vitesse de l'eau (Lecoanet et *al.*, 2004; Espinasse et *al.*, 2007; Darlington et *al.*, 2009; Solovitch et *al.*, 2010; Wang et *al.*, 2012). Le transport des NMs augmente fortement lorsque ceux-ci sont stables en suspension (Wang et *al.*, 2012). Ces conditions sont réunies lorsqu'ils sont faiblement agrégés (taille < 300 nm), que la force ionique de la solution est faible, en présence d'acides humiques ou fulviques, ou de surfactants. La vitesse de l'eau est également à prendre en compte : généralement, plus le flux d'eau est important, plus le transport de NPs est important (Lecoanet et Wiesner, 2004; Chowdhury et *al.*, 2012; Jeong et Kim, 2009). De manière générale, il a été observé que la taille des NMs augmentait suite à leur transport dans la colonne suggérant des processus d' homo- et d'hétéroagrégation (Fig. 12– processus 3 et 6, (Fang et *al.*, 2009; Wang et *al.*, 2012). Logiquement, les NMs de plus petite taille ont des capacités de transport plus grandes (Darlington et *al.*, 2009; Ben-Moshe et *al.*, 2010). Darlington et *al.*, (2009) ont montré que les NPs de 200nm avaient une mobilité beaucoup plus importante que les agrégats de plus grande taille due au processus de filtration et à la sédimentation (Fig. 12– processus 5 et 8). Différentes études ont mis en évidence que la mobilité des NPs variait fortement d'un nanomatériau à un autre (Lecoanet and Wiesner, 2004; Lecoanet et *al.*, 2004; Ben-Moshe et *al.*, 2010; Tian et *al.*, 2010). Les NMs à base de carbone (ex : fullerène) semblent particulièrement peu mobiles comparés aux NMs métalliques, sans doute à cause de leur très forte hydrophobicité qui empêche leur dispersion dans l'eau et donc leur mobilité (Jaisi et *al.*, 2008; Tian et *al.*, 2012).

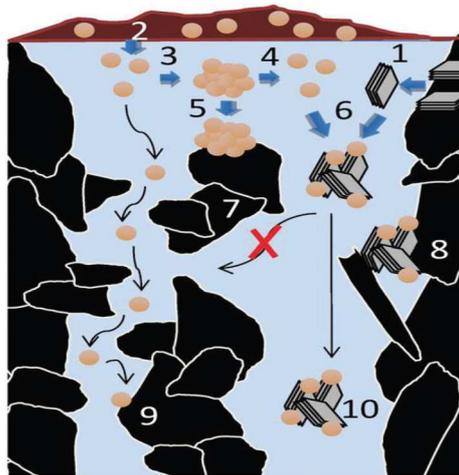


Figure 12 : Schématisation des processus clés déterminant le transport des colloïdes et NMs en milieu poreux (Cornelis *et al.*, 2014).

1. Génération de colloïdes. 2. Lessivage des NMs. 3. Homoagrégation. 4. Dispersion. 5. Sédimentation. 6. Hétéroagrégation. 7. Exclusion de taille. 8. Filtration (Straining). 9. Déposition. 10. Transport convectif

Un nombre limité de publications concernant le transfert des NMs dans les sols naturels est disponible à l'heure actuelle (Sun *et al.*, 2015). Il a été montré que les ZnO-NPs ont une mobilité plus faible dans un sol que dans du sable, la concentration et la force ionique étaient aussi très différents. Dans le sable, le transport du ZnO diminuait lorsque la concentration appliquée augmentait, alors que le phénomène inverse était observé dans le sol (Sun *et al.*, 2015).

Deux études portant sur le transport des TiO₂-NPs ont montré une mobilité différente comme résultat (Fang *et al.*, 2009; Nickel *et al.*, 2015). Dans l'étude de Fang *et al.*, (2009), le transport du TiO₂ était influencé par la teneur en argile et la force ionique de la solution du sol, donc plus faible.

Ces études pionnières suggèrent que les NMs ont une très faible mobilité dans les sols naturels et donc qu'il existe un faible risque de transport de ces contaminants hors du site pollué, que ce soit verticalement vers les eaux souterraines ou latéralement vers des sites voisins (Simonin, 2015).

2.2/ Biodisponibilité et toxicité des nanomatériaux dans les sols

2.2.1/ Biodisponibilité des nanomatériaux dans les sols

Les NMs peuvent avoir des temps de résidence longs dans les sols et subir de nombreuses transformations. Les plantes et les organismes du sol (microorganismes, mésofaune et macrofaune) seront donc exposés à ces contaminants émergents. Selon la définition de Semple *et al.*, (2004), la biodisponibilité d'un composé dans les sols est définie en écotoxicologie comme suit : « un composé biodisponible est librement disponible pour traverser la membrane cellulaire d'un organisme à partir du milieu où l'organisme se trouve à un temps donné » et la

bioaccessibilité est définie ainsi : « le composé bioaccessible est librement disponible pour traverser la membrane cellulaire d'un organisme depuis l'environnement, si l'organisme a accès à ce composé. Toutefois, le composé peut être soit éliminé physiquement de l'organisme ou seulement biodisponible après un certain temps ». D'après ces définitions, la bioaccessibilité englobe donc ce qui est actuellement biodisponible et ce qui est susceptible de le devenir (Semple et *al.*, 2004). Dans les sols, on s'attend donc à ce que la concentration biodisponible en NMs soit plus faible que la concentration totale, du fait du grand nombre de surfaces réactives pouvant immobiliser les NMs et de transformations pouvant affecter leur biodisponibilité (Cornelis et *al.*, 2014).

Evaluer la fraction biodisponible et bioaccessible des NMs est un défi encore plus grand qui nécessite des développements méthodologiques importants et donc les données à ce sujet sont quasi inexistantes (Vittori-Antisari et *al.*, 2013). Toutefois, lorsque la toxicité des NMs repose sur la dissolution de métaux comme dans le cas de l'Ag ou du Zn, la recherche de la fraction biodisponible des éléments traces dissous est facile (Cornelis et *al.*, 2014). De nombreuses études ont montré que les NMs étaient retrouvés dans les racines ou les feuilles de différentes plantes (Rico et *al.*, 2011), dans les tissus d'invertébrés (Tourinho et *al.*, 2012) ou dans des champignons mycorhiziens (Whiteside et *al.*, 2009), illustrant leur biodisponibilité réelle dans les sols.

2.2.2/ Toxicité des nanomatériaux dans les sols

L'adsorption de NPs à la surface des cellules, leur dissolution et des stress oxydatifs induits par la production de ROS (Nel et *al.*, 2006; Handy et *al.*, 2008; Jiang et *al.*, 2008; Simon-Deckers et *al.*, 2009; Li et *al.*, 2012) sont les principaux mécanismes sur lesquels repose cette toxicité.

Un paramètre sans doute clé pour leur toxicité est l'agrégation, car elle réduit l'aire de surface « disponible » et donc leur réactivité (Hotze et *al.*, 2010). L'agrégation pourrait donc réduire leur toxicité lorsqu'elle est associée à des processus de surface, comme l'émission de ROS et la dissolution (Lowry et *al.*, 2012). D'autre part, l'hétéroagrégation entraîne une augmentation de la taille effective des NMs, ce qui pourrait limiter leur ingestion par certains organismes ou le passage à travers une paroi et/ou membrane cellulaire (Tourinho et *al.*, 2012). Ainsi certains paramètres physicochimiques du sol identifiés pour favoriser ou limiter l'hétéroagrégation pourraient être de bons indicateurs de la biodisponibilité des NMs. Une force ionique élevée et la présence d'argile semblent être des conditions favorables à une forte hétéroagrégation des NPs et conduirait donc à de faibles biodisponibilité et toxicité (Shoultz-Wilson et *al.*, 2011). Cependant en présence de matière organique dissoute, il a été observé une augmentation de l'écotoxicité/accumulation associée à une augmentation de la mobilité dans les sols (Cornelis et *al.*, 2014). L'évaluation de la biodisponibilité et de la toxicité des NMs et des facteurs du sol les

influençant en est encore à ses balbutiements. L'amélioration des méthodologies pour caractériser les NMs dans des conditions environnementales proches du sol et le développement des protocoles permettant d'évaluer la fraction biodisponible/bioaccessible des NPs en milieux hétérogènes complexes et l'évaluation de l'influence des propriétés du sol (teneur en argile, limon, sable) force ionique et teneur en matière organique sur l'écotoxicité des NMs sont nécessaires car il semble probable que ces facteurs affecteront leur biodisponibilité et toxicité (Simonin, 2015).

2.3/ Évaluation du risque écotoxicologique

Classiquement, la démarche d'évaluation du risque environnemental d'une substance chimique à priori se compose de 3 grandes étapes (Technical Guidance Document on Risk assessment, EC 2003a, b; Ramade, 2007).

➔ L'évaluation de l'exposition, qui a pour objet de déterminer les concentrations prévisibles dans l'environnement (PEC). Elle est généralement déterminée pour chacun des compartiments des écosystèmes : l'air, l'eau, le sol... Plusieurs facteurs sont pris en compte lors de la détermination d'une PEC comme le type de substances, les quantités émises, la nature des milieux récepteurs... (Baurand, 2015).

➔ L'évaluation des effets, qui va permettre de déterminer une concentration prévisible sans effet sur l'environnement (PNEC). Cette phase comprend deux parties : l'identification du danger qui correspond aux différents processus par lesquels on détermine si une substance est intrinsèquement dangereuse pour l'homme ou l'environnement et la détermination d'une relation dose-réponse entre les concentrations de la substance et les effets induits sur les individus de la population exposée. Pour ce faire, on utilise des bioessais (tests monospécifiques effectués la plupart du temps en laboratoire), qui permettent de caractériser la toxicité de la substance considérée chez des organismes de niveaux trophiques variés (bactéries, champignons, végétaux, animaux). Chez les animaux, les tests portent généralement sur la survie, le comportement, la croissance, la reproduction, le succès d'éclosion ou sur le développement embryonnaire. Classiquement, les paramètres écotoxicologiques déterminés sont la concentration sans effet observé (NOEC), la plus faible concentration ayant un effet (LOEC), ou encore les concentrations efficaces induisant une inhibition de X % par rapport aux traitements témoins (CE_x). Suivant le type de bioessais réalisés (évaluation de la toxicité aiguë, ou chronique, en conditions contrôlées ou *in situ*), le nombre de modèles biologiques considérés ou encore le modèle d'étude utilisé, un facteur d'extrapolation variable est appliqué aux données de toxicité pour estimer les concentrations sans effet. La valeur de PNEC est ainsi calculée en divisant la

plus faible NOEC obtenue à l'issue des bioessais par le facteur d'extrapolation sélectionné (Baurand, 2015).

➔ L'évaluation du risque (rapport PEC/PNEC) qui correspond à la probabilité que la substance considérée soit présente dans l'environnement à une concentration toxique pour les organismes vivants. Pour les substances chimiques, si ce rapport est supérieur à 1, il existe alors un risque pour l'environnement. L'approche expérimentale utilisée lors de l'évaluation du risque des produits chimiques, qui est souvent basée sur des bioessais de toxicité aiguë portant sur une seule phase du cycle de vie des organismes, reste critiquable. Elle ne rend pas compte notamment de la variabilité des réponses biologiques des individus dans l'espace et dans le temps (Ramade, 2007). Un individu au stade adulte n'a pas les mêmes réponses biologiques qu'un juvénile ou encore qu'un embryon en cours de développement. Il est donc important de disposer de bioessais d'écotoxicité renseignant sur les effets des substances chimiques à divers stades du cycle vital voir sur l'intégralité de ce cycle (Ducrot, 2013).

2.3.1/Evaluation du risque toxicologique des nanoparticules

2.3.1.1/ Modèles : sélection et utilisation

Les études de nanoécotoxicologie disponibles à ce jour étudient le comportement et les effets de NPs sur des organismes considérés comme modèles pour la classification des composés chimiques, notamment du point de vue du dispositif de sécurité européen REACH. Il s'agit d'organismes situés à différentes échelles de la chaîne alimentaire : bactéries des sols ou des eaux (*Escherichia*, *Bacillus*, *Vibrio*...), levures (*Saccharomyces*), algues, protozoaires ciliés, mollusques, crustacées (*Daphnia*), poissons, nématodes (*Caenorhabditis*), mais aussi insectes et plantes. Les stratégies d'études doivent par ailleurs inclure des tests de caractérisation des NPs étudiées, des essais *in vivo*, et des essais *in vitro* (cellulaires et acellulaires) (Kahru et Dubourguier, 2010; Peralta-Videa et al., 2011; Kahru et Ivask, 2012).

Les modèles animaux à visée toxicologique chez l'Homme, quant à eux, sont essentiellement des rongeurs, bien que la pertinence de ce type de modèles ait été remise en cause pour les études de toxicité de NPs administrées par voie digestive, notamment du fait des différences morphologiques et fonctionnelles importantes avec l'Homme (Fröhlich et Roblegg, 2012). Les études réalisées rapportent notamment une augmentation de la mortalité, une perte de poids chez certaines espèces, et une accumulation importante des métaux dans l'organisme, sous forme particulaire ou ionique, en particulier au niveau du foie, du pancréas, de la rate, des reins, ou parfois du cerveau, suggérant des difficultés d'élimination de ces matériaux (Aillon et al., 2009; Shaw et Handy, 2011; Fröhlich et Roblegg, 2012). Au niveau tissulaire et cellulaire, une

déstabilisation des membranes, ainsi que des phénomènes de stress oxydant et d'inflammation sont également rapportés (Valant et al., 2009).

Les modèles cellulaires utilisés *in vitro* pour des études de nanotoxicologie sont constitués par une grande variété de lignées continues diploïdes ou de cellules primaires, parmi lesquelles des cellules nerveuses, pulmonaires, hépatiques, sanguines, épithéliales ou endothéliales, phagocytaires, ou encore cancéreuses. Certaines études sont aussi menées sur des microorganismes (*E.coli...*), ou des levures (*S.cerevisiae*). Le choix du type cellulaire est souvent orienté à partir de données ou d'observations *in vivo*. Il peut aussi être fonction du type de NPs et des applications envisagées. Les conditions de culture (contenants, milieux, présence ou non de sérum...) et d'exposition aux NPs (forme, dose, durée) sont aussi très variables (Jones et Grainger, 2009). La présence des macrophages dans de nombreux tissus et organes, et leur rôle majeur dans la défense innée de l'organisme, en particulier leur forte capacité phagocytaire, en font un modèle de choix pour de nombreuses études *in vitro*, la toxicité des NPs étant souvent liée à leur internalisation par les cellules (Oberdörster et al., 2005; Lanone et al., 2009).

Cette diversité de modèles et de conditions d'études permet d'élargir les données sur la toxicité des NPs. Cependant, elle contribue également à compliquer leur exploitation, notamment dans un cadre réglementaire. En effet, les résultats observés peuvent différer fortement d'une lignée cellulaire à une autre. De plus, les lignées immortalisées sont généralement dérivées d'un type cellulaire, et les différences avec le type d'origine peuvent rendre contestable l'application *in vivo* de certains résultats obtenus *in vitro* (Hughes et al., 2007). Les cultures primaires peuvent ici constituer une alternative à l'utilisation des lignées, mais l'isolation du type cellulaire souhaité et son maintien dans des conditions de culture *in vitro* peuvent s'avérer difficiles et requièrent souvent l'utilisation de milieux complexes. Il apparaît donc ici que les deux types de modèles devraient être utilisés de façon complémentaire, pour une meilleure estimation des effets cytotoxiques des nanomatériaux (Jones et Grainger, 2009).

Plusieurs bioessais d'embryotoxicité standardisés sont disponibles au niveau Français (AFNOR) et Américain (ATSM) sur chez les amphibiens dont le développement embryonnaire est l'un des mieux connus. Un bioessai standardisé, nommé FETAX (*Frog Embryos Test Teratogenesis Assay Xenopus*) utilise les embryons du xénope *Xenopus laevis* et permet de mesurer les effets tératogènes des substances chimiques (Davies et Freeman, 1995; ASTM E1439-98, 1998). Plus récemment, Herkovits et Pérez-Coll (2003) ont développé un bioessai nommé AMPHITOX. Il comprend 4 tests utilisant des embryons d'amphibiens (*Bufo arenarum*) pour évaluer l'embryotoxicité de substances chimiques en se basant sur la survie ou les malformations de développement. Ce bioessai a été standardisé en 2003 aux Etats-Unis (ASTM STP1443, 2003).

De nombreux paramètres de mesure des effets toxiques à différents niveaux d'organisation biologique sont disponibles à différents stades embryonnaires chez des organismes aquatiques, les embryons de poisson zèbre *Danio rerio* sont très utilisés pour évaluer l'embryotoxicité des NPs (Zhu et al., 2009; Asharani et al., 2011; Aerle et al., 2013; Park et al., 2013), les embryons d'huître (Ringwood et al., 2010) aussi sont utilisés. Peu de données sont disponibles afin de caractériser les effets toxiques des NPs chez les stades embryonnaires d'organismes terrestres (Baurand, 2015).

2.3.1.2/ Les déterminants de la toxicité des NPs

Les NPs favorisent la formation de pro-oxydants déstabilisant l'équilibre entre la production de ROS dans la membrane (*in vitro* et *in vivo*) et mécanismes de réparation de cette perturbation (Curtis et al., 2006; Kabanov, 2006). Par exemple, les fullerènes hydrosolubles (C60) induisent la formation du radical superoxyde (O_2^-), la peroxydation lipidique et sont très cytotoxiques.

Les kératinocytes traitées avec des nanotubes de carbone présentent une augmentation de la génération de ROS, une peroxydation des lipides, une souffrance mitochondriale et des modifications morphologiques (Kabanov, 2006).

La plupart des études de toxicité des NPs mettent en évidence l'association entre l'exposition aux nanomatériaux et la production de ROS, en particulier dans le cas des NPs métalliques, notamment du fait de leur nature chimique (Park et al., 2008; Karlsson et al., 2008; Sharma et al., 2011). Les métaux qui les composent peuvent en effet interférer avec les métaux intracellulaires et perturber leur homéostasie (Kao et al., 2012). Certaines études suggèrent de plus que ces perturbations seraient en partie causées par la dissolution partielle des NPs en ions métalliques (Song et al., 2010; Xia et al., 2008). Cependant, si les ions présentent une toxicité qui leur est propre et sont en effet capables de générer des ROS au niveau cellulaire, ils n'expliquent par toujours la toxicité des NPs (Midander et al., 2009; Shaw et Handy, 2011).

Ainsi, plusieurs études rapportent l'activation de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) associée à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-13, IL-17, IL-25, MIP-1, IFN-g, TNF- α ...) et de composés chimio-attracteurs (Kang et al., 2005; Palomaki et al., 2010; Roy et al., 2011).

L'inflammation a aussi été observée sur d'autres types cellulaires, tels que des kératinocytes ou des cellules épithéliales pulmonaires (cellules non phagocytaires), résultant également en la production d'interleukines et de TNF- α (Rothen-Rutishauser et al., 2007; Yazdi et al., 2010).

Le suivi morphologique et les observations macro et microscopiques permet de déterminer les malformations ou les retards de croissance et l'arrêt du développement si à lieu les battements

cardiaques et les stades de développement sont aussi utilisés. La mortalité, l'inhibition ou l'arrêt d'éclosion et le taux d'éclosion sont possible à utiliser en embryotoxicité. La recherche de biomarqueurs enzymatiques ainsi que les effets tératogènes (Baurand, 2015).

3/ LES NANOPARTICULES DE FER

Depuis quelques années, nous assistons à l'émergence des nanotechnologies, qui lorsqu'elles rencontrent le vivant, se nomment nanobiotechnologies (Auffan, 2007). Les champs de recherche et d'investigation se développent dans différents domaines : la recherche pharmaceutique et médicale (NPs comme vecteurs de médicaments (Chen et *al.*, 2013; Lv et *al.*, 2013), la destruction de tumeurs par chauffage de NPs (Hang et Hainfeld, 2013), l'utilisation de NPs comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (Ohno et *al.*, 2013) et la recherche dans le domaine des nanotechnologies environnementales (dépollution des eaux (Jiang et *al.*, 2012; Mueller et *al.*, 2012) et des sols (Machado et *al.*, 2013), le traitement des eaux de consommation (Chai et *al.*, 2013), le recyclage des déchets (Lee et *al.*, 2009).

3.1/ Nano-fer et leurs utilisations

Les NPs de fer sont souvent utilisées dans différents domaines de recherches : cosmétologie, électronique, nanomédecine, remédiation environnementale.

Il existe plusieurs types de NPs de fer en fonction de l'oxyde qui les compose, la présence de fer métallique ou encore des adjuvants ou autres métaux qui lui sont associés. Parallèlement, à ces NPs manufacturées, des NPs de fer peuvent être retrouvées dans l'environnement suite à des rejets industriels d'industries métallurgiques par exemple. Le tableau 2 présente les différentes NPs de fer que l'on peut retrouver dans l'environnement suite à des retombées atmosphériques ou à leur relargage (volontaire ou accidentelle) dans l'environnement. Les nano-maghémite (Fe_2O_3) et les nano-magnétites (Fe_3O_4) peuvent aussi se retrouver dans l'environnement et notamment dans l'atmosphère suite à des éruptions volcaniques, elles peuvent aussi être émises par les rejets atmosphériques d'industries (Canivet, 2013). Les NPs de fer fabriquées par le MCMC de Thiais sont représentatives des NPs qui peuvent être émises dans l'atmosphère par des industries métallurgiques de par leur mode de fabrication (Hervé-Bazin, 2007).

Tableau 2 : Synthèse et utilisation des différents types de NPs Fe₂O₃ (Canivet, 2013).

Types de nanoparticules de fer	Utilisation	Références
Nano-maghémites - Fe₂O₃	<ul style="list-style-type: none"> - Dépollution des eaux par adsorption de microcystine-LR (MC-LR) dans les eaux - Dépollution de l'arsenic (III, V) dans les eaux - Dépollution de l'As(V) dans les eaux de boisson 	<ul style="list-style-type: none"> - Gao <i>et al.</i>, 2012 - Tang <i>et al.</i>, 2011 - Tuutijärvi <i>et al.</i>, 2012
Nano-magnétites - Fe₃O₄	<ul style="list-style-type: none"> - Application dans l'imagerie de diagnostic et de thérapie du cancer - Utilisation de nanoparticules magnétiques (MNP) à base d'oxyde de fer comme sondes sensibles pour l'imagerie par résonance magnétique et les applications thérapeutique 	<ul style="list-style-type: none"> - Mody <i>et al.</i>, 2010 - Xu et Sun, 2013
Nanoparticules zero valent iron - nZVI	<ul style="list-style-type: none"> - Dépollution du chrome dans les eaux usées - Dépollution d'ibuprofène présent dans les sols - Dépollution du Cr(VI) dans les eaux - Dépollution des eaux par dégradation du lindane en solution aqueuse 	<ul style="list-style-type: none"> - Lin <i>et al.</i>, 2013 - Machado <i>et al.</i>, 2013 - Petala <i>et al.</i>, 2013 - San Roman <i>et al.</i>, 2013
Superparamagnetic iron oxide nanoparticles - SPION *	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation pour de l'imagerie par résonance magnétique - Utilisation comme vecteurs de médicaments - Utilisation comme agent de contraste pour le diagnostic de tumeurs - Nanomédecine : Utilisation des propriétés magnétiques uniques, grâce à laquelle elles présentent une excellente efficacité de ciblage tumoral, ce qui ouvre la voie à un traitement personnalisé du cancer efficace 	<ul style="list-style-type: none"> - Hilger et Kaiser, 2012 - Wahajuddin et Arora, 2012 - Cheng <i>et al.</i>, 2013 - Santhosh et Ulrich, 2013

3.2/ Toxicité

Bien que le fer soit un élément essentiel à la vie, une augmentation de sa concentration en milieu cellulaire peut générer la formation de ROS (Alberts *et al.*, 1983). Or, dans la plupart de leurs applications, les NPs d'oxyde de fer sont en contact avec les cellules voire le milieu intracellulaire. Il est donc probable que les interactions NPs d'oxyde de fer/cellules ne soient pas anodines.

C'est notamment le cas des NPs de magnétite dont la toxicité vis-à-vis des cellules humaines a été démontré (Berry *et al.*, 2003; 2004). Les NPs d'oxyde de fer utilisées à des fins biomédicales (Gupta *et al.*, 2005) sont généralement fonctionnalisées en surface via le greffage de composés organiques (Kim *et al.*, 2001; Goetze *et al.*, 2002; Lacava *et al.*, 2002; Chunfu *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Cette couche organique limite les contacts directs entre le fer des NPs et les composants cellulaires.

Chez les souris, l'injection intra péritonéale d'oxyde de fer, provoque une inflammations dans la cavité péritonéale, (Lacava *et al.*, 2002). Aussi, l'injection intraveineuse de Fe₃O₄ provoque des effets génotoxique observés après une semaine chez la même espèce (Sadeghiani *et al.*, 2005). Parallèlement, Kreuter *et al.*, (2001) ont démontré sur des rats, que des NPs magnétiques étaient capables de délivrer des substances médicamenteuses directement dans des tumeurs cérébrales.

Il est nécessaire de comprendre le mécanisme d'action des NPs d'oxyde de fer contre les bactéries, mais à ce jour. Quelques études ont suggéré que la cause première de la fonction antibactérienne peut être de la perturbation de l'activité de la membrane cellulaire. Une autre

possibilité pourrait être l'induction d'espèces réactives de l'oxygène intercellulaires, notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un agent oxydant fort nocif pour les cellules bactériennes.

Des travaux ont montré une forte affinité entre les NPs et la membrane externe d'*E.coli*. L'adsorption des NPs est certainement contrôlée par des attractions électrostatiques. Mais le résultat le plus intéressant concerne l'étroite relation existant entre la sensibilité à l'oxydation des NPs à base de fer et leur cytotoxicité :

- ➔ Les nano-maghémite (FeIII - forme oxydée) : sont chimiquement stables au contact d'*E.coli* et n'induisent aucune toxicité significative.
- ➔ Les nano-magnétites (FeII/FeIII - forme intermédiaire) : leur surface s'oxyde en maghémite au contact d'*E.coli* via une désorption du FeII de leur structure. Une cytotoxicité apparaît à partir de 0.7 g/L de Fe_3O_4 .
- ➔ Les nZVI (Fe° - forme réduite) : elles sont entièrement oxydées en lépidocrocite (FeIII) et magnétite (FeII/FeIII) dans l'eau et au contact d'*E.coli*. Dès l'introduction de 0.07 g/L de Fe° 70% de cytotoxicité apparaît.

Dans un deuxième temps, les études se sont plus focalisées sur les effets des nanomatériaux sur le métabolisme des végétaux. Le principal critère étudié a été la photosynthèse (Racuciu and Creanga, 2007c; Racuciu and Creanga, 2007b; Racuciu and Creanga, 2009; Racuciu et al., 2009; Lin et al., 2009a). Par exemple, des études menées sur divers végétaux (maïs, pavot, chélidoine, courgette) ont montré une diminution de la teneur en chlorophylle A et B après une exposition à des NPs de fer (Fe_2O_3 , Fe_3O_4) (Cotae and Creanga, 2005; Racuciu and Creanga, 2007c; Racuciu and Creanga, 2007b; Racuciu and Creanga, 2009; Racuciu et al., 2009).

D'autres études ont mis en évidence une perturbation du réseau de microtubules chez *Arabidopsis thaliana* après exposition à des NPs de TiO_2 (Wang et al., 2011b) ou à des fullerènes (Liu et al., 2010). Une autre étude a montré que les grains de pollen exposés à des NPs de Pd (Speranza et al., 2010) induit une toxicité très apparue. Des citrouilles cultivées sur du sable sont exposées à des NPs de Fe_2O_3 (20 nm), les résultats montrent une accumulation faible de NPs dans les plantules mais significative.

4/ INTERET DU MODELE BIOLOGIQUE ET BUT DU TRAVAIL

4.1/ choix et intérêt

Pour évaluer les effets toxicologiques causés par un xénobiotique, il est nécessaire de disposer de modèle biologique représentatif du milieu étudié. Au sens écologique général, un bioindicateur peut être défini comme un organisme ou un groupe d'organismes pertinents pour déterminer qualitativement et quantitativement l'état de l'environnement (Fränzle, 2006).

Plus récemment on s'est intéressé en milieu terrestre à la faune du sol et notamment aux escargots (mollusques, Gastéropodes, Pulmonés), il sont reconnus comme les indicateurs écologiques pertinents (Berger et Dallinger 1993; Cortet et *al.*, 1999), car :

- Ils représentent une bio masse significative au sein de la communauté des invertébrées des sols (Dallinger et *al.*, 2001).
- Ils occupent une situation privilégiée à l'interface sol-plante-atmosphère, et ils intègrent des sources et voies de contaminations multiples (Barker, 2001).

Ils possèdent des capacités de bioaccumulation importantes pour de nombreux polluants métalliques (Viard et *al.*, 2004), et organiques (Sverdrup et *al.*, 2006). Ils présentent des réponses physiologiques (inhibition de croissance et de reproduction, mortalité) (Martje, 2005) et biochimiques (Regoli et *al.*, 2006) quand ils sont exposés aux contaminants.

- Ils constituent un élément de réseaux trophique qui contribue au transfert des polluants du sol et /ou des plants aux prédateurs (Beeby, 1985; Laskowski et Hopkin, 1996; Scheifler et *al.*, 2002).
- Le choix préférentiel de cette espèce est principalement lié à sa distribution mondiale, traduisant ses capacités d'adaptation à des biotopes des sols et des climats variés et à sa facilité d'élevage (Gomot et Deray, 1987).

Les stades juvéniles et adultes d'*H. aspersa* sont utilisés dans de nombreuses études écotoxicologiques. En effet, de par leur place au sein de l'écosystème terrestre, les escargots sont capables d'intégrer des sources multiples de contamination (sol, atmosphère, végétaux) par diverses voies : digestive, respiratoire et/ou cutanée. Les capacités de résistance et d'accumulation des métaux ont été démontrées chez ces escargots (Scheifler et *al.*, 2002a,b). Les petit-gris sont des bioindicateurs d'exposition et d'effets de polluants métalliques (Gomot, 1997; Coeurdassier et *al.*, 2000, 2002a ; Scheifler et *al.*, 2002a,b ; Fritsch et *al.*, 2011) ou organiques (Coeurdassier et *al.*, 2002b, 2011; de Vaufleury et *al.*, 2006; Regoli et *al.*, 2006). Un bioessai évaluant les effets des substances chimiques et des matrices contaminées sur la survie et la croissance d'*H. aspersa* juvéniles a été standardisé (ISO 15952:2006). *H. aspersa* a également permis de suivre les transferts des divers polluants (organiques, métalliques, radionucléides) dans des chaînes trophiques (Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2000; Scheifler et *al.*, 2002b, 2003, 2006; Scheifler, 2002; Hispard et *al.*, 2008b), ou encore d'évaluer les cinétiques de transfert milieu escargot (Gimbert et *al.*, 2006, 2008).

Le stade embryonnaire est aussi utilisé dans des études écotoxicologiques, des bioessais évaluant les effets des métaux et des pesticides sur les embryons (œufs) d'*H. aspersa* sont réalisés dans les études de Druart et *al.*, (2010, 2012) et de Baurand, (2015).

4.2/ Définition des objectifs

L'objectif général de cette étude est d'évaluer la toxicité des NPs d'oxyde de fer en utilisant un modèle bio-inducteur de pollution par les métaux, le gastéropode terrestre l'escargot petit gris : *Helix aspersa*. Les oxydes de fer constituent des minerais à haute teneur en fer, c'est l'élément métallique le plus abondant dans la croûte terrestre. Annaba constitue une ville très polluée par les particules ultrafines d'oxydes métalliques et en particulier par les oxydes de fer, vue l'implantation du complexe sidérurgique « ARCELOR MITTAL » d'El Hadjar le plus grand producteur d'acier en Algérie avec 300 milles tonnes par ans malgré la chute de production (1 million de tonnes au départ), il est connue par ses fortes émissions de métaux lourds notamment le fer. C'est parmi les sources qui sont à l'origine des diffusions de matières polluantes (poussières métalliques, aérosols de taille très petite « nano ») variées affectant l'ensemble des écosystèmes de cette région, pouvant parcourir des centaines de kilomètres à partir de leur sources avant de se déposer (Grara, 2011, Belhaouchet, 2012, Zaafour, 2014). Pour y répondre, ce manuscrit est organisé en cinq grandes parties :

- ➔ La première partie synthétise les connaissances sur les nanomatériaux, la nanotoxicologie et la nanoécotoxicologie, l'oxyde de fer nanométrique qui fait l'objet de ce travail, ainsi que les critères de choix du modèle biologique utilisé en évaluation du risque. Elle définit également les objectifs.
- ➔ La deuxième partie inclut l'embryotoxicité, application des NPs sur les œufs d'*H. aspersa* avec un suivi des effets jusqu'au stade juvénile.
- ➔ La troisième partie comprend l'étude morphologique, elle est consacrée à l'examen des aspects comportementaux et morphométriques des adultes d'*H. aspersa*.
- ➔ La quatrième partie est consacrée à l'étude biochimique et enzymatique de l'hépatopancréas des adultes d'*H. aspersa*.
- ➔ La cinquième et la dernière partie est destinée à l'exploration histopathologique de l'hépatopancréas du rein et le tractus génital des adultes d'*H. aspersa*.

PARTIE II :

Etude

experimentale

experimentale

Chapitre 1 : Embryotoxicité des NPs Fe₂O₃

1/ OBJECTIF DU TRAVAIL

Actuellement, il n'existe pas de bioessai disponible pour évaluer l'embryotoxicité des substances chimiques sur les invertébrés du sol. C'est pourquoi nous présentons un nouveau test d'embryotoxicité avec les œufs d'escargots, qui constituent un matériel biologique adapté : ils incubent dans le sol et peuvent être exposés aux contaminants contenus dans les lixiviats ou la solution du sol. Les effets de trois concentrations (les solutions sont préparées dans de l'eau distillée) des nanoparticules d'oxyde de fer nanométrique ont été étudiés (1,25, 1,5 et 2 mg/ml).

2/ MATERIEL ET METHODES

2.1/Matériel

2.1.1/ Matériel chimique

L'oxyde de fer nanométrique nous a été élaboré au laboratoire LMS2 de physique par le Professeur DJEKOUN Abdelmalik, il est de taille de 26nm. L'élaboration des nanoparticules de α -Fe₂O₃ a été effectuée par broyage mécanique à haute énergie, à partir de la poudre élémentaire de l'hématite (Fig 13a). Le broyage a été réalisé dans un broyeur planétaire à de type Fritsch (P7), en utilisant deux jarres en acier, celui-ci se compose de : une jarre en acier inoxydable de volume 45 ml et des du même type d'acier (Fig. 13b). La préparation de la charge (billes + poudres) a été effectuée dans une boîte à gants sous atmosphère d'argon. Le rapport massique billes/poudres est de 1/20 environ et la vitesse de broyage est de l'ordre de 500 tr/mn. Pour minimiser les effets relatifs à l'augmentation de la température à l'intérieur des jarres, le broyage a été fait avec des séquences d'une demi-heure suivie de 15mn de pause et cela pendant 3h.

Le broyeur planétaire P7 est un broyeur constitué d'un plateau animé d'un mouvement de rotation sur lequel on dispose deux jarres qui tourne autour de son axe dans le sens opposé au mouvement du plateau. Les forces centrifuges résultantes de ces mouvements agissent sur le contenu de la jarre en produisant des effets à très haute énergie de chocs, de frottements des billes sur les parois des jarres. Ce procédé particulièrement efficace permet ainsi d'obtenir des poudres nanostructurées métastables. En effet, l'énergie d'impact des billes lors du broyage dépend des paramètres d'opérations, spécialement de la vitesse de rotation des jarres et du plateau. Il faut noter que parmi ces paramètres, la vitesse du disque exerce la plus significative influence sur la force radiale qui accentue la déformation. La taille moyenne des cristallites est calculée à partir de la largeur à mi-hauteur des pics de diffraction DRX, en utilisant la formule de Scherrer.

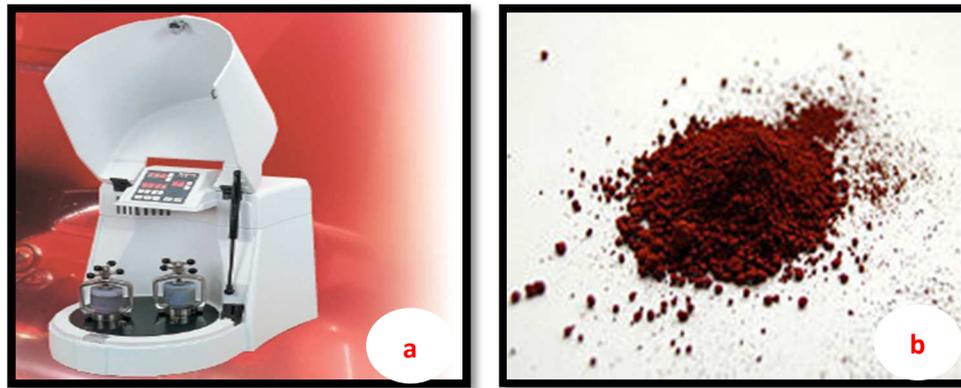


Figure 13 : Synthèse d'oxyde de fer nanométrique :

(a) broyeur planétaire (b) poudre des NPs de Fe₂O₃.

2.1.2/ Matériel biologique

Helix aspersa ou le petit gris, est un escargot appartient à l'embranchement des Mollusques, animaux à corps mou dépourvu de squelette, sa masse viscérale présente une torsion de 180° par rapport au pied d'où une asymétrie de certain de ses organes (Bonnet et Vrillo, 1990).

C'est un gastropode, pulmoné terrestre, aussi nommé *Cantareus aspersus*, *Cornu aspersum*, *Criptomphalus aspersus* dans la nomenclature récente (Barker, 2001) ou le petit gris. Selon Bonnet & Vrillon (1990) sa position systématique est citée dans la figure 14 ci-dessous.

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

Figure 14 : Classification de *Helix aspersa*.

La coquille de cette espèce est un squelette externe secrétée par la face dorsale et le bord libre du manteau, elle est globulaire, spirale, a un enroulement dextre, son ouverture est évasée, descendante; son bord externe est appelé : péristome (Chevalier, 1982). Des sols pauvres en calcium peuvent constituer un facteur limitant à la croissance des escargots, le calcium étant un élément indispensable à la formation de la coquille (Dallinger *et al.*, 2001).

Le corps de l'escargot est mou, visqueux en raison de la présence du mucus. Il est constitué de trois parties : la tête, le pied et la masse viscérale (Fig. 15) (Bonnet et Vrillo, 1990).

- Sa tête comporte la bouche qui s'ouvre vers le bas et les organes des sens constitués de deux paires de tentacules. Les tentacules inférieures, tactiles, sont dirigés vers le bas, les tentacules supérieures, oculaires, portant un œil simple et un organe olfactif, qui sont dirigés vers le haut (Bonnet et Vrillo, 1990).
- Le pied est musculueux, large et plat, il supporte une coquille calcaire formée d'une seule pièce en forme de spirale. Sa face inférieure, en contact avec le sol, forme une sole de reptation, lorsque l'escargot se déplace, elle laisse une trace brillante formée de mucus (Cadart, 1955). La masse viscérale dont la plus grande partie est enfermée dans la coquille (Chevalier, 1982), contenant presque tous les organes; elle est richement vascularisée.
- Les viscères correspondent aux organes situés à l'intérieur de la coquille et comprennent le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge également dans le pied. Ce dernier comporte essentiellement la sole pédieuse, musculueuse, la partie antérieure du tube digestif et le système nerveux.

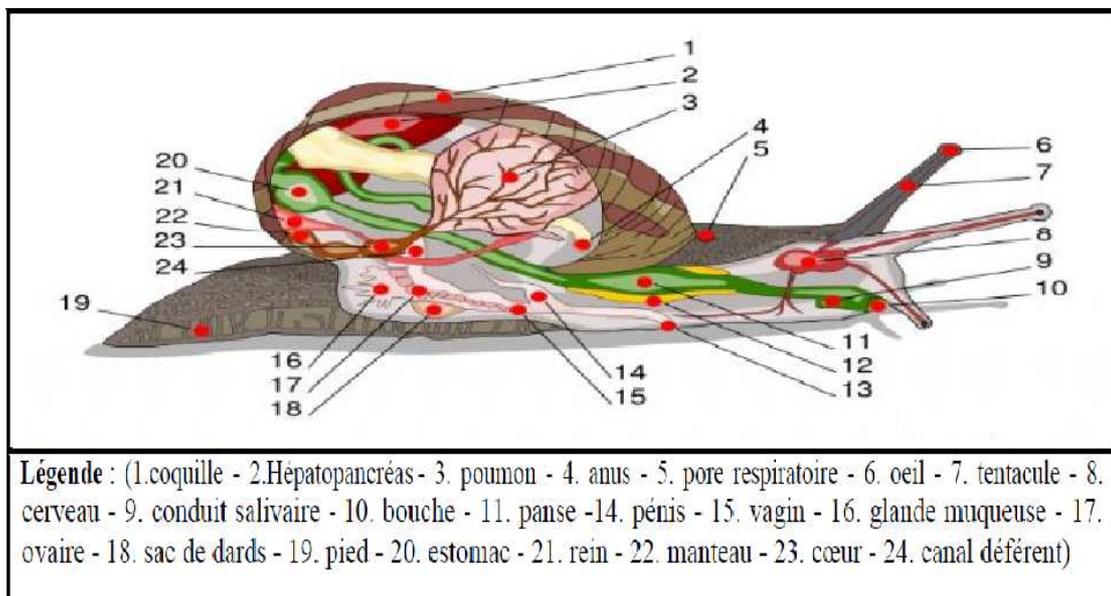


Figure 15 : Anatomie d'un escargot (www.naturae-scientia.com)

On le retrouve dans les dunes, les bois, les rochers, les haies mais également dans les zones cultivées (Kerney et *al.*, 2006). Il se nourrit principalement de plantes, de lichens et de champignons. Son régime alimentaire n'est pas spécialisé et l'escargot s'adapte en fonction des plantes qui colonisent le milieu (Chevalier *et al.*, 2001). Le sol fait également partie de son alimentation et peut influencer sa croissance (Gomot *et al.*, 1989).

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

Une absence prolongée d'humidité provoque l'estivation de *Helix aspersa* (Chevallier, 1992). L'animal se fixe alors sur un support en fermant l'ouverture de sa coquille par un voile de mucus solidifié : l'épiphragme. Il reprend son activité lorsque les conditions environnementales sont plus favorables. Lorsque la température moyenne devient inférieure à 15° C, les escargots se mettent en hibernation en se "collant" sur un support ou en s'enfouissant dans le sol ou la litière et secrètent un épiphragme d'hiver. Dans une atmosphère humide, le processus d'hibernation s'effectue en-dessous de 5° C. Le raccourcissement de la durée de jour semble avoir également une action sur la mise en hibernation (Bailey, 1981).

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

- Phase infantile « jeunes éclos » durant laquelle le tractus génital est non-différencié chez des animaux de 0,02 à 0,6 g.
- Phase juvénile relative à un tractus génital qui s'organise et à une gamétogenèse active. La masse est comprise entre 0,6 et 6,0 g.
- Phase de maturation sexuelle ou phase subadulte durant laquelle les glandes annexes femelles se développent. Elle concerne des escargots non bordés (absence d'épaississement du péristome) de plus de 6 g.
- La phase adulte à croissance nulle durant laquelle les animaux sont aptes à se reproduire. Ils sont alors bordés et pèsent entre 6 et 14 g.

En général, la croissance naturelle jusqu'au stade adulte s'étale sur deux ans si bien que les individus sont le plus souvent considérés comme sexuellement matures à partir du deuxième ou troisième été suivant leur naissance (Chevallier, 1992). Cette croissance se fait par pallier, au rythme des estivations et hibernations. Les facteurs qui influencent la croissance sont la température, l'humidité ambiante, l'éclairement (longueur d'onde, intensité et photopériode) ainsi que la nature du sol et de la nourriture (Gomot, 1997). La durée de vie moyenne d'un escargot en milieu naturel est de 6 à 7 ans (Gomot and Gomot, 1995).

Les escargots terrestres sont hermaphrodites protandres (d'abord mâles puis femelles) et s'accouplent une ou plusieurs fois avant la ponte (Bride et Gomot, 1991). A partir du mois d'octobre en Europe, l'escargot hiberne en s'enfouissant dans le sol. Sa coquille est alors obturée par un épiphragme épais. Il reprend généralement son activité au printemps quand les températures avoisinent les 12-14°C (Marasco et Murciano 2003; Kerney *et al.*, 2006). La reproduction des escargots a lieu au printemps et en été (début du mois de mai et dure jusqu'à la mi-septembre). L'accouplement implique une fécondation réciproque par échange de spermatophores entre les deux partenaires.

La durée entre l'accouplement et la ponte varie en fonction des conditions du milieu. En conditions optimales, elle est d'une dizaine de jours mais ce délai peut atteindre un voire deux mois suivant les conditions d'environnement (Chevallier, 1982). Pour pondre, l'escargot creuse une cavité de quelques centimètres de profondeur dans le sol, y dépose ses œufs puis rebouche le "nid de ponte".

La fécondation a lieu au niveau de la chambre de fertilisation, à la surface de la glande à albumen. 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 (Fig. 16). La ponte peut durer jusqu'à 36 heures.

Les œufs vont ensuite se développer pendant 12 à 15 jours avant d'éclore. Les escargots éclos remontent ensuite en surface, ce qui peut encore prendre 4 à 5 jours. Les jeunes éclos pèsent alors environ 25 à 35 mg (Baurand, 2015).



Figure 16 : Reproduction chez l'escargot *Helix aspersa* :

(a) Accouplement (b) Grappe des œufs.

La croissance de l'escargot correspond à une prise de poids pouvant atteindre jusqu'à 14 g en conditions contrôlées favorables (photopériode 18 h de lumière par 24 h, 20°C et 80-90% d'humidité) et à un accroissement de la coquille en longueur, mais également en épaisseur (Gomot de Vaufleury, 2001).

2.2/ Méthodes

2.2.1/ Elevage et application du traitement

Un élevage a été mis en place suivant les recommandations de Gomot-DeVaufleury (2000) dans des conditions contrôlées de température (20 + 2°C) et de lumière (photopériode de 16h). Une éponge mouillée est placée dans les boîtes afin d'assurer l'humidité nécessaire, et dans ces même boîtes nous avons placé des petites boîtes en plastique remplies de terreau pour que les escargots après accouplement puissent pondre leurs œufs à l'intérieur du terreau (Fig. 17). Les accouplements sont réalisés dans les conditions ainsi définies. Les pontes obtenues sont identifiées.



Figure 17 : Mode d'élevage.

2.2.2/ Pendant la phase embryonnaire

Dès le 1^{er} jour de la ponte nous les avons partagé dans 4 lots, chacun constitué de 16 œufs dont :

- 1 lot témoin dont le papier n'est imbibé qu'avec de l'eau distillé « ED » (Fig.18a).
- 3 lots traités (lot C1, lot C2 et lot C3) par trois concentrations différentes respectivement 1.25 mg/ml, 1,5 mg/ml, et 2 mg/ml (Fig. 18b-d). Le tableau 03 résume la distribution des lots.

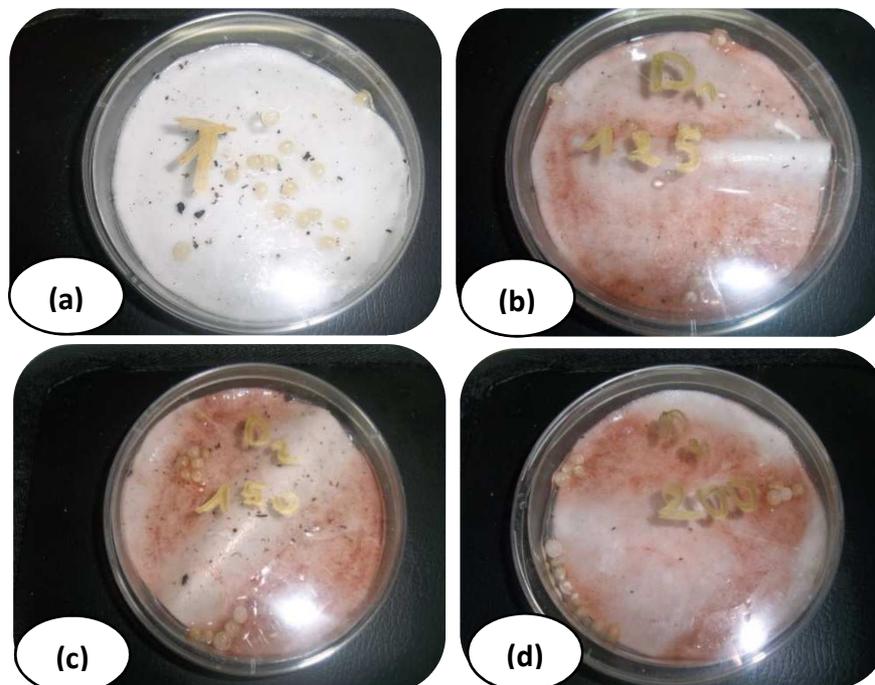
Tableau 03 : Distribution des groupes selon les doses d'oxyde de fer nanométrique.

Lot	Concentration des NPs de Fe ₂ O ₃
T	Non traité : témoin
C1	Escargots traités avec 1.25mg/ml ED
C2	Escargots traités avec 1.5 mg/ml ED
C3	Escargots traités avec 2 mg/ml ED

T : témoin, C1 : lot traité avec 1.25mg/ml, C2 : lot traité avec 1.5mg/ml, C3 : lot traité avec 2mg/ml

Des boîtes de Pétri ont été préparées pour l'incubation des œufs comme suit : on met dans chaque boîte trois couches de papier absorbant (Whatman; 10 cm de diamètre) et on les imprègne par des solutions sus citées, les tubes sont bien agités pour obtenir des solutions homogènes surtout avant utilisation.

La ponte a été partagée en 4 lots, 16 œufs ont été placés dans chaque boîte et on les incube dans des conditions favorables pour l'éclosion.

**Figure 18 : Mode d'incubation des œufs de la ponte avant éclosion :**

(a) témoin, (b) traités avec [1,25 mg/ml] NPs de Fe₂O₃, (c) traités avec [1,5 mg/ml] NPs de Fe₂O₃, (d) traités avec [2 mg/ml] NPs de Fe₂O₃.

Comme les œufs sont opaques, les observations sont beaucoup plus sur la forme, la taille des œufs et la couleur de la coque. Les NPs testés ont une couleur vive (rouge raille), et leur accumulation est facilement observée. Les embryons ont été observés avec une loupe binoculaire, nous avons utilisé un appareil photo pour prendre des photographies en même temps. Les photos ont été prises : le 5^{ème}, 8^{ème}, 10^{ème}, 12^{ème} et 14^{ème} jour d'incubation, et nous avons réalisé le comptage d'éclosion le 12^{ème} et le 14^{ème} jour.

Après l'éclosion (14^{ème} jour) les œufs non éclos ont été retirés des lots pour éviter leur décomposition, nous avons ensuite maintenu les éclos dans les mêmes boîtes et nous avons commencé à alimenter les naissains pendant 28 jours. Le comptage de taux de mortalité est effectué chaque 10 jours c'est-à-dire le 8^{ème}, le 18^{ème} et le 28^{ème} jour.

2.2.3/ Pendant la phase juvénile

Juste après les 28 jours qui suivent l'éclosion, les naissains sont devenus des Juvéniles, ils sont transférés dans des nouvelles boîtes d'élevage en respectant le groupe initial (Fig. 19).



Figure 19 : Transfert des juvéniles vers des boîtes en plastique.

Chaque escargot a été pesé individuellement (Fig. 20a) et le diamètre de sa coquille a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (Fig. 20b).

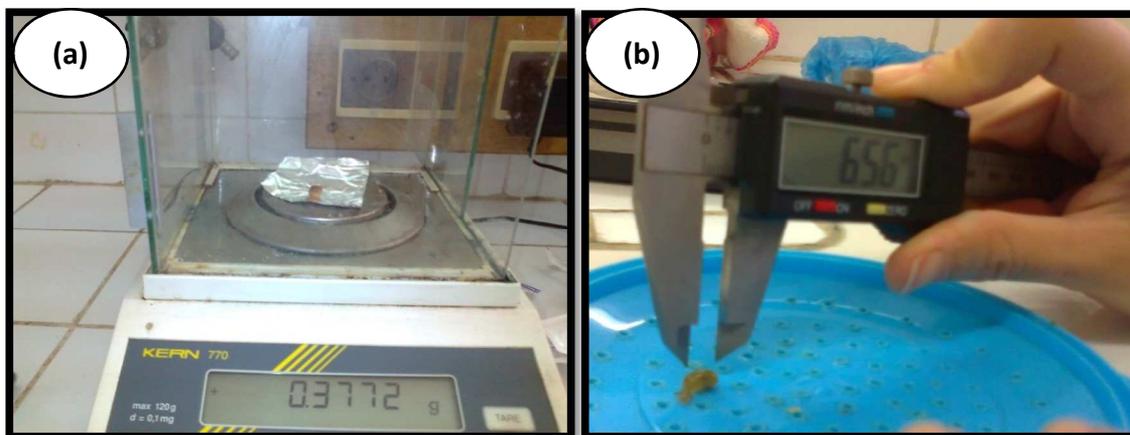


Figure 20 : Suivi des paramètres morphométriques :

(a) suivi du poids (b) suivi de la taille coquillère.

2.2.4/ Analyse statistique

Les données relatives au poids et à la taille sont exprimées en moyennes \pm standard erreur. L'analyse de la variance à un critère de classification et le test de Tukey au seuil de $p = 0,05$ ont été appliqués. Pour toutes les séries de données, l'égalité des variances a été contrôlée par les tests de Bartlett (Dagnelie, 1999). La normalité des données a été vérifiée par l'application des tests d'Anderson–Darling et de Kolmogorov-Smirnov (Dagnelie, 1999). Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel d'analyse et de traitement statistique des données MINITAB version 16.0

3/ RESULTATS

3.1/ Pendant la phase embryonnaire

3.1.1/ Suivi des œufs

Les observations des changements ont été effectués à l'aide d'un binoculaire de la marque (Leitz Wetzlar Germany), des œufs ont été choisis aléatoirement à partir de chaque groupe par des prises de photographies en même temps à l'aide d'un appareil photo numérique de la marque (Samsung HD ES90).

Nous avons observé quelques modifications à partir du 5^{ème} jour, et à cet effet, nous avons pris des photos le 5^{ème} jour (Fig. 21), le 8^{ème} (Fig. 22), le 10^{ème} (Fig. 23) ainsi qu'au 12^{ème} (Fig. 24) et au 14^{ème} jour (Fig. 25) (2 jours de prolongation pour l'éclosion).

Au 5^{ème} jour d'incubation : On observe pour le témoin un œuf blanc et brillant avec une forme régulière, des déformations de la membrane et des traces de la molécule ont été observés pour les lots traités d'une manière plus remarquable pour la dose la plus élevée.

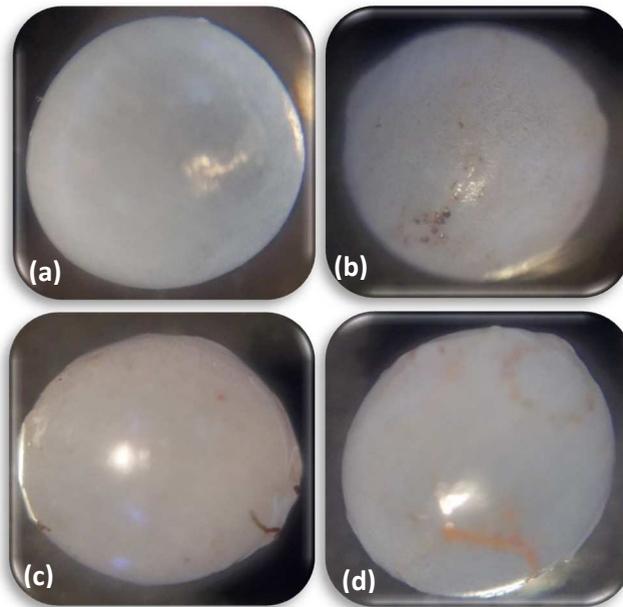


Figure 21 : Aspects des œufs au 5^{ème} jour :

(a) œuf du lot témoin (b) œuf du lot traité par [1.25] mg/ml des NPs Fe₂O₃, (c) œuf du lot traité par [1.5 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (d) œuf du lot traité par [2 mg/ml] des NPs Fe₂O₃.

Au 8^{ème} jour d'incubation : Nous n'avons rien remarqué pour le témoin, des gonflements chez les membranes des œufs des lots traités avec accumulation du Fe₂O₃ NPs sous une couleur rouille ont été observés

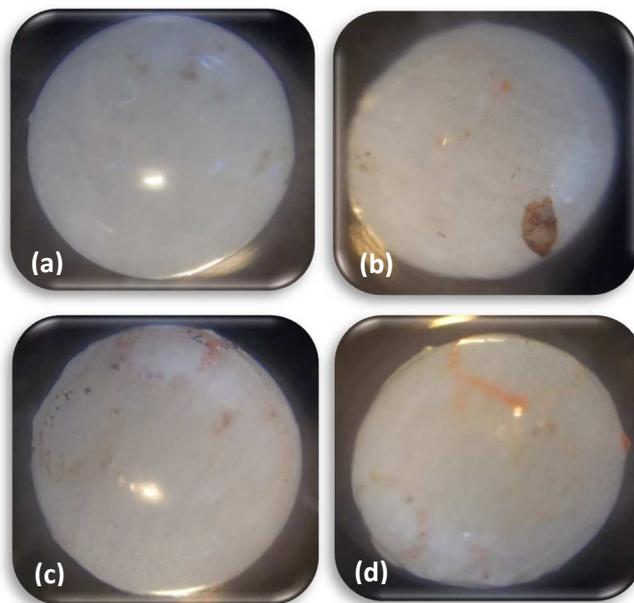


Figure 22 : Aspects des œufs au 8^{ème} jour :

(a) œuf du lot témoin (b) œuf du lot traité par [1.25 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (c) œuf du lot traité par [1.5 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (d) œuf du lot traité par [2 mg/ml] des NPs Fe₂O₃.

Au 10^{ème} jour d'incubation : Les mêmes observations ont été vus dans le 08^{ème} jour, mais d'une façon plus remarquable.

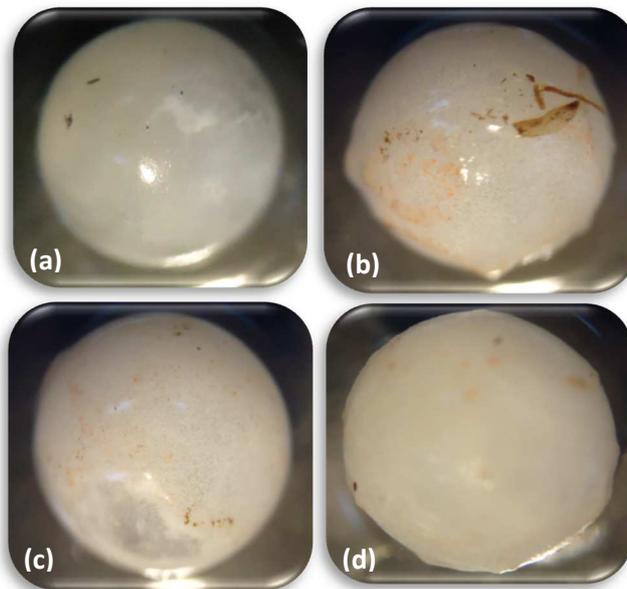


Figure 23 : Aspects des œufs au 10^{ème} jour :

(a) œuf du lot témoin (b) œuf du lot traité par [1.25 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (c) œuf du lot traité par [1.5 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (d) œuf du lot traité par [2 mg/ml] des NPs Fe₂O₃.

Au 12^{ème} jour d'incubation : les observations au 12^{ème} jour révèlent une coquille transparente pour l'escargot jeune éclos du lot témoin, elle est d'une couleur rouille pour les jeunes éclos des lots traités et concentrée surtout en arrière. Les œufs non éclos des lots traités ont une membrane déformée.

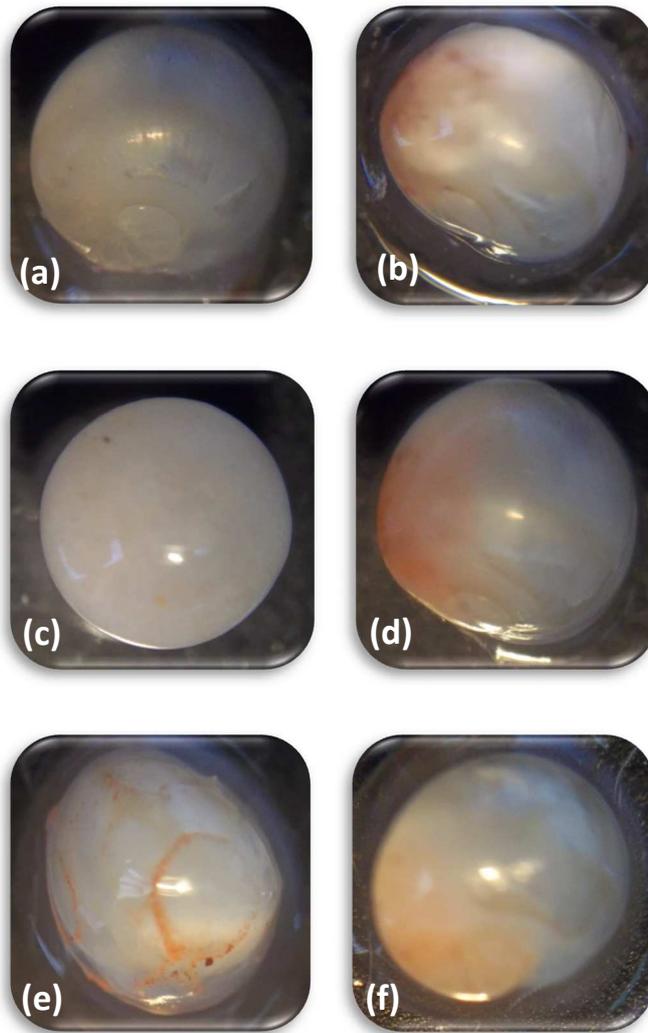


Figure 24 : Aspects des œufs au 12^{ème} jour :

(a) escargot du lot témoin (b) escargot du lot traité par [1.25 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (c) œuf du lot traité par [1.5 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (d) escargot du lot traité par [1.5 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (e) œuf du lot traité par [2 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (f) escargot du lot traité par [2 mg/ml] des NPs Fe₂O₃.

Au 14^{ème} jour d'incubation : à cette date, on assiste à l'apparition des yeux chez les jeunes éclos du lot témoin avec une coquille transparente, l'accumulation des NPs Fe₂O₃ en arrière de la coquille pour les jeunes des trois lots traités. Un albinos est observé dans le groupe traité par la dose 3 mg/g des NPs de Fe₂O₃ (Fig. 26).

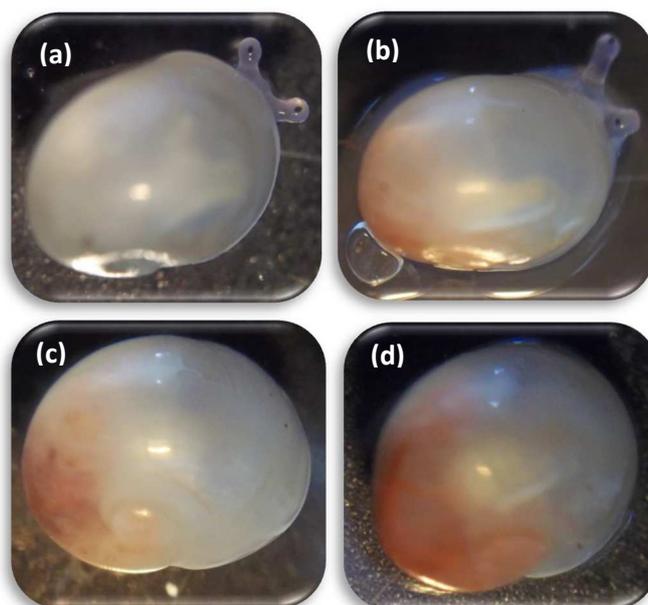


Figure 25 : Aspects des œufs au 14^{ème} jour :

(a) escargot du lot témoin (b) escargot du lot traité par [1.25 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (c) escargot du lot traité par [1.5 mg/ml] des NPs Fe₂O₃, (d) escargot du lot traité par [2 mg/ml] des NPs Fe₂O₃.

3.1.2/ Comptage d'éclosion

Le tableau 04 ci-dessous résume le comptage effectué pour chaque lot le 12^{ème} et le 14^{ème} jour de la ponte.

Tableau 04 : Nombre d'œufs éclos dans le 12^{ème} et le 14^{ème} jour après exposition aux différentes concentrations des NPs Fe₂O₃.

	T	C1	C2	C3
12^{ème} jour				
Eclos	16	14	12	11
Non éclos	00	02	02	05
Décomposés	00	00	02	00
14^{ème} jour				
Eclos	16	15	13	14
Non éclos	00	00	00	02
Décomposés	00	01	03	00

3.1.3/ Mortalité

Les résultats obtenus lors du comptage de mortalité sont résumés dans le tableau 05 ci-dessous.

Tableau 05 : Pourcentage de mortalité pendant les 28 jours qui suivent l'éclosion après exposition aux différentes concentrations des NPs Fe₂O₃.

	T	C1	C2	C3	Total
08^{ème} jour	0%	20%	7.69%	0%	6.89%
18^{ème} jour	0%	8.33%	0%	7.14%	3.70%
28^{ème} jour	0%	9.09%	0%	7.69%	3.84%
Total	0%	33.33%	7.69%	14.28%	13.79%

3.2/ Pendant la phase juvénile

3.2.1/ Poids frais

Le tableau 06 illustre les moyennes du poids frais des juvéniles pendant 04 semaines.

On observe une diminution du poids dose dépendant, l'analyse statistique révèle des différences très hautement significatives ($p= 0.001$), les résultats montrent une augmentation par rapport au temps et elle est statistiquement très hautement significative ($p=0.000$), cependant lorsqu'on s'intéresse à la corrélation entre les deux critères (dose et temps) les différences sont statistiquement non significatives ($p= 0.835$).

3.2.2/ Taille coquillère

Le tableau 07 illustre les moyennes du taille de la coquille des juvéniles pendant 04 semaines.

On observe une diminution de la taille coquillère dose dépendant, l'analyse statistique révèle des différences significatives ($p= 0.011$), les résultats montrent une augmentation par rapport au temps et elle est statistiquement très hautement significative ($p=0.000$), toutefois lorsqu'on compare par rapport à la corrélation entre les deux critères (dose et temps) les différences sont statistiquement non significatives ($p= 0.810$).

Tableau 06 : Résultats du suivi du poids des juvéniles après exposition aux différentes concentrations des NPs Fe₂O₃.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
T	0,0478 ±0,0069	0,0608 ±0,0114	0,0752 ±0,0145	0,1511 ±0,2039	0,1875 ±0,0670	0,2362 ±0,0618	0,2729 ±0,0596	0,2729 ±0,0474
C1	0,0477 ±0,0099 NS	0,0595 ±0,0151 NS	0,0686 ±0,0213 NS	0,0955 ±0,0211 NS	0,1267 ±0,0095 *	0,1939 ±0,0085 *	0,2239 ±0,0187 **	0,2239 ±0,0681 NS
C2	0,0424 ±0,0089 NS	0,0561 ±0,0118 NS	0,0696 ±0,0152 NS	0,0944 ±0,0163 NS	0,1822 ±0,0212 NS	0,2275 ±0,0198 NS	0,2251 ±0,0532 NS	0,2251 ±0,0834 NS
C3	0,0416 ±0,0112 NS	0,0504 ±0,0160 NS	0,0620 ±0,0159 *	0,0851 ±0,0160 NS	0,1753 ±0,0369 NS	0,2170 ±0,0246 NS	0,2414 ±0,0475 NS	0,2414 ±0,0794 NS

Tableau 07 : Résultats du suivi de la taille coquillère des juvéniles après exposition aux différentes concentrations des NPs Fe₂O₃.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
T	5,403 ±0,339	5,865 ±0,293	6,134 ±0,549	6,734 ±0,566	7,331 ±0,649	7,762 ±0,517	7,9 ±0,571	8,106 ±0,658
C1	5,4 ±0,349 NS	5,85 ±0,567 NS	6,155 ±1,093 NS	6,777 ±0,552 NS	7,15 ±0,844 NS	7,801 ±0,801 NS	7,894 ±0,935 NS	8,088 ±0,544 NS
C2	5,366 ±0,362 NS	5,812 ±0,436 NS	5,98 ±0,603 NS	6,417 ±0,831 NS	7,061 ±0,612 NS	7,533 ±0,662 NS	7,677 ±0,449 NS	7,321 ±0,974 *
C3	5,3 ±0,660 NS	5,754 ±0,741 NS	6,25 ±0,648 NS	6,56 ±0,740 NS	7,15 ±0,671 NS	7,355 ±1,328 NS	7,844 ±1,135 NS	7,127 ±0,862 **



Figure 26 : Aspect d'un juvénile malformé, albinos traité avec la plus forte concentration (2mg/ml).

4/ DISCUSSION

Peu de travaux ont été trouvés sur les effets toxicologiques des NPs Fe₂O₃ par rapport aux oxydes métalliques micrométriques et même par rapport aux NPs des oxydes métalliques comme TiO₂ et ZnO et c'est ce qui nous a laissé prudent quant à l'explication de nos résultats.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés de la toxicité des nano Fe₂O₃ sur l'avancement du développement de *H. aspersa* (de la ponte jusqu'à l'éclosion), se basant sur l'étude de Gimbert qui a montré que, souvent de nature métallique les xénobiotiques qui pénètrent sans difficulté à l'intérieur de la cellule peuvent s'accumuler et générer des processus cytotoxiques. Les bio essais d'embryotoxicité prouvent l'avantage de ce stade précoce du cycle de vie, comme le montre Druart *et al.*, (2010, 2012).

Les études de Lacoue-Labarthe *et al.*, (2008; 2009; 2010) sur la bioaccumulation d'une dizaine de métaux dans les œufs de seiche montrent que, selon le métal et selon le moment auquel les œufs

sont exposés, les métaux franchissent ou non la coque de l'œuf. Ces auteurs montrent que, durant les premiers stades embryonnaires, les métaux sont liés à la coque et ne sont pas en contact avec l'embryon. Puis, après l'organogénèse, la coque devient perméable et les métaux peuvent exercer leur toxicité sur l'embryon. D'autres auteurs estiment également que la coque de l'œuf ou l'albumen forment un rempart à l'embryon contre la toxicité des contaminants (Howe *et al.*, 2004; Oliveira-Filho *et al.*, 2005), démontrant ainsi que les stades embryonnaires sont moins sensibles que les stades larvaires de l'organisme (Perkins *et al.*, 2000; Geffard *et al.*, 2002; Howe *et al.*, 2004; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009). Cependant, Druart (2011) a démontré qu'à 7 jours du développement embryonnaire (soit le tout début du stade larvaire), le Cd avait déjà franchi la barrière protectrice de l'œuf pouvant ainsi atteindre l'embryon et exercer sa toxicité. De manière générale et particulièrement chez certaines espèces aquatiques (escargots, poissons), les stades précoces (larves, embryons) sont plus sensibles que les stades juvéniles ou adultes (Gomot, 1998; Strmac *et al.*, 2002; Hallare *et al.*, 2005; Pietrock *et al.*, 2008).

L'évaluation de la toxicité de la ferrite de cobalt (CoFe₂O₄ d'un diamètre moyen 40 nm) avec des concentrations proches de celles rencontrées dans l'environnement situées entre 10–500 µM sur les embryons de poisson zèbre pendant 96 h montre aussi une agglomération sur les membranes, aussi la dissolution des ions a induit des dommages mécaniques graves aux membranes (Ahmad *et al.*, 2015). Les grands agglomérats de Fe₂O₃ sont plus toxiques pour les membranes lipidiques en raison de la plus grande affinité entre eux, induisant à la fin une cytotoxicité plus grande (Drasler *et al.*, 2014 ; Mahmoudi *et al.*, 2012). L'adhérence des agrégats, la sédimentation, l'intériorisation des NPs et des ions étaient également les principaux facteurs qui contribuent à induire la toxicité du développement dans les embryons de poisson zèbre (Zhu *et al.*, 2012).

Les résultats de Shih *et al.*, 2016 ont montré clairement que les agrégats de TiO₂ pourrait avoir un impact sur l'efficacité d'éclosion des embryons de poisson zèbre traités avec différentes concentrations de ces NPs (10, 20, 60, 120 mg/L) dans un mode d'essai par lots , l'éclosion a été inhibée à la capacité d'adsorption de TiO₂ la plus élevée.

Alors que Yoo *et al.*, (2016) ont exposé des embryons de poisson zèbre à différentes concentrations de NPs d'Ag (30, 60, 120 et 240 nM) à 72 h, le taux d'éclosion n'a pas été significativement différent entre les groupes (témoin: 90%; NPs d'Ag 240 nM: 89%). Le groupe témoin a montré une mortalité 2%, tandis que le groupe traité avec les NPs d'Ag 240nM a montré une augmentation de la mortalité (11%).

Accompagne l'agrégation et la sédimentation des NPs du Fe₂O₃ et les caractéristiques des nanoparticules, l'adhérence/adsorption directe des agrégats des NPs du Fe₂O₃ qui ont pu être

observées sur la surface des embryons (Fig. 13). Cette adhérence/adsorption directe peut causer l'épuisement d'oxygène en échange, ce qui entraîne une hypoxie des embryons exposés; cela a été rapporté pour provoquer un retard d'éclosion et de développement d'embryons, peuvent également provoquer une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) *in vivo*, ce qui induit un stress oxydatif chez les embryons qui peut être essentielle dans l'induction de la toxicité observée dans le développement.

Une autre étude menée par Aerle et *al.*, (2013), les NPs d'argent de 10nm appliquées sur les embryons de poisson zèbre *Danio rerio* à des différentes concentrations (0.031, 0.062, 0.125, 0.250, 0.500, 1, et 5 µg/L) pendant 48h. Des malformations fortement marqués chez l'embryon ont été notées. En utilisant une approche de séquençage de nouvelle génération dans une plate-forme Illumina (High-Throughput SuperSAGE), des altérations significatives de l'expression des gènes ont été trouvés et la plupart des voies de gènes affectés sont en particulier ceux associés à la phosphorylation oxydative et la synthèse protéique. L'auteur a prouvé que cette toxicité est associée à des ions d'argent biodisponibles dans les embryons de poisson zèbre exposés.

Les ions métalliques peuvent entraîner un déséquilibre de l'homéostasie et des réponses cellulaires aberrantes, y compris la cytotoxicité, les dommages d'ADN, le stress oxydatif, les événements épigénétiques, et les processus inflammatoires, ce qui conduirait à terme à la toxicité observée (Singh et *al.*, 2010) .

Une expérience sur une limace *Deroceras reticulatum*, montre que les rapports de la haute sensibilité des œufs aux sels métalliques, est une confirmation des résultats obtenues par Aerle et *al.*, (2013) sur les effets des ions métalliques d'argent (Iglesias et *al.*, 2000). Druart et *al.*, (2010, 2012) ont montré qu'un transfert significatif du Cd à partir du milieu d'exposition aux œufs a été souligné, affectant particulièrement l'albumen. Les anomalies de l'embryogenèse chez les embryons non éclos dépendaient du type de la substance et de la concentration envisagée.

Depuis leur apparition, de nombreux chercheurs ont étudié l'influence des caractéristiques physico-chimiques des nanomatériaux sur leur toxicité. Ainsi, la toxicité peut varier en fonction des agents synthétiques (Brayner et *al.*, 2010), dont le diamètre nominal (Hund-Rinke et *al.*, 2006), la forme (Petit et *al.*, 2010; Peng et *al.*, 2011), et le revêtement (Xu et *al.*, 2010). Selon les nanomatériaux, certains ou tous les effets toxiques peuvent être attribués à la dissolution des nanomatériaux dans l'environnement (Franklin et *al.*, 2007; Aruoja et *al.*, 2009; Miao et *al.*, 2009; Xu et *al.*, 2010; Gong et *al.*, 2011). En outre, certaines études montrent clairement que la forme

nanoparticulaire est plus toxique que la forme ionique ou micrométrique (Aruoja et al., 2009; Miao et al., 2009; Shi et al., 2011).

Le stress oxydatif définit le potentiel des ROS pour endommager les composants cellulaires tels que les membranes biologiques, les protéines, l'ADN et l'ARN (Radwan et al., 2010). L'implication du stress oxydatif a été largement démontré comme le mécanisme responsable de la toxicité des nanomatériaux (George et al., 2011; Xiong et al., 2011). Cet effet est particulièrement bien illustrée dans une étude subaiguë de l'impact de NPs de TiO₂ (100 et 200 mg/L) sur les juvéniles de carpes *Cyprinus carpio* à travers la diminution du taux de Superoxide dismutase, catalase et l'activité peroxidase ainsi que l'augmentation du taux des lipides de peroxydation (Hao et al., 2009).

Ireland et al., (1993) ont montré que le TiO₂ et Al₂O₃ nanométriques sont des NPs de transition redox actives, qui interfèrent avec le métabolisme des protéines par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui entraînent le stress oxydatif et causent des dommages cellulaires. Le contact entre les nanomatériaux et les organismes peut provoquer des effets toxiques directs ou effets indirects (diminution de la nutrition après l'adsorption des NPs par les surfaces d'échange de l'organisme) (Zeyons et al., 2009).

L'impact des NPs sur les organismes aquatiques comme les escargots d'eau douce (Croteau et al., 2011; Musee et al., 2010), sur les larves chironomes (Oberholster et al., 2011 ; Lee et al., 2009), sur les cnidaires (Yeo et Kang, 2010) et sur les polychètes (Galloway et al., 2010) ont également été étudié montrant des effets toxiques à travers une réduction de la nutrition et une augmentation du nombre de malformations, stress oxydatif, lésions de l'ADN en corrélation avec l'augmentation de la mortalité.

La déformation et le gonflement de la membrane des œufs traités avec les différentes concentrations d'oxyde de fer nanométrique est une conséquence de sa pénétration à travers la membrane, ce qui lui permet de s'accumuler dans les cellules. Les nanoparticules sont absorbées par les cellules par le biais de différents mécanismes, tels que l'endocytose (Geiser et al., 2005; Greulich et al., 2011). Selon Marigomez et al., (2002) : le transfert des éléments métalliques à travers les membranes plasmiques des cellules, est principalement effectué par diffusion passive ou par des mécanismes nécessitant de l'énergie, tels que le transport par des protéines membranaire, spécifique ou non, ou par endocytose des molécules. Ils peuvent agglomérer et résider dans le cytoplasme ou atteindre le noyau à travers des pores nucléaires (Asharani et al., 2009a). Il est intéressant aussi de dire, qu'ils peuvent également être déposés dans divers organites

tels que le lysosome, la matrice mitochondriale et le réticulum endoplasmique (Geiser et al., 2005; Asharani et al., 2009b; Yen et al., 2009; Vanwinkle et al., 2009; Greulich et al., 2011). De nombreux rapports ont montré leur existence dans le compartiment endolysosomal (Asharani et al., 2009b).

L'accumulation de la molécule à l'arrière de la coquille n'est pas un hasard, en effet c'est l'emplacement de l'hépatopancréas, d'après Les travaux d'Oberdörster et al., (2005), il a été montré que les nanoparticules pouvaient franchir ces barrières de protection, se distribuer dans l'organisme et s'accumuler dans certains organes, principalement lors des expositions respiratoires ou digestives.

Les glandes digestives sont les organes de gastéropodes les plus importantes, impliquées dans la détoxification des polluants (Ismert et al., 2002). Les modifications histologiques et histochimiques sont censés être des biomarqueurs utiles de l'exposition aux NPs des oxydes métalliques (Besnaci et al., 2016). Ainsi, chez *Helix pomatia*, après l'exposition au Cd (Berger et al., 1995), 85% à 95% de ces ETM ont été trouvées dans l'hépatopancréas (Dallinger et al., 1993). Boucenna et al., (2015) a rencontré des dégâts au niveau des cellules hépato pancréatiques qui sont dues à l'accumulation des métaux lourds à ce niveau. Une étude récente a démontré que l'exposition *in vitro* d'oxydes métalliques de fer sur *H.aspersa* induit des altérations hépatopancréatiques expliquées par l'inhibition des activités des nucléotidases dans l'hépatopancréas (Qiao et al., 2009). Manzl et al., (2004) a également observé la toxicité aiguë des oxydes métalliques dans les cellules hépato pancréatiques de *Helix pomatia*.

En plus du retard d'éclosion et de la diminution de nombre des œufs éclos dans les groupes traités, des malformations et des déformations morphologiques ont été noté notamment dans le groupe traité avec la forte concentration (Fig. 29). Hu et al., (2011) après évaluation de la toxicité des NPs chitosane biodégradable utilisant les embryon de poisson zèbre comme modèle, note que le taux de malformation augmente avec l'augmentation de la concentration des NPs.

Dans une étude *in vivo*, la mortalité, la malformation, la fréquence cardiaque et de toute mort cellulaire dans l'embryon ont été mesurées dans des embryons de poisson zèbre exposés à des NPs de silice (25, 50, 100 and 200 mg/mL) pendant 96h. Les résultats ont montré que les nanoparticules de silice induisent des malformations de manière dose dépendante avec des perturbations très graves dans le système cardiovasculaire (Duan et al., 2013).

Le pourcentage de mortalité observé dans notre bioessai, confirme l'hypothèse de Druart (2011) qui dit que le système de détoxification et/ou d'élimination restait important lors d'une exposition

par voie digestive. Ainsi, Scott-Fordsmand et Krogh (2004) ont déterminé une EC10 de 55 mg/kg chez *Folsomia fimetaria* après 21 jours d'exposition tandis que Widarto et al., (2007) ont constaté une mortalité de l'ensemble des organismes chez *F. candida* à partir de 40 mg/kg de NPs. Ces mêmes auteurs ont montré qu'il n'y avait pas d'effet sur la survie et que la croissance des vers de terre affectée uniquement jusqu'à la moitié de la durée de l'exposition (qui dure au total 196 jours), suggérant une sensibilité plus grande des juvéniles par rapport aux adultes (Widarto et al., 2004) (voir partie 03 effets sur les adultes).

Nos résultats montrent une légère perturbation du poids des juvéniles de *Helix aspersa* traitées par les différentes concentrations des NPs de Fe₂O₃ en fonction du temps et par rapport aux témoins. Les travaux de Grara et al., (2015) aussi ont révélé des perturbations exprimées par une diminution de la masse corporelle chez les animaux traités par des différentes concentrations de ZnO nanométrique, l'auteur a expliqué cette perte de poids par la diminution de la consommation alimentaire que nous avons constatée particulièrement chez les animaux traités aux différentes concentrations. Ce résultat est en accord avec les travaux de Laskowski et Hopkin (2006a) concernant l'effet du Zn, Cu et Cd sur *Helix aspersa* et de Coeurdassier et al., (2000) qui ont étudié l'effet du Chrome macrométrique sur *Helix aspersa*, qui ont noté une diminution du poids suite à une diminution de la consommation de nourriture.

Nos résultats sont aussi en accord avec les travaux de Hames et Hopkin (1989) qui ont révélés que l'exposition des escargots à des concentrations croissantes des ETM en fonction de temps est à l'origine d'une diminution du poids relatif des traités particulièrement à la plus forte concentration en ETM.

Gimbert (2006) a aussi constaté que parmi les effets comportementaux, une réduction dose-dépendante de la prise de nourriture a été souvent observée chez escargots nourris avec les aliments présentant des concentrations élevées en ETM.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Heikens, et al., (2001) et Van Straalen, et al., (2001), qui postulent que dans le cas des métaux essentiels comme le zinc et le cuivre, les invertébrés ont développé des mécanismes de régulation leur permettant de maintenir à un niveau constant leur concentration interne, pour une certaine gamme de concentrations rencontrées dans les sols. Au contraire, la régulation des métaux non essentiels est très faible voire nulle, entraînant leur accumulation dans les organismes (Jess et Marks, 1998).

L'analyse statistique montre qu'il y a des différences significatives entre le diamètre de la coquille des témoins et des traitées, ce qui souligne une perturbation de la croissance de la taille des juvéniles traitées par les différentes concentrations de nano-oxyde de fer.

En effet, Beebly et Richmond (2002) ont montré, en exposant au laboratoire *H. aspersa* à une nourriture contaminée au plomb, une diminution de 15 à 25% de la masse de la coquille, Cooke et al., (1979) ont montré que la coquille des escargots n'est pas un site de stockage important pour les ETM. Des escargots *H. aspersa*, prélevés dans des zones hautement contaminées présentent des concentrations de l'ordre de 1µg/g. Seul le plomb a été retrouvé dans la coquille mais des quantités n'excédant pas 3% des quantités totales accumulées dans l'organisme (Beeby et Richmond, 2002).

D'autres travaux confortent nos résultats ceux de Grara et al., (2015) qui ont mis en évidence une diminution du poids de la coquille en présence des poussières métalliques et en présence de ZnO nanométrique. Coeurdassier et al., (2000) qui a mis en évidence une perturbation des diamètres de la coquille.

Pendant la phase de développement des juvéniles, la diminution de la consommation alimentaire chez les traitées par des concentrations croissantes de nano-oxyde de fer, pourrait s'expliquer par le fait que ces animaux sont capables de réguler la quantité de métaux dans leur masse corporelle par conséquent une diminution de la consommation alimentaire aux fortes doses de xénobiotiques est observée.

5/ CONCLUSION

À la lumière des résultats trouvés dans notre travail, nous avons confirmé que nos NPs choisies et avec les concentrations testées (1,25, 1,5 et 2 mg/ml de Fe₂O₃) ont un effet toxique lors de la phase embryonnaire. Leur toxicité se manifeste par différentes manières. Tout d'abord, sur les œufs avant éclosion avec la déformation de la membrane, par la suite, il est apparu dans le succès d'éclosion des œufs après période d'incubation et par le taux de mortalité des nouveaux éclos. La toxicité est observée aussi pendant un mois de la phase juvénile par l'influence sur le poids frais et le diamètre coquillière des escargots. Enfin, nous avons pu montrer que *H. aspersa* est un bon bioaccumulateur et bioindicateur et le principal site de l'accumulation est l'hépatopancréas au niveau duquel est apparu la couleur rouille, sans oublier de parler de l'importance du stade d'étude « embryonnaire » mais aussi juvénile, aussi il faut noter l'effet toxique des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'escargot petit gris pendant un stade très sensible de sa vie.

Chapitre 2 : Effets des NPs du Fe₂O₃ sur les paramètres morphologiques

1/ OBJECTIF DU TRAVAIL

La physiologie des invertébrés peut traduire les effets toxiques des xénobiotiques par des altérations à plusieurs niveaux des fonctions vitales et peut se répercuter sur les performances individuelles impliquées dans la dynamique des populations (taux de natalité, taux de mortalité, âge de première reproduction) (Forbes et Forbes, 1994). Ces effets sont les conséquences de changements métaboliques, cellulaires ou tissulaires mais aussi de modifications comportementales.

L'objectif de cette partie est la mise en place d'élevage afin de maintenir des escargots adultes dans des conditions expérimentales (milieu contrôlé) en présence des NPs Fe₂O₃ dans la nourriture (deux voies de contact « digestive et cutanée »), puis la recherche des effets de la molécule candidate sur le comportement des escargots et sur certains paramètres morphométriques.

2/ MATERIEL ET METHODES

2.1/ Elevage et suivi de l'essai

Les animaux utilisés dans notre expérimentation sont les adultes d'escargot *Helix aspersa* ramené d'une ferme d'élevage de la willaya de Guelma (site non contaminé). Ces petits gris sont ensuite transférés au laboratoire, où ils ont été adaptés aux conditions contrôlées : photopériode de 18h de lumière / 24h, température 20 ± 2 °C, pendant une semaine.

Les 80 individus choisis ont une masse moyenne de 8.86 ± 1.15 g et un diamètre coquillère moyen de 32.3 ± 0.39 mm. Ils sont répartis dans des boîtes de plastiques transparents, avec couvercle perforé, chaque boîte contient une éponge humide pour maintenir l'humidité, l'alimentation est fournie dans des boîtes de Pétri (elle est pesée avant qu'elle soit fournie). Les boîtes sont nettoyées régulièrement tous les 3 jours (Gomot, 1997). Durant la période d'adaptation, ils sont nourris la farine de blé.

Le traitement des animaux a été effectué par des doses croissantes des nanoparticules d'oxyde de fer (fine poudre de 1, 2 et 3 mg/g de farine) comme l'illustre le tableau (08) bien mélangées avec la farine de blé, nous avons retenu en plus, un lot témoin qui ne reçoit que de la farine, chaque lot comporte 20 escargots (Fig. 27). La durée du traitement a été de six semaines pendant laquelle la mesure de la taille de la coquille et la pesée de tous les escargots s'est faite conjointement au nettoyage et au changement de nourriture. Après chaque nettoyage les résidus de nourriture de

chaque lot ont été séchés et pesés pour servir à calculer le pourcentage de consommation de chaque lot.



Figure 27 : Boîtes d'élevage des escargots sous des conditions contrôlées.

Tableau 08 : Distribution des groupes d'escargots selon les doses des NPs Fe_2O_3 .

Lot	Dose des NPs de Fe_2O_3
T	Escargots non traités « témoins » : 0 mg/g de farine
D1	Escargots traités avec 1 mg/g de farine
D2	Escargots traités avec 2 mg/g de farine
D3	Escargots traités avec 3 mg/g de farine

2.2/ Dissection des escargots et prélèvement des organes

A la fin de la 6^{ème} semaine de traitement, les escargots sont pesés puis sacrifiés par décapitation. Les escargots sont décoquillés avec les ciseaux en suivant le bord d'enroulement de la coquille (Fig. 28).



Figure 28 : Etapes de la dissection.

Découper lentement la coquille par petits morceaux et les enlever délicatement avec une pince, leurs hépatopancréas sont rapidement excisés et pesés, la masse molle aussi est pesé à l'aide d'une balance de précision (Fig. 29).

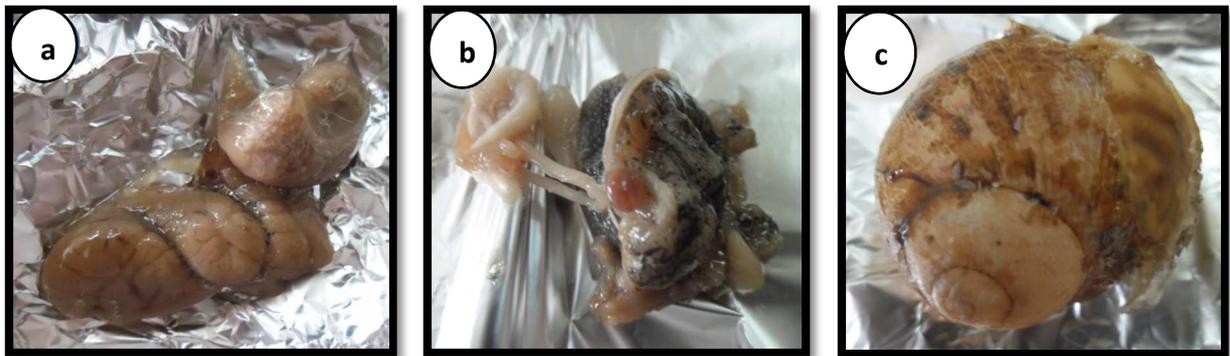


Figure 29 : Séparation des différents constituants de l'escargot :

(a) l'hépatopancréas, (b) la masse molle, (c) la coquille.

2.3/ Effets comportementaux

Au cours de l'exposition aux différents traitements, nous avons également cherché à caractériser les effets des NPs Fe_2O_3 testé sur les comportements plus ou moins perturbés de *Helix aspersa*. Suite à l'observation, nous avons noté des comportements différents, comme se nourrir normalement ou fuir la nourriture, ou l'activité des animaux et leur position spatiale dans l'enceinte d'essai : par exemple, actif ou inactif en position haute ou sur les supports, ou encore, actif ou inactif sur la nourriture.

Lorsqu'il est inactif, nous avons observé qu'il a tendance à se réfugier sur des supports situés à quelques centimètres du fond de la boîte (position haute). Ceci a déjà été rapporté par d'autres auteurs (Chevallier, 1992; Ait hamlet, 2013).

Ces comportements sont relevés, les jours de changement de nourriture. La position dans les enceintes peut être facilement notée, l'activité des animaux est notée de la façon suivante : la boîte est ouverte et le couvercle retourné et posé sur la paille. Après une minute, les escargots en mouvement sont considérés comme actifs, ceux qui restent immobiles sont inactifs. Cette méthode est retenue plutôt qu'une observation directe sans ouverture de la boîte car les escargots ont une activité plutôt nocturne si bien qu'au moment des observations, la quasi-totalité des escargots sont inactifs. L'activité ainsi observée représente donc plutôt un état de réceptivité et une capacité à réagir à une stimulation mécanique (déplacement et ouverture de la boîte). Les résultats sont exprimés sous forme d'observations hebdomadaires de chaque comportement vis-à-vis des concentrations des NPs Fe₂O₃ par rapport au témoin. (Ait Hamlet, 2013)

2.4/ Taux de mortalité

Le contrôle de la vitalité des individus de *Helix aspersa* au cours des essais est effectué au moment des renouvellements de nourriture, les individus morts sont évacués des enceintes d'essai. La mort d'un individu est généralement facile à déterminer : le pied flasque et jaunâtre est le plus souvent sorti de la coquille. La sole pédieuse n'adhère à aucune surface. Le corps luisant et très visqueux indique que la liquéfaction des tissus est en cours. L'odeur nauséabonde que dégage l'escargot est également un indicateur. En cas de doute, le pied est stimulé à l'aide d'une aiguille ou d'une paire de pinces brucelles. L'absence de réaction permet de conclure à la mort de l'individu.

2.5/ Pourcentage de consommation

Nous avons contrôlé la nourriture consommée par les escargots pendant toute la période de traitement. Il faut peser les résidus de chaque lot pour déterminer le pourcentage de consommation et la méthode est la suivante :

Pour chaque jour de nettoyage, les anciennes boîtes qui contiennent les résidus de la nourriture (les boîtes de Pétri) sont séchées, la farine ensuite est nettoyée des fèces et pesée. Cette opération est effectuée pour chaque groupe. A la fin du traitement on fait la somme des résidus pesés pour chaque lot et on calcule par rapport à la somme de la quantité d'alimentation mise à chaque nettoyage et changement de nourriture.

Equation :

$$\% \text{Consommation} = \text{QNC} \times 100 / \text{QNF}$$

$$/ \text{QNC} = \text{QNF} - \text{QR}$$

QNC : la somme des quantités de nourriture consommées

QNF : la somme des quantités de nourriture fournies

QR : la somme des quantités résiduelles

2.6/ Évolution du poids des escargots et du diamètre coquillère

Deux fois par semaine les escargots de chaque groupe sont pesés individuellement à l'aide d'une balance de précision « KER N°770 » et le diamètre de leurs coquilles est déterminé à l'aide d'un pied à coulisse.

2.7/ Poids frais de l'hépatopancréas, de la masse molle et de la coquille

Elles sont mesurées à l'aide de la même balance de précision utilisée précédemment. Cette pesée est effectuée après le sacrifice des animaux, à la fin de la 6^{ème} semaine du traitement.

2.8/ Etude statistique

Les moyennes \pm déviation standard (DS), avec un niveau significatif de $p \leq 0.05$, sont calculées pour chaque groupe d'expérience. Le test 't' de Student, l'analyse de la variance à un et deux critères de classification ont permis de mettre en évidence les différences entre les groupes étudiés au cours des tests effectués sur les paramètres physiologiques. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 16.0.

3/ RESULTATS

3.1/ Mortalité

Les résultats de comptage donnent des taux de mortalité résumés dans le tableau 09.

Tableau 09 : Taux de mortalité pour chaque lot.

Lot	nombre des individus morts	Taux de mortalité
Témoin	0	0
D1	2	10 %
D2	2	10 %
D3	3	15%

Durant le bioessai, la mortalité était faible, avec seulement 7 individus sur 80 escargots, ce qui représente 8.75 % de totalité de la population.

3.2/ Pourcentage de consommation

Par rapport à la quantité totale de la nourriture fournie pour chaque lot et aussi à la quantité des résidus nous avons calculés le pourcentage de consommation à l'aide de la règle de trois et le tableau 10 résume les résultats obtenus.

Tableau 10 : Pourcentages de consommation pour chaque lot.

Lot	Poids des résidus	Taux de consommation
Témoin	26.6 g	90.26 %
D1	43.1 g	85.49 %
D2	55.8 g	81.27 %
D3	72.9 g	75.17 %

3.3/ Effets sur le comportement

Les escargots exposés au Fe₂O₃ nanométrique ont montré une série de signes pendant la période expérimentale. Parmi ces signes les escargots ne sont plus attirés par la nourriture de façon dose-dépendante comparé aux escargots témoins. A la dose élevée de xénobiotique (3 mg/g), les escargots passent la plupart de leur temps au sommet des boîtes où ils sont isolés les uns des autres avec une faible activité nutritionnelle. À la dose 2 mg/g, les escargots consomment la farine d'une manière faible avec une diminution de mobilité par rapport aux témoins. Toutefois, à la dose la plus faible 1mg/g, la plupart des animaux ont montré une activité presque similaire à celle des escargots témoins avec une faible perturbation dans la consommation et comportement.

3.4/ Effet sur l'évolution du poids frais

Le tableau 11 met en évidence l'évolution du poids frais moyen des escargots en fonction du temps et en présence des doses croissantes des NPs d'oxyde de fer.

L'analyse de la variance à deux critères met en évidence des différences très hautement significatives en fonction du temps ($p = 0.000$) et en fonction de la dose ($p = 0.001$) mais aucune différence n'est observée lors de la corrélation entre les deux critères (temps et dose $p = 0.835$). L'analyse de la variance à un critère et le test t de student révèlent pour le groupe traité avec la plus forte dose, une diminution avec des différences significatives à partir de la 4^{ème} semaine, elles sont devenues hautement significatives à la fin de la 5^{ème} semaine et très hautement significatives la 6^{ème} semaine. Pour le groupe traité avec la dose 2 mg/g la diminution n'est devenue significative qu'à la 6^{ème} semaine. La diminution du poids des escargots traités avec la plus faible dose est non significative par rapport au témoin.

Tableau 11 : Evolution du poids frais des escargots des 4 lots durant les 6 semaines de traitement.

	T (m ±sd)	D1 (m ±sd)	D2 (m ±sd)	D3 (m ±sd)
P1	9.89±1.17	9.53±1.07 NS	9.77±1.06 NS	9.77±0.68 NS
P2	9.78±1.14	9.60±0.83 NS	9.74±0.91 NS	9.54±0.72 NS
P3	9.85±1.03	9.50±2.14 NS	9.86±0.93 NS	9.40±0.75 NS
P4	10.03±1.12	10.00±0.87 NS	9.98±0.94 NS	9.71±0.67 NS
P5	10.06±1.02	9.98±0.94 NS	10.01±0.87 NS	9.80±0.79 NS
P6	10.09±1.14	10.00±0.87 NS	10.05±0.99 NS	9.88±0.96 NS
P7	10.29±1.12	10.15±0.96 NS	10±0.85 NS	9.52±0.72 *
P8	10.46±1.12	10.20±0.95 NS	10.09±1 NS	9.67±0.93 *
P9	10.51±1.20	10.00±0.75 NS	10.09±0.74 NS	9.65±0.75 *
P10	10.61±0.91	10.24±1.01 NS	10.05±0.88 *	9.61±0.5 **
P11	10.73±0.78	10.28±0.87 NS	9.98±1.01 *	9.61±0.56 ***
P12	10.80±0.80	10.42±0.81 NS	10.13±0.92 *	9.64±0.64 ***

3.5/ Effet sur l'évolution du diamètre coquillère

Le tableau 12 met en évidence l'évolution de la taille des coquilles en fonction du temps en présence des doses croissantes des NPs d'oxyde de fer.

L'analyse de la variance à deux critères met en évidence des différences très hautement significatives en fonction du temps ($p = 0.000$) et significatives en fonction de la dose ($p = 0.011$) mais aucune différence n'est observée lors de la corrélation entre les deux critères (temps et dose $p = 0.810$). Nous notons d'après l'ANOVA à un critère et le test t de student qu'il y a une diminution dose-dépendante de la taille moyenne des coquilles des groupes traités par rapport au témoin cette diminution ne devient significative qu'à la dernière semaine pour le groupe traité à la dose 3mg/g.

Tableau 12 : Evolution du diamètre coquillère des escargots des 4 lots durant les 6 semaines de traitement.

	T (m ±sd)	D1 (m ±sd)	D2 (m ±sd)	D3 (m ±sd)
P1	32.30±1.4	32.33±1.53 NS	32.28±1.34 NS	32.29±1.52 NS
P2	32.32±1.39	32.35±1.11 NS	32.30±1.34 NS	32.30±1.65 NS
P3	32.40±1.22	32.37±1.28 NS	32.36±1.25 NS	32.33±1.2 NS
P4	32.45±1.19	32.40±1.12 NS	32.40±1.20 NS	32.36±1.43 NS
P5	32.47±1.22	32.43±0.40 NS	32.41±1.21 NS	32.38±1.22 NS
P6	32.50±1.13	32.47±1.43 NS	32.44±1.09 NS	32.40±1.49 NS
P7	32.52±1.29	32.49±1.22 NS	32.48±1.17 NS	32.43±1.41 NS
P8	32.54±1.08	32.49±0.98 NS	32.48±1.27 NS	32.48±0.97 NS
P9	32.60±1.24	32.57±1.34 NS	32.55±1.28 NS	32.50±1.10 NS
P10	32.64±1.21	32.59±1.36 NS	32.56±1.03 NS	32.50±1.04 NS
P11	32.68±1.34	32.64±1.30 NS	32.57±1.05 NS	32.55±0.39 *
P12	32.70±0.79	32.64±1.66 NS	32.58±0.75 NS	32.51±1.02 *

3.6/ Effet sur le poids frais de la coquille

Les statistiques relatives à l'évolution du poids de la coquille en présence des concentrations croissantes des NPs de Fe₂O₃, mettent en évidence une diminution significative ($p < 0.05$) de ce paramètre particulièrement à la plus forte concentration d'oxyde de fer, alors que la différence est non significative pour la 1^{ère} et la 2^{ème} dose (Fig. 30).

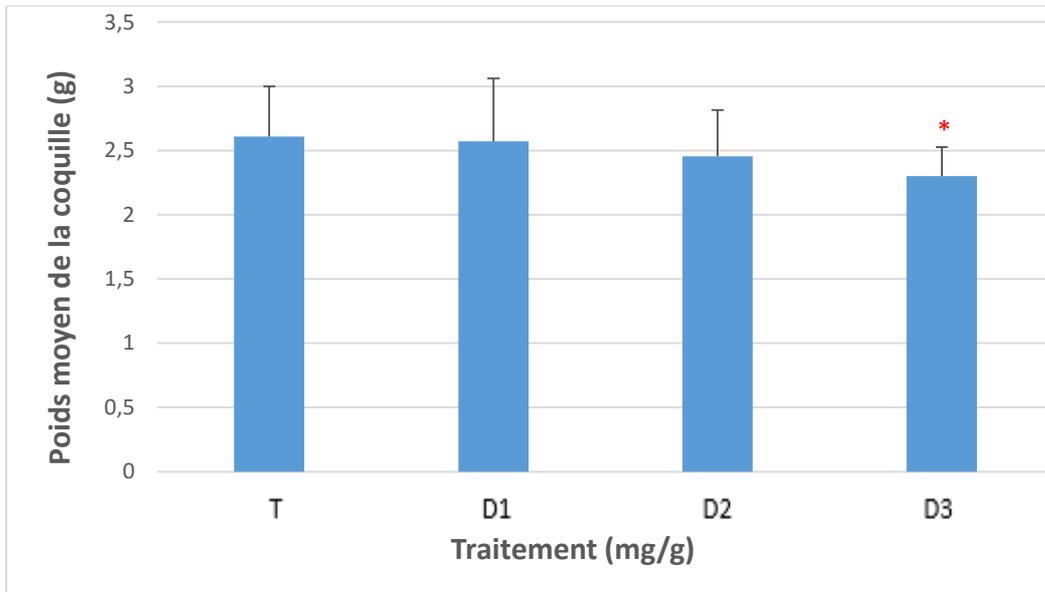


Figure 30 : Effets des NPs du Fe₂O₃ sur le poids frais moyen de la coquille des adultes de l'escargot *Helix aspersa* après six semaines de traitement.

3.7/ Effet sur le poids frais de la masse molle

Les résultats du poids des masses molles montrent qu'il existe des différences significatives entre le groupe traité avec la 3^{ème} dose et le groupe témoin. Cependant les différences ne le sont pas entre les groupes traités avec les deux premières doses par rapport au témoin. (Fig. 31).

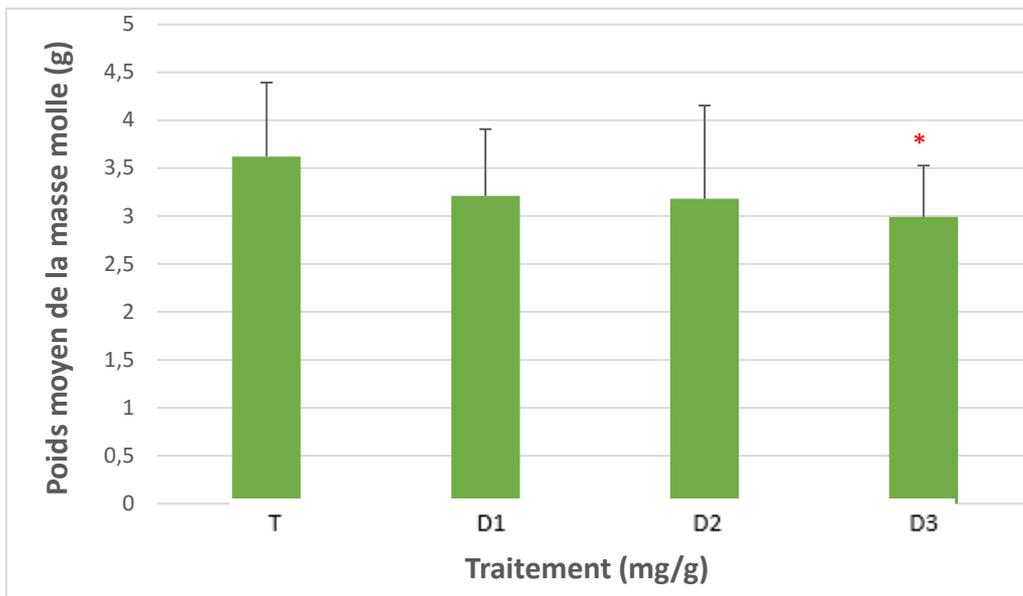


Figure 31 : Effets des NPs du Fe₂O₃ sur le poids frais moyen de la masse molle des adultes de l'escargot *Helix aspersa* après six semaines de traitement.

3.8/ Effet sur le poids frais de l'hépatopancréas

L'analyse statistique de l'évolution du poids de l'hépatopancréas montre que, le poids de ce dernier diminue particulièrement à la plus forte concentration (diminution significative). Mais les différences ne sont pas significatives entre les moyennes des poids des hépatopancréas du 1^{er} et 2^{ème} groupe et le groupe témoin (Fig. 32).

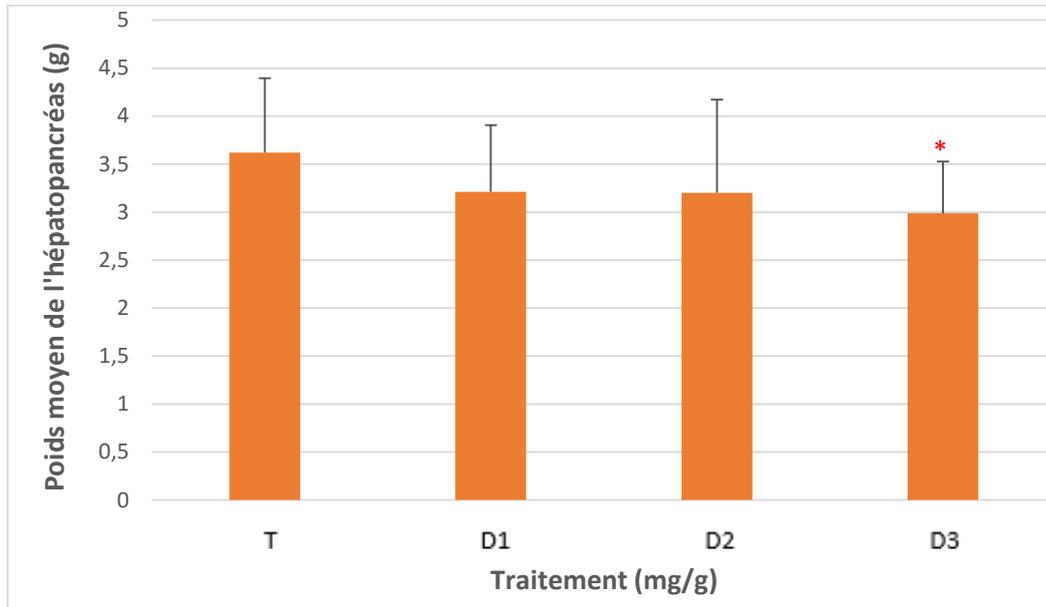


Figure 32 : Effets des NPs du Fe₂O₃ sur le poids frais moyen de l'hépatopancréas des adultes de l'escargot *Helix aspersa* après six semaines de traitement.

4/ DISCUSSION

Les bioindicateurs de la pollution environnementale sont sensibles aux variations physicochimiques de leurs milieux, notamment la température (Bride et *al.*, 1993), les fréquences électromagnétiques (Regoli et *al.*, 2006) et toute forme de pollution urbaine (Terfaya et *al.*, 2009; Ait Hamlet, 2013; Grara, 2011), ils sont également sensible vis-à-vis des xénobiotiques variés tels que les hydrocarbures (Ismart et *al.*, 2002), les éléments traces métalliques ETM (Gomot, 1997), les pesticides (Coourdassier et *al.*, 2001; Vidal, 2001) ou encore les nanoparticules (Grara et *al.*, 2015; Boucenna, 2016). Les mollusques gastéropodes en particulier sont connus par leur capacité d'accumulation des métaux lourds les plus fréquents, à savoir le Cu, le Pb, le Zn et le Cd. Ainsi, toutes les études sur les bioindicateurs, convergent vers l'idée que l'espèce *Helix aspersa* est un excellent modèle biologique pour toutes les études écotoxicologiques, toxicologiques et pour la compréhension des mécanismes d'action des xénobiotiques (Ait Hamlet et *al.*, 2012; Grara, 2011).

Dans notre travail nous avons mis en évidence une mortalité égale à (8.75 %) et elle est de 100% des lots traités, il n'y a pas des morts dans les témoins. En effet, la mortalité des escargots dépend de l'espèce et sa sensibilité vis-à-vis des substances testées, on peut expliquer cela par la forte résistance du système de détoxification qui joue ici un rôle majeur d'élimination et de réparation des dégâts induits par la pénétration de ces molécules. La durée de traitement aussi influence la survie sans oublier la concentration du xénobiotiques et la voie de pénétration. Ces résultats sont en accord avec ceux de Grara et *al.*, (2015), en effet, les effets de plusieurs doses de ZnO nanométrique (500 µg/g, 1000 µg/g, 5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g) dans l'alimentation (farine de blé) sur la mortalité et la croissance de l'escargot *Helix aspersa* durant quatre semaine apportent des données originales sur la toxicité du ZnO. Les pourcentages cumulatifs de mortalités des escargots traités ont révélé que le pourcentage de mortalités augmente avec l'augmentation de la concentration de ZnO avec 30%, 50%, 40% pour les trois fortes doses respectivement.

L'injection intrapéritonéale des NPs de TiO₂ (2 ng/g et 10 µg/g du poids corporel) chez le poisson *Pimephales promelas* exposé déjà à des bactéries pathogènes (*Aeromonas hydrophila* ou *Edwardsiella ictaluri*) pendant 48h, montre que la mortalité augmente chez les poissons traités avec les NPs TiO₂ surtout à la forte concentration par rapport aux autres non traités (Jovanović et *al.*, 2015).

Les effets néfastes des NPs Fe₂O₃ avec les trois doses (dose-dépendante) sur le comportement locomoteur et nutritif des adultes de l'escargot *Helix aspersa* peut exprimer un état de stress, en effet les métaux engendrent des radicaux oxygénés tels que le puissant radical hydroxyle OH toxiques au niveau cellulaire qui est le stress oxydant, chez les mollusques, peut induire un état de stress général. (Le Bras, 2007), de la même manière que les métaux lourds les nanoparticules des oxydes métalliques peuvent l'induire.

Sur des crustacés d'eau douce, Dabrunz et *al.*, 2011 ont montré que les nanomatériaux induisent une augmentation de la mortalité, altèrent la reproduction, modifient le comportement ou encore génèrent des malformations chez la puce d'eau « *Daphnia magna* ». De plus, des daphnies qui ingèrent des NPs de TiO₂, par exemple, ne l'éliminent pas facilement et les NPs se trouvent donc concentrées dans son organisme (Zhu et *al.*, 2010).

Chez les microorganismes, il a été démontré que les nanomatériaux pouvaient avoir un effet délétère sur la survie des bactéries (Chatterjee et *al.*, 2010) . Par exemple, des NPs de bore et d'aluminium entraînent une diminution de la survie des bactéries *Vibrio fischeri* avec des EC50 comprises entre 56 et 66 mg/L alors que les NPs de TiO₂ ont très peu d'effet sur la même espèce (Strigul et *al.*, 2009).

L'impact de NPs sur les escargots d'eau douce (Musee *et al.*, 2010; Croteau *et al.*, 2011), sur les larves de chironomes (Lee *et al.*, 2009; Oberholster *et al.*, 2011), sur les cnidaires (Yeo and Kang, 2010) et sur les polychètes (Galloway *et al.*, 2010) ont également été étudié mettant en évidence des effets toxiques à travers une diminution de la nutrition et une augmentation du nombre de malformations, un stress oxydant, des dommages à l'ADN en corrélation avec une augmentation de la mortalité.

Certains auteurs ont montré que la présence de 1 g/kg de sol de NPs de TiO₂ entraînait des dommages à l'ADN, l'évaluation de la mortalité, perturbation de la croissance et de la reproduction des nématodes exposés aux nanomatériaux mettent en évidence leur toxicité envers ces organismes. Selon (Zhang *et al.*, 2011a), la durée de vie de *Caenorhabditis elegans* exposé a 1 nM de NPs de CeO₂ est diminuée de 12%. Les nanomatériaux peuvent également induire des changements de comportement des nématodes.

Pendant les six semaines d'exposition, nous avons suivi le poids des escargots, le diamètre de la coquille ainsi que le taux de consommation, et à la fin, nous avons pesés la coquille, la masse molle et l'hépatopancréas de chaque escargot, tous les résultats obtenus vont dans le même sens une diminution de la consommation traduite par la perte du poids et d'une légère diminution du diamètre coquillière, ceci constitue le premier indice d'une toxicité potentielle.

Hames et Hopkin (1989) expliquent cette diminution de consommation de nourriture par les variations des sécrétions d'enzymes digestives. Ainsi, Hopkin (1990) et Bibic *et al.*, (1997) postulent que dans un environnement pollué, l'animal se met dans un état de jeune prolongé. Il en est de même pour Lam (1996), qui a mis en évidence une réduction dose-dépendante des coefficients de consommation et d'absorption de la nourriture chez des adultes de *Radix plicatulus* exposés au Cd. Viard *et al.*, (2004) ont fait des constatations similaires en présence d'une contamination au plomb : c'est l'extrême concentration en plomb dans le sol, détectée par les escargots, qui limite leur taux de consommation et donc inhibe partiellement leur croissance. Aussi, Swaileh et Ezzughayyar (2000) ont montré, chez *Helix engaddensis*, que si pendant quatre semaines, les escargots réduisaient ou refusaient totalement de se nourrir avec une nourriture contaminée en cuivre et cadmium, dès qu'ils disposaient de nourriture saine la cinquième et la sixième semaine, les escargots intoxiqués au cadmium continuaient de refuser la nourriture. Mais à l'opposé, les escargots intoxiqués au cuivre ont tout de suite recommencé à se nourrir normalement et ont rattrapé leur poids normal. Il apparaît donc évident que, selon le contaminant considéré, le refus de se nourrir provient d'un phénomène soit de toxicité soit de répulsion (Swaileh et Ezzughayyar, 2001).

Cette perte de poids peut être expliquée par la diminution de la consommation alimentaire que nous avons constatée particulièrement chez les animaux traités par les différentes concentrations de Fe₂O₃. Ce résultat est en accord avec les travaux de Laskowski et Hopkin (1996a) concernant l'effet du Zn, Cu et Cd sur *Helix aspersa* et de Coeurdassier et al. (2000) qui ont étudié l'effet du Chrome sur *Helix aspersa*. Grara et al., (2015) aussi a mis en évidence une diminution du poids frais après exposition de *Helix aspersa* aux NPs d'oxyde de zinc.

L'autre paramètre qui accompagnera les changements du poids c'est le diamètre coquillère, cette dernière constitue un indice révélateur de la croissance des individus.

La diminution du poids moyen de la coquille des escargots traités que nous avons noté dans notre bioessai peut être expliquée par l'inhibition de la synthèse d'une hormone de croissance, comme le suggère Gimbert et al., (2006) qui ont mis en évidence une diminution de 30 % de la masse de la coquille des escargots exposés à un sol artificiel contaminé par le Cadmium. Nos résultats sont également en accord aussi avec ceux de Grara et al., (2011, 2015) qui a mis en évidence une diminution dose-dépendante du poids moyen de la coquille des escargots traités par des métaux lourds et par des NPs de ZnO, ce même auteur a expliqué cette modification par l'effet des ions libérés par les métaux qui sont connus par leur toxicité directe en liaison avec la coquille, des dommages irréversibles sur certaines enzymes ou sur l'ADN, ils peuvent également perturber de manière indirecte des processus physiologiques importants en entrant en compétition avec certains éléments essentiels tels que le calcium (Ca) (Molnár et al., 2004). Ces résultats confirment l'importance du suivi des paramètres physiologiques dans l'évaluation de la contamination d'un milieu.

L'autre facteur important pris en compte dans cette partie, concerne le suivi du poids des tissus molles, nous avons mis en évidence une diminution dose-dépendante du poids des tissus molles en présence de Fe₂O₃. On peut expliquer cette diminution par la compétition entre les ions Calcium et les ions du fer libéré par les NPs Fe₂O₃, la fixation des ions Fe à la place du calcium perturbe les échanges cellulaires (Coeurdassier et al., 2001). La diminution du poids de la masse molle est marquée aussi dans le bioessai de Grara et al., (2011; 2015) après exposition de *Helix aspersa* pendant quelques semaines à des différentes doses de métaux lourds et de NPs ZnO respectivement.

Ensuite, nous sommes intéressés au poids de l'hépatopancréas, nos résultats montrent une diminution du poids hépatopancréatique par rapport au témoin. En effet, Hopkin (1995) et Bibic et al., (1997) stipulent que dans un environnement pollué, l'animal se met dans un état de jeûne prolongé pour éviter la nourriture contaminée, cette hypothèse a été confirmée par Notten et al., (

2006) sur l'escargot *Cepaea nemoralis* testés par des métaux lourds qui existent naturellement dans la nourriture (les feuilles de *Urtica dioica*). Madoz-Escande (2006) a révélé une accumulation des métaux de Te, Cs, Ba au niveau de la glande digestive des escargots, cela suggère des atteintes cellulaires et des perturbations métaboliques réduisant la masse de cette organe.

Des études préliminaires ont démontré que l'aluminium est stocké dans un seul type de granule chez *Helix aspersa*, indiquant de nouveau l'importance de l'hépatopancréas dans le stockage et la détoxification des métaux (Brooks et al., 1992).

Les xénobiotiques pénètrent sans aucune difficulté à l'intérieur de la cellule où ils peuvent s'accumuler et générer des processus cytotoxiques. Toutefois, les cellules ont développé des mécanismes de biotransformation visant à inactiver les xénobiotiques en métabolites plus hydrosolubles donc plus facilement excrétables.

Une étude a démontré que les NPs d'Ag exercent des effets toxiques d'une manière spécifique à l'espèce, et leur exposition pourrait permettre à la bioaccumulation de l'argent, et affecter la croissance, le développement et le règlement des larves d'invertébrés marins (Zhang et al., 2012). A l'échelle cellulaire et moléculaire, les nanoparticules sont réactives envers l'environnement cellulaire. Les conséquences de cette réactivité sont la facilité des NPs à s'internaliser dans l'environnement cellulaire et la formation d'espèces radicalaires de l'oxygène.

5/ CONCLUSION

Nous pouvons conclure que l'espèce *Helix aspersa* est sensible à la présence des nanoparticules métalliques à base de Fe₂O₃ qui se manifeste par des altérations sur le gain du poids frais moyen des escargots de la masse molle et celles de l'hépatopancréas, ainsi que le diamètre et le poids de la coquille. La survie aussi est touchée ainsi que la consommation de la nourriture et la mobilité. Ces perturbations peuvent être dues aux perturbations dans le métabolisme biochimique ou un déséquilibre dans les réserves énergétiques. Ces changements peuvent être utilisés comme biomarqueur de contamination et d'évaluation des processus physiologiques tels que la croissance ou la reproduction indispensables au maintien et à la survie de l'espèce.

En définitive, l'escargot petit gris *Helix aspersa* répond bien aux critères des bioindicateurs et peut participer à la biosurveillance de l'environnement par les nanoparticules.

Chapitre 3 : Effets des NPs du Fe₂O₃ sur les paramètres biochimiques et enzymatiques

1/ OBJECTIF DU TRAVAIL

Les changements engendrés par l'entrée d'un xénobiotique dans l'organisme sont de deux types : la mobilisation au niveau moléculaire, permettant la protection de l'organisme contre les effets néfastes du contaminant, il s'agirait de l'implication des systèmes de défense (détoxification) qui transforment le contaminant en une forme inoffensive et facile à excréter. La deuxième variante est l'induction des effets toxiques qui sont dus, soit au xénobiotique lui-même, par le dépassement des systèmes de défense de l'organisme soit dus aux métabolites, produits de la biotransformation de ce contaminant, qui présentent une toxicité plus élevée que la substance d'origine (Van der Oost *et al.*, 2003). La diversité de la réponse des organismes vis-à-vis des contaminants est à l'origine de la diversité des indicateurs biologiques susceptibles d'être utilisés en tant que biomarqueurs de pollution (Narbonne, 1993). Les biologistes des radicaux libres ont transposé ce terme qui signifie un changement moléculaire dans une molécule biologique provenant d'une attaque des espèces réactives de l'oxygène, de l'azote et de composés halogénés. Il peut être défini comme toute molécule biologique de l'organisme susceptible de servir de marqueur d'un phénomène physiopathologique. De ce fait, la sélection d'un biomarqueur doit se baser sur certains critères pour justifier et rentabiliser l'objectif de son utilisation (Livingstone et Farrar, 1984; Moore, 1985; Gebel, 2000) :

- Un produit majeur de modification oxydative qui peut être directement impliqué dans la toxicité.
- Un produit stable non susceptible d'induction artéfactuelle ou de perte durant la conservation des échantillons.
- Représentatif de la balance entre la génération des dommages oxydatifs et leur élimination.
- Déterminé par une analyse spécifique, sensible, reproductible et robuste.
- Libre des facteurs confondants venant d'une prise alimentaire.
- Accessible dans un tissu cible comme les lymphocytes et cellules mononuclées.
- Mesurable dans les limites de détection d'une procédure analytique fiable.

Dans le contexte de l'exposition des invertébrés aux NPs, il semble intéressant d'essayer de caractériser les perturbations de l'escargot petit gris *Helix aspersa* par des approches biochimiques à travers le suivi de quelques biomarqueurs.

L'intérêt des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère aspécifique de leur réponse, ce qui peut être un avantage dans le contexte de l'évaluation d'un stress oxydatif (Vigano *et al.*, 1998), malgré la grande complexité des mécanismes de réponse mis en jeu, ces mécanismes antioxydants demandent donc à être mieux compris pour définir les paramètres les plus discriminants comme biomarqueurs de choix de l'impact des contaminants sur les organismes (Cossu *et al.*, 1997). Finalement, seule une approche globale intégrant des analyses chimiques et biologiques (bioindicateurs et biomarqueurs) permet d'évaluer la qualité d'un écosystème et les risques qu'il encourt (Fig. 33) (Lagadic et Caquet, 1996).

Nous nous focaliserons dans cette étude sur certains des biomarqueurs les plus utilisés actuellement sur les organismes terrestres (Saint-Denis *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2006; Gambi *et al.*, 2007; Reinecke *et al.*, 2007). Ces biomarqueurs sont décrits ci-dessous.

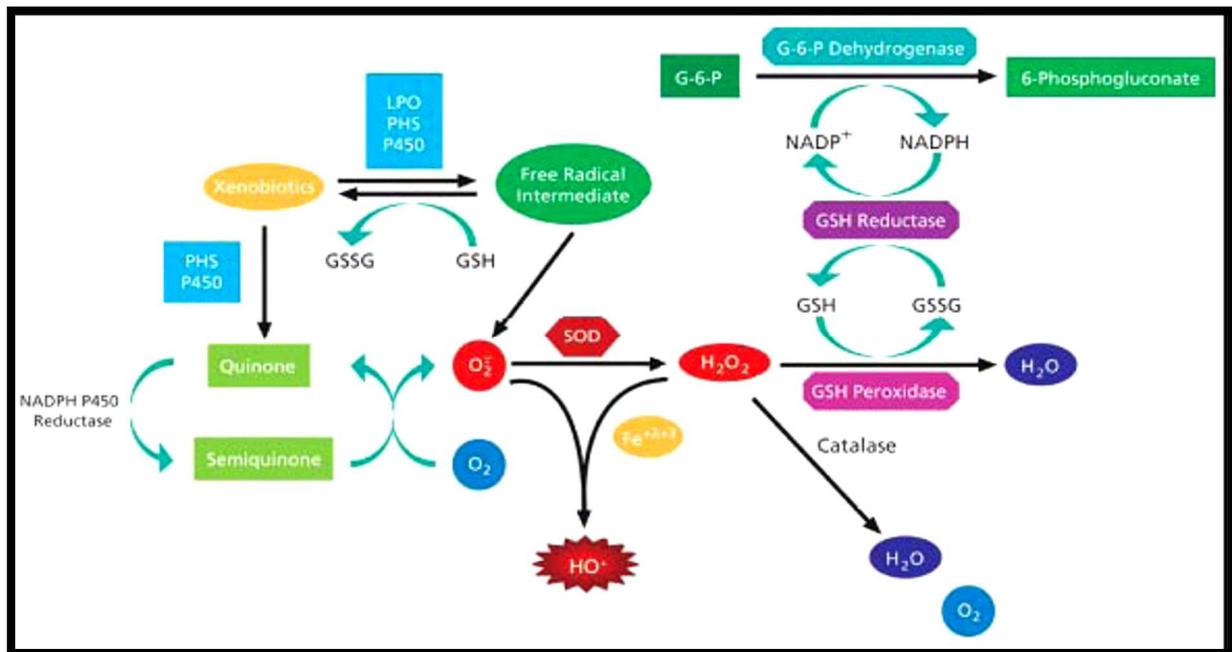


Figure 33 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants (Descamps, 2004).

2/ MATERIEL ET METHODES

2.1/ Sacrifice et dissection

Après sacrifice et pesé des hétopancréas, nous avons utilisé deux méthodes de conservation. La première pour les échantillons qui servent aux différents dosages biochimiques où 10 spécimens (hétopancréas) sont choisis au hasard de chaque traitement et posés au congélateur pour servir aux dosages biochimiques. La 2^{ème} méthode, est pour les échantillons des coupes histologiques.

2.2/ Extraction et dosage des métabolites

L'analyse biochimique des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) a été effectuée sur une partie de l'hépatopancréas de 10 escargots de chaque groupe, selon la méthode de Shibko et *al.*, (1966) résumée dans la figure (34).

2.2.1/ Extraction des métabolites

L'extraction des métabolites a été conduite sur un fragment de 100mg de l'hépatopancréas des escargots pour chaque traitement (1, 2 et 3 mg/g de Fe₂O₃) ainsi que le témoin. Le fragment est pesé et homogénéisé dans 1 ml d'acide trichloracétique ou TCA (20 %).

Après une première centrifugation de la solution broyée (5000 trs/min à 4°C, pendant 10 min), le surnageant (I) obtenu sert au dosage des glucides totaux selon la méthode de Duchateau & Florkin (1959), tandis que le reste des tubes (culot I) est additionné du mélange en partie égale d'éther et de chloroforme et subie ensuite une seconde centrifugation (5000 trs/min à 4°C, pendant 10 min), qui donne un autre surnageant (II) destiné au dosage des lipides totaux (Goldsworthy et *al.*, 1972). Alors que, le culot (II) sera dissout dans de la soude (0,1 N) et utilisé pour la quantification des protéines totales selon Bradford (1976).

2.2.2/ Dosage des glucides

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de Duchateau & Florkin (1959). Elle consiste à additionner à 100 µl du surnageant I, contenu dans un tube à essai, 4 ml du réactif d'anthrone et de chauffer le mélange à 80 °C pendant 10 mn, une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présente dans l'échantillon, et la lecture de l'absorbance est faite à une longueur d'onde de 620 nm. La préparation du réactif d'anthrone se fait comme suit : à 150 mg d'anthrone est ajouté 75 ml d'acide sulfurique concentré et 25 ml d'eau distillée, pour obtenir à la fin une solution limpide de couleur verte, utilisé après 4h d'obscurité. La quantité des glucides est calculée à partir de la gamme d'étalonnage, effectuée à partir d'une solution mère de glucose 1mg/1ml d'eau distillée (voir annexe 02 Tab. 16, Fig. 55).

2.2.3/ Dosage des lipides

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy et *al.*, (1972) en utilisant la vanilline comme réactif. Le dosage des lipides se fait sur des prises de 100 µl du surnagent II qui subissent une évaporation totale puis 1ml d'acide sulfurique concentré a été ajouté, les tubes sont ensuite agités et mises pendant 10 min dans un bain de sable à 100 °C. Après refroidissement, 200 µl de ce mélange est ajouté à 2,5 ml de la vanilline et après 30 mn d'obscurité, une coloration rose se développe. La densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Le réactif est préparé comme suit : faire dissoudre 0,38 g de vanilline dans 55 ml d'eau distillée et ajouter 195 ml d'acide orthophosphorique à 85%, ce réactif se conserve à l'obscurité. La

quantité des lipides est calculée à partir de la droite de régression obtenue à partir de la gamme d'étalonnage, effectuée à partir d'une solution mère de lipides en ajoutant à 2,5 mg d'huile de table (tournesol 99% triglycérides) 1 ml d'éther chloroforme (1V/1V) (voir annexe 03 Tab. 17, Fig. 56).

2.2.4/ Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales est effectué selon la méthode de Bradford (1976) en ajoutant à 100µl du culot II, 4 ml de réactif du bleu brillant de commassie (BBC) G 250 (Merck). La solution de BBC, se prépare comme suit : 100 mg de BBC est homogénéisée dans 50 ml d'éthanol (95%), ensuite 100 ml d'acide orthophosphorique à 85% est additionné au mélange et ensuite compléter à 1000 ml avec l'eau distillée. Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. Les concentrations sont calculées à l'aide de la gamme d'étalonnage qu'est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (Sigma) titrant 1 mg/ml d'eau distillée (voir annexe 01 Tab. 15, Fig. 54).

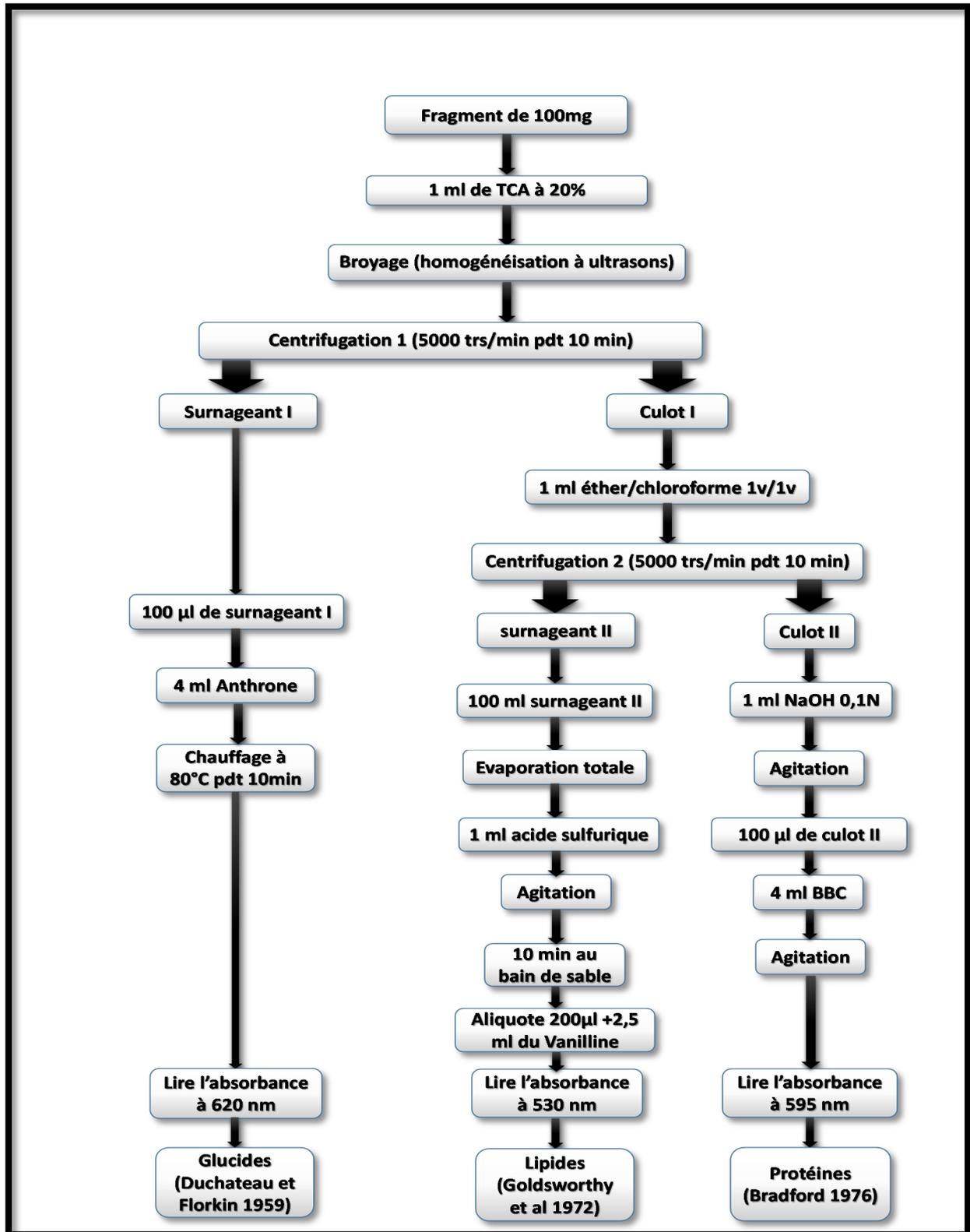


Figure 34 : Protocole d'extraction et de dosage des métabolites (Shibko et *al.*, 1966).

2.3/ Dosage des paramètres du stress oxydant

2.3.1/ Préparation de l'homogénat

Un gramme d'hépatopancréas des escargots des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le tampon phosphate (pH 7.4 ; 0,1 M ; à conserver à 4°C), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquote dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

Après centrifugation le dosage des protéines totales est effectué selon la méthode de Bradford (1976) déjà citée pour servir aux calculs des concentrations des paramètres étudiés.

Tampon Phosphate (pH 7.4 ; 0,1 M):

-KH₂PO₄ à 0.1 M; M = 136.09 g/mol → 6,8 g + 500 ml d'eau → pH 4.32

-K₂HPO₄, 3H₂O à 0.1 M; M = 228.22 g/mol → 11.4 g + 500 ml d'eau → pH 9.06

125 ml de K₂HPO₄ + 25 ml de KH₂PO₄ pour obtenir un pH 7.4.

2.3.2/ Dosage du glutathion (GSH)

a/ Principe :

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de Weckbeker & Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5- mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela on réalise une déprotéinisation (par l'acide sulfosalicylique 0.25%) afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion.

b/ Protocole :

Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation : 0.8 ml de l'homogénat auquel est ajoutée 0.2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0.25%. Agitation, incubation dans un bain de glace pendant 15 minutes. Centrifugation 1000 rpm pendant 5 minutes. 0.5 ml de surnageant au quel est ajouté 1 ml de tampon Tris-EDTA (0.02M) pH 9.6. Agitation et addition de 0.025 ml de DTNB à 0.01M dissout dans le méthanol absolu (Tab. 13). Incubation 5 minutes à température ambiante puis lecture de la DO à $\lambda = 412$ nm.

Tableau 13 : Protocole utilisé pour le dosage du GSH.

Réactifs	Blanc	Echantillon
Surnageant	-----	0.5 ml
H ₂ O distillée	0.5ml	-----
Tampon Tris-EDTA ;PH=9.6	1ml	1ml
DTNB (0.01M)	0.025ml	0.025ml

On note que la concentration du GSH est mesurée par rapport à 1 mg de protéines (on dose les protéines totales avant la déprotéinisation selon la méthode de Bradford, 1976).

c/ Calcul de la concentration :

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH } (\mu\text{molGSH/mg de protéines}) = \frac{D0 \times 1 \times 1.525}{13.1 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg de prot}}$$

- **D0** : Densité optique.
- **1** : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).
- **1.525** : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5ml surnageant+1ml Tris-EDTA + 0.025 ml DTNB).
- **13.1** : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.
- **0.8** : Volume de l'homogénat.
- **0.5** : Volume du surnageant.

d/ Préparation des solutions tampons :

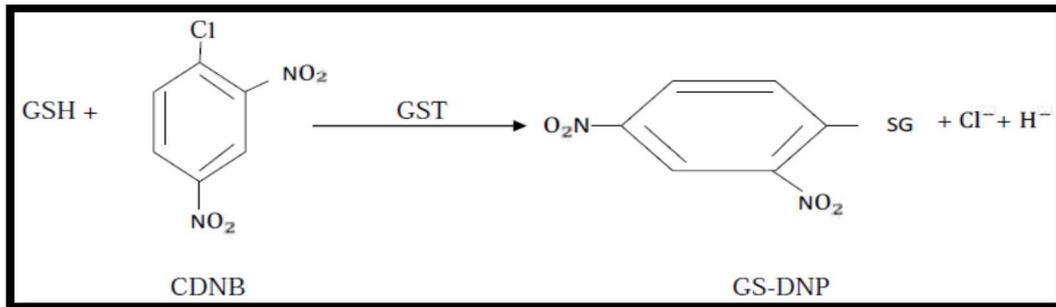
- **Tampon Tris-EDTA** : Tris (C₄H₁₁NO₃) à 0,4M et EDTA à 0,02M, on dissout 19,382g de Tris et 2,976g d'EDTA dans 400ml d'eau distillée. Le pH doit être ajusté à l'aide d'un pH mètre à 9,6 en ajoutant l'HCl (acide) ou le NaOH (base).
- **Solution SSA** : On dissout 0,063g d'acide sulfosalicylique dans 25ml d'eau distillée.
- **Solution DTNB 0,01M** : Dissout 0,0594g dans 15ml de méthanol absolu.

2.3.3/ Dosage de l'activité Glutathion S-Transférase (GSTs)

a/ Principe :

La mesure de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST) est déterminée selon la méthode de Habig *et al.*, (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro-2,4 di nitrobenzene) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH), la

conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyl 2-4 Dinitrobenzene permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :



b/ Protocole :

Le dosage consiste à faire réagir 200 µl du surnageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM) [20.26 mg CDNB, 153.65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0.1M, p H 6)]. La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes a une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant (tab. 14).

Tableau 14 : Protocole utilisé pour le dosage du GST.

Réactifs	Blanc (µl)	Echantillon (µl)
Tampon phosphate (0.1M) pH 6.5	850	830
CDNB (0.02 M)	50	50
GSH (0.1 M)	100	100
Homogénat	20

On note que la concentration du GST est mesurée par rapport à 1 mg de protéines.

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

c/ Calcul de la concentration de GST :

La concentration est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST } (\mu\text{mol GST/mg de protéines}) = \frac{(\text{DO } \acute{\text{e}}\text{cht}/15 \text{ sec} - \text{DOblanc}/15 \text{ sec})}{9.6 \times 1 \text{ mg de prot}}$$

- **Do** : Densité optique de l'échantillon /15 secondes.
- **Do/ 15 sec blanc** : Densité optique du blanc /15secondes.
- **9.6** : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm.

d/ Préparation des solutions tampons :

- **Tampon phosphate (0.1 M) pH 6.5** : de la même façon que celui de pH 7.4 juste on règle le pH à l'aide du pH mètre à 6.5 par l'ajout du HCl.
- **Solution CDNB (0.02M)** : Dissoudre 202,55 mg CDNB dans 50 ml d'éthanol absolu.
- **Solution GSH (0.1M)** : Dissoudre 153,65 mg GSH dans 50 ml d'eau distillée.

2.3.4/ Dosage de l'activité glutathion peroxydase (GPx)**a/ Principe :**

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :

**b/ Protocole :**

Dans un tube sec, 0.2 ml de surnageant est additionnée à 0.4 ml de GSH a 0.1 mM (réaction enzymatique) ajouter 0.2 ml du tampon phosphate 0.1 M (tampon d'extraction pH 7.4). Le tube blanc contient 0.4 ml de GSH + 0.2 ml du tampon phosphate (réaction non enzymatique). Incuber au bain marie à 25° C pendant 05 min puis additionner 0.2 ml d'H₂O₂ (1.3 mM) pour initier la réaction, incuber pendant 10 min. addition de 1ml de TCA 1% T pour arrêter la réaction. Le mélange se met dans la glace pendant 30 min après on centrifuge durant 10 min a 3000 t/min. 0.48 ml de surnageant sont placés dans une cuve est additionnés de 2.2 ml du tampon phosphate avec 0.32 ml de DTNB à 1mM. Lire de la densité optique à 412 nm dans les 05 min.

c/ Calcul de la concentration de GPx :

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{GPx (mmole de GSH oxydées/mg de protéines)} = \frac{Q \times 5}{1 \text{ mg de protéines}}$$

$$Q = \frac{(DO \text{ écht} - DO \text{ étalon}) \times 0.04}{DO \text{ étalon}}$$

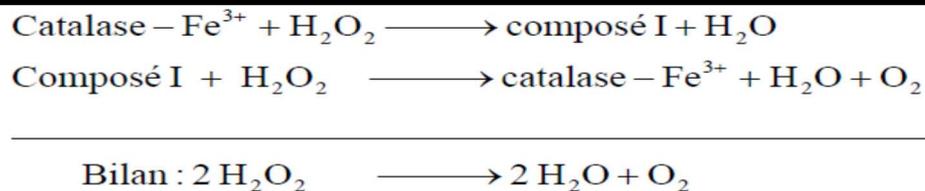
- **Q** : Quantité de GSH disparue (oxydée)
- **DO écht** : Densité optique de l'échantillon.
- **DO étalon** : Densité optique de l'étalon.
- **0.04** : Concentration du substrat (GSH).

d/ Préparation des solutions tampons :

- **Solution du GSH (0.1 mM)** : Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.
- **Solution TCA (1%)** : Dissoudre 1g TCA dans 100 ml d'eau distillée.
- **Solution DTNB (1.0 mM)** : Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu

2.3.5/ Dosage de l'activité Catalase*a/ Principe :*

Les catalases sont présents dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi., 1984).

*b/ Protocole :*

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel contient 20 µl de surnageant, 200 µl de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et 780 µl de tampon phosphate². La réaction est déclenchée par l'addition de l'eau oxygénée. Le dosage s'effectue en suivant la cinétique de la réaction pendant 1 mn à 240 nm dans des cuves UV en quartz au spectrophotomètre.

c/ Calcul de la concentration du Cat :

L'activité spécifique de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante :

$$\text{Cat (micromoles d'H}_2\text{O}_2 \text{ /minute /mg de protéines)} = \frac{\Delta DO}{\epsilon \times L \times 1 \text{ mg prot}}$$

- ΔDO : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat,
- ϵ : coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène à 240 nm (0.04 mM⁻¹ cm⁻¹),
- L : longueur de la cuve utilisé (1 cm),

d/ Préparation des solutions tampons :

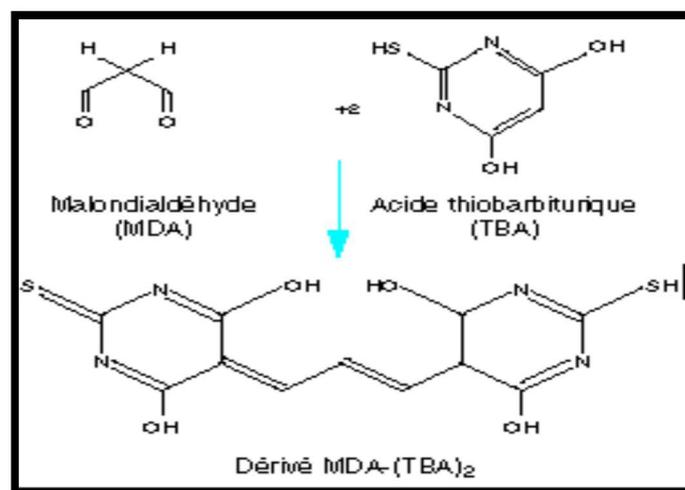
- **Solution H₂O₂** : (à conserver à 4°C et à l'abri de la lumière) 1.7 mL de H₂O₂ (30 %) + 100mL de tampon phosphate.

2.3.6/ Dosage de malondialdéhyde (MDA)

a/ Principe :

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 doubles liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipopéroxydation *in vitro*. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'Esterbauer et *al.*, (1992).

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.



b/ Protocole :

Prélever 0,5 ml de l'homogénat, ajouter 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) 5 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %, mélanger et incuber au bain marie à une température de 90 °C pendant 15 minutes. Refroidir et additionner à 0.5 ml de surnageant 4 ml de *n*-butanol. Centrifuger pendant 10 minutes à 2500 tours/min. Récupérer le surnageant, et lire la densité optique à 532 nm contre le blanc.

c/ Calcul de la concentration du MDA :

La quantité du MDA dans un échantillon est exprimée en nm/mg de tissu (hépatopancreas).

Elle est déterminée par la formule de Beer-Lamber : **DO= E.C.L**

$$\text{MDA (mmol MDA/mg de protéines)} = \frac{DO \times 106}{\epsilon \times L \times \chi \times Fd}$$

- **DO** : Densité optique lue à 532 nm ;
- ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- **L** : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;
- χ : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;
- **Fd** : Facteur de dilution = 0.2083.

d/ Préparation des solutions tampons :

- **Solution TCA 5%** : dissoudre 5g de l'acide trichloroacétique (TCA) dans 100 ml eau distillée.
- **Solution TBA 0.67%** : dissoudre 0.67g de l'acide thiobarbiturique (TBA) dans 100 ml eau distillée

2.4/ Analyse statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins ($M \pm SD$) l'écart type moyen, la comparaison entre les différents groupes sont effectuées après une analyse de la variance (ANOVA), les moyennes sont comparées par un test *t* de Student.

L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au logiciel MINITAB (Version 16.0).

3/ RESULTATS

3.1/ Les métabolites

3.1.1/ Concentration des protéines

Nos résultats montrent que la teneur en protéines est augmentée pour les trois groupes traités avec l'oxyde de fer nanométrique, l'analyse statistique montre que cette augmentation est hautement significative pour les groupes traités avec la dose 1mg/g et la dose 2 mg/g. Cependant, elle est très hautement significative pour la 3^{ème} dose par rapport aux témoins (Fig 35).

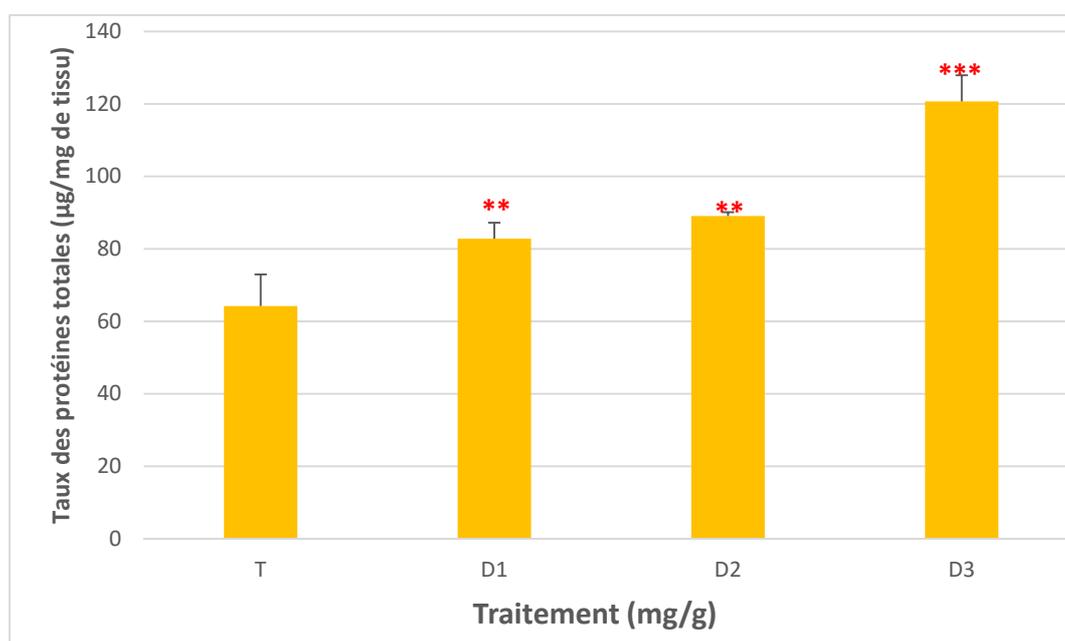


Figure 35 : Concentration des protéines hépatopancréatique de *Helix aspersa* après six semaines de traitement avec les NPs Fe₂O₃.

3.1.2/ Concentration des glucides

Les résultats bruts montrent que les concentrations des glucides dans l'hépatopancréas des escargots traités sont augmentés, l'analyse statistique confirme que cette augmentation qui est très hautement significative pour les trois lots traités avec l'oxyde de fer nanométrique par rapport au témoin (Fig. 36).

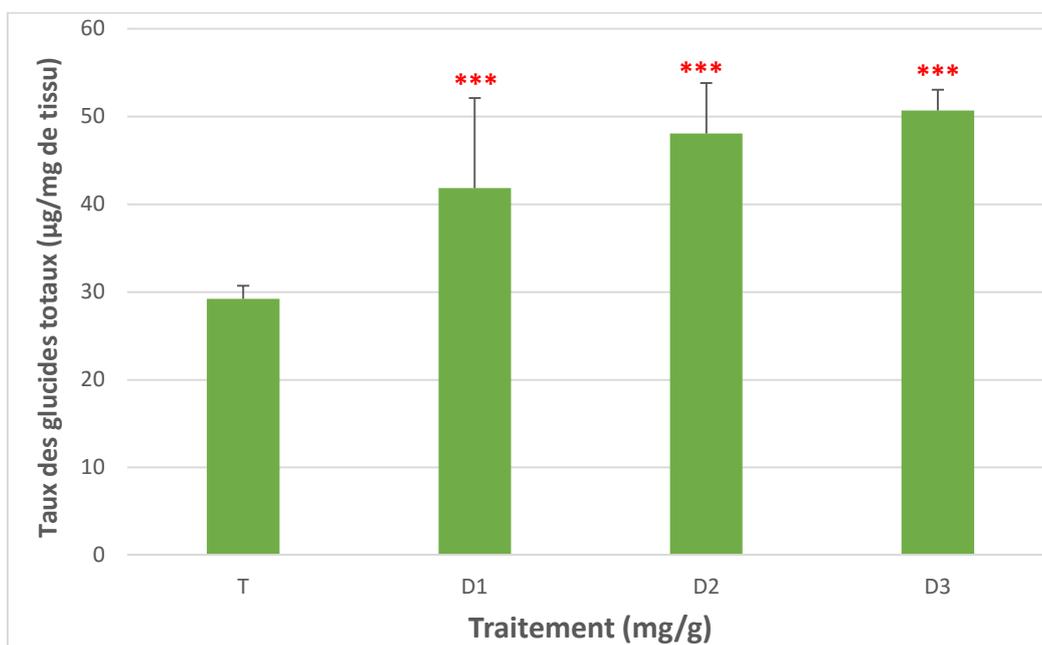


Figure 36 : Concentration des glucides dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après six semaines de traitement avec les NPs Fe₂O₃.

3.1.3/ Concentration des lipides

Selon les moyennes des résultats, on observe une diminution de taux des lipides hépatopancréatique d'une manière dose-dépendante. Statistiquement cette diminution est non significative pour le lot traité avec la plus faible dose, mais elle est très hautement significative pour les deux autres groupes traités (avec 2 et 3 mg/g) par rapport au témoin (Fig. 37).

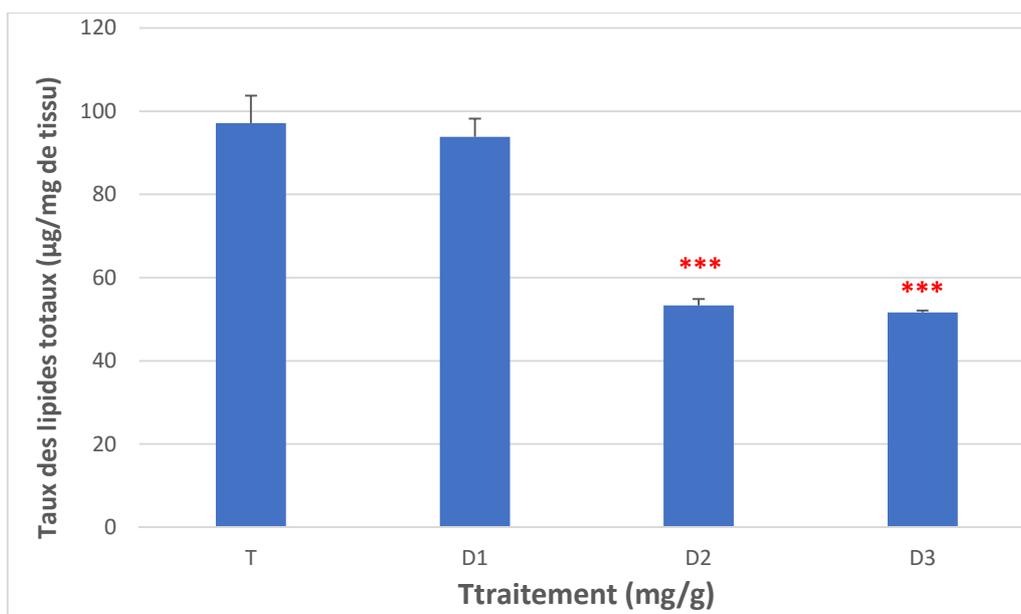


Figure 37 : Concentration des lipides hépatopancréatique de *Helix aspersa* après six semaines de traitement avec les NPs Fe₂O₃.

3.2/ les paramètres du stress oxydant

3.2.1/ Concentrations de glutathion hépatique (GSH)

Le taux de glutathion des trois groupes contaminés est augmenté par rapport aux taux du glutathion chez les échantillons témoins. Les tests statistiques de dosage de GSH montrent qu'il existe une différence non significative entre les moyennes des doses des échantillons de la 1^{ère} dose et le groupe témoins. Alors qu'elle est très hautement significative entre les échantillons témoins et le 2^{ème} et le 3^{ème} groupe traités (Fig. 38).

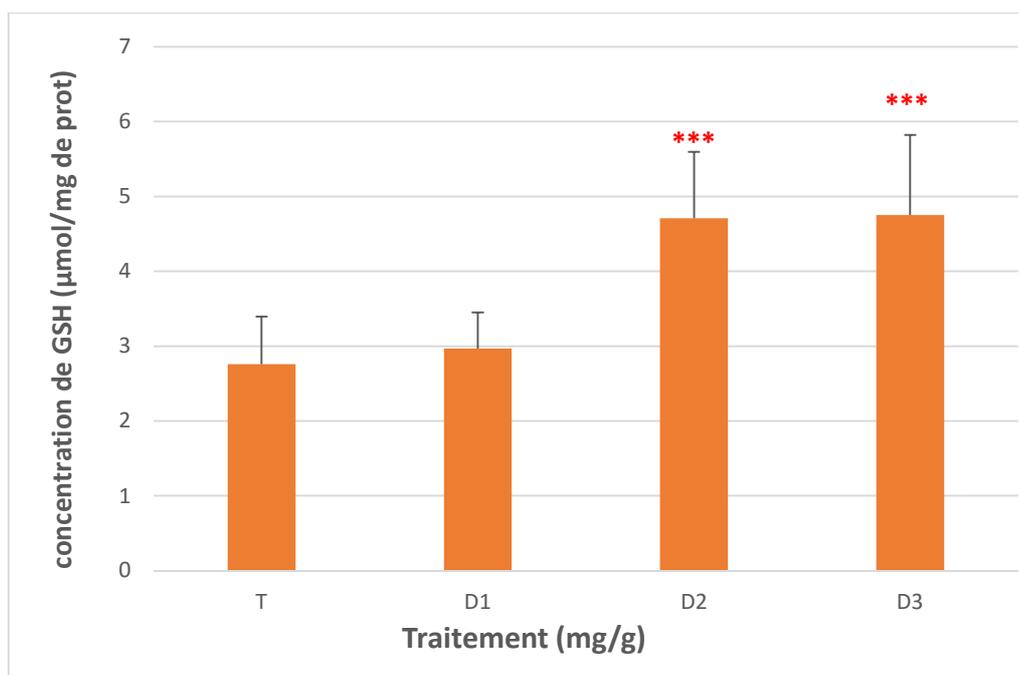


Figure 38 : Concentration du glutathion dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après six semaines de traitement avec les NPs Fe₂O₃.

3.2.2/ Activités enzymatiques du glutathion S-transférase (GST)

Les résultats obtenus montrent une augmentation du GST chez les trois groupes contaminés. L'analyse statistique révèle une augmentation significative pour le groupe traité à la dose 1mg/g, hautement significative pour le groupe traité avec la dose 2mg/g et très hautement significative pour le groupe traité avec la dose 3mg/g du Fe₂O₃ nanométrique par rapport au témoin (Fig. 39).

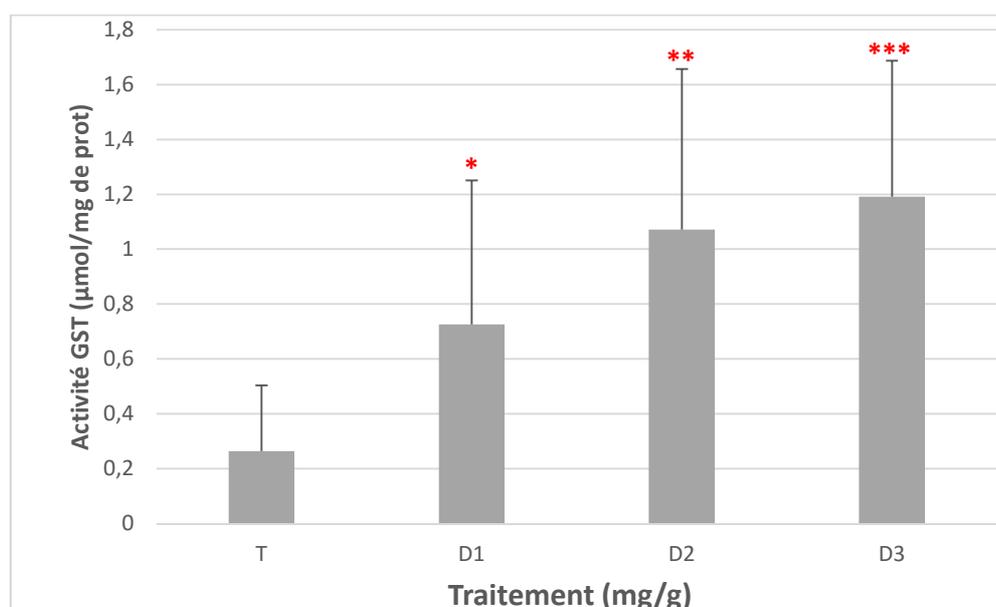


Figure 39 : Activité enzymatique du glutathion s-transférase dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après six semaines de traitement avec les NPs Fe₂O₃.

3.2.3/ Activités enzymatiques du glutathion peroxydase (GPx)

Le taux de glutathion peroxydase des trois groupes contaminés est augmenté par rapport à celui des témoins. Les résultats statistiques de dosage de GPx montrent que cette augmentation est non significative pour la 1^{ère} et la 2^{ème} dose. Alors que la différence est hautement significative entre les échantillons témoins et le 3^{ème} groupe traités (Fig. 40).

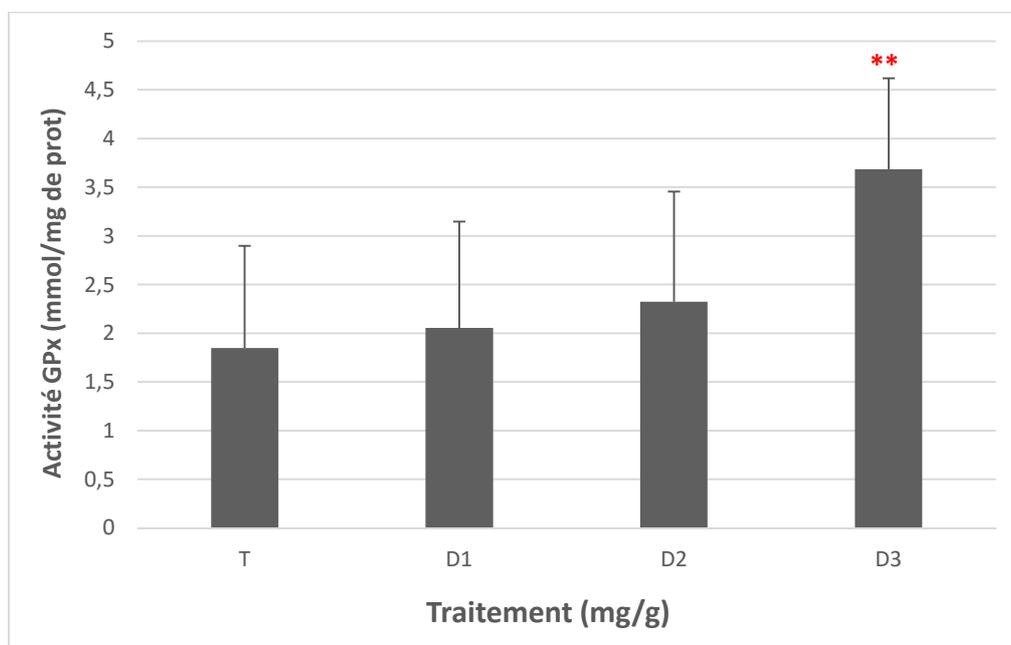


Figure 40 : Activité enzymatique du glutathion peroxydase dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après six semaines de traitement avec les NPs Fe₂O₃.

3.2.4/ Activités enzymatiques de la catalase

Les moyennes des différents groupes étudiés font ressortir une diminution de taux de la catalase hépato pancréatique. Statistiquement cette diminution est non significative pour le lot traité avec la plus forte dose (3mg/g), mais elle est hautement significative pour les deux autres groupes traités (avec 1 et 2mg/g) par rapport au témoin (Fig. 41).

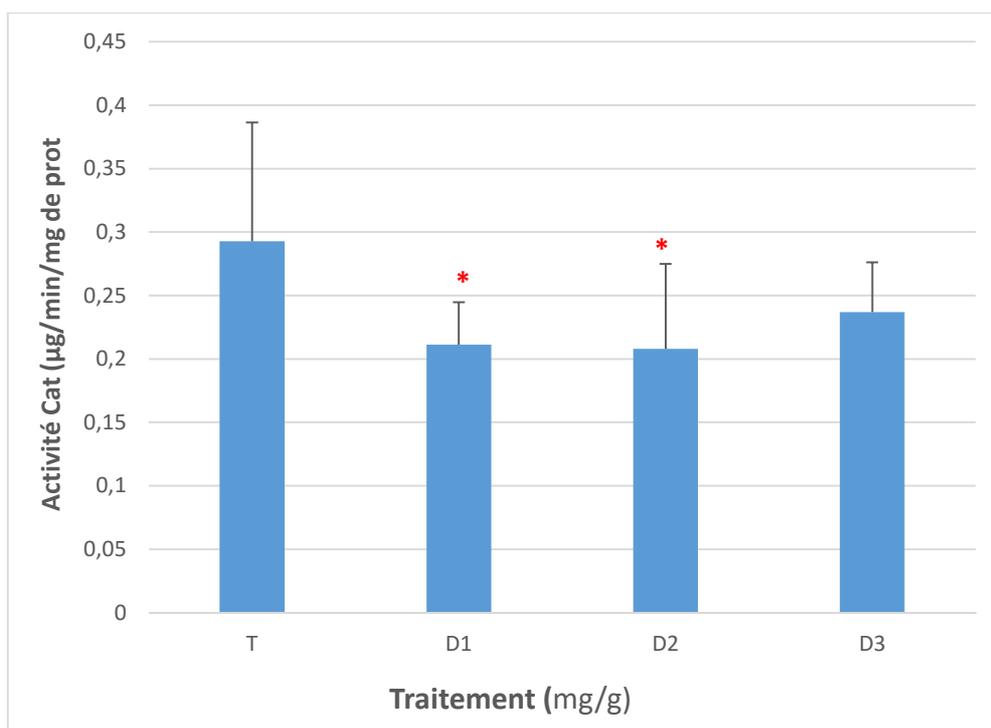


Figure 41 : Activité enzymatique de la catalase dans l'hépatopancréas de *Helix aspersa* après six semaines de traitement avec les NPs Fe₂O₃.

3.2.5/ Concentration de Malondialdéhyde (MDA)

Le taux du Malondialdéhyde hépatopancréatique des trois groupes contaminés est augmenté par rapport aux taux du MDA des échantillons témoins et ce d'une manière dose-dépendante. Les résultats statistiques montrent qu'il existe des différences significatives entre les moyennes des doses des échantillons de la 1^{ère} dose et le groupe témoins. Alors que les différences sont hautement significatives entre les échantillons témoins et les deux autres groupe traités (Fig. 42).

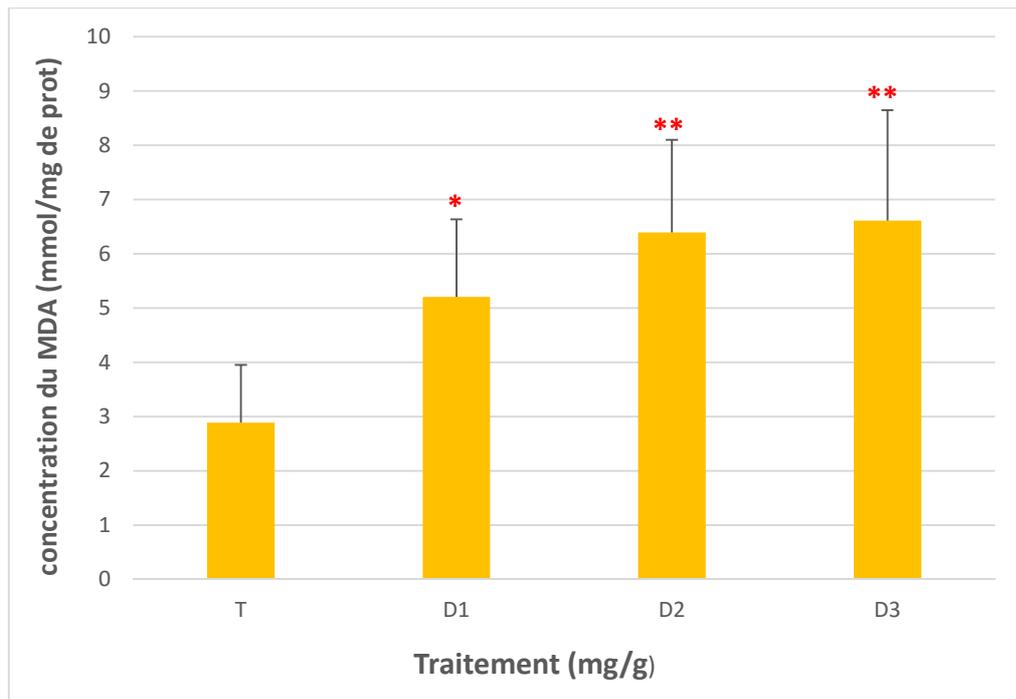


Figure 42 : Concentration du MDA dans l'hépatopancreas de *Helix aspersa* après six semaines de traitement avec les NPs Fe₂O₃.

4/ DISCUSSION

Les paramètres biochimiques chez les espèces exposées à des substances toxiques sont considérés comme des bons biomarqueurs et peuvent constituer un important outil de diagnostic pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (Forbes et *al.*, 1997 ; Mcloughlin et *al.*, 2000). Les résultats de dosage des paramètres biochimiques montrent une augmentation du taux des protéines et des glucides, une baisse de niveau des lipides.

Les protéines sont les premiers biomarqueurs de perturbation métabolique. L'évolution du taux de protéines totales dans l'hépatopancreas des escargots traités a augmenté (avec des différences très hautement significatives) et d'une manière dose-dépendante. Ce phénomène pourrait être considéré comme un biomarqueur précoce de l'exposition aux contaminants chimiques. Les protéines sont principalement impliquées dans l'architecture de la cellule; les protéines peuvent également lier les toxines et jouer le rôle des protéines de transport (Cui et *al.*, 2010).

Lorsque des organismes vivants sont soumis à des changements dans leur environnement, ils sont soumis à un stress intense, qui peut même aboutir à la mort d'organismes sans que ce dernier puisse réagir en particulier lorsque leurs enzymes de détoxification sont diminuées, ce stress peut être moins intense, ce qui permet alors l'organisation afin de déployer une batterie de réponses, par

l'activation de leurs mécanismes de détoxification, pour se battre pour survivre et dans certains cas, s'acclimater à ce nouveau paramètre (Lagadic et *al.*, 1997).

La synthèse des protéines totales implique plusieurs cas, en particulier l'induction d'activités enzymatiques : les enzymes de détoxification / métabolisation. Cette augmentation peut être expliquée aussi par Kohler et *al.*, (1992) qui ont proposé une hypothèse qui explique comment les oxydes métalliques provoquent la synthèse des protéines de stress (enzymes de détoxification).

Chez les rongeurs, Zhu et *al.*, (2008) a trouvé une augmentation significative du taux des protéines totales chez des rats exposés à différentes concentrations d'oxyde de fer nanométriques. Aussi chez les gastéropodes terrestres, Grara et *al.*, (2012) qui ont montré une variation des protéines chez des escargots traités par des métaux lourds et dans le même ordre d'idées que Boucenna et *al.*, (2005) qui montré des manifestations toxiques des poussières métalliques sur *Helix aspersa*, ces résultats ont été accompagnés par une induction dose-dépendante de la synthèse protéique.

La présence des métaux peut également induire la synthèse des protéines permettant ensuite la connexion entre eux (Zidar et *al.*, 2009). Le transfert d'une partie de l'oxyde de fer nanométrique en une forme granulé avec des protéines spécifiques de transport correspond à des voies de détoxification intracellulaires décrites dans les invertébrés du sol. Les métaux ont tendance à se lier à des métalloprotéines cytoplasmiques. De métaux métalloprotéines peuvent alors être excrétés sous forme d'agrégats après une action lysosomale (Pihan et *al.*, 2001).

Concernant les glucides totaux, ceux-ci ont montré pour les différents groupes traités une augmentation significative par rapport au groupe contrôle, cette augmentation peut être expliquée par plusieurs hypothèses comme celle de l'augmentation de la métabolisation des réserves énergétiques qui est prouvée par le pourcentage de consommation d'aliments qui est diminué par rapport au témoin d'une façon dose-dépendante, mais pas de manière significative (plus de 75% de la nourriture est consommée dans les trois groupes traités). La diminution du taux des lipides totaux vient confirme cela. Afin d'assurer l'énergie nécessaire pour les réactions de désintoxication, le corps utilise des éléments de rechange et les dégradent pour augmenter le taux de glucose. Pour la même espèce, Jumel et Lagadic (2000) rapportent une augmentation de la demande énergétique des animaux qui se traduit par une mobilisation rapide de glycogène du manteau. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Saravanan et *al.*, (2015) qui a proposé l'hypothèse de l'élévation du niveau de glucose dans le sang comme réponse à des perturbations respiratoires dues au stress causé par les NPs du Fe₂O₃ d'une taille inférieure à 50 nm (1 et 25 mg/L) appliquées à des carpes (*Labeo rohita*) durant 96 h.

Aussi pour le taux des lipides totaux, nos résultats montrent une diminution dose-dépendante chez les escargots traités aux NPs Fe₂O₃ par rapport aux escargots témoins. Nos résultats sont en accord avec ceux de Grara et *al.*, (2012) qui a aussi enregistré une diminution significative de la concentration en lipides totaux de *Helix aspersa* traité aux métaux lourds.

Dans des conditions de stress, les escargots ont besoin de plus d'énergie pour métaboliser la substance toxique. En effet, la diminution dose-dépendante du taux des lipides après exposition de *Helix aspersa* aux NPs Fe₂O₃ peut être due à la contrainte chimique provoquée par le xénobiotique testé. Cependant Eissa et *al.*, (2002) ont rapporté que l'effet néfaste des composés chimiques pourrait être attribuée à une augmentation dans l'utilisation de l'énergie et/ou l'altération des organites cellulaires et peut interférer avec la synthèse des protéines.

Le système de défense antioxydant est présent chez tous les cellules aérobies et neutralisent les réactions chimiques intermédiaires produit par le voie endogène et/ou le métabolisme des xénobiotiques (winston et Di Giulio, 1991). L'activité du système antioxydant peut subir une augmentation ou une inhibition sous l'effet d'un stress chimiques.

En général, le stress oxydatif provoqué par une particule est considéré comme l'un des mécanismes les plus importants de toxicité des nanoparticules, en particulier pour les particules contenant des métaux de transition. A la base des résultats expérimentaux (Siméonova et Luster., 1995; Chao et *al.*, 1996), ils ont émis l'hypothèse que les maladies respiratoires et cardiovasculaires provoquées par un métal de transition ou à l'exposition aux oxydes métalliques peut être due à l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS). Zhu et *al.*, (2008) ont démontré que les nanoparticules et les submicroniques particules du Fe₂O₃ pourraient générer l'inflammation et la médiation du stress oxydatif dans les poumons des rats aussi bien aux faibles ou aux fortes doses d'exposition intratrachéale.

Le stress oxydatif a été proposé comme un mécanisme de lésions cellulaires induites par de nombreux types de nanoparticules (Fig. 48) (Stone et *al.*, 2007; Ali et *al.*, 2012).

Il a été proposé que les métaux de transition tels que le fer peuvent contribuer à la production de ROS intracellulaire par réaction du type Fenton (Stohs et Bagchi, 1995). Fe³⁺ théoriquement peut être réduit par l'anion superoxyde en Fe²⁺, qui réagissent ensuite avec H₂O₂ pour produire (OH) (Stohs et Bagchi, 1995). En effet, il a été démontré que les nanoparticules Fe₂O₃ sont capables de pénétrer à travers la membrane des cellules épithéliales respiratoires et libérer Fe³⁺ dans les lysosomes acides (Guo et *al.*, 2009). Fahmy et Cormier (2009) ont proposé que l'activité de surface des nanoparticules d'oxydes métalliques influence l'effet biologique de ces particules. Les

procédés de fabrication utilisés rendent les particules hydrophiles ou lipophiles, catalytiquement actives ou passives et modifient les propriétés électroniques de la surface des particules. La production des ROS de manière extracellulaire peut oxyder les lipides de la membrane cellulaire, peut diffuser à l'intérieur de la cellule et initier la production des ROS intracellulaire ou intramitochondriale (Landar et *al.*, 2006).

Fukui et *al.*, (2015) suggère qu'il existe deux possibilités pour le mécanisme de génération de ROS. En plus, on pense que le mécanisme direct est une réaction du type Fenton. En outre, il est également possible que le mécanisme indirect est induit par un dysfonctionnement du système de transport d'électrons mitochondriale causé par les ions libéré par les NPs métalliques.

Dans notre étude, le GSH le GST et le GPx sont mesurés simultanément pour évaluer le stress oxydatif dans l'hépatopancréas des escargots après exposition à des différentes doses des NPs d'oxyde de fer. Une augmentation du taux des trois paramètres GSH, GPx et GST a été trouvé, indique que le système de défense antioxydant dans le tissu hépatopancréatique pourrait être surchargé. Il est connu que le superflu ROS peut réagir avec le NO dans le procédé de production hautement réactif et les produits cytotoxiques d'azote, tels que le peroxy-nitrite (ONOO-) et de l'acide peroxy-nitrique (ONOOH). Le Peroxy-nitrite à son tour, réagit avec et modifie diverses molécules, telles que les lipides, l'ADN et les protéines, ce qui entraîne un déficit fonctionnel.

L'augmentation du taux de glutathion réduit (GSH) est très hautement significative et particulièrement chez le 2^{ème} et le 3^{ème} groupe. Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales : c'est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, y compris les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les métaux (Dickinson et Forman, 2002).

Cette augmentation peut être expliquée par la liaison directe du glutathion au métal (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, et par conséquent l'inhibition de leur transformation en GSSG. Dans le même sens d'idée, on peut aussi utiliser l'hypothèse d'Ali et *al.*, (2012) qui dit qu'il y a une forte affinité des nanoparticules métalliques pour la molécule de GSH.

Après une étude Hatcher et *al.*, (1995) suggèrent que la synthèse de GSH en présence de métaux serait un mécanisme de protection dans lequel le métal se fixe aux groupements thiols du GSH, prévenant ainsi les dommages cellulaires.

En effet, l'affinité des métaux vis-à-vis des groupements thiols forme des complexes avec ces entités chimiques. Cette interaction métal-glutathion conduit généralement à la formation des radicaux éthyles (-S°). Bien que ces radicaux soient relativement stables et puissent interagir entre eux pour former des ponts disulfures non radicalaires, ils peuvent également réagir avec l'oxygène et ainsi générer des espèces réactives de l'oxygène (Galaris et Evangelou, 2002) et des radicaux libres responsables de lésions tissulaires importantes, Ceci souligne le rôle important du glutathion dans la gestion d'un stress métallique (Altar et al., 1987; Christova et al., 2003).

D'une part les réactions des métaux avec le glutathion se traduisent soit par la formation de complexes ou l'oxydation du GSH (Regoli et Principato, 1995) et ces deux réactions pourraient expliquer l'augmentation du glutathion. D'autre part, le GSH est à l'origine de la synthèse de métallothionines. Ces dernières sont spécialisées dans la chélation des métaux, ce qui explique cette augmentation du GSH.

Une recherche a démontré que l'activité du gène GCL « Glutamate cystéine ligase » peut être augmentée rapidement après l'exposition au stress oxydatif induit une augmentation de la formation de GCL holoenzyme (Krejsa et al., 2010). L'expression de ARNm GCLC et GCLM "catalytique ou modifiant" accrue peut être un marqueur direct d'un stress oxydatif (Thompson et al., 1999). Dans l'étude de Guo et al., (2015), la transcription du GCLC a été augmentée après application de ses nanoparticules sur des cellules endothéliales *in vitro*, ils ont lié cette augmentation de transcription de ce gène par l'augmentation de la synthèse du glutathion. Weldy et al., (2011), a aussi observé des niveaux accrus dans la transcription des GCLM GCLC endothéliale et ainsi que GSH après exposition aux nanoparticules du gaz d'échappement diesel, ce phénomène peut être mis en corrélation avec la dose d'exposition, le temps, la taille des particules et d'autres propriétés physico-chimiques des NPs, ainsi que le type cellulaire étudié, etc.

Les glutathion S-transférases (GSTs) représentent une famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés électrophiles. La fonction des GSTs la plus connue est leur activité de catalyser des réactions de conjugaison entre, le glutathion et des substances nocives pour diminuer leurs réactivités avec les macromolécules intracellulaires.

Les GST complètent l'action des glutathion peroxydases (GPx) dans la seconde ligne de défense enzymatique antioxydante, les GSTs préviennent les dommages cytotoxiques et génotoxiques causés par les composés électrophiles générés comme produits de dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (Hayes et Pulford, 1995).

Cette enzyme joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à

leur exposition au stress oxydant (Hayes et Pulford, 1995). Plusieurs isoformes et classes de GST ont été isolés et déterminés comme biomarqueurs moléculaires d'exposition au tétrabromodiphényl-ether chez les mollusques bivalves (Li et *al.*, 2015)

D'après nos résultats, on observe des augmentations très significatives de la GST dans l'hépatopancréas. Donc la GST est impliquée dans la détoxification et l'élimination de l'oxyde de fer nanométrique et de ces métabolites. Les résultats de Boucenna, (2016) sont conformément d'accord avec ceux que nous avons trouvé, quatre doses de Fe₂O₃ nanométrique (100, 500, 1000 et 1500 µg/g) sont testées sur l'escargot *Helix aspersa* durant 8 semaines.

Sur une nouvelle ligne de cellule Dubey et *al.*, (2015) a testé deux doses (25 et 12,5 mg/l) des nanoparticules de TiO₂ et ZnO, une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (GST) a été observée, qui peuvent en partie être expliquées par le fait que l'augmentation des ROS peut conduire à la transcription des gènes redox-sensibles.

L'activité de GST élevée suggère l'utilisation de GSH dans les réactions de conjugaison qui sont augmentées dans le cadre du mécanisme de désintoxication. Un statut antioxydant altéré comme indiqué dans notre étude est confirmé par les résultats d'autres enquêtes, Prabhakar et *al.*, (2012) ont signalé une augmentation des activités enzymatiques de SOD et de la GST dans les tissus de rats exposés aux NPs d'oxyde d'aluminium. L'administration des NPs TiO₂ à des souris pendant 14 jours, induit un stress oxydatif significatif prouvé par une augmentation du taux de GST (Ma et *al.*, 2010).

Dans des travaux différents plusieurs xénobiotiques ont été testés sur *Helix aspersa*, des poussières métalliques (Larba et Soltani, 2014), des pesticides organophosphorés (Ismert et *al.*, 2002, Balhaouchet et *al.*, 2012. Ait Hamlet et *al.*, 2012, Radwan et Mohamed, 2013), des métaux lourds (Grara et *al.*, 2012), des ETM (Regoli et *al.*, 2006) et des nanoparticules d'oxydes métalliques (Boucenna, 2016 « Fe₂O₃ et Al₂O₃ ») et une induction de l'activité GST a été signalé.

Sur d'autres mollusques, le bivalve *Scrobicularia plana* et le polychète *Hediste diversicolor*, Mouneyarc et *al.*, (2014) notent que les effets des nanoparticules métalliques d'Ag, Au, Cu Cd et de Zn induisent une augmentation de la GST. Aussi Buffet et *al.*, 2013 et 2011 ont enregistré une augmentation du GST après exposition des mollusques bivalves *Scrobicularia plana* à des NPs d'Ag.

Chez le poisson *Anguilla anguilla* une augmentation très significative de l'activité GST est également observée après 72 heures d'exposition aux nanoparticules d'oxyde de fer (Radu et *al.*, 2010). Une étude *in vitro* sur des cellules de la même espèce (*Anguilla anguilla*) exposées aux IONPs montre une augmentation significative de la GST et un changement dans le mécanisme de désintoxication, Srikanth et *al.*, (2014) suggère que le GST joue un rôle de protection contre les

dommages oxydatifs des cellules . Sur des branchies *Oncorhynchus mykiss* Johari et *al.*, (2016) et suite à une exposition chronique à des concentrations sublétales des nanoparticules d'argent, ils ont trouvés à la fin de l'étude un taux élevé de GST.

Tous les travaux expliquent cette augmentation par l'activité détoxifiante du système antioxydant. La GPx est une enzyme antioxydante clé qui règle le niveau des ROS (la GPx est capable de non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés) et donc protège les cellules contre les dégâts générés par les xénobiotiques (Wang et *al.*, 1997; Jing et *al.*, 1999).

L'augmentation significative de l'activité de l'enzyme GPx dans les cellules maillantes d'*A. anguilla* exposées à des IONPs est due à l'élimination des excès de peroxyde d'hydrogène en évitant d'endommager les cellules Srikanth et *al.*, (2014).

Fahmy et Cormier (2009) ont déclaré que toutes les nanoparticules d'oxyde métallique ont été en mesure de générer des ROS; cependant, le CuO nanométrique est capable d'inhiber l'activité de la catalase et d'augmenter l'activité de la GPx par rapport aux cellules témoins, et même de bloquer les défenses antioxydantes de la cellule par une augmentation du taux de glutathion total.

L'exposition à des niveaux sublétaux de cadmium augmente le GPx dans le tissu hépatique et rénal de l'*Oreochromis mossambicus* (tilapia) (Basha et Rani, 2003). Aussi dans l'étude de (Scown et *al.*, 2010) en utilisant la technique de PCR en temps réel, l'expression de GPx dans le foie et les branchies de la truite arcenciel n'est pas affectée de façon significative après l'exposition à NPs d'Ag.

D'après nos résultats on observe une augmentation de l'activité GPx dans les hépatopancréas des escargots traités par l'oxyde de fer nanométrique. Cette augmentation est due principalement à un début de production de peroxyde d'hydrogène et l'augmentation de GSH. Ce qui entraîne une augmentation de l'activité enzymatique de la GPx (GPx a besoin du glutathion pour fonctionner correctement) (Nielson, 1995). GPx initie la rupture du H₂O₂ seulement à des concentrations faibles, alors que le CAT a besoin des niveaux élevés de H₂O₂ pour commencer son activité (Reddy et *al.*, 2015).

La catalase est une enzyme hémique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Avec le fer comme cofacteur, la catalase est essentiellement présente dans les peroxysomes hépatiques, mais aussi dans les hématies et les mitochondries de cellules cardiaques (Putnam et *al.*, 2000). La catalase et la GPx deux enzymes appartiennent au mécanisme de défense primaire contre les ROS en catalysant la conversion peroxyde d'hydrogène en eau (Franco et *al.*, 1999; Hirrlinger et *al.*, 2002).

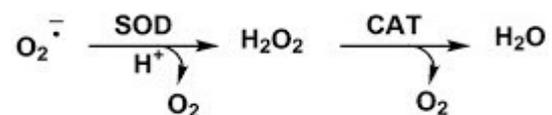
L'induction de l'activité catalase se manifeste d'une manière irrégulière. Des études montrent tantôt une augmentation de l'activité (Diguilio *et al.*, 1993), tantôt une baisse (Labrot *et al.*, 1996). Une des hypothèses retenue est que cette activité enzymatique semble très sensible aux facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle (Pellerin-Massicote, 1994).

Fahmy *et al.*, (2014) postulent que le Fe₂O₃ inhibe l'activité enzymatique catalase des cellules exposées.

Siddiqui *et al.*, (2015) suggèrent que le stress oxydatif peut-être le principal mécanisme de toxicité dans la lignée cellulaire de fibroblastes de peau de souris (L929) induite par les Mo-NPs (molybdène NPs), par la diminution de l'activité enzymatique catalase antioxydant. Ils ont également constaté une diminution du potentiel membranaire mitochondrial (MMP) qui indique le rôle du stress oxydatif dans la toxicité des Mo-NPs. Cette diminution, suggère une intégrité mitochondriale moins préservée. Le nombre de cellules peut être diminué (diminution de division cellulaire) en raison de la production de radicaux d'oxygène pendant la respiration mitochondriale, ce qui suggère une corrélation possible entre le stress oxydatif et l'activité mitochondriale

Panda *et al.*, (2003) et Dimkpa *et al.*, (2012) ont expliqué l'absence de l'augmentation des activités CAT avec les NPs ZnO par la non-réactivité de ces enzymes aux ions Zn dans le blé, on peut dire la même chose pour les ions Fe dans les cellules hépatopancréatiques.

Le superoxyde dismutase est spécialisé pour convertir le radical superoxyde moins toxique à l'hautelement toxique H₂O₂, alors que l'enzyme catalase réduit H₂O₂ en H₂O. La diminution du SOD signifié la diminution du catalase suggère Alarifi *et al.*, (2013), le superoxyde dismutase assure l'eau oxygéné qu'est le substrat de la catalase :



Fahmy *et al.*, (2014) mentionnent une activité catalase et SOD au niveau de l'hémolymphe chez l'escargot *Biomphalaria alexandrina* traité par des différentes doses de NPs d'oxyde de zinc. Ils ont suggéré à la fin de l'étude que le ZnO inhibe la catalase. L'exposition de la moule *Mytilus* par les NPs de SiO₂ induit également une forte inhibition de l'activité catalase.

Chez d'autres escargots des eaux douces, des NPs sont appliqués et une activité catalase est diminué, avec *Lymnea luteola* Ali *et al.*, (2014) ont appliqué un traitement des NPs d'argent et avec *Dreissena polymorpha* et *Gammarus roeseli* Garaud *et al.*, (2015) ont testé des doses de 10 à 100µg/l des NPs de CeO₂.

Une étude de l'effet des NPs d'argent mais cette fois sur les vers de terre *Eisenia foetida* est traduite par un déséquilibre dans le système antioxydant et une diminution de l'activité catalase a été

marqué (Tsyusko et al., 2012 ; Gomes et al., 2015). Sarkar et Sil, (2014) mentionnent également une augmentation des ROS accompagné par une diminution de la catalase au niveau des hépatocytes isolées de souris et exposées à des NPs de Fe₂O₃.

Le MDA fait partie des aldéhydes réactifs issus de la décomposition des produits de la peroxydation lipidique. Il a été proposé comme biomarqueur du stress oxydant, en raison de son caractère mutagène et athérogène, il est le produit le plus étudié de la dégradation des LPO (Douki et al., 1996) .

L'un des produits finaux de l'oxydation lipidique par les radicaux libres et ROS, il est généralement connu comme étant un marqueur du stress oxydatif. La peroxydation des lipides insaturés encore donna lieu à plus de radicaux libres et alors cause des dommages des biomolécules, des blessures des membranes cellulaires et une cytotoxicité en liaison avec les ROS, comme indique l'augmentation du niveau de LDH et la libération des enzymes de l'inhibition de la viabilité cellulaire. Guo et al., (2015).

Dans notre étude une augmentation significative du taux de Malondialdéhyde est notée dans les hépatopancreas des escargots traités.

L'augmentation significative de la MDA a démontré que la peroxydation lipidique avait eu lieu ce qui confirme nos résultats de la diminution du taux des lipides totaux. Une autre possibilité d'aucune diminution peut résulter lors de la synthèse des NO, ce qui peut probablement prédire les lésions cellulaires. On suppose que le stress oxydatif des nanoparticules exercerait sur le phagocytose des macrophages (Donaldson et al., 1998) alors que les nanoparticules ont été trouvés déposer dans les parties les plus distales des poumons et en contact direct avec la membrane des voies aériennes (Brown et al., 2000).

Les résultats de Boucenna (2016) de l'évaluation toxicologique des NPs de Fe₂O₃ sur *Helix aspersa* soutient nos résultats. L'étude d'Utkarsh et al., (2015) montre que le taux de MDA a été augmenté dans les tissus d'une manière dépendante de la dose de IONPs des rats traités, ils ont expliqués ces niveaux élevés de MDA par la formation de radicaux hydroxyle qui à son tour associé aux LPO des tissus. Dans les hépatocytes des rats traités avec le Fe₂O₃ nanométrique, un taux élevé de MDA a été enregistré (Sarkar et sil, 2014)

Fahmy et al., (2014) ont trouvé une augmentation du taux MDA dans les tissus mous et l'hémolymphe suite à une évaluation de l'oxyde de zinc nanométrique sur les escargots des eaux douces *Biomphalaria alexandrinia* et aussi sur une ligne maligne de cellules de mélanome de la peau humaine Alarifi et al., (2013) ont trouvé cette augmentation avec les NPs de zinc.

Ali et al., (2014) ont trouvé un taux élevé de MDA dans l'hémolymphe de *Lymnaea luteola* traité avec des NPs d'argent, aussi avec le même type de NPs ce résultat a été trouvé au niveau des

branchies des moules *Mytilus galloprovincialis* et de ver de terre *Eisenia foetida* (Gomes et al., 2014, 2015).

L'évaluation des nanoparticules de titane aussi a révélé une augmentation dans le taux MDA, chez le poisson *Cyprinus carpio* par Linhua et al., (2009) et chez des souris par Abdelazim et al., (2015). Chez *Helix aspersa* plusieurs xénobiotiques ont induit une augmentation de MDA, les poussières métalliques (boucenna 2016), les métaux lourds (Grara et al., 2012), les pesticides (Bouaricha, 2013).

On peut dire que l'oxyde de fer nanométrique à une activité cytotoxique très importante qui n'est pas très différente de celle des métaux lourds micrométrique. D'autre part, les modifications fonctionnelles trouvées aux concentrations plus élevées peuvent être dues au jeûne causé par la répulsion des aliments contaminés et par conséquent par l'estivation induite.

Les différentes voies oxydantes sont proposées par Manke et al., (2013). Elles sont résumées dans la figure 43.

L'oxyde de fer à l'échelle nanométrique peut présenter partout, et les escargots peuvent être en contact avec lui toute la vie. Notre étude est une approche expérimentale sub-chronique dans les conditions de laboratoire et elle peut être insuffisante pour généraliser les résultats obtenus. Il peut être important de déterminer si ces réponses sont semblables au réel (Wang et al., 2005), parce que Wu et al., (2005) a conclu que, après des expériences en laboratoire tandis que certains marqueurs biologiques tels que l'induction d'enzymes et de l'intégrité des lysosomes sont clairement réversibles après réduction de la pollution, d'autres réactions telles que les lésions cellulaires et les pathologies peuvent être permanente et non réversible. Il est important d'élucider cette question en jouant sur les biomarqueurs ; les concentrations des xénobiotiques et la sensibilité du modèle biologique, les paramètres qui affectent l'échange du temps de récupération (Wu et al., 2005). Il serait intéressant de quantifier les nanoparticules d'oxyde de fer et de ses métabolites dans les tissus des mollusques pour élucider les effets de cette nanoparticule sur les escargots terrestres.

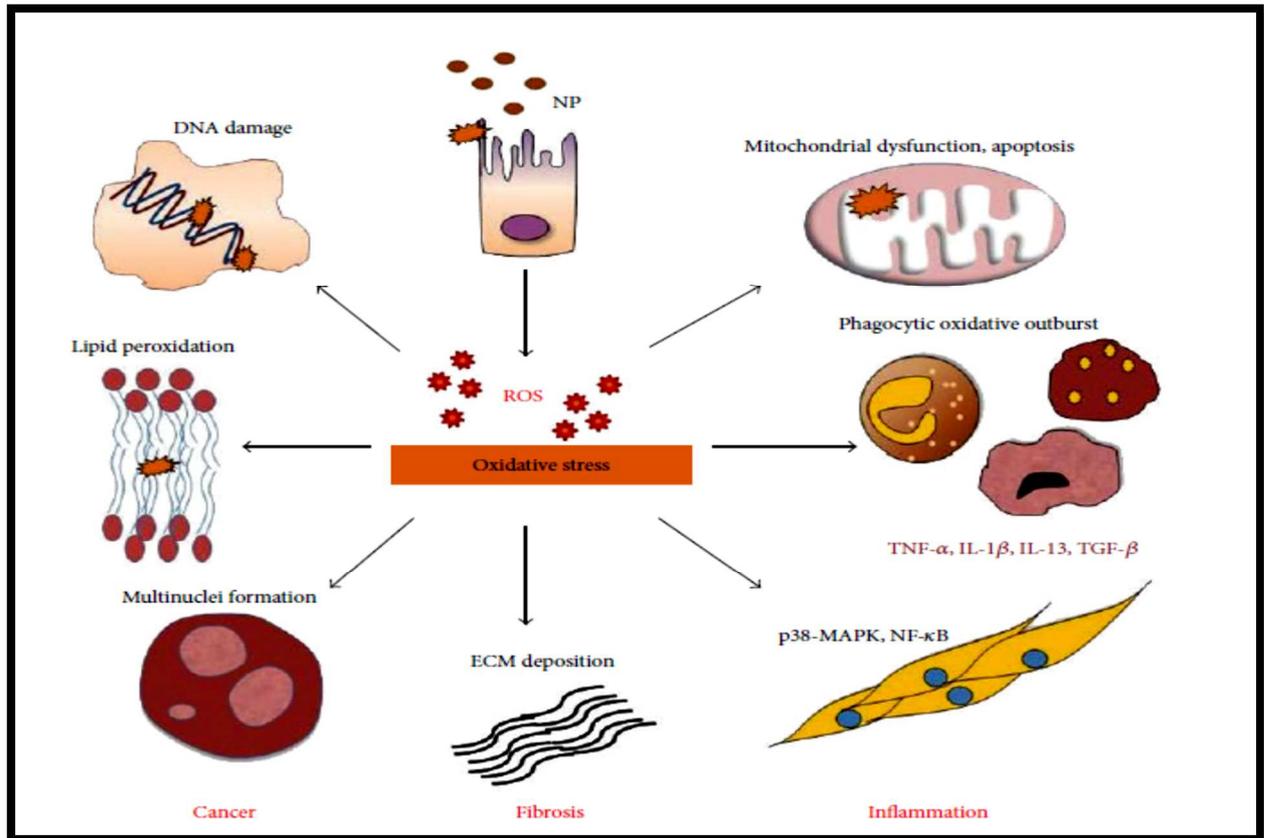


Figure 43 : voies peroxydant des NPs « toxicité induite » : divers NPs présentent un stress oxydatif (toxicité dépendante). (Manke et al., 2013)

lors de l'exposition à des NPs, la génération de ROS est capable d'induire des dommages oxydatifs de l'ADN, les cassures, la dénaturation des protéines et la peroxydation des lipides qui démontre ainsi les caractéristiques mutagènes et cancérigènes associées aux NPs. La production excessive des radicaux libres conduit à des lésions de la membrane mitochondriale provoquant la nécrose et la mort cellulaire. Les phagocytes incluant les neutrophiles et les macrophages produisent des ROS massives et suite à la phagocytose incomplète des NPs à travers le système enzymatique NADPH-oxydase. Alors que les ROS induite par les NPs déclenche une cascade inflammatoire de chimiokines et de l'expression de cytokines par l'intermédiaire de l'activation des voies de signalisation cellulaire, tels que MAPK, NF- κ B, Akt, et RTK. En outre, le stress oxydatif qui médié la stimulation de ces mécanismes cellulaires c'est un résultat de la transcription des gènes responsables de la fibrose, EMT et carcinogénèse. Les NPs suscités les ROS sont au centre de la scène pour la majorité des effets indésirables qui en découlent.

5/ CONCLUSION

Nous avons montré à l'issue de ce travail que l'exposition sub-chronique de *Helix aspersa* à des nanoparticules d'oxyde de fer n'est pas suffisamment différente de celle des oxydes métalliques micrométriques. Avec les doses choisies, nous avons révélé des augmentations significatives des enzymes de détoxification et de protéines de transport (taux de protéines totales) diminution des besoins énergétiques (taux de glucides totaux et lipides totaux).

En effet, suite aux perturbations trouvées au niveau du système enzymatique antioxydant (augmentation des taux de GSH, GST, GPx et MDA et diminution de l'activité catalase), il semblerait que le Fe₂O₃ nanométrique est indicateur du stress oxydant en raison de l'induction d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives à l'azote (RNS) qui induisent par l'histo-accumulation hépatopancréatique des nanoparticules de fer chez les escargots terrestres *H. aspersa* exposés à ces nanoparticules des dégâts au niveau cellulaire.

Chapitre 4 : Etude histologique de l'effet des NPs de Fe₂O₃

1/ OBJECTIF DU TRAVAIL

A partir des résultats obtenus dans la partie précédente, une étude histologique devient inévitable, les explications et les hypothèses proposées de tout changement sont d'une origine cellulaire et situées dans des tissus vitaux très sensibles. L'étude de ces dommages ultrastructuraux représente un outil puissant pour révéler les effets d'une exposition sublétales à des xénobiotiques et indiquer leurs sites et leurs modes d'action au sein de différents types cellulaires, comme les cellules rénales et hépatiques (Triebkorn et *al.*, 1997; Braunbeck, 1998; Gernhöfer et *al.*, 2001). Les dommages ultrastructuraux sont considérés comme des biomarqueurs sensibles, peu variables dans le temps et intégrateurs d'effets liés à différents stress environnementaux incluant la contamination chimique (Braunbeck et Völkl, 1993). L'hépatopancréas, site important du métabolisme, de l'accumulation, de la biotransformation, et de l'excrétion de nombreux xénobiotiques, fait partie des organes les plus étudiés (Odendaal et Reinecke, 2003; Hamed et *al.*, 2007; Radwan et *al.*, 2008).

Les métaux sont pris principalement par le rein et la glande digestive ; Ainsi, ces organes peuvent être des cibles appropriées pour étudier la réponse cellulaire. Par ailleurs, le rein des mollusques est impliqué dans les fonctions excrétrices et de réserve (Andrews, 1981), et par la suite, les phénomènes liés à l'excrétion de métal et les pathologies de l'épuisement des réserves doivent être observée dans cet organe, ainsi que les altérations dues aux blessures cellulaires générales.

Dans cette dernière partie, nous nous proposons d'évaluer les atteintes histopathologiques au niveau de l'hépatopancréas et du rein de *Helix aspersa* exposé à des doses croissantes de Fe₂O₃ nanométrique (1, 2 et 3 mg/g).

2/ MATERIEL ET METHODES

2.1/ Préparation des échantillons

Les escargots ont été sacrifiés et trois hépatopancréas et reins de chaque groupe sont destinés aux études histologiques. Ces derniers subissent le protocole de fixation, inclusion, coupe, coloration et montage décrits ci-dessous pour des analyses en microscopie optique.

Les tractus génitaux de quatre échantillons de chaque lot ont été choisi aléatoirement, des photographies ont été réalisées juste après le sacrifice des animaux afin de réaliser des comparaisons morphologiques macroscopiques.

2.2/ Préparation des coupes histologiques

2.2.1/ Fixation

Après le prélèvement de l'hépatopancréas et du rein des escargots on les coupe en deux et on les place à l'intérieur de piluliers en verre de 50 ml remplis de formol dilué à 10%.

La fixation permet la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit impérativement être réalisée après la dissection de l'escargot (séparation du pied et des viscères quand les escargots sont encore vivants), par immersion de l'échantillon dans un grand volume de liquide fixateur, dans notre cas le liquide est le formol (Preece, 1972), compte tenu de leur taille, les échantillons séjournent trois jours dans ce fixateur.

2.2.2/ Inclusion

Cette étape a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Les échantillons sortis du formol sont rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine : d'une part son caractère hydrophobe, les échantillons doivent donc subir, dans un premier temps, une déshydratation par immersion successives dans des bains d'alcool à degré croissant (30 minutes dans un bain d'alcool à 70°, deux bains successifs de 15 minutes dans de l'alcool à 95° puis trois bains de 30 minutes dans de l'alcool à 100°). Ensuite, l'alcool est remplacé par du toluène (trois bains de 15 minutes chacun) afin d'imprégner les échantillons par le solvant de la paraffine (Fig. 44a).

Dans un deuxième temps, les échantillons sont placés à l'étuve dans un bain de paraffine liquide (étuve de 56 à 58°C) afin qu'elle les imprègne totalement. Après une nuit, les échantillons sont inclus dans la paraffine à l'aide de moules (barres de Leuckart) : après refroidissement, on obtient des blocs de paraffine durs, à l'intérieur desquels se trouvent les échantillons inclus et orientés selon le plan de coupe choisi.

2.2.3/ Coupe

Les coupes des blocs de paraffine, de 6µm d'épaisseur, sont réalisées par un microtome Leitz et sont collées sur des lames de verre grâce à l'eau albumineuse (Fig. 44c).

2.2.4/ Coloration

Comme les colorants sont en solution aqueuse, les lames doivent être déparaffinées avant de pouvoir être réhydratées (coloration à l'hématoxyline-éosine). Le déparaffinage consiste à chauffer les lames, jusqu'à fusion de la paraffine, avant de les immerger dans trois bains successifs de toluène. Ensuite, les lames sont plongées dans des bains d'alcool à degré décroissant (un bain d'alcool à 100°, deux bains d'alcool à 95° puis un bain d'alcool à 70°) puis colorées (Martoja et Martoja-Pierson, 1967; Gabe, 1968) (Fig. 44b).

2.2.5/ Montage

Après avoir subi une nouvelle déshydratation (deux bains d'alcool à 95°C puis à 100°, trois bains de toluène), les lames colorées sont montées entre lames et lamelles avec une résine synthétique, le baume de Canada. Les lames sont alors prêtes pour être observées au microscope optique.

2.2.6/ Observation

L'observation des coupes histologiques des deux organes est réalisée avec un microscope (Zeiss Axio Imager 2) équipé d'une caméra (Zeiss AxioCam MRc5) permettant la prise d'images avec un logiciel d'imagerie numérique (AxioVision release 4.8.2).

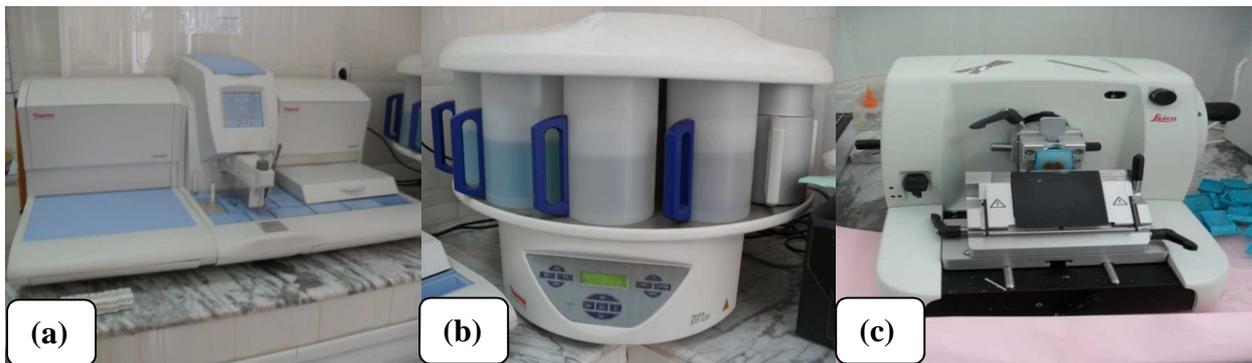


Figure 44 : Appareillage utilisé dans la réalisation des coupes histologiques : (a) automate d'inclusion (b) réservoir de paraffine (c) microtome.

3/ RESULTATS

3.1/ Observations des coupes histologiques de l'hépatopancréas

Chez les escargots l'hépatopancréas occupe un volume important de la masse viscérale, il est formé de deux lobes, chacun étant relié au mésentéron par un canal hépatopancréatique. Les lobes de l'hépatopancréas sont entourés d'un tissu conjonctif associé à quelques fibres musculaires lisses, l'ensemble constituant une enveloppe, ils apparaissent formés par la juxtaposition de nombreux tubules digestifs qui ont diverses formes et tailles et sont séparés par un espace intertubulaire contenant des sinus et des hémocytes hémolympatique et une couche musculaire circulaire entoure chaque tubule. Un simple épithélium des lignées de plusieurs types cellulaires forme la lumière des tubules. Ces cellules ont des morphologies différentes, mais elles sont de trois principaux types cellulaires et chaque cellule comporte les éléments essentiels (membrane, noyau,...). Les cellules digestives constituent le composant cellulaire le plus abondant de l'épithélium de tubules de la glande digestive elles sont relativement polymorphique en fonction du stade de digestion Heusser et Dupuy, (2011), les cellules à calcium et excrétrices sont moins abondantes par rapport aux cellules digestives (Zaldibar et *al.*, 2008) (Fig. 45).

A la fin de l'essai, un examen microscopique des coupes histologiques des escargots traités avec les trois doses (1, 2 et 3mg/g) a montré des modifications des tissus par des degrés variables avec un effet dose-dépendant.

À la dose de 1 mg/g de NPs Fe₂O₃ (Fig. 46), une dégénération partielle de certaines cellules digestives et un tissu connectif inter tubulaire plus important et plus étendu sont observés, en outre, un regroupement des tubules dus au rétrécissement de la lumière accompagné par une nécrose de la membrane basale des tubules. A la dose de 2 mg/g (Fig. 47), les mêmes changements ont été observés, accompagnés par une rupture de la membrane basale d'une manière dose dépendante, les tubulaire sont presque dépourvues de lumière, le tissu conjonctif est trop altéré et il y a apparition de certains infiltrats inflammatoires. A la dose de 3 mg/g (Fig. 48), le tissu conjonctif, les tubules digestifs et leurs membranes sont sévèrement endommagées, avec une dégénérescence très avancée de cellules digestives et de celles à calcium avec l'apparition des infiltrats inflammatoires.

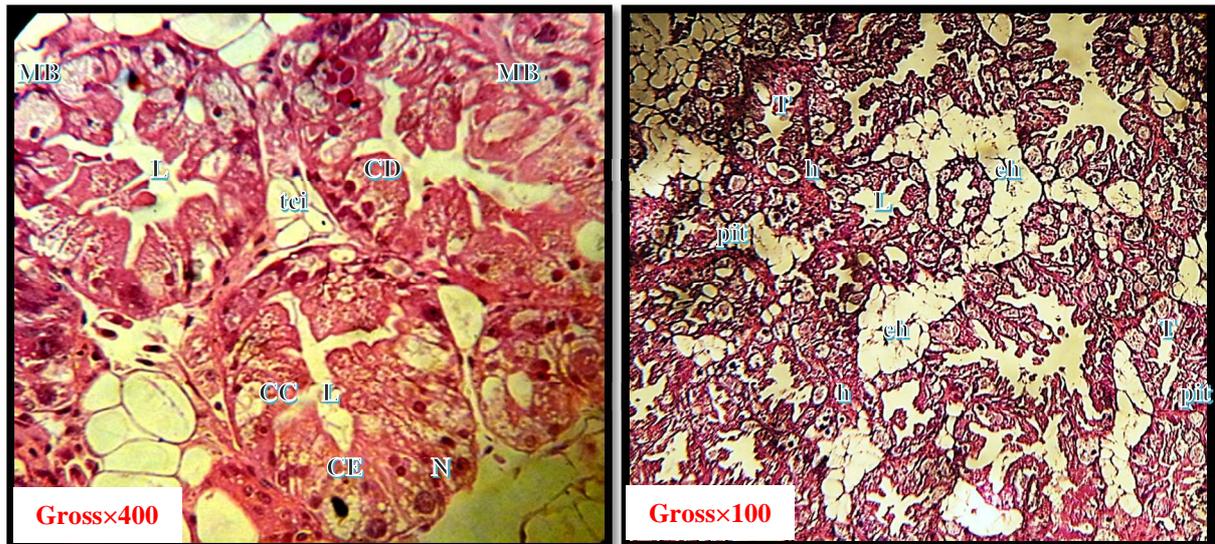


Figure 45 : Coupes histologiques de l'hépatopancreas des escargots témoins :

(T) tubule (MB) membrane basale, (tci) tissu connectif intertubulaire, (eh) espace hémolympatique (CE) cellule excrétrice (L) lumière tubulaire (CD) cellule digestive (CC) cellule à calcium (pit) paroi inter tubulaire (h) hémolymphe (N) noyau.

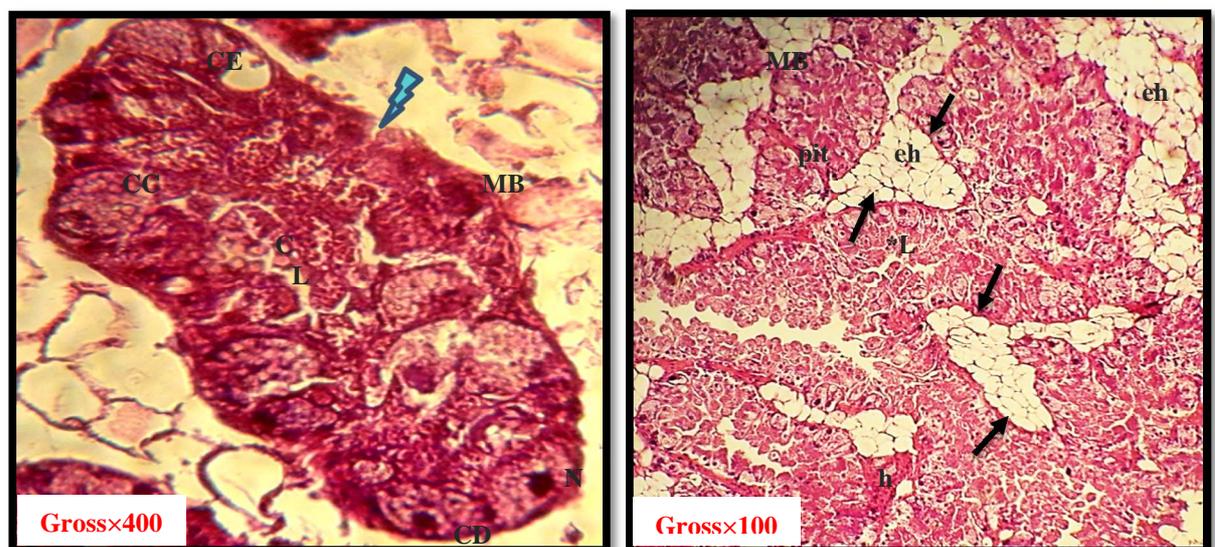


Figure 46 : Coupes histologiques de l'hépatopancreas des escargots traités avec la dose 1 mg/g des NPs Fe₂O₃ : (MB) membrane basale, (CE) cellule excrétrice, (CC) cellule à calcium, (C) calcium, (L) lumière, (CD) cellule digestive, (h) hémolymphe, (eit) espace intertubulaire, (eh) espace hémolympatique, (⚡) nécrose tubulaire, (➤) regroupement de la masse tubulaire et réduction de l'espace inter tubulaire, (*L) lumière rétractée.

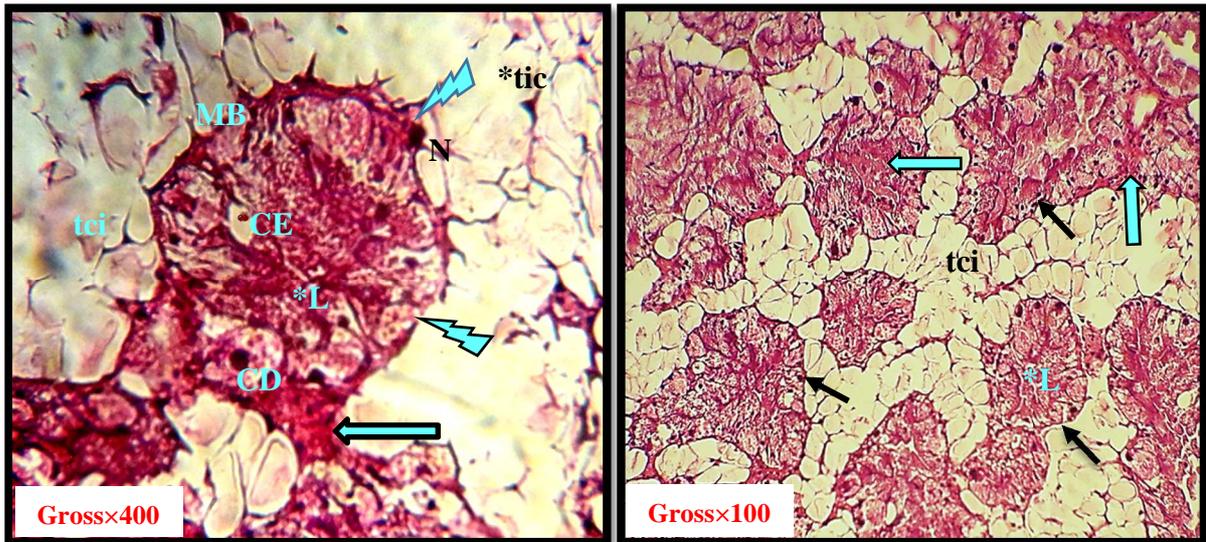


Figure 47 : Coupes histologiques de l'hépatopancreas des escargots traités avec la dose 2 mg/g des NPs de Fe₂O₃ : (N) noyau, (CD) cellule digestive, (CE) cellule excrétrice, (tci) tissu connectif intertubulaire, (MB) membrane basale, (*L) lumière très rétractée, (↖) regroupement de la masse tubulaire, (⚡) nécrose membranaire, (←) infiltrats inflammatoires.

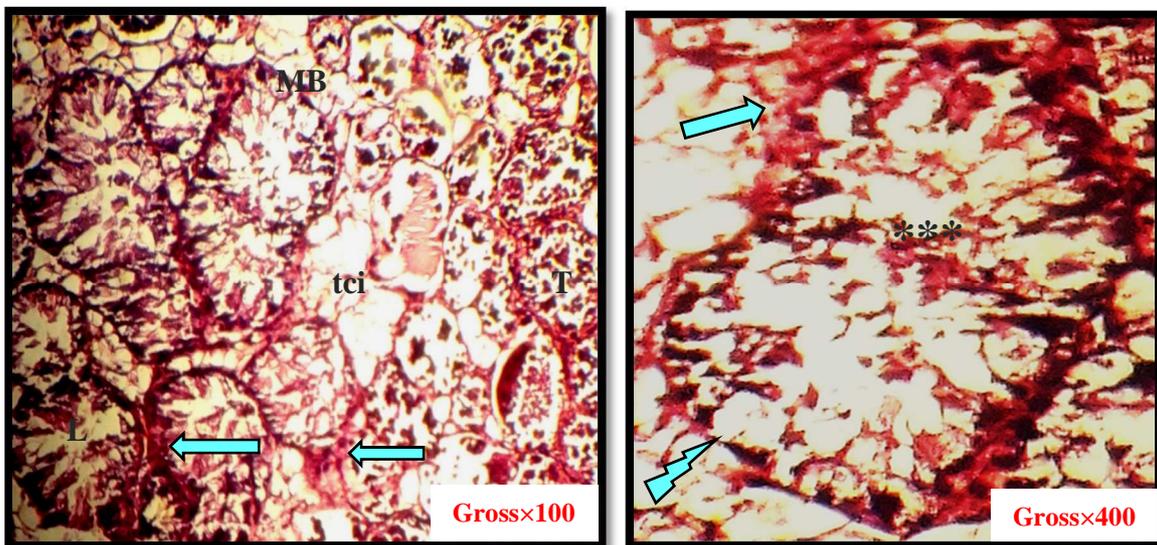


Figure 48 : Coupes histologiques de l'hépatopancreas des escargots traités avec la dose 3 mg/g des NPs de Fe₂O₃ : (MB) membrane basale, (T) tubule, (tci) tissu connectif intertubulaire, (L) lumière, (⚡) nécrose membranaire, (←) infiltrats inflammatoires, (***) débris cellulaires.

3.2/ Observation des coupes histologiques du rein

Le rein est constitué d'un épithélium excréteur tapissé de lamelles rénales, lamelles conjonctives creuses, un sinus sanguin doté de fibres musculaires lisses, constituées de cellules prismatiques avec une bordure en brosse. L'épithélium renferme un seul type de cellules excrétrices avec un noyau et une membrane granulaire, ces cellules excrétrices ont des formes bâtonnet (les plus nombreux) et ciliées (Chabicovsky *et al.*, 2003). La production de l'urine primitive est le fait des néphrocytes : ils réalisent l'ultrafiltration de l'hémolymphe circulant dans les lacunes des axes conjonctifs soutenant les replis de la paroi rénale. Ils produisent également des concrétions à partir de molécules prélevées dans l'hémolymphe, Il s'agit de dépôts de couches concentriques d'acide urique et de lipide autour d'un noyau d'urate de calcium, élaborés au sein des vacuoles, Ces concrétions sont expulsées dans la lumière rénale. Ils produisent également des concrétions à partir de molécules prélevées dans l'hémolymphe (Heusser et Dupuy, 2011). L'aspect du tissu rénal chez les escargots témoins est illustré par la figure 49.

L'examen histologique du rein des escargots traité par la dose 1 mg/g des NPs de Fe₂O₃, met en évidence des acini avec un contour irrégulier, des nécroses et des lyses au niveau des replis accompagné d'une dégénérescence des cellules excrétoires, une hypertrophie du tissu conjonctif (épithélium rénal) (Fig. 50). Concernant les tissus des traités par la concentration 2 et 3 mg/g les mêmes observations ont été notées de manière dose dépendante. Nous remarquons les hypertrophies des cellules excrétrices et parallèlement la prolifération du tissu conjonctif engendrant ainsi la disparition de leur membrane d'où la présence des infiltrats inflammatoires et des débris cellulaires dans la totalité de tissu, des nécroses touchent le tissu conjonctif (Fig. 51 et 52).

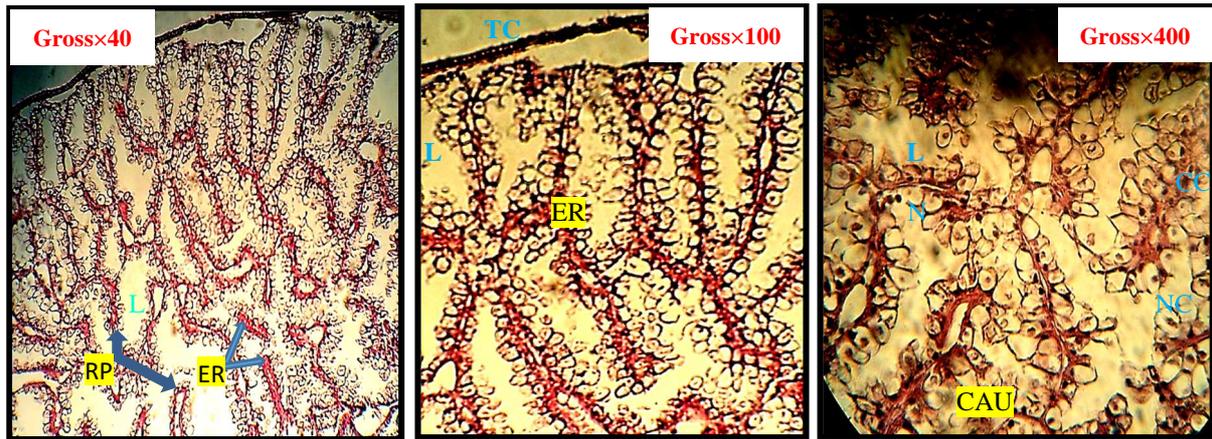


Figure 49 : Coupes histologiques du rein des escargots témoins : (L) lumière de l'acini, (RP) repli de la paroi, (TC) tissu conjonctif, (ER) épithélium rénal, (NC) néphrocyte, (CC) cellule ciliée, (N) noyau, (CAU) concrétion d'acide urique.

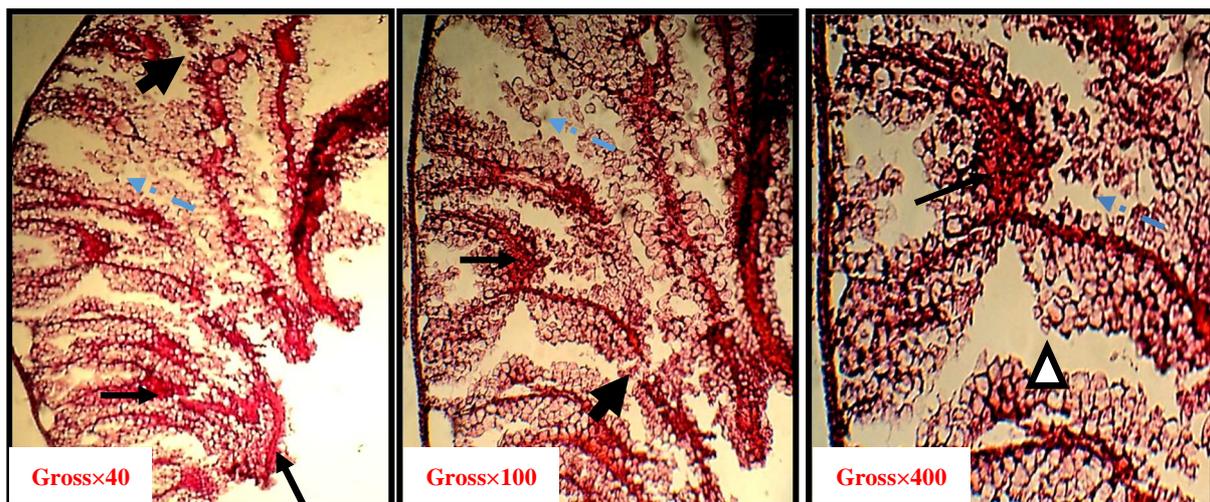


Figure 50 : Coupes histologiques du rein des escargots traités par la dose 1 mg/g des NPs de Fe₂O₃ : (↗) Nécrose, (△) hypertrophies cellulaire, (→) hypertrophies cellulaires, (↖) débris cellulaires.

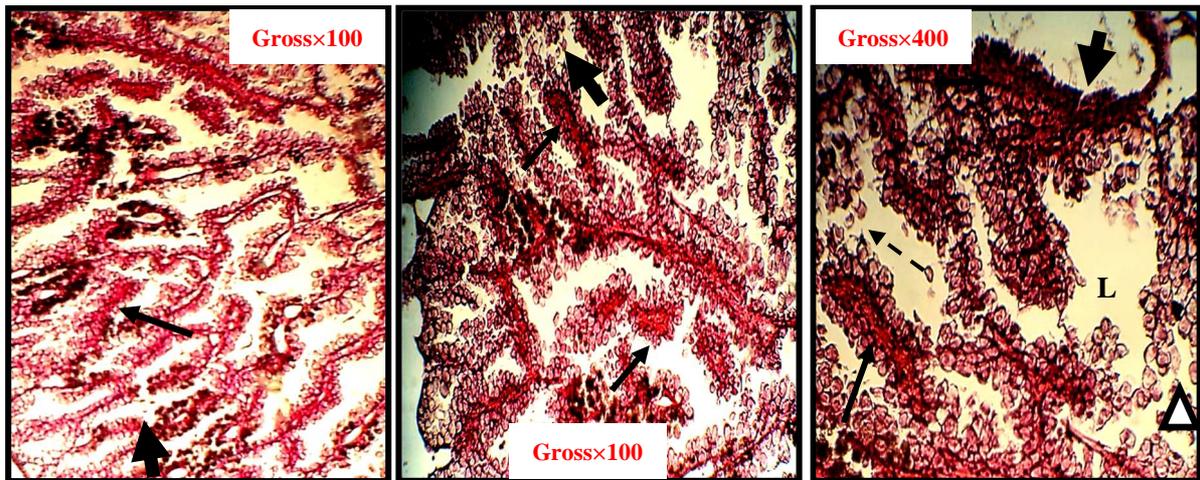


Figure 51 : Coupes histologiques du rein des escargots traités par la dose 2 mg/g des NPs de Fe₂O₃ : (L) lumière, (▲) nécrose, (△) hypertrophie cellulaire, (↗) infiltrats inflammatoires, (↘) débris cellulaires.

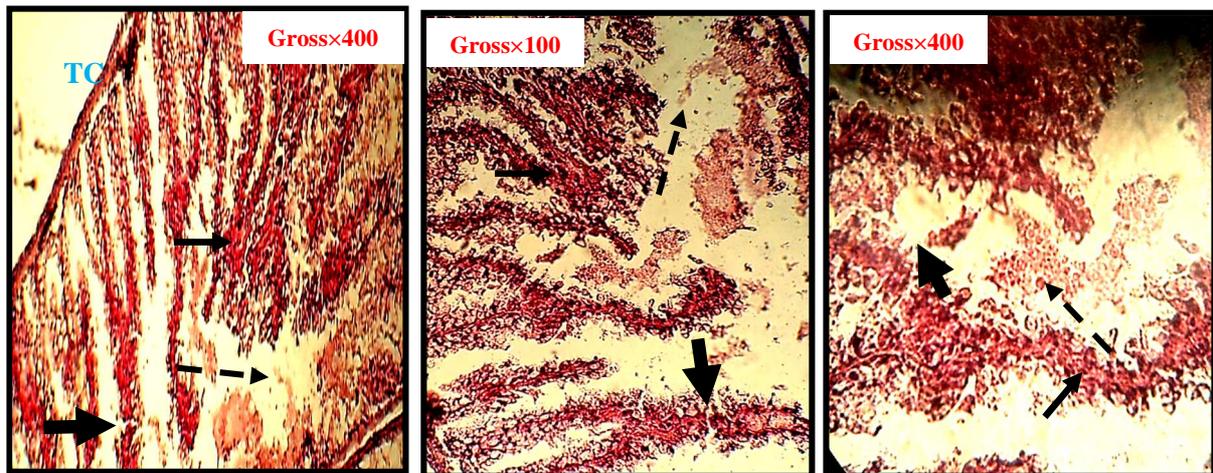


Figure 52 : Coupes histologiques du rein des escargots traités par la dose 3 mg/g des NPs de Fe₂O₃ : (TC) tissu conjonctif, (▲) nécroses de tissu rénale, (↗) infiltrats inflammatoires, (↘) débris cellulaires.

3.3/ Observations des appareils génitaux

Les différents traitements n'affectent pas la taille de l'appareil reproducteur. Comme cela peut être observé sur la Figure 53, les escargots disséqués de chaque groupe présentent une certaine hétérogénéité. On remarque cependant une différence de couleur entre les poches de Dard des témoins par rapport à celles traités et même du canal godronné « Oviducte ». Les témoins sont d'une couleur plus claire alors que les traités apparaissent avec une couleur foncé très proche de la couleur de l'oxyde de fer (rouge raille) ce qui signifie qu'il y a une accumulation à ce niveau-là.

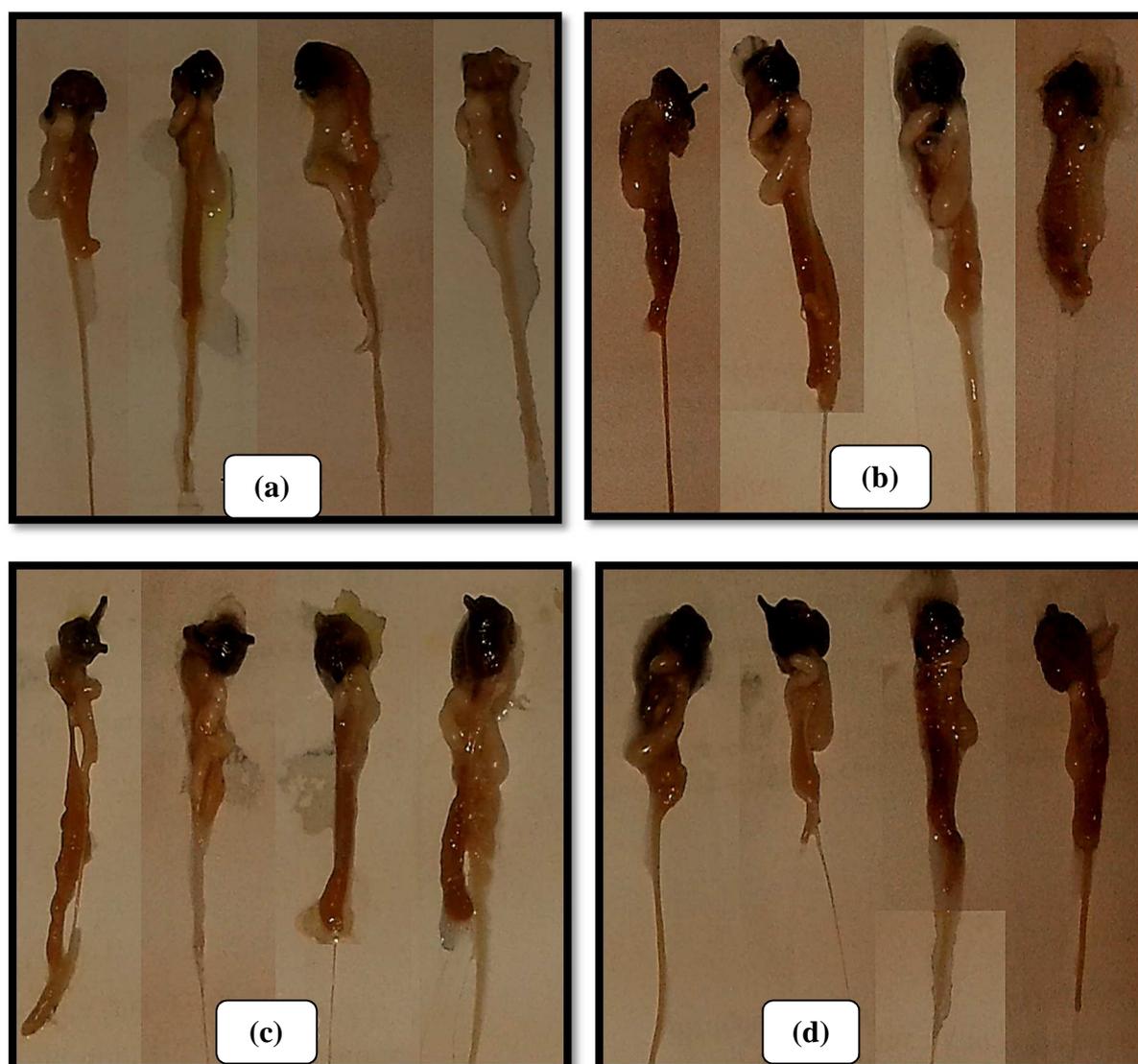


Figure 53 : Appareils génitaux de quatre escargots à partir de chaque lot : (a) témoins, (b) traités avec 1 mg/g des NPs de Fe₂O₃, (c) traités avec 2 mg/g des NPs de Fe₂O₃, (d) traités avec 3 mg/g des NPs de Fe₂O₃.

4/ DISCUSSION

L'examen histologique de l'hépatopancréas de *Helix aspersa* traité par l'oxyde de fer nanométrique a mis en évidence des altérations qualitatives importantes dès la faible concentration testée. En effet, l'exposition aux nanoparticules peut causer des altérations cytologiques très importantes au niveau de l'hépatopancréas qui joue un rôle crucial dans la détoxification des polluants (Frias-Espicueta et al., 2008). Nos résultats biochimiques ont suggérés des perturbations et des altérations tissulaires, qui ont été confirmées par nos données histopathologiques.

L'étude de Eybe et al., (2013) a démontré la possibilité de pénétration des xénobiotiques (Chrome et Platine) à l'escargot *Helix aspersa*, indiquant ainsi une accumulation importante des particules sous forme de petites vésicules de 2 à 4µm au niveau des cellules à calcium de la glande digestive.

En premier lieu, nous avons remarqué que quelques cellules digestives et leurs noyaux sont devenues très dilatés ce qui entraîne à un rétrécissement très apparu de la lumière tubulaire, ce résultat est en accord avec celui de Dumeé et al., (2012) d'une étude histologique de la bioaccumulation des métaux lourds dans l'escargot (*Pomacea canaliculata*). L'étude histologique a révélé une dégénérescence des tubules digestifs, une fragmentation des cellules digestives et des ruptures au niveau de la membrane basale des tubules de manière dose-dépendante, conduisant à une détérioration sévère du tissu de la glande digestive aux plus fortes concentrations.

La détérioration des cellules digestives entraînent par conséquent, l'altération du processus digestif global provoquée par l'ingestion des nanoparticules, ceci pourrait être une première réponse biologique due à la présence des xénobiotiques, ces observations sont en accord avec les travaux de Boucenna et al., (2015), de Russell et al., (1981) et de Chabicoovsky et al., (2004).

Notons que les cellules digestives sont les plus abondantes dans l'épithélium de l'hépatopancréas, selon Porcel et al., (1996) et Chabicoovsky et al., (2004), la perte des cellules digestives semble être une réponse générale après une exposition aux métaux lourds chez les gastéropodes terrestres et elle est reliée principalement à la détérioration du processus digestif provoqué par la présence des particules métalliques (Zaldibar et al., 2008; 2007).

La comparaison de Zhu et al., (2008) entre l'oxyde de fer micrométrique et nanométrique, a montré que l'oxyde de fer nanométrique cause des lésions cellulaires au niveau des poumons des rats et aussi une augmentation de la perméabilité micro vasculaire et ils ont émis l'hypothèse que les altérations cellulaires causées par un métal de transition ou de ses particules d'oxydation peuvent être dues à l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des espèces réactives de

l'azote (RNS). Nous avons démontré que les nano- et les micro- particules de Fe₂O₃ pourraient générer l'inflammation et la médiation du stress oxydatif. Constamment, les augmentations de la perméabilité microvasculaire et la lyse des cellules de l'épithélium pulmonaire sont corrélées avec l'augmentation des protéines totales, ce qui suggère la lésion de l'épithélium pulmonaire après pénétration de Fe₂O₃ nanométrique (Zhu et al., 2008). Des résultats similaires confirment les altérations tissulaires induites par les NPs de Fe₂O₃ ont été rapportés par Hetland et al., (2004) qui a trouvé que l'exposition aux particules ultrafines ambiante induit la toxicité cellulaire et l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Triebkorn et Köhler, (1996); (1998) qui ont mis en évidence des altérations structurales des cellules basophiles et digestives de la glande digestive de la limace *D. reticulatum* exposée au Cd, Pb et Zn et aussi de celle de Manzl et al., (2004) qui ont également observé la toxicité aigüe des oxydes métalliques sur les cellules de l'hétopancreas chez l'espèce de *H.pomatia*. Une étude *in vitro* a démontré que l'exposition à l'oxyde métallique provoque une inhibition des activités des nucléotidases dans l'hétopancreas d'*H.aspersa* (Sousa Dahm et al., 2006).

Yager et Harry, (1963) postulent que les ETM montrent une forte diffusion dans les cellules provoquant des nécroses cellulaires. Les NPs sont caractérisées par leur petite taille c'est à dire une diffusion plus rapide que les ETM macrométriques dans les cellules hétopancreatiques, donc il est évident de dire que les nécroses observées seraient le résultat de la pénétration des NPs. Par conséquent, il semblerait que l'oxyde de fer nanométrique a une activité cytotoxique très importante n'est pas très différente à celle des molécules macro et micrométriques. D'autre part, les modifications structurelles observées aux concentrations plus élevées peuvent être dues au jeune prolongé provoquée par la répulsion des aliments contaminés et par conséquent, par le jeune induit.

Habituellement, les cellules répondent à la charge oxydante en fortifiant leurs mécanismes de défense antioxydants pour se protéger contre tout dommage oxydatif. Cependant, si les mécanismes de défense ne parviennent pas à neutraliser l'oxydation des protéines de la charge oxydante (Ramirez-Prieto et al., 2006), la peroxydation des lipides (Gutteridge, 1995), des lésions de l'ADN, une perturbation mitochondriale et apoptose se produisent (Li et al., 2003).

L'injection des NPs de Cd a donné lieu à une vaste vacuolisation, la formation de lésions nécrotiques lamellaire et l'infiltration de l'espace hémolympatique des hétopancreas à la fois des mâles et des femelles de crabe de boue *S. olivacea* traités (Kavitha et al., 2013).

Kumari et *al.*, (2012), trouvent que l'histopathologie des rats traités avec des fortes doses de Fe₂O₃ a montré une dilatation de la veine centrale et des nécroses des cellules rondes péri vasculaires et des zones focales du foie. En plus, cette étude décrit que le traitement des Fe₂O₃ a causé des dommages tubulaire focal dans les reins et la rate des rats traités. Parallèlement à cette étude Chen et *al.*, (2006) ont rapporté des lésions pathologiques dans les reins, le foie et la rate de souris exposées à des doses aiguës des nanoparticules de Cu, des dommages de cellules tubulaires proximales rénales, glomérulonéphrite, stéatose autour de veines centrales dans le foie ainsi qu'une diminution des unités spléniques.

Hsieh et *al.*, (2015) mentionnent que l'oxyde de fer nanométrique cause la mort cellulaire par apoptose dépendante de mitochondries dans des cultures cellulaires. Des nécroses et des apoptoses ont été également observées au niveau du foie et des reins des rats traités par des NPs d'argent et d'or (Rathore et *al.*, 2014). Des lésions histopathologiques ont été observées dans le foie et les reins chez les souris après un traitement de 13 semaines par l'oxyde d'aluminium nanométrique. Thit et *al.*, (2015) indiquent que les effets histopathologiques signalés chez *Xenopus laevis* traité par les NPs de Cu se manifeste par l'apoptose des cellules épithéliales rénales .

L'étude de Boucenna, (2016) met en évidence un dommage tissulaire incontestable au niveau de la glande digestive et le rein de *Helix aspersa* comme réponse à la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer aux doses étudiées (50, 100, 200, 400 µg/g) par voie digestive (dans l'alimentation), qui entraîne des changements structuraux tels que, la dilatation des espaces hemolymphatiques entre tubules, la dégénérescence et la nécrose cellulaires et l'atrophie du tissu conjonctif.

Les modifications de la structure du rein ont également été soulevées dans les études de Marigomez et *al.*, (1990) et Ali et *al.*, (2015) qui ont étudié respectivement l'évaluation des effets de l'exposition sublétales au cadmium sur le rein de *Littorea littorina* et l'impact des NPs d'argent sur l'escargot *Eobania vermiculata*. Ces auteurs suggèrent que la vacuolisation des cellules épithéliales détectées et l'agrégation des organites peut être due à une altération de l'activité excrétrice due à l'exposition aux métaux et aux NPs.

L'observation des coupes des appareils génitaux montre une différence de couleur surtout au niveau de l'oviducte et de poches de Dard, ceux des escargots traités prennent la couleur de l'oxyde de fer nanométrique. La capacité accumulatrice de *Helix aspersa*, est d'ailleurs un caractère de sélection pour cette espèce. La capacité de l'oxyde de fer de pénétrer au niveau cellulaire est déjà prouvée par les dégâts tissulaires causés au niveau de l'hépatopancréas et du rein, cependant, une arrivée de ces particules au niveau de l'appareil génital n'est pas à exclure. Le problème qui se

pose est ce que cette pénétration et accumulation causent des problèmes de fertilité et de reproduction pour cette espèce ou non.

Les contaminants peuvent réduire le succès de la reproduction ou la survie de la progéniture des espèces (Casabé et *al.*, 2007). Les effets sur la reproduction peuvent être interprétés de deux façons : comme un effet direct en raison d'une interaction avec les mécanismes clés de la reproduction, ou comme un effet indirect, par l'intermédiaire de l'assimilation des nutriments, la croissance et le maintien de l'équilibre énergétique (Booth et O ' Halloran, 2001).

Chez les mammifères, suite à une évaluation de la toxicité de l'oxyde de fer nanométrique sur la fertilité et la reproduction des souris, des fortes doses (100 mg/kg) ont induit des modifications à long terme dans la reproduction y compris l'augmentation des pertes fœtales dans la génération (Di Bona et *al.*, 2015). Aussi l'étude histologique des coupes de tissus des testicules des souris traités avec l'oxyde de fer nanométrique a indiqué une réduction significative du nombre de spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes matures dans les tubules séminifères des descendants mâles (Noori et *al.*, 2011).

El-Hommosany et El-Sherbibni, (2011), ont montré que l'exposition de l'escargot *B. alexandrina* aux nanoparticules d'or réduit la fécondité et le taux de reproduction donc réduit considérablement leur ponte, les auteurs ont attribués ceci à l'impact nocif sur les activités physiologiques reproductrices des escargots traités.

5/ CONCLUSION

Les gastéropodes sont connus par leur pouvoir accumulateur et peuvent répondre à la pollution d'une manière sensible et mesurable, ils sont donc employés comme des sentinelles de la pollution environnementale dans les sols.

Nous avons vu dans ce travail que les nanoparticules présentent une grande capacité de pénétration et d'internalisation au niveau cellulaire accompagnée par le déclenchement d'un stress oxydant qui suggère une augmentation dans le taux des radicaux libres qui sont responsables des lésions tissulaires et pouvant aboutir à la mort cellulaire.

Nous avons mis en évidence que la glande digestive est l'organe le plus sensible, qui assure à la détoxification des xénobiotiques, à travers ces atteintes tissulaires bien visibles.

Nous avons également mis en évidence que le rein est un organe cible des nanoparticules testées par des altérations à différents niveaux.

Nous avons confirmé la sensibilité de l'espèce vis-à-vis les NPs Fe₂O₃ qui se manifeste par une perturbation dans le des paramètres physiologiques des escargots exposés tels que la reproduction.

Conclusion
et perspectives
et perspectives

Les nanotechnologies et les nanoparticules sont un domaine d'activité en pleine expansion, avant tout en raison du fait que les NPs révèlent des propriétés chimiques et physiques radicalement différentes des substances de même composition mais de plus grande taille. En effet, les connaissances actuelles des effets toxiques des nanoparticules sont relativement limitées, il existe une incertitude réelle quant à leurs impacts sur les humains et l'environnement. Les raisons de cette inquiétude scientifique sont basées sur la méconnaissance des interactions existantes entre les nanoparticules et les systèmes biologiques. L'escargot *Helix aspersa* est largement présent dans les écosystèmes terrestres, c'est un mollusque, qui peut nous renseigner sur la qualité de l'écosystème dans lequel il vit, il est exposé à la pollution par plusieurs voies d'exposition qui impliquent l'ingestion d'aliments souillés ainsi que le contact et l'absorption par l'épithélium du pied depuis des surfaces contaminées.

Dans notre travail l'objectif principal était d'étudier les effets des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'escargot terrestre *Helix aspersa*, utilisé comme espèce bioindicatrice et bioaccumulatrice de la contamination des sols. Les expérimentations ont été menées sur la phase embryonnaire et l'impact de l'exposition pendant cette dernière sur la croissance des escargots pendant la phase juvénile, sur les adultes les expérimentations ont été menées sur le comportement, certains paramètres morphométriques, la biochimie de l'hépatopancréas, la mesure de quelques biomarqueurs du stress oxydant (GSH, GST GPx, CAT et MDA) et l'histopathologie du rein et de l'hépatopancréas.

A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que :

Les NPs de Fe_2O_3 et avec les concentrations choisies (1,25, 1,5 et 2 mg/ml) ont un effet toxique sur *Helix aspersa* pendant la phase embryonnaire. Sa toxicité se manifeste par différentes manières. Tout d'abord, sur les œufs avant éclosion avec la déformation de la membrane, par la suite sur le succès d'éclosion des œufs et le temps d'incubation avant éclosion, et par le taux de mortalité des nouveaux éclos. On a pu aussi montrer que *H. aspersa* est une espèce bioaccumulatrice et que le site principal de l'accumulation est l'hépatopancréas, qui apparut avec la couleur rouille sur les traités. Par la suite, l'influence de cette exposition embryonnaire sur les juvéniles n'est très prononcée ce qui suggère une détoxification avec succès.

Les doses des NPs d'oxyde de fer (1, 2 et 3 mg/g) testées sur les adultes de *Helix aspersa* entraînent des altérations comportementales, comme la diminution de l'activité et de la prise alimentaire aux plus fortes concentrations. Ainsi, ces molécules perturbent les performances individuelles en modifiant l'acquisition de l'énergie. En plus, ces altérations comportementales

sont accompagnées par une réduction significative des paramètres physiologiques tels que le poids frais moyen des escargots, le poids frais moyen de l'hépatopancréas et celui de la coquille. Ces perturbations physiologiques peuvent entraîner, par conséquent, des effets délétères sur la reproduction pouvant concerner des perturbations de la gamétogenèse, du développement des organes reproducteurs, notamment après l'atteinte de l'appareil génital.

D'un autre côté, la composition en métabolites de l'hépatopancréas est également affectée par les NPs testés, avec une augmentation significative des protéines et des glucides et une diminution aussi significative des lipides.

Les NPs Fe_2O_3 induisent également le système de détoxification par le biais d'une augmentation des activités de la GSH, GST, GPx et celle de la MDA et une diminution du taux de CAT. Ses modifications sont probablement liées à une augmentation de la libération d'espèces réactives de l'oxygène en présence des nanoparticules.

Les altérations structurales du tissu hépatopancréatiques témoignent d'une altération du processus digestif, et induisent ainsi, une réduction des capacités de digestion et d'assimilation des aliments par les escargots exposés aux différents traitements. L'histologie du rein aussi est altérée, signification d'une altération du processus excréteur, une accumulation des NPs est supposée.

En perspectives, il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur :

- ➔ L'embryotoxicité par observation sous microscope électronique pour bien discerner les altérations et les malformations si elles existent, et même de s'assurer si les nanoparticules franchissent la membrane et pénètrent et accumulent ou bien l'effet est juste de l'extérieur.
- ➔ L'étude de la toxicité chronique de notre nanoparticule candidate depuis l'œuf jusqu'à la reproduction est très importante, pour voir l'effet de cette exposition à long terme et quelles anomalies et perturbations elles pourraient engendrer.
- ➔ Pour comprendre le mécanisme du stress oxydant induit par ces nanoparticules et le système de détoxification mis en jeu par l'espèce, il est intéressant de doser d'autres paramètres tel que : le superoxyde dusmutase SOD, le métallothionines, les ROS,etc.
- ➔ Une évaluation de la neurotoxicité de Fe_2O_3 nanométrique chez *Helix aspersa* par dosage de l'AChE et même par la réalisation des coupes histologiques au niveau du système nerveux.

- ➔ Des coupes histologiques à des différents niveaux pour chercher les altérations causées et des dosages des nanoparticules sur différents segments afin d'identifier les lieux d'accumulation.
- ➔ Une étude ultra structurale sur les organelles cibles telles que les mitochondries, les lysosomes,.....etc.
- ➔ Il serait aussi intéressant d'établir ces études sur le terrain en conditions réelles d'application dans le cadre d'une démarche d'évaluation du risque pour compléter la démarche effectuée au laboratoire.

Références

bibliographiques

- ➔ Abdel-Azim S.A., Darwish H.A., Rizk M.Z., Ali S.A., Kadry M.O. 2015. Amelioration of titanium dioxide nanoparticles-induced liver injury in mice: Possible role of some antioxidants. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 67(4):305-314.
- ➔ Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology*. 105:121-126.
- ➔ Aerle R.V., Lange A., Moorhouse A., Paszkiewicz K., Ball K., Johnston B.D., De-Bastos E., Booth T., Tyler C.R., Santos E.M. 2013. Molecular Mechanisms of Toxicity of Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. *Environ Sci Technol*. 47(14):8005-8014.
- ➔ Ahmad F., Liu X., Zhou Y., Yao H., Zhao F., Ling Z., Xu C. 2015. Assessment of thyroid endocrine system impairment and oxidative stress mediated by cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles in zebrafish larvae. *Environmental toxicology*. DOI 10.1002/tox.
- ➔ Ahmad F., Liu X., Zhou, Y., Yao H. 2015. An *in vivo* evaluation of acute toxicity of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles in larval-embryo Zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 166:21-28.
- ➔ Aillon, K. L., Y. Xie, N. El-Gendy, C. J. Berkland and M. L. Forrest (2009). Effects of nanomaterial physicochemical properties on *in vivo* toxicity. *Adv Drug Deliv Rev*. 61(6):457-466.
- ➔ Ait-Hamlet S. 2013. Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Thèse de doctorat Université Badji Mokhtar-Annaba. 177p.
- ➔ Ait-Hamlet S., Bensoltane S., Djekoun M., Yassi F., Berrebbah H. 2012. Histological changes and biochemical parameters in the hepatopancreas of terrestrial gastropod *Helix aspersa* as biomarker of neonicotinoid insecticide exposure. *African Journal of Biotechnology*. 11 (96):16277-16283.
- ➔ Alarifi S., Ali D., Alkahtani S., Verma A., Ahamed M., Ahmed M., Alhadlaq H.A. 2013. Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomed*. 8:983-993.
- ➔ Alberts B., Johnson A., Lewis J. 1983. The extracellular matrix of the animals. In *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. *Garland Science, New York*. 692-713 p.

- ➔ Ali D., Alarifi S., Kumar S., Ahamed M., Siddiqui M.A. 2012. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. *Aquatic toxicology*. 124:83-90.
- ➔ Ali D., Ali H., Alarifi S., Kumar S., Serajuddin M., Mashih A.P., Ansari A.A. 2015. Impairment of DNA in a Freshwater Gastropod (*Lymnaea luteola* L.) After Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 68(3):543-552.
- ➔ Ali D., Yadav P.G., Kumar S., Ali H., Alarifi S., Harrath A.H. 2014. Sensitivity of freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L., to silver nanoparticles. *Chemosphere*. 104:134-140.
- ➔ Altar C., Kathleen H. 1987. Topography of substantia nigra innervation by D₁ receptor-containing striatal neurons. *Brain Research*. 410(1, 28):1-11.
- ➔ Andrews E.B. 1981. Osmoregulation and excretion in prosobranch gastropods. Part 2: Structure in relation to function. *J Moll Stud*. 47:248-2.
- ➔ ANSES. 2014. Évaluation des risques liés aux nanomatériaux : enjeux et mise à jour des connaissances. Autosaisine n°2012-SA-0273 « Nanomatériaux et Santé ».
- ➔ Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*. 407(4):1461-1468
- ➔ Asharani P.V., Hande M.P., Valiyaveetil S. 2009a. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol*. 10:65.
- ➔ Asharani P.V., Mun L.K.G., Hande M.P., Valiyaveetil S. 2009b. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 3:279.
- ➔ Asharani, P. V., Lianwu, Y. I., Gong, Z., & Valiyaveetil, S. 2011. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology*. 5(1):43-54.
- ➔ ASTM E1439-98. 1998. Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX). *ASTM International*.
- ➔ ASTM STP1443. 2003. AMPHITOX: A Customized Set of Toxicity Tests Employing Amphibian Embryos. *ASTM International*.
- ➔ Auffan M. 2007. Nanoparticules d'oxydes métalliques : relations entre la réactivité de surface et des réponses biologiques. Thèse de Doctorat en géosciences de l'environnement. Université Paul Cézanne aix-Marseille III. France. 204p.

- ➔ Bailey S.E.R. 1981. Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *Jorn. Comp. Physiol.* 142:89-94.
- ➔ Barillet S. 2007. Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat de l'université Paul Verlaine de Metz, France. 476p.
- ➔ Barker G.M. 2001. The Biology of Terrestrial Molluscs. *CAB International, Oxon, Wallingford, UK.* 567p.
- ➔ Basha P.S., Rani A.U. 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol Environ Saf.* 56:218-221.
- ➔ Baurand P E. 2015. Embryotoxicité de contaminants métalliques et organiques chez l'escargot *Helix aspersa*. Thèse de Doctorat en études de l'environnement. Université de Franche-Comté. France. 228p.
- ➔ Beeby A. 1985. The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfert of lead through a polluted ecosystem. *Journal of Applied Ecology.* 22:267-275.
- ➔ Beeby A., Richmond L. 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators.* 1(4):261-270.
- ➔ Belhaouchet N., Djebbar M.R, Meksem L., Grara N., Zeriri I., Berrebbah H. 2012. Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide: The Spinosad on an alternate model: *Helix aspersa*. *Journal of Applied Sciences Research.* 8(8):4199-4206.
- ➔ Benbouzid H. 2012. Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliées. Thèse de doctorat Université Badji Mokhtar-Annaba. 87p.
- ➔ Ben-Moshe T, Dror I, Berkowitz B. 2010. Transport of metal oxide nanoparticles in saturated porous media. *Chemosphere.* 81:387-393.
- ➔ Berger B., Dallinger R. 1993. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environmental Monitoring Assessment.* 25:65-84.
- ➔ Berger B., Dallinger R., Felder E., Moser J. 1995. 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.
- ➔ Berry C.C., Charles S., Wells S., Dalby M.J., Curtis A.S.G. 2004a. The influence of transferring stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. *International Journal of Pharmaceutics.* 269(1):211-225.

- ➔ Berry C.C., Wells S., Charles S., Aitchison G., Curtis A.S.C. 2004b. Cell response to dextran derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*. 25(23): 5405-5413.
- ➔ Berry C.C., Wells S., Charles S., Aitchison G., Curtis A.S.C. 2003. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials*. 24(25):4551-4557.
- ➔ Besnaci S, Bensoltane S, Zerari L., Chrairia S., Ait hamlet S., Berrebbah H. 2016. Impact of Nanometric Iron Oxide in the Hepatopancreas of Terrestrial Gastropod *Helix Aspersa*: Histological Changes and Biochemical Parameters. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 36(2):234-241
- ➔ Bibic A., Drobne D., Strus J., Byrne A.R. 1997. Assimilation of zinc by Porcellio scaber (Isopoda, Crustacea) exposed to zinc. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58:814-821.
- ➔ Biola-Clier M. 2016. Génotoxicité et impact de nanoparticules de dioxyde de titane sur la réparation de l'ADN dans des cellules alvéolaires pulmonaires. Thèse de Doctorat en Toxicologie. Université Grenoble Alpes. France. 249p.
- ➔ Bondy, S. C. 2011. Nanoparticles and colloids as contributing factors in neurodegenerative disease. *Int J Environ Res Public Health* 8(6):2200-2211.
- ➔ Bonnet J.C., Vrillon J.L. 1990. L'escargot *Helix aspersa* biologie – élevage. Edition INRA. 14-15p.
- ➔ Booth L., O'Halloran K. 2001. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem.* 20:2494–2502.
- ➔ Bouaricha H. 2013. Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium sp*). Thèse de Doctorat Université Badji Mokhtar-Annaba. 148p.
- ➔ Boucenna M. 2016. Etude de la toxicité des particules métalliques d'origine industrielle chez *Helix aspersa*. Evaluation nanotoxicologique du Fe₂O₃ et Al₂O₃. Thèse de Doctorat Université Badji Mokhtar-Annaba. 193p.
- ➔ 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.
- ➔ Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principle of proteindye binding. *Anal Biochem.* 72:278-254.

- ➔ Braunbeck T. 1998. Cytological alterations in fish hepatocytes following *in vivo* and *in vitro* sublethal exposure to xenobiotics - structural biomarkers of environmental contamination. In: *Fish Ecotoxicology* (eds. Braunbeck T., Hinton D. E., Streit B.). Birkhäuser Verlag, Berlin. 61-140.
- ➔ Braunbeck T., Vökl A. 1993. Toxicant-induced cytological alterations in fish liver as biomarkers of environmental pollution? A case study on hepatocellular effects of dinitro-*o*-cresol in golden ide. In *Fish: ecotoxicology and ecophysiology*, Weinheim: New York; Basel; Cambridge: VCH. 55-80.
- ➔ Brayner R., Dahoumane S.A., Yepremian C., Djediat C., Meyer M., Coute A., Fievet F. 2010. ZnO Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Ecotoxicological Studies. *Langmuir*. 26(9):6522-6528.
- ➔ Bride J., 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.
- ➔ Brooks A.W., White K.N., Bailey S.E.R. 1992. Accumulation and excretion of aluminium and iron by the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 103 C:577-583.
- ➔ Brown L.M., Collings N., Harrison R.M., Maynard A.D., Maynard R.L. 2000. Introduction. In: Brown, L.M. (Ed.), *Ultrafine Particles in the Atmosphere*, Phil. *Trans. R. Soc. Lond. A*. 358:2563-2565.
- ➔ 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.
- ➔ Buffet P.E., Pan J.F., Poirier L., Amiard-Triquet C., Amiard J.C., Gaudin P., Mouneyrac C. 2013. Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. *Ecotoxicology and environmental safety*. 89:117-124.
- ➔ Buffet P.E., Tankoua O.F., Pan J.F., Berhanu D., Herrenknecht C., Poirier L., Guibolini M. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*. 84(1):166-174.
- ➔ Buffle J., Wilkinson K.J., Stoll S., Filella M, Zhang J. 1998. A Generalized Description of Aquatic Colloidal Interactions: The Three-colloidal Component Approach. *Environ Sci Technol*. 32:2887-2899.

- ➔ Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2(4):55.
- ➔ Cadart J. 1955. Les escargots (*Helix pomatia* L. et *Helix aspersa* M.) biologie, élevage, parage, histoire, gastronomie, commerce. Paul Lechevalier, Paris. France.
- ➔ Canivet C. 2013. Caractérisation et toxicité de nanoparticules manufacturées de fer chez *Physcomitrella patens* (Hedw. Bruch & Schimp.) et sur cellules épithéliales bronchiques humaines (HBEC) : vers une utilisation en biosurveillance d'aérocontaminants nanoparticulaires. Thèse de Doctorat en médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé – Lille II. 364p.
- ➔ Casabé N., Piola L., Fuchs J., Oneto M.L., Pamparato L., Basack S., Giménez R., Massaro R., Papa J.C., Kesten E. 2007. Ecotoxicological Assessment of the Effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine Soya Field. *J Soils Sediments*. 7 (4):232-239
- ➔ Casals E., Va'zquez-Campos S., Bastu's N.G., Puntos V. 2008. Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *Trends in Analytical Chemistry*. 27(8):672-683.
- ➔ Chabicoovsky M., Klepal W., Dallinger R. 2004. Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates programmed cell death and metallothionein overload. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23:648-655.
- ➔ Chabicoovsky M., Niederstatter H., Thaler R., Hodl E., Parson W., Rossmanith W., Dallinger R. 2003. Localization and quantification of Cd and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 190:25-36.
- ➔ Chai L., Wang Y., Zhai N., Yang W. & You, X. 2013. Sulfate-doped Fe₃O₄/Al₂O₃ nanoparticles as a novel adsorbent for fluoride removal from drinking water. *Water research*. 47:4040-4049.
- ➔ Chao C.C., Park S.H., Ann E.A. 1996. Participation of nitric oxide and iron in the oxidation of DNA in asbestos-treated human lung epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys*. 326:152-157.
- ➔ Chatterjee S., Lim, S.R., Woo S.H. 2010. Removal of reactive black 5 by zero-valent iron modified with various surfactants. *Chem. Eng. J.* 160:27-32.
- ➔ Chen J., Shao R., Zhang X.D., Chen C. 2013. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. *International Journal of Nanomedicine*. 8:2677-2688.

- ➔ Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wang T., Yuan H., Ye C., Zhao F. 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. *Toxicol Lett.* 163: 109-120.
- ➔ Cheng W., Ping Y., Zhang Y., Chuang K.H., Liu Y. 2013. Magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents for tumor diagnosis. *J Healthc Eng.* 4(1):23-45.
- ➔ Chevalier L., Desbuquois C., Le Lannic J., Charrier M. 2001. Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Muller (Gastropoda, Pulmonata). *C.R. Acad. Sc. Paris.* 324:979-887.
- ➔ Chevallier H. 1982. Facteurs de croissance chez des gastéropodes pulmonés terrestres paléarctiques en élevage. *Haliotis.* 12:29-46.
- ➔ Chevallier H. 1992. L'élevage des Escargots. *Production et Préparation du Petit-Gris.* 2ème édition. Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort. Paris. 144p.
- ➔ Chithrani B.D., Chan W.C. 2007. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 7(6):1542-1550.
- ➔ Chowdhury I., Cwiertny D.M., Walker S.L. 2012. Combined Factors Influencing the Aggregation and Deposition of nano-TiO₂ in the Presence of Humic Acid and Bacteria. *Environ Sci Technol.* 46:6968-6976.
- ➔ Christova K., Manov A., Pamukchieva F., Jiang L. 2003. Mechanical stress studies of amorphous Ge_xSb_{40-x}S₆₀ film. *Journal of Non-Crystalline Solids.* 325(1-3):142-149.
- ➔ Chunfu Z., Jinquan C., Duanzhi Y., Yongxian W., Yanlin F., Jiaju T. 2004. Preparation and radio labeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. *Applied Radiation and Isotopes.* 61(6):1255.
- ➔ Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Badot P.M. 2000. Dosedependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in the land snail *Helix aspersa*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:2571-2578.
- ➔ Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M. 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 20:1951-1957.
- ➔ Commissariat à l'Énergie Atomique. 2005. Clefs du cea n°52 : Le nanomonde, de la science aux applications.

- ➔ Cooke M., Jackson A., Nickless G., Roberts D.J. 1979. Distribution and speciation of cadmium in the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Newsletter of Environmental Contamination and Toxicology*. 23(4,5):445-451.
- ➔ Cornelis G., Hund-Rinke K., Kuhlbusch T., Brink N van den., Nickel C. 2014. Fate and Bioavailability of Engineered Nanoparticles in Soils: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 44:2720-2764.
- ➔ Cornelis G., Ryan B., McLaughlin M.J., Kirby J.K., Beak D., Chittleborough D. 2011. Solubility and Batch Retention of CeO₂ Nanoparticles in Soils. *Environ Sci Technol*. 45:2777-2782.
- ➔ Cortet J., Gomot-de Vaufleury A., Poinso-Balaguer N., Gomot L., Texier C., Cluzeau D. 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutants effects. *European Journal of Soil Biology*. 35:115-134.
- ➔ Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A., Vasseur P. 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38:122-131.
- ➔ Cotae V., Creanga L. 2005. LHC II system sensitivity to magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 289:459-462.
- ➔ Coutris C., Joner E.J., Oughton D.H. 2012. Aging and soil organic matter content affect the fate of silver nanoparticles in soil. *Sci Total Environ*. 420:327-333.
- ➔ Cronholm P.K., Midander H.L., Karlsson K., Elihn I.O., Wallinder, Moller L. 2011. Effect of sonication and serum proteins on copper release from copper nanoparticles and the toxicity towards lung epithelial cells. *Nanotoxicology*. 5(2):269-281.
- ➔ Crosera M.M., Bovenzi G., Maina G., Adami C., Zanette C., Florio F., Filon Larese. 2009. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *Int Arch Occup Environ Health*. 82(9):1043-1055.
- ➔ Croteau M.N., Dybowska A.D., Luoma S.N., Valsami-Jones E. 2011. A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology*. 5(1):79-90.
- ➔ CSST. 2006. Commission de la Sante et de la Sécurité du Travail, Service du répertoire toxicologique, *Noir de Carbone*.
- ➔ Cui Y., Gong X., Duan Y., Li N., Hu R., Liu H., Hong M., Zhou M., Wang L., Wang H., Hong F. 2010. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*. 183:874-880.

- ➔ Curtis J., Greenberg M., Kester J., Phillips S., Krieger G. 2006. Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. *Toxicol Rev.* 25(4):245-60.
- ➔ Dabrunz A., Duester L., Prasse C., Seitz F., Rosenfeldt R., Schilde C., Schaumann G.E., Schulz R. 2011. Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO₂ nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*. *PLoS ONE* 6:e20112.
- ➔ Dagnelie P. 1999. Statistiques théoriques et appliquées. Tome 2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Univ De boeck et Larcier, 659p.
- ➔ Dallinger R., Berger B., Gruber C., Hunziker P.E., Stürzenbaum S. 1993. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cellular and Molecular biology.* 46(2):331-346.
- ➔ Dallinger R., Berger B., Triebkorn R., Kohler H. 2001. Soil biology and ecotoxicology. In: Barker, G.M. (Ed.). The biology of terrestrial molluscs. *CAB International, Oxon, Wallingford, UK.* 489-525.
- ➔ Darlington T., Neigh A., Spencer M., Nguyen O., Oldenburg S. 2009. Nanoparticle characteristics affecting environmental fate and transport through soil. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 28:1191-1199.
- ➔ Davies W.J., Freeman S.J. 1995. Frog Embryo Teratogenesis Assay, in: O'Hare, S., Atterwill, C.K. (Eds.), *In Vitro Toxicity Testing Protocols.* Humana Press, Totowa, NJ. 311-316p.
- ➔ Descamps O. 2004. Stress oxydant et vieillissement : aspects mitochondriaux et stratégies nutritionnelles anti-cancer et antivieillessement chez la souris OHI. Thèse effectuée au laboratoire NVMC.
- ➔ Di Bona K.R., Xu Y., Gray M., Fair D., Hayles H., Milad L., Rasco J.F. 2015. Short- and Long-Term Effects of Prenatal Exposure to Iron Oxide Nanoparticles: Influence of Surface Charge and Dose on Developmental and Reproductive Toxicity. *International journal of molecular sciences.* 16(12):30251-30268.
- ➔ Di Giulio R.T., Habig C., Gallagher E.P. 1993. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology.* 26(1):1-22.
- ➔ Dickinson D.A., Forman H.J. 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology.* 64 :1019-26.
- ➔ Diez-Ortiz M., Lahive E., George S., Ter Schure A., Van Gestel C.A.M., Jurkschat K. 2015. Short-term soil bioassays may not reveal the full toxicity potential for

- nanomaterials; bioavailability and toxicity of silver ions (AgNO_3) and silver nanoparticles to earthworm *Eisenia fetida* in long-term aged soils. *Environ Pollut.* 203:191-198.
- ➔ Dimkpa C.O., McLean J.E., Latta D.E., Manangón E., Britt D.W., Johnson W.P., Anderson A.J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research.* 14(9):1-15.
 - ➔ Donaldson K., Li X.Y., MacNee W. 1998. Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury. *J. Aerosol Sci.* 29(5/6):553-560.
 - ➔ Douki T., Delatour T., Bianchini F., Cadet J. 1996. Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method. *Carcinogenesis.* 17:347-353.
 - ➔ Drasler B., Drobne D., Novak S., Valant J., Boljte S., Otrin L., Rappolt M., Artori B., Iglíc A., Iglíc V.K., Sustar V., Makovec D., Gyergyek S., Hocevar M., Godec M., Zupanc J. 2014. Effects of magnetic cobalt ferrite nanoparticles on biological and artificial lipid membranes. *Int. J. Nanomed.* 9:1559-1581.
 - ➔ Druart C. 2011. Effets des pesticides de la vigne sur le cycle biologique de l'escargot dans divers contextes d'exposition. Thèse de l'Université de Franche-Comté. 326p.
 - ➔ Druart C., Scheifler R., Millet M., 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.* 53:56-64.
 - ➔ Druart C., Scheifler R., Vaufleury A. 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. *Journal of Hazardous Materials.* 184:26-33.
 - ➔ Duan J., Yu Y., Li Y., Yu Y., Sun Z. 2013. Cardiovascular toxicity evaluation of silica nanoparticles in endothelial cells and zebrafish model. *Biomaterials.* 34(23), 5853-5862.
 - ➔ Dubey A., Goswami M., Yadav K., Chaudhary D. 2015. Oxidative Stress and Nano-Toxicity Induced by TiO_2 and ZnO on WAG Cell Line. *PLoS ONE.* 10(5):e0127493.
 - ➔ Duchateau G., Florkin M. 1959. For trehalosemie of insects and its signification. *Arch Insect Physiol Biochem.* 67:306-314.
 - ➔ Ducrot V. 2013. Mechanistic approaches for assessing effects of chemicals in aquatic molluscs. Habilitation à Diriger des Recherches. Université Rennes 1.

- ➔ Dumeé V., Kruatrachue M., Trinachartvanit W., Tanhan P., Pokethitiyook P., Damrongphol P. 2012. Bioaccumulation of heavy metals in water, sediments, aquatic plant and histopathological effects on the golden napple snail in Beung Boraphet reservoir, Thailand. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 86:204-212.
- ➔ EC (2003a). Technical Guidance Document on risk assessment. Part II. Institute for health and consumer protection.
- ➔ EC (2003b). Technical Guidance Document on risk assessment. Part III. Institute for health and consumer protection.
- ➔ Eidi H. 2011. Cytotoxicité de nanoparticules polymériques, vecteurs de médicaments. Thèse de Doctorat de l'université Henri Poincaré. France. 125p.
- ➔ Eissa S.H., Rizk E.T., Abou-Shafey A.E., Mona M.H., Atlum A. 2002. Toxicological effect on *Euphorbia peplus* water suspension on hemocytes of the fresh water snails, *Biomphalaria alexandrina* and *Lanistes carinatus*. *Proc LCBS*. 2:417-447.
- ➔ El-Hommosany K., El-Sherbibni, S.A. 2011. Impact of the photosensitizers hematoporphyrin coated gold nanoparticles on *Biomphalaria alexandrina* snails. *Open Journal of Animal Sciences*. 1(02):54.
- ➔ Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jungens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13:341.
- ➔ Eybe T., Audinot J.N., Udelhoven T., Lentzen E., El Adib B., Ziebel J., Bohn T. 2013. Determination of oral uptake and biodistribution of platinum and chromium by the garden snail (*Helix aspersa*) employing nano-secondary ion mass-spectrometry. *Chemosphere*. 90(6):1829-1838.
- ➔ Fahmy B., Cormier S.A. 2009. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology In Vitro*. 23(7):1365-1371.
- ➔ 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.
- ➔ Fang J., Shan X., Wen B., Lin J., Owens G. 2009. Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns. *Environmental Pollution*. 157:1101-1109.
- ➔ Flohé, L., Günzler, W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*. 105:114-120.
- ➔ Forbes V.A., Forbes T.L., Rivière J.L. 1997. Écotoxicologie: théorie et applications. Editions Quae, Paris. France. 424 p.

- ➔ Forbes V.E., Forbes T.L. 1994. *Ecotoxicology in Theory and Practice*. Chapman & Hall, London. 242 p.
- ➔ Franco A.A., Odom R.S., Rando T.A. 1999. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*. 27(9):1122-1132.
- ➔ Franklin N.M., Rogers N.J., Apte S.C., Batley G.E., Gadd G.E., Casey P.S. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*. 41(24):8484-8490.
- ➔ Fränzle O. 2006. Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecological Indicators*. 6(1):114-136.
- ➔ Frias-Espericueta M.G., Abad-Rosales S., Aidée C.N.V., Isidro-Osuna L., Pàez-Osuna F., Olvera R.L., Voltolina D. 2008. Histological effects of a combination of heavy metals on pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquatic Toxicology*. 89:152-157.
- ➔ Frohlich E. 2012. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 7:5577-5591.
- ➔ Frohlich, E., Roblegg E. 2012. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology*. 291(1-3):10-17.
- ➔ Fubini B., Ghiazza M., Fenoglio L. 2010. Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology*. 4:347-363.
- ➔ Fukui H., Iwahashi H., Endoh S., Nishio K., Yoshida Y., Hagihara Y., Horie M. 2015. Ascorbic acid attenuates acute pulmonary oxidative stress and inflammation caused by zinc oxide nanoparticles. *Journal of occupational health*. 57(2):118-125.
- ➔ Gabe M. 1968. *Techniques histologiques*, Masson et Cie Editeurs, Paris., 1113 p.
- ➔ Galaris D., Evangelou A. 2002. The role of oxidative stress in mechanisms of metalinduced carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 42(1):93-103.
- ➔ Galloway T., Lewis C., Dolciotti I., Johnston B.D., Moger J., Regoli F. 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution*. 158(5):1748-1755.
- ➔ Gambi N., Pasteris A., Fabbri E. 2007. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C. 145:678-685.

- ➔ Gao Y.Q., Gao N.Y., Deng Y., Gu J.S., Shen Y.C., Wang S.X. 2012. Adsorption of microcystin-LR from water with iron oxide nanoparticles. *Water Environ Res.* 84(7): 562-8.
- ➔ Garaud M., Trapp J., Devin S., Cossu-Leguille C., Pain-Devin S., Felten V., Giamberini L. 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. *Aquatic Toxicology.* 158:63-74.
- ➔ Gebel G. 2000. Structural evolution of water swollen perfluoro sulfonated ionomers from dry membrane to solution. *Polymer.* 41:5829-5838.
- ➔ Geffard O., Budzinski H., His E. 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology.* 11(6):403-416.
- ➔ Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schurch S., Kreyling W., Schulz H., et al. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by non-phagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* 113:1555-60.
- ➔ George S., Xia T.A., Rallo R., Zhao Y., Ji Z.X., Lin S.J., Wang X., Zhang H.Y., France B., Schoenfeld D., Damoiseaux R., Liu R., Lin S., Bradley K.A., Cohen Y., Nal A.E. 2011. Use of a High-Throughput Screening Approach Coupled with *In Vivo* Zebrafish Embryo Screening To Develop Hazard Ranking for Engineered Nanomaterials. *ACS Nano.* 5(3):1805-1817.
- ➔ Gernhöfer M., Pawert M., Schramm M., Müller E., Triebkorn R. 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery.* 8:241-260.
- ➔ Gimbert F. 2006. Cinétique de transfert de polluants métalliques de sol à l'escargot. Thèse de Doctorat de l'université de Franche-comté. France .192p.
- ➔ Goetze T., Gansau C., Buske N., Roeder M., Gornert P., Bahr M. 2002. Biocompatible magnetic core/shell nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 252: 399.
- ➔ Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J. 1972. Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology.* 18:545-551.
- ➔ Gomes S.I., Hansen D., Scott-Fordsmand J.J., Amorim M.J. 2015. Effects of silver nanoparticles to soil invertebrates: Oxidative stress biomarkers in *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution.* 199:49-55.

- ➔ Gomes T., Pereira C.G., Cardoso C., Sousa V.S., Teixeira M.R., Pinheiro J.P., Bebianno M.J. 2014. Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine environmental research*. 101:208-214.
- ➔ Gomot A. 1997. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33:209-216.
- ➔ Gomot A. 1998. "Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 41(3):288-297.
- ➔ Gomot A., Gomot L. 1995. Neurohormonal control of body and shell growth of the snail *Helix*. *Bull. Inst. Océanog. Monaco*. 14:141-149.
- ➔ Gomot A., Gomot L., Boukraa S., Bruchert S. 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of the route for the stimulating factors. *Jornal 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 L., Deray A. 1987. Les escargots. *La Recherche*. 186:302-311.
- ➔ Gomot-de Vaufleury A. 2001. Regulation of growth and reproduction. *The biology of terrestrial molluscs*. Barker GM. Oxon, CABI:331-355.
- ➔ Gong N., Shao K.S., Feng W., Lin Z.Z., Liang C.H., Sun Y.Q. 2011. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*. 83(4):510-516.
- ➔ Gottschalk F., Nowack B. 2011. The release of engineered nanomaterials to the environment. *J Environ Monit.* 13(5):1145-1155.
- ➔ Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R., Nowack B. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology*. 43:9216-9222.
- ➔ Grara N., Atilia A., Boucenna M., Khalid F., Berrebah H., Djebbar M.R. 2012. Effects of heavy metals on the *Helix aspersa* bioindicators of environment pollution for human health. *Int. Conf. Appl. Life. Sci.* 241-246.
- ➔ Grara N., Bouloudenine M., Khaldi F., Zenir Z., Abdemadjid S. 2015. Caractérisation Morphophysiological de la Toxicité du ZnO (Nanoparticule manufacturée) sur l'escargot *Helix aspersa* bio indicateur de pollution de l'environnement. *J. Mater. Environ. Sci.* 6(9):2596-2603.

- ➔ Grara N. 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux .Thèse de Doctorat Université Badji Mokhtar-Annaba. 280p.
- ➔ Greulich C., Diendorf J., Gessmann J., Simon T., Habijan T., Eggeler G., et al. 2011. Cell typespecific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomater.* 7:3505.
- ➔ Grieneisen M.L. 2010. The proliferation of nano journals. *Nat Nanotechnol.* 5(12):825.
- ➔ Guo B., Zebda R., Drake S.J., Sayes C.M. 2009. Synergistic effect of co-exposure to carbon black and Fe₂O₃ nanoparticles on oxidative stress in cultured lung epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology.* 6:4.
- ➔ Guo C., Xia Y., Niu P., Jiang L., Duan J., Yu Y., Sun Z. 2015. Silica nanoparticles induce oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction *in vitro* via activation of the MAPK/Nrf2 pathway and nuclear factor-κB signaling. *International journal of nanomedicine.* 10:1463.
- ➔ Gupta A.K., Gupta M. 2005a. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* 26(13):1565.
- ➔ Gupta A.K., Gupta M. 2005b. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 26(18):3995.
- ➔ Gutteridge JM. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry.* 41:1819-1828.
- ➔ Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry.* 249:7130-7139.
- ➔ Hagens W.I., Oomen A.G., De-Jong W.H., Al E. 2007. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body. *Regul. Toxicology Pharmacol.* 49:217-28.
- ➔ Hallare A.V., Schirling M., Luckenbach T., Köhler H-R., Triebkorn R. 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology.* 30(1):7-17.
- ➔ Hamed S.S., Abdelmeguid N.E., Essawy A.E., Radwan M.A., Hegazy A.E., 2007. Histological and Ultrastructural Changes Induced by Two Carbamate Molluscides on the digestive Gland of *Eobania vermiculata*. *Journal of Biological Sciences.* 7(6):1017-1037.

- ➔ Hames C.A.C., Hopkin S.P. 1989. The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods. *J. Zool. (Lond.)*. 217:599-627.
- ➔ Handy RD, Kammer F von der, Lead JR, Hassellöv M, Owen R, Crane M. 2008. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology* 17:287-314.
- ➔ Hao L.H., Wang Z.Y., Xing B.S. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences-China*. 21(10):1459-1466.
- ➔ Hatcher E.L., Chen Y., Kang Y.J. 1995. Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free Radic. Biol. Med.* 19:805-812.
- ➔ Hayes J.D., Pulford D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Biochemistry and Molecular Biology*. 30:445-600.
- ➔ Heikens A., Peijnenburg W.J.G.M., Hendriks A.J. 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environ. Pollut.* 113:385-393.
- ➔ Herkovits J., Perez-Coll C.S. 2003. AMPHITOX: a customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. *ASTM special technical publication*. 1443:46-62.
- ➔ Hervé-Bazin B. 2006. Nanoparticules : principales données toxicologiques actuelles. ADHYS, Association pour le Développement de l'Hygiène et de la Sécurité dans les établissements de recherche ou d'enseignement supérieur, Paris. France.
- ➔ Hetland R.B., Cassee F.R., Refsnes M., Schwarze P.E., Lag M., Boere A.J.F., Dybing E. 2004. Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *In Vitro Toxicol.* 18:203-212.
- ➔ Heusser S., Dupuy H.G. 2011. De la structure tissulaire à la réalisation des fonctions chez les gastéropodes pulmonés (I) Élément d'histologie et de physiologie des espèces *Helix aspersa* et *Helix pomatia*. *Folia conchyliologica*. 10:16-25.
- ➔ Hilger I., Kaiser W.A. 2012. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine*. 7(9):1443-1459.
- ➔ Hirrlinger J., Resch A., Gutterer J.M., Dringen R. 2002. Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *Journal of neurochemistry*. 82(3):635-644.

- ➔ Hopkin S.P. 1990. Critical Concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial Arthropods. *Funct. Ecol.* 4:321-327.
- ➔ Hopkin S.P. 1995. Deficiency and excess of essential and non-essential metals in terrestrial insects, In: Harrington, R., Stork, N.E., (Eds.), *Insects in a Changing Environment*, Academic Press, London 251-270.
- ➔ Hotze E.M., Bottero J-Y., Wiesner M.R. 2010. Theoretical framework for nanoparticle reactivity as a function of aggregation state. *Langmuir.* 26:11170-11175.
- ➔ Howe C.M., Berrill M., Pauli B.D., Helbing C.C., Werry K., Veldhoen N. 2004. "Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 23(8):1928-1938.
- ➔ Hsiao I.L., Huang Y.J. 2011. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci Total Environ.* 409(7):1219-1228.
- ➔ Hsieh H.C., Chen C.M., Hsieh W.Y., Chen C.Y., Liu C.C., Lin F.H. 2015. ROS-induced toxicity: exposure of 3T3, RAW264. 7, and MCF7 cells to superparamagnetic iron oxide nanoparticles results in cell death by mitochondria-dependent apoptosis. *Journal of Nanoparticle Research.* 17(2):1-14.
- ➔ Hu C.W., Li M., Cui Y.B., Li D.S., Chen J., Yang L.Y. 2010. Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol Biochem.* 42: 586-91.
- ➔ Hu Y.L., Qi W., Han F., Shao J.Z., Gao J.Q. 2011. Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model. *Int J Nanomedicine.* 6(4):3351-3359.
- ➔ Hua M., Zhang S., Pan B., Zhang W., Lv L., Zhang Q. 2012. Heavy metal removal from water/wastewater by nanosized metal oxides: A review. *J Hazard Mater.* 211-212:317-331.
- ➔ Hughes P., Marshall D., Reid Y., Parkes H., Gelber C. 2007. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need. *Biotechniques* 43(5):575, 577-578, 581, 572 passim.
- ➔ Hund-Rinke K., Simon M. 2006. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids. *Environ Sci Pollut Res Int.* 13(4):225-232.
- ➔ Iglesias J., Castillejo J., Parama R., Mascato R., Lombardia M.J. 2000. Susceptibility of the eggs of the pest slug *Deroceras reticulatum* to contact with metal salts. *J. Molluscan Stud.* 66:171-176.

- ➔ Ireland J.C., Klostermann P., Rice E.W., Clark R.M. 1993. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Appl Environ Microbiol.* 59(5):1668-1670.
- ➔ Ismert M., Oster T., Bagrel D. 2002. Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic metabolizing enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere.* 46(2):273-280.
- ➔ Jaisi D.P., Saleh N.B., Blake R.E., Elimelech M. 2008. Transport of Single-Walled Carbon Nanotubes in Porous Media: Filtration Mechanisms and Reversibility. *Environ Sci Technol.* 42:8317-8323.
- ➔ Jeong S-W., Kim S-D. 2009. Aggregation and transport of copper oxide nanoparticles in porous media. *J Environ Monit.* 11:1595-1600.
- ➔ Jess S., Marks R.J. 1998. Effect of temperature and photoperiod on growth and reproduction of *Helix aspersa* var. *maxima*. *Journal of Agricultural Sciences.* 130:367-372.
- ➔ Ji Z., Jin X., George S., Xia T., Meng H., Wang X., Suarez E., et al. 2010. Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media. *Environ Sci Technol.* 44(19):7309-7314.
- ➔ Jiang J., Oberdörster G., Biswas P. 2008. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanoparticle Res.* 11:77-89.
- ➔ Jiang W.K., Yang R., Vachet W., Xing B. 2012. Interaction between oxide nanoparticles and biomolecules of the bacterial cell envelope as examined by infrared spectroscopy. *Langmuir.* 26(23):18071-18077.
- ➔ Jing Y., Dai J., Chalmers-Redman R.M. 1999. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood.* 94:2102-2111.
- ➔ Johari S.A., Kalbassi M.R., Lee S.B., Dong M.S., Yu I.J. 2016. Silver nanoparticles affects the expression of biomarker genes mRNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Clinical Pathology.* 25(1):85-90.
- ➔ Jolivet J.P., Chanéac C., Tronc E. 2003. Iron oxide chemistry, from molecular clusters to extended solid networks. *Chem. Commun.* 481-487.
- ➔ Jolivet J-P., Tronc E., Chanéac C. 2002. Synthesis of iron oxide-based magnetic nanomaterials and composites. *Comptes Rendus Chimie.* 5(10):659-664.

- ➔ Jones C.F., Grainger D.W. 2009. *In vitro* assessments of nanomaterial toxicity. *Adv Drug Deliv Rev.* 61(6):438-456.
- ➔ Jovanović B., Whitley E.M., Kimura K., Crumpton A., Palić D. 2015. Titanium dioxide nanoparticles enhance mortality of fish exposed to bacterial pathogens. *Environmental Pollution.* 203:153-164.
- ➔ Jumel A., Lagadic L. 2000. Metabolism of polysaccharides in *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) exposed to 4-nonylphenol and nonylphenol dodecylethoxylate in mesocosms. Third SETAC World Congress. Global Environmental Issues in the 21st Century: Problems, Causes and Solutions. Brighton, Angleterre.
- ➔ Kabanov A.V. 2006. Polymer genomics: an insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev.* 58(15):1597-621.
- ➔ Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B., Vonbank R., Wichser A., Zuleeg S., *et al.* 2008. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ Pollut.* 156:233-239.
- ➔ Kahru A., Dubourguier H.C. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology.* 269(2-3):105-119.
- ➔ Kahru A., Ivask A. 2012. Mapping the Dawn of Nanoecotoxicological Research. *Acc Chem Res.* 46(3):823-833.
- ➔ Kahru A., Savolainen K. 2010. Potential hazard of nanoparticles: from properties to biological and environmental effects. *Toxicology.* 269(2-3):89-91.
- ➔ Kalia K., Narula G.D., Kannan G.M., Flora S.J.S. 2006. Effects of combined administration of captopril and DMSA on arsenite induced oxidative stress and blood and tissue arsenic concentration in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 144:372-379.
- ➔ Kang C.M., Jang A.S., Ahn M.H., Shin J.A., Kim J.H., Choi Y.S., Rhim T.Y., Park C.S. 2005. Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33(3):290-296.
- ➔ Kao Y.Y., Chen Y.C., Cheng T.J., Chiung Y.M. Liu P.S. 2012. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicol Sci.* 125(2):462-472.
- ➔ Karakassides M.A. 2013. Nanoscale zero-valent iron supported on mesoporous silica: Characterization and reactivity for Cr(VI) removal from aqueous solution. *Journal of hazardous materials.* 261:295-306.

- ➔ Karlsson H.L., Cronholm P., Gustafsson J., Moller L. 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 21(9):1726-1732.
- ➔ Kavitha R., Rani S.D., Sivagnanam S., Padmaja M. 2013. Cadmium Nanoparticle Induced Histological and Biochemical changes in Hepatopancreas of Mud Crab *Scylla olivacea* (Herbst, 1796). *Journal of Academia and Industrial Research.* 2(3):205.
- ➔ Keller A.A., McFerran S., Lazareva A., Suh S. 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J Nanoparticle Res.* 15:1-17.
- ➔ Kerney M., Cameron R., Bertrand A. 2006. A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, Delachaux et Niestlé SA. 97 p.
- ➔ Khin M.M., Nair A.S., Babu V.J., Murugan R., Ramakrishna S. 2012. A review on nanomaterials for environmental remediation. *Energy Environ Sci.* 5:8075-8109.
- ➔ Kim D., El-Shall H., Dennis D., Morey T. 2005. Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. *Colloid Surface.* 40(2):83.
- ➔ Kiser M.A., Westerhoff P., Benn T., Wang Y., Pérez-Rivera J., Hristovski K. 2009. Titanium Nanomaterial Removal and Release from Wastewater Treatment Plants. *Environ Sci Technol.* 43:6757-6763.
- ➔ Kohler H.R., Storch V., Alberti G. 1992 The impact of lead on the assimilation efficiency of laboratory-held Diplopoda (Arthropoda) preconditioned in different environmental situations. *Oecologia.* 90:113-119.
- ➔ Kool P.L., Ortiz M.D., van Gestel C.A.M. 2011. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl₂ to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environ Pollut.* 159:2713-2719.
- ➔ Krejsa C.M., Franklin C.C., White C.C., Ledbetter J.A., Schieven G.L., Kavanagh T.J. 2010. Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress. *J Biol Chem.* 285(21):16116-16124.
- ➔ Kreuter J. 2001. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47(1):65-81.
- ➔ Kulvietis V., Zalgeviciene V., Didziapetriene J., Rotomskis R. 2011. Transport of nanoparticles through the placental barrier. *Tohoku J Exp Med.* 225(4):225-234.
- ➔ Kumari M., Rajak S., Singh S.P., Kumari S.I., Kumar P.U., Murty U.S., Rahman M.F. 2012. Repeated oral dose toxicity of iron oxide nanoparticles: biochemical and

histopathological alterations in different tissues of rats. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 12(3):2149-2159.

- ➔ Labille J., Feng J., Botta C., Borschneck D., Sammut M., Cabie M., *et al.* 2010. Aging of TiO₂ nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environ Pollut.* 158:3482-3489.
- ➔ Labrot F., Ribera D., Denis M.S., Narbonne J.F. 1996. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*. 1(1):21-28.
- ➔ Lacava L.M., Lacava Z.G.M., Azevedo R.B., Chaves S.B., Garcia V.A.P., Silva O., Pelegrini F., Buske N., Gansau C., Da Silva M.F., Morais P.C. 2002. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 252:367.
- ➔ Lacoue-Labarthe T., Warnau M., Metian M., Oberhänsli F., Rouleau., Bustamante P. 2009. Biokinetics of Hg and Pb accumulation in the encapsulated egg of the common cuttlefish *Sepia officinalis*: Radiotracer experiments. *Science of the Total Environment*. 407(24):6188-6195.
- ➔ Lacoue-Labarthe T., Warnau M., Oberhänsli F., Teyssié J-L., Bustamante P. 2010. Contrasting accumulation biokinetics and distribution of ²⁴¹Am, Co, Cs, Mn and Zn during the whole development time of the eggs of the common cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 382(2):131-138.
- ➔ Lacoue-Labarthe T., Warnau M., Oberhänsli F., Teyssié J-L., Koueta N., Bustamante P. 2008. Differential bioaccumulation behaviour of Ag and Cd during the early development of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquatic Toxicology*. 86(3):437-446.
- ➔ Lademann J., Weigmann H-J., Rickmeyer C., Barthelmes H., Schaefer H., Mueller G., Sterry W. 1999. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*. 247-256.
- ➔ Lagadic L., Caquet T. 1996. Marqueurs biologiques de pollution: des outils au service de l'écotoxicologie. *Phytoma - La Défense des Végétaux*. 480:10-13.
- ➔ Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*. Eds Lagadic L, Caquet T, Amiard J C, Ramade F, Masson, Paris. France. 1-9.

- ➔ Lam P.K.S. 1996 a. Effects of cadmium on the consumption and absorption rates of a tropical freshwater snail *Radix plicatulus*. *Chemosphere*. 32:2127-2132.
- ➔ Landar A., Zmijewski J.W., Dickinson D.A., LeGoffe C., Johnson M.S., Milne G.L., Zaroni G., Vidari G., Morrow J.D., Darley-Usmar V.M. 2006. Interaction of electrophilic lipid oxidation products with mitochondria in endothelial cells and formation of reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290:H1777-H1787.
- ➔ Lanone S., Rogerieux F., Geys J., Dupont A., Maillot-Marechal E., Boczkowski J., Lacroix G., Hoet P. 2009. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol*. 6:14.
- ➔ Lapiéd E., Moudilou E., Exbrayat J.M., Oughton H., Joner E.J. 2010. Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Nanomedicine*. 5:975-84.
- ➔ Larba R., Soltani N. 2014. Use of the land snail *Helix aspersa* for monitoring heavy metal soil contamination in northeast Algeria. *Environmental Monitoring and assessment*. 186(8):4987-4995.
- ➔ Larroutourou B. 2005. Les nanosciences. *Centre national de la recherche scientifique*. 42.
- ➔ Laskowski R., Hopkin S.P. 1996a. Effect of Zn, Cu, Pb and Cd on fitness in snail (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 34:59-69.
- ➔ Laskowski R., Hopkin S.P. 1996b. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail *Helix aspersa*: implication for predators. *Environmental pollution*. 91:289-297.
- ➔ Le Bras G.J. 2007. Ecotoxicologie et méthodes d'investigation « les bio-indicateurs ». version 2.0, ISA & Université Catholique de Lille. France. 91p.
- ➔ Lecoanet H.F., Bottero J-Y., Wiesner M.R. 2004. Laboratory Assessment of the Mobility of Nanomaterials in Porous Media. *Environ Sci Technol*. 38:5164-5169.
- ➔ Lecoanet H.F., Wiesner M.R. 2004. Velocity Effects on Fullerene and Oxide Nanoparticle Deposition in Porous Media. *Environ Sci Technol*. 38:4377-4382.
- ➔ Lee B., Sarin L., Johnson N.C., Hurt R.H. 2009. A Nano-Selenium Reactive Barrier Approach for Managing Mercury over the Life-Cycle of Compact Fluor. *Environ Sci Technol*. 43(15):5915-5920.
- ➔ Lee S.W., Kim S.M., Choi J. 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus*

- riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28(1):86-91.
- ➔ Li J.J., Muralikrishnan S., Ng C.T., Yung L.Y., Bay B. H. 2010. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Exp Biol Med (Maywood)*. 235(9):1025-1033.
 - ➔ Li N., Hao M., Phalen R.F., Hinds W.C., Nel A.E. 2003. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical Immunology*. 109:250-265.
 - ➔ Li Y., Zhang W., Niu J., Chen Y. 2012. Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal-Oxide Nanoparticles. *Acs Nano*. 6:5164-5173.
 - ➔ Lin C., Fugetsu B., Su Y.B., Watari F. 2009a. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *Journal of Hazardous Materials*. 170(2-3):578-583.
 - ➔ Lin K.S., Dehvari K., Liu Y.J., Kuo H., Hsu P.J. 2013. Synthesis and characterization of porous zero-valent iron nanoparticles for remediation of chromium contaminated wastewater. *J Nanosci Nanotechnol*. 13(4):2675-2681.
 - ➔ Linhua H.A.O., Zhenyu W.A.N.G., Baoshan X.I.N.G. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences*. 21(10):1459-1466.
 - ➔ Liu Q.L., Zhao Y.Y., Wan Y.L., Zheng J.P., Zhang X.J., Wang C.R., Fang X.H., Lin J.X. 2010. Study of the Inhibitory Effect of Water-Soluble Fullerenes on Plant Growth at the Cellular Level. *Acs Nano*. 4(10):5743-5748.
 - ➔ Liu R., Lal R. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Sci Total Environ*. 514:131-139.
 - ➔ Livingstone D.R., Farrar S.V. 1984. Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo[a]pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L. *Science of the Total Environment*. 39:209-235.
 - ➔ Lövestam G., Rauscher H., Roebben G., Klüttgen B.S., Gibson N., Putaud J.P., Stamm H. 2010. Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. Joint Research Centre (JRC) Reference Reports, 80004-1.
 - ➔ Lowry G.V., Gregory K.B., Apte S.C., Lead J.R. 2012. Transformations of nanomaterials in the environment. *Environ. Sci. Technol*. 46: 6893-6899.

- ➔ Lv L.Z., Tong C.Q., Yu J., Han M., Gao J.Q. 2013. Mechanism of enhanced oral absorption of hydrophilic drug incorporated in hydrophobic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 8:2709-2717.
- ➔ Ma L., Liu J., Li N., Wang J., Duan Y., Yan J., Liu H., Wang H., Hong F. 2010. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials*. 31:99-105.
- ➔ Machado S., Stawinski W., Slonina P., Pinto A.R., Grosso J.P., Nouws H.P.A., Albergaria J.T., Delerue-Matos C. 2013. Application of green zero-valent iron nanoparticles to the remediation of soils contaminated with ibuprofen. *Science of the Total Environment*. 461-462:323-329.
- ➔ Madoz-Escande C., Simon O. 2006. Contamination of terrestrial gastropods, *Helix aspersa maxima*, with Cs, Sr, Ba and Te by direct, trophic and combined pathways, France. 35-36p.
- ➔ Mahmoudi M., Hofmann H., Rutishauser B.R., Fink A.P. 2012. Assessing the *in vitro* and *in vivo* toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem. Rev.* 112:2323-2338.
- ➔ Manke A., Wang L., Rojanasakul Y. 2013. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*.
- ➔ Manzl C., Krumschnabel G., Schwarzbaum P.J., Dallinger R. 2004. Acute toxicity of cadmium and copper in hepatopancreas cells from the Roman snail (*Helix pomatia*). *Comp. Biochem. Physiol.* 138C:45-52.
- ➔ Marasco F., Murciano C. 2003. Les escargots. *Elevage*. Paris, Editions de Vecchi. 103 p.
- ➔ Marigomez I., Soto M., Cajaraville M.P., Angulo E., Giamberini L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*. 56(5):358-392.
- ➔ Marigomez J.A., Cajaraville M.P., Angulo E. 1990. Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry*. 94(2):191-199.
- ➔ Martje J.M.N. 2005. Origin, transfer and effects of heavy metals in a soil-plant-snail food chain in polluted ecosystems of Biesboch National Park. Amsterdam, Pays-Bas. 10-53p.
- ➔ Martoja R., Martoja P.M. 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, Paris VI. 345p.

- ➔ Masaya M., Yoshinobu H., Ai Y., Maki K., Yasuo O. 2002. Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury. *Journal of Phycology*. 38(5):983.
- ➔ Mavon A., Miquela C., Lejeune O., Payre B., Moretto P. 2007. *In vitro* percutaneous absorption and *in vivo* stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacol Physiol*.10-20.
- ➔ McLoughlin N. Yin D., Maltby L., Wood R.M., Yu H. 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19:2085-2092.
- ➔ Meier R., Eeftens M., Aguilera I., Phuleria H.C., Ineichen A., Davey M., Ragettli M.S., Fierz M., Schindler C., Probst-Hensch N., *et al.* 2015. Ambient Ultrafine Particle Levels at Residential and Reference Sites in Urban and Rural Switzerland. *Environmental Science & Technology*. 49:2709-2715.
- ➔ Miao A.J., Schwehr K.A., Xu C., Zhang S.J., Luo Z.P., Quigg A., Santschi P.H. 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution*. 157(11):3034-3041.
- ➔ Midander K., Cronholm P., Karlsson H.L., Elihn K., Moller L., Leygraf C., Wallinder I. O. 2009. Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper (II) oxide particles: a cross-disciplinary study. *Small*. 5(3):389-399.
- ➔ Mitrano D.M., Motellier S., Clavaguera S., Nowack B. 2015. Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products. *Environment International*. 77:132-147.
- ➔ Mody V.V., Siwale R., Singh A., Mody H.R. 2010. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci*. 2(4):282-289.
- ➔ Mohapatra M., Anand S. 2010. Synthesis and applications of nanostructured iron oxides/hydroxides. *International Journal of Engineering, Science and Technology*. 2(8):127-146.
- ➔ Molnár G., Salánki J., Kiss T. 2004. Cadmium inhibits GABA-activated ion currents by increasing intracellular calcium level in snail neurons. *Brain research*. 1008(2)/205-211.
- ➔ Moore M.N., Mayernick J.A., Giam C.S. 1985. Lysosomal responses to a polynuclear aromatic hydrocarbon in a marine snail: effects of exposure to phenanthrene and recovery. *Marine Environmental Research*. 17:230-233.

- ➔ Mouneyrac C., Buffet P.E., Poirier L., Zalouk-Vergnoux A., Guibbolini M., Riso-de Faverney C., Perrein-Ettajni H. 2014. Fate and effects of metal-based nanoparticles in two marine invertebrates, the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* and the annelid polychaete *Hediste diversicolor*. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(13):7899-7912.
- ➔ Mueller N.C., Braun J., Bruns J., Cernik M., Rissin P., Rickerby D., Nowack B. 2012. Application of nanoscale zero valent iron (NZVI) for groundwater remediation in Europe. *Environ Sci Pollut Res*. 19:550-558.
- ➔ Mueller N.C., Nowack B. 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ Sci Technol*. 42(12):4447-4453.
- ➔ Musee N., Oberholster P.J., Sikhwivhilu L., Botha A.M. 2010. The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behaviour of freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Chemosphere*. 81(10):1196-1203.
- ➔ Narbonne J.M. X. 1993. Use of biomarkers in assessment of contamination in marine ecosystems. *Fundamental Approach and Applications, MAP Technical Reports Series*. 71:1-20.
- ➔ Navarro D.A., Banerjee S., Watson D.F., Aga D.S. 2011. Differences in Soil Mobility and Degradability between Water-Dispersible CdSe and CdSe/ZnS Quantum Dots. *Environ Sci Technol*. 45:6343-6349.
- ➔ Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 311:622-627.
- ➔ Nickel C., Gabsch S., Hellack B., Nogowski A., Babick F., Stintz M., *et al.* 2015. Mobility of coated and uncoated TiO₂ nanomaterials in soil columns—Applicability of the tests methods of OECD TG 312 and 106 for nanomaterials. *J Environ Manage*. 157:230-237.
- ➔ Nielson F. 1995. Other trace elements. In: Ziegler, E.E., Filer, L.J. Present Knowledge in Nutrition, 7th ed. Press, Washington, DC. 353-377.
- ➔ Noori A., Parivar K., Modaresi M., Messripour M., Hasan M. 2011. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice. *African Journal of Biotechnology*. 10(7):1221-1227.
- ➔ 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.

- ➔ Nowack B., Ranville J.F., Diamond S., Gallego-Urrea J.A., Metcalfe C., Rose J., *et al.* 2012. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31:50-59.
- ➔ Obadia M.A. 2008. Les nanotechnologies. *République française Avis du Conseil économique et social*. 21:186.
- ➔ Oberdorster G. 2001. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health*. 74(1):1-8.
- ➔ Oberdorster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H. 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part. *Fibre Toxicol*. 2:8.
- ➔ Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 113(7):823-839.
- ➔ Oberholster P.J., Musee N., Botha A.M., Chelule P.K., Focke W.W., Ashton P.J. 2011. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74(3):416-423.
- ➔ Odendaal J.P., Reinecke A.J. 2003. Quantifying histopathological alterations in the hepatopancreas of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a biomarker of cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56(2):319-325.
- ➔ Ohno K., Mori C., Akashi T., Yoshida S., Tago Y., Tsujii Y., Tabata Y. 2013. Fabrication of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging from Polymer-Brush-Afforded Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Prepared by Surface-Initiated Living Radical Polymerization. *Biomacromolecules*. 14(10):3453-3462
- ➔ Oliveira-Filho E.C., Geraldino B.R., Grisolia C.K., Paumgarten F.J. 2005. "Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 75(6):1185-90.
- ➔ Palomaki J., Karisola P., Pylkkanen L., Savolainen K., Alenius H. 2010. Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology*. 267(1-3):125-131.
- ➔ Pan B., Xing B. 2012. Applications and implications of manufactured nanoparticles in soils: a review. *European Journal of Soil Science*. 63:437-456.

- ➔ Panda S.K., Chaudhury I., Khan M.H. 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum*. 46(2):289-294.
- ➔ Park E.J., Yi J., Chung K. H., Ryu D. Y., Choi J. Park K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett*. 180(3):222-229.
- ➔ Park K., Tuttle G., Sinche F., Harper S.L. 2013. Stability of citrate-capped silver nanoparticles in exposure media and their effects on the development of embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of pharmacal research*. 36(1):125-133.
- ➔ Pellerin-Massicotte J. 1997. Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *J. Rech. Océanogr*. 22(3):91-98.
- ➔ Peng X.H.P.X.H., Palma S., Fisher N.S., Wong S.S. 2011. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. *Aquatic Toxicology*. 102(3-4):186-196.
- ➔ Peralta-Videa J.R., Zhao L., Lopez-Moreno M. L., De la Rosa G., Hong J., Gardea-Torresdey J. L. 2011. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010. *J Hazard Mater*. 186(1):1-15.
- ➔ Perkins P.J., Boermans H.J., Stephenson G.R. 2000. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19(4 I):940-945.
- ➔ Petala E., Dimosa K., Douvalisc A., Bakasc T., Tucekb J., Zborilb R., Karakassidesa M.A. 2013. Nanoscale zerovalent iron supported on mesoporous silica: Characterization and reactivity for Cr (VI) removal from aqueoussolusion. *Journal of hazardous materials*. 261:295-306.
- ➔ Peters K., Unger R.E., Kirkpatrick C.J., Gatti A.M., Monari E. 2004. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function *in vitro*: studies on viability, proliferation and inflammation. *J Mater Sci Mater Med*. 15(4):321-325.
- ➔ Petersen E.J., Zhang L., Mattison N.T., O'Carroll D.M., Whelton A.J., Uddin N., *et al*. 2011. Potential Release Pathways, Environmental Fate, And Ecological Risks of Carbon Nanotubes. *Environ Sci Technol*. 45:9837-9856.
- ➔ Petit A.N., Eullaffroy P., Debenest T., Gagne F. 2010. Toxicity of PAMAM dendrimers to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*. 100(2):187-193.
- ➔ Petros R.A., DeSimone J.M. 2010. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*. 9(8):615-627.

- ➔ Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanoparticle Res.* 14:1-11.
- ➔ Pietrock M., Meinelt T., Marcogliese D.J. 2008. "Effects of cadmium exposure on embryogenesis of *Stagnicola elodes* (Mollusca, Gastropoda): Potential consequences for parasite transmission. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 55(1):43-48
- ➔ Pihan F. 2001. Caractérisation de mollusques gastéropodes terrestres entant que bioindicateurs de contamination polymétallique (Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Cu, Cd et Pb). Thèse de Doctorat de l'université de Metz, Metz. France. 427p.
- ➔ Pitkethly M. 2003. Nanoparticles as building blocks ?. *NanoToday.* 12:36-42.
- ➔ Porcel D., Bueno J.D., Almendros A. 1996. Alteration in the digestive gland and shell of the snail *Helix aspersa* Muller (gastropoda, pulmonata) after prolonged starvation comparative. *Biochemistry and Physiology.* 115:11-17.
- ➔ Porter D.W., Wu N., Hubbs A.F., Mercer R.R., Funk K., Meng F., Li J., Wolfarth M.G., et al. 2012. Differential mouse pulmonary dose and time course responses to titanium dioxide nanospheres and nanobelts. *Toxicol Sci.* 131(1):179-193.
- ➔ Prabhakar P.V., Reddy U.A., Singh S.P., Balasubramanyam A., Rahman M.F., Indu-Kumari S., Agawane S.B., Murty U.S., Grover P., Mahboob M. 2012. Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in wistar rats. *J. Appl. Toxicol.* 32:436-445.
- ➔ Preece A. 1972. A manual for histologic technicians. Little, Brown and Company, Boston.
- ➔ Putnam C.D., Arvai A.S., Bourne Y., Tainer J.A. 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol.* 296:295-309.
- ➔ Qiao R.R., Yang C.H., Gao M.Y. 2009. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to *in vivo* MRI applications. *J Mater Chem.* 19:6274-6293.
- ➔ Răcuciu M., Creangă D.E. 2007a. Influence of water-based ferrofluid upon chlorophylls in cereals. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 311(1):291-294.
- ➔ Racuciu M., Creanga D.E. 2007b. Cytogenetic changes induced by aqueous ferrofluids in agricultural plants. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 311(1):288-290.

- ➔ Racuciu M., Creanga D.E., Olteanu Z. 2009. Water Based Magnetic Fluid Impact on Young Plants Growing. *Romanian Reports in Physics*. 61(2):259-268.
- ➔ Răcuciu M., Creangă, D.E. 2009. Biocompatible magnetic fluid nanoparticles internalized in vegetal tissue. *Rom Journ Phys*. 54:115-124.
- ➔ Radu M., Cristina-Munteanu M., Petrache S., Iren-Serban A., Dinu D., Hermenean A., Dinischiotu A. 2010. Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells. *Acta Biochimica Polonica*. 57(3):355.
- ➔ Radwan M .A., Mohamed M.S. 2013. Imidocloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 95:91-97.
- ➔ Radwan M.A., El-Gendy K.S., Gad A.F. 2010. Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of *Theba pisana* exposed to heavy metals. *Environ. Contam. Toxicol*. 58(3):828-835.
- ➔ Radwan M.A., Essawy A.E., Abdelmeguid N.E., Hamed S.S., Ahmed A.E. 2008. Biochemical and histochemical on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pesticides Biochemistry and Physiology*. 90:154-167.
- ➔ Ramade F. 2007. Introduction à l'écotoxicologie : fondements et applications. Lavoisier, Lassay-les- Châteaux.
- ➔ Ramirez-Prieto M.T., Garcia-Rio F., Villamor J. 2006. Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring. *Medicina Clinica*. 127:386-396.
- ➔ Rathore M., Mohanty I.R., Maheswari U., Dayal N., Suman R., Joshi D.S. 2014. Comparative *in vivo* assessment of the subacute toxicity of gold and silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. 16(4):1-12.
- ➔ Rauscher H., Roebben G. 2014. Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term “nanomaterial”.
- ➔ Reddy U.A., Prabhakar P.V., Mahboob M. 2015. Biomarkers of oxidative stress for *in vivo* assessment of toxicological effects of iron oxide nanoparticles. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- ➔ 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., Principato G. 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to, metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 31:143-164.
- ➔ Reinecke S.A., Reinecke A.J. 2007. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66:92-101
- ➔ Rico C.M., Majumdar S., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. 2011. Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *J Agric Food Chem*. 59:3485-3498.
- ➔ Ringwood A.H., McCarthy M., Bates T.C., Carroll D.L. 2010. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Marine environmental research*. 69:S49-S51.
- ➔ Rivière C., Boudghène F.P., Gazeau F., Roger J., Pons J.N., Laissy J.P., Deux J.F. 2005. Iron Oxide Nanoparticle-labeled Rat Smooth Muscle Cells: Cardiac MR Imaging for Cell Graft Monitoring and Quantitation 1. *Radiology*. 235(3):959-967.
- ➔ Rothen-Rutishauser B., Muhlfeld C., Blank F., Musso C., Gehr P. 2007. Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model. *Part Fibre Toxicol*. 4:9.
- ➔ Rousk J., Ackermann K., Curling S.F., Jones D.L. 2012. Comparative Toxicity of Nanoparticulate CuO and ZnO to Soil Bacterial Communities. *Plos One*. 7:e34197.
- ➔ Roy R., Tripathi A., Das M., Dwivedi P.D. 2011. Cytotoxicity and uptake of zinc oxide nanoparticles leading to enhanced inflammatory cytokines levels in murine macrophages: comparison with bulk zinc oxide. *J Biomed Nanotechnol*. 7(1):110-111.
- ➔ 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.
- ➔ Sadeghiani N., Barbosa L.S., Silva L.P., Azevedo R.B., Morais P.C., Lacava Z.G.M. 2005. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. *J. Magnetism Magnetic Materials*. 289:466-8.
- ➔ Saint-Denis M., Narbonne J.F., Arnaud C., Ribera D. 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biology and Biochemistry*. 33:395-404.

- ➔ San Roman I., Alonso M.L., Bartolomé L., Galdames A., Goiti E., Ocejo M., Moragues M., Alonso R.M., Vilas J.L. 2013. Relevance study of bare and coated zero valent iron nanoparticles for lindane degradation from its by-product monitorization. *Chemosphere*. 93(7):1324-1332.
- ➔ Santhosh P.B., Ulrich N.P. 2013. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. *Cancer Letters*. 336:8-17.
- ➔ Saravanan M., Suganya R., Ramesh M., Poopal R.K., Gopalan N., Ponpandian N. 2015. Iron oxide nanoparticles induced alterations in haematological, biochemical and ionoregulatory responses of an Indian major carp *Labeo rohita*. *J Nanopart Res*. 17:274.
- ➔ Sarkar A., Sil P.C. 2014. Iron oxide nanoparticles mediated cytotoxicity via PI3K/AKT pathway: role of quercetin. *Food and Chemical Toxicology*. 71:106-115.
- ➔ Sauer U.G., Kneuer C., Tentschert J., Wachter T., Schroeder M., Butzke D., Luch A., Liebsch M., Grune B., Gotz M.E. 2011. A knowledge-based search engine to navigate the information thicket of nanotoxicology. *Regul Toxicol Pharmacol*. 59(1):47-52.
- ➔ Scheifler R. 2002. Evaluation de la biodisponibilité et des transferts de polluants métalliques et organiques des réseaux trophiques "sols-plantes-invertébrés". Université de Franche-Comté. France. 167p.
- ➔ Schuytema G.S., Nebeker A.V., Griffis W.L. 1994. Effects of dietary exposure to forest pesticides on the brown garden snail *Helix aspersa* Muller. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 26(1):23-28.
- ➔ Scott-Fordsmand J., Krogh P., Schaefer M., Johansen A. 2008. The toxicity testing of double walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. *Ecotoxicol Environ Saf*. 71:616-9.
- ➔ Scott-Fordsmand J.J., Krogh P.H. 2004. The influence of application form on the toxicity of nonylphenol to *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 58(3):294-299.
- ➔ Scown T.M., Santos E.M., Johnston B.D., Gaiser B., Baalousha M., Mitov S., Lead J.R., Stone V., Fernandes T.F., Jepson M., van Aerle R., Tyler C.R. 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicol Sci*. 115(2):521-534.
- ➔ Semple K.T., Doick K.J., Jones K.C., Burauel P., Craven A., Harms H. 2004. Peer Reviewed: Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. *Environ Sci Technol*. 38:228A-231A.

- ➔ Servin A., Elmer W., Mukherjee A, Torre-Roche R.D., Hamdi H., White J.C., *et al.* 2015. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *J Nanoparticle Res.* 17:1-21.
- ➔ Sharma, V., Anderson D., Dhawan A. 2011. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2). *J Biomed Nanotechnol.* 7(1): 98-99.
- ➔ Shi J.Y., Abid A.D., Kennedy I.M., Hristova K.R., Silk W.K. 2011. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. *Environmental Pollution.* 159(5): 1277-1282.
- ➔ Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyneck C. 1966. Newhall A, Freidman L, A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt Biochem.* 19:415-428.
- ➔ Shih Y.J., Su C.C., Chen C.W., Dong C.D., Liu W.S., Huang C.P. 2016. Adsorption characteristics of nano-TiO₂ onto zebrafish embryos and its impacts on egg hatching. *Chemosphere.* 154:109-117.
- ➔ Shih Y.J., Su C.C., Chen C.W., Dong C.D., Liu W.S., Huang C.P. 2016. Adsorption characteristics of nano-TiO₂ onto zebrafish embryos and its impacts on egg hatching. *Chemosphere.* 154:109-117.
- ➔ Shoults-Wilson W.A., Reinsch B.C., Tsyusko O.V., Bertsch P.M., Lowry G.V., Unrine J.M. 2011. Role of Particle Size and Soil Type in Toxicity of Silver Nanoparticles to Earthworms. *Soil Sci Soc Am J.* 75:365.
- ➔ Siddiqui M.A., Saquib Q., Ahamed M., Farshori N.N., Ahmad J., Wahab R., Pant A.B. 2015. Molybdenum nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress, G2/M arrest, and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 125:73-81.
- ➔ Simeonova P.P., Luster M.I. 1995. Iron and reactive oxygen species in the asbestosinduced tumor necrosis factor-alpha response from alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 12(6):676-683.
- ➔ Simko M., Mattsson M.O. 2010. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review. *Part Fibre Toxicol.* 7:42.
- ➔ Simon-Deckers A. 2008. Effets biologiques de nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques. Thèse de Doctorat en Toxicologie humaine et environnementale de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (*Agro Paris Tech*). France. 281p.

- ➔ Simon-Deckers A., Loo S., Mayne-L'hermite M., Herlin-Boime N., Menguy N., Reynaud C., *et al.* 2009. Size-, Composition- and Shape-Dependent Toxicological Impact of Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes toward Bacteria. *Environ Sci Technol.* 43:8423-8429.
- ➔ Simonin M. 2015. Dynamique, réactivité et écotoxicité des nanoparticules d'oxydes métalliques dans les sols : impact sur les fonctions et la diversité des communautés microbiennes. Thèse de Doctorat en écotoxicologie. Université Claude Bernard - Lyon I. France. 205p.
- ➔ Singh N., Jenkins G.J.S., Asadi R., Doak S.H. 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev.* 1:5358.
- ➔ Som C., Berges M., Chaudhry Q., Dusinska M., Fernandes T.F., Olsen S.I., *et al.* 2010. The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. *Toxicology.* 269:160-169.
- ➔ Song W., Zhang J., Guo J., Ding F., Li L., Sun Z. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol Lett.* 199(3): 389-397.
- ➔ Souza Dahm K.C., Ruckert C., Tonial E.M., Bonan C.D. 2006. *In vitro* exposure of heavy metals on nucleotidase and cholinesterase activities from the digestive gland of *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 143:316320.
- ➔ Speranza A., Leopold K., Maier M., Taddei A.R., Scoccianti V. 2010. Pd-nanoparticles cause increased toxicity to kiwifruit pollen compared to soluble Pd (II). *Environmental Pollution.* 158(3):873-882.
- ➔ Srikanth K., Ahmad I., Rao J.V., Trindade T., Duarte A.C., Pereira E. 2014. Modulation of glutathione and its dependent enzymes in gill cells of *Anguilla anguilla* exposed to silica coated iron oxide nanoparticles with or without mercury co-exposure under *in vitro* condition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 162:7-14.
- ➔ Stohs S.J., Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine.* 18:321-336.
- ➔ Stone V., Johnston H., Clift M.J. 2007. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Transactions on Nanobioscience.* 6:331-340.

- ➔ Strigul N., Vaccari L., Galdun C., Wazne M., Liu X., Christodoulatos C., Jasinkiewicz K. 2009. Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Desalination*. 248(1):771-782.
- ➔ Strmac M., Oberemm A., Braunbeck T. 2002. Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *Journal of Fish Biology*. 60(1):24-38.
- ➔ Sun P., Shijirbaatar A., Fang J., Owens G., Lin D., Zhang K. 2015. Distinguishable Transport Behavior of Zinc Oxide Nanoparticles in Silica Sand and Soil Columns. *Sci Total Environ*. 505:189-198.
- ➔ Sun T.Y., Gottschalk F., Hungerbühler K., Nowack B. 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ Pollut*. 185:69-76.
- ➔ Sverdrup L.E., De-Vaufleury A., Hartnik T., Hagen S.B., Loibner A.P., Jensen J. 2006. Effects and uptake of polycyclic aromatic compounds in snails (*Helix aspersa*). *Environmenta Toxicology and Chemistry*. 25:1941-1945
- ➔ Swaileh K.M., Ezzughayyar A. 2001. Dose-dependent effects of dietary Pb and Zn on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 50(1):9-14.
- ➔ Tang W., Li Q., Gao S., Shang J.K. 2011. Arsenic (III,V) removal from aqueous solution by ultrafine Fe₂O₃ nanoparticles synthesized from solvent thermal method. *Journal of Hazardous Materials*. 192:131-138.
- ➔ Tardif F., Sicard Y., Shakesheff A., Moehlmann C., Backman U. 2008. Is it possible to easily measure the engineered nanoparticles at workplaces?
- ➔ Terfaya M., Djebbar M.R., Rouabhi R., Berrebbeh H. 2009. Relationship between air pollution generated by traffic emission and cardiopulmonary disease in Annaba (Algeria). *American Eurasian journal of Toxicological Sciences*. 1(1):01-06.
- ➔ Thio B.J.R., Zhou D., Keller A.A. 2011. Influence of natural organic matter on the aggregation and deposition of titanium dioxide nanoparticles. *J Hazard Mater*. 189:556-563.
- ➔ Thit A., Banta G.T., Selck H. 2015. Bioaccumulation, subcellular distribution and toxicity of sediment-associated copper in the ragworm *Nereis diversicolor*: The relative importance of aqueous copper, copper oxide nanoparticles and microparticles. *Environmental Pollution*. 202:50-57.

- ➔ Thompson S.A., White C.C., Krejsa C.M., et al. 1999. Induction of glutamate-cysteine ligase (γ -glutamylcysteine synthetase) in the brains of adult female mice subchronically exposed to methylmercury. *Toxicol Lett.* 110(1-2):1-9.
- ➔ Tian Y., Gao B., Silvera-Batista C., Ziegler K.J. 2010. Transport of engineered nanoparticles in saturated porous media. *J Nanoparticle Res.* 12:2371-2380.
- ➔ Tian Y., Gao B., Wang Y., Morales V.L., Carpena R.M., Huang Q., et al. 2012. Deposition and transport of functionalized carbon nanotubes in water-saturated sand columns. *J Hazard Mater.* 213-214:265-272.
- ➔ Tinkle S.S., Antonini J.M., Rich B.A., Roberts J.R., Salmen R., DePree K., Adkins E.J. 2003. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 1202-1208.
- ➔ Tourinho P.S., van Gestel C.A.M., Lofts S., Svendsen C., Soares A.M.V.M., Loureiro S. 2012. Metalbased nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environ Toxicol Chem.* 31:1679-1692.
- ➔ Triboulet S. 2013. Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique. Thèse de Doctoaat en Sciences agricoles. Université de Grenoble. France. 343p.
- ➔ Triboulet S., Adué-Garica C., Armand L., Diemer H., Promer F., Collin- Faure V., Habert A., Strub J.M., Hanau D., Herlin N., Carrière M., Van- Dorsselaer A., Rabilloud T. 2014. Analysis of cellular responses of macrophages to zinc ions and zinc oxide nanoparticles: a combined targeted and proteomic approach. *Nanoscale.* 6:6102-6114.
- ➔ Triebkorn R., Köhler H.R. 1996. The impact of heavy metals on the grey garden slug, *Derocerasreticulum* (Müller): metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. *Environ Pollut.* 93:317-343.
- ➔ Triebkorn R., Köhler H.R. 1998. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil Invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. *Biomarkers.* 3:109-127.
- ➔ Triebkorn R., Köhler H.R., Honnen W., Schramm M., Adams S.M., Müller E.F. 1997. Induction of heat shock proteins, changes in leaver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field ?. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery.* 6:57-73.
- ➔ Tsakalacos T. 2003. NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem. (Nanostructures: Synthesis, Functional Properties and Applications). *Puublisher Kluwer Academy*, 1128p.

- ➔ Tsyusko O.V., Hardas S.S., Shoultz-Wilson W.A., Starnes C.P., Joice G., Butterfield D.A., Unrine J.M. 2012. Short-term molecular-level effects of silver nanoparticle exposure on the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental pollution*. 171:249-255.
- ➔ Tuutijärvi T., Vahala R., Sillanpää M., Chen G. 2012. Maghemite nanoparticles for As (V) removal: desorption characteristics and adsorbent recovery. *Environ Technol*. 33(16-18):1927-36.
- ➔ Unrine J.M., Hunyadi S.E., Tsyusko O.V., Rao W., Shoultz-Wilson W.A., Bertsch P.M. 2010a. Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms *Eisenia fetida*. *Environ Sci Technol*. 44:8308-13.
- ➔ Unrine J.M., Tsyusko O.V., Hunyadi S.E., Judy J.D., Bertsch P.M. 2010b. Effects of particle size on chemical speciation and bioavailability of Cu to earthworms *Eisenia fetida* exposed to Cu nanoparticles. *J Environ Qual*. 39:1942-53.
- ➔ Valenzuela P., Simon J.A. 2012. Nanoparticle delivery for transdermal HRT. *Maturitas*. 73(1):74-80.
- ➔ Van Straalen N.M., Butovsky R.O., Pokarzhevskii A.D., Zaitsev A.S., Verhoef S.C. 2001. Metal concentrations in soil and invertebrates in the vicinity of a metallurgical factory near Tula (Russia). *Pedobiologia*. 45(5):451-466.
- ➔ Van-der-Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Phar*. 13:57-149
- ➔ Vanwinkle B.A., Mesy Bentley K.L., Malecki J.M., Gunter K.K., Evans I.M., Elder A., et al. 2009. Nanoparticle (NP) uptake by type I alveolar epithelial cells and their oxidant stress response. *Nanotoxicology*. 3:307.
- ➔ Viard B., Maul A., Pihan J-C. 2004. Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination. *Journal of Environmental Monitoring*. 6:103-107.
- ➔ Vidal M.L. 2001. Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalves d'eau douce *Corbicula fluminea* (Muller)- Purification et caractérisation des Glutathion S Transférases .Thèse de Doctorat de l'université de Bordeaux. 285p.
- ➔ Vigano L., Arillo A., Melodia F., Arlati O., Monti C. 1998. Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the River Po, Italy. *Environmenal Toxicology and Chemistry*. 17:404-411.

- ➔ Vittori Antisari L., Carbone S., Gatti A., Vianello G., Nannipieri P. 2013. Toxicity of metal oxide (CeO₂, Fe₃O₄, SnO₂) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil. *Soil Biol Biochem.* 60:87-94.
- ➔ Wahajuddin., Arora S. 2013. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine.* 7:3445-3471.
- ➔ Wang C.T., Ro S.H. 2006. Surface nature of nanoparticle gold/iron oxide aerogel catalysts. *Journal of Non-Crystalline Solids.* 352(1):35.
- ➔ Wang H.H., Kou X.M., Pei Z.G., Xiao J.Q., Shan X.Q., Xing B.S. 2011. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin *Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology.* 5(1):30-42.
- ➔ Wang T.S., Shu Y.F., Liu Y.C. 1997. Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. *Toxicology* 121:229-237.
- ➔ Wang W.X., Rainbow P.S. 2005. Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 61:145-159.
- ➔ Wang Y., Aker W.G., Hwang H.M., Yedjou C.G., Yu H., Tchounwou P.B. 2011. A study of the mechanism of *in vitro* cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells. *Science of the total environment.* 409(22):4753-4762.
- ➔ Wang Y., Gao B., Morales V.L., Tian Y., Wu L., Gao J., *et al.* 2012. Transport of titanium dioxide nanoparticles in saturated porous media under various solution chemistry conditions. *J Nanopart Res.* 14:1-9.
- ➔ Weckbecker G., Cory J.G. 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 1210 cells *in vitro*. *Cancer Letters.* 40:257-264.
- ➔ Weldy C.S., Wilkerson H.W., Larson T.V., Stewart J.A., Kavanagh T.J. 2011. DIESEL particulate exposed macrophages alter endothelial cell expression of eNOS, iNOS, MCP1, and glutathione synthesis genes. *Toxicol In Vitro.* 25(8):2064-2073.
- ➔ Whiteside M.D., Treseder K.K., Atsatt P.R. 2009. The brighter side of soils: Quantum dots track organic nitrogen through fungi and plants. *Ecology.* 90:100-108.
- ➔ Widarto T.H., Holmstrup M., Forbes V.E. 2004. The influence of nonylphenol on lifehistory of the earthworm *Dendrobaena octaedra* Savigny: linking effects from the individual- to the population-level. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 58(2):147-159.

- ➔ Widarto T.H., Krogh P.H., Forbes V.E. 2007. Nonylphenol stimulates fecundity but not population growth rate (λ) of *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67(3):369-377.
- ➔ Winston G.W., Di Giulio R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*. 19:137-161.
- ➔ Witschger O., Fabries J-F. 2005. Particules ultrafines et santé au travail 2 - Sources et caractérisation de l'exposition.
- ➔ Wu R.S.S., Siu W.H.L., Shin P.K.S. 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*. 51:623-634.
- ➔ Xia T., Kovoichich M., Liong M., Madler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J.I., Zink J.I., Nel E.A. 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*. 2(10):2121-2134.
- ➔ Xiao N., Jing B., Ge F., Liu X. 2006. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere*. 62:1366-1373.
- ➔ Xiong D.W., Fang T., Yu L.P., Sima X.F., Zhu W.T. 2011. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*. 409(8):1444-1452.
- ➔ Xu C., Sun S. 2013. New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65:732-743.
- ➔ Xu M., Deng G.F., Liu S.S., Chen S., Cui D., Yang L.M., Wang Q.Q. 2010. Free cadmium ions released from Cd Te based nanoparticles and their cytotoxicity on *Phaeodactylum tricornutum*. *Metallomics*. 2(7):469-473.
- ➔ Xu X.Q., Shen H., Xu J.R., Xu J., Li X.J., Xiong X.M., Yean S., Cong L., Yavuz C.T. 2005. Core-shell structure and magnetic properties of magnetite magnetic fluids stabilized with dextran. *Applied Surface Science*. 252(2):494.
- ➔ 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.
- ➔ Yang Y., Wang Y., Westerhoff P., Hristovski K., Jin V.L., Johnson M-V.V., et al. 2014. Metal and nanoparticle occurrence in biosolid-amended soils. *Sci Total Environ* 485-486:441-449.

- ➔ Yang Z., Liu Z.W., Allaker R.P., Reip P., Oxford J., Ahmad Z., Ren G. 2010. A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *J R Soc Interface* 7 Suppl. 4:S41-422.
- ➔ Yazdi A.S., Guarda G., Riteau N., Drexler S.K., Tardivel A., Couillin I., Tschopp J. 2010. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(45):19449-19454.
- ➔ Yen H.J., Hsu S.H., Tsai C.L. 2009. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*. 5:1553.
- ➔ Yeo M.K., Kang M. 2010. The effect of nano-scale Zn-doped TiO₂ and pure TiO₂ particles on *Hydra magnipapillata*. *Molecular & Cellular Toxicology*. 6(1):9-17.
- ➔ Yoo M.H., Rah Y.C., Choi J., Park S., Park H.C., Oh K.H. et al. 2016. Embryotoxicity and hair cell toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 83:168-174.
- ➔ Zaafour F. 2014. Étude écophysiologique de la reproduction de l'escargot terrestre Petit-Gris (*Helix aspersa aspersa*, Gastropoda: *Stylommatophora*; *Helicidea*) dans la région Nord-Est d'Annaba– Algérie. Thèse de Doctorat Université Badji Mokhtar-Annaba. 250p.
- ➔ Zaldibar B., Cancio I., Soto M., Marigomez I. 2008. Changes in cell-type composition in digestive gland of slugs and its influence in biomarkers following transplantation between a relatively unpolluted and chronically metal-polluted site. *Environmental Pollution*. 156:367-379.
- ➔ Zalibar B., Cancio M., Marigomez I. 2007. Digestive cell in digestive gland epithelium slugs experimentally exposed to a mixture of cadmium and kerosene. *Chemosphere*. 70:144-154.
- ➔ Ze Y., Liu C., Wang L., Hong M., Hong F. 2011. The regulation of TiO₂ nanoparticles on the expression of light-harvesting complex II and photosynthesis of chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Biological trace element research*. 143(2):1131-1141.
- ➔ Zeyons O. 2008. Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. Thèse de Doctorat en physicochimie de l'université Paris VI - Pierre et Marie Curie. France. 330p.

- ➔ Zeyons O., Thill A., Chauvat F., Menguy N., Cassier-Chauvat C., Orear C., Daraspe J., Auffan M., Rose J., Spalla O. 2009. Direct and indirect CeO₂ nanoparticles toxicity for *Escherichia coli* and *Synechocystis*. *Nanotoxicology*. 3(4):284-295.
- ➔ Zhang H., Ji Z., Xia T., Meng H., Low-Kam C., Liu R., Pokhrel S., Lin S., Wang X., Liao Y.P., Wang M., Li L., Rallo R., Damoiseaux R., Telesca D., Madler L., Cohen Y., Zink J.I., Nel A.E. 2012. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS nano*. 6:4349-4368.
- ➔ Zhang H.F.Z.H.F., He X.A., Zhang Z.Y., Zhang P., Li Y.Y., Ma Y.H., Kuang Y.S., Zhao Y.L., Chai Z.F. 2011a. Nano-CeO(2) Exhibits Adverse Effects at Environmental Relevant Concentrations. *Environmental Science & Technology*. 45(8):3725-3730.
- ➔ Zhou D., Abdel-Fattah A.I., Keller A.A. 2012. Clay Particles Destabilize Engineered Nanoparticles in Aqueous Environments. *Environ Sci Technol*. 46:7520-7526.
- ➔ Zhu M.T., Feng W.Y., Wang B., Wang T.C., Guc Y.Q., Wang M., Wang Y., Ouyang H., Zhao Y.L., Chai Z.F. 2008. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*. 247:102-111.
- ➔ Zhu X., Tian S., Cai Z. 2012. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *PLoS One journal*. 7(9):e46286.
- ➔ Zhu Z.J., Carboni R., Quercio M.J., Yan B., Miranda O.R., Anderton D.L., Vachet R.W. 2010. Surface properties dictate uptake, distribution, excretion, and toxicity of nanoparticles in fish. *Small*. 6(20):2261-2265.
- ➔ Zidar P., Van Gestel C.A.M., Strus J. 2009. Single and joint effects of Zn and Cd on *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). *Appl Soil Ecol*. 25:257-265.

Annexes

Annexe 01 : Courbe d'étalonnage des protéines

Tableau 15 : Réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines hépatopancréatiques.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution standard d'albumine (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

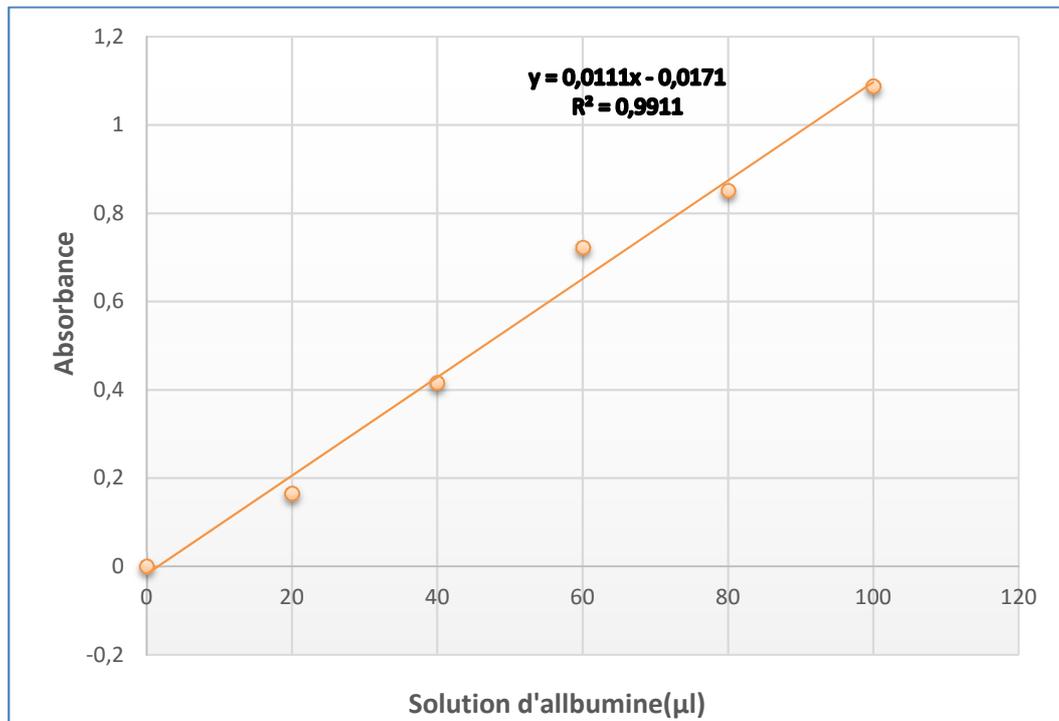


Figure 54 : Courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µl).

Annexe 02 : Courbe d'étalonnage des glucides

Tableau 16 : Réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des glucides hépatopancréatiques.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

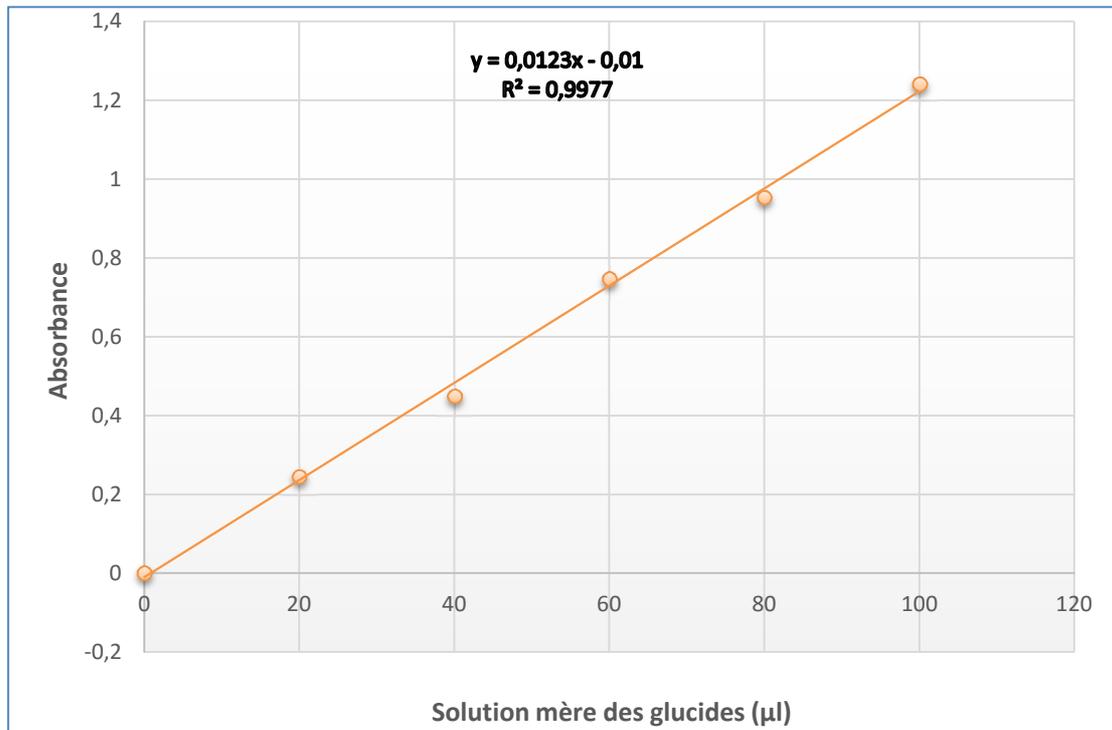


Figure 55 : Courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de solution mère des glucides (µl).

Annexe 03 : Courbe d'étalonnage des lipides

Tableau 17 : Réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des lipides hépatopancréatiques.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant (éther/chloroforme) (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif Vanilline (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	4

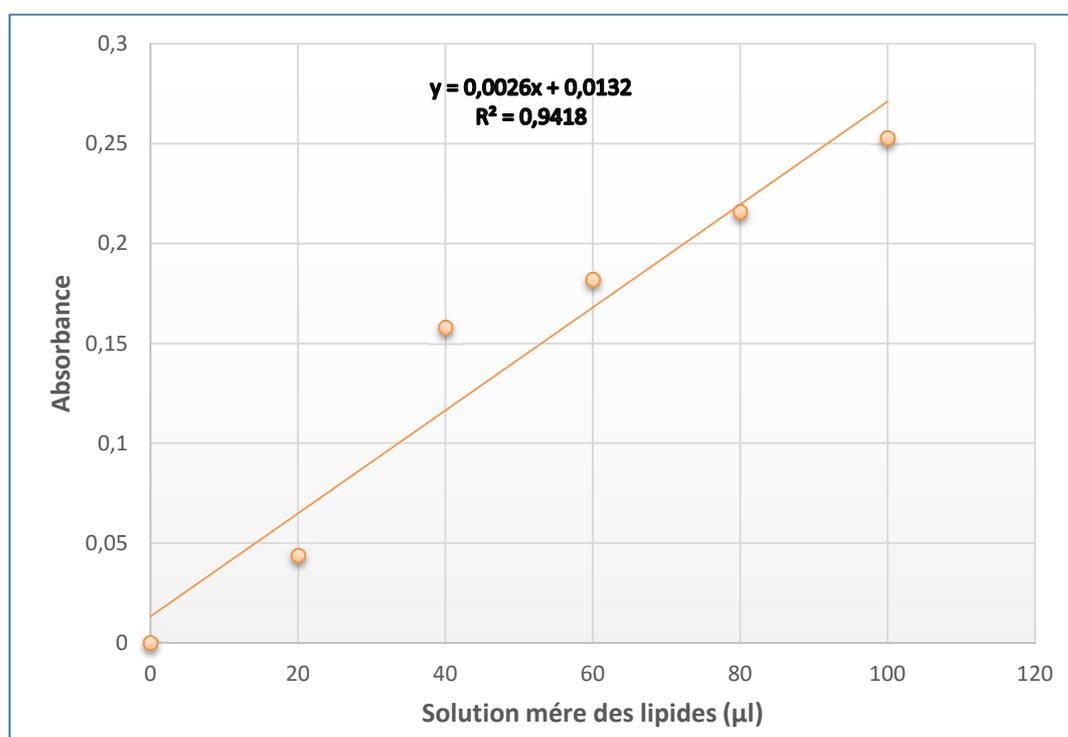


Figure 56 : Courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de solution mère des lipides (µl).

Résumés

Résumé

A l'aube du XXI^{ème} siècle, les nanosciences et nanotechnologies promettent des progrès remarquables dans de nombreux domaines, mais soulèvent aussi de nombreuses inquiétudes en particulier au sujet de leurs effets sur la santé humaine et l'environnement. Cette étude a pour objectif d'apporter des éléments de réponse à la compréhension de la nature et de l'origine des effets biologiques de nanoparticules d'oxyde métallique : Fe₂O₃ sur une espèce bioindicatrice bioaccumulatrice en écotoxicologie, l'escargot terrestre *Helix aspersa* qui est en contact direct avec l'environnement et l'homme (comestible).

Leurs effets ont été étudiés par une approche ciblée au laboratoire, tout d'abord pendant la phase embryonnaire sur les œufs d'une ponte nous avons évalué l'embryotoxicité et vérifié l'influence après contact des œufs à ces nanoparticules sur la phase juvénile. Sur les adultes nous avons évalué l'effet de ces nanoparticules sur le comportement et sur quelques paramètres morphologiques, déterminé la composition biochimique de l'hépatopancréas, mesuré les niveaux de défenses enzymatiques antioxydants, estimé les effets histopathologiques et vérifié l'accumulation au niveau génital pour estimer les effets sur les capacités reproductrices.

Un effet toxique lors de la phase embryonnaire est noté. Il se manifeste par différents aspects, tout d'abord, sur les œufs avant éclosion avec la déformation de la membrane, après dans le succès d'éclosion des œufs et à la fin pendant la période d'incubation par le taux de mortalité des nouveaux éclos. La toxicité est observée aussi pendant la phase juvénile par des perturbations de la croissance.

L'examen biochimique a révélé des perturbations significatives dans la composition en métabolites de l'hépatopancréas de *Helix aspersa* (contenu en glucides totaux, en lipides totaux et en protéines totales). Quant aux antioxydants, nos résultats révèlent un stress oxydant déclenché et une induction du système de détoxification, avec une augmentation du taux de GSH, GST, GPx et MDA et une diminution de l'activité catalase.

L'examen histologique de l'hépatopancréas et du rein des escargots traités a mis en évidence des altérations qualitatives importantes dès la plus faible dose testée, confirmant ainsi les résultats obtenus dans les premières parties. Au niveau de l'appareil génital, une accumulation est observée qui pourrait porter préjudice sur l'activité reproductrice qui nécessitant des études ultérieures pour évaluer l'impact sur cette activité physiologique par une étude histologique approfondie appuyée par des dosages de biomarqueurs.

Mots clés : nanoparticules, oxyde de fer « Fe₂O₃ », *Helix aspersa*, embryotoxicité, croissance, comportement, morphologie, hépatopancréas, rein, stress oxydant, histologie.

Abstract

At the turn of the century, nanoscience and nanotechnologies promise outstanding progress in numerous fields, but also raise numerous worries in particular concerning their effects on human health and the environment. This study aims to provide elements of response to understanding the nature and the origin of the biological effects metal oxide nanoparticles: Fe₂O₃ on bioindicator bioaccumulator in ecotoxicology species, the land snail *Helix aspersa*, which is in direct contact with the environment and human (edible).

Their effects have been studied by a focused approach in the laboratory, first during the embryonic phase on laying eggs we have evaluated the embryotoxicity and verified the influence after eggs contact to these nanoparticles on juvenile phase. About adults, we have evaluated the effect of these nanoparticles on comportment and on some morphological parameters, determined the hepatopancreas biochemical composition and measured the enzymatic antioxidant defenses levels, estimated the histopathological effects and verified the accumulation in genital tract to estimate the effects on reproductive capacity.

A toxic effect during the embryonic phase is noted. It is manifested in different ways, first, on eggs before hatching with the deformation of the membrane, after in eggs hatching success and at the end during the incubation period by new hatched mortality rate. The toxicity is also observed for a month in juvenile phase by growth disturbances.

The biochemical examination revealed significant disturbances in hepatopancreas metabolites composition of *Helix aspersa* (content of total carbohydrates, total lipids and total proteins). As for antioxidants, our results reveal a triggered oxidative stress and induction of detoxification system, with an increase in levels of GSH, GST, GPx and MDA and decreased in catalase activity.

The histological exam of hepatopancreas and kidney treated snails has highlighted significant qualitative alterations as early as the lowest tested dose, therefore confirms the results obtained in first parts. In the genital tract an accumulation was observed that could prejudice the reproductive activity requiring further studies to assess the impact on the physiological activity by a thorough histological study supported by measurements of biomarkers

Keywords : nanoparticles, iron oxide « Fe₂O₃ », *Helix aspersa*, embryotoxicity, growth, comportment, morphology, hépatopancréas, kidney, oxidative stress, histology.

ملخص

في مطلع القرن الواحد والعشرين، علم النانو وتكنولوجيا النانو يعتبران تقدمًا كبيرًا للعديد من المجالات، ولكنهما أيضًا تثيرا العديد من المخاوف وخاصة فيما يتعلق بأثيرهما على صحة الإنسان والبيئة. تهدف هذه الدراسة إلى تقديم عناصر إجابة لفهم طبيعة وأصل الآثار البيولوجية لجزيئات المعادن المؤكسدة النانوية: أكسيد الحديد، على أنواع مؤشرات بيولوجية وتراكمية في علم السمية الإيكولوجية، حلزون الأرض *Helix aspersa* والذي هو في اتصال مباشر مع البيئة والإنسان (يؤكل).

قد تم دراسة تأثيراتها من خلال نهج متبع في المختبر، في البداية خلال المرحلة الجنينية على بيض التعشيش قمنا بتقييم التسمم الجنيني والتحقق من تأثير احتكاك البيض بهذه الجزيئات النانوية على مرحلة نمو صغار الحلزون. على الحلزون البالغ، قمنا بتقييم تأثير هذه الجزيئات النانوية على السلوك وعلى بعض القياسات المورفولوجية، تحديد التركيب الكيميائي للبنكرياس الكبدي وقياس مستويات الدفاعات المضادة للأكسدة الأنزيمية، تقدير الآثار المرضية في الأنسجة والتحقق من التراكم على مستوى الأعضاء التناسلية لتقدير آثارها على القدرة الإنجابية.

سجلنا تأثير سمي خلال المرحلة الجنينية. يتجلى هذا التأثير بطرق مختلفة، أولاً، على البيض قبل الفقس بتشوه الغشاء، وبعدها على نسبة نجاح فقس البيض وفي نهاية فترة الحضانة على معدل وفيات الحلزونات حديثة الفقس. السمية لوحظت أيضاً لمدة شهر على صغار الحلزون من خلال اضطرابات في النمو.

بين التحليل البيوكيميائي اضطرابات كبيرة في مكونات نواتج الأيض للبنكرياس الكبدي لحلزون الأرض *Helix aspersa* (محتوى السكريات، كمية الدهون والبروتينات الكلية). أما بالنسبة لمضادات الأكسدة، نتائجنا كشفت عن بدأ الاجهاد التأكسدي وتحريض نظام إزالة السموم، مع زيادة مستويات الجلوتاثيون GSH, GST, GPx و مؤشر الأكسدة الدهنية (MDA)، وانخفاض نشاط الكاتالاز (CAT).

أبرز الفحص النسيجي للبنكرياس الكبدي ولكي الحلزونات المعالجة إطلاقات نوعية هامة وبأقل جرعة اختبار، مؤكدا النتائج المتحصل عليها في الأجزاء الأولى لهذا العمل. على مستوى الجهاز التناسلي، لوحظ تراكم الذي يمكن أن يضر النشاط التناسلي لذا نحتاج إلى مزيد من الدراسات لتقييم التأثير على النشاط الفيزيولوجي من خلال دراسة نسيجية شاملة تدعمها قياسات للمؤشرات الحيوية.

كلمات الدالة: الجزيئات النانوية، أكسيد الحديد « Fe_2O_3 »، *Helix aspersa*، سمية الجنين، النمو، السلوك، المورفولوجيا، البنكرياس الكبدي، الكلية، الاجهاد التأكسدي، الدراسة النسيجية.

Research Article



Impact of Nanometric Iron Oxide in the Hepatopancreas of Terrestrial Gastropod *Helix Aspersa*: Histological Changes and Biochemical Parameters

Sana Besnaci^{1*}, Samira Bensoltane^{1,2}, Labiba Zerari¹, Chrairia Samia¹, Smina Ait hamlet¹, Houria Berrebbah¹

¹Cellular Toxicology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji-Mokhtar University, Annaba, P.O. Box 12, Algeria.

²Faculty of Medicine, Badji-Mokhtar University, Annaba, Algeria.

*Corresponding author's E-mail: s.besnaci@yahoo.fr

Accepted on: 10-01-2016; Finalized on: 31-01-2016.

ABSTRACT

Iron oxide nanoparticles are of considerable interest for application in nanotechnology-related fields. However, as iron being a highly redox-active transition metal, the safety of iron nanoparticles need to be further studied. In this study, adult snails, *Helix aspersa* are used to estimate the effect of these nanoparticles on biochemical parameters and histological changes in the hepatopancreas of this gastropod has after a treatment of six weeks. During this period, snails exposed by ingestion and contact to wheat flour, which contains NPs powder. The doses of ferric oxide nanoparticles were 0, 1, 2 and 3 g/kg of wheat flour. Although the percentage of consumption reduced in a dose-dependent manner, it is still (90.26% for the control group and 75.17% for the group of the highest dose). The results of the biochemical assays (total carbohydrates, total proteins and total lipids) showed significant increases of total carbohydrates and total proteins at three doses (1, 2 and 3 g/kg of Fe₂O₃) and significant decreases of total lipids at two doses (2 and 3 g/kg of Fe₂O₃ nanoparticles). However, the histological examination of the hepatopancreas of snails showed alterations as a response to all treatments, narrowing of the tubular lumen degeneration of some digestive cells, tubule degeneration and necrosis of the connective tissue intertubular, starting from the second dose appearance of some inflammatory infiltrates, leading to a tissue severely damaged at the third dose (3g/kg of iron oxide nanoparticles).

Keywords: Nanoparticles, *Helix aspersa*, nano-iron oxide, hepatopancreas, biochemical study, histological study.

INTRODUCTION

Nanotechnology is considered the principal technology of the twenty-first century involving the use of new devices to study matter at the molecular or supramolecular level: the characteristic scales of nanotechnology range from 1 to 100 nanometers (nm). At these scales, matter acquires unexpected properties. It should be regarded as new chemical compounds whose characteristics and toxicities are different¹.

It is able to offer solutions to contemporary problems through smaller materials, lighter, faster and more efficient. The metal nanoparticles occupy an increasingly important in industrial processes and in biomedical research. However, the cellular responses to these nanoparticles may lead to toxic phenomena are still unclear and must be studied in detail and case-by-case². Current toxicological data on NPs are still insufficient. However, several studies show that NPs can enter the body through the pulmonary tract, skin or intestinal³ and have systemic toxic effects^{4,5} their uses requires as with any new technology, impact studies on the health of humans and animals. Currently, there are no regulations on their use, and their long-term impact on the environment and humans is still unclear. However, the scientific community has focused very early on the subject and begins to provide some answers⁶.

Because of their potential introduction into the soil as well as the aquatic environment, the inclusion of a set of

ecotoxicity tests in the risk characterization of nanoparticles (NPs) is necessary. Only recently, however, has research focused on their impact on terrestrial organisms⁷⁻¹¹ and the literature on this topic is very limited. Among the metal oxides, our study looked to iron oxide. Their small size gives their advantageous properties, particularly magnetic¹² making them useful in many applications. Thus, in the nanometer range, some iron oxide structures such as magnetite (Fe₂O₄) or maghemite (γ-Fe₂O₃) have superparamagnetic properties. It has exhibited great potential for their applications as catalytic materials, wastewater treatment absorbents, pigments, flocculants, coatings, gas sensors, ion exchangers, magnetic recording devices, magnetic data storage devices, toners and inks for xerography, magnetic resonance imaging, bioseparation and medicine¹³. Although iron is an essential element for life, an increase in cell medium concentration can generate ROS formation¹⁴.

However, in most of their applications, the iron oxide nanoparticles are in contact with the cells or the intracellular medium. It is, therefore, likely that nanoparticles interactions iron/oxide cells are not trivial. This is the case of magnetite nanoparticles, the toxicity toward human cells has been demonstrated¹⁵⁻¹⁷. The iron oxide nanoparticles used for biomedical purposes^{18,19} is generally surface-functionalized via grafting of organic compounds²⁰⁻²⁴. This organic layer limits the direct contact between the iron nanoparticles and cell components. As indicated by the nature of the coating



plays an important role in the biological effects of nanoparticles.

The central model of this study is the little snail gray *Helix aspersa*, known for its ability to accumulate chemicals at significant concentrations in their tissues, particularly, the hepatopancreas^{25,26}. By virtue of many works^{27,28} it has been made possible to use the cellular alterations on the gastropods hepatopancreas as biomarkers for the exposure to xenobiotics. However, some information is available in the literature concerning the study of the biochemical and the histological markers gastropods, which are exposed to nanoparticles and especially Fe₂O₃, for example, Neenu²⁹, Hussain³⁰ reported the cellular toxicity induced by superparamagnetic Fe₂O₃ NPs. Further, Noori³¹ observed reproductive effects of magnetic Fe₂O₃ NPs on mice.

The objective of this work is to study the effects of nanoparticles, Fe₂O₃ on the biochemical and histological parameters of the land snails *H. aspersa*, it is one of the most abundant gastropods in the North-East of Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Chemical

The nanoscale iron oxide was developed in the laboratory of Magnetism and Spectroscopy of Solids (LMS2) of physics, the development of α -Fe₂O₃ nanoparticles was performed by high-energy mechanical milling, from the elemental powder hematite. Milling was carried out in a planetary by Fritsch mill type (P7), using two steel jars.

The preparation of the load (beads + powder) was performed in a glove box under an argon atmosphere. The weight ratio of beads/powders is about 1/20 and the grinding speed T at the order of 500 rev/min. To minimize the effects relating to the increase of the temperature inside the jars, the grinding was done with sequences of half an hour followed by 15 minutes of break and that for 3h.

Toxicological tests on the nanometer iron oxide are still insufficient and especially gastropods, according to results obtained by Nations³² that were not significant and from the preliminary tests we fixed doses used in our treatment (Tab. 1).

Table 1: Group distribution in the basis of nanometric-iron oxide doses.

Group	Fe ₂ O ₃ nanometric doses
C	Untreated
D1	Snails treated with 1g/kg of food
D2	Snails treated with 2g/kg of food
D3	Snails treated with 3g/kg of food

C: control, D1: dose 1, D2: dose 2, D3: dose 3.

Experimental design

Gastropod terrestrial snails (*Helix aspersa*) were collected from an uncontaminated site, situated in the North-East region of Algeria. Snails average weight of 8.86±1.15g were transferred to the laboratory where they will be adapted to the controlled conditions described by Gomot³³ (temperature 20±2°C, photoperiod 18 hL/6hO, humidity 80 to 90%) for almost a week. However, they were exclusively fed with wheat flour supplied in the Petri dish.

The 60 chosen snails were divided into four groups of 15 animals each and were reared in transparent plastic boxes (30×20×15cm) with a perforated lid and a wet sponge to retain moisture. The four groups of snails were fed with dry wheat flour (control snails), or fed with wheat flour contain the NPs powder according to as shown in table 1. The boxes were cleaned and the food was renewed three times a week. Under the controlled laboratory conditions previously mentioned, the experiment was done for six weeks and the physiological changes are notes (comportment and mortality).

Biochemical dosages

The determination of biochemical parameters (total proteins, total carbohydrates and total lipids) has been realized from the hepatopancreas of 13 specimens chosen from each group (control and treated). The methods used are the Method of Duchateau and Florkin³⁴ for quantifying total carbohydrates, the method of Bradford³⁵ for total proteins and method of Goldsworthy³⁶ for total lipids. The extraction of carbohydrates, lipids and proteins according to Shibko³⁷: on a fragment of the hepatopancreas homogenized with trichloroacetic acid (TCA) in 20%. The amount of metabolites were measured in an aliquot of 100µl. Dosages were expressed as µg/mg of the analyzed tissue.

Histology

The histological sections were performed on fragments of three specimens for each group (the control and the treated groups). These glands were fixed in the liquid of Bouin³⁸ for 24 h.

Samples were prepared for analyzes after several stages of rinses in dematerialized water, dehydration in baths of alcohol in increasing degree and impregnation in a bath of paraffin wax³⁹. Then, the samples of hepatopancreas were included in the paraffin by means of molds (bars of leuckart).

Finally, the paraffin sections were cut into 5µm slices by a Leitz microtome and stained with hematoxylin and eosin for light microscopic examination⁴⁰. The sections were viewed and photographed.

Statistical analysis

Data were calculated as Mean ± SD and analyzed using Student's test followed by the analysis of variance (ANOVA) in one way of classification.



The probability of 0.05 or less was considered significant. All statistical analysis was done according to the software MINITAB of analysis and data processing version 17.Ink.

RESULTS

Comportment

The continues followed of the movement and the feeding consumption of snails treated with the three doses of nanometric Iron oxide (1, 2 and 3 g/kg) and after comparison with those of the control we noticed; a decrease with dose-dependent manner of the nutritional attraction and activity, and a decrease of the mobility also with a dose-dependent manner.

At the dose 1 g/kg, most snails showed an activity almost identical to that of the control ones with little disruption of feeding consumption and comportment. However, snails treated with 2g/kg dose consume less flour and move more slowly than the control. The signs are more apparent in animals treated with high dose (3 g/kg). Snails spend most of their time at the top of the boxes, isolated from each other, with low nutritional activity.

Percentage of consumption

In order to calculate the percentage of consumption, it is necessary to dry and weigh the flour residue by using a precision balance, after each box cleaning and food change. At the end of the experiment, the amount of residuals for each group is eliminated from the total amount of six weeks of each group experience (Tab.2).

Table 2: Effects of Fe₂O₃ nanoparticles on the consumption of flour.

Group	Residues weight	% of consumption
C	26.6 g	90.26 %
D1	43.1 g	85.49%
D2	55.8 g	81.27 %
D3	72.9 g	75.17 %

C: control, D1: dose 1, D2: dose 2, D3: dose 3.

Biochemical parameters

The results of effects of the different doses of iron oxide nanoparticles (1, 2 and 3g/kg) on digestive gland constituents (total proteins, total lipids and total carbohydrates) in *H. aspersa* which are obtained after six weeks of treatment are summarized in Figures 1a, 1b and 1c. As compared to the control group, biochemical analysis revealed significant differences in the rate of different metabolites in snails exposed to iron oxide nanoparticles.

We observed a highly significant increase in total proteins concentration in snails exposed to 1 and 2 g/kg of iron oxide nanoparticles and a very highly significant increase in the dose 3 g/kg (fig. 1a) as compared to the control

value. The figure 1b shows the carbohydrate rate with a very highly significant increase for the three treatment groups (by 1, 2 and 3g/kg of Fe₂O₃ nanoparticles) as compared to the control value. Concerning the content of total lipids which was not significantly reduced for the low dose; it was reduced in a very highly significant for the medium and the highly doses of iron oxide nanoparticles (fig. 1c) as compared to the control value.

Histopathology

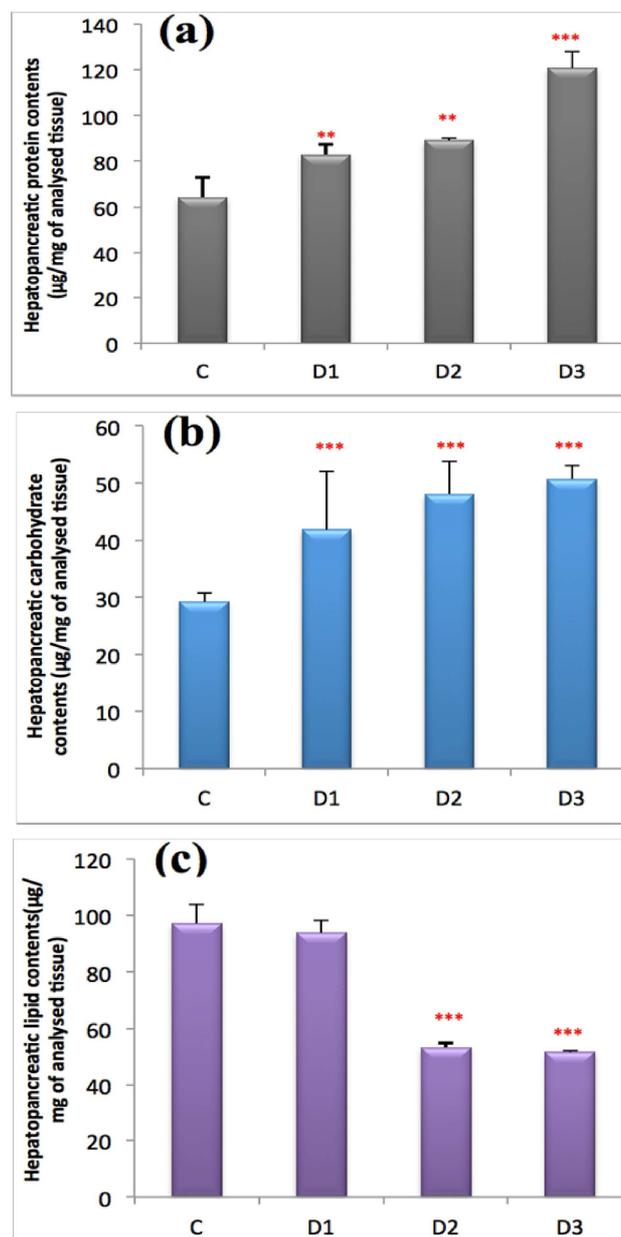


Figure 1: Concentrations of total contents (µg/mg of tissue analyzed) of proteins (a) carbohydrates (b) and lipids (c) in the hepatopancreas of *H. aspersa* after six weeks of exposure to 0, 1, 2 and 3 g/kg, of iron oxide administered by nanoparticles ingestion. Results are expressed as mean ± standard deviations (SD), n = 13.

** : Highly significant difference compared to the control (P ≤ 0.01).

*** : Very highly significant difference compared to the control (P ≤ 0.001).



The digestive gland of normally feeding (untreated) *H. aspersa* consists of essentially the juxtaposition of numerous digestive tubules that have various shapes and sizes and are separated by intertubular space containing hemolymphatic sinuses and hemocytes. Circular muscle layer surrounds each tubule. A simple epithelium of several cellular types lines the lumen of the tubules. These cells have various morphologies, but they have three main cellular types and each cell has the essential components (membrane and nucleus). Digestive cells constitute the most abundant cellular component of the digestive gland tubular epithelium they are relatively polymorphic according to the stage of digestion⁴¹, calcium and excretory cells are fewer than digestive cells⁴² (fig. 2a).

At the end of the study, microscopic examination of histological sections snails treated with three doses (1, 2

and 3 g/kg) showed tissue changes by varying degrees with a dose-dependent effect. In the dose 1 g/kg of iron oxide nanoparticles (fig. 2b), partial degeneration of some digestive cells and intertubular connective tissue more important and more extends are observed, in addition, the regrouping tubules due to narrowing of the lumen which is accompanied by necrosis at the basement membrane. Also, at a dose 2g/kg (Fig. 2c), the same changes were observed, accompanied by breakage of the basal membrane in a dose-dependent manner and almost absent tubular lumen the connective tissue is too altered and the appearance of some inflammatory infiltrates. At a dose of 3g/kg (Fig. 2d), connective tissue, digestive tubules and their membranes are severely damaged with a highly advanced degeneration of digestive and calcium cells and the appearance of inflammatory infiltrates.

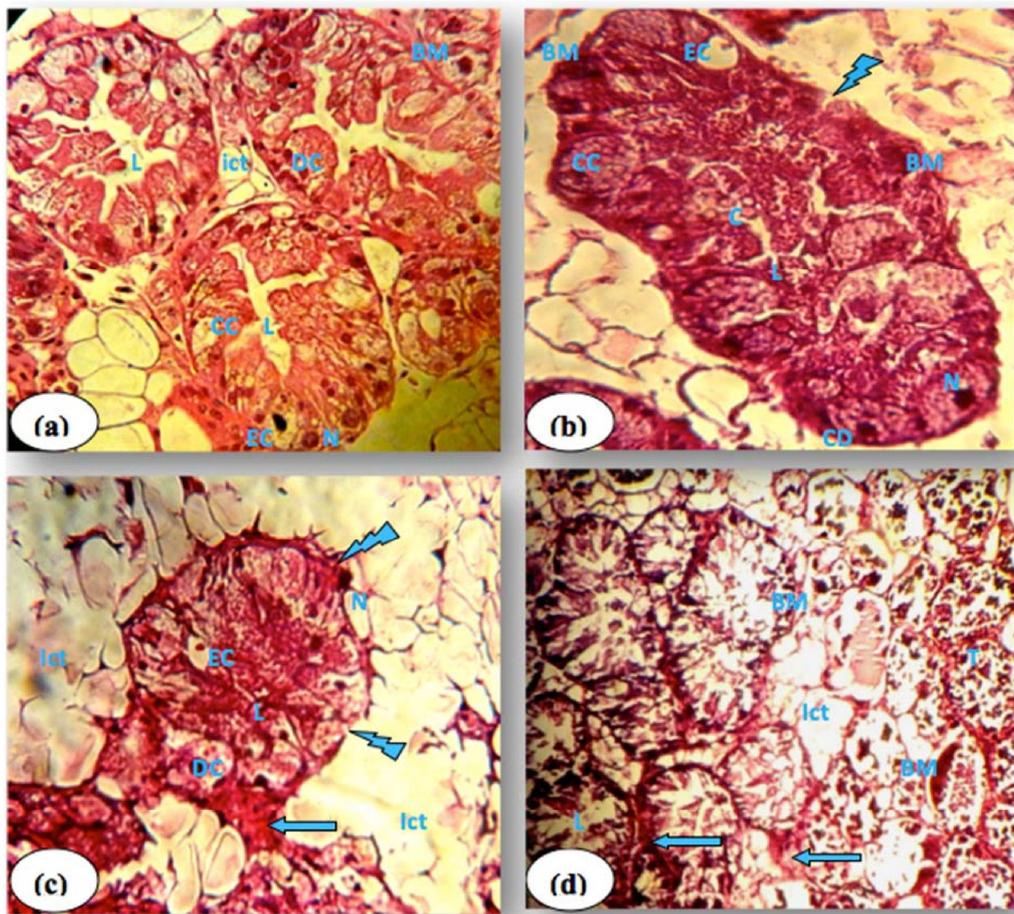


Figure 2: Histological pictures of the midgut gland of snails of *H. aspersa* in control and treated groups (with three doses 1, 2 and 3g/kg of iron oxide nanoparticles) stained with hematoxylin-eosin coloration. (L) digestive tubule lumen; (DC) digestive cells; (CC) calcium cells; (EC) excretory cells; (lct) intertubular connective tissue; (eg) excretory granules; (BM) basement membrane; (N) nucleos. **(a)** Control snails section, untreated showing the juxtaposition of numerous digestive tubules of various shapes and size. **(b)** hepatopancreas section of snails treated with 1g/kg of Fe_2O_3 nanoparticles showing a narrowing of tubular lumen partial degeneration of some digestive cells and tubule necrosis (⚡). **(c)** hepatopancreas section of snails treated with 2g/kg of iron oxide nanoparticles, showing a remarkable degeneration of the intertubular connective tissue with a complete absence of the tubular lumen, a tubular necrosis with the appearance of some inflammatory infiltrates (←). **(d)** hepatopancreas section of snails treated with 3g/kg of Fe_2O_3 nanoparticles, showing tissues severely damaged a very remarkable inflammatory infiltrates and especially in the basal membrane.

DISCUSSION

Biochemical parameters in species exposed to toxicants are good biomarkers and can constitute an important diagnostic tool to assess the exposure and effects of xenobiotics^{43,44}. The results of biochemical parameters dosage show an increase of proteins and carbohydrates level, a decrease of lipids level.

Proteins are the first biomarkers of metabolic disruption. The evolution of the rate of total protein in the hepatopancreas of treated snails was increased (with very highly significant differences) and was dose-related. This phenomenon could be considered an early biomarker of exposure to chemical contaminants. Proteins are mainly involved in the architecture of the cell; proteins may also bind toxins and function as transport proteins⁴⁵.

When among living organisms are subject to changes in their environment, they are submitted to intense stress, causing the death of organisms without the latter can react particularly when their detoxification enzymes are decreased, this stress may be less intense, allowing then the organization to deploy a battery of responses, through the activation of their detoxification mechanisms, to fight, to survive and in some cases, to acclimate to this new parameter⁴⁶.

The synthesis of total proteins involves several event in particular the induction of the enzymatic activities: detoxification enzymes/metabolization. This increase can be explained also by Kohler⁴⁷ hypothesis that said metal oxides trigger the synthesis of stress proteins (enzymes of detoxification).

From this concept and the result obtained by Zhu⁴⁸ that found a significant increase in protein levels in rats exposed to different concentrations of nanometric iron oxide, our result is proved to be true. In addition, Masaya's⁴⁹ results of the toxic effect of chemical stress among different biological models, Grara's²⁸ that showed a variation in snails treated with heavy metals, and in the same order of ideas Boucenna's⁵⁰ results that showed toxic manifestations of a metal dust on *Helix aspersa*, those results were accompanied by a dose-dependent induction of protein synthesis.

The presence of metals may also induce the synthesis of proteins enabling the connection between them⁵¹ the transfer of a part of nanometric iron oxide in granules corresponds to intracellular detoxification pathways described in soil invertebrates. Metals tend to bind to cytoplasmic metalloproteins. Metals-metalloproteins can then be excreted in pellet form after lysosomal action⁵².

Then the total carbohydrates for the treated groups showed a significant increase by contribution to the control group, this increase can be explained by several hypotheses as the increase in energy reserves which is proved by the feed consumption percentage which is decreased compared to the control with dose-dependent manner but not significantly (more than 75% of the feed is

consumed for the three treated groups). Whereas the decrease of the total lipids confirms that. To ensure the necessary energy for the body to fight against a xenobiotic they should be used spare elements and degrade them to increase the rate of glucose, the energy producing a key molecule which is essential in the detoxification reactions. For the same species, Jumel and Lagadic⁵³ report an increase in energy demand of animals that results in rapid mobilization of glycogen of the mantle. Our work is in agreement with that of Saravanan⁵⁴ that have been proposed a hypothesis that it said the elevation of blood glucose level may be a response to respiratory disturbances due to the stress caused by Fe₂O₃ NPs.

Thus, for the lipid levels, our results show a dose-dependent decrease in snails treated with nanometric iron oxide compared to control snails. Our results are in agreement with those of Grara²⁸ that recorded a significant decrease in lipid concentration *Helix aspersa* to heavy metals.

Under stress conditions, the snails need more energy to detoxify the toxicant. Indeed, the dose-dependent decrease of lipid levels after exposure of *Helix aspersa* to nanometric iron oxide may be due to the chemical stress caused by xenobiotic tested. However Eissa⁵⁵ reported that the detrimental effect of chemical compounds could be attributed to the increased use of energy and/or the alteration of cell organelles (treated snails) and can interfere with protein synthesis.

Histological examination of the hepatopancreas of *Helix aspersa* treated with nanometric iron oxide highlighted important qualitative changes since the lowest concentration tested. Indeed, nanoparticles exposure can cause very significant cytological alterations in hepatopancreas, which plays a crucial role in the detoxification of pollutants⁵⁶. In the first time, we have revealed some digestive cells and their nuclei became highly dilated resulting in a very narrow tubular lumen (fig. 2b, c) this result is in agreement with that of Dumeé⁵⁷. The histological study revealed also, degeneration of digestive tubules, fragmentation of digestive cells and ruptures at the basement membrane of tubules with dose-dependent manner, leading to a severe deterioration in the tissue of the digestive gland at the highest concentrations (fig, 2d). The deterioration of digestive cells entail, therefore, altering the global digestive process caused by ingestion of the nanoparticles, this could be a first biological response due to the presence of xenobiotics, these observations are in agreement with the work of Boucenna, Russell and Chabicoovsky^{50,58,59}.

Note that the digestive cells are most abundant in the epithelium of the hepatopancreas according to Chabicoovsky⁵⁹ the loss of digestive cells seems to be a general response after exposure to heavy metals in terrestrial gastropods and is connected mainly to the



deterioration of the digestive process caused by the presence of metal particles⁴².

Whereas Zhu⁴⁸ in his comparison between the submicron-sized and the nano-sized of iron oxide particles, it has been found that iron oxide nanoparticles cause cell lysis at the rat lungs and also increases microvascular permeability, it is hypothesized that these cellular alterations caused by transition metal or its oxide particle exposure may be due to the induction of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). We demonstrated that the nano- and submicron-sized iron oxide particles could generate inflammation and mediate oxidative stress.

These results are in accordance with those of Triebkorn and Köhler^{60,61} which have revealed structural alterations of basophils and digestive cells of the digestive gland of *D. reticulatum* slug exposed to Cd, Pb and Zn and also that of Manzi⁶² they equally observed the acute toxicity of the metal oxides on the cells of the hepatopancreas on the species of *H. pomatia*. Thus, in *Helix pomatia*, an isoform is rapidly induced following exposure to Cd, binder 85% to 95% of this ETM in the hepatopancreas⁶³. An *in vitro* study has shown that the metallic oxide exposure causes inhibition of nucleotidases activities in the hepatopancreas *H. aspersa*⁶⁴. Yager and Harry⁶⁵ say the high diffusion of ETM in the cells causing cellular necrosis; it is obvious to say that the necrosis observed the result of NPs that have a smaller size than the ETM easier to broadcast.

Therefore, it seems obvious that the nanometric iron oxide has a very important cytotoxic potency, which is not very different from that of heavy metals macrometric. On the other hand, the structural changes observed at the higher concentrations could be due to starvation caused by the repulsion of contaminated food and thus, by induced aestivation⁶⁶.

The nanoscale iron oxide may present everywhere, and snails can be in contact with him all lifetime. Our study is a sub-chronic experimental approach in the laboratory conditions can be inadequate to generalize the results obtained. It may be important to test whether these responses are alike⁶⁷, because Wu⁶⁸ concluded that after laboratory experiments while some biomarkers like enzyme induction and lysosomal integrity are clearly reversible after pollution reduction, other responses like cell damage and pathology may be permanent and not reversible. In the future, it is important to elucidate this issue by playing on biomarkers; the xenobiotic concentrations and sensitivity of the biological model, the parameters that affect the recovery time exchange⁶⁸. It would be interesting to quantify iron oxide nanoparticles and its metabolites in snail's tissues to elucidate the effects of this nanoparticle on land snails.

CONCLUSION

We showed at the end of this work that the sub-chronic exposure of *Helix aspersa* to iron oxide nanoparticles is

not sufficiently different to that of macrometric metallic oxides. With selected doses we revealed significant increases of detoxification enzymes and proteins transport (rate of total proteins) decrease in energy needs (rate of total carbohydrates and total lipids), and remarkable alterations on the hepatopancreatic tissue due to the induction of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) which induces by the histo-accumulation of the iron nanoparticles in the individuals of land snail *H. aspersa* exposed to these nanoparticles. We have not confirmed the degree of toxicity of iron oxide nanoparticles only but we also confirmed *Helix* is an excellent bioindicator and bioaccumulation of environmental degradation.

The results of this study highlight the need for safe disposal and release of metallic NPs in ecosystems. In addition, *Helix aspersa* species are edible for humans; it should pay attention on the origin of snails harvested in the wild, so it could contaminate humans.

Acknowledgement: The authors would like to thank Professor A. M. Djekoun from Physics Department that provides us the iron oxide nanoparticles powder, Dr. Yacine Bourbia from El Hadjar Hospital who has helped us to realize the histological sections and finally the entire animal physiology laboratory group.

REFERENCES

1. Tsakalakos T, NATO Sci. Ser II: Math. Phys. Chem. (Nanostructures: Synthesis, Functional Properties and Applications). Publisher Kluwer Academy, 2003, 1128 p.
2. Triboulet S, Adué-Garica C, Armand L, Diemer H, Promer F, Collin-Faure V, Habert A, Strub J M, Hanau D, Herlin N, Carrlère M, Van-Dorsseleer A, Rabilloud T, Analysis of cellular responses of macrophages to zinc ions and zinc oxide nanoparticles: a combined targeted and proteomic approach. *Nanoscale*, 6, 2014, 6102-6114.
3. Hagen W I, Oomen A G, Jong W H, Al E. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body. *Regul. Toxicology Pharmacol*, 49, 2007, 217–28.
4. Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, Wang T, Yuan H, Ye C, Zhao F, Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. *Toxicol Lett*, 163, 2006, 109–120.
5. Wang C T, Ro S H, Surface nature of nanoparticle gold/iron oxide aerogel catalysts. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 352(1), 2006, 35.
6. Simon-Deckers A, Effets biologiques de nanoparticules manufacturées: influence de leurs caractéristiques, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), 2008, 5 p.
7. Hu CW, Li M, Cui Y B, Li D S, Chen J, Yang L Y, Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol Biochem*, 42, 2010, 586–91.
8. Scott-Fordsmann J, Krogh P, Schaefer M, Johansen A, The toxicity testing of double walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. *Ecotoxicol Environ Saf*, 71, 2008, 616–9.
9. Unrine J M, Hunyadi S E, Tsyusko O V, Rao W, Shoults-Wilson W A, Bertsch P M, Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms *Eisenia fetida*. *Environ Sci Technol*, 44, 2010a, 8308–13.
10. Unrine J M, Tsyusko O V, Hunyadi S E, Judy J D, Bertsch P M, Effects of particle size on chemical speciation and bioavailability of Cu to



- earthworms *Eisenia fetida* exposed to Cu nanoparticles. *J Environ Qual*, 39, 2010b, 1942–53.
11. Lapiéd E, Moudilou E, Exbrayat J M, Oughton H, Joner E J, Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Nanomedicine*, 5, 2010, 975–84.
 12. Wang H H, Kou X M, Pei Z G, Xiao J Q, Shan X Q, Xing B S, Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin *Cucurbita mixta* plants, *Nanotoxicology*. 5(1), 2011, 30-42.
 13. Mohapatra M, Anand S, Synthesis and applications of nanostructured iron oxides/hydroxides. *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2(8), 2010, 127-146.
 14. Alberts B, Johnson A, Lewis J, The extracellular matrix of the animals. In *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Garland Science, New York, 1983, 692-713.
 15. Berry C C, Charles S, Wells S, Dalby M J, Curtis A S G, The influence of transferring stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. *International Journal of Pharmaceutics*, 269(1), 2004a, 211-225.
 16. Berry C C, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis A S C, Cell response to dextran derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*, 25(23), 2004b, 5405-5413.
 17. Berry C C, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis A S C, Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials*, 24(25), 2003, 4551-4557.
 18. Gupta A K, Gupta M, Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials*. 26(13), 2005a, 1565.
 19. Gupta A K, Gupta M, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 2005b, 3995.
 20. Goetze T, Gansau C, Buske N, Roeder M, Gornert P, Bahr M, Biocompatible magnetic core/shell nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252, 2002, 399.
 21. Lacava L M, Lacava Z G M, Azevedo R B, Chaves S B, Garcia V A P, Silva O, Pelegrini F, Buske N, Gansau C, Da Silva M F, Morais P C, Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252, 2002, 367.
 22. Chunfu Z, Jinquan C, Duanzhi Y, Yongxian W, Yanlin F, Jiaju T, Preparation and radio labeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. *Applied Radiation and Isotopes*, 61(6), 2004, 1255.
 23. Xu X Q, Shen H, Xu J R, Xu J, Li X J, Xiong X M, Yean S, Cong L, Yavuz C T, Core-shell structure and magnetic properties of magnetite magnetic fluids stabilized with dextran. *Applied Surface Science*, 252(2), 2005, 494.
 24. Kim D, El-Shall H, Dennis D, Morey T, Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. *Colloid Surface*, 40(2), 2005, 83.
 25. Gomot A, Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33, 1997, 209-216.
 26. Regoli F, Gorbi S, Fattorini D, Tedesco S, Notti A, Machella N, Bocchetti R, Benedetti M, Piva F, Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicological effects of urban pollution: an integrated approach. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 2006, 63-69.
 27. Marigomez I A, Kortabitarte M, Dussart G B J, Tissue level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. *Arch Environ Contam Toxicol*, 34, 1998, 167-176.
 28. Grara N, Atailia A, Boucenna M, Khaldi F, Berrebah H, Djebbar M R, Effects of Heavy Metals on the Snails *Helix aspersa* Bioindicators of the Environment Pollution for Human Health. *International Conference on Applied Life Sciences (ICALS2012)*, Turkey, September 10-12, 2012.
 29. Neenu S, Gareth J S J, Romisa A, Shareen H, Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*, 1, 2010, 5358.
 30. Hussain S M, Hess K L, Gearhart J M, Geis K T, Schlager J J, *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro*, 19, 2005, 975–983.
 31. Noori A, Parivar K, Modaresi M, Messripour M, Yousefi M H, Amiri G R, Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice. *Afr J Biotechnol*, 10(7), 2011, 1221–1227.
 32. Nations S, Wages M, Jaclyn E, Canas, Maul J, Theodorakis C P G, Cobb Acute effects of Fe₂O₃, TiO₂, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 83, 2011, 1053–1061.
 33. Gomot A, Contribution à l'étude de la croissance d'escargots du genre *Helix* : influence de facteurs de l'environnement, nutrition et composition biochimique, contrôle neuroendocrine. *Doctorat Sciences de la Vie, Université de Besançon, France, 1994, n 398.*
 34. Duchateau G, Florkin M, For trehalosemie of insects and its signification. *Arch Insect Physiol Biochem*, 67, 1959, 306-314.
 35. Bradford M M, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principe of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 1976, 278-254.
 36. Goldsworthy G J, Mordue W, Guthkelch J, Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*, 18, 1972, 545-551.
 37. Shibko S, Koivistoinen P, Tratyneck C, Newhall A, Freidman L, A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt Biochem*, 19, 1966, 415-428.
 38. Preece A, A manual for histologic technicians. Little, Brown and Company, Boston, 1972.
 39. Odendaal J P, Reinecke A J, Quantifying histopathological alterations in the hepatopancreas of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a biomarker of cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safet*, 56(2), 2003, 319-325.
 40. Martoja R, Martoja P M, Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, Paris VI, 1967, 345 p.
 41. Heusser S, Dupuy H G, Synthèse de la structure tissulaire à la réalisation des fonctions chez les Gastéropodes Pulmonés (I) Eléments d'histologie et de physiologie des espèces *Helix aspersa* et *Helix pomatia*. *Folia chonchiliologica*, 10, 2011, 3-25.
 42. Zaldibar B, Cancio I, Soto M, Marigomez I, Changes in cell-type composition in digestive gland of slugs and its influence in biomarkers following transplantation between a relatively unpolluted and chronically metal-polluted site. *Environmental Pollution*, 156, 2008, 367-379.
 43. Forbes V A, Forbes T L, Rivière J L, Écotoxicologie: théorie et applications. Editions Quae, Paris, 1997, 424 p.
 44. McLoughlin N, Yin D, Maltby L, Wood R M, Yu H, Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19, 2000, 2085-2092.
 45. Cui Y, Gong X, Duan Y, Li N, Hu R, Liu H, Hong M, Zhou M, Wang L, Wang H, Hong F, Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 183, 2010, 874–880.



46. Lagadic L, Caquet T, Amiard J C, Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux .Eds Lagadic L, Caquet T, Amiard J C, Ramade F, Masson, Paris, 1997, 1-9 p.
47. Kohler H R, Storch V, Alberti G, The impact of lead on the assimilation efficiency of laboratory-held Diplopoda (Arthropoda) preconditioned in different environmental situations. *Oecologia*, 90, 1992, 113-119.
48. Zhu M T, Feng W Y, Wang B, Wang T C, Guc Y Q, Wang M, Wang Y, Ouyang H, Zhao Y L, Chai Z F, Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*, 247, 2008, 102–111.
49. Masaya M, Yoshinobu H, Ai Y, Maki K, Yasuo O, Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury. *Journal of Phycology*, 38(5), 2002, 983.
50. Boucenna M, Berrebah H, Atilia A, Grara N, Djebar M R, 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), 2015, 189-198.
51. Zidar P, Van Gestel C A M, Strus J, Single and joint effects of Zn and Cd on *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). *Appl Soil Ecol*, 25, 2009, 257-265.
52. Pihan F, Caractérisation de mollusques gastéropodes terrestres entant que bioindicateurs de contamination polymétallique (Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Cu, Cd et Pb). Thèse de doctorat, université de Metz, Metz, France, 2001, 427p.
53. Jumel A, Lagadic L, Metabolism of polysaccharides in *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) exposed to 4-nonylphenol and nonylphenol dodecylethoxylate in mesocosms. Third SETAC World Congress. Global Environmental Issues in the 21st Century: Problems, Causes and Solutions. Brighton, Angleterre, 2000.
54. Saravanan M, Suganya R, Ramesh M, Poopal R K, Gopalan N, Ponpandian N, Iron oxide nanoparticles induced alterations in haematological, biochemical and ionoregulatory responses of an Indian major carp *Labeo rohita*. *J Nanopart Res*, 17, 2015, 274.
55. Eissa S H, Rizk E T, Abou-Shafey A E, Mona M H, Atlum A, Toxicological effect on *Euphorbia peplus* water suspension on heamocytes of the fresh water snails, *Biomphalaria alexandrina* and *Lanistes carinatus*. *Proc LCBS*, 2, 2002, 417-447.
56. Frias-Espericueta M G, Abad-Rosales S, Aidée C N V, Isidro-Osuna L, Pàez-Osuna F, Olvera R L, Voltolina D, Histological effects of a combination of heavy metals on pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquatic Toxicology*, 89, 2008, 152-157.
57. Dumeé V, Kruatrachue M, Trinachartvanit W, Tanhan P, Pokethitayook P, Damrongphol P, Bioaccumulation of heavy metals in water, sediments, aquatic plant and histopathological effects on the golden napple snail in Beung Boraphet reservoir, Thailand. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86, 2012, 204–212.
58. Russell L K, DeHaven J I, Botts R P, Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, 1981, 634-640.
59. Chabicoovsky M, Klepal W, Dallinger R, Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates programmed cell death and metallothionein overload. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 2004, 648-655.
60. Triebkorn R, Köhler H R, The impact of heavy metals on the grey garden slug, *Deroceras reticulatum* (Müller): metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. *Environ Pollut*, 93, 1996, 317-343.
61. Triebkorn R, Köhler H R, Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. *Biomarkers*, 3, 1998, 109-127.
62. Manzl C, Krumschnabel G, Schwarzbaum P J, Dallinger R, Acute toxicity of cadmium and copper in hepatopancreas cells from the Roman snail (*Helix pomatia*). *Comp Biochem Physiol*, 138(C), 2004, 45-52.
63. Berger B, Dallinger R, Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environmental Monitoring Assessment*, 25, 1993, 65-84.
64. Souza Dahm K C, Ruckert C, Tonial E M, Bonan C D, *In vitro* exposure of heavy metals on nucleotidase and cholinesterase activities from the digestive gland of *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 143, 2006, 316–320.
65. Yager C M, Harry H W, The uptake of radioactive zinc, cadmium and copper by the freshwater snail *Taphius glabratus*. *Malacologia*, 1, 1963, 339-53.
66. Sharaf H M, Histochemical changes of carbohydrate and protein contents in the digestive gland cells of the land snail *Monacha cartusiana* following starvation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 16, 2009, 51-55.
67. Wang W X, Rainbow P S, Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, 2005, 145-159.
68. Wu R S S, Siu W H L, Shin P K S, Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 51, 2005, 623-634.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.