

Toxicité subChronique des Nanoparticule de ZnO chez *Helix aspersa*: Etude physiologique et Comportementale

N. Grara¹, F. Khaldi², A. Benamara³, Z. Zenir², S. Abdemadjid², M. Bouloudenine²

¹Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des sciences de la Terre et de l'Univers, Université 8 Mai 1945 Guelma 24000–Algérie

²Université Mohamed Chérif Messaadia, Souk Ahras, PB 1553, 41000, Algérie.

³Laboratoire de Toxicologie Cellulaire. Université Badji Mokhtar- Annaba, Algérie.

*Corresponding author: grara120@yahoo.fr

ARTICLE INFO

Article History:

Received : 19/12/2016

Accepted : 10/10/2017

Key Words:

Helix aspersa, metal Nanoparticles, ZnO, indicator of health status, bioaccumulation, digestive gland, kidney, compartmental

ABSTRACT/RESUME

Abstract: In this study we were interested in assessing the impact of ZnO based metal nanoparticles and their effects on body bioaccumulative bioindicator of environmental pollution and an indicator of health status *Helix aspersa* for the preservation of Human health. This is a sub chronic (28 days) by means of digestive absorption. The toxicity of ZnO is determined in the snail *Helix aspersa* using a bioassay conducted on laboratory animals exposed to increasing concentrations of ZnO (500 µg/g, 1000 µg/g, 5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g). Initial results show that the presence of metallic nanoparticles to ZnO growth caused an inhibition dose-dependent in the shell diameter. The growth inhibition is also represented by a reduction dose - dependent on the weight of organs especially Soft (digestive gland and kidney), and reduced dose - dependent consumption rate and dry weight of the waste and compartmental disturbances were noted.

Resumé: Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'impact des nanoparticules métalliques à base ZnO et leurs effets sur un organisme bioaccumulateur et bioindicateur de pollution de l'environnement et un indicateur d'état sanitaire *Helix aspersa* pour la préservation de la santé de l'Homme. Il s'agit d'une étude de toxicité subchronique (28 jours) par la voie d'absorption digestive. La toxicité du ZnO est déterminée chez l'escargot *Helix aspersa* grâce à un biotest réalisé en laboratoire sur des animaux exposés à des concentrations croissantes de ZnO (500 µg/g, 1000 µg/g, 5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g). Les premiers résultats montrent que la présence de Nanoparticules métalliques à base de ZnO provoquait une diminution du diamètre (D et L) de la coquille, une réduction dose – dépendante du poids des organes moux en particulier (glande digestive et rein), ainsi qu'une réduction dose - dépendante du taux de consommation et du poids sec des déchets ainsi que des perturbations comportementales ont été noté.

I. Introduction

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

La présence de substances non naturelles dans l'environnement augmente proportionnellement à leur utilisation par l'Homme. Ainsi le développement des nanotechnologies et de leurs utilisations, aura très certainement pour conséquence une augmentation de la concentration en nanoparticules dans l'air, les eaux et les sols. Ils pourront donc atteindre les écosystèmes (Simon-Deckers, 2008). La toxicité des nanoparticules sur les organismes est principalement due à leur composition chimique et à leur réactivité de surface.

Ils peuvent également servir de vecteurs d'autres polluants, c.-à-d. en fixant d'autres polluants à leur surface augmentant ou diminuant la biodisponibilité d'autres substances toxiques ou encore interagir avec des protéines telles que des enzymes (Simon-Deckers, 2008). De nombreux groupes d'invertébrés sont reconnus pour leurs intérêts en écotoxicologie, Parmi les plus couramment cités, les mollusques gastéropodes terrestres et aquatiques présentent la plupart des critères définis par Edwards et al. (1996) guidant le choix des taxons à retenir pour l'évaluation écotoxicologique. Le transfert de polluants dans les réseaux trophiques ne se limite pas aux composés organiques, l'augmentation des concentrations des nanoparticules métalliques dans les sols, principalement due aux activités humaines suscite de nombreuses études sur les risques de leurs transferts. Ces risques paraissent d'autant plus grands que les métaux (Zn : La toxicité des nanoparticules à base de ZnO est toujours comparée à celle des ions Zn^{2+} ,.....) contrairement à la plupart des composés organiques, ne sont pas dégradés dans l'environnement (Gomot, 1997a). Le modèle central de cette étude est l'escargot Petit Gris *Helix aspersa*, connu pour ses capacités à accumuler les contaminants à des concentrations importantes dans ses tissus, Herbivore et détritivore, ce mollusque gastéropode pulmoné est exposé aux pollutions des sols, des végétaux et de l'atmosphère et représente de ce fait un modèle intégrateur complémentaire des organismes sous-terrains comme les annélides ou les organismes à régime strictement herbivore ou détritivore. Peut-être parce qu'il entre dans le régime alimentaire de l'Homme, Il est considéré comme l'un des maillons de la chaîne trophique, il est la proie de nombreux prédateurs tels que les mammifères,

oiseaux et peut donc être à l'origine de transferts des polluants (contaminants) (Grara et al., 2012).

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

II. Matériel et méthodes

Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est un gastéropode terrestre: l'escargot *Helix aspersa* collecté de la région de Souk Ahras (zone non polluée) (Nord - Est Algérien). Les escargots de Poids moyen de ($5 \pm 0,5g$) sont élevés dans les conditions d'environnement optimales suivantes : Photopériodes 18h de lumière / 24h, température ($20 \pm 2^\circ C$), hygrométrie de 80 à 95% aliment en farine de blé, Ils sont réparties dans des boîtes de polystyrène transparents ($23,5 \times 16,5 \times 10,5$ cm) avec couvercle perforé, chaque boîte contient une éponge mouillée pour maintenir l'humidité. L'alimentation est fournie dans des boîtes de pétri régulièrement tous les 3 jours (Gomot, 1997 b; Coeurdasier et al. 2001).

Matériel chimique

Le matériel chimique utilisé une nanoparticule (ZnO) élaborée par la méthode de Co-précipitation (Bouloudenine, 2006).

Caractérisation structurale des nanoparticules élaborées de ZnO

Caractérisation cristallographique par diffraction des rayons x « drx »

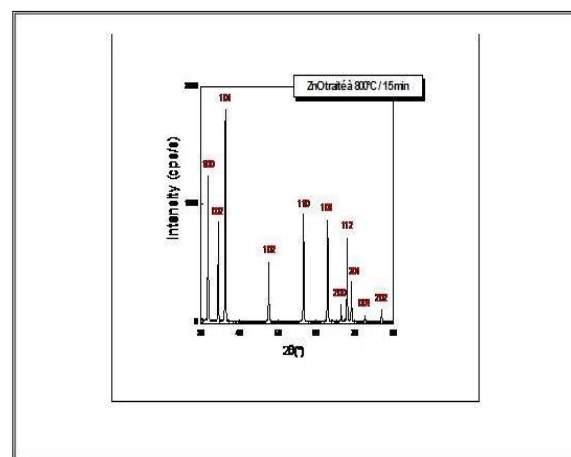


Figure 1. Diagramme de diffraction des rayons X de la poudre ZnO, CoK α 1 ($\lambda=1.789 \text{ \AA}$) (Bouloudenine, 2006)

La figure (01) montre la diffraction des rayons X du produit élaboré. Nous remarquons que la poudre présente bien les pics caractéristiques de la structure hexagonale würtzite correspondant aux plans de diffraction de la structure würtzite de ZnO (Ce diffractogramme révèle une très bonne qualité cristalline des nanoparticules élaborées. Nous avons calculés les paramètres et le volume de la maille élémentaire de notre structure, par le logiciel [U Fit]. Les cristallites constituant notre poudre ont une taille moyenne égale à **59,10 nm**, calculée par la formule de Debye Scherrer. Les résultats de diffraction des rayons X, montrent que la poudre synthétisée présente bien les raies de diffraction de la structure Würtzite de ZnO « **a = 3,24982(9)** ; **c = 5,20661(15)** » ; sans apparition de phases parasite (Bouloudenine ,2006).

Spectroscopie électronique à transmission « MET »

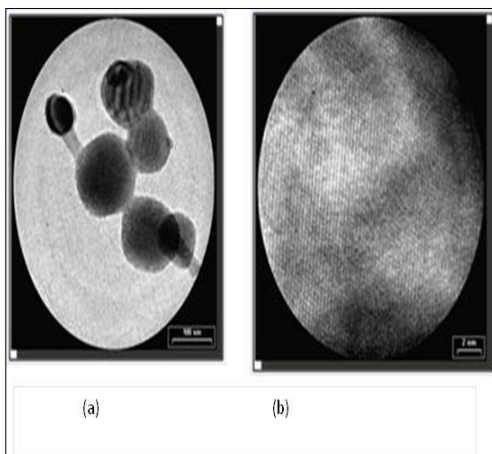


Figure 2. Clichés MET de la poudre polycristalline ZnO (a, b), Bouloudenine. 2006

La figure 02 (a, b) représente des photographies MET de la poudre polycristalline ZnO. A faible résolution, (a), nous observons des cristallites de ZnO avec des formes hexagonales d'une taille moyenne de 100 nm. A haute résolution, (b), l'image MET révèle une structure bien cristallisée dont les plans cristallographiques sont parallèles à la direction (100) (Bouloudenine ,2006).

Mode de traitement

Le traitement des animaux à été effectué par addition des concentrations croissantes de ZnO dans l'alimentation (farine de blé). Nous avons retenu 5 concentrations de ZnO: 500 ; 1000 ; 5000 ; 10000 ; 15000 $\mu\text{g/g}$ d'alimentation et un milieu témoin, le

traitement a duré quatre semaines (Coeurdassier et al. 2001 et 2002).

Préparation et sacrifice des animaux

Après la période du traitement, les escargots sont mis à jeûn pendant 48 heures afin que le contenu de leur tube digestif soit vide, les animaux sont ensuite sacrifiés par congélation à -20°C puis disséqués, les coquilles sont enlevées, lavés avec l'eau physiologique (Coeurdassier, 2001).

Paramètres mesurés

Le diamètre de coquille

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

Le poids frais des deux organes (glande digestive et rein)

Le poids frais des deux organes peut être seulement effectué après le sacrifice des animaux à la fin de chaque période de traitement à l'aide d'une balance de précision (Coeurdassier, 2001).

La consommation alimentaire et les déchets

Les déchets et la farine consommés séché à l'étuve à 37°C pendant 2h sont pesés à l'aide d'une balance portable. Les pesées sont toujours réalisées avant le nettoyage de l'enceinte d'essai (Coeurdassier, 2001).

Effets comportementaux

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

A partir de ces observations, 4 comportements sont définis en fonction de l'activité des animaux et de leur position spatiale dans l'enceinte d'essai (Coeurdassier, 2001) : Actif en position haute (CA), Inactif en position haute (CpA), Actif sur le substrat (SA), Inactif sur le substrat (SpA).

Ces comportements sont "échantillonnés" individuellement, à heure fixe, les jours de changement de nourriture soit 3 séries d'observations par semaine. La lumière du local de test s'allume à 6 heures (matin) et les observations s'étalent entre 9h30 et 10h30. L'ordre des observations pour les différents lots est choisi au hasard. Si la position dans les enceintes peut être facilement relevée, l'activité des animaux est notée de la façon suivante. La boîte

est ouverte et le couvercle retourné est posé sur la 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 (pourtant possible en raison des enceintes transparentes) car les escargots ont une activité plutôt nocturne si bien qu'au moment des observations, la quasi-totalité des escargots sont "inactifs". L'activité ainsi observée représente donc plutôt un état de réceptivité et une capacité à réagir à une stimulation mécanique (déplacement et ouverture de la boîte). Les résultats sont exprimés en % d'observations hebdomadaires de chaque comportement à une concentration donnée par rapport au nombre total d'observations hebdomadaires à la même concentration (Coeurdassier, 2001).

Analyse statistique

L'analyse statistique des données est effectuée par le test T de Student qui sert à comparer entre deux échantillons indépendant (Témoin et traité). À fin de mètre en évidence les différences significatives. Ce test est réalisé à l'aide d'un logiciel d'analyse des données: STATISTICA version 8.0 ; (Statsoft.com) (Dagnelie, 1999).

III. Resultats

Effet du ZnO sur l'évolution des deux diamètres (D, L) de la coquille des escargots

Les figures (03et 04) illustrent respectivement l'évolution du diamètre D et le diamètre L en fonction du temps. Nous constatons qu'en présence des différentes concentrations du xénobiotique les deux diamètres de la coquille évolue d'une manière non significative chez les escargots traités par les concentrations (500 µg/g, 1000 µg/g, 5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g) par rapport aux témoins.

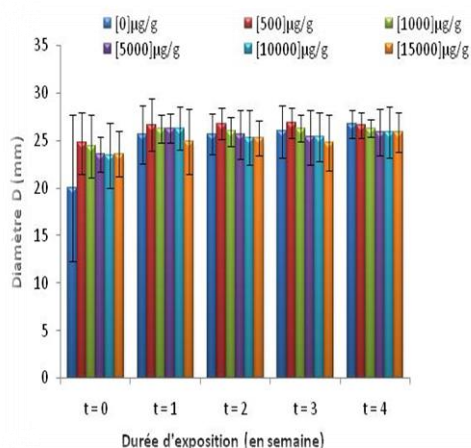


Figure 3. Effet du ZnO sur l'évolution du diamètre moyen « D » de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps

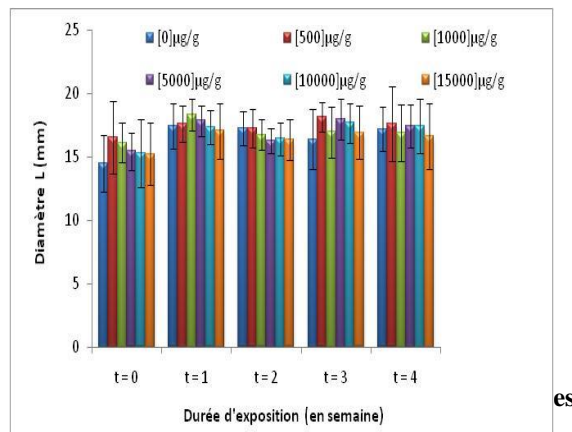


Figure 4. Effet du ZnO sur l'évolution du diamètre moyen « L » de la coquille des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps.

La figure (05) illustre les variations du poids de l'hépatopancréas et du rein en présence de ZnO. Nous constatons qu'en présence du xénobiotique le poids des deux organes tend à augmenter de manière non significative chez les escargots traités par la concentration (500 µg/g) par rapport aux témoins. En revanche, le poids des deux organes diminue de manière dose-dépendante pour ceux traités par les concentrations (1000 µg/g, 5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g). L'analyse statistique montre que le poids de l'hépatopancréas diminue d'une manière très hautement significative pour ceux traités par les concentrations (5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g), cependant le poids des reins diminue d'une manière non significative pour ceux traités par les concentrations (1000 µg/g, 5000 µg/g et 10000 µg/g) et une différence significative pour ceux traités par la concentration (15000 µg/g).

Effet du ZnO sur le poids des déchets sec

La figure (06) illustre les variations du poids des déchets sec des escargots en fonction du temps. Nous constatons une diminution dose-dépendante du poids sec des déchets dès la 1^{ère} concentration en présence des xénobiotiques. D'autre part, l'analyse statistique révèle une différence non significative pour ceux traités par les différentes concentrations par rapport aux témoins à la 1^{ère} et à la 2^{ème} semaine. Ainsi qu'une différence significative pour ceux traités par la concentration (5000 µg/g) et une différence hautement significative pour ceux traités par la concentration (10000 µg/g et 15000 µg/g) à la 3^{ème} semaine du traitement. A la 4^{ème} semaine le poids sec des déchets continue à diminuer mais de manière non significative.

Effet du ZnO sur le poids moyen de la consommation alimentaire

La figure (07) illustre les variations du poids moyen de la consommation alimentaire des escargots en fonction du temps. Nous constatons qu'en présence des xénobiotiques, le poids moyen de la consommation alimentaire tend à diminuer d'une

manière dose dépendante. L'analyse statistique révèle une différence non significative pour ceux traités par les différentes concentrations à la 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} semaine et pour ceux traités par les concentrations (500 µg/g et 1000 µg/g et 5000 µg/g) à la 4^{ème} semaine. Une différence significative pour ceux traités respectivement par les concentrations (10000 µg/g et 15000 µg/g) à la 4^{ème} semaine.

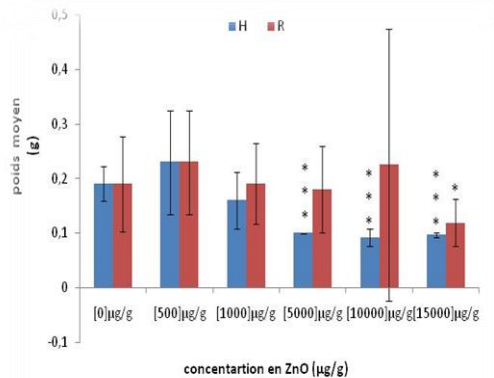


Figure 5. Evolution du poids moyen des organes (hépatopancréas et rein) des escargots *Helix aspersa* en fonction des concentrations croissantes en ZnO

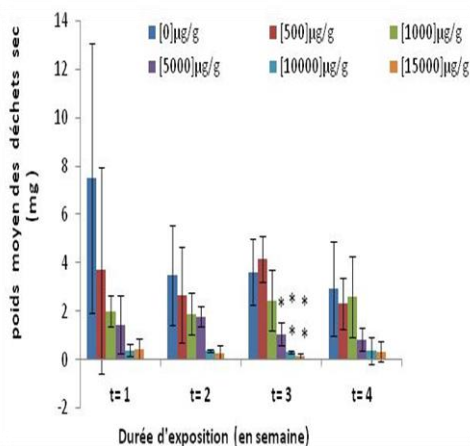


Figure 6. Effet du ZnO sur le poids moyen des déchets secs en fonction du temps.

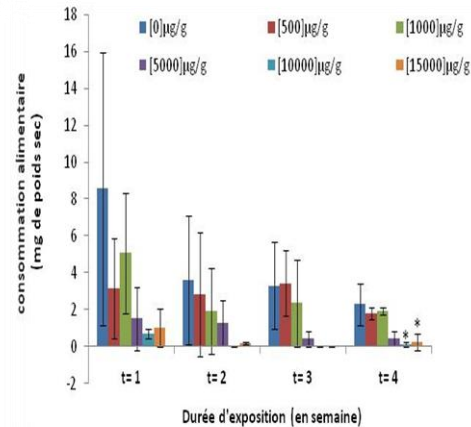


Figure 7. Effet du ZnO sur la consommation alimentaire des escargots *Helix aspersa* en fonction du temps

Effet du ZnO sur le comportement

Les résultats relatifs aux proportions hebdomadaires de chaque comportement aux différentes concentrations de ZnO après une, deux, trois et quatre semaines d'exposition sont présentés respectivement par les figures (08, 09, 10, 11). Au cours de la première semaine d'exposition les escargots ont tendance à être en position haute :

- Les individus sont observés en activité sur le couvercle de la boîte (CA) avec environ 33% chez les témoins et 31% chez les traités par la plus forte concentration (15000 µg/g).

- Soit inactif sur le couvercle de la boîte (CpA) avec 40% chez les témoins et 34% chez les traités par la plus forte concentration (15000 µg/g), une différence significative pour ceux traités par les concentrations (10000 µg/g, 15000 µg/g) par rapport aux témoins.

Les individus présents sur le substrat ont tendance à être:

- Inactifs (SpA) ; avec environ 13% chez les témoins et 32% chez les traités par la concentration (15000 µg/g),

- actifs sur le substrat (SA) avec environ 13% chez les témoins et 4% chez les traités par la plus forte concentration (15000 µg/g).

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

- sont inactifs sur le substrat (SpA) avec environ 23% chez les témoins et 55% chez les traités par la plus forte concentration (15000 µg/g).

- Ceux qui sont actifs sur le substrat (SA) avec environ 7% chez les témoins et 10% chez les traités par la concentration (15000 µg/g)

- Les individus actifs sur le couvercle (CA) avec environ 37% chez les témoins et 19% chez les traités par la plus forte concentration (15000 µg/g).

- Ceux qui sont inactifs en position haute (CpA) avec environ 37% chez les témoins et 13% chez les traités par la plus forte concentration (15000 µg/g)

Une différence significative pour ceux traités par les concentrations (10000 µg/g et 15000 µg/g) par rapport aux témoins.

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

- Les individus sont actifs sur le couvercle de la boîte (CA) avec environ 4% chez les témoins et 20% chez les traités par la plus forte concentration (15000 µg/g). une différence significative pour ceux traités par la concentration (15000 µg/g) par rapport aux témoins.

- Ceux qui sont inactifs sur le couvercle de la boîte (CpA) avec environ 40% chez les témoins et 43% chez les traités par la plus forte concentration (15000 µg/g) par rapport aux témoins.

- Ceux qui sont inactifs sur le substrat (SpA) avec environ 33% chez les témoins et 19% chez les traités par la concentration (15000 µg/g) par rapport aux témoins.

- Ceux qui sont actifs sur le substrat (SA) avec environ 7% chez les témoins et 10% chez les traités par la concentration (15000 µg/g) par rapport aux témoins.

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

- Les individus actifs sur le couvercle de la boîte (CA) avec environ 37% chez les témoins et 32%, 14% et 16% respectivement pour ceux traités par les concentrations (5000 µg/g, 10000 µg/g, 15000 µg/g), une différence hautement significative avec (p = 0.004, p = 0.005) respectivement pour ceux traités par les concentrations (10000 µg/g et 15000 µg/g) par rapport aux témoins.

- Ceux qui sont inactifs sur le couvercle (CpA) avec environ 52% chez les témoins et 48%, 20% respectivement pour ceux traités par les concentrations (10000 µg/g, 15000 µg/g), une différence significative avec (p = 0.03) pour ceux traités par la concentration (15000 µg/g) par rapport aux témoins.

- Ceux qui sont inactif sur le substrat (SpA) avec environ 7% chez les témoins et 47% chez les traités par la plus forte concentration (15000 µg/g), une différence significative pour ceux traités par la concentration (15000 µg/g) par rapport aux témoins.

- Ceux qui sont actifs sur le substrat (SA) avec environ 30% chez les témoins et 15% chez les traités par la plus forte concentration (15000 µg/g) par rapport aux témoins.

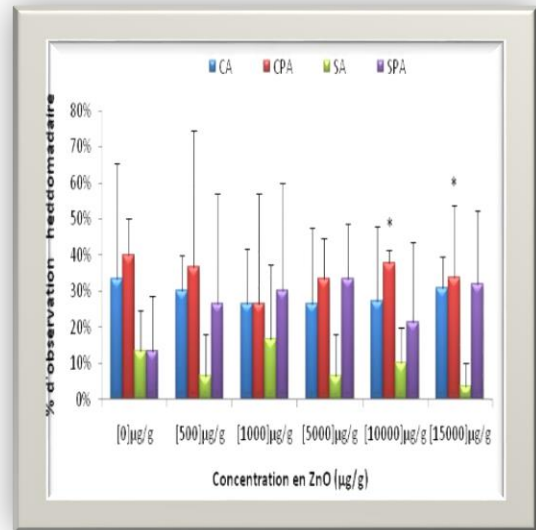


Figure 8. Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de ZnO après une semaine d'exposition.

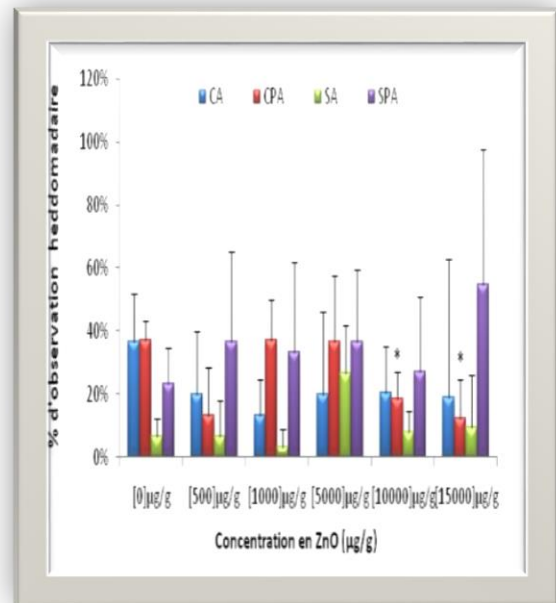


Figure 9. Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de ZnO après deux semaines d'exposition.

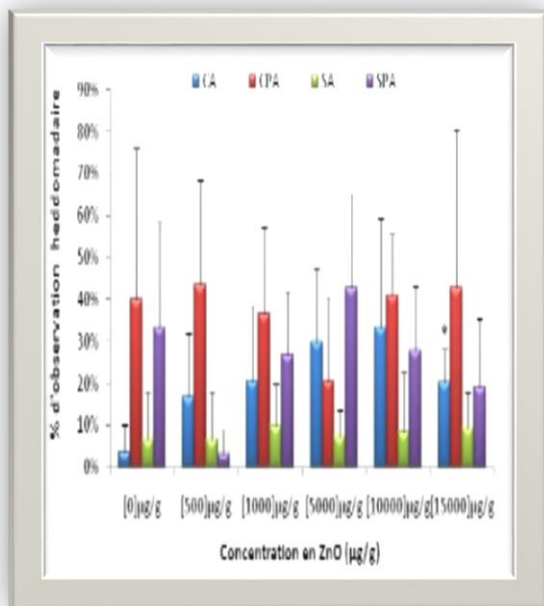


Figure 10. Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de ZnO après trois semaines d'exposition.

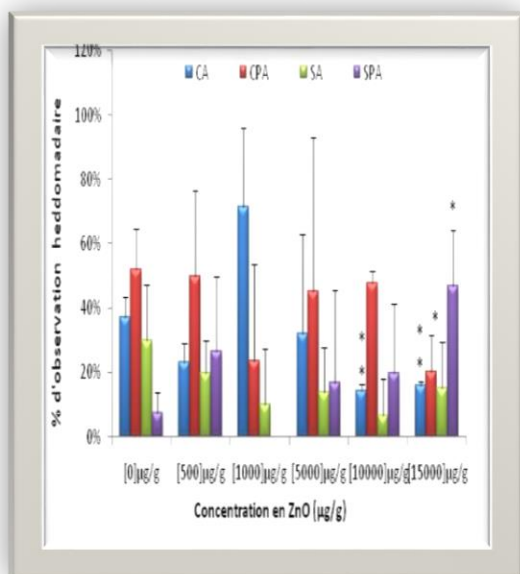


Figure 11. Pourcentage hebdomadaire d'observations de chaque comportement chez les escargots *Helix aspersa* pour chaque concentration de ZnO après quatre semaines d'exposition.

IV. Discussion

Les escargots sont des espèces comestibles par l'homme et peuvent occasionner des concentrations importantes en métaux, risquant de contaminer l'homme (Gomot, 1997a). Parmi les accidents invoqués, figure la catastrophe de Minamata (Japon), qui est un exemple du phénomène de transfert de polluant dans les chaînes alimentaires. Des quantités importantes de mercure ont été libérées par une papeterie industrielle dans les eaux de la baie de Minamata. Ce métal a été méthylé par des bactéries présentes dans les sédiments en un composé organométallique, le méthylmercure. Sous cette forme extrêmement mobile et toxique, le mercure a été transféré dans la chaîne alimentaire pour atteindre des concentrations très élevées dans la faune pisciaire. La population locale, dont le poisson constituait une part prépondérante de l'alimentation, a été fortement intoxiquée par le mercure ; plus de cent personnes sont décédées et un grand nombre a souffert de graves troubles et infirmités (Grara *et al.* 2012 a ; Scheifler, 2002).

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

(Pal *et al.* 2007) avance que la toxicité des nanoparticules est dus à leurs forme, d'autres études ont révélé que la toxicité des nano-objets était en fonction de la taille ou de l'état d'agglomération (Huang *et al.* 2005, Lyon *et al.* 2006, Makhluif *et al.* 2005).

D'autres études suggèrent un effet de la dissolution des nanoparticules, notamment pour les ZnO (Franklin *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007). La toxicité proviendrait de la libération des ions Zn²⁺. Ces articles justifient que, tout au long de cette étude, la toxicité des nanoparticules sera comparée à celle des ions Zn²⁺apportés. Ainsi, la forme, la taille, l'état d'agrégation et la chimie peuvent avoir des effets toxiques différents en fonction des organismes (animales, bactéries, cellules humaines...) avec lesquels les nanoparticules sont mises en contact.

Les conditions expérimentales différentes peuvent également induire des résultats de toxicité différents.

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

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

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

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

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

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

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

Dans notre travail nous avons noté une diminution de la consommation alimentaire chez les animaux traités par les différentes concentrations de ZnO. Cette diminution de la consommation alimentaire que nous avons constatée particulièrement chez les animaux traités par de fortes concentrations de ZnO. Comme le stipule Laskowski et Hopkin, (1995 b). D'autre part, Van Straalen *et al.* (1987) suggèrent que ces animaux sont capables de réguler la quantité de métaux dans leur masse corporelle avec pour conséquence une diminution de la consommation alimentaire aux fortes doses des xénobiotiques. De plus, La diminution dose-dépendante de la prise de nourriture a été souvent relatée chez des gastéropodes terrestres nourris avec des aliments présentant des concentrations élevées en éléments métalliques toxiques (Swailh et Ezzughayyar 2001). Gomot (1997a) observe une différence significative de prise alimentaire chez des individus juvéniles de *Helix aspersa* exposés à 400 µg Cd dans l'aliment et les témoins dont la consommation alimentaire est importante.

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

Dans notre travail nous avons noté une diminution du poids sec des déchets chez les animaux traités par les différentes concentrations de ZnO. Cette diminution peut être expliquée par la diminution de la consommation alimentaire que nous avons constaté dès la première semaine de traitement. Ces résultats sont en accord avec les travaux de

Coeurdassier et al. (2001) qui ont mis en évidence une diminution du poids sec des déchets chez des escargots après exposition de (28 jours) à un pesticide, le diméthoate à base d'organophosphorés.

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

Ces explications suggèrent que des mécanismes autres que la toxicité aiguë ou chronique peuvent être responsables de l'absence des escargots des emplacements contaminés (Laskowski et Hopkin 1996). D'autres facteurs qui peuvent être impliqués sont le comportement (actif ou inactif en position haute) avec une diminution de la consommation alimentaire aussi une inhibition de croissance. Ces effets étaient démontrés chez les escargots du genre *Helix* après ingestion d'un aliment contaminé par un métal (Laskowski et Hopkin 1996 ; Gomot de Vaufléury 2000 ; Swaileh et Ezzughayyar, 2000). Ainsi, les escargots présentent donc une gamme des réponses biologiques avec des paramètres qui constituent des Paramètres auxiliaires et précieux dans le diagnostic de la pollution (El Gendy et al. 2011).

V. Conclusion:

Au terme de ce travail, nous pouvons conclure que l'espèce *Helix aspersa* est sensible à la présence des NPs métalliques à base de ZnO, cette sensibilité s'est manifestée par une perturbation dans le développement des escargots exposés à travers une diminution du poids des organes mous (glande digestive et rein), ainsi qu'une perturbation des diamètres de la coquille, une diminution de la consommation alimentaire et du poids sec des déchets avec une modification du comportement des escargots.

En définitive, nos expériences montrent que les escargots répondent bien aux critères des bioindicateurs rappelés par Hopkin (1993) pour participer à la biosurveillance (biomonitoring).

VI. Bibliographie :

1. [Simon-Deckers A . 2008. Effets biologiques des nanoparticules manufacturées : influence de leur caractéristique. Thèse Univ. Paris 281 p.
2. Beeby A., Richmond L. 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators*, 1, 261-270.
3. Boulouenine M. 2006. Elaboration et caractérisation de semiconducteurs magnétiques dilués de type $Zn_{1-x}Co_xO$ par voies chimiques. Thèse Univ Badji Mokhtar Annaba, 186 p.
4. Chevallier H .1992. L'élevage des Escargots. Production et Préparation du Petit-Gris. 2ème édition. Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort.
5. Coeurdassier M. 2001. Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnaea stagnalis* et *Lymnaea palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques .Thèse Univ. française, France.281 p.
6. Coeurdassier M., Gomot- de Vaufléury A., Badot P.M. 2000. Dose - Dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2571-2578.
7. Coeurdassier M., Gomot- de Vaufléury A., Badot P.M. 2000. Dose - Dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2571-2578.
8. Coeurdassier M., Gomot-de Vaufléury A., Lovy C., Badot P.M. 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53, 425-431.
9. Dagnelie P.1999. Statistiques théoriques et appliquées : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles, Univ De boeck et Larcier.
10. Edwards C.A., Subler S., Chen S.K., Bogomolov D.M. 1996. Essential criteria for selecting bioindicator species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems, Kluwer Academic, Amsterdam, 67-84.
11. El-Gendy K. S., Radhwan M. A., Gad A .F. 2011. Feding and Growth Responses Of the Snail *Theba pisana* to Dietary Exposure. *Arch Environ Contam Toxicol*,60,272-280
12. Franklin N., Rogers M., Apte N. J., Batley S. C., Gadd G. E., Casey G. E. 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.
13. Gomot A. 1997a. Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme. *Bull. Acad. Natle.Méd* ,181, 59-75.
14. Gomot A. 1997b. Double labelling of neural grafts for identification of sites mediating growth in snails. *Biol. Cell*, 89, 133-140.
15. Gomot A., Gomot L., Boukraa, S., Bruckert S. 1989. Influence of soil on the growth on the land snail *Helix*

- aspersa. An experimental study of absorption route for the stimulating factors. *J. Moll. Stud*, 55, 1-7.
16. Gomot-de Vaulfleury A., Kerhoas I. 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64, 434-442.
 17. Gomot-de Vaulfleury A. 2000. Standardised growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb and pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 46, 41-50.
 18. Grara N., Atailia A., Boucenna M., Berrebbah H and Djebbar M. R. 2012 a. Stress oxydatif des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-Est algérien) chez l'escargot *Helix aspersa*. *Environment Risque et Santé*, 11, 221-9.
 19. Grara N., Atailia A., Boucenna M., Berrebbah H and Djebbar M. R. 2012 b. Toxicity of metal dust from Annaba steel complex (Eastern Algeria) on the morpho physiological parameters of the snail *Helix aspersa*. *Advances in Environmental Biology*, 6, 2, 605 - 611
 20. Holbrook D. R., Murphy K. E., Morrow J. B., Cole K. D. 2008. Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. *Nature nanotechnology*, 3, 352-355.
 21. Hopkin S.P. 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier Applied science, NY, USA, 366 p.
 22. Hopkin, S.P. 1993. In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. In :Callow P (Ed). *Handbook of ecotoxicology*. Blackwell. Oxford, 397-427.
 23. Huang L., Li D. Q., Lin Y. J., Wei M., Evans D. G., Duan X. 2005. Controllable preparation of nano-MgO and investigation of its bactericidal properties. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 5, 986-993.
 24. Koeneman B. A., Zhang Y., Westerhoff P., Chen Y., Crittenden J. C., Capco, D. G. 2010. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol Toxicol*, 26, 225-238.
 25. Lam P. K. S. 1996. Effects of cadmium on the consumption and absorption rates of a tropical freshwater snail *Radix plicatulus*. *Chemosphere*, 32, 2127-2132.
 26. Laskowski R., Hopkin P. 1995 b. Accumulation of Zn, Cu, Pb, and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*) : Implication for Predators. *Environmental Pollution*, 91, 289-297.
 27. Laskowski R., Hopkin P. 1996. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on Fitness in Snails (*Helix aspersa*) . *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34, 59-69.
 28. Lyon D. Y., Adams L. K., Falkner J. C., Alvarez P. J. J. 2006. Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effects of Preparation Method and Particle Size. *Environmental Science & Technology*, 40, 14, 4360-4366.
 29. Makhluif S., Dror R., Nitzan Y., Abramovich Y., Jelinek R., Gedanken A. 2005. Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bactericide. *Advanced Functional Materials*, 15, 10, 1708-1715.
 30. Marigomez I., Kortabitarte M., Dussart G.B.J. 1998. Tissue- level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 34, 167-176.
 31. Notten M. J. M., Oosthoek A. J. P., Rozema J. 2005. Heavy metal concentration in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental pollution*, 138, 178-190.
 32. Pal S., Tak Y. K., Song J. M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram (-) negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 73, 6, 1712-1720.
 33. Petersen H., Gjelstrup P. 1998. Effects of insecticide dimethoate on the behaviour of *Folsomia fimetaria* (L.) (Collembola: Isotomidae). *Appl. Soil. Ecol.*, 9, 389-392.
 34. Pujalté I., 2011. Étude in vitro de la toxicité de nanoparticules métalliques (TiO₂, ZnO, CdS) sur la cible rénale, Université Bordeaux Segalen, p : 26
 35. Scheifler R. 2002. Evaluation de la biodisponibilité et des transferts de polluants métalliques et organiques dans les réseaux trophiques "sol-plante-invertébrés". Thèse. Univ Franche-Comté, Besançon, 196 p.
 36. Swaileh K.M., Ezzughayyar A. 2000. Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the land snail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 47, 253-260.
 37. Swaileh K.M., Ezzughayyar A. 2001. Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 47, 253-260.
 38. Tadjine A. 2007. Impact de la pollution atmosphérique d'origine particulaire sur deux modèles (le rat et le lapin). Approche histologique, biochimique, hématologique et toxicologique. Thèse Univ Annaba, 104 p.
 39. Van Straalen, N.M., Burghouts, T.B.A., Doornhof, M.J., Groot, G.M., Janssen, M.P.M., Joosse, E.N.G., Van Meerendonk, J.H., Theeuwens, J.P.J.J., Verhoef, H.A., Zoomer, H.R., 1987. Efficiency of lead and cadmium excretion in population of *Orcheslla cincta* (Collembola) from various contaminated forest soils. *J. Appl. Ecol.*, 24, 953-68.
 40. Viard B., Maul A., Pihan J.C. 2004. Standard use conditions of terrestrial gastropods in active bio monitoring of soil contamination. *Journal of Environmental Monitoring*, 6, 103-107.
 41. Zhang Y., Chen W., Zhang J., Liu J., Chen G., Pope C. 2007. In vitro and in vivo toxicity of CdTe nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 7, 497.

Please cite this Article as:

Grara N., Khaldi F., Benamara A., Zenir Z., Abdemadjid S., Bouloudenine M., *Toxicité subChronique des Nanoparticule de ZnO chez Helix aspersa: Etude physiologique et Compormentale, Algerian J. Env. Sc. Technology*, 3:3-A (2017) 79-88