CHAPITRE II :

Matériel et méthodes

1. Matériel et Méthodes

Une partie de notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de toxicologie de département de biologie Université de El-arbi Tébessi Wilaya de Tébessa et d'autre partie au niveau de l'unité de recherche : Matériaux ; Nanomatériaux ; et Ecosystèmes/USCR Spectromètre d'Absorption Atomique Faculté des Sciences de Bizerte de Tunisie.

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est le mollusque gastéropode pulmoné terrestre appartient à l'espèce *Helix aspersa*, aussi nommé *Cantareus aspersus, Cornu aspersum*, *Criptomphalus aspersus* (**Barker, 2001)**. Plus communément appelé Petit gris.

1.1.1.1. Présentation et classification de l'espèce (*Helix aspersa*)

L'escargot Petit-Gris (*Helix aspersa*) appartient à l'embranchement des Mollusques, animaux à corps mou et dépourvus de squelette. Sa masse viscérale présente une torsion de 180° par rapport au pied d'où une asymétrie de certains de ses organes. Il possède un poumon (ou cavité palléale) ce qui le situe dans la sous classe des Pulmonés. Il appartient au sous-ordre des Stylommatophores caractérisés par le port des yeux à l'extrémité des tentacules oculaires. La forme de sa coquille enroulée caractérise la super famille des Helicacea. Il appartient à la famille des Hélicidés **(Sandrine, 2003).** Le petit-gris est une espèce ubiquiste, originaire des pays méditerranéens et de la façade atlantique française, très répandue en Europe et dans le monde. *H. aspersa* est assez rare dans les champs et les prairies, et préfère fréquenter la périphérie des zones cultivées, les lisières de forêts, voire les milieux forestiers **(Baurand, 2015).**

Selon **Bonnet et Vrillon (1990)** sa position systématique est la suivante :

- ✓ **Règne :** Animal.
- ✓ **Embranchement :** Mollusques.
- ✓ **Classe :** Gastéropodes.
- ✓ **Sous-classe :** Euthyneurs.
- ✓ **Super ordre :** Pulmonés.
- ✓ **Ordre :** Stylommatophores.
- ✓ **Famille :** Helicidaes.

- ✓ **Genre :** Helix.
- ✓ **Espèce :** *Helix aspersa.*

1.1.1.2. Morphologie

Le corps de l'escargot est protégé par une carapace dure, habituellement marqué avec des spirales **(Dekle et Fasulo, 2009).** La coquille est assez mince et obliquement globuleux. Les premiers tours sont relativement petits, mais ils augmentent en taille très rapidement. Les marques sont de différentes nuances de brun dans des bandes de largeurs variées, sur une couleur de fond jaunâtre. Les bandes sont cassé régulièrement par étroite, zig-zag jaune strie, qui traversent radialement le verticille. Les coquilles de jeunes sont très minces et fragiles et sont beaucoup plus claires que celles des adultes. **(Burke, 2013)**

1.1.1.3. Anatomie d'*Helix aspersa*

1.1.1.3.1. Appareil digestif

En raison de la torsion à 180° du corps de l'escargot, le tube digestif forme une boucle ramenant l'anus vers l'avant. La bouche se prolonge par un bulbe buccal à l'intérieur duquel se trouve une langue musculaire recouverte d'une lame cornée : la radula, son rôle est de broyer les aliments. Dans la partie postérieure du bulbe buccal on trouve deux glandes salivaires. Ce bulbe se prolonge par un œsophage qui se renfle en un estomac, lui-même prolongé par un intestin formant une double circonvolution autour de l'hépatopancréas et aboutissant à l'anus **(Sandrine, 2003).**

1.1.1.3.2. Système nerveux

Le système nerveux sympathique est constitué par une paire de ganglions buccaux situés sous le bulbe buccal. Ils sont reliés par deux cordons nerveux aux ganglions cérébroïdes et innervent la plus grande partie du tube digestif. Le système nerveux central est situé dans la région céphalique. Il est formé d'une chaîne de ganglions formant un double collier péri œsophagien complexe **(Sandrine, 2003).**

1.1.1.3.3. Appareil circulatoire et respiratoire

Le cœur est constitué d'une oreillette antérieure et d'un ventricule postérieur. Le sang ou hémolymphe contient un pigment, l'hémocyanine. Il est incolore sous sa forme désoxydée et bleu sous sa forme oxydée. Le sang est propulsé dans le réseau artériel via deux aortes. L'aorte antérieure irrigue le pied et la postérieure le tortillon. Le sang revient au cœur par un système de veines et de sinus veineux. Le poumon est une poche formée de l'épithélium

palléal, irrigué par les vaisseaux pulmonaires, l'air y circule au travers du pneumostome par des mouvements de contraction de son ouverture **(Sandrine, 2003).**

1.1.1.3.4. Appareil génital

L'escargot est hermaphrodite. Cette particularité explique la complexité de l'appareil, formé d'organes à la fois mâles et femelles et d'organes uniquement mâles ou femelles. Il comprend :

- Une gonade, ou ovotestis, où se forment ovules et spermatozoïdes situés à l'extrémité postérieure de l'hépatopancréas.
- Un canal hermaphrodite servant à l'évacuation des gamètes.
- Une glande de l'albumine qui élabore les réserves vitellines.
- Un ovospermiducte

Puis l'appareil se divise en deux voies :

- La voie mâle comprenant un spermiducte où les spermatozoïdes s'accumulent en un spermatophore ainsi qu'un organe copulateur, le pénis.
- La voie femelle comprend la poche qui sécrète le dard calcaire lors de l'accouplement, le vagin et l'orifice génital **(Sandrine, 2003).**

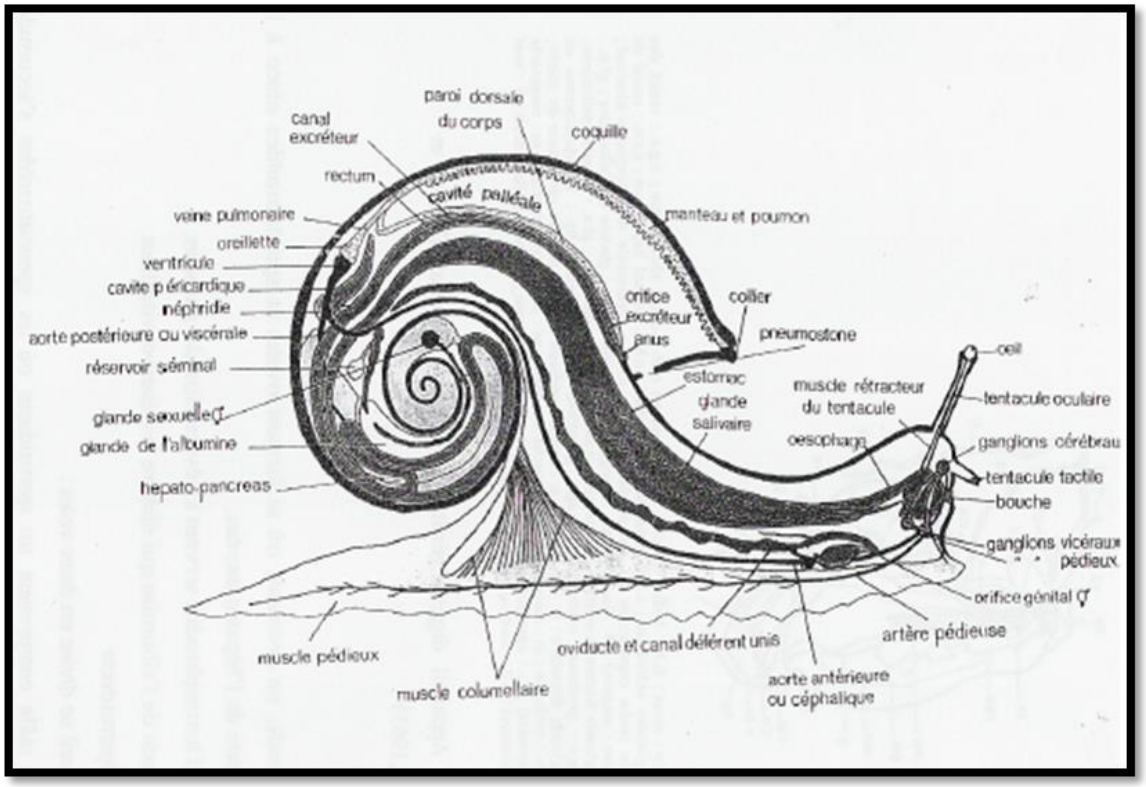


Figure 07 : l'anatomie d'*Helix aspersa* **(Sandrine, 2003).**

1.1.1.4. La biologie de l'espèce *Helix aspersa*

1.1.1.4.1. Activité journalière

Il a été établi un modèle théorique du rythme d'activité nycthéméral de l'escargot en condition de photopériode « jour long » :

- La première phase d'activité débute à la tombée de la nuit et à une durée supérieure à 6h.
- La phase dite d'inactivité relative à une durée inférieure à 18 heures.
- Une autre phase d'activité, ne concernant pas tous les individus, se produit avant le lever du jour.

L'activité des escargots est étroitement liée à l'hygrométrie **(Sandrine, 2003).**

1.1.1.5. Hibernation et estivation

En décembre et janvier en Italie, l'activité des escargots cesse et ils ferment dans la coquille pour le repos hivernal **(Begg, 2003).** L'escargot hiberne en s'enfouissant dans le sol ou en s'abritant les interstices des murs. Sa coquille est alors obturée par un épiphragme épais. Il reprend généralement son activité au printemps quand les températures avoisinent les 12 - 14°C **(Baurand, 2015).** Dans les jours trop secs, ils entrent en estivation en se fixant contre une paroi et en obturant sa coquille d'un voile blanchâtre, l'épiphragme. Celui-ci limite les pertes en eau qui atteignent cependant 30% du poids frais de l'animal **(Sandrine, 2003)**.

1.1.1.6. La croissance

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

- **Phase infantile** durant laquelle le tractus génital est non-différencié chez les 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 des escargots est comprise entre 0,6 et 6,0 g.
- **Phase de maturation sexuelle ou phase préadulte** durant laquelle les glandes annexes femelles se développent. Elle concerne des escargots non bordés (absence d'épaississement du péristome) leurs poids 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（**Gomot, 1997)**.

1.1.1.7. La reproduction

H. aspersa est hermaphrodite : une seule gonade produit les spermatozoïdes et les ovules qui atteignent l'orifice génital par des conduits séparés. Le processus de l'accouplement est complexe, il peut avoir lieu plusieurs fois avant la ponte. Les 2 escargots se positionnent tête-bêche pour échanger leurs spermatozoïdes **(Baurand, 2015).**

L'accouplement nécessite de 4 à 12 heures. La ponte survient 3 fois à 6 jours après la fécondation. Les œufs sphériques blancs sur1/8 de pouce de diamètre sont déposés dans un nid construit par l'escargot. L'escargot construit le nid en utilisant son pied pour pelleter le sol vers le haut. Le nid est d'environ 1 à 1,5 pouces de profondeur. La masse d'œufs est cachée par un mélange de mucus de sol. Le nombre d'œufs déposés en même temps varie de 30 à 120. La fréquence de ponte dépend de la température, de l'humidité, et les conditions du sol. Une basse température et faible humidité inhibe l'activité de l'escargot, ainsi le sol sec est inadapté pour la préparation d'un nid. Par temps chaud et humide, les ovipositions peuvent survenir une fois par mois. Si chaque individu est capable de pondre une fois toutes les six semaines à partir de février à Octobre, puis oviposition se produit environ cinq fois par an et 430 œufs sont pondus **(Dekle et Fasulo, 2009).** Les œufs vont se développer en 12 à 15 jours avant d'éclore. Ensuite les jeunes éclos remontent ensuite en surface, ce qui prend 4 à 5 jours supplémentaires avant de pouvoir les apercevoir **(Baurand, 2015).**

1.1.2. Matériel chimique :

Le matérielles chimique utilisé dans cette expérimentation est une préparation commerciale de nanoparticules à base d'oxyde de fer (Fe_2O_3 : Hématite), nanoparticules du dioxyde de silice (SiO_2) et leur mixture.

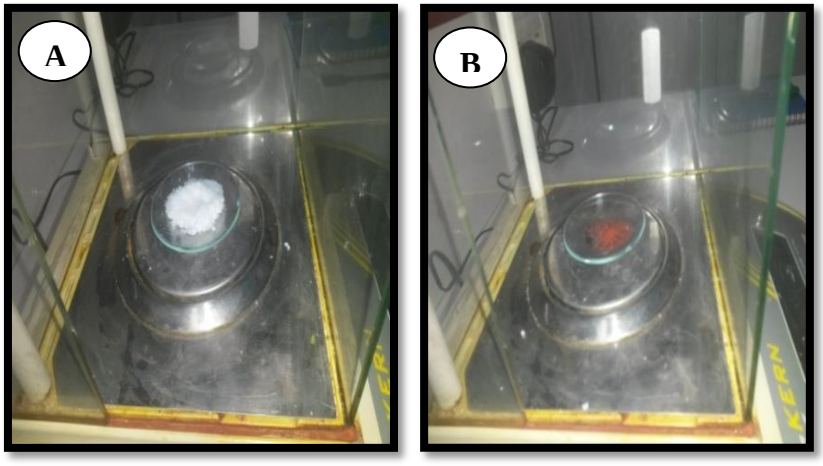


Figure 08 : **(A)** Nanoparticule de Silice **(B)** Nanoparticule d'oxyde de fer.

1.2. Méthodes

1.2.1. Méthode d'exposition

Les escargots utilisés dans notre expérimentation sont des juvéniles, leur poids moyen est de (1.2 ± 0,1g), collecté dans une région considéré comme peu/pas polluée.

1.2.1.1. Remise en activité des animaux avant les tests de toxicité

Sept jours avant le début des expérimentations, les individus en estivation sont remis en activité par pulvérisation d'eau distillée dans les boites d'élevages. L'humidité est maintenue à niveau élevé à l'aide d'une éponge mouillé. Une boite de pétrie contenant de la nourriture (farine de blé) est placée au fond de boite（**Coeurdassier, 2001)**.

1.2.1.2. Conditions d'élevages

Les escargots utilisés dans notre expérimentation sont des juvéniles de poids moyen de (0,84 ± 0,50g), collecté dans la région de Guelma (Nord - Est Algérien). Les escargots sont élevés dans des conditions d'environnement optimales suivantes : photopériode de 18h de lumière/24h, température 20 ± 20°C. Ils sont répartis dans des boites de plastiques transparents, recouvertes avec des tulles maintenues par des élastiques (pour l'oxygénation), et chaque boite contient une éponge humide pour maintenir d'humidité, l'alimentation (farine de blé) est fournie dans des boites de pétrie. Les boites sont nettoyées régulièrement tous les trois jours **(Gomot, 1997 ; Coeurdassier et *al.*, 2001)**.

1.2.1.3. Exposition *d'Helix aspersa* à la nourriture

La « farine de blé » est utilisée dans toutes les expériences d'intoxication des escargots par la nourriture. La contamination est réalisée le jour précédant la mise en route des expérimentations. Les nanoparticules sont ajoutées à la farine sous forme d'une fine poudre. Dans tous les cas la nourriture est ensuite homogénéisée manuellement. La nourriture ainsi contaminée est conditionnée dans des boites en plastique ou dans des béchers en verre puis conservée à -20° C à l'obscurité. Lorsque l'aliment est conservé à -20°C afin de limiter la dégradation du produit, les aliquotes sont décongelés 1 à 2 heures avant d'être apportés aux animaux selon la méthode de **(Coeurdassier, 2001, 2002).**

1.2.1.4. Dispositifs expérimentaux et durée d'exposition

Le traitement des animaux a été effectué par addition des concentrations croissantes des nanoparticules métalliques (Fe_2O_3 et SiO_2 et de leur mixture) dans l'alimentation. Nous avons retenu 5 concentrations croissantes (500 µg/g, 1000 µg/g, 5000 µg/g, 10000 µg/g,

15000 µg/g) et un témoin **(Grara, 2015)**. Les escargots sont répartis en 3 groupes de 6 lots de {10 escargots / lot.} **(Tableau 02)**.

Tableau 02 : Répartition des concentrations des nanoparticules selon les lots et le type de traitement.

Les types de traitement de NP exposé	Les Lots	Nombre d'Escargots	Concentration en µg NP/ g d'aliment sec (farine de blé)
Fe_2O_3	Témoin	10	0
	Dose 1	10	500
	Dose 2	10	1000
	Dose 3	10	5000
	Dose 4	10	10000
	Dose 5	10	15000
SiO_2	Témoin	10	0
	Dose 1	10	500
	Dose 2	10	1000
	Dose 3	10	5000
	Dose 4	10	10000
	Dose 5	10	15000
Fe_2O_3+SiO_2	Témoin	10	0
	Dose 1	10	500
	Dose 2	10	1000
	Dose 3	10	5000
	Dose 4	10	10000
	Dose 5	10	15000

Dans tous les cas, la nourriture apportée est renouvelée, qu'elle soit contaminée ou non, tous les (03) jours au moment du nettoyage des boites d'élevage. Ce nettoyage est fait, autant que possible, à heure fixe. Il comprend un lavage des parois des boites avec l'eau distillée et un changement de l'éponge absorbante au fond des boites. Le traitement se déroule pendant 4 semaines pour les 3 groupes.



Figure 09 : Exposition d'*Helix aspersa* à la nourriture contaminée.

1.2.1.5. Préparation et sacrifice des animaux

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

Les animaux sont ensuite sacrifiés par congélation à -20°C puis disséqués, les coquilles sont enlevées, les hépatopancréas ont été excisés lavés avec l'eau physiologique**.**



Figure 10 : Dissection et prélèvement de l'hépatopancréas.

1.3. Paramètres étudies

1.3.1. Analyse des métaux

1.3.1.1. Préparation des tissus, minéralisation et extraction

Avant la minéralisation ou l'extraction, les animaux sont décongelés, plongés dans une solution d'EDTA 10 µM pendant 5 min puis rincés à l'eau pure et disséqués pour séparer les hépatopancréas **(selon la Technique de Kirchhoff)**.

Les fragments d'organes sont placés individuellement dans des tubes à vis puis séchés à l'étuve (50° C) entre environ 48 à 72 heures **(selon la Technique de Kirchhoff)**.

1.3.1.2. Minéralisation pour le dosage des éléments métalliques

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

1.3.1.3. Dosage des éléments métalliques

Les concentrations en métaux dans les différents échantillons sont mesurées par spectrophotométrie d'absorption atomique (ICP-AES) **(selon la Technique de Kirchhoff)**.

1.3.2. Analyse statistique

L'analyse statistique des données est effectuée par de test statistique (test T de Student) qui sert à comparer entre deux échantillons indépendant (Témoin et traité). Ce test est réalisé à l'aide d'un logiciel d'analyse des données : MINITAB version 18.1.0. La démonstration statistique des effets recherchés est réalisée à l'aide de tests paramétriques : ANOVA à un et deux critères de classification. Ces tests réalisés à l'aide de même logiciel d'analyse des données. Le niveau de signification est $p \leq 0,05$.