1. Matériel

Tous les bio-essais de cette étude ont été réalisés au Laboratoire de Toxicologie, du département de Biologie, Université cheikh Larbi Tébessi, Tébessa.

1.1. Matériel biologique

L'escargot *Helix aspersa* communément appelé petit-gris, est un mollusque gastéropode pulmoné qui fait partie de l'ordre de stylommatophores, de la famille des hélicidaes **(Beaumont et Cassier. 1998).**



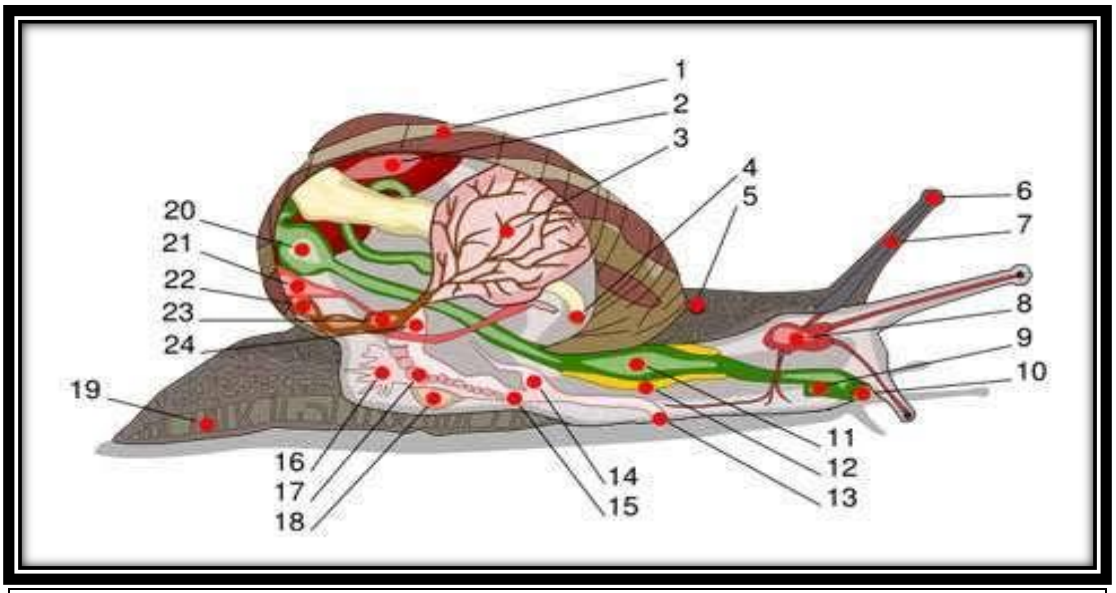
Figure 04: Le petit gris (Helix aspersa **(Daguzan, 1981)**

1.1.1. Morphologie

L'escargot *Helix aspersa* possède une coquille spiralée pouvant contenir tout son corps. Lorsqu'il est en extension, seul le pied apparaît, la masse viscérale étant retenue dans la Coquille par le muscle columellaire **(Smida et Toualbia. 2016).**

1.1.2. Anatomie de l'escargot

Il possède une coquille dextre (qui s'enroule de gauche à droite), de couleur brun-jaune avec un diamètre moyen de 30 mm. Le corps de l'escargot est composé de deux parties distinctes : le pied et les viscères. Le pied lui permet de se déplacer avec un mouvement de glisse aidé par l'émission d'un mucus qui réduit la friction avec les surfaces rugueuses. Il comporte le système nerveux, la partie antérieure du tube digestif, la sole pédieuse et musculeuse. Les viscères sont constitués des organes présents dans le tortillon à l'intérieur de la coquille à savoir : le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge jusque dans le pied **(Baurand. 2014).**



Légende : (1.coquille - 2. foie - 3. poumon - 4. anus - 5. pore respiratoire - 6. oeil - 7.tentacule - 8. cerveau - 9. conduit salivaire - 10. bouche - 11. panse -14. pénis - 15. vagin - 16. glande muqueuse - 17. ovaire - 18. sac de dards - 19. pied - 20. estomac - 21. rein - 22. manteau - 23.coeur - 24. canal déférent)

Figure 05: Anatomie de l'escargot

(www.naturae-scientia.com)

1.1.3 Activité au cours de l'année

L'escargot présente des phases d'activité et d'inactivité saisonnières et journalières. L'activité des Hélicidaes est préférentiellement nocturne. Comme tous les mollusques, l'escargot est un poïkilotherme (animal à sang froid). Il s'est adapté aux variations thermiques saisonnières en développant des rythmes d'activité annuels marqués par deux états physiologiques : le premier, représenté par l'hibernation ou l'estivation, se caractérise par un ralentissement du métabolisme et intervient lors des températures basses (inferieures à 7°C) ou élevées (supérieures à 27°C), ou lorsque l'humidité relative (Hr) est en-deçà de son optimum (75-95 % Hr). Le deuxième se caractérise par une reprise de l'activité locomotrice, le déclenchement de la croissance des jeunes et la reproduction des adultes Pendant la vie ralentie, un épiphragme calcaire peut fermer l'ouverture de la coquille **(Bazizen. 2014).**

1.1.4. Alimentation

Les escargots, comme les limaces, s'alimentent grâce à une langue dentée nommée radula (1500 à 2500 dents). La langue de l'escargot est couverte d'aspérités très dures, disposées en rangées régulières, de façon analogue par exemple à une râpe de menuisier **(Sediri. 2017).**

L'alimentation des escargots varie selon l'espèce. Certains escargots sont phytophages, détritivores, d'autres nécrophages, d'autres enfin prédateurs, parfois cannibales. Les escargots peuvent s'attaquer aux plantes cultivées des jardins (salade, tomates écrasées, fanes de carottes, de céleris…) causant parfois de gros dégâts aux récoltes **(Sediri. 2017).**



Figure 06 : Les deux paires de tentacules d'un escargot brésilien en train de manger **(Dcschmidt. 2008).**

Les escargots phytophages hébergent dans leur intestin une flore bactérienne qui participe à la digestion des végétaux. Les bactéries se maintiennent en vie durant l'estivation ou l'hibernation, en se nourrissant du mucus qui est sécrété par l'épithélium intestinal. Le parasitisme semble rare chez les escargots, mais on connait au moins une espèce marine de Nouvelle-Caldonie (Hydroginella caledonica) qui peut parasiter de nuit, durant leur sommeil certaines espèces de poissons des familles des Scaridae, Serranidae et Pomacentridae. L'escargot introduit son proboscis dans les tissus du poisson et semble pouvoir aspirer par ce moyen des fluides corporels **(Sediri. 2017).**

1.1.5. Hibernation

Helix aspersa, escargot terrestre, n'est actif que lorsque l'humidité est suffisamment élevée. Dans le cas contraire, l'animal se rétracte à l'intérieur de sa coquille qu'il obture par un voile muqueux (courte inactivité) ou par un épiphragme, ce qui lui évite la déshydratation. La photopériode et la température sont des variables saisonnières qui induisent les états d'inactivité. Hibernation et estivation sont donc des réponses à des stress environnementaux prévisibles **(Kafi et Maoui.2017).**



Figure 07: Escargot en hibernation avec son épiphragme **(Grobe.2006).**

1.1.6. Estivation

Un rythme de vie demie –ralentie d'été, on observe ce comportement dans des régions ou l'été et particulièrement chaud et sec. L'animal se présente complètement rétracté à l'intérieur de sa coquille (operculé) dont l'ouverture et fermée ; par l'intermédiaire des matières muqueuses et calcaires secrétées par le mollusque lui-même durant l'estivation, la respiration et les mouvements cardiaque sont normaux mais il y a diminution rapide des réserves d'eau et des réserves énergétiques **(Djadouri et Ben dahra .2014).**

1.1.7. Longévité

Helix aspersa est adulte à deux ans mais peut vivre plus de cinq ans. Dans la nature, il dépasse rarement l'âge de trois ans. Sa mort est souvent due à des prédateurs ou à des parasites. En captivité, sa longévité est bien plus longue et va de 10 à 15 ans. Certains individus ont vécu plus de trente ans **(Zaafour. 2014).**

1.1.8. Croissance

La taille à maturité, chez les ectothermes, est le produit du taux de croissance corporelle et de la durée de la période de croissance qui est le temps nécessaire pour le développement du tractus génital.

Un individu à croissance lente peut avoir une grande taille à l'âge adulte si la différenciation du tractus génital est lente alors qu'un individu à croissance rapide peut être petit si le développement du tractus génital est rapide (raccourcissement de la période de croissance) **(Bazizen. 2014).**

1.1.9. Reproduction

Les hélicidaes sont des espèces hermaphrodites. Néanmoins, cet hermaphrodisme est protérandrique. L'autofécondation n'a été que très rarement constatée chez les espèces du genre *Helix* alors qu'elle existe chez les limaces et les achatines **(Bazizen. 2014).**

1.1.9.1. Formation des gamètes

Les escargots du genre *Helix* montrent un cas d'hermaphrodisme à maturation asynchrone des gonocytes mâles et femelles. Ces gastéropodes sont munis d'un ovotestis qui est une glande hermaphrodite produisant à la fois des spermatozoïdes et des ovules **(Bazizen. 2014).**

1.1.9.2. L'accouplement

Les escargots matures sont généralement bordés. Dans la nature, ils sont alors âgés de 2 à 3 ans. En ce qui concerne *Helix aspersa*, deux escargots s'accouplent tête-bêche, le pénis de chacun pénétrant dans le vagin de l'autre. Les spermatozoïdes sont alors émis sous forme d'un long filament : le spermatophore. L'accouplement dure de 10 à 12h. Suivant les régions, les escargots s'accouplent durant toute la période d'activité avec une périodicité bien définie ; ce qui synchronise les individus **(Pirame .2003).**



Figure 08 : accouplement d'*helix aspersa*
(http://www.escargot dessarradelles.fr)

1.1.9.3. Fécondation

La rencontre des gamètes s'effectue dans un diverticule spécial, appelé chambre de fécondation, qui est rattaché à l'extrémité distale du canal hermaphrodite. Chez les gastéropodes, le spermatozoïde n'a pas de zone privilégiée pour pénétrer l'ovocyte et la polyspermie peut exister, mais les spermatozoïdes surnuméraires sont rapidement désintégrés. Après la fécondation, les œufs d'une ponte subissent leurs premières divisions de segmentation simultanément avant de montrer des différences de croissance au cours du développement **(Bouchebbah .2014).**

1.1.9.4. Ponte

L'intervalle entre l'accouplement et la ponte est variable. En conditions constantes de température et d'hygrométrie (20° C et 85%) les durées moyennes sont de 10 à 15 jours. Pour pondre, l'escargot creuse dans la terre ou le sable un «nid de ponte », la ponte dure 12 à 48 heures. Généralement, chez un animal en ponte, seule la coquille est visible, le reste du corps (le pied) est à l'intérieur du nid. Les œufs, petites sphères blanches de 4 à 25 mm de diamètre et pesant 30 à 40 mg, sont émis un à un par l'orifice génital. Un escargot pond en moyenne 90 œufs par ponte **(Pirame. 2003).**

1.1.9.5. incubation-éclosion

Après la ponte, dès les premiers jours d'incubation, l'embryon élabore une coquille protéique qui se calcifie au cours de son développement. En conditions naturelles, la durée d'incubation varie de 15 à 30 jours. Il se libère par rupture de la membrane externe de l'œuf qu'il consomme. Le nouveau-né va séjourner dans le «nid de ponte » de 6 à 10 jours ; puis il remonte jusqu'à la surface du sol. Il pèse alors de 10 à 40 mg, mesure 2 à 4 mm de diamètre, il est apte à se nourrir **(Pirame S.2003).**

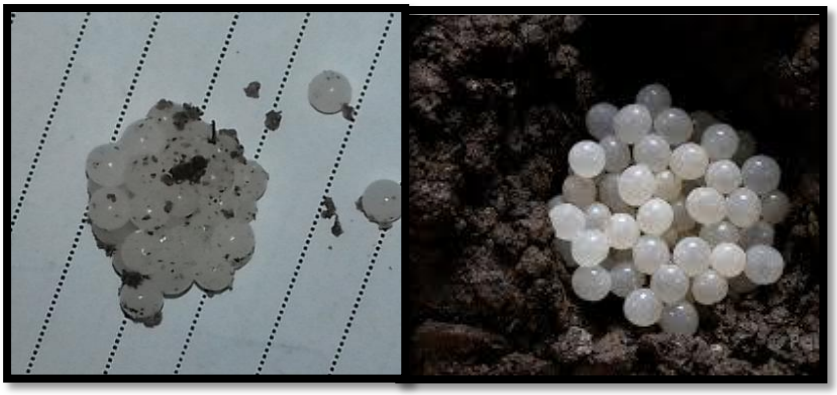


Figure 09 : Grappe des œufs d'*Helix aspersa*
(Mahrez et Haouichi. 2019).

1.1.9.6. Développement embryonnaire

La connaissance des différentes étapes du développement embryonnaire d'*H. Aspersa* s'avère indispensable en vue de la recherche d'effets toxiques de substances chimiques sur le développement (malformations, retards…) comme cela est couramment réalisé chez les espèces aquatiques. Cependant, les œufs d'escargots étant entourés d'une coque opaque, ces observations nécessitent le retrait de cette enveloppe sans léser la membrane périvitelline pour apercevoir l'embryon. Les phases de l'embryogenèse de l'escargot de Bourgogne *Helix pomatia* ont été décrites pour la 1ère fois par Fol (1879-1880) **(Baurand .2014).**

1.2. Matériel chimique

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

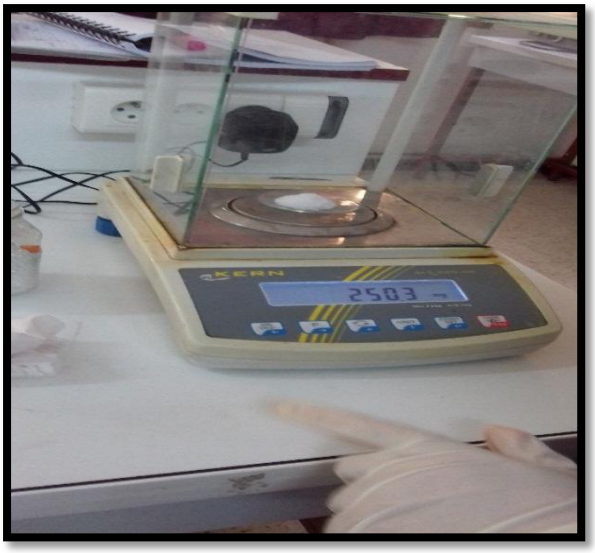


Figure 10 : Nanoparticule de dioxyde de Silice en poudre **(Mahrez et Haouichi. 2019).**



Figure 11 : Nanoparticule d'oxyde de fer en poudre **(Gomot, 1997).**

2. Méthodes

2.1. Condition d'élevage

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).

Les adultes reproducteurs sont placés dans des boites en plastiques transparentes à couvercle perforé pour la pénétration de l'air pour maintenir l'oxygénation, et chaque boite contient une éponge mouillé pour maintenir d'humidité, l'alimentation (farine de blé) est fournie dans des boites de pétrie **(Figure 12)**. Le nettoyage des boites et le changement de nourriture se fait un jour sur deux. Dans ces mêmes boites nous avons placé des pots remplis de terreau pour que les escargots après accouplement puissent pondre leurs œufs à l'intérieur du terreau.



Figure 12 : L'élevage des escargots « *Helix aspersa* » dans laboratoire **(Mahrez et Haouichi. 2019).**

2.2. Mode de traitement

Le traitement est réalisé pendant la phase embryonnaire, dès le 1er jour de la ponte nous avons partagé les œufs en 2 groupes de 6 lots:

- lots témoins dont le papier n'est imbibé qu'avec de l'eau distillé (ED).
- 5 lots traités par 5 concentrations différentes respectivement (1mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, et 15 mg/ml) des nanoparticules (SiO_2, Fe_2O_3,).(Le **tableau 02** résume la distribution des groupes).

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 des œufs	NP en mg/ml
SiO_2	Témoin	21	Eau Distillée
	1mg/ml	21	1
	3mg/ml	21	3
	5 mg/ml	21	5
	10 mg/ml	21	10
	15mg/ml	21	15
FeO_3	Témoin	21	Eau Distillée
	1mg/ml	21	1
	3mg/ml	21	3
	5 mg/ml	21	5
	10 mg/ml	21	10
	15mg/ml	21	15

Des boites de Pétri ont été préparées pour l'incubation des œufs comme suit : on met dans chaque boite trois couches superposés de papier filtre (Whatman; 10 cm de diamètre) et on les imprègne par des solutions sus citées, les flacons sont bien agités pour obtenir des solutions homogènes surtout avant chaque utilisation. La ponté a été partagée en 02 groupes de 06 lots et chaque lot referme 21 œufs, qui ont été placés dans chaque boite et on les incube dans des conditions favorables pour l'éclosion comme dans les figures ci-dessous.

2.2.2. Mode d'incubation des œufs de la ponte avant éclosion

- **Le groupe 01 traité par des NPs de SiO_2**



Figure 13 : lot témoin.



Figure 14: Lot traité par 1mg/ml des NPs de SiO_2.



Figure 15: Lot traité par 3mg/ml des NPs de SiO_2.



Figure 16: Lot traité par 5mg/ml des NPs de SiO_2.

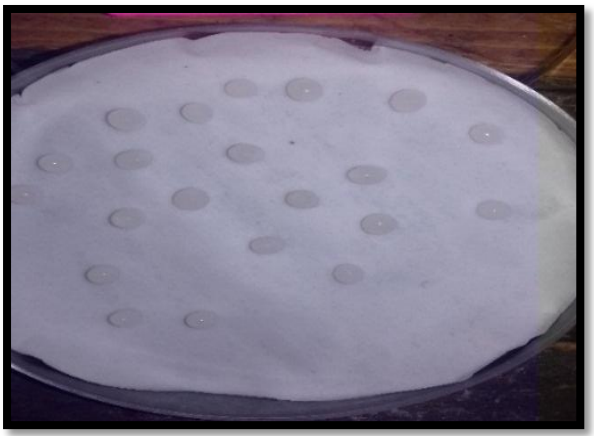


Figure 17: Lot traité par 10mg/ml des NPs de SiO_2.



Figure 18: Lot traité par 15mg/ml des NPs de SiO_2.

- **Le groupe 02 traité par des NPs de Fe_2O_3**



Figure 19: Lot témoin.



Figure 20: Lot traité par 1mg/ml des NPs de Fe_2O_3.



Figure 21: Lot traité par 3mg/ml des NPs de Fe_2O_3.



Figure 22: Lot traité par 5mg/ml des NPs de Fe_2O_3.



Figure 23: Lot traité par 10mg/ml des NPs de Fe_2O_3.

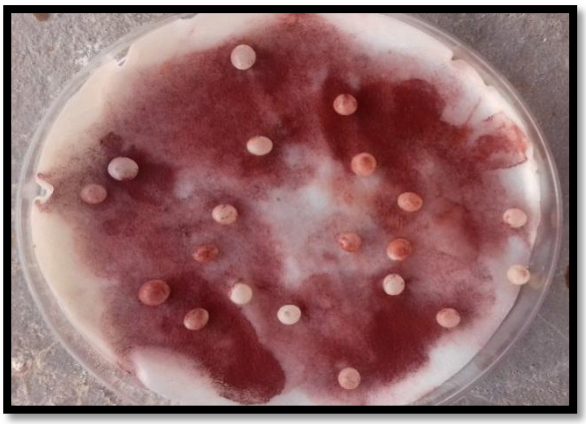


Figure 24: Lot traité par 15mg/ml des NPs de Fe_2O_3.

Dans cette étude la morphométrie des œufs peuvent être basé sur deux critères :

- Le diamètre : est mesuré à l'aide d'un micromètre oculaire dans chaque lot sur 05 œufs durant le 01er, le 05ème, le 10ème et le 15^{ème}jours d'incubation.
- Comme les œufs sont opaques, les observations sont beaucoup plus sur la forme et la couleur de la coque chez les traitées par les nanoparticules d'oxyde de fer car ils ont une couleur vif (couleur rouille), et leur accumulation est facilement observée. Mais chez les traitées par le dioxyde de silice nos observations basés beaucoup plus sur la forme des œufs. 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 5ème, 10ème, 14ème, 15^{ème}et 20ème jour d'incubation, et nous avons réalisé le comptage d'éclosion le 15ème et le 20ème jour. les œufs décomposés ont été retirées des lots, nous avons ensuite maintenu les éclos dans les mêmes boites et nous avons commencé à alimenter les naissains pendant 28 jours. Le comptage de taux de mortalité est effectué chaque 7jours.

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 boites d'élevage en respectant le groupe initial **(Fig 25).**



Figure 25 : Transfert des juvéniles vers des boites en plastique **(Mahrez et Haouichi. 2019).**

Chaque escargot a été pesé individuellementà l'aide d'une balance de précision chaque semaine (pendant 4 semaines) dans chaque lot.



Figure 26 : Suivi du poids des escargots juvéniles

(Mahrez et Haouichi. 2019)

2.2.4. Analyse statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type (m ± s), la comparaison entre deux échantillons (témoin et traités) est effectué après une analyse de la variance à un seul critère de classification .Les moyennes sont comparées par un test T de student.

L'analyse statistique des données été réalisée grâce au logiciel MINITAB 17.

Les différences sont considérées comme :

- Significative lorsque ($P \leq 0.05$).
- Hautement significative comparent au témoin ($P \leq 0.01$).
- Très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0.001$).