



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

THÈSE

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat de 3^{ème} Cycle en
Sciences Biologiques Option Toxicologie Fondamentale et Appliquée

Titre

Etude de la toxicité d'une nanoparticule sur le gastéropode marin
Stramonita haemastoma

Présentée Par

SEDRATI FATEH

Devant le jury composé de :

Pr. HAMAIDIA Kaouther	Présidente	Univ. Souk Ahras
Dr. BOUZAHOUANE Hana	Directrice de thèse	Univ. Souk Ahras
Pr. KHALDI Fadila	Co-Directrice de thèse	Univ. Souk Ahras
Pr. GRARA Nedjoud	Examinatrice	Univ. Guelma
Dr. TREA Fouzia	Examinatrice	Univ. Annaba
Dr. MERGHAD Amina	Examinatrice	Univ. Souk Ahras
Pr. OUALI Kheireddine	Membre invité	Univ. Annaba
Dr. MENAA Mohcen	Membre invité	Univ. Souk Ahras

2024-2025

Remerciements

Cette thèse a été un défi intellectuel, mais aussi une incroyable opportunité de croissance personnelle et professionnelle. Merci Allah pour m'avoir donné la puissance et le courage de compléter ce travail avec succès.

Un merci chaleureux à ma famille et à mes amis, pour leur soutien moral inébranlable et leurs encouragements constants. Votre présence à mes côtés m'a donné la force et la motivation nécessaires pour mener à bien ce travail. Comme l'a dit Helen Keller, « Seuls, nous pouvons faire si peu ; ensemble, nous pouvons faire tellement. »

Je suis également profondément reconnaissant envers Dr. Bouzahouane Hana, ma directrice de thèse, pour son engagement, sa patience et son soutien. Votre guidance a été essentielle tout au long de ce parcours académique et a grandement contribué à ma réussite. Son expertise et sa disponibilité m'ont encouragé à persévérer dans les moments difficiles et à donner le meilleur de moi-même.


Je voudrais exprimer mes remerciements chaleureux à Pr. Khaldi Fadila, co-directrice de cette thèse et présidente du comité de formation doctorale, pour son soutien indéfectible et ses précieux conseils. Votre expertise et votre bienveillance ont été déterminantes dans l'élaboration et la finalisation de cette thèse

Un grand merci à la Présidente du jury, Pr. Kaouther HAMAIDIA pour avoir accepté de présider ce jury, et aux examinatrices, Pr. GRARA Nedjoud, Dr. TREA Fouzia, et Dr. MERGHAD Amina. Je suis profondément reconnaissant à chacun des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Un remerciement particulier à Dr. MENAA Mohcen pour sa contribution dans l'étude, notamment au niveau des statistiques, pour sa disponibilité et ses recommandations.

Je remercie également Pr. DUALI Kheireddine de l'Université d'Annaba pour sa présence et contribution lors de la soutenance en tant qu'invité, ainsi que pour ses recommandations et son aide précieuse, vitale à la réussite de ce travail.

Je tiens aussi à remercier Pr. Nasri Hichem et Dr. Zaidi Hajer de l'Université Chadli Ben Jedid El-Tarf pour leur aide précieuse et leur soutien.



Une dédicace aussi à la mémoire de Madame Aicha Mezdoure, qui a contribué à la réalisation de ce travail. Que son âme repose en paix et qu'Allah lui accorde sa miséricorde.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Dr. Bouarroudj Tayeb du Centre de recherche GRAPC pour sa contribution dans la thèse et aide pratique sur les techniques physiques.

Je remercie également Pr. Lassaad Gzara, de l'Université King Abdulaziz en Arabie Saoudite, pour sa contribution dans cette thèse.

Un grand merci à Pr. Omar Laouar de la faculté de médecine d'Annaba et à Dr. Bensalem Mounira pour leur contribution. Un remerciement particulier aussi à Pr. Noomene Sleimi, de l'Université de Carthage, Tunisie, pour ses directives et recommandations.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à l'achèvement de cette thèse. Votre soutien et votre encouragement ont été des piliers essentiels tout au long de cette aventure académique.

Table des matières

Résumé.....	
Abatract	
الملخص	
Liste des Figures.....	
Liste des Tableaux.....	
Liste des abréviations	
Introduction	
Synthèse Bibliographique Chapitre I : Les Nanoparticules	
I. Les nanoparticules.....	5
II. Classification des nanoparticules	7
1. Les nanoparticules organique ou polymères	7
2. Les nanoparticules à base de carbone (nanotubes de carbone).....	8
3. Les nanoparticules métalliques et oxyde métalliques.....	9
4. Les points quantiques ou (Quantum Dots)	10
III. Source et origine des nanoparticules	12
1. Les NPs d'origine naturelle.....	12
2. Les NPs de source anthropique	13
IV. Application des Nanoparticules.....	14
V. Nanoparticules dans l'environnement, pollution et danger potentiel au sein des écosystèmes aquatiques.....	20
VI. Règlementation des nanoparticules	27
VII. Toxicité des NPs chez l'homme	29
VIII. Ecotoxicité des NPs chez les organismes marins et aquatiques	31
1. Toxicité des NPs Chez les gastéropodes	32
2. Toxicité des NPs chez les mollusques.....	33
3. Mécanismes d'action des NPs	36
4. Les Nanoparticules de chrome (Cr ₂ O ₃)	38
4.1. Origine et propriétés	38
4.2. Utilisation et importance économique.....	38
5. Les Nanoparticules d'Aluminium (Al ₂ O ₃)	39
5.1. Origine et propriétés.....	39
5.2. Utilisation et importance économique.....	40
6. Ecotoxicité et mécanismes de toxicité.....	41
6.1. Toxicité des NPs Cr ₂ O ₃	41

6.2. Toxicité des NPs Al ₂ O ₃	43
Synthèse Bibliographique Chapitre II : Le Néogastéropode <i>Stramonita haemastoma</i>.....	47
1. Description	49
2. Nomenclature	49
2.1. Origine du nom scientifique.....	49
2.3. Autres noms commun de <i>S. haemastoma</i>	49
2.4. Autres synonymes scientifiques.....	50
3. Distribution.....	51
4. Morphologie	52
5. Habitat	53
6. Alimentation et techniques de prédation	54
7. Reproduction	56
8. Classification de <i>S. haemastoma</i>	59
8.1. Taxonomie	59
8.2. Embranchement des mollusques.....	60
8.3. Classe des gastéropodes.....	61
8.4. Ordre des Néogastéropodes	62
8.5. Famille des <i>Muricidae</i> ou Murex.....	63
8.6. Sous famille des <i>Rapaninae</i>	63
9. Applications et usages de <i>S. haemastoma</i>	65
10. <i>S. haemastoma</i> comme espèce bio-indicatrice	66
Matériel et Méthodes	69
1. Présentation de la zone d'étude	69
2. Récolte du modèle biologique <i>S. haemastoma</i>	70
3. Conditions d'élevage des escargots <i>in vivo</i>	71
3.1. Phase d'adaptation.....	71
3.2. Protocole expérimental d'exposition.....	72
3.2.1. Sélection des nanoparticules	72
3.2.2. Préparation de solution stock de NPs	72
3.2.3. Phase d'exposition <i>in vivo</i>	73
4. Dosage des biomarqueurs du stress oxydant	75
4.1. Préparation des échantillons	75
4.2. Homogénéisation des tissus.....	75
4.3. Dosage des protéines	76
4.4. Dosage du Glutathion réduit (GSH).....	77
4.5. Dosage de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST).....	78
4.6. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)	79

4.7. Dosage de l'activité de la Catalase (CAT)	80
4.8. Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)	81
4.9. Dosage de l'Acétylcholinestérase (AChE).....	82
4.10. Dosage de la métallothionéine (MT).....	82
4.11. Dosage du Malondialdéhyde (MDA)	84
5. Etude histologique.....	85
5.1. Etapes de l'évaluation histopathologique	86
5.1.1. Prélèvement	86
5.1.2. Fixation	86
5.1.3. Déshydratation	86
5.1.4. Phase d'imprégnation.....	86
5.1.5. Inclusion à la paraffine.....	86
5.1.6. Réalisation des coupes histologiques	87
5.1.7. Déparaffinage.....	87
5.1.8. Réhydratation	87
5.1.9. Coloration.....	87
5.1.10. Montage microscopique et observation.....	87
5.2. Indice de condition histopathologique (Hi).....	89
6. Synthèse et Caractérisation des Nanoparticules d'Al ₂ O ₃ et de Cr ₂ O ₃	90
6.1. Préparation des nanoparticules de Cr ₂ O ₃	90
6.2. Caractérisation des nanoparticules de Cr ₂ O ₃	90
6.3. Préparation les nanoparticules d'Al ₂ O ₃	91
6.4. Caractérisation des nanoparticules d'Al ₂ O ₃	90
6.5. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) sur les nanoparticules (potentiel zêta).....	91
7. Analyse de l'IBR (Integrated Biomarker Response).....	92
8. Analyse statistique.....	93
Résultats et interprétation	94
1. Résultats au niveau de la glande digestive de <i>S. haemastoma</i>	95
1.1. Biomarqueurs du stress oxydatif	95
1.2. Biomarqueur de la peroxydation lipidique (LPO).....	100
1.3. Biomarqueur de la neurotoxicité	101
1.4. Métallothionéine (MT).....	102
1.5. Étude histologique.....	1024
1.5.1. Observation des altérations histologiques	1064
1.5.2. Indice d'état histopathologique (Hi)	106
1.6. Analyse en composantes principales (ACP).....	107
2. Résultats au niveau des branchies de <i>S. haemastoma</i>	109

2.1. Biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques.....	109
2.1.1. Après 7 jours d'exposition.....	109
2.1.2. Après 14 jours d'exposition.....	111
2.1.3. Après 28 jours d'exposition.....	113
2.2. Analyse IBR	114
2.2.1 Après 7 jours	115
2.2.2. Après 14 jours	115
2.2.3. Après 28 jours	116
3. Analyse histologique	118
Discussion	122
Conclusion et perspectives	141
Productions scientifiques.....	142
Références Bibliographiques.....	142

Résumé

Résumé

Cette étude examine la toxicité des nanoparticules d'oxyde de chrome(III) (NPs de Cr_2O_3) et des nanoparticules d'oxyde d'aluminium (NPs d' Al_2O_3) sur le gastéropode méditerranéen *Stramonita haemastoma*. En utilisant une approche multi-biomarqueurs, nous avons évalué l'induction du stress oxydatif, la neurotoxicité et les altérations histologiques sur des intervalles de temps de 7, 14 et 28 jours, à différentes concentrations de nanoparticules (NPs). Les biomarqueurs du stress oxydatif qui ont été évalués sont le glutathion réduit (GSH), la glutathion S-transférase (GST), la glutathion peroxydase (GPx), la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD). La neurotoxicité a été évaluée par l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), tandis que les niveaux de métallothionéine (MT) et de malondialdéhyde (MDA) ont été mesurés pour évaluer la réponse au stress et la peroxydation des lipides, respectivement. Ces biomarqueurs ont été analysés dans la glande digestive et les branchies de *S. haemastoma*. Des examens histologiques ont été réalisés pour identifier les altérations tissulaires. Nos résultats mettent en évidence une induction significative du stress oxydatif, des effets neurotoxiques et des dommages histologiques chez *S. haemastoma* exposée aux NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 . Les relations entre les biomarqueurs ont été déterminées à l'aide de l'analyse en composantes principales (ACP) et de l'approche IBR (Integrated Biomarker Response), ce qui a permis de mieux comprendre les effets toxicologiques. Cette étude est innovante car elle est la première à utiliser cette espèce et à rapporter la toxicité des NPs de Cr_2O_3 chez les espèces marines. Elle souligne l'importance de prendre en compte plusieurs biomarqueurs sur différentes durées d'exposition pour évaluer avec précision l'impact environnemental de la pollution par les NPs.

Mots-clés : Toxicité des nanoparticules, *Stramonita haemastoma*, biomarqueurs du stress oxydatif, neurotoxicité, altérations histologiques, IBR.

Abstract

This study investigates the toxicity of chromium (III) oxide nanoparticles (Cr_2O_3 NPs) and aluminum oxide nanoparticles (Al_2O_3 NPs) on the Mediterranean gastropod *Stramonita haemastoma*. Using a multi-biomarker approach, we assessed oxidative stress induction, neurotoxicity, and histological alterations over time intervals of 7, 14, and 28 days, at various nanoparticle concentrations. Oxidative stress biomarkers were evaluated, including reduced glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD). Neurotoxicity was assessed via acetylcholinesterase (AChE) activity, while metallothionein (MT) and malondialdehyde (MDA) levels were measured to gauge stress response and lipid peroxidation, respectively. These biomarkers were analyzed in both the digestive gland and gills of *S. haemastoma*. Histological examinations were conducted to identify tissue alterations. Our findings highlight significant oxidative stress induction, neurotoxic effects, and histological damage in *S. haemastoma* exposed to both Cr_2O_3 and Al_2O_3 nanoparticles. The relationships among biomarkers were analyzed using principal component analysis (PCA) and the Integrated Biomarker Response (IBR) approach, providing a comprehensive understanding of the toxicological effects. This study is innovative as it is the first to employ this species and to report the toxicity of Cr_2O_3 NPs in marine species. This study underscores the importance of considering multiple biomarkers over different exposure durations to accurately assess the environmental impact of nanoparticle pollution.

Keywords: Nanoparticle toxicity, *Stramonita haemastoma*, Oxidative stress biomarkers, Neurotoxicity, Histological alterations, IBR.

المخلص

تبحث هذه الدراسة في سمية جسيمات أكسيد الكروم (III) النانوية (NPs de Cr₂O₃) وجسيمات أكسيد الألومنيوم النانوية (NPs d'Al₂O₃) على بطنات الأقدام في البحر الأبيض المتوسط *Stramonita haemastoma* وباستخدام نهج متعدد المؤشرات الحيوية، قمنا بتقييم تحريض الإجهاد التأكسدي والسمية العصبية والتغيرات النسيجية على مدى فترات زمنية من 7 و14 و28 يوماً، بتركيزات مختلفة من الجسيمات النانوية. قمنا بتقييم المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي، بما في ذلك الجلوتاثيون المرجع (GSH) والجلوتاثيون S-transferase (GST) والجلوتاثيون بيروكسيداز (GPx) والكاتالاز (CAT) وديسموناز الأكسيد الفائق (SOD). تم تقييم السمية العصبية من خلال نشاط إنزيم الأسيتيل كولينستريز (AChE)، في حين تم قياس مستويات الميتالوثيونين (MT) والمالونديالدهيد (MDA) لقياس الاستجابة للإجهاد وبيروكسيد الدهون على التوالي. وقد تم تحليل هذه المؤشرات الحيوية في كل من الغدة الهضمية والخياشيم في *S. haemastoma*. كما أجريت فحوصات نسيجية لتحديد التغيرات في الأنسجة. تسلط النتائج التي توصلنا إليها الضوء على تحريض الإجهاد التأكسدي الكبير والتأثيرات السمية العصبية والأضرار النسيجية لـ *S. haemastoma* المعرضة لكل من جسيمات الكروم والألمنيوم النانوية. وتعتبر هذه الدراسة مبتكرة لأنها الأولى من نوعها التي تستخدم هذا النوع من الجسيمات النانوية في الأنواع البحرية. وقد تم تحليل العلاقات بين المؤشرات الحيوية باستخدام تحليل المكونات الرئيسية (PCA) ونهج الاستجابة المتكاملة للمؤشرات الحيوية (IBR)، مما يوفر فهماً شاملاً للتأثيرات السمية. تؤكد هذه الدراسة على أهمية النظر في المؤشرات الحيوية المتعددة على مدى فترات التعرض المختلفة لإجراء تقييم دقيق للتأثير البيئي للتلوث بالجسيمات النانوية.

الكلمات المفتاحية: سمية الجسيمات النانوية، سترامونيتا هيماستوما، المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي، السمية العصبية، التغيرات النسيجية، الاستجابة المتكاملة للعلامات البيولوجية (IBR).

Liste des Figures

Numéro de la Figure	Titre	Page
Figure 1	Nombre de publications sur les nanoparticules depuis 2000	6
Figure 2	Nanoparticules et l'échelle nanométrique	6
Figure 3	Les polymères : A - Dendrimères, B - Liposomes et C - Micelles	7
Figure 4	Représentation schématique des nanotubes de carbone	8
Figure 5	Classification des nanoparticules selon la nature chimique et physique	11
Figure 6	Classification des nanoparticules selon la nature chimique	11
Figure 7	Usages des nanoparticules - A : Implant orthopédique à base de NPs - B : Types de NPs employées dans les procédés alimentaires	18
Figure 8	Applications des nanoparticules dans notre quotidien	19
Figure 9	Transformations des nanoparticules dans le milieu marin	22
Figure 10	Comportement des nanoparticules dans le compartiment marin et leurs interactions	24
Figure 11	Biodisponibilité des NPs et interactions avec les organismes	25
Figure 12	Impact des nanoparticules dans le milieu marin	26
Figure 13	Pictogramme d'avertissement relatif aux nanoparticules	27
Figure 14	Voies d'entrée des nanoparticules et leur distribution dans le corps humain	30
Figure 15	Toxicité et accumulation des NPs chez les gastéropodes aquatiques	33
Figure 16	Voies d'internalisations et devenir des NPs dans les cellules	38
Figure 17	Photo de <i>S. haemastoma</i> prise le 28/07/2021	50
Figure 18	Distribution documentée de <i>S. haemastoma</i>	51

Figure 19	Coquille de <i>S. haemastoma</i> et anatomie externe	52
Figure 20	<i>S. haemastoma</i> regroupé dans un rocher	54
Figure 21	<i>Stramonita haemastoma</i> se nourrissant de patelles	57
Figure 22	Trou résultant de la prédation d'une patelle par <i>S. haemastoma</i>	57
Figure 23	Capsule de <i>S. haemastoma</i>	58
Figure 24	Capsule de <i>S. haemastoma</i>	59
Figure 25	Les trois familles majeures des Néogastéropodes	64
Figure 26	Le Cap de Gard (36°58'04''N, 7°47'32''E) Golfe d'Annaba	69
Figure 27	A : Masse molle de <i>S. haemastoma</i> -1 Glande digestive -2 Radula 3- Ctenidium 4- Manteau. B : Branchies. C : Glande digestive (gonade en jaune).	70
Figure 28	A : Nano-poudre d'oxyde de chrome Cr ₂ O ₃ , B : d'oxyde d'aluminium Al ₂ O ₃	72
Figure 29	Le gastropode <i>Muricidae S. haemastoma</i>	74
Figure 30	Mise en élevage de <i>S. haemastoma</i> sous conditions de laboratoire	74
Figure 31	Exposition des individus aux nanoparticules par dispersion directe	74
Figure 32	Courbe d'étalonnage des protéines	77
Figure 33	Etapas de l'étude histologique	88
Figure 34	Valeurs de GSH et de GST dans la glande digestive de <i>S. haemastoma</i> exposée aux NPs de Cr ₂ O ₃ (A, A') et d'Al ₂ O ₃ (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.D. N= 3.	96
Figure 35	Valeurs GPx et MDA dans la glande digestive de <i>S. haemastoma</i> exposée aux NPs de Cr ₂ O ₃ (A, A') et d'Al ₂ O ₃ (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.D. N= 3.	98
Figure 36	Valeurs CAT et SOD dans la glande digestive de <i>S. haemastoma</i> exposée aux NPs de Cr ₂ O ₃ (A, A') et d'Al ₂ O ₃ (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.D. N= 3.	100
Figure 37	Valeurs MT et AChE dans la glande digestive de <i>S. haemastoma</i> exposée aux NPs de Cr ₂ O ₃ (A, A') et d'Al ₂ O ₃ (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.D. N= 3.	103
Figure 38	Altérations histologiques observées dans les glandes digestives de <i>S. haemastoma</i> exposées à 28 jours aux NPs de Cr ₂ O ₃ et d'Al ₂ O ₃ , CT : groupe témoin avec structure normale (DG), coloration H&E X100, X40.	105
Figure 39	Médianes moyennes de l'indice d'état histopathologique (Hi) du groupe témoin et des glandes digestives des individus exposés aux deux NP	106

Figure 40	Biplot de l'analyse en composantes principales dans la glande digestive des escargots exposés aux NPs de Cr ₂ O ₃ (A, A') et d'Al ₂ O ₃ (B, B') avec toutes les variables mesurées intégrées dans toutes les durées et concentrations	108
Figure 41	Les taux de GSH et GST dans les branchies de <i>S. haemastoma</i> traitées avec les NPs de Cr ₂ O ₃ (A, A') et d'Al ₂ O ₃ (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.d. n= 3 (* p < 0,05).	110
Figure 42	Les taux de GPx et CAT dans les branchies de <i>S. haemastoma</i> traitées avec les NPs de Cr ₂ O ₃ (A, A') et à l'Al ₂ O ₃ (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.d. n= 3 (* p < 0,05).	111
Figure 43	Les taux de SOD et MDA dans les branchies de <i>S. haemastoma</i> traitées avec les NPs de Cr ₂ O ₃ (A, A') et d'Al ₂ O ₃ (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.d. n= 3 (* p < 0,05).	112
Figure 44	Les taux de MT et AChE dans les branchies de <i>S. haemastoma</i> traitées avec les NPs de Cr ₂ O ₃ (A, A') et d'Al ₂ O ₃ (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.d. n= 3 (* p < 0,05).	114
Figure 45	Graphiques IBR des activités GST, GPx, CAT, SOD et AChE (biomarqueurs enzymatiques) et du contenu GSH, MT, MDA (biomarqueurs non enzymatiques) dans les branchies de <i>S. haemastoma</i> traité avec les NPs de Cr ₂ O ₃ .	116
Figure 46	Graphiques IBR des activités GST, GPx, CAT, SOD et AChE (biomarqueurs enzymatiques) et le contenu GSH, MT, MDA (biomarqueurs non enzymatiques) dans les branchies de <i>S. haemastoma</i> traité avec les NPs d'Al ₂ O ₃ .	117
Figure 47	Evolution des valeurs IBR v2 en fonction des périodes d'exposition (7, 14 et 28 jours) et des concentrations de NPs de Cr ₂ O ₃ et d'Al ₂ O ₃ dans les branchies de <i>S. haemastoma</i> .	117
Figure 48	Altérations histologiques observées dans les branchies de <i>S. haemastoma</i> exposées à 28 jours aux NPs de Cr ₂ O ₃ et d'Al ₂ O ₃ . A. Coloration H&E X100, X200, X400 à faible puissance.	119
Figure 49	La variation de tendance des biomarqueurs (GSH, GST, GPx, CAT, SOD, MDA, AChE, et MT) dans les branchies de <i>S. haemastoma</i> exposées aux NPs d'Al ₂ O ₃ et de Cr ₂ O ₃ en fonction des durées d'exposition (* p < 0,05).	120

Liste des Tableaux

Numéro	Titre	Page
1	Types de nanoparticules métalliques et oxydes métalliques	10
2	Exemple de système de transport ciblé des nano-pesticides	18
3	Concentrations létales médianes (CL ₅₀) des nanoparticules chez les organismes aquatiques	38
4	Groupes majeurs des mollusques (Classes et subdivisions)	62
5	Valeurs des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer	71
6	Poids des altérations histologiques pour l'Indice moyen de l'état histopathologique	89
7	Indices moyens de l'état histopathologique des glandes digestives (Contrôle, CR : exposé aux NPs de Cr ₂ O ₃ et AL : exposé aux NPs d'Al ₂ O ₃) et poids d'altération respectifs (Wj)	107

Liste des abréviations

- **NPs** : Nanoparticules
- **GSH** : Glutathion réduit
- **GST** : Glutathion-S-Transférase
- **GPx** : Glutathion Peroxydase
- **CAT** : Catalase
- **SOD** : Superoxyde Dismutase
- **MDA** : Malondialdéhyde
- **MT** : Métallothionéines
- **AChE** : Acétylcholinestérase
- **Cr₂O₃** : Oxyde de chrome

- **Al₂O₃** : Oxyde d'aluminium
- **Hi** : Indice d'état histopathologique
- **IBR** : Integrated biomarkers response
- **CT** : Contrôle (ou groupe témoin)
- **DG** : Glande digestive
- **H&E** : Hématoxyline & Éosine (coloration)
- **GA** : Altérations glandulaires
- **GN** : Nécrose
- **BSA** : Albumine Sérique de Bovin
- **NM** : Nanomatériau
- **XRD** : Diffraction des Rayons X
- **TEM** : Microscopie Électronique à Transmission
- **SEM** : Microscopie Électronique à Balayage
- **EDX** : Analyse par Énergie Dispersive des Rayons X
- **UV-Vis** : Spectroscopie Ultraviolet-Visible
- **DLS** : Diffusion de la Lumière Dynamique
- **AuNP** : Nanoparticules d'or (Gold Nanoparticles)
- **AgNP** : Nanoparticules d'argent (Silver Nanoparticles)
- **ZnO NP** : Nanoparticules d'oxyde de zinc
- **TiO₂ NP** : Nanoparticules de dioxyde de titane
- **Fe₃O₄ NP** : Nanoparticules de magnétite (Oxyde de fer(III))
- **SiO₂ NP** : Nanoparticules de silice
- **CdSe NP** : Nanoparticules de séléniure de cadmium (Quantum dots)
- **CNT** : Nanotubes de carbone

- **QDs** : Quantum Dots (Points quantiques)
- **Dendrimères** : Polymères branchés nanométriques
- **Fullerènes** : Nanoparticules de carbone en forme de cage
- **Liposomes** : Vésicules lipidiques
- **Micelles** : Agrégats moléculaires amphiphiles
- **Polymères** : Nanoparticules polymériques
- **ACP** : Analyse en Composantes Principales

Introduction

Introduction

La nanotechnologie a gagné en importance au cours des dernières années et continue de croître, portée par un développement exponentiel et des applications dans de nombreux secteurs (Abdel-Latif et al., 2020). Elle concerne principalement les nanomatériaux manufacturés, ou nanoparticules (NPs), définis selon la recommandation de la Commission Européenne comme des particules présentant au moins une dimension comprise entre 1 et 100 nm (Commission Européenne, 2011).

Les progrès continus dans ce domaine sont directement liés à l'utilisation massive des NPs dans divers secteurs : médical, biomédical, technologique, chimique, alimentaire, mais aussi en remédiation environnementale, cosmétique, construction et textile (Sánchez et al., 2011 ; Hu et Gao, 2010 ; Hou et al., 2019 ; Nho, 2020).

La taille du marché mondial des nanoparticules métalliques (Me-NPs) a été estimée à 2,4 milliards USD en 2021, avec une projection à 4,2 milliards USD d'ici 2026, correspondant à un taux de croissance annuel de 11,5 % (Focus on Catalysts, 2023).

Ces données soulignent l'ampleur des quantités de NPs utilisées et potentiellement relarguées dans l'environnement, pouvant atteindre des concentrations élevées et induire des effets toxiques chez les organismes vivants, notamment aquatiques et marins (Handy et al., 2008 ; Kahru et Dubourguie, 2010 ; Bour et al., 2015 ; Corsi et al., 2020).

L'intérêt porté aux NPs est principalement dû à leurs caractéristiques uniques et avantageuses, principalement absentes chez les métaux lourds, par exemple, leur grande surface spécifique, leur petite taille, leurs propriétés optiques et électriques, et d'autres (Shi et al., 2013 ; Nasri et al., 2022). En revanche, ces mêmes propriétés favorables dépassent leur capacité à interagir et à pénétrer les organismes vivants, induisant ainsi des effets potentiellement nocifs (Garcés et al., 2021 ; Dube et Okuthe, 2023).

L'écosystème aquatique est le principal récepteur des nanoparticules (NPs) rejetées dans l'environnement (Buffet et al., 2011 ; Minetto et al., 2014). L'augmentation continue de leur usage implique une accumulation progressive dans les milieux aquatiques (Shaw et Handy, 2011 ; Gottschalk et al., 2013 ; Rocha et al., 2015). Par exemple, la libération significative de NPs de TiO₂ dans les systèmes aquatiques a été démontrée, en lien direct avec leur usage industriel.

Les préoccupations liées à la toxicité potentielle des nanoparticules (NPs) ont fortement émergé ces dernières années, en raison de leur accumulation dans les milieux aquatiques et des effets néfastes qu'elles peuvent induire (Handy et al., 2008 ; Quik et al., 2011). En réponse, de nombreuses études écotoxicologiques ont mis en évidence des effets toxiques, *in vivo* et *in vitro*, des NPs sur différentes espèces aquatiques (Ray et al., 2011 ; Ali et Ali, 2015 ; Ates et al., 2016 ; Nelson et al., 2018).

Cependant, la majorité des études se sont concentrées sur les organismes d'eau douce, tandis que les espèces marines ont reçu relativement peu d'attention (Canesi et al., 2010 ; Minetto et al., 2016). Les mécanismes de toxicité des NPs et leurs voies d'absorption restent encore mal élucidés. Les effets nocifs rapportés sont majoritairement associés à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et à l'induction d'un stress oxydatif, par deux mécanismes principaux :i) la libération d'ions, intra- ou extracellulaire, à partir des NPs ;ii) l'interaction directe entre la taille des NPs et les membranes cellulaires, entraînant la génération d'ERO (Yung et al., 2014 ; Peng et al., 2017).

L'échec des mécanismes de défense intracellulaires sous un état prolongé de stress oxydatif pourrait conduire à l'altération des protéines cellulaires, des lipides, de l'ADN et des organites (Medici et al., 2021). De plus, la formation de bio-corona entre les NPs et les protéines, facilitant ainsi l'internalisation des NPs, est considérée comme une voie d'absorption potentielle, en plus d'autres voies comme l'endocytose médiée par clathrine et cavéoline, la phagocytose et la macropinocytose (Khan et al., 2015 ; Deng et Gao, 2016 ; Canesi et al., 2017).

Les nanoparticules (NPs) sont considérées comme des contaminants émergents dans les écosystèmes marins. Leur présence dans les eaux côtières et profondes résulte de multiples sources, et peut compromettre l'intégrité des espèces et des habitats marins (Roma et al., 2020). Parmi les principales sources de libération figurent les peintures antisalissures, les cosmétiques, les produits de soins personnels, ainsi que les eaux usées issues des stations de traitement (Matranga et Corsi, 2012).

La toxicité et le devenir environnemental des NPs en milieu marin dépendent étroitement de leur comportement dans la colonne d'eau. Dans ce milieu, les NPs subissent des transformations complexes : dissolution partielle, agrégation, agglomération, et sédimentation. Leur interaction avec la matière organique naturelle en suspension favorise la formation d'agglomérats, ce qui peut réduire leur biodisponibilité ou, au contraire, favoriser la libération d'ions métalliques. La sédimentation constitue souvent l'étape finale du devenir des NPs, entraînant leur accumulation dans les sédiments, avec un impact direct sur les espèces benthiques ou inféodées aux substrats (Rocha et al., 2015 ; Vale et al., 2016 ; Turan et al., 2019).

Le comportement des NPs dans les environnements marins varie selon leur nature physico-chimique (taille, charge de surface, composition chimique), mais aussi selon les conditions environnementales telles que le pH, la température ou la force ionique.

Malgré l'augmentation rapide de la production et de la dispersion des NPs dans le milieu marin, les connaissances sur leur toxicité, leur biodisponibilité et leur devenir environnemental restent limitées. Cette lacune constitue un enjeu majeur pour la recherche en écotoxicologie marine (Blasco et al., 2015). Par exemple, Koehler et al. (2008) ont évalué la toxicité du dioxyde de silicium (SiO_2), issu de la laine de verre, chez la moule *Mytilus edulis*. Les auteurs ont observé une accumulation des NPs dans les mitochondries et les lysosomes, accompagnée d'une altération de la stabilité membranaire lysosomale, d'apoptose, et de stress oxydatif.

Le chrome (Cr) est reconnu comme un polluant métallique potentiel dans l'environnement. Il peut exister sous plusieurs états d'oxydation, principalement sous forme trivalente (Cr(III), Cr₂O₃) et hexavalente (Cr(VI)) (Sharma et al., 2022). Les nanoparticules de Cr₂O₃ sont largement utilisées dans divers secteurs industriels, notamment dans les pigments verts, la catalyse, les capteurs, les dispositifs piézoélectriques, ainsi que dans le domaine biomédical pour leurs propriétés anticancéreuses et antibactériennes (Ghotekar et al., 2021).

Plusieurs études ont mis en évidence les effets toxiques associés à l'exposition aux NPs de Cr₂O₃, incluant le stress oxydatif, la génotoxicité, la cytotoxicité et des altérations histologiques chez le rat (Singh et al., 2016 ; Fatima et Ahmad, 2019), la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'internalisation des NPs dans des algues vertes et des bactéries (Costa et al., 2015), ainsi que l'induction de l'apoptose, des dommages à l'ADN et un déséquilibre du système antioxydant in vitro (Horie et al., 2013 ; Alarifi et al., 2016). Des effets toxiques aigus ont également été rapportés chez les poissons et les daphnies (Tavares et al., 2014 ; Kanwal et al., 2019).

Cependant, à ce jour, la littérature ne fournit aucune donnée sur la toxicité potentielle des NPs de Cr₂O₃ chez les organismes marins. À notre connaissance, aucune étude n'a encore été menée dans ce contexte.

Les nanoparticules (NPs) d'oxyde d'aluminium (Al₂O₃) ont suscité un fort intérêt au cours de la dernière décennie en raison de leurs propriétés avantageuses, telles que la résistance à l'abrasion, les caractéristiques diélectriques, l'inertie chimique et une haute résistance mécanique (Murali et al., 2018) . La production mondiale annuelle d'Al₂O₃ en nanoparticules est estimée à environ 35 000 tonnes (Murali et al., 2017), avec une part représentant environ 20 % des nanoparticules présentes dans les produits commerciaux (Chen et al., 2020). Ces NPs sont largement utilisées dans des secteurs variés, notamment médical, cosmétique, alimentaire, chimique, biologique, ainsi que dans les microélectroniques, les agents antimicrobiens et les matériaux abrasifs (Wang et al., 2014; Liu et al., 2019).

Cette large diffusion conduit inévitablement à une libération environnementale croissante, avec une accumulation attendue principalement dans les compartiments aquatiques, considérés comme puits finaux des nanoparticules (Li et al., 2016 ; Canli et al., 2018 ; Nogueira et al., 2019). Au regard de ces données, il apparaît indispensable de conduire des études écotoxicologiques approfondies visant à évaluer la nanotoxicité de ces particules.

Les NPs d'alumine (Al_2O_3) ont été considérées dans plusieurs études comme moins toxiques que d'autres nanoparticules, telles que le TiO_2 et le ZnO , du moins à faibles concentrations (Yang et al., 2012 ; Nogueira et al., 2020). Toutefois, divers effets toxiques ont été rapportés chez plusieurs organismes, notamment chez les poissons (Chen et al., 2020), les insectes (Huang et al., 2012 ; Muñoz et al., 2019), les rats (Morsy et al., 2013 ; Liu et al., 2020), les cellules in vitro (Dong et al., 2019), les bivalves (Gurkan et Gurkan, 2021) ainsi que les microalgues (Li et al., 2011). Par ailleurs, un manque d'études concernant les organismes marins est notable, et de même pour les nanoparticules de chrome, peu de données sont disponibles dans la littérature actuelle.

Les mollusques sont reconnus comme d'excellents bioindicateurs des écosystèmes aquatiques, en raison de leur rôle écologique majeur et de leur sensibilité avérée aux polluants, notamment aux nanoparticules (Abramenko et al., 2021). Par exemple, Canesi et al. (2012) ont souligné l'importance des bivalves comme groupe cible pour l'évaluation de la toxicité des nanoparticules, insistant sur l'intérêt d'utiliser les invertébrés aquatiques comme indicateurs écotoxicologiques pertinents.

Le gastéropode marin perceur *Stramonita haemastoma* (*Muricidae*), couramment appelé « Bakouma » en Algérie, a été utilisé comme bioindicateur de la toxicité des peintures antisalissures au tributylétain (TBT) et de l'incidence de l'imposex (Chiavarini et al., 2003 ; Limaverde et al., 2007 ; Rossato et al., 2014 ; El Ayari et al., 2018). Cette espèce occupe divers substrats marins durs et est fréquemment présente dans les zones subtidales côtières (Madeira et al., 2018).

Toutefois, cet escargot marin a fait l'objet de peu d'études concernant l'évaluation de la toxicité d'autres polluants, et à notre connaissance, aucune étude antérieure n'a examiné les effets des nanoparticules sur *S. haemastoma*. Dans une étude antérieure, ce Muricidae a été validé comme un indicateur pertinent de la pollution métallique côtière (Bouzahouane et al., 2018). De même, Di Bella et al. (2018) ont qualifié *S. haemastoma* d'espèce sentinelle prometteuse pour la pollution métallique. Les gastéropodes constituent des modèles écotoxicologiques appropriés en raison de leur tolérance aux conditions expérimentales en laboratoire et de leur facilité d'échantillonnage (Caixeta et al., 2020).

D'autre part, en considérant ces escargots comme des prédateurs de bivalves et la consommation humaine (Cioni et al., 2011), ils peuvent servir de modèle excellent pour l'évaluation de la toxicité des NPs.

Cette étude vise à évaluer *in vivo* la toxicité des NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 sur *S. haemastoma* en utilisant une approche multi-biomarqueurs, un examen histologique, et l'étude des relations entre biomarqueurs via l'analyse en composantes principales (ACP) et l'IBR (Integrated Biomarker Response). Deux organes ont été sélectionnés qui sont la glande digestive qui représente l'organe métabolique, et la cténidie qui représente les branchies avec le rôle respiratoire important, pour l'évaluation des effets toxiques potentielle des deux NPs notamment l'induction du stress oxydant souvent considéré comme mécanisme d'action de ces NPs, évaluer le potentiel neurotoxique et les effets histologiques et donc déterminer la présence potentielle du phénomène de translocation et de biodisponibilité de ces NPs.

Synthèse Bibliographique
Chapitre I :
Les nanoparticules

I. Les nanoparticules

Les nanoparticules (NPs) sont définies comme les particules de taille inférieure à 100 nm qui possèdent des caractéristiques physiques et chimiques propre à eux, les NPs présentent une très grande surface d'échange due au fait que la majorité des atomes qui les constituent se situent en surface (Lanone et Boczkowski, 2010 ; Leon et al., 2020).

Il existe plusieurs définitions pour le terme nanoparticule ou nanomatériau , selon l'Organisation internationale de normalisation (ISO) le terme nanomatériau est défini comme «tout matériau possédant toute dimension externe à l'échelle nanométrique ou une structure interne ou en surface à l'échelle nanométrique» ; et le terme Nanoparticule comme « nano objet dont toutes les dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et dont les longueurs du plus grand et du plus petit axe ne diffèrent pas de façon significative» . Selon les recommandations de la commission européenne 2011 un nanomatériau est défini comme n'importe quel matériau naturel formé accidentellement ou synthétisé et dont au moins 50% de ces particules sont à l'échelle nanométrique de 1 à 100 nm (Journal officiel de l'Union européenne, 2011 ; ISO, 2017 ; Shard et al., 2020).

Les caractéristiques unique et propre aux NPs sont très avantageuses et ont contribué de façon importante dans le développement des nanotechnologies et leur incorporation dans divers secteurs, La fig. 1 représente l'évolution des travaux de recherche sur les NPs. Il faut aussi noter le fait que même au sein d'un même élément naturel, la forme nanométrique de cet élément présente des caractéristiques bien spécifique, et généralement absente chez celle de sa forme microscopique (≥ 500 nm) de même nature ; c'est effectivement ce point bien précis qui a fait des NPs un champ de recherche moderne qui ne cesse de se développer (Triboulet, 2013 ; Song et al.,2016).

Les propriétés supérieures des NPs comme leur taille (Fig.2), leurs caractéristiques optiques, catalytiques, électriques, magnétiques et autres ont donné une importance et un intérêt inégalé envers eux, ceci a encouragé leur exploitation dans plusieurs aspects.

Au jour d'aujourd'hui les NPs sont importantes dans plusieurs domaines notamment le secteur Biomédical, les applications de conversion et stockage énergétique, mais aussi dans le domaine environnemental et Ecotoxicologique comme par exemple dans la bio remédiation des polluants (Dalal et Jana, 2018 ; Paris et Vallet-Regí, 2018).



Figure 1: Nombre de publication sur les nanoparticules depuis 2000 (recherche **Pub Med** le 19/12/2021).

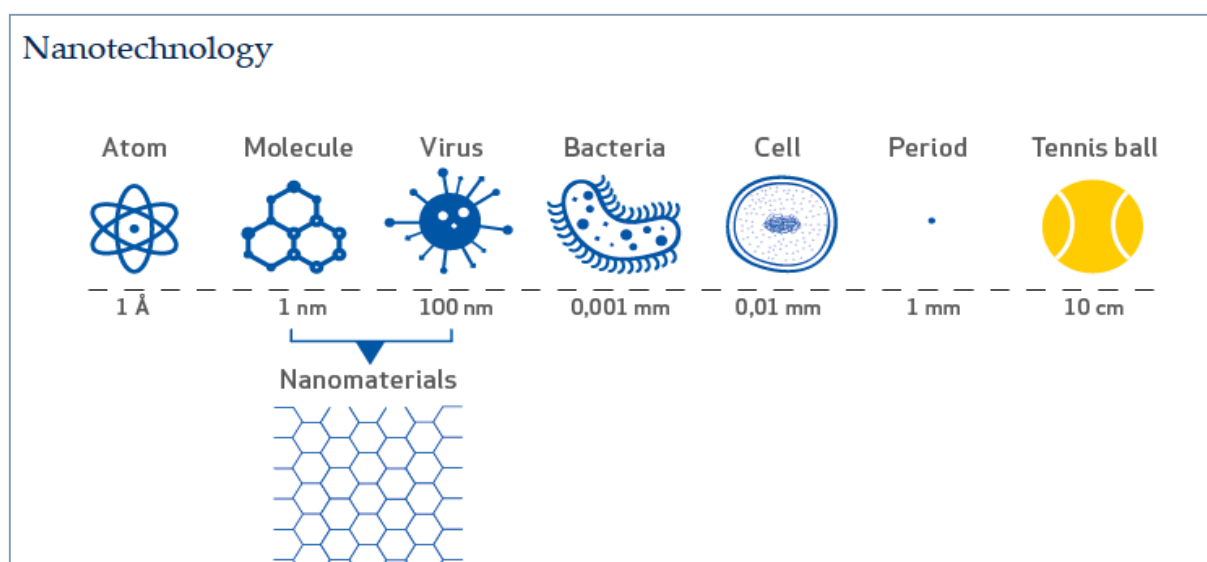


Figure 2 : Nanoparticules et l'échelle nanométrique (Agence européenne de chimie, 2016).

II. Classification des nanoparticules

Les NPs peuvent être classées selon plusieurs critères différents, leur classification peut donc être basée sur leur forme, la taille, la dimension des particules, la méthode de synthèse utilisée lors de la production des NPs, les propriétés physiques mais surtout leur nature chimique. En se basant sur la dimension et la forme des particules on peut distinguer : les NPs-sphérique, les nanoplates et les nano fibres, de plus selon la taille des particules, les NPs sont classées dans un range allant de 1 à 100 nm. D'un autre côté, la nature des éléments utilisés lors de la synthèse des NPs et aussi la méthode adaptée (traitement physique, chimique et autres) a une influence sur le type de particule synthétisée mais aussi les paramètres physico-chimiques par conséquent on distingue alors quatre majeurs types : NPs dendrométriques, polymères (Fig.3) , les NPs à base de carbone (Fig.4) et enfin les NPs métalliques et oxyde métalliques (Pal et al., 2011 ; Kshtriya et al., 2021).

1. Les nanoparticules organiques ou polymères

Ce type de NPs est considéré comme non toxique et biodégradable, les polymères sont très sensibles à la chaleur et aux radiations magnétiques, parmi les NPs organiques on trouve : les liposomes, ferritine, dendrimères et les micelles. Les caractéristiques idéales des polymères ont attiré une attention considérable dans divers secteurs et domaines d'application notamment biomédicale, ce type de nanoparticules est largement utilisé dans les différentes techniques de la délivrance médicamenteuses et celle ciblée de principe actif pour leur efficacité (Ealia et Saravanakumar, 2017).

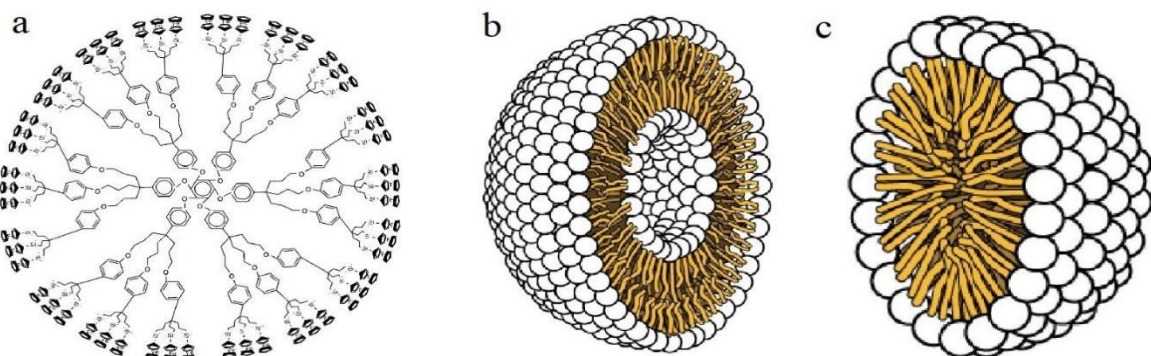


Figure 3: Les polymères : a - Dendrimères, b - Liposomes et c - micelles (Ealia et Saravanakumar, 2017).

2. Les nanoparticules à base de carbone (nanotubes de carbone)

Les nanotubes de carbone (Fig.4) ont été découverts en 1991. Ce sont des particules qui se disposent seulement en deux dimensions dans leur forme nanométrique ; ce type de nanoparticules est composé soit de plusieurs couches à la fois de graphène (multitude d'atomes de carbone répartis sur un réseau hexagonal) comme les MWNT (multiple-walled nanotube), ou d'une seule couche de graphène comme les SWNT (single-walled nanotube). Ils sont similaires à un réseau d'atome de carbone distribué de façon hexagonale ; les nanotubes de carbone possèdent des propriétés physico-chimiques très intéressantes comme leur bonne conductivité et la très grande dureté (Chuto et Riffaud, 2010 ; Bhatia, 2016).

Les C_{60} fullerènes font partie des nanotubes de carbone les plus importants à cause des diverses caractéristiques intéressantes qu'ils présentent ; de plus ils ont été étudiés de façon exhaustive comme étant des particules prometteuses dans le domaine médical de délivrance des principes actifs, et c'est le fait qu'ils peuvent être remplis par des produits chimiques dans leur cavité qui a donné tant d'intérêt envers eux. Cependant leur faible solubilité a fait que des modifications de leur surface soit nécessaire pour leurs applications multiples (Chuto et Riffaud, 2010 ; Bhatia, 2016).

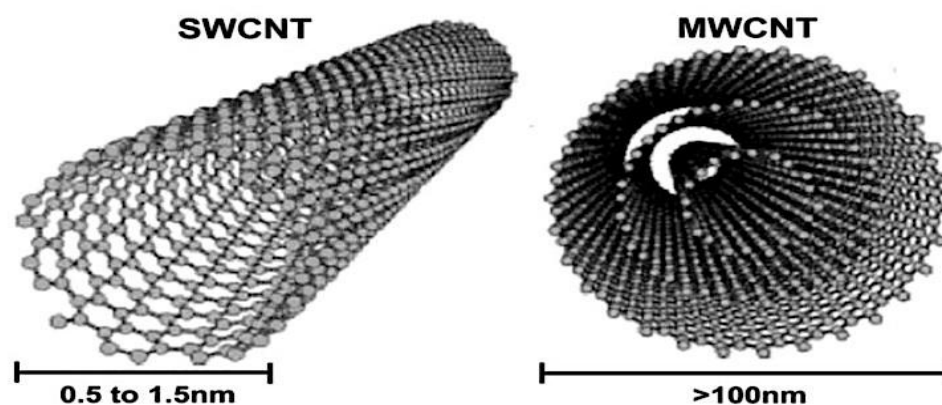


Figure 4: Représentation schématique des nanotubes de carbone (Ribeiro et al., 2017).

3. Les nanoparticules métalliques et oxyde métalliques

Les nanoparticules métalliques possèdent des propriétés et des caractéristiques propre et absente chez les autres types de particules dont certains les suivants : une charge à la surface, une petite taille, des structures variées notamment cristalline et amorphe, des formes multiples comme la forme sphérique, tétragonal et cylindrique en plus de leur forte résistance à la corrosion, ceci a incité leur utilisation dans les domaines biomédical et des technologies électroniques.

Ces NPs sont synthétisés à partir des métaux par plusieurs méthodes dont certaines sont constructives et autres destructives, d'un autre côté les oxydes métalliques comme l'oxyde de fer et l'oxyde de titane sont synthétisés pour améliorer et renforcer les propriétés trouvées dans leur élément métallique respectif (Singh, 2016 ; Ijaz et al., 2020).

Les NPs métalliques sont en majorité non biodégradables et présentent une forte rigidité, par ailleurs certains éléments de ce groupe se distinguent par leur bonne biocompatibilité ; d'un autre côté ces particules peuvent être synthétisées dans des formes et structures très diverses et logiquement Les caractéristiques que possèdent ces NPs peuvent être modifiées et surtout améliorées, les NPs métalliques sont même utilisées en associant plusieurs éléments métalliques nanométriques ce qui représente un sérieux avantage, le tableau 1 représente les divers types majauers des NPs métalliques (El-Sayed and Kamel, 2020).

Ce genre de NPs est synthétisé par trois approches différentes soit par méthodes chimiques, méthodes physiques ou méthodes biologiques ; avec bien sûr pour chaque méthode des avantages et des défauts (Jeevanandam et al., 2016).

Tableau 1: Quelques types de nanoparticules métalliques et oxydes métalliques
(Zhang et al., 2008 ; Dijaz et al., 2014).

Nanoparticules métalliques	Oxydes métalliques
<ul style="list-style-type: none"> • Plomb (Pb) • Argent (Ag) • Fer (Fe) • Cadmium (Cd) • Aluminium (Al) 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxyde de Fer (Fe₂O₃) • Dioxyde de Titane (TiO₂) • Oxyde d'argent (Ag₂O) • Oxyde de Zinc (ZnO) • Dioxyde de Cérium (CeO₂)

4. Les points quantiques ou (Quantum Dots)

Les Quantum Dots (QDs) sont des particules très fines de diamètre allant de 2 à 10 nm, les QDs sont des semi-conducteurs aux propriétés supérieures, il existe une grande variété de ces particules et généralement ils sont constitués de plusieurs atome des éléments du groupe III à VI (Se, Zn, Te et autres) et III à V comme par exemple l'Indium (In) du tableau périodique. Les QDs possèdent des propriétés de fluorescences très intéressantes comme leur stable photo-fluorescence et les capacités à émettre plusieurs couleurs, ces caractéristiques ont influencé l'exploitation des points quantiques dans divers secteurs. Parmi les champs auxquelles ces particules ont été extrêmement utiles on trouve l'imagerie médicale et les capteurs spécifiques au principe actif tel que l'ibuprofène ; les Quantum Dots les plus importants et les plus étudié sont celle à base du cadmium (Cd) constitué principalement des CdSe, il existe également d'autre genre à basse de zinc (Zn) comme les ZnS (Bharti et al., 2019 ; Yetisgin et al., 2020).

Malgré les vastes propriétés uniques, les Quantum Dots sont considérés comme très toxiques et peuvent constituer un danger réel pour la santé publique mais aussi un sérieux problème pour leurs applications médicale dans le futur (Drbohlavova et al., 2009). La Fig. 5 et la Fig.6 représentent la classification des nanoparticules selon la nature chimique et physique.

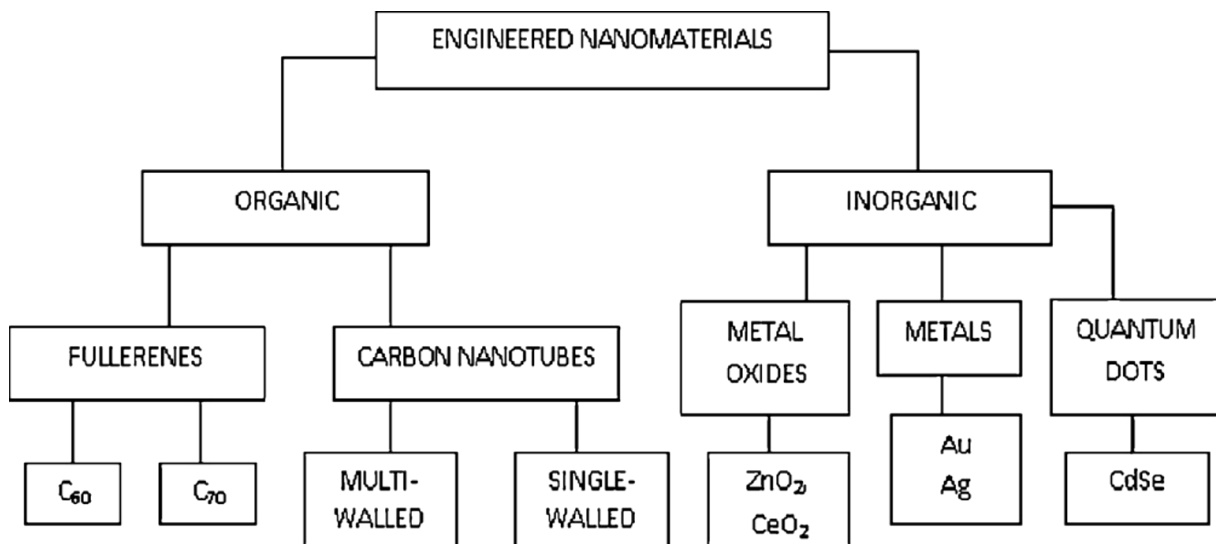


Figure 5: Classification des nanoparticules selon la nature chimique et physique (Peralta-Videa et al., 2011).

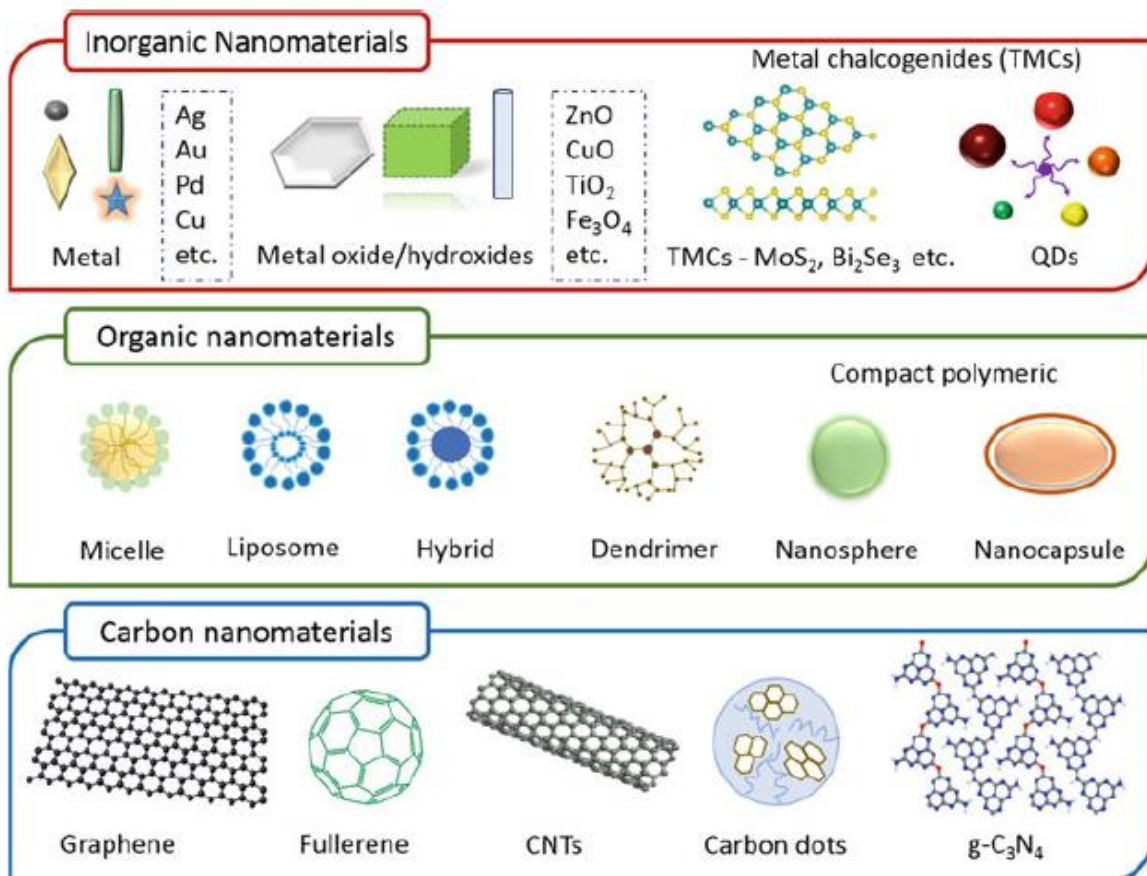


Figure 6: Classification des nanoparticules selon la nature chimique (Kumar et Ray, 2018).

III. Source et origine des nanoparticules

Les nanoparticules constituent un éventail assez large et très divers de particules de fait par les différentes propriétés, formes et structures dans les quelle ils peuvent se présenter ; ces nano-objets proviennent de deux sources principales l'une naturelle et l'autre anthropique, l'origine des NPs peut ainsi être un critère de classification des NPs en deux catégories selon la source d'émission dans l'environnement :

1. Les NPs d'origine naturelle

Divers phénomènes et processus naturels peuvent intervenir dans la formation et l'émission des nanoparticules, par ailleurs la sphère terrestre (lithosphère, atmosphère et biosphère) contient multiple genre de NPs formées naturellement et pouvant se trouver dans les rivières, les océans, les rocher, les sols et autres (Jeevanandam et al., 2018).

Plusieurs sources naturelles causent l'émission des NPs notamment les éruptions volcaniques, tempête de sable, poussière cosmique, les feux de forêt etc. ; certains NPs sont aussi d'origine biologique telle que l'ADN (2.5nm), certain virus (10-30nm) et bactéries (IRSST., 2006 ; Strambeanu et al., 2015).

Parmi les NPs d'origine naturelle on trouve les particules de carbone (le charbon) et nanotubes de carbone tel que les fullerènes, certains NPs inorganique notamment les oxydes métalliques comme l'oxyde de fer, et plusieurs d'autres comme les NPs d'argile (Nowack et Bucheli, 2007). Quelques types de métaux et oxyde métallique à la taille nanométrique sont formés par divers processus naturelle complexes comme par exemple l'oxyde d'aluminium Al_2O_3 , l'oxyde de silice SiO_2 , l'oxyde de manganèse MnO_2 , les sulfites de fer FeS (Sharma et al., 2015).

Les NPs d'origine naturelle sont généralement hétérogène et ont une taille similaire pour chaque genre, c'est le cas des poussières atmosphériques qui peuvent contenir des millions de tonne de particules naturellement formées qui sont transportées par l'atmosphère sur de très grandes distances et être retenues pendant plusieurs jours dans l'air (Smita et al., 2012).

2. Les NPs de source anthropique

Les nanoparticules sont aussi originaires des multiples activités humaines qui ont pour résultats dans la plupart des cas l'émission de ces éléments dans l'environnement et de façon assez alarmante, il est possible de diviser les NPs de source anthropique en deux fractions différentes : ceux produits de façon accidentelle ou involontaire et d'un autre cote les particules nanométriques produites de façon voulue et intentionnelle (Boczkowski et Lanone, 2010 ; Gigault, 2011).

Les procédés de combustion des énergies fossiles comme les carburants sont des sources accidentelles d'émission des différents types de NPs dans l'environnement dont les causes majeures sont les trafics routiers, les émissions des bateaux et des avions, les constructions, les fuites de carburants et les déversements accidentels, l'utilisation des pneus de voitures et la pollution atmosphérique (Kumar et Al-Dabbous, 2016 ; Nam et Lead, 2016).

D'une autre part plusieurs procédés de multiples industries comme l'industrie chimique des nanomatériaux sont des sources intentionnelles de production des NPs, les NPs métalliques, les polymères et les nanotubes de carbone sont conçues avec des propriétés modifiables et avantageuses à diverses autres applications, ils couvrent un très large nombre de substances comme les NPs d'Or (Au_2), les NPs d'argent (Ag_2), oxyde de zinc (ZnO) et dioxyde de titane (TiO_2).

A ce jour les importantes applications des NPs ont augmenté du fait de leurs productions volontaires en vue d'obtenir les propriétés les mieux adaptées aux applications commerciales multiples tel que l'utilisation des NPs d'argent en tant que composé dans les carburants et cosmétique, le dioxyde de titane est utilisé dans le secteur biomédical. Les NPs de cérium (CeO_2) sont utilisées comme polisseurs de verre et plusieurs autres applications ; les caractéristiques que possèdent les nanomatériaux et l'impact économique dans les industries différentes ont causé l'augmentation au fur et à mesure des années de leur synthèse (Buzea et al., 2007 ; Baker et al., 2014).

La majorité de ces NPs anthropiques sont produites depuis le dix-neuvième siècle et des quantités très importantes ont été déversées vers l'environnement, ces particules sont considérées comme nocives pour la santé et peuvent avoir des effets graves notamment cancérigènes, tératogènes et mutagènes, comme indiqué précédemment, plusieurs industries sont concernées, notamment les exploitations industrielles de l'or et d'autres éléments. (Strambeanu et al., 2015).

IV. Application des Nanoparticules

Compte tenu de multiples propriétés physico-chimiques supérieures dans plusieurs aspects, la production des différentes nanoparticules synthétiques n'ont cessé d'augmenter au fil des années et par conséquent une augmentation massive de leurs utilisations dans nombreux domaines (Zheng et al., 2016). Les nanomatériaux manufacturés sont produits afin de présenter des caractéristiques spécifiques qui répondent aux critères nécessaires aux usages pour lesquels ils ont été créés. (Handy et al., 2008).

Les chercheurs scientifiques ont exploité les comportements chimique, magnétique, optique et électrique et ont grandement bénéficié des caractéristiques extraordinaires qu'offre les NPs par rapport aux autres éléments de même nature mais non-nanométrique qui ne présentent pas autant d'avantage. Ce qui a ouvert les portes d'un développement technologique dans plusieurs secteurs, parmi les applications les plus prometteuses des NPs on trouve le domaine médical et biomédical où divers possibles usages ont été réussis avec une efficacité inégale, et autres comme l'industrie variée et les technologies modernes telles que les fabrications électroniques (Prajitha et al., 2019).

Les applications des NPs sont très multiples, on peut distinguer certains usages dans lesquels les NPs ont gagné une place importante en tant qu'élément indispensable, durant ces dernières années les nanotechnologies représentent : dans le secteur médical et santé 18 %, les communications, l'environnement, et autres technologies 8-9 % pour chacun, les constructions, produits cosmétiques et industries agroalimentaire 1-6 %, l'industrie chimique aussi représente une grande part des applications des NPs avec 12%. Une augmentation des recherches et techniques d'incorporation dans la bio remédiation et dépollution a vu le jour avec des avis très prometteurs (Sanchez et al., 2011).

Les nanotechnologies environnementales ont obtenu un grand intérêt puisqu'elles permettent l'étude des interactions entre l'environnement et les NPs pour le but ultime de l'exploitation de ces dernières avec efficacité et le minimum possible d'effet toxique. Les NPs sont utilisées dans le traitement des eaux et de l'air, dans la détection des polluants, dans le secteur des technologies énergétique tel que les carburants et les matériaux thermoélectriques en plus de la capture et séquestration du carbone dans les procédés industriels (Louie et al., 2016).

Les nanotechnologies et leurs usages dans le domaine de l'environnement rentrent en majorité dans ces trois classes des activités environnementales suivantes :

- La remédiation environnementale contre les polluants.
- Les produits durable et respectueux de l'environnement.
- Les capteurs pour les différentes substances chimiques et polluantes (Khan et al., 2019).

Les NPs sont également utilisées dans un domaine très important et ont récolté beaucoup de succès dans leurs applications médicales et biomédicales innombrables. Au sein des applications cliniques des NPs, l'administration ciblée des médicaments ou la délivrance médicamenteuse (Drugs targeting) et l'imagerie médicale sont les plus exploitées. Les propriétés supra magnétiques ont favorisé l'usage en radiographie comme par exemple l'utilisation de l'oxyde de fer (FeO) dans l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

D'un autre côté les usages des NPs comme système de transport et vecteurs de médicament surtout en oncologie et due principalement aux propriétés pharmacocinétique unique, ce qui peut permettre un ciblage direct des tumeurs par les médicaments transportés. Il faut noter que plusieurs formes de nanoparticules sont utilisées comme système de transport ciblée de médicaments qui sont les suivants : - les polymères, les lysosomes et micelles, les NPs inorganique comme l'argent, l'or et le titanium. (Gill et al., 2007 ; Calugaru et al., 2015).

Parmi les avantages de la nano-médecine, le fait que la distribution peut être contrôlée par la modification sur les NPs en surface ou de la taille et plusieurs autres procédures ceci a fait que ces applications peuvent assurées une efficacité surtout dans les traitements anti-tumoraux des cancers (Arvizo et al., 2012 ; Thassu et al., 2013).

Généralement les nano-porteurs de médicaments sont destinés à résoudre un très grand problème qui est le transport des médicaments fortement hydrophobe qui représente un vrai challenge pour les chercheurs, de plus les nano-porteurs de médicaments peuvent être très efficace dans la délivrance des principes actifs d'origine protéique et lipidique (Torchilin, 2006 ; Gill et al., 2007 ; Arvizo et al., 2012 ; Thassu et al., 2013 ; Calugaru et al., 2015).

Le dioxyde de zirconium ZrO_2 , l'oxyde de cérium CeO_2 , l'oxyde de titane TiO_2 et l'oxyde d'aluminium Al_2O_3 ont été et sont encore employés dans le domaine biomédical en tant qu'implants dentaires de toutes formes mais aussi dans l'orthopédie. Leurs applications dans les matériaux dentaires peuvent être seules ou sous forme de mixture de plusieurs nanoparticules à la fois un exemple est la Zirconie stabilisée à l'yttrium (TZP – 3Y), la zirconie tétragonique (TZP-CE) stabilisée avec le dioxyde de cérium et le TZP/ Al_2O_3 qui ont été utilisés comme tous types d'implants dentaires.

Des matériaux similaires sont aussi appliqués dans l'orthopédie notamment dans l'arthroplastie avec l'utilisation d'implant de remplacement d'os dans les cas de fracture ou autre mais aussi d'autres types (Fig. 7A). Toutes les propriétés favorables comme la biocompatibilité, la stimulation de l'ostéogénèse dans les implants à base de NPs et la rigidité ont suscité les applications des NPs en orthopédie et en chirurgie dentaire. D'un autre côté, un problème fréquent avec ces implants est les infections microbiennes. Cela a renforcé les études visant à exploiter les NPs, en raison de leurs caractéristiques antibactériennes, comme celles du TiO_2 , par exemple, avec des matériaux composés de NPs ayant montré une certaine efficacité dans la résolution de ce problème

Cependant il faut bien noter que beaucoup d'avis concernant les dangers et la non sureté de leurs applications dans ce domaine ont émergé et plusieurs types de ces implants ont été soit retirés ou modifiés pour réduire les échecs identifiés lors des applications (Streicher et al., 2007 ; Smith et al., 2018 ; Li et al., 2020 ; Yuehong-Li et al., 2020).

Le monde des productions agro-alimentaire aussi a été intégré par les différentes NPs qui sont utilisées pour plusieurs objectifs et catégories ; les NPs sont employées comme additifs alimentaires de tous genres qui se divisent en plusieurs catégories comme les additifs afin d'améliorer la fluidité des aliments en poudre (Fig.7B), ils sont communément appelés antiagglomérants et ils sont employés dans le sucre en poudre et sel par exemple.

Dans une autre catégorie de NPs employées comme additif alimentaire on retrouve les pigments comme les colorants alimentaires, par ailleurs dans les applications pour enrichir les

aliments c.-à-d. l'incorporation d'éléments liposoluble comme les lipides directement dans les aliments, un exemple de cette stratégie est l'incorporation des Omega-3, des vitamines et le bêta-carotène par encapsulation dans des micelles nanométriques. Parmi les antiagglomérants on peut distinguer les suivantes : E551 (oxydes de silicium (SiO_2)) et E559 (silicate d'aluminium). En tant que colorant les suivants : E172i, E172ii et E172iii (oxyde de fer noir, jaune et rouge, respectivement), E171 qui est l'oxyde de titane (TiO_2) (Houdeau et al., 2018).

Il faut aussi noter que d'autres NPs comme le zinc, cuivre et surtout l'argent sont utilisés dans une autre classe d'additif alimentaire tel que les emballages en textiles ou papier. Ces éléments sont connus pour les effets biocides (antifongique et antibactérien) due principalement à leurs capacités de libérer les ions et générer les radicaux libres. Les NPs les plus connus pour ce type d'effets sont les NPs d'argent avec la libération d'ion Ag^+ progressivement. L'objectif final de leurs utilisations est de prolonger la conservation des aliments emballés.

Cependant des craintes sur la toxicité et danger potentiel sur la santé humaine se sont fait entendre et ces NPs sont concernées par plusieurs études toxicologiques avec la question la plus importante qui est : « est-ce que les NPs peuvent migrer vers l'aliment ... » avec en plus des grandes difficultés d'évaluation des effets potentiellement toxiques de ces éléments. Sans oublier que la réglementation concernant ce type d'application n'est pas suffisamment développée (Marano et Guadagnini, 2011).

Les nanoparticules par leurs propriétés idéales ont montré une certaine capacité dans les usages au sein de l'agriculture avec des techniques très variées. Les NPs sont employées dans la fertilisation des sols par plusieurs méthodes différentes soit comme nano-fertiliseur brute directement ou par exemple comme des matériaux hôtes à d'autres fertilisateurs et donc comme transporteur. Par ailleurs les NPs sont utilisées pour la prévention et le traitement des différentes maladies des végétaux par les systèmes de transport cible de produits actifs. Certaines propriétés jugées très utiles comme celle photo catalytique et la fluorescence ont contribué aux usages des NPs dans le développement de capteurs, dans la remédiation des sols et la dégradation nano chimique (Siddiqui et al., 2015 ; Nasrollahzadeh et al., 2019).

Les utilisations des Nano-pesticides sont parmi les plus importantes applications des NPs dans l'agriculture, les divers avantages que présente ces éléments ont influé ces exploitations : la solubilité, la rigidité, les stabilités thermiques, la biodégradabilité dans certains cas et la forme cristalline. Un exemple des nano-pesticides est présenté dans le tableau 2, comme pour les nano-fertilisateurs dans l'usage des NPs en tant que pesticides peut être soit direct avec

les caractéristiques biocides de certains éléments ou comme système de transport cible dans les quelle d'autre produits chimiques sont incorporés dans des capsules nanométriques ces procédure permettent d'augmenter l'efficacité et diminuer les pertes (Ditta et Ibrahim, 2015 ; Thul et Sarangi, 2015 ; Nasrollahzadeh et al., 2019).

Tableau 02 : Exemple de système de transport ciblé des nano-pesticides (Thul et Sarangi, 2015)

Nanoformulations	Matériaux utilisés	Composés actifs
Herbicide	Zn–Al	2-4-dichlorophénoxyacétate
Pesticide	SiO ₂	Validamycine
Pesticide	Polymère	Bifenthrin
Insecticide	TiO ₂ /Ag	Diméthomorphe
Pesticide	PEG	Carbofuran
Insecticide	TiO ₂	Avermectines
Insecticide	Chitosane	Etofenprox

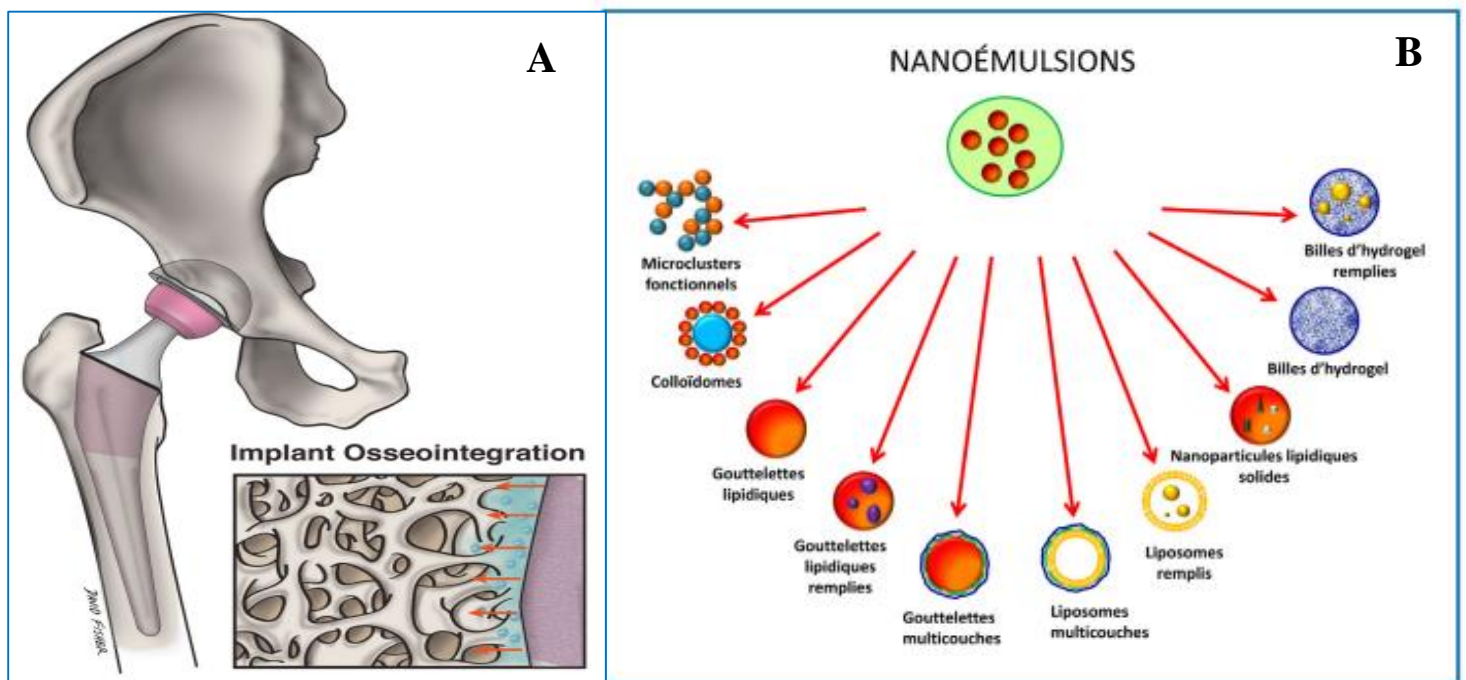


Figure 7 : Usages des nanoparticules, - A : implant orthopédique à base de NPs - B : types de NPs employées dans les procédés alimentaires (Marano et Guadagnini, 2011).

Les NPs sont utilisées dans nombreuses autres industries et produits de consommation comme représenté dans la Fig. 8, ils ont suscité l'attention et l'intérêt de plusieurs secteurs en se basant sur les structures spécifiques et requises à chaque type d'usage ; les NPs sont adaptées dans les domaines énergétique, optique, catalytique, les industries chimiques et l'aérospatiale, soin et santé, semi-conducteurs. Toutes ces industries emploient les NPs soit dans la forme brute, incorporée dans des liquides ou des éléments solides ; un exemple bien spécifique est celui de l'implication des points quantiques dans la fabrication des Diodes électroluminescentes (connu en tant que LED), aussi l'exploitation des capacités antibactériennes des NPs d'Ag dans les vêtements, les NPs ZnO₂ comme revêtements pour réduire les expositions aux rayonnements UV (Lu. 2012).



Figure 8: Applications des nanoparticules dans notre quotidien (www.veillenanos.fr).

V. Nanoparticules dans l'environnement, pollution et danger potentiel au sein des écosystèmes aquatiques

L'augmentation conséquente des utilisations des nanoparticules au fur et à mesure des années au présent et sans doute dans le future proche a un impact sur l'augmentation des émissions de ces éléments dans l'environnement.

Plusieurs procédés peuvent être la cause d'émission des NPs qu'il soit stationnaire comme les émissions industrielle et automobile, le déversement d'eaux usées contenant multiple genre de NPs qui proviennent essentiellement des produits de consommation dans plusieurs domaines et plusieurs autres émissions. De plus ces éléments peuvent rejoindre l'environnement de façon directe ou indirect comme dans le cas de traitement des eaux usées avec les NPs.

Des craintes des effets néfastes potentiels à cause de l'augmentation des concentrations des NPs dans les milieux naturels (eau, sol et air) émergent avec beaucoup d'intérêt donné à l'évaluation du comportement des nanoparticules une fois libérées dans l'environnement (Biswas et Chang-Yu, 2005 ; Bundschuh et al., 2018).

Les NPs métalliques du fait de leurs applications importantes dans plusieurs produits ont suscité des craintes par rapport au danger potentiel qu'ils peuvent représenter notamment dans les écosystèmes aquatiques.

Le ZnO₂, le TiO₂, l'Ag et le CuO par exemple sont massivement utilisés avec une production moyenne annuelle de plusieurs milliers de tonnes. Par conséquence une augmentation des concentrations de ces NPs aux seins des écosystèmes aquatiques est reportée par plusieurs études ; d'autre part les craintes concernant essentiellement la capacité d'accumulation chez les espèces aquatiques sans oublier leurs effets toxiques multiple comme l'induction de stress oxydant, potentiel tératogène et effets sur l'ADN (Xu et al., 2020).

L'environnement aquatique est considéré comme étant le problème ultime concernât les polluant, dans la même idéologie les NPs aussi sont considéré comme un problème pour l'écosystème aquatique principalement à cause de la difficulté de leurs détections dans l'eau, Sédiment et les organismes en face des effets Eco toxicologique multiples reporté de ces NPs. De plus les comportements de ces éléments dans l'eau comme l'agglomération et la sédimentation sont des raisons pourquoi donnez aussi d'importance aux écosystèmes aquatiques et les interactions avec les nanoparticules (Buffet et al., 2011 ; Ali et al., 2014 ; Ramskov et al., 2015).

Le comportement des nanoparticules dans les systèmes aquatiques est très influencé par la surface (taille, forme etc...) des particules qui joue un rôle primordial dans leur devenir une fois introduits vers les milieux aquatiques à savoir la stabilité, la mobilité et l'agglomération. Dans le milieu marin les nanoparticules ont tendance à se comporter d'une manier spécifique et similaire à la majorité d'entre eux, généralement c'est l'agglomération dans les milieux marins qui est observer pour beaucoup de NPs.

La formation d'agglomération est largement favorisée par la force ionique et teneur en matière organique naturelle en suspension dans l'eau de mer ; le résultat final de cette agglomération est généralement la tendance des NPs à de sédimenter et être disposer. Il a été reporter que les NPs peuvent se comporter comme vecteur de polluants dans le milieu marine à cause de la capacité probable des NPs à absorber les autres polluants, d'un autre cote cette aspect peut favoriser l'internalisation de ces polluant dans les organismes marins due à la faciliter observer des NPs à pénétrer dans les organismes marins et autres. Des ponts très importants comme celle mentionné précédemment ont contribué à susciter l'évaluation de leurs comportements et l'écotoxicité (Kahru et Dubourguier, 2010 ; Quik et al., 2011 ; Huang et al., 2019 ; Arvidsson et al., 2020).

Les NPs peuvent subir d'autres processus de transformations dans le milieu aquatique essentiellement résumé dans la Fig. 9 ; Des transformations chimiques, physiques et biologiques. Les réactions chimiques regroupent : - la dissolution, l'oxydation et la réduction comme le processus de sulfatation ou la libération des ions en plus des réactions photochimiques. La transformation biologique regroupe essentiellement les processus de biodégradation via les microbes mais aussi les bio-modifications (Weinberg et al., 2011 ; Huang et al., 2019 ; Turan et al., 2019).

Les NPs cationique comme le ZnO_2 et l' Ag^+ font partie des particules qui subissent la dissolution et la sulfatation, ces réactions auront pour résultat de favoriser l'agglomération et l'augmentation de la toxicité de ces particules dans l'eau de mer. Ce type de réaction est considéré comme un élément déclencheur des effets toxiques de certains NPs comme ceux mentionnés en début de phrase à cause de la libération des ions et cations toxiques (Turan et al., 2019).

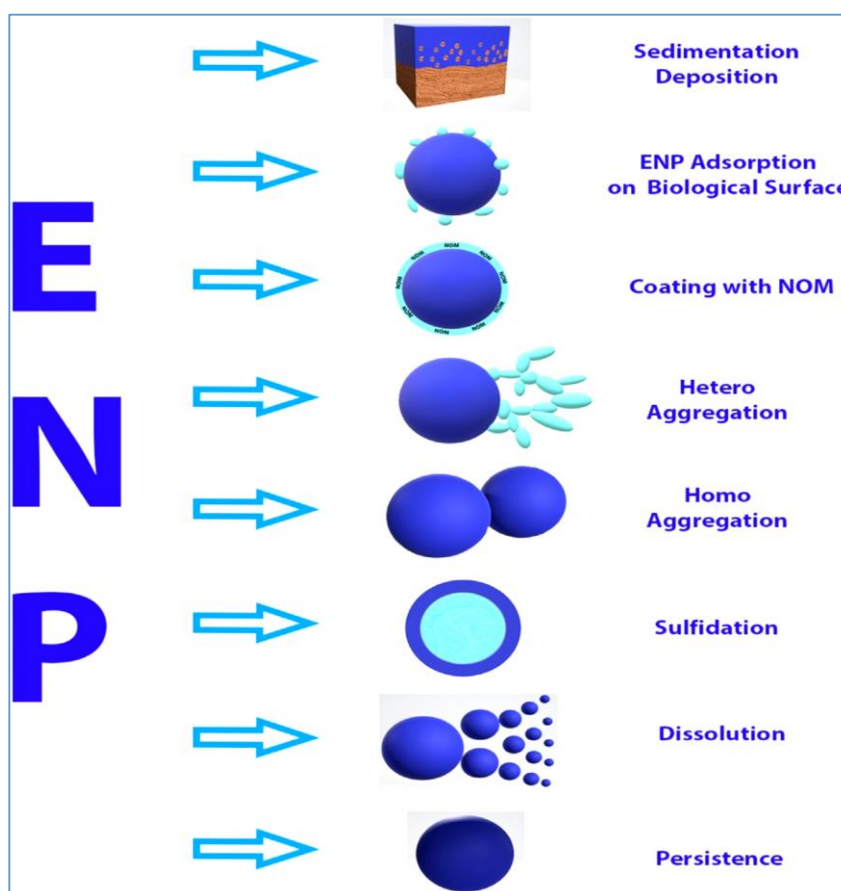


Figure 9: Transformations des nanoparticules dans le milieu marin (Turan et al., 2019).

Avec les utilisations multiples des nanoparticules, leurs existences dans les différents compartiments environnementaux semblent tout simplement inévitable ; dans l'écosystème marin plusieurs voies ou causes d'introduction des NPs peuvent être identifiées, qui sont les suivantes :

1- les produits cosmétiques qui contiennent certains types de NPs notamment le TiO_2 et le ZnO qui sont libérés directement dans l'eau après utilisation. 2- les décharges des eaux usées domestiques avec de nos jours les innombrables genres de particules nanométriques incorporées dans les produits de consommations et domestique qui peuvent se retrouver dans les eaux usées et donc rejoindre l'écosystème marin. 3- le ruissellement avec des preuves de la libération des NPs comme le TiO_2 de certaines surfaces comme les peintures et être transportées vers l'écosystème marin. 4- le déversement des déchets dans les eaux marines comme le cas des micros plastiques. 5- autre route d'entrée comme par exemple les dépôts atmosphériques et l'application des NPs dans la bio-remédiation (Zhu et al. 2016 ; González-Gálvez et al., 2017).

Plusieurs études ont été dédiées à l'évaluation de la libération des nanoparticules à partir des différents produits et textiles qui contiennent divers NPs tel que les vêtements, Des preuves de la libération des NPs contenues dans les chaussettes après leur lavage ont été indiquées et observées, c'est le cas des NPs d'Ag. Le résultat de ces libérations sera probablement l'émission dans l'écosystème marin ce qui va considérablement augmenter les concentrations des NPs dans ces compartiments (Krzyżewska et al., 2009).

Les nanoparticules une fois en contact avec le compartiment marin ont un comportement assez distingué, les NPs d'origines métalliques ont tendance à former des agrégats et soit libérer des ions mais aussi être déposées dans le fond par un phénomène appelé sédimentation. Les concentrations des NPs dans les eaux de mer sont prédites à rang de picogramme/L, Cependant, des études ont prouvé que pour les NPs les plus connues et à usage important, telles que le TiO_2 et le ZnO , Les concentrations surtout dans les sédiments peuvent atteindre les milligrammes/kg de sédiments. Les invertébrés benthiques comme les huîtres qui sont des filtreurs, palourde nourricière et les échinodermes sont potentiellement exposés aux NPs par les sédiments (Corsi et al., 2014 ; Baalousha et al., 2017).

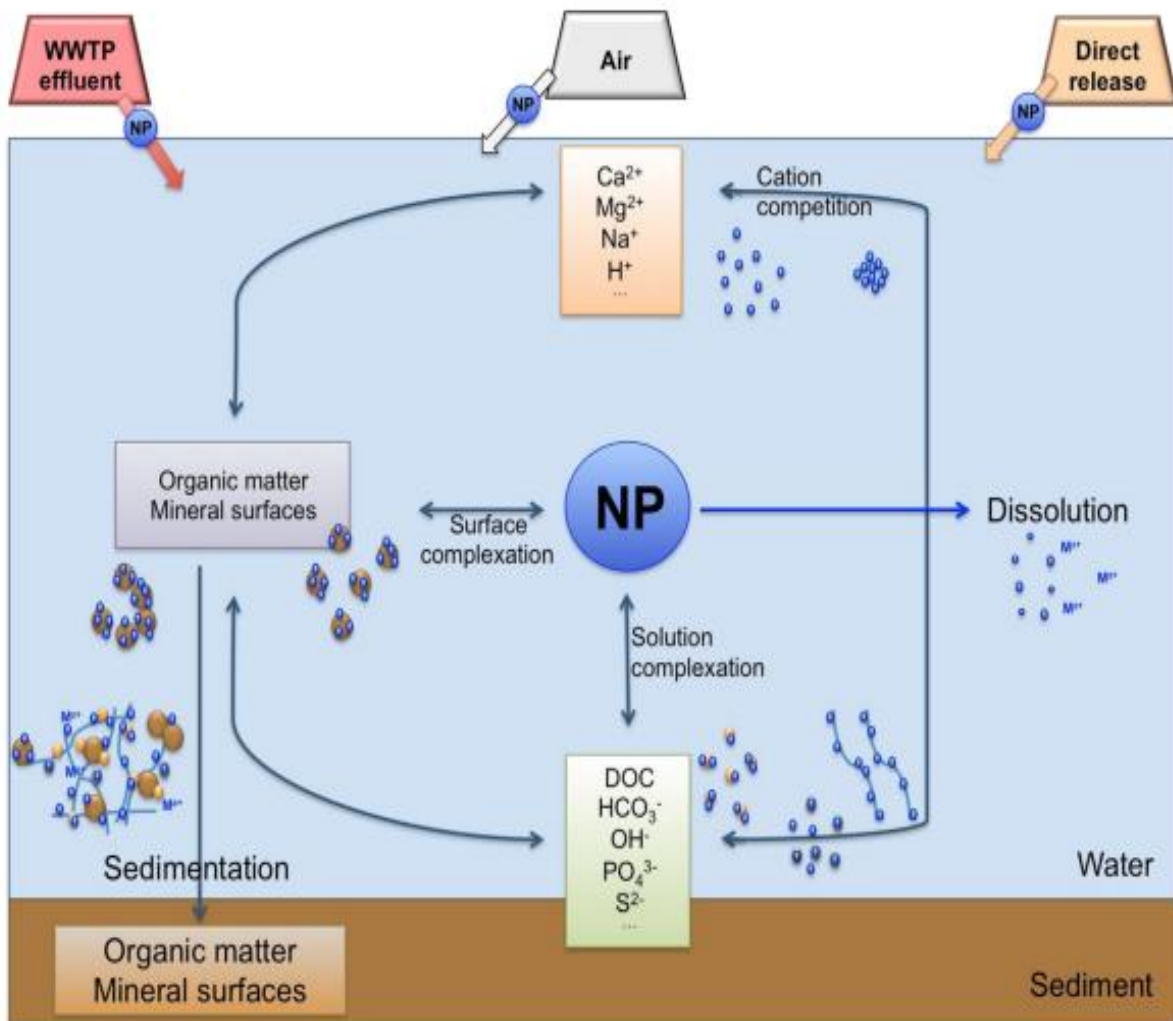


Figure 10: Comportement des nanoparticules dans le compartiment marin et leurs interactions (Val et al., 2016).

L'interaction des nanoparticules une fois dans la colonne d'eau saline avec les particules en suspension naturelle est représentée dans la Fig. 10 et Fig .11 et peut conduire à la formation de molécules sous forme colloïdale qui sont similaire à des couronnes, ce type d'interaction est largement suspecté d'être un élément favorable à l'entrée des NPs dans les organismes marins et générer des effets toxiques (Corsi et al., 2020).

L'un des points les plus importants auquel fait face les chercheurs dans le domaine des nano toxicologie est la grande difficulté de leurs caractérisations mais surtout la détections des NPs dans les divers compartiments mais spécifiquement dans le milieu aquatique. Parmi les méthodes les plus adaptées à la détection des concentrations des NPs notamment métalliques est la Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) à cause des résultats plutôt convaincante que cette technique peut donner en matière de détection des concentrations des nanoparticules dans l'eau. Il faut bien noter que les concentration réelles des NPs dans les eaux naturelles sont très difficile à établir et beaucoup de différence dans les concentrations prédites sont remarquées, les concentrations prédites dans les eaux naturelles des NPs d'Ag, CeO₂, TiO₂ et ZnO₂ varient de 1- 10 µg/L tandis que les concentrations optimales totales avoisinent les 100 µg/L. D'un autre côté elles sont plus importantes dans les sédiments de façon inévitable due aux dépôts et la persistance (Klaine et al., 2008 ; Atluri et Jensen, 2017).

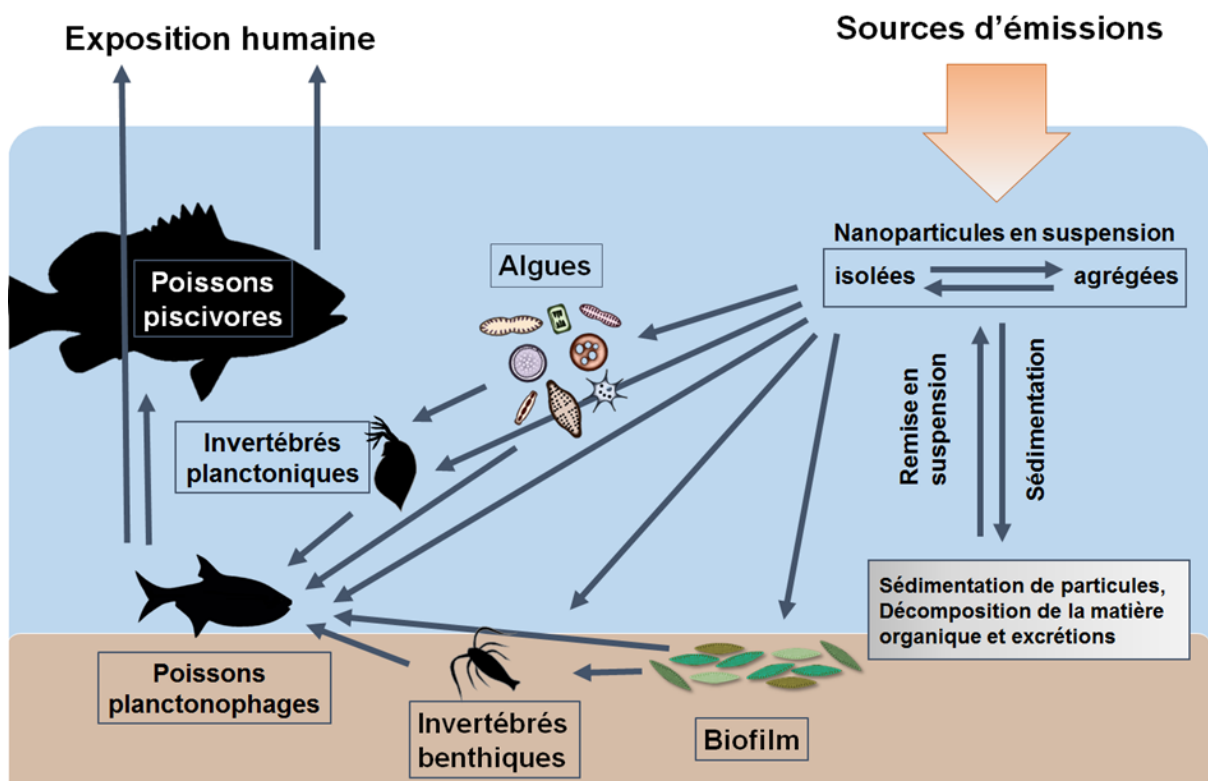


Figure 11: Biodisponibilité des NPs et interactions avec les organismes marins (Flahaut et al., 2018).

L'état d'agrégation des NPs dans les milieux marins et leur tendance soit à se sédimenter ou de libérer les ions ou même la dissolution est influencée majoritairement par les caractéristiques intrinsèques des particules : - taille, forme, structure et composition chimique. Cependant même les propriétés du milieu ont un impact considérable dans la nature des NPs une fois introduite dans la colonne d'eau tel que les

, le pH, la force ionique, la salinité et la température (Peng et al., 2017).

La charge à la surface des NPs est un élément très important aussi dans la disposition des NPs au sein de l'écosystème marin, la mesure du potentiel Zeta qui exprime la charge existante dans la surface des NPs est devenue un paramètre important dans la caractérisation des NPs surtout dans les études Ecotoxicologique. Le point essentiel à retenir pour l'impact de la charge c'est que la présence d'une négative stimule la formation d'agglomérations des NPs dans l'eau saline (exemple : le TiO_2), une charge positive au contraire favorise la stabilité des particules et permet leur présence sous forme nanométrique dans la colonne eau. L'état d'agglomération comme précédemment noté favorise la sédimentation et augmente la biodisponibilité des NPs pour les organismes benthiques. Par ailleurs une grande salinité favorise ce type d'interaction ce qui est présent dans les eaux marines donc ces comportements peuvent être expliqué comme étant le résultat de tous ces facteurs (Fig. 12) qui jouent un rôle important dans leur devenir (Wang et al., 2014 ; Corsi et al., 2021).

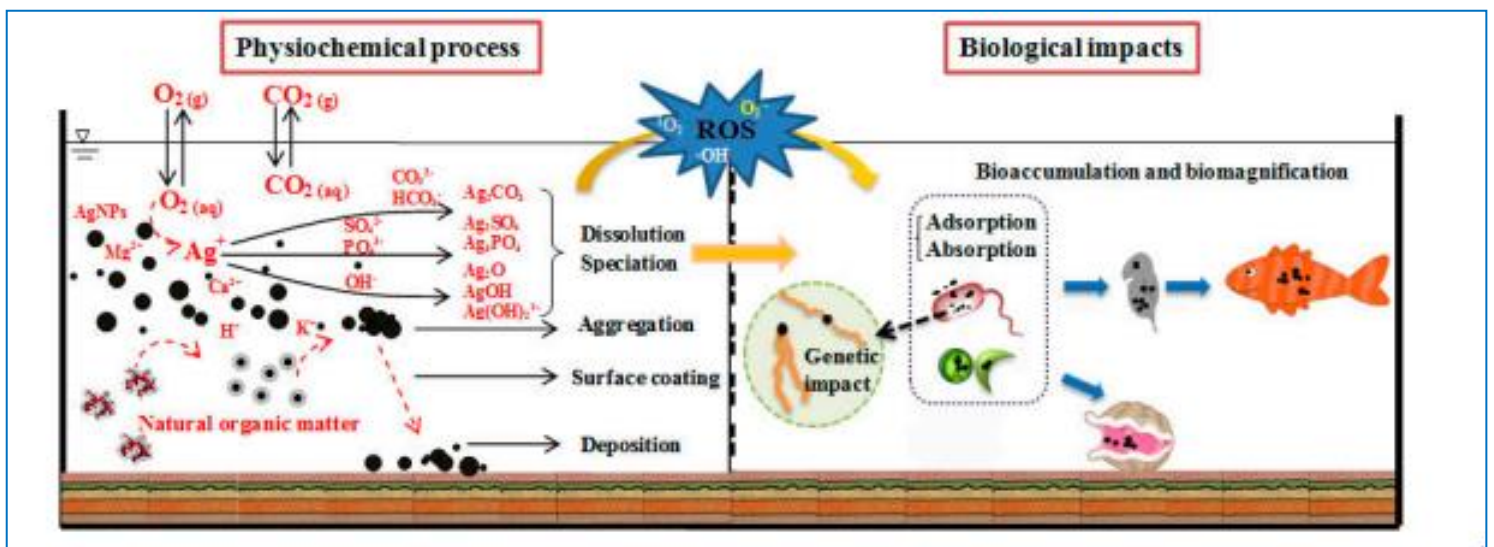


Figure 12: Impacts des nanoparticules dans le milieu marin (Peng et al., 2017).

VI. Règlementation des nanoparticules

Face aux dangers potentiels que peuvent induire les nanoparticules plusieurs systèmes d'évaluations de leurs toxicités sont mis en place et sont régulièrement améliorés. L'écotoxicologie est un élément important dans l'évaluation des effets potentiels nocifs de ces NPs ; des stratégies d'investigations de la toxicité des NPs sont mises en avant par plusieurs organisations gouvernementales et autres divers tel que la réglementation européenne REACH (règlementation d'évaluation, restriction et autorisation des produits chimiques) et l'organisation de coopération et de développement économique OECD. L'objectif est principalement de standardiser les essais toxicologiques, dans le cas des NPs des bio-essais de courte durée et d'autre chronique sont proposés avec divers organismes et modèles biologiques considérés comme indicateur. Les informations relatives à la toxicité des NPs dans l'écosystème aquatique sont considérées comme étant les plus importants et représentatifs (Crane et al., 2008 ; ECHA, 2016 ; OECD, 2021).

La réglementation en l'encontre des nanoparticules n'est pas assez développée en comparaison avec d'autres produits chimiques et polluants malgré le danger renforcé par d'innombrables travaux scientifiques. Cependant il existe certaines réglementations relatives au valeurs limites d'exposition des NPs comme par exemple ceux établis par le NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) par rapport au dioxyde de titanium avec des valeurs d'exposition limite approximative à $2,4 \text{ mg/m}^3$ dans le milieu professionnel. Comme exemple des difficultés au niveau de la législation des NPs le cas de la France avec l'absence de lois spécifique au NPs selon le rapport de l'institut français de recherche et de sécurité (ECHA, 2017 ; INRS, 2020). La Fig. 13 représente le Pictogramme d'avertissement relatif aux NPs.

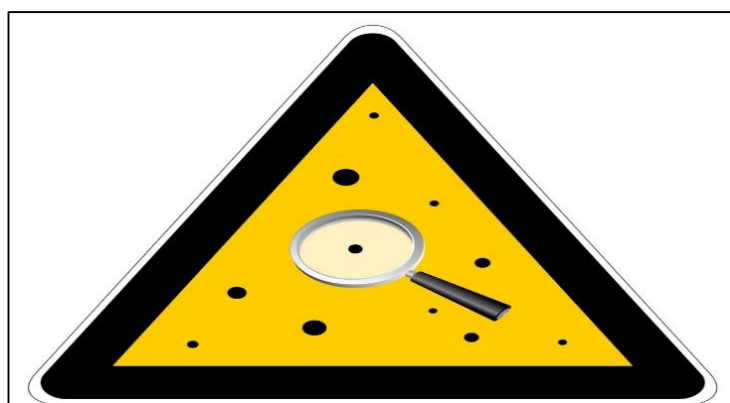


Figure 13: Pictogramme d'avertissement relatif aux nanoparticules (INRS, 2020).

L'Organisme de Normalisation National Britannique (BSI) a proposé un cadre réglementaire concernant les nanoparticules et la valeur limite d'exposition (VLE), les directives de cet organisme s'appuie principalement sur les connaissances passe des éléments de plus grande taille et de même nature que les NPs (IRSST, 2010). Avec une classification des NPs en quatre types :

- 1- Une VLE de 0,01 fibre/ml pour les nanoparticules ou nanomatériaux fibreux
- 2- Des VLE dix fois plus inférieur pour les substances CMR (cancérogènes - mutagènes – réprotoxiques)
- 3- Pour les NPs insolubles (métallique principalement) il est recommandé d'appliquer les mêmes valeurs proposées pour le dioxyde de titanium TiO_2 par le NIOSH en plus des facteurs de sécurité supérieurs.
- 4- Pour ceux soluble il est recommandé d'appliquer la moitié des VLE des éléments de même nature chimique mais de taille et dimension supérieur (IRSST, 2010).

La Règlementation européenne CLP qui désigne les termes « classification, étiquetage, emballage » a introduit les nanoparticules dans l'inventaire des substances chimiques à être déclarées. La réglementation CLP stipule que les informations relatives aux types de NPs, leur forme, leur concentration et les mixtures doivent être étiquetées et absolument communiquées dans les SDS (fiche de sécurité) avec les données de leur effets toxiques potentiels et les avertissement et précaution relatif à ces substances (Alessandrelli et polci, 2011). Le Comité de la Prévention français dans un rapport récent confirme que malgré la non classification des NPs dans la liste des substances CLP certains NPs avec les connaissances actuelles peuvent être classées prochainement (CPP, 2020).

Les organismes de normalisation tel que l'ISO et l'OECD donne une grande importance aux nanoparticules et ont dédié plusieurs activités à leurs rencontre pour permettre une évaluation des effets potentiels : les définitions, nomenclature, test toxicologique, ligne directives, méthodes de quantification et caractérisations et protocoles toxicologiques (Castillo. 2010).

Parmi la liste de NPs à étudier en priorité émis par l'OECD on trouve les suivants : Nanoparticules d'argent, Nanoparticules de fer, TiO_2 , Fullerènes (C_{60}), les nanotubes de carbone de divers types (SWCNT et MWCNT), CeO_2 , ZnO_2 , SiO_2 , Dendrimères, Nanoargiles et nanoparticules d'Or (OECD, 2021).

VII. Toxicité des nanoparticules chez l'homme

En réaction aux divers usages dans lesquelles les nanoparticules sont impliquées, plusieurs craintes sur leurs toxicités pour tous les organismes vivants ont émergé. Un très grand nombre de publications scientifiques ont remporté les effets délétères des NPs avec des effets assez multiples lors d'évaluations de la toxicité sur plusieurs organismes aquatiques ou terrestres. Les NPs ont été reportées comme ayant une capacité d'induction d'effet immunotoxique, génotoxique, tératogène, neurotoxique, pneumotoxique, réprotoxique et autres (Andujar et al., 2009 ; Dobrovolskaia et al., 2009 ; Hu et Gao, 2010 ; Maurer-Jones et al., 2013 ; Greco et al., 2014 ; Bahadar et al., 2015 ; Mahaye et al., 2017 ; Nho et al., 2020).

Un point essentiel dans la toxicité des nanoparticules est à préciser, c'est majoritairement les propriétés et les caractéristiques uniques considérées comme favorables qui sont la cause de la capacité des NPs à induire ces effets toxiques divers. De plus les NPs ont la capacité de pénétrer et passer à travers les barrières biologiques des organismes vivants, ceci a suscité des inquiétudes envers eux par rapport aux effets nocifs potentiels (Fernandez et al., 2011 ; Cid et al., 2015 ; Ng et al., 2015).

Les Nanoparticules sont considérées comme une nouvelle classe de polluants; en effet ces particules peuvent intégrer les épithéliums et être transposées dans divers organismes et s'accumuler dans divers organes comme le cerveau et les reins (Masse et Boudene, 2012). Plusieurs effets toxiques ont été décrit lors d'évaluations de la toxicité des NPs dans les durées aiguës, subaiguës ou chroniques (Castillo et al., 2017).

Chez l'homme la toxicité des nanoparticules est susceptible d'être la conséquence de l'entrée principalement par la voie respiratoire et le contact direct avec la peau (voie cutanée), la voie digestive par ingestion est considérée comme une voie d'exposition secondaire d'exposition aux NPs. La petite taille des NPs est considérée comme élément favorable à leur entrée dans le système respiratoire et par conséquent induire une toxicité. D'un autre côté les NPs métalliques ont la capacité d'intégrer les cellules et de fait interagir avec l'ADN résultant potentiellement en géotoxicité. Il faut préciser aussi la grande capacité des NPs comme les nano-cuivre (CuO) à s'accumuler dans les différents tissus biologiques après entrée dans le système circulaire sanguin et lymphatique qui joue un rôle important dans le transport de ces NPs vers divers organes (DeVoll et al., 2010 ; Ameh et Sayes. 2019 ; Garces et al., 2021). Les voies d'exposition aux NPs et leur destination finale potentielle sont représentées dans la Fig. 14.

Bien que les mécanismes de toxicité ne soient pas spécifiquement connus, la toxicité des NPs peut être soit locale ou systémique et l'induction du stress oxydant est considérée comme l'élément principal en cause de leur capacité à induire les effets toxiques. Il a été reporté que les NPs augmentent la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme l'anion super oxyde O_2^- et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et donc induire un stress oxydant dans les milieux biologiques ; par conséquent induire des effets internes dans les cellules comme ceux mitochondriaux et la peroxydation lipidique résultant en la dégradation des membranes cellulaires (Singh, 2016 ; Horie et Tabei, 2020).

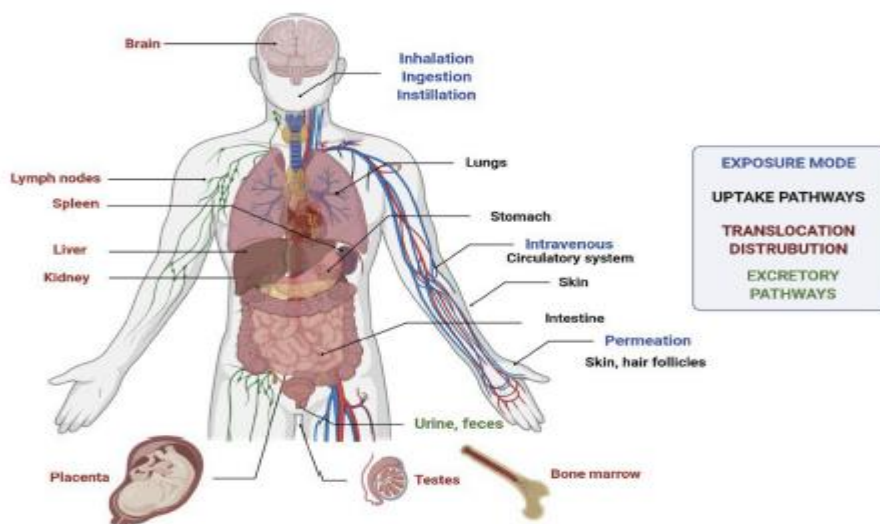


Figure 14: Voies d'entrée des nanoparticules et leurs distributions dans le corps humain (Medici et al., 2021).

VIII. Ecotoxicité des NPs chez les organismes marins et aquatiques

Les nanoparticules métalliques constituées soit de traces métalliques (Cu-NPs, Ag-NPs) ou d'oxyde tel que le ZnO₂ et le TiO₂ peuvent induire plusieurs effets toxiques dans le biote aquatique du fait de leur comportement dans le milieu aquatique. Les NPs possèdent la capacité d'interagir et être intégrées au sein des organismes aquatiques comme les poissons et s'accumuler dans les différents tissus responsables de la toxicité reporté par plusieurs études comme l'inhibition de l'activité de la Na⁺-K⁺/ATPase et la diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) suite à l'exposition aux NPs-Ag. D'un autre côté l'induction de stress oxydant chez la carpe (*Cyprinus carpio*) a été reporté suite à l'exposition au ZnO₂ (Shaw et Handy, 2011 ; Hao et al., 2012 ; de Oliveira et al., 2014 ; Katuli et al., 2014).

La libération des nanoparticules dans le milieu marin ne cesse d'augmenter par conséquent les concentrations aussi augmenté de façon exponentielle, ceci à soulever les inquiétudes sur les dangers probable des NPs dans le compartiment marin. Aujourd'hui la littérature et les publications scientifiques concernant leur écotoxicité a grandi de façon très importante avec multiple preuves des effets toxiques qu'engendrent les NPs métalliques pour les organismes marins ; les études disponibles actuellement concernent divers organismes de réseaux trophiques différents et cible plusieurs organes, tissus et cellules. Cependant un point important doit être noté c'est le fait que les protocoles adaptés pour d'évaluation écotoxicologique des NPs manque de similitudes avec l'absence d'une standardisation ce qui nécessite d'autres efforts en vue d'accomplir une évaluation comparable entre chaque étude (Bour et al., 2014 ; Blasco et al., 2015 ; Ramskov, et al., 2015 ; Marutescu et al., 2019).

Le milieu aquatique est le récepteur final des contaminants, notamment les NPs. Malgré que leurs effets ne soient pas totalement élucidés, les modèles biologiques aquatiques sont généralement utilisés pour les tests écotoxicologiques concernant les NPs. Ces modèles incluent les mollusques, les crustacés, les poissons et les algues.

Les mollusques, en majorité des espèces filtrantes, sont considérés comme des bioindicateurs de la pollution par les NPs. Les études sur les mollusques se concentrent principalement sur l'investigation de la bioaccumulation, de la toxicité, ainsi que sur la létalité et les altérations des processus biochimiques (Cattaneo et al., 2009 ; Galloway et al., 2010 ; Cordeiro et al., 2019 ; Abramenko et al., 2021 ; Sendra et al., 2021).

1. Toxicité des NPs Chez les gastéropodes

Les escargots sont considérés comme espèces bioindicateurs idéals pour l'évaluation de la toxicité des nanoparticules due à plusieurs raisons notamment la facilité de les obtenir et de les maintenir en laboratoire, leur sensibilité envers tout type de polluant, le cycle de vie plutôt favorable mais surtout la possibilité d'effectuer plusieurs analyses biochimiques comme le dosage des biomarqueurs et les tests immunologiques. Les escargots aquatiques sont largement employés dans les études écotoxicologiques concernant les NPs, les escargots d'eau douce comme *L. stagnalis* plus utilisés que ceux marin tel que *L. littorina* (Larba et Soltani, 2014 ; Caixeta et al., 2020). Les effets toxiques et les phénomènes de bioaccumulation des NPs observé chez les gastéropodes sont représentés dans la Fig.15.

Plusieurs études ont confirmé que les NPs métalliques comme le CuO, CeO₂ et le ZnO₂ peuvent s'accumuler dans les tissus des escargots aquatiques ; d'un autre côté certains résultats indiquent clairement que les NPs pénètrent à l'intérieur des escargots aquatiques par divers mécanismes tel que l'endocytose médiée par la clathrine et les cavéoles. La libération d'ions est un mécanisme probable par lequel les NPs induisent des effets toxiques par le biais de la surproduction d'ERO et par conséquent l'induction du stress oxydant. Par ailleurs il a été reporté que les NPs métalliques provoquent un déséquilibre dans les systèmes de défenses antioxydants tel que : catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD) en plus de l'augmentation des Malondialdéhydes (MDA) l'indicateur de peroxydation lipidique (Fahmy et al., 2014 ; Fahmy et al., 2017 ; Caixeta et al., 2020).

Ali et al. (2014) ont reporté que les NPs d'Ag possèdent une activité molluscicide et une toxicité aigüe chez l'escargot aquatique *Lymnaea luteola* avec une concentration létale médiane (CL₅₀) (48,10 µg/L). Les NPs d'Ag ont provoqué une diminution des taux de glutathion-S-transférase (GST), GPx et Glutathion réduit (GSH), et une augmentation des taux de MDA et CAT dans la glande digestive de *Lymnaea luteola*.

Les résultats reportés par Li et al. (2012) indiquent que les NPs d'Ag sont plus biodisponible par exposition direct (à travers l'eau) par rapport à la voie digestive chez l'escargot herbivore marin *Lymnaea luteola* ; par voie directe une forte accumulation dans les

glandes digestives, branchies et reins par rapport à la voie digestive ou l'accumulation a été observée dans les branchies. Ces données indiquent que l'exposition direct *via* l'eau est probablement la voie principale d'entrée des NPs chez les organismes marins.

L'accumulation des NPs chez l'escargot aquatique *Potamopyrgus antipodarum* suite à l'exposition aux NPs à faible concentrations a été observée (100 µg Ag/g PS sédiment) ou (240 µg Cu/g sédiments), après exposition aux NPs-Ag *via* les sédiments (Ramskov, et al., 2014 ; Ramskov, et al., 2015).

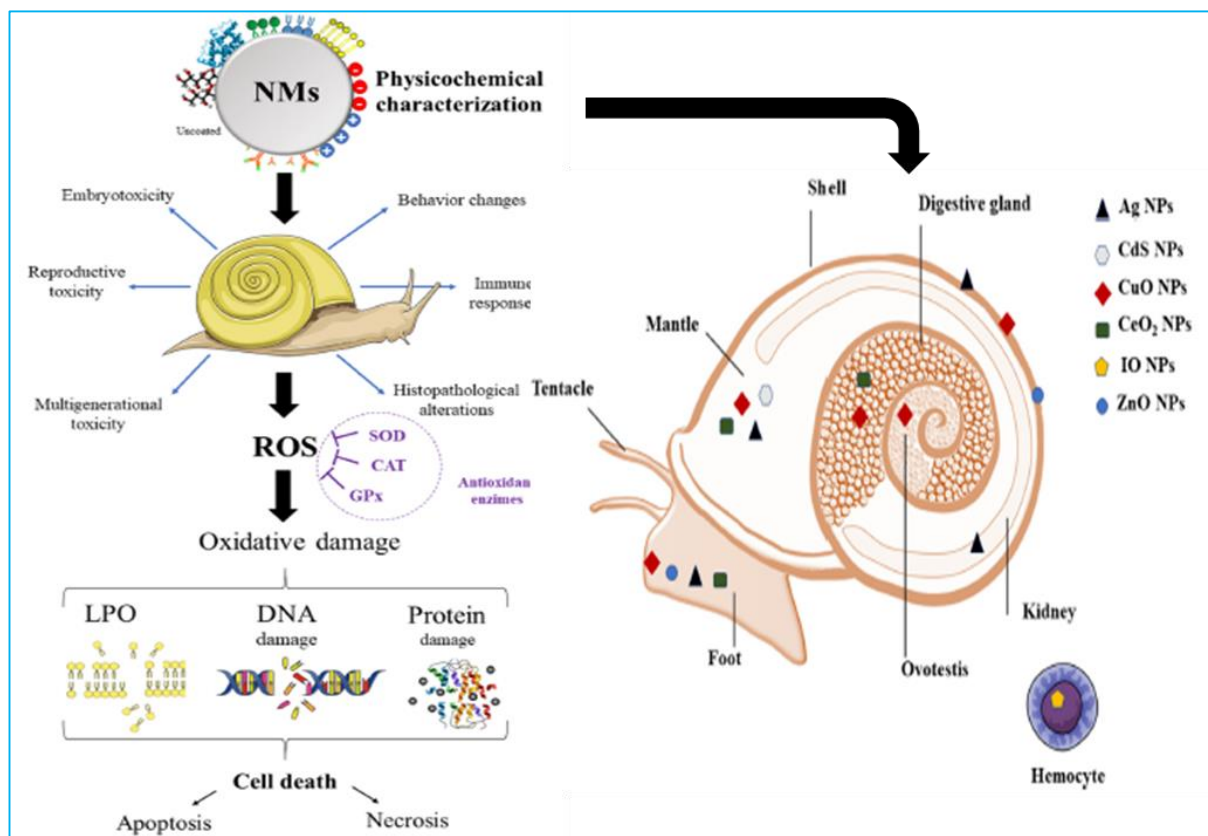


Figure 15: Toxicité et accumulation des NPs chez les gastéropodes aquatiques (Caixeta et al., 2020).

2. Toxicité des NPs chez les mollusques

Les données toxicologiques des NPs concernant les organismes aquatiques sont limitées en grande partie à certains types d'espèces utilisées dans les bioessais réglementaires et autres espèces d'eau douce. Les invertébrés comme les bivalves ont récemment été utilisés

comme modèle biologique adéquat à l'investigation de l'écotoxicité des NPs en vue de l'importance qu'ils prennent en matière de sensibilité, et étant considérés comme bioindicateurs idéals dont l'exemple le plus pertinent est la moule commune (*Mytilus edulis*) qui fait partie des bivalves les plus utilisés pour l'évaluation de la toxicité, la biodisponibilité et la bioaccumulation des divers NPs métalliques comme le TiO₂ (Eisler, 2010 ; Matranga et Corsie, 2012 ; Canesi et al., 2015).

Parmi les divers mollusques, les Bivalves ont été identifiés comme étant la cible unique relative aux NPs et leurs effets toxiques ; plusieurs publications en mise en avant l'importance des Bivalves tel que les moules, palourdes et d'huîtres pour leurs applications afin d'éclaircir la toxicité des NPs et leurs mécanismes.

Par ailleurs, une grande série de résultats expérimentaux ont indiqué les effets toxiques induits par les NPs chez divers types de mollusques, parmi eux les effets létaux, immunotoxiques, hématotoxiques et modification d'expression des protéines ; tous ces effets sont considérés comme le résultat de l'induction du stress oxydant en vue que la toxicité des NPs et largement considérée comme étant médiée par la surproduction d'ERO (Canesi et al., 2012 ; Canesi et al., 2015 ; Felice et Parolini, 2020).

Koehler et al. (2008) ont reporté plusieurs altérations suite à l'exposition du bivalve *Mytilus edulis* aux nanoparticules SiO₂ contenu dans la Laine de verre (matériaux isolant thermique à base de verre appelé en anglais Glass wool). L'endocytose et la diffusion ont été les deux mécanismes mis en évidence comme étant la cause de l'entrée des NPs et leur accumulation dans les mitochondries et les nucléoles de *M. edulis*. Parmi les effets induits par les NPs SiO₂ la diminution de la stabilité lysosomale et l'apoptose dans les cellules épithéliales des branchies et glandes digestives, il a été jugé que le mécanisme d'action en cause était le stress oxydant.

Pour le dioxyde de titanium TiO₂ la grande partie des données toxicologiques sur les organismes marins concerne les mollusques ; les NPs TiO₂ sont capable d'induire d'innombrable altérations chez les mollusques notamment chez les bivalves comme *Mytilus galloprovincialis* et *Haliotis diversicolor supertexta* ou d'autres. Les expérimentations *in vivo* et *in vitro* ont reporté de multiples altérations notamment le déséquilibre des systèmes antioxydants enzymatique et non enzymatique (GSH, SOD, GPX, GST), l'augmentation de la MDA synonyme à la peroxydation lipidique, l'embryotoxicité et fragmentation de l'ADN.

De même leur bioaccumulation a été observé à plusieurs reprises chez diverses espèces de mollusques. Cependant malgré que diverses publications ont indiqué la toxicité des NPs tel que TiO₂, la comparaison entre les résultats reste très difficile à établir à cause des conditions expérimentales très différents (Zhu et al., 2011 ; Ates et al., 2013 ; Minetto et al., 2014 ; Xia et al., 2017 ; Saidani et al., 2019).

Les organismes benthiques peuvent être exposés par trois voies différentes aux NPs ; soit par voie direct *via* l'eau, à travers les sédiments après dépôts des NPs ou *via* la voie digestive et les chaînes trophiques. La toxicocinétique des NPs chez les mollusques est largement méconnu, cependant chez certain bivalves quelques informations sont actuellement disponible.

Les NPs peuvent intégrer les bivalves *via* les branchies par endocytose pour enfin arriver dans l'espace intracellulaire et induire la libération d'ions par les interactions avec le pH acide lysosomale. La libération d'ions peut générer une série d'effets toxiques due à l'induction de stress oxydant. Cependant il existe un manque d'information entre l'absorption des NPs dans les branchies et leur arrivée à l'intérieur des lysosomes des bivalves ; d'un autre côté après absorption les NPs peuvent être transportés du système digestif à l'hémolymphe (Rocha et al., 2015).

Les NPs métalliques sont capable d'induire des effets nocifs chez les tous les espèces des mollusques, plusieurs études ont reporté ces effets délétères malgré le fait que les protocoles expérimentaux sont différents rendant la comparaison des données difficile comme noté précédemment. Chez *M. galloprovincialis* l'exposition à 10mg/L pendant 96h de TiO₂ a pu induire des altérations génotoxiques, des diminutions dans la stabilité lysosomale des tissus de l'hépatopancréas de *Crassostrea virginica* suite à l'exposition à 0.5mg/L de TiO₂. Par ailleurs il a été reporté que les NPs d'Au ont tendance à s'accumuler principalement dans la glande digestive et secondairement dans les branchies chez *M. edulis* après administration de 0.75mg/L (Minetto et al., 2016).

Les NPs de CuO aussi ont la capacité de s'accumuler chez les mollusques, il a été reporté que le CuO s'accumule dans les glandes digestives et les branchies de *M. galloprovincialis* après exposition direct pendant 15 jours à 0.01 mg/L ; des modifications dans les biomarqueurs du stress oxydant : CAT, GPX et SOD ont été observées et les taux de MDA ont augmenté (Gomes et al., 2011 ; Gomes et al., 2012).

Globalement, en se basant sur les données actuelles relatives à l'évaluation de l'écotoxicité des nanoparticules métalliques chez les mollusques, on peut établir une synthèse des éléments les plus fréquents et des effets observés plusieurs fois.

Dans la majorité des résultats, la mortalité était plutôt rare. Les effets sur l'ADN ont souvent été utilisés et rapportés. Aussi, les biomarqueurs du stress oxydant et l'indicateur de peroxydation lipidique ont été largement employés. La métallothionéine et les tests de stabilité de membrane lysosomale (LMS) ont également été fréquemment évalués dans ces études. Cependant, les investigations physiologiques et histologiques étaient rarement appliquées. Pourtant, dans les études ayant choisi ce type d'investigation, l'impact toxique des NPs a été indiqué (Roma et al., 2020). Le tableau 3 résume une partie des Cl_{50} reportées pour diverses NPs.

3. Mécanismes d'action des NPs

Trois mécanismes d'action des NPs ont été identifiés chez les espèces benthiques, par exemple le cas du ZnO_2 qui peut induire des effets toxiques par trois mécanismes principaux qui sont les suivant :

- La libération des ions (très toxiques) une fois dans le compartiment marin par le résultat de la dissolution.
- Le contact direct entre les NPs et la surfaces des cellules qui peut induire des altérations due à la libération des ERO en surface.
- L'induction du stress oxydant causer par la production des ERO à l'intérieur des cellules suite à l'accumulation des NPs et libération d'ions (Yung et al., 2014 ; Deng et Gao. 2016).

Les résultats de l'étude de Khan et al., (2014) ont indiqués que l'absorption des NPs Ag dans les organismes marins peut se faire par plusieurs mécanismes qui sont : l'endocytose médiée par la clathrine (particules ≤ 120 nm) et endocytose médiée par les cavéoles (pour NPs 50 - 100 nm). Il existe d'autres voies comme la Macro pinocytose pour les particules ≤ 1 μ m et les pompe H^+ pour les ions (Fig.16).

Tableau 03 : Les concentrations létales médianes (CL₅₀) des NPs chez les organismes aquatiques.

NPs	Modèle	CL ₅₀	Références
TiO ₂ ZnO ₂	<i>Danio rerio</i>	CL ₅₀ 96h = 124.5 mg/L CL ₅₀ 96h = 4.92 mg/L	Xiong et al., (2011)
Ag-NPs	<i>Danio rerio</i>	CL ₅₀ 96h = 16.76mg/L	Katuli et al., (2014)
ZnO ₂	<i>B. alexandrina</i>	CL ₅₀ = 145 µg/ml	Fahmy et al., (2014)
Ag-NPs Au-NPs	<i>B. alexandrina</i>	CL ₅₀ = 9.68 µg/ml CL ₅₀ = 133.7 µg/ml	Moustafa et al., (2018)
CuO	<i>Lymnea luteola</i>	CL ₅₀ 96h = 83.6 µg/ml	Ali et Ali, (2015)
TiO ₂	<i>T. platyurus</i>	CL ₅₀ 48h = 10 mg/L	Blaise et al., (2008)
ZnO ₂	<i>Crassostrea gigas</i>	CL ₅₀ = 37.2 mg/L	Trevisan et al., (2014)

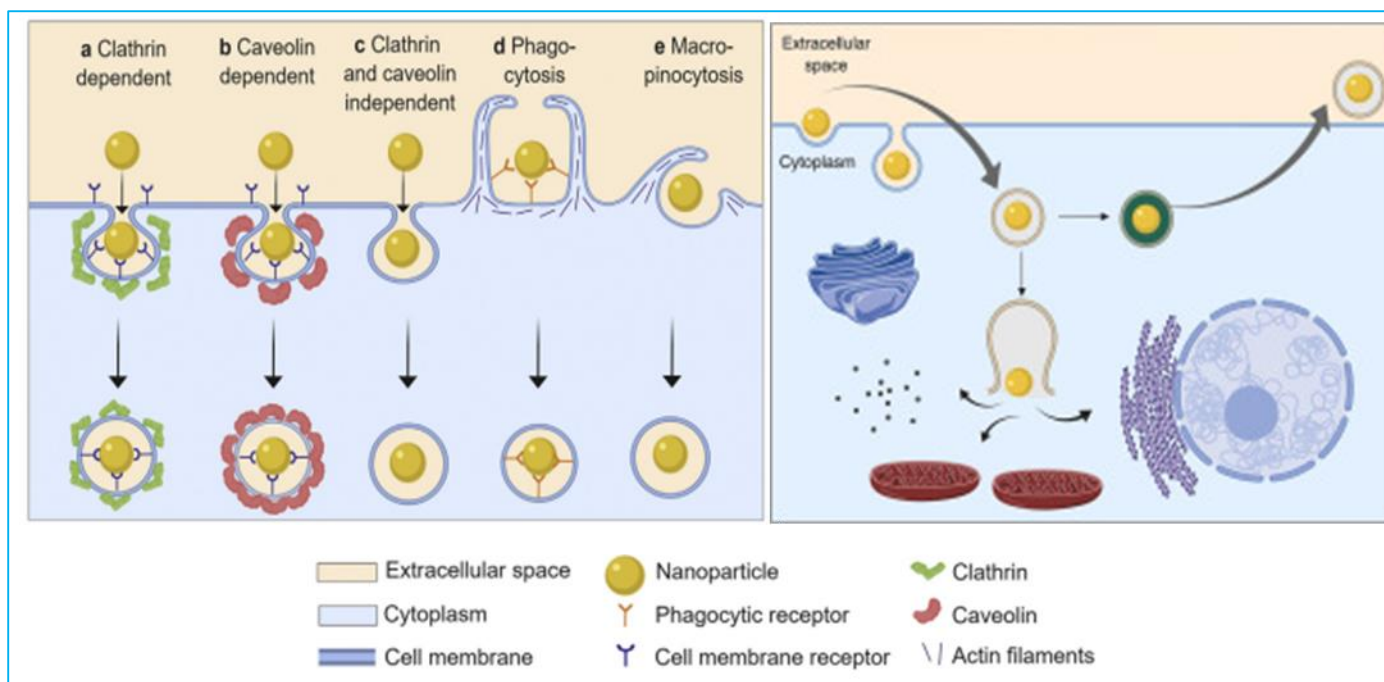


Figure 16: Voies d'internalisations et devenir des NPs dans les cellules (Donahue et al., 2019).

4. Les Nanoparticules de chrome (Cr_2O_3)

4.1. Origine et propriétés

L'oxyde de chrome de formule chimique Cr_2O_3 fait partie de divers oxydes originaire de l'élément métallique Chrome (Cr) ; parmi les multiples états d'oxydation du Chrome en trouve l'oxyde de chrome trivalent (III) et celui Hexa valent (VI) qui apparaissent à l'échelle nanométrique.

Un intérêt très important est accordé aux nanoparticules de Cr_2O_3 principalement due aux multiples caractéristiques que possèdent ces éléments (Al-Fakeh et Al-Otaibi, 2022).

Les NPs de Cr_2O_3 possèdent plusieurs propriétés jugées favorables par les chercheurs scientifiques dans divers domaines notamment leur petite taille et faible diamètre, une grande surface d'échange, résistance à l'oxydation, propriétés diélectriques, un point de fusion très élevé (proche de $2300\text{ }^\circ\text{C}$), stabilité thermodynamique, une dureté très élevée et des propriétés magnétiques diverses (Meenambika et al., 2014 ; Ghotekar et al., 2021).

Les NPs de Cr_2O_3 se trouvent généralement sous forme de poudre cristalline de couleur vert foncé, à caractère plutôt inodore et incombustible aussi largement insoluble dans l'eau à l'état de poudre solide.

Ces nano-poudres sont répertoriés le plus souvent sous le numéro CAS (1308-38-9). Au niveau de l'environnement ce type de NPs est considéré comme un polluant potentiel malgré l'absence d'étude spécialisée qui confirme cette hypothèse et au niveau réglementaire aucune classification toxicologique n'est vraiment disponible comme la majorité des NPs (Fiche de sécurité Roth, 2021).

4.2. Utilisation et importance économique

Grace aux multiples propriétés de l'oxyde de chrome(III), un intérêt croissant a été donné à ces nanoparticules qui sont employées dans un large éventail (Gaabour, 2021). Tant dans les applications industrielles lourde tel que les matériaux de protection anticorrosion et

abrasion, dans les catalyseurs et aussi dans les capteurs spécifiques de certain élément comme les alcools (éthanol), les gaz toxiques notamment l'ammonium et les solvants chimiques dont l'acétone et le toluène, aussi dans les procédures pyrotechnique et l'élaboration des carburants (Gibot, 2022).

Dans le domaine de la nano-médecine et biomédical et à cause de la biocompatibilité, les NPs de Cr_2O_3 ont trouvé usage dans nombreux aspect notamment biologique tel que dans les médicaments anti-cancéreux, antibactérien, antifongique et antioxydant ainsi que dans les systèmes de délivrance médicamenteuse. Dans l'industrie énergétique aussi ce type de NPs est utilisé dans les batteries d'ion de lithium, les photos catalyseur et les systèmes de captions d'énergie solaire.

Plusieurs méthodes de synthèse des NPs de Cr_2O_3 notamment chimiques et physiques ont été mise en place, cependant ces méthodes sont considérées comme nocives alors les chercheurs récemment se tournent vers la tendance de la biosynthèse ou synthèse verte de ces NPs (Sackey et al., 2021 ; Zainab et al., 2022).

Parmi les applications principales du Cr_2O_3 , on trouve l'usage comme pigments et colorants verts à cause de la teinture naturelle verte de ces NPs ; les pigments de Cr_2O_3 sont appelés eskolaïte, ce pigment est utilisé dans divers fabrications comme celle des décorations en porcelaine et d'autres (Verger, 2015).

5. Les Nanoparticules d'Aluminium (Al_2O_3)

5.1. Origine et propriétés

L'oxyde d'aluminium de formule chimique Al_2O_3 est un oxyde de l'élément métallique aluminium (Al) ; il se présente sous forme de poudre solide cristalline généralement de couleur blanche, les NPs d' Al_2O_3 proviennent principalement d'un minerait appelle la bauxite contenant de 40 à 60% des NPs d' Al_2O_3 (INERIS, 2005).

Les NPs d' Al_2O_3 ont une très grande importance industrielle et économique, ils représentent enivrent 20% du marché des nanomatériaux mondial avec une augmentation exponentielle de leur production chaque année, cela indique la grande importance accordée à ce type de NPs (Yang et al., 2012 ; Vidya et Chitra, 2016). Cette proportion énorme de

production a fait que les nano-Alumina Al_2O_3 figurent dans la liste des nanomatériaux qui nécessitent un test d'urgence sur la santé publique et les effets environnementaux potentiellement néfastes par l'organisation de développement et de coopération économique (OCED) avec d'autre type de NPs comme l'oxyde de cérium (CeO_2) (Saucedo et al., 2011).

Les NPs Al_2O_3 peuvent se présenter sous diverses formes cristallographiques ; à cause de l'inexistence d'un système de nomenclature universel pour différencier les oxydes d'aluminium généralement les chercheurs utilisent la forme cristalline pour faire la différence ; de ce fait le α - Al_2O_3 est attribué à la forme Hexagonale, la variation γ est attribuée au polymorphisme ou altération structurelle de cet élément, la forme γ - Al_2O_3 possède une forme cristalline cubique. D'un autre côté les NPs d' Al_2O_3 se trouvent le plus souvent sous forme de poudre solide et inodore de couleur blanche et ce type d'élément est abondant dans la nature par rapport à d'autres types de NPs (Becker et al., 2016).

De façon similaire à d'autres types de nanoparticules métalliques, les NPs d'aluminium sont convoitées du fait des propriétés structurelle, chimique et physique absents chez leurs éléments naturels. En se basant sur la liste des caractéristiques qu'exhibe les NPs d' Al_2O_3 plusieurs secteurs (domestique, industriel et médical) utilisent à ce jours ces NPs dans une variété de produits de tous types, ce qui est logique compte tenu de la forte résistance à la corrosion, un point de fusion élevé à environ 2072 °C, conductivité thermique, une grand dureté (15 Gpa sur l'échelle de Vickers) et une stabilité relative chimiquement, et d'autres (Whitney, 2014; Song et al., 2017).

5.2. Utilisation et importance économique

L' Al_2O_3 est notamment utilisé d'une façon très abondante depuis plus de 40 ans dans l'orthopédie, avec multiple type et marques sur le marché mondial de prothèse orthopédique à base d'oxyde d'aluminium. Comme constituant de base ou combiné avec d'autres NPs dont le dioxyde de Zirconium, parmi les autres usages on trouve aussi les implants dentaires ; la première raison d'usage de ces NPs est leur biocompatibilité reconnue par plusieurs chercheurs (Piconi, 2017 ; Denes et al., 2018).

Les NPs Al_2O_3 sont aussi employés comme insecticides à large spectres, antibactériens et antifongiques due principalement à la disponibilité et leur faible cout au niveau mondiale, ces applications sont destinés surtout au secteur des activité agronomiques ; cependant l'utilisation de ces nano-poudres reste contesté principalement à cause des

mécanismes toxiques inconnus et largement inexplorés (Stadler et al., 2009 ; Buteler et al., 2017 ; Singh et al., 2018 ; Muñoz et al., 2019; Belhamel et al., 2020)

Pour avoir une simple idée de l'étendue des applications de ces éléments un chiffre de 1800 produits commerciaux contiennent des NPs d' Al_2O_3 a été reporté par Nogueira et al. (2019) ces NPs sont aussi largement employés dans les produits cosmétologiques divers, dans les industries chimiques lourds, dans le domaine médical mise à part l'orthopédie et les technologies de délivrance médicamenteuse.

Par ailleurs aussi employé dans les céramiques, les abrasives, le papier, les fibres, les catalyseurs et produits électroniques, les traitements des eaux et les capteurs. Un point important aussi c'est l'usage de ce type de NPs dans l'industrie agro-alimentaire spécifiquement dans les additives alimentaires pour des fins multiples (amélioration du goût, conservation, coloration et emballage) (Alshatwi et al., 2012 ; 2013 ; Akbaba et Turkez, 2018 ; Köerich et al., 2020).

6. Ecotoxicité et mécanismes de toxicité

6.1. Toxicité des NPs Cr_2O_3

En se basant sur la littérature actuelle sur le sujet de la toxicité des NPs de Cr_2O_3 , on peut noter directement le manque cruel et la limitation de nombre d'étude s'adressant sur les effets nocifs potentiels de ces NPs, un résumé des résultats publiés par certaines études est présenté dans ce qui suit :

6.1.1. Chez les invertébrés

Les NPs Cr_2O_3 ont été capable d'induire plusieurs effets toxiques chez *Daphnia Magna* et *Aliivibrio fischeri* selon les résultats reportés par Purari et al. (2016), une exposition aiguë (48h) et une autre sub-chronique (21 jours) à des concentrations de Cr_2O_3 allant de 0.5 à 8 mg/L ont induit des altérations morphologiques chez *Daphnia Magna* spécifiquement au niveau de leurs branchies, des altérations au niveau mitochondriale et cellulaire importantes avec la confirmation de l'internalisation intra cellulaire des NPs Cr_2O_3 .

Ces effets toxiques sont dus selon les mêmes auteurs à la libération d'ions de chrome hexa valent et l'induction de stress oxydant médié par la surproduction d'ERO ; d'un autre côté

une Cl_{50} estimée à 6.7 mg/L et 16mg/L, respectivement pour *Daphnia Magna* et *Aliivibrio fischeri* a été reportée ce qui prouve une forte toxicité du Cr_2O_3 envers ces espèces.

Une Cl_{50} pour 48h estimée à 6.74 mg/L a été reportée par Tavares et al. (2014) chez *Daphnia similis*, les NPs Cr_2O_3 ont induit une très forte toxicité aigüe avec des altérations morphologiques et une accumulation intracellulaire confirmée par microscopie électronique, au cours de la même étude les NPs de chrome ont montré une toxicité deux fois plus élevée que celle induite par les NPs de cuivre (CuO).

6.1.2. Chez les vertébrés

Les NPs Cr_2O_3 ont montré une toxicité plus élevée que d'autres NPs notamment ceux de Cobalt, Nickel et argent chez le poisson *Labeo Rohita*, une exposition pendant 21 jours à 25mg/L de Cr_2O_3 a causé plusieurs effets toxiques dont une forte toxicité aigüe exprimée par l'augmentation de la mortalité. Aussi un état d'imbalance dans les défenses antioxydants avec une diminution des activités du GPx, SOD et CAT et une augmentation des produits de la peroxydation lipidique (MDA) dans le rein et le foie des poissons. Des altérations histologiques aussi ont été indiquées notamment l'inflammation, l'œdème et la vacuolisation hépatique (Kanwal et al., 2019).

Lin et al. (2013) ont reporté les effets reprotoxiques du Cr_2O_3 sur les embryons du poisson zèbre, avec une inhibition de l'activité et du gène codant pour l'enzyme d'éclosion ZHE-1. Ces effets ont été expliqués par le mécanisme de toxicité concernant la libération d'ions de chrome notamment hexa valent et l'internalisation cellulaire de ces NPs et de ce fait l'induction d'un état de stress oxydant, ce mécanisme est présenté dans toutes les études comme étant la voie de toxicité des NPs Cr_2O_3 .

Chez les rats Wistar, l'exposition à des doses élevées *in vivo* de NPs Cr_2O_3 (30-300 mg/kg) cause des effets toxiques multiples, parmi ces effets certaines altérations au niveau histologique ont été confirmées et reportées notamment des hémorragies, des dégénérescences cellulaires et des dilatations hépatiques. D'un autre côté le point principal est évidemment le fort potentiel génotoxique noté dans deux études avec la détection d'altérations au niveau de l'ADN confirmé par le test des comètes, la formation de micronoyau et l'augmentation d'abrasion chromosomal. Des effets sur la fonction hépatique ont aussi été observés avec une diminution de l'activité des enzymes hépatiques tels que l'Aspartate Aminotransférase (AST), de l'Alanine

Aminotransférase (ALT) et de la Phosphatase Alcaline (ALP) en plus des altérations morphologiques au niveau du sperme des rats.

Il faut noter aussi la bio distribution remarquable de ces NPs avec une accumulation dans le foie, les reins, et les poumons des rats, dans une étude des effets hématologiques ont aussi été observé, le mécanisme de toxicité suspecté et comme toujours celui de la toxicité médiée par la production d'ERO. En conclusion ces effets sont très variés et supposent aussi un effet génotoxique potentiel même à faible dose chez les rats (Singh et al., 2016 ; Fatima et Ahmed, 2016 ; 2019).

6.2. Toxicité des NPs Al₂O₃

La littérature au sujet de la toxicité des NPs d'Al₂O₃ est plus riche en comparaison avec celle dédiée aux NPs de chrome, cependant elle reste limitée pour les espèces de mollusques et gastropodes avec pratiquement uniquement un faible nombre d'étude répertorié. Un autre point important est le problème des différences de résultats reportés pour l'Al₂O₃ ou dans certains cas des résultats contradictoires entre le potentiel toxique de ces NPs et la toxicité faible jugée principalement en comparaison avec d'autres NPs réputées d'être fortement toxiques.

6.2.1. Chez les invertébrés

Les essais d'écotoxicité sont considérés comme un outil plutôt fiable pour l'évaluation de la toxicité et du risque lié à la contamination aux NPs ; les NPs d'Al₂O₃ ont montré plusieurs effets toxiques sur les espèces aquatiques d'eau douce notamment *Daphnia magna*, cependant la plupart des effets ont été observés dans des concentrations élevés en comparaison avec d'autre NPs.

Selon les résultats reportés par Nogueira et al. (2020), l'oxyde d'aluminium α et η a induit des effets toxiques notable uniquement a forte dose (500-1500 mg/L), avec une Cl₅₀ estimée à 1195 mg/L et 897 mg/L, respectivement pour la forme α et η et une LOEL estimée à 6.25mg/L ; selon les même auteurs, le profil toxicologique des NPs d'Al₂O₃ est faible à modéré chez *Daphnia Magna*, d'un autre côté les résultats indiquent clairement l'accumulation des NPs

et l'augmentation de production des ERO, augmentation de l'activité du CAT et diminution de celle de la SOD et le GSH.

Une modification du matériel génétique due à l'exposition à des concentrations croissantes (0.1-1000 mg/L) d' Al_2O_3 a été notée par Zaleska et Doskocz (2015). Les résultats de la RAPD-PCR ont montré des effets génomiques chez la bactérie *Pseudomonas putida*, dont les effets majeurs ont été observés à forte dose (1000 mg/L).

Lors d'une étude de microsome, l'exposition à 100 mg/L pendant 28 jours aux NPs d' Al_2O_3 a induit plusieurs effets toxiques rapportés par l'étude de Zaleska et al. (2020). Parmi les effets observés, on note ceux sur *Daphnia magna* avec une diminution de la viabilité, une augmentation de l'activité des systèmes de défenses antioxydants et une accumulation au sein des mitochondries causant des altérations morphologiques. Une altération des populations et de la biodiversité du microsome a également été observée dans cette étude.

Ates et al. (2013) ont évalué l'impact des NPs d' Al_2O_3 sur le crustacé *Artemia salina* sur une durée aiguë de 24h et 96h. L'exposition à 5, 10, 50 et 100 mg/L a causé la génération d'un état de stress oxydant, une augmentation de la mortalité et de la peroxydation lipidique traduite par l'augmentation des taux de MDA. L'accumulation a été confirmée par ICP-MS et les effets ont été plus sévères à 50 et 100 mg/L et à 96h.

6.2.2. Chez les vertébrés

Dans la littérature actuelle, il est important de noter que principalement deux modèles biologiques sont le plus souvent employés pour l'évaluation de la toxicité des NPs, notamment d' Al_2O_3 : premièrement les rats, majoritairement, et en second lieu les différentes espèces de poissons, essentiellement d'eau douce. Plusieurs études ont pointé et indiqué la toxicité des nano-alumines chez les espèces de poissons.

L' Al_2O_3 induit une toxicité à faibles doses (10-100 $\mu\text{g/L}$) en causant un déséquilibre des défenses antioxydantes avec l'augmentation de l'activité du GST, GPx et de la SOD au niveau des branchies du poisson d'eau douce *Carassius auratus*. L'accumulation de ces NPs a aussi été déterminée par ICP-MS dans les branchies et le foie des poissons. Un effet de synergie potentiel a également été mis en avant avec les NPs Al_2O_3 et d'oxyde de zinc ZnO_2 (Benavides et al., 2016).

Divers effets toxiques ont aussi été indiqués chez le poisson d'eau douce *Oreochromis mossambicus*. L'exposition à un large éventail de concentrations d' Al_2O_3 (0.1-250 mg/L) génère des altérations histologiques très sévères et dose-dépendantes, avec de la nécrose, inflammation, altération de la veine porte dans le foie d'*Oreochromis mossambicus*, confirmées par l'index histologique HSI comme étant une dégénérescence du tissu hépatique.

Au niveau des branchies, de l'hyperplasie, congestion, forte inflammation, œdème et dommages épithéliaux ont aussi été notés. D'un autre côté, l'accumulation de ces NPs a été confirmée dans plusieurs tissus chez le même modèle, notamment le foie, les reins et le cerveau. Une valeur de médiane de létalité a été estimée à 120 mg/L, ce qui est en accord avec plusieurs travaux dont les résultats indiquent clairement la capacité des NPs d' Al_2O_3 à induire de multiples effets toxiques avec la génération d'un état de stress oxydant (Murali et al., 2017 ; 2018 ; Vidya et Chitra, 2016 ; Canli et al., 2018).

Chen et al. (2020) ont rapporté les effets neurotoxiques des NPs d'alumine chez le poisson zèbre. En effet, l'exposition à diverses concentrations de NPs Al_2O_3 (0, 6.25, 12, 25 et 50 mg/L) aux embryons de poissons zèbre pendant une courte durée a sévèrement affecté la capacité nerveuse de ces poissons au stade adulte, avec une altération de la capacité de mémoire et d'apprentissage, mobilité et vitesse de réaction. Selon les auteurs, cela est causé par une inhibition des taux de neurotransmetteur (Ach) et des dommages au niveau du tissu nerveux et des cellules nerveuses, en plus de l'installation d'un état de stress oxydant.

Les nanoparticules d'aluminium peuvent induire des effets toxiques très variés chez les rats albinos et les souris BALB. La voie inhalatoire est principalement l'une des voies d'entrée et de génération de toxicité pour les NPs Al_2O_3 chez les rats. L'exposition pendant 24h à 50 mg par nébulisation de NPs Al_2O_3 a induit des effets pneumotoxiques très sévères tels que l'inflammation pulmonaire et l'œdème, mais aussi un déséquilibre dans les défenses antioxydantes, avec une augmentation de l'activité de la SOD et une diminution des taux de GSH et de l'activité de la CAT. Ce qui confirme les effets toxiques induits par le biais du stress oxydant selon Kozima et al. (2020).

Canli et al. (2018) ont comparé la toxicité des nano-CuO, TiO₂, et Al₂O₃ chez le rat Wistar, avec des doses de 0.5, 5 et 50 mg/kg de chaque NPs pendant 14 jours. Les résultats ont clairement démontré l'effet des NPs Al₂O₃ sur les biomarqueurs du stress oxydant, avec une diminution de l'activité du GPx et de la SOD ainsi qu'une augmentation des taux de glutathion réductase (GR), de manière dose-dépendante, sans affecter la GST et la CAT. D'un autre côté, pour le CuO et le TiO₂, un effet sur la CAT et le GST sans changement dans la SOD et le GPx dans le foie des rats exposés a été observé. Ces résultats indiquent que la toxicité de l'Al₂O₃ n'est pas faible par rapport aux autres NPs.

Morsy et al. (2013) ont indiqué que l'exposition à de fortes doses d'Al₂O₃, à raison de 1.3 g/kg pendant 28 jours chez les rats, cause une défaillance complète du système antioxydant endogène, avec une inhibition de la SOD, GPx, CAT et GSH et une augmentation de la production de MDA dans le foie, les reins et le système nerveux des rats. En conclusion, on peut dire qu'à un certain seuil d'exposition, les NPs Al₂O₃ exhibent des effets toxiques divers et difficiles à comprendre.

Synthèse Bibliographique

Chapitre II

Le Néogastéropode *Stramonita haemastoma*

1. Description

Stramonita haemastoma(Fig.17) est une espèce d'escargot marin prédateur communément appelée en anglais « red mouthed rock shell » ce qui veut dire la coquille de roche à bouche rouge, ou aussi appelée bouche de sang (peazy et al., 2019).

2. Nomenclature

2.1 Origine du nom scientifique

haemastoma provient des deux mots grec (*haem*) qui veut dire sang et (*stoma*) qui veut dire bouche donc en combinaison la traduction signifie bouche de sang, ce nom a été attribué en raison de la couleur rouge dans l'ouverture de la coquille (Lamare et Müller, 2008).

2.2 Origine du nom en français

Le nom de ces espèces en français provient de la traduction du mot latin *haemastoma*. (Lamare et müller, 2008).

2.3 Autres noms commun de *S. haemastoma*

- **France** : Ouarque (Pays basque), Pourpre, Pourpre bouche de sang
- **Royaume-Uni, USA** (anglais) : Red-mouthed rock shell, Florida rocksnail
- **Italie** : Boccone di mare
- **Allemagne** : Rotmund-Leistenschnecke
- **Espagne** : Boca Roja (Richier et al., 2021).

2.4 Autres synonymes scientifiques

Thais (*Stramonita*) *hidalgoi* Coen, 1946

Purpura oceanica Locard, 1886

Purpura laevis Monterosato, 1878

Purpura barcinonensis Hidalgo, 1867

Purpura macrostoma Küster, 1860

Purpura fasciata Dunker, 1857

Purpura gigantea Reeve, 1846

Purpura gigantea Calcara, 1840

Purpura nuttalli Conrad, 1837

Purpura lineata Kiener, 1835

Purpura haemastoma var. *bifasciata* Kiener, 1835

Purpura unifascialis Lamarck, 1816

Haustrum striatum Perry, 1811

Thais metallica Röding, 1798

Murex consul Gmelin, 1791

Thais haemastoma (Linnaeus, 1767)

Stramonita haemastoma haemastoma (Linnaeus, 1767)

Purpura haemastoma (Linnaeus, 1767)



Figure 17: Photo de *S. haemastoma* prise le 28/07/2021 (www.inaturalist.org).

3. Distribution

S. haemastoma est une espèce largement dispersée dans diverses zones, essentiellement cette espèce est présente dans les Océans Atlantique, Pacifique oriental et une large dispersion aussi dans la méditerranée. Ce gastéropode a été observé dans les eaux chaudes et tropicales de l'ouest de l'océan Atlantique à l'est de la mer Méditerranée dans diverses zones tel que les Caraïbes, Amérique du Sud, Amérique du Nord, Australie et Asie, même dans les eaux froides de Corée et Japon. La Fig.18 représente la distribution Globale de *S. haemastoma* (Limaverde et al., 2007 ; Lahbib et al., 2011 ; De Biasi et al., 2016 ; Di Bella et al., 2017).



Figure 18: Distribution Globale de *S. haemastoma* (Global Biodiversity Information Facility, 2021).

Parmi les pays de la méditerranée où vit *S. haemastoma* on trouve : les côtes sud de l'Espagne, la France, l'Italie, le Portugal, la Grèce, la Tunisie, Algérie et Maroc ; parmi ceux d'Amérique du sud on trouve le Brésil et la Colombie ; pour l'Afrique de l'ouest la Namibie et l'Angola sont des habitats aussi de *S. haemastoma* en plus en Amérique du nord la Floride et le golfe du nouveau Mexique dans les états unis (WoRMS, 2022).

4. Morphologie

S. haemastoma est une espèce qui possède un opercule composé d'une lamelle avec un noyau externe, la taille varie entre 4 et 8 cm et la coquille est spirale et ventrues sans épines avec des spires au sommet aplaties et basses (Fig. 19). Chez cet escargot de mer, la coquille présente une ouverture large de couleur rouge-orangé (Lamare et Müller, 2008 ; Meziane et Kerfouf, 2018).

Il n'existe aucune corrélation entre la maturité sexuelle et la taille de la coquille chez l'escargot de mer *S. haemastoma* (Boulajfene et al., 2015a) ; *S. haemastoma* est un buccin prédateur relativement grand avec jusqu'à 80 mm de longueur de la coquille (Rossato et al., 2014).

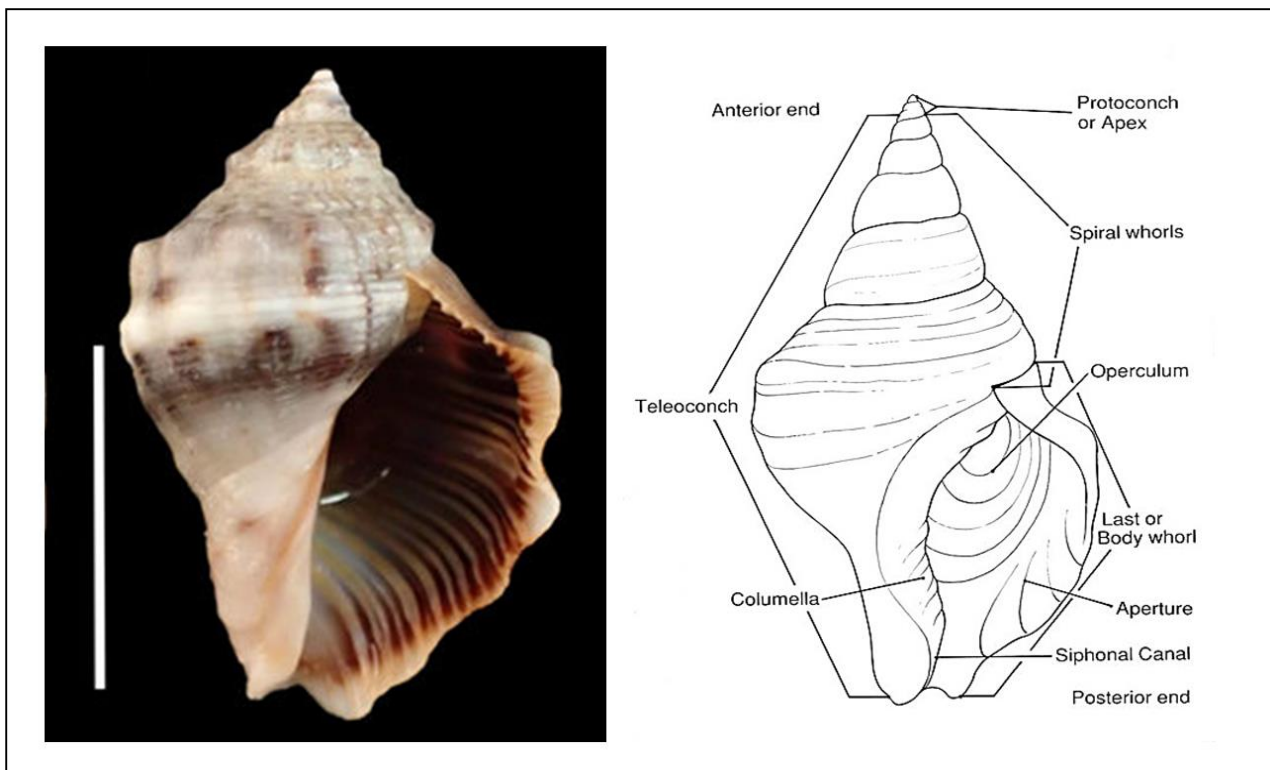


Figure 19: Coquille de *S. haemastoma* et anatomie externe (Poppe et Goto, 1992 ; Peazy et al., 2019).

5. Habitat

L'escargot prédateur *S. haemastoma* vit dans les littoraux rocheux et boueux (Chiavarini et al., 2003 ; Bendoula et al., 2017). Ce gastéropode préfère les bassins de marée intérieurs à marée basse et se trouve couramment dans la zone subtidale peu profonde (El Ayari et al., 2014 ; Madeira et al., 2018). En Méditerranée, cette espèce est généralement présente sur les côtes rocheuses peu profondes exposées aux vagues et, occasionnellement, dans des zones sablonneuses comme représenté dans la Fig. 20 (El Ayari, 2015).

S. haemastoma est principalement un gastéropode carnivore des rivages rocheux marins. Il est communément observé dans les zones intertidales, où il se déplace soit par voie directe, dite ditaxique, soit par ondulations alternées du pied (Papp et Duarte, 2001). On trouve également cette espèce sur les épaves submergées, les récifs d'huîtres et dans les zones boueuses. Il est important de noter l'absence d'un grand nombre de prédateurs connus de cet escargot, ce qui peut favoriser son abondance (Santos et Boehs, 2011).

S. haemastoma privilégie les habitats où des refuges sont disponibles, notamment dans les zones peu profondes infralittorales et intertidales rocheuses (Rilov et al., 2002). La présence de ce muricide prédateur est relativement rare dans les endroits où les proies, comme les bivalves, sont abondantes mais les abris insuffisants. Ainsi, la disponibilité de refuges constitue un facteur clé dans la répartition de ces escargots marins (Rilov et al., 2005).

Certains paramètres abiotiques, notamment la structure de l'habitat, la disponibilité des proies et le degré d'exposition aux vagues, jouent un rôle important dans leur dispersion spatio-temporelle de *S. haemastoma*. La zone du milieu intertidale est généralement là où cet escargot est le plus abondant par rapport à la zone basse intertidale et haut ou presque une absence totale a été reporté ceci reflète la préférence d'un habitat riche en proies et faible en stress due à l'exposition aux vagues (Ramirez et al., 2009).



Figure 20 : *S. haemastoma* regroupées dans un rocher photo prise le 26 déc. 2021 (www.inaturalist.org).

6. Alimentation et techniques de prédation

Le prédateur carnivore marin *S. haemastoma* consomme principalement certains types de mollusques et crustacés notamment *Cirripèdes*, et patelles (Fig. 21) ; parmi les espèces considérées comme étant l'alimentation principale de cet escargot prédateur on trouve les bivalves comme les moules *Brachidontes pharaonis* et *Mytilaster minimus*, les huîtres tel que *Crassostrea virginica*, et palourde *Rangia cuneata*.

S. haemastoma peut également se nourrir d'autres bivalves comme *Perna perna*, *Donax variabilis* et *Mercenaria mercenaria*, d'un autre côté les phénomènes de cannibalismes peuvent arriver envers des congénères de taille largement inférieures (Watanabe et Young, 2005 ; Giacoletti et al., 2016 ; Pusack et al., 2018).

Les habitudes alimentaires de *S. haemastoma* sont un vrai dilemme pour l'industrie commerciale des huîtres et des moules bivalves à cause de leur prédation par celui-ci (Watanabe et Young, 2005 ; Butler, 1985).

La consommation d'huître par *S. haemastoma* permet leurs développements et leurs croissances, cependant ils consomment rarement les huîtres de taille largement supérieure pour des raisons peut être due à leur incapacité (Brown, 1996).

S. haemastoma adopte des techniques de prédatons très efficaces, il utilise la radula (similaire a une langue projectible avec des dents) pour ouvrir les coquilles des palourdes et huîtres (Cas des patelles, représenté dans la Fig. 22), puis ensuite assurer la digestion de leurs viandes ensuite absorber le contenu et c'est principalement là, le moyen comment se nourris *S. haemastoma*. La population de cette espèce assez large sont suspectées de dévaster les autres récifs d'huîtres cependant dans certains régions leurs abondances est en plein baisse selon ce qui a été reporté dans la littérature assez limitée concernant ces escargots marins (Overstreet, 1978 ; Rilov et al., 2002).

Dans l'étude de Rocha-Barreira et al. (2004) dans les conditions contrôlées au laboratoire, les méthodes de prédatons de *S. haemastoma* sur l'huître *Crassostrea rhizophorae* ont été évalué en vue de déterminer le comportement de ce prédateur marin. Les résultats ont indiqué que le comportement prédateur de l'escargot peut être divisé en plusieurs actions reliées l'une à l'autre successivement en commençant par la détection très rapide et l'approche de la proie qui elle a duré entre 30 à 1 h de temps avec une approche indirecte dans laquelle les mouvements de siphon sont observés.

Ensuite le contact avec la proie ou *S. haemastoma* à chercher une zone idéale de pénétration se finissant par la détermination du site s'attaque adéquat. Puis le prédateur a utilisé ça trompe en vue de la pénétration vers sa proie par la coquille avec une libération de mucus pour en fin entamer la phase d'ingestion de l'huître en question.

Plusieurs types de perforation de coquille ont été observé notamment perforation complète en demi-lune, perforation circulaire complète et perforation irrégulière complète ou incomplète. Ces résultats restent pratiquement les seuls à avoir décrit par expérimentation le comportement de prédation de l'escargot *S. haemastoma* (Rocha-Barreira et al., 2004).

Comme la plupart des Néogastéropodes *S. haemastoma* peut libérer des substances chimiques qui assure la maîtrise de la proie, hormis les conotoxines (type de neurotoxines) les propriétés d'autres substances sont inconnues ; certaines données indiquent des effets paralysants provenant de certains types extraits de glandes de l'intestin antérieur chez *S. haemastoma* (Cioni et al., 2011).

Cet escargot marin utilise une méthode très connue chez les espèces prédatrices similaire pour localiser leur proie, il s'agit de la chimio réception par le biais des multiples organes chimio sensorielles comme l'osphradium ; *S. haemastoma* localise ces proies à l'aide d'indice chimique à travers l'eau même si ces signaux chimiques peuvent être perturbé par les diverses turbulences dans l'eau. Dans ce cas de figure les indices chimiques sont détectés par l'eau qui est aspirée par le siphon de ces escargots puis il passe sur l'osphradium l'organe chimio sensoriel très développé (Byron et Smee, 2012).

7. Reproduction

L'escargot de mer *S. haemastoma* à une longue durée de vie pouvant varier de 1 jusqu'à 20 ans successivement avec une absence de différence entre les deux sexes dans la morphologie de la coquille (Butler, 1985) ; il n'existe aucune corrélation positive entre la maturité sexuelle de cette espèce et la taille de la coquille (Boulajfene et al., 2015a).

Ces espèces peuvent pondre un grand nombre de capsules allongées de 2 cm allant de 20 à 80 en nombre durant la période d'accouplement (d'avril à septembre), ces capsules referment un nombre important d'œufs approximatif à 1700 jusqu'à 7000 (Fig. 23 et Fig. 24). Il faut noter le fait que *S. haemastoma* est une espèce qui possède un cycle de vie typiquement bento-pélagique et les adultes ont une faible dispersion et activité et sont benthiques, pendant la période d'accouplement ils se déplacent vers les zones intertidales pour s'accoupler (Lahbib et al., 2011 ; El Ayari et al., 2014 ; El Ayari, 2015 ; El Ayari et al., 2017).



Figure 21 : *S. haemastoma* se nourrissant de patelles (litoraldegranada.ugr.es).



Figure 22 : Trou résultant de la prédation d'une patelle par *S. haemastoma* (litoraldegranada.ugr.es).

La ponte de *S. haemastoma* se présente comme des amas de forme hexagonal de capsule située généralement dans les roches (Bouzahouane, 2018). La couleur de ces capsules est généralement jaune qui peut prendre une teinte noire le résultat est généralement la libération de larve dans l'eau qui se transforme en juvéniles puis migre vers le fond de la mer (Otero et al., 2013).

Ces espèces marines ont une phase larvaire plutôt longue (Stickle et Zhang, 2003). Les larves de *S. haemastoma* ont une grande durée de vie, ils sont appelés « téléplanique » et ont la capacité de migrer et se disperser sur des distances larges ; dans les conditions contrôlées au laboratoire une estimation de la durée nécessaire au développement larvaire pélagique d'environ 2 à 3 mois (Claremont et al., 2011 ; Appeltans et al., 2012 ; El Ayari et al., 2017).



Figure 23 : Capsule de *S. haemastoma* (litoraldegranada.ugr.es).



Figure 24 : Capsule de *S. haemastoma* prise par Lauren colombet en 2017 (www.bioobs.fr).

8. Classification de *S. haemastoma*

8.1. Taxonomie

Selon les bases de données du World Register of Marine Species (WoRMS) et du Catalogue of life (Col) la Position systématique de l'espèce *S. haemastoma* est comme suite :

Règne : Animal

Embranchement : Mollusca (Cuvier, 1795)

Classe : Gastropoda (Cuvier, 1797)

Sous-classe : Caenogastropoda (Cox, 1960)

Ordre : Neogastropoda (Thiele, 1929)

Famille : Muricidae (Rafinesque, 1815)

Sous-famille : Rapaninae (Gray, 1853)

Genre : *Stramonita* (Schumacher, 1817)

Espèce : *S. haemastoma* (Linnaeus, 1767)

8.2. Embranchement des mollusques

Avec un nombre supérieur à 50,000 espèces identifiées et bien décrites et environ 200,000 espèces vivantes, l'embranchement des mollusques (Mollusca) fait partie des plus importants, large et divers de tout le règne animal ; la majorité des organismes vivants appartenant à l'embranchement des mollusques sont marins avec une diversité morphologique très varié et plusieurs classes selon les caractéristiques de ces espèces (Gosling, 2015).

D'un point de vue anatomique interne et externe les mollusques ont des similitudes communes, ils sont des espèces à corps mou protégé par une coquille dure ; Les organes internes des mollusques sont généralement contenus dans des tissus repliés à l'intérieur de leur coquille, appelée manteau. Par ailleurs les espèces de cet embranchement sont distinguées par la présence d'un pied d'origine musculaire qui permet la locomotion, malgré la morphologie plutôt basique les mollusques sont constitués d'une grande variété de formes (Gosling, 2015).

Les mollusques font partie des organismes vivants les plus connus de la planète. Ils ont une importance économique et commerciale, mais aussi écologique, en raison de leur large éventail d'exploitations, notamment en tant que source alimentaire, comme les escargots et les moules, ou encore pour leur valeur commerciale, comme l'exploitation de ces derniers dans la production de perles (Wanninger et Wollesen, 2019).

8.3. Classe des gastéropodes

Chez les mollusques et le très grand nombre d'espèces approchant les 100,000 une classe représente pratiquement trois quarts du nombre total d'espèce, il s'agit de la classe des gastéropodes qui est la plus large aux seins de l'embranchement des mollusques (Brown et Lydeard, 2010). Les groupes des mollusques sont représentés dans le tableau 4.

Tableau 4: Les groupes majeurs des mollusques (classes et subdivisions) (Haszprunar et Wanninger, 2012).

1. Solénogastres	Groupe de 280 espèces de vers marins
2. Polyplacophore	Groupe d'environ 1000 espèces marines tel que les chitons
3. Monoplacophores	Environ 30 espèces connues vivant dans les profondeurs marines parmi eux l'espèce <i>Tryblidia</i>
4. Bivalves	Comprends plus de 20,000 espèces marines à coquille sans appareil buccale parmi eux moules et palourdes
5. Scaphopodes	Comprend 800 espèces totalement marines, comme l'espèce appelée en anglais « tusk shell »
6. Gastéropodes	La classe la plus grande et diverse de mollusques avec 100,000 espèces qui présentent des formes diverses de coquilles parmi eux les escargots, les patelles et les buccins.
7. Céphalopodes	Sont des espèces exclusivement marines avec 30,00 espèces et environ 1000 espèces existantes comme les sépias, calmars et poulpes
8. Aculifera	C'est la subdivision majeure des mollusques qui est composée des Solenogastres, caudofovéates et polyplacophores

Pour l'anatomie interne et externe des gastéropodes, la masse viscérale (ou corps mou) est généralement protégé à l'intérieure d'une coquille chez toutes les espèces de cette classe ; la locomotion est assurée par la présence d'un pied cilié d'origine musculaire, les gastéropodes possèdent des coquilles diverses et multiples en forme et disposition.

Les gastéropodes possèdent généralement les coquilles d'enroulement par exemple chez certaines espèces de cette classe ils possèdent des coquilles sous développées d'autres n'ont pas et en distinction les espèces les plus évoluées ont tendance à présenter des coquilles asymétriques tandis que les moins évoluées des coquilles symétriques (Mai, 2014).

Les gastéropodes se nourrissent souvent de petits organismes et d'algues, ils peuvent exister des espèces prédateurs et carnivore, cette classe possède la glande digestive qui permet la digestion de leurs nourriture avec les sécrétions enzymatiques multiples ; les organismes aquatiques et les caenogastéropodes (dont *S. haemastoma*) possèdent des yeux fixés à la base de leur tentacules contrairement aux autres gastéropodes terrestres qui présentent les yeux à l'extrémité de ces derniers (Brown et Lydeard, 2010 ; Mai, 2014).

8.4. Ordre des Néogastéropodes

Les Néogastéropodes font partie des mollusques gastéropodes, cet ordre très connu et bien étudié englobe plusieurs familles différentes tel que les escargots dit pourpre (Muricidae), escargots de cône (Conidae), escargots olive (Olividae) et bulots (Buccinidae) ; l'une des majeures caractéristiques des espèces appartenant à cet ordre est leurs capacités de prédateurs qui ont attribué à cet ordre une position de dominateur au sein des chaînes alimentaires benthiques (Modica et Holford, 2010). Les trois familles majeures des Néogastéropodes sont représentées dans la Fig. 25.

L'anatomie des Néogastéropodes se caractérise par la présence d'un intestin très spéciale avec une trompe appelée en anglais (proboscis), des glandes salivaires primaires et secondaires, la glande de Leiblein, une glande anale et plusieurs glandes radulaires ; la grande majorité des espèces de l'ordre des Néogastéropodes sont des carnivores qui adoptent des stratégies de prédatons très diverses et développées par exemples les *Muricidae* qui se nourrissent souvent des bivalves gastéropodes et les petits crustacées (Modica et Holford, 2010).

Parmi les stratégies de prédation on parle de la sécrétion de neurotoxines par exemple chez notre modèle d'étude *S. haemastoma* qui a la capacité de produire des toxines paralysantes dans les glandes salivaires pour le but de prédation (Modica et Holford, 2010).

8.5. Famille des *Muricidae* ou Murex

Les *Muricidae* sont parmi les familles des plus connues de l'embranchement des mollusques, les murex sont principalement un large inventaire de 2000 espèces d'escargots marins prédateurs caractérisés par leurs coquilles uniques en forme et assez divers ; la famille des *Muricidae* a un impact économique élevé à cause de leurs coquilles ornées, leur opercule (operculum) mais surtout à cause du pourpre extrait des espèces de cette famille de mollusques marins (Benkendorff et al., 2015).

Les anciennes civilisations ont exploité les *Muricidae* en vue de l'extraction du pourpre et certainement pour des raisons alimentaires et cette famille est bien connue depuis les temps anciens ; les *Muricidae* secrètent une variété de produits bioactifs tel que les indoles bromés à activité anticancéreuse et anti-inflammatoire ceci peut expliquer les usages anciens de cette famille pour des visé thérapeutiques (Benkendorff et al., 2015).

Les femelles des *Muricidae* sont caractérisées par la ponte d'un grand nombre de capsules et la grande fécondité qu'elles possèdent, la majorité des adultes de cette famille n'ont pas une croissance élevée et en moyenne 90 % des juvéniles meurent au cours de la première année d'existence cependant l'espérance de vie des juvéniles provenant des femelles plus petites sont susceptibles de terminer leurs premières années de vie (Spight et al., 1974).

8.6. Sous famille des *Rapaninae*

Parmi la grande famille des Néogastéropodes appartenant à l'embranchement des mollusques on trouve une sous famille qui figure parmi celles les plus connue et remarquable il s'agit de la sous famille des *Rapaninae* ; cette dernière est constituée de plusieurs espèces d'escargots prédateurs actifs marins qui jouent un rôle vital dans l'écologie des autres communautés des littoraux et leurs structures, les *Rapaninae* sont des espèces qui habitent principalement dans les zones intertidales et subtidales peu profondes (Claremont et al., 2013).

Les *Rapaninae* sont importants sur le plan écologique et économique à cause de la considération de certaines espèces appartenant à cette sous famille comme des espèces ravageurs et envahissante dont l'exemple ultime est l'espèce *Rapana venosa*, cependant des bienfaits distincts sont attribués aux *Rapaninae* due à l'exploitation pour l'extraction de la pourpre et certains produits bioactifs pour usages pharmaceutiques (Claremont et al., 2013).

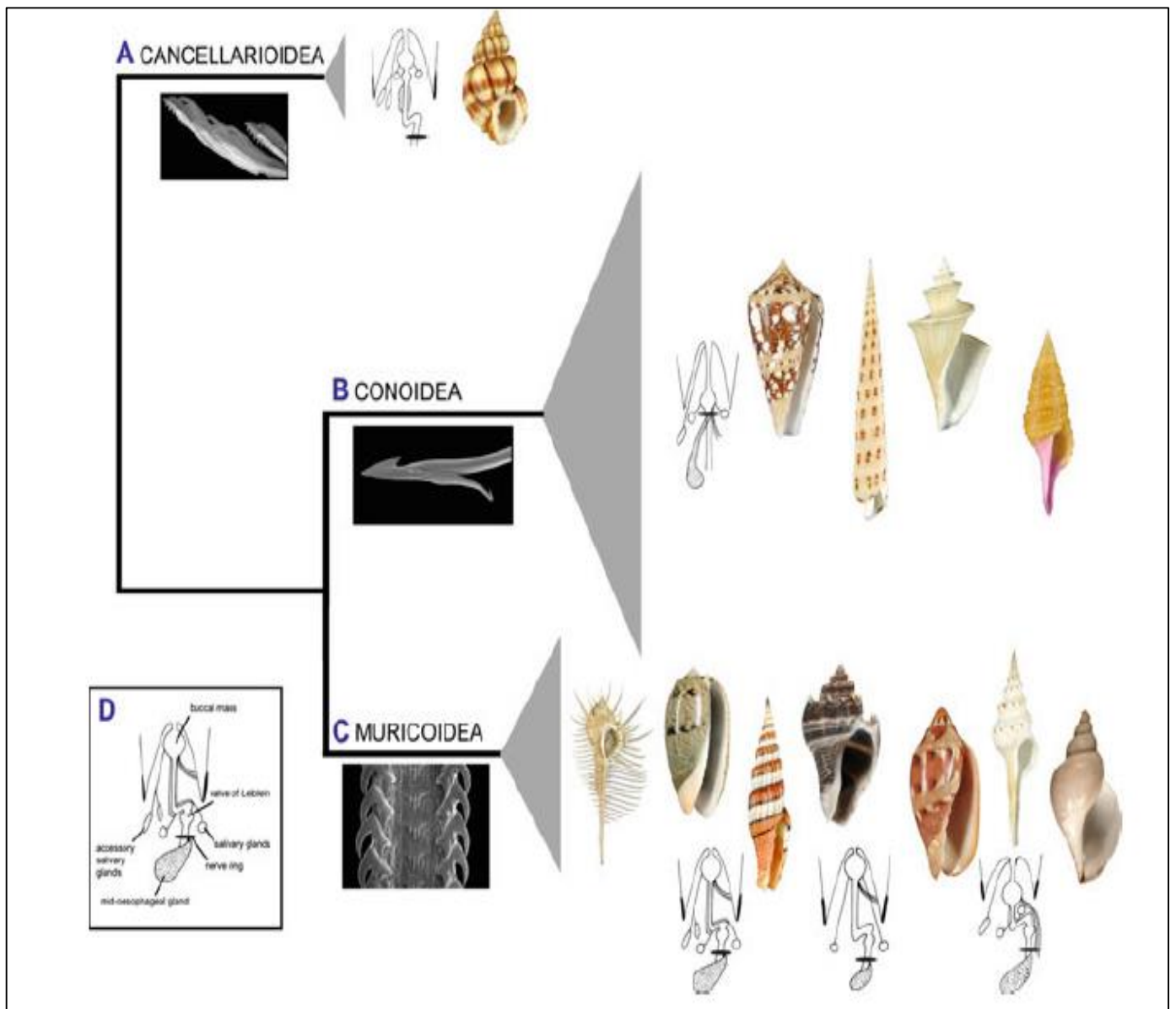


Figure 25 : Les trois familles majeures des Néogastéropodes (Modica et Holford, 2010).

Les espèces de cette sous classe sont caractérisées par leurs caractère carnivore et prédateurs, les *Rapaninae* adoptent des techniques de prédatons comme la perforation des coquilles de leurs proies, et digestion (comme expliqué dans la partie méthode de prédation de *S. haemastoma*) ; certains *Rapaninae* peuvent habiter les zones proches côtières ce qui nécessite des résistances au stress multiple cependant ils ont tendance à trouver refuge loin des prédateurs dans ces zones l'abondance en alimentation (Vermeij et Carlson, 2000).

9. Applications et usages de *S. haemastoma*

L'espèce *S. haemastoma* est une espèce qui fut historiquement mais aussi actuellement importante et bien connue à cause des usages de cette espèce dans l'extraction de la pourpre (couleur rouge violacé et élément majeurs de l'antiquité de la méditerranée). La phénicie ou actuellement le pays arabe Liban était le lieu où l'industrie la plus remarquable de la pourpre était le plus réputé ; Appelée dès lors 'pourpre tyrrhénien', en rapport avec la ville où cette pratique d'extraction du pourpre (vers 1200 av. J.-C.) rendit la cité de Tyr très célèbre dans les temps de l'Antiquité (Kaplan, 2006 ; Garcia, 2017).

La pourpre fut un élément très précieux qui n'était par réservé à toutes les personnes de cette antiquité au contraire il était plutôt réservé principalement à la royauté de cette époque ; appelée aussi pourpre royale, il fut considéré comme un symbole de liberté et royauté. Selon certaines sources 8000 à 10,000 coquilles étaient nécessaires à la production de petites quantités de pourpre (Kaplan, 2006 ; Bouzahouane, 2018).

Actuellement dans notre époque récente les usages de *S. haemastoma* sont principalement pour des raisons alimentaires, il existe une industrie commerciale pour cette espèce, de plus ces escargots de mer sont collectés pour alimentation dans la méditerranée tel qu'en Espagne et Afrique du nord mais aussi dans l'Amérique du nord et sud comme dans le Brésil et les USA (Santhanam, 2019).

10. *S. haemastoma* comme espèce bio-indicatrice

Les Gastéropodes de mer *S. haemastoma* ont souvent été utilisés dans un cas spécifique comme indicateur des effets de deux types de composés organoétains qui sont le tributylétain (TBT) (Limaverde et al., 2007 ; Toste et al., 2013).

Ces derniers ont été des produits largement utilisés dans les peintures des coques des navires pour les protéger et empêcher les organismes aquatiques de se fixer sur la coque. Cette espèce est prouvée comme excellent indicateur de la pollution aux (TBT) à cause de leurs sensibilités avec l'observation des phénomènes d'imposex c.-à-d. la masculinisation chez les femelles de *S. haemastoma*. D'un autre côté ces gastéropodes sont considérés comme des excellents bioindicateurs à cause de leur abondance, la distribution géographique très large, la collecte plutôt facile et la possibilité de réaliser plusieurs analyses biochimiques et autres (Bouzhouan et al., 2018 ; El Ayari et al., 2018).

Il existe un nombre élevé de publications qui visent à évaluer l'imposex due aux organoétains chez *S. haemastoma* (Fernandez et al., 2002 ; Limaverde et al., 2007 ; Quadros et al., 2009 ; Santos et al., 2011 ; Rossato et al., 2014 ; Boulajfene et al., 2015b ; El Ayari et al., 2018 ; Sierra-Marquez et al., 2019).

Cependant en termes d'étude écotoxicologique sur d'autres polluants ou contaminants pratiquement un très faible intérêt a été donné à cette espèce comme étant une espèce de bioindicateur idéal. Dans la littérature actuelle on peut retrouver selon les recherches les plus affinées seulement l'étude de Bouzahouane et al. (2018) en valorisation de ces gastéropodes comme indicateurs de la pollution aux NPs avec une conclusion de la pertinence de ce gastéropode en tant qu'indicateur vis-à-vis la pollution par les éléments trace métallique.

Une autre étude de Di Bella et al. (2018) a reporté que l'utilisation de *S. haemastoma* comme espèce sentinelle concernant la pollution aux métaux lourds arsenic, cadmium, nickel et chrome, a démontré que les concentrations de ces métaux lourds sont plus élevés que ceux indiqués précédemment par les anciennes études pour d'autres *Muricidae* de la méditerranée, il a été conclu dans cette étude que ces gastéropodes sont des espèces sentinelles et indicateurs très prometteurs.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

1. Présentation de la zone d'étude

Le Golfe d'Annaba situé dans la ville d'Annaba sur le Nord-Est de l'Algérie est un bassin ouvert sur la mer méditerranéenne délimité par le cap Rosa ($8^{\circ}15'E$, $36^{\circ}58'N$) à l'Est et le cap de Garde à l'Ouest ($7^{\circ}47'E$, $36^{\circ}58'N$) à environ 40 km d'étendue et une profondeur maximale de 65 m ; l'identification et la collecte du modèle biologique sélectionné pour notre étude (*S. haemastoma*) a été effectuée dans un site localisé dans le Cap de Garde ($36^{\circ}58'04''N$, $7^{\circ}47'32''E$).

Au sujet de la présence ou non de source de contamination et pollution au niveau du Cap de Garde, plusieurs études sur terrains confirment l'absence de n'importe quel type de pollution sur le site avec en plus l'absence d'activité industrielle proche de la région du Cap de Garde aussi aucune source de rejet de tous type proche. Au niveau démographique seule une très faible habitation des lieux est constatée avec pratiquement seulement une présence dans le bain pendant la saison estivale (Belabed et al., 2008 ; Bouzahouane et al., 2018 ; Bouzahouane, 2019).



Figure 26: Le Cap de Garde ($36^{\circ}58'04''N$, $7^{\circ}47'32''E$) Golfe d'Annaba.

2. Récolte du modèle biologique *S. haemastoma*

Un site de collecte situé dans le Cap de Garde a été choisi. Les raisons principales de ce choix sont : la disponibilité et l'abondance de ces escargots marins, la possibilité de collecter la quantité nécessaire à l'étude mais surtout d'un point de vue toxicologique l'absence de source de stress ou de contamination et donc l'assurance d'espèce modèle non-contaminée par aucune source de pollution.

Les escargots marins *S. haemastoma* (Fig. 27) ont été récoltés par plongée marine sur le littoral du Cap de Garde à une profondeur maximale de 3m, ensuite immédiatement transportés dans les conditions de laboratoire pour la phase d'adaptation.

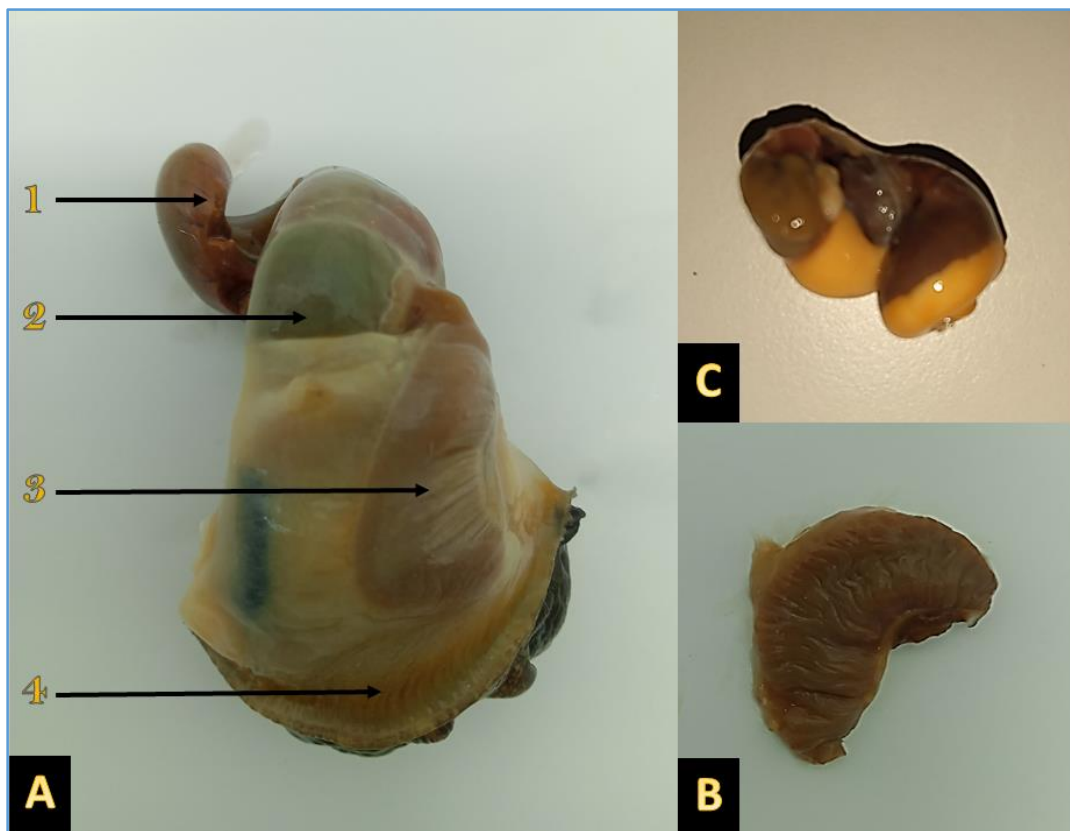


Figure 27: A : Masse molle de *S. haemastoma* -1 Glande digestive -2 rein 3- Ctenidium 4- manteau. B : Branchies. C : Glande digestive (Gonade en jaune) (Photo pers).

3. Conditions d'élevage des escargots *in vivo*

De retour au laboratoire et immédiatement après la récolte, les escargots marins ont été mis sous conditions d'élevage au laboratoire dans des bacs en plastiques (43cm×32cm×25cm) dans une photopériode de 12 :12 H (lumière : sombre), les bacs ont été remplis avec de l'eau de mer naturelle approvisionnée directement de l'Est du littoral d'El Kala (Wilaya d'El Tarf, Algérie) dans un site nommée la Montagné (36°53'59''N, 8°28'12.93''E).

Les escargots ont été dispersés de façon aléatoire dans les bacs et maintenu sous aération continue à l'aide de pompe à oxygène pour aquariums, les paramètres physico-chimiques de l'eau de mer ont été mesurés à l'aide d'une valise multi-paramètres (Horiba®), la température, pH, Salinité, Conductivité, oxygène dissous et turbidité ; les résultats sont présentés dans le tableau 05.

Tableau 5: Valeurs des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer.

Température	pH	Salinité	Oxygène dissout	Conductivité	Densité	TDS
24 °C	8.2	34.4 ppt	8.57 mg/L	52.3 ms/cm	23.3 σt	31.4g/l

3.1. Phase d'adaptation

Les escargots ont été maintenu sous élevage dans les conditions de laboratoire pendant une période de sept jours, afin d'assurer une acclimatation et dépuración idéale ; les paramètres de l'eau ont été constamment surveillés et maintenus dans les valeurs initiales pour éviter tous types de stress. Durant les trois premiers jours de la phase d'acclimatation, l'eau de mer a été changée chaque jour pour les bacs et après cela chaque deux jours.

3.2. Protocole expérimental d'exposition

3.2.1 Sélection des nanoparticules

Deux types de nanoparticules ont été choisis pour effectuer cette étude, l'oxyde de chrome (Cr_2O_3) et l'oxyde d'aluminium (Al_2O_3) (Fig. 28). Les deux NPs ont été obtenues du centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques (CRAPC, Bou Ismail, Algérie) sous forme de nano-poudre.

La caractérisation de ces NPs a aussi été effectuée au niveau du CRAPC, avec une étude physico-chimique pour déterminer plusieurs paramètres tels que la taille, le diamètre hydrodynamique et la forme cristalline de chaque NPs.

3.2.2 Préparation de solution stock de NPs

Avant l'exposition des escargots aux nanoparticules (NPs), il est essentiel de préparer des solutions stock afin d'éviter une dispersion directe des NPs sous forme de poudre dans l'eau. Pour chaque type de nanoparticule (nano-chrome et nano-aluminium), des solutions stock à 1 g/L ont été préparées en utilisant de l'eau ultrapure MilliQ de type I. Ces suspensions ont ensuite été soumises à une ultrasonication dans un bain à ultrasons (50 kHz) pendant 30 minutes afin d'assurer une dispersion homogène. Les solutions stock obtenues ont été conservées à l'obscurité jusqu'au moment de l'utilisation.

À chaque point d'exposition, une nouvelle dispersion des NPs a été réalisée par sonication suivie d'une agitation manuelle immédiate, juste avant l'introduction des escargots et avant chaque renouvellement d'eau dans les différents groupes exposés, garantissant ainsi une distribution optimale des nanoparticules tout au long de l'expérimentation.

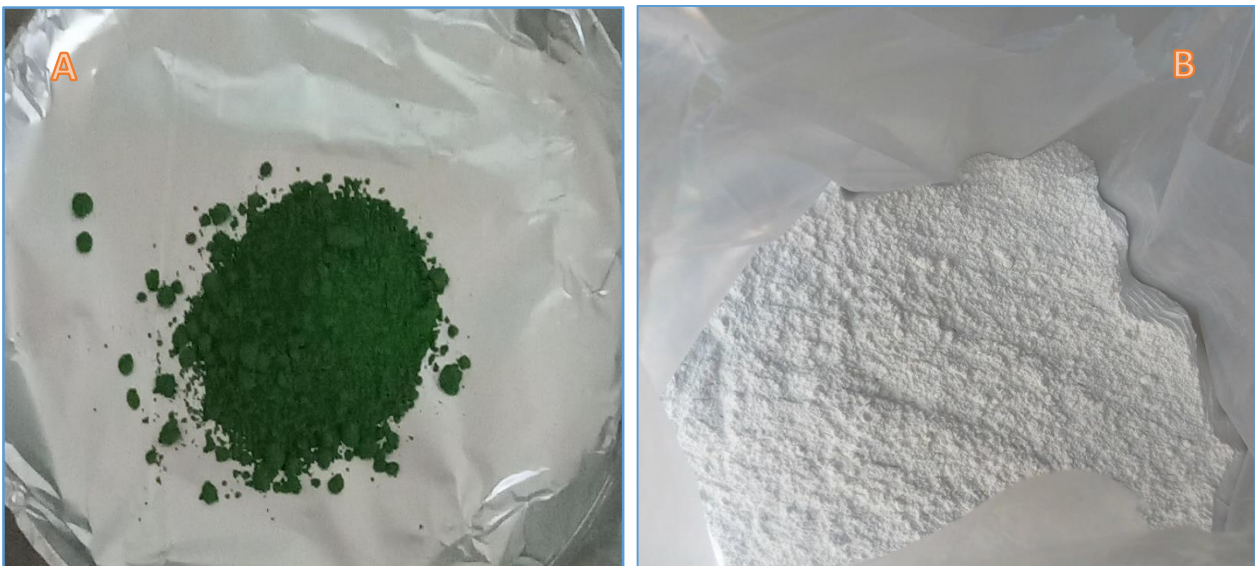


Figure 28: A : Nano-poudre d'oxyde de chrome (Cr_2O_3), B : oxyde d'aluminium Al_2O_3 (Photo pers).

3.2.3 Phase d'exposition *in vivo*

Après la fin de la période d'acclimatation des escargots, la totalité des individus ont été dispersés dans des bacs en plastique de façon aléatoire à raison de 20 individus par lot (Fig.30-31) ; les escargots ont été maintenus dans les mêmes conditions que la phase d'adaptation (aération continue et cycle de 12 :12 h lumière/obscurité) avec une surveillance constante des paramètres de l'eau notamment la Température et l'oxygène dissous. Chaque bac a été rempli avec 3L d'eau de mer naturelle, avec un renouvellement chaque 48 h de l'eau de mer.

Avec un total de 08 Lots dans l'expérimentation d'exposition, selon l'ordre suivant :

- ✚ Lot 01 (témoin) : le Lot témoin a été maintenu dans les mêmes conditions que les Lots traités et n'a reçu aucune nanoparticule.
- ✚ Lot 02 (C1) : exposé à une concentration de 1 mg/L de NPs de Chrome (Cr_2O_3)
- ✚ Lot 03 (C2) : exposé à une concentration de 2,5 mg/L de NPs de Cr_2O_3
- ✚ Lot 04 (C3) : a reçu une concentration de 5 mg/L de NPs de Cr_2O_3
- ✚ Lot 05 (C1) : exposé à une concentration de 1 mg/L de NPs d'alumine (Al_2O_3)
- ✚ Lot 06 (C2) : a reçu une concentration de 2,5 mg/L de NPs d' Al_2O_3
- ✚ Lot 07 (C3) : a reçu une concentration de 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3

Les escargots ont été exposés aux deux NPs pendant une durée subaiguë de 28 jours, pour chaque NPs de notre étude trois concentrations ont été choisies (1, 2.5 et 5 mg/L). La méthode d'exposition appliquée pour cette étude consiste en une dilution des volumes adéquats à partir des solutions stock préalablement préparées afin d'atteindre chaque concentration pour chaque lot de cette étude.



Figure 31: Le Gastropode Muricidae *S. haemastoma* (Photo pers).



Figure 30: Mise en élevage de *S. haemastoma* sous conditions de laboratoire (Photo pers).



Figure 291: Exposition des individus aux Nanoparticules par dispersion directe. (Photo pers)

4. Dosage des biomarqueurs du stress oxydant

4.1. Préparation des échantillons

Pour chaque période de temps d'exposition (7 jours, 14j et 28j) le nombre adéquat d'escargots de mer a été sélectionné et sorti des aquariums pour tous les Lots témoins, exposés à l'oxyde de chrome, et exposés à l'oxyde d'aluminium ; les individus sélectionnés ont été immédiatement disséqués suite à l'obtention de leur masse molle après la cassure de leur coquille physiquement. Deux organes ont été sélectionnés pour les analyses biochimiques qui sont la glande digestive et le cténidium (ou branchies), les organes ont été instantanément conservés sous 4 °C en attendant la phase d'homogénéisation.

4.2. Homogénéisation des tissus

Les glandes digestives et les branchies obtenus de chaque individu pour chaque période de temps ont été instantanément broyés en utilisant un bain à ultrason (50 KHz) ; pour le dosage du Gluathion réduit (GSH) les organes ont été homogénéisés avec 10 mM d'EDTA (1:3 v/v) ; pour le dosage des enzymes antioxydants (GST, GPX, CAT et SOD) le tampon Tris-HCl (10Mm, pH : 7.4) a été utilisé comme tampon d'homogénéisation.

Pour l'estimation des Malondialdéhydes (MDA), les échantillons des tissus ont été homogénéisés avec 50 mM Tris-HCl ; pour la détermination de l'activité de l'AChE le tampon phosphate (100Mm, pH : 7) a été utilisé pour l'homogénéisation des tissus : puis les homogénats ont été centrifugés à 9000 g pendant 20 minutes (4 °C) avec une centrifugeuse réfrigérée Sigma®.

Pour le dosage de la métallothionéine (MT), les échantillons des deux organes ont été broyés par un bain à ultrason avec le Tampon Tris-HCl (20Mm), Saccharose (0.25 M) et Leupeptine (0.006 Mm) à raison de 1/3 v : v ratio, ensuite les homogénats ont été centrifugé à 20,000 g pendant 30 minutes à 4 °C.

Tous les surnageants ont été immédiatement conservés au congélateur à -80 °C jusqu'à la réalisation des dosages.

4.3. Dosage des protéines

Les différentes concentrations des biomarqueurs enzymatique et non enzymatique sont généralement exprimées par rapport à la proportion en protéines, pour cette raison la mesure des concentrations en protéines dans les échantillons est une phase primordiale.

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode standard et universellement appliquée de Bradford (1976), cette méthode colorimétrique est basée sur la réaction et attachement d'un colorant bleu appelé bleu de Coomassie (G250) avec les lots cationiques des protéines, cette réaction est directement proportionnelle à la concentration de protéines contenues dans un échantillon déterminé par spectrophotométrie. Pour ce dosage l'élaboration d'une gamme d'étalonnage à six points (0, 0.2, 0.3, 0.6, 0.8 et 1 mg/ml) (Fig. 31) a été effectuée en utilisant l'albumine du sérum bovin (BSA) comme standard ; le protocole utilisé est comme suite :

- ✚ Prélèvement de 100 μ l du surnageant
- ✚ Ajout de 4 ml du réactif protéique (BBC)
- ✚ Agitation au vortex pendant quelques secondes
- ✚ Mesure de l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 595$ nm
- ✚ Traçage de la courbe d'Etalonnage : Absorbance = f (concentrations de protéines)
- ✚ Les concentrations en protéines sont déduites en se basant sur la courbe d'étalonnage BSA en tenant compte des facteurs de dilution initiale
- ✚ La proportion de protéines est exprimée en mg/ml

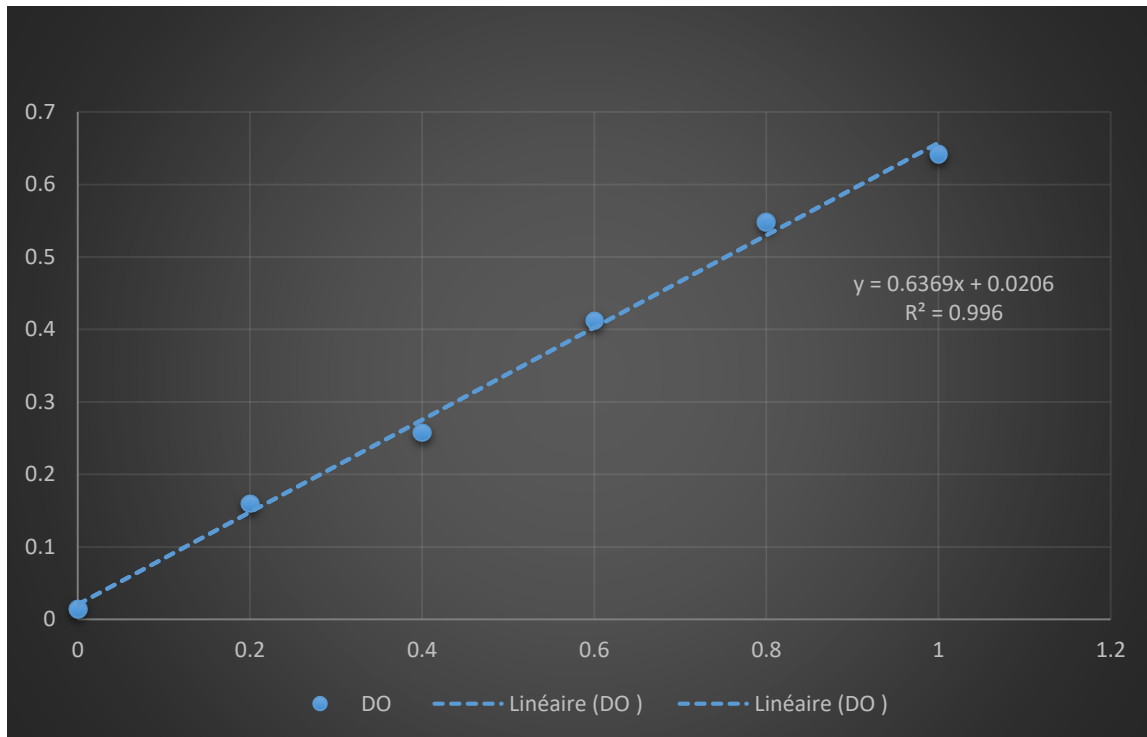


Figure 322: Courbe d'étalonnage des protéines (BSA)

4.4. Dosage du Glutathion réduit (GSH)

Le dosage du Glutathion réduit (GSH) a été effectué par la méthode de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) selon la méthode décrite par Weckbecker et Cory (1988) ; cette méthode de dosage est fondée sur la mesure spectrophotométrique de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique, produit direct de la réduction du DTNB par les groupements thiol (-SH) du glutathion. Cette méthode de dosage nécessite donc une déprotéinisation préalable pour conserver uniquement les groupements thiol du GSH.

Une gamme d'étalonnage standard du GSH a été élaborée pour la détermination des taux du GSH, une gamme à six points a été réalisée (0, 20, 40, 60, 80 et 100 $\mu\text{mol/ml}$) en employant le Glutathion réduit (Sigma®) comme standard ; Le protocole de dosage du GSH utilisé comporte les étapes suivantes :

- ✚ Prélever 0,8 ml du surnagent.
- ✚ Déprotéinisation avec 0,2 ml d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25 %.
- ✚ Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- ✚ Centrifugation à 10,000 Rpm pendant 5 min à 4 °C
- ✚ Prélever 0,5 ml du surnagent.
- ✚ Ajouter 1 ml du tampon Tris-EDTA (0.4 M Tris-Hcl, 0.02 M EDTA), pH 9,6.
- ✚ Mélanger et ajouter 25µl de 10 mM DTNB préparé dans du méthanol absolu.
- ✚ Laisser pendant 5 min à température ambiante
- ✚ Lecture de l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 412$ nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le Tris-EDTA remplaçant le surnagent.
- ✚ Les taux de GSH sont obtenus par rapport à la courbe d'étalonnage et exprimés en nmol/mg de protéines.

4.5. Dosage de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST)

Le dosage de l'activité enzymatique de la GST a été réalisé selon la méthode de Habig et al. (1974), cette méthode est basée sur la réaction de conjugaison d'un substrat le 1-chloro, 2,4- dinitrobenzène (CDNB) et le glutathion réduit GSH comme cofacteur catalysé par la GST, la conjugaison du CDBN induit la formation d'une nouvelle molécule, le 1-(s-glutathionyl)-2,4-dinitrobenzene qui absorbe la lumière à une longueur d'onde $\lambda = 340$ nm.

Les étapes du protocole de dosage appliqué sont les suivantes :

- ✚ Prélever 50 µl du surnagent.
- ✚ Ajouter 1.05 ml du tampon Tris 100 mM
- ✚ Ajouter 50µl de CDBN (1mM).
- ✚ Ajouter 50µl de GSH (1mM).
- ✚ Agitation par vortex pendant quelques secondes

- ✚ L'activité enzymatique a été déterminée par mesure de l'absorbance à $\lambda = 340$ nm dans un intervalle de deux minutes contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.
- ✚ L'activité enzymatique du GST est déterminée avec un coefficient d'absorbance égale à $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- ✚ Les concentrations de GST sont exprimées en nmol/ mg de protéines et déduites selon la formule suivante :

$$AS : \frac{(\Delta DO/\text{min}) \times V_t \times F}{\epsilon \times L \times V_s \times C \text{ protéines}}$$

AS : Activité spécifique (nmol de CDNB conjugué formé/ minute/mg de protéines).

$\Delta DO/\text{min}$: Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

V_t : Volume total où est réalisée la mesure.

V_s : Volume du surnageant.

F : Facteur de dilution.

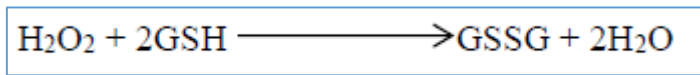
ϵ : Coefficient d'extinction molaire du CDNB ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L : Longueur de la cuve utilisée ($L = 1 \text{ cm}$).

C protéines : Concentration des protéines (mg/L).

4.6. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

Pour le dosage du Glutathion peroxydase (GPx), la méthode employée est fondée sur la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) catalysé par l'activité enzymatique du GPx en présence du GSH comme substrat de la réduction résultant la formation du disulfure de glutathion (GSSG), ce protocole a été décrit par Flohé et Günzler (1984) selon la réaction suivante :



Le mode opératoire appliqué pour le dosage du GPx est résumé dans les étapes suivantes :

- ✚ Prélever 0.2 ml du surnageant.
- ✚ Ajouter 0.4 ml de 0.1 mM du GSH.

- ✚ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (50 mM Tris et 150 mM NaCl).
- ✚ Incubation au bain marie à 25 °C, pendant 5 min.
- ✚ Ajouter 0.2 ml de 1.3 mM d'H₂O₂ pour initier la réaction puis laisser agir 10 minutes.
- ✚ Ajouter 1 ml d'une solution TCA à 1 % pour arrêter la réaction.
- ✚ Conservation dans la glace pendant 30 minutes.
- ✚ Centrifugation à 3000 Rpm pendant 10 minutes
- ✚ Prélever 0.48 ml du surnageant.
- ✚ Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS.
- ✚ Ajouter 0.32 ml de 1 mM DTNB
- ✚ Agitation du mélange au vortex pendant quelques secondes puis lecture des densités optiques à $\lambda = 340 \text{ nm}$

$$GPx \left(\mu \frac{\text{molGSH}}{\text{mg}} \text{protéine} \right) = \frac{(DO \text{ échantillon} - DO \text{ étalon}) \times 0.04}{DO \text{ étalon}}$$

- DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.
- DO étalon : Densité optique de l'étalon.
- 0.04 : Concentration de substrat (GSH).

4.7. Dosage de l'activité de la Catalase (CAT)

Le protocole de dosage de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT) employé dans notre étude est celui reporté par Beers et Sizer (1952), cette méthode est basée sur la capacité de la CAT à réduire l'H₂O₂ en molécules d'oxygène O₂ et d'eaux H₂O à 25 °C ; l'activité de la CAT est directement proportionnelle à la variation de l'absorbance à 240 nm de la réduction de l'H₂O₂.

Les étapes expérimentales suivies pour ce dosage sont les suivantes :

- ✚ Ajouter 1.9 ml de tampon phosphate (50 mM, pH : 7) directement dans une cuve en Quartz.

- ✚ Ajouter 100 µl du surnagent
- ✚ Ajout de 1 ml de H₂O₂ (5 mM) et mesure immédiate des variations des densités optiques à λ= 240 nm toutes les 15 secondes pendant une minute
- ✚ Les concentrations de CAT sont exprimées en µmol d'H₂O₂ réduit/minute/mg de protéines
- ✚ Une unité (U) de CAT est définie comme la proportion d'enzyme catalysant la dégradation de 1 µmol d'H₂O₂ par minute.

$$AS = \frac{(\Delta DO/min) \times V_t \times F}{\epsilon \times L \times V_s \times C \text{ protéines}}$$

AS : Activité spécifique (µmol d'H₂O₂ réduit/minute/mg de protéines).

Δ DO/min : Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

V_t : Volume total où est réalisée la mesure.

V_s : Volume du surnageant.

F : Facteur de dilution.

ε : Coefficient d'extinction molaire de l'H₂O₂ (ε = 0,04 mM⁻¹ cm⁻¹).

L : Longueur de la cuve utilisée (L = 1 cm).

C protéines : Concentration des protéines (mg/L).

4.8. Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)

Le dosage de l'activité enzymatique de la SOD a été effectué selon la méthode de l'inhibition de l'auto oxydation du pyrogallol par la SOD en présence de l'EDTA précédemment reporté par Marklund et Marklund (1974) ; cette méthode est universellement considérée comme l'une des plus fiables par rapport à d'autres essais.

Les étapes expérimentales utilisées sont décrites comme suite :

- ✚ Ajout de 850 µl du tampon Tris-HCl (50 mM, pH : 8,2).
- ✚ Additionner 20 µl du surnagent
- ✚ Ajout de 100 µl d'EDTA (20 mM)
- ✚ Ajout de 50 µl de pyrogallol (2,5 mM préparer dans 10 mM d'HCl)

- ✚ Mesure de la variation d'absorbance pendant 5 minutes chaque minute à une longueur d'onde $\lambda = 420 \text{ nm}$
- ✚ L'activité de la SOD est exprimée en unité (U) SOD / mg de protéine.
- ✚ L'activité de la SOD est calculée par la formule : $\text{SOD (U/mL)} = (\% \text{ inhibitions} \times 1000) / n \times 50$ et sachant que : $\% \text{ d'inhibition} = (\text{Abs Blanc} - \text{Abs test}) / \text{Abs test}$. n : mg de protéines présentes dans le volume de l'échantillon utilisé.

4.9. Dosage de l'Acétylcholinestérase (AChE)

L'activité de l'Acétylcholinestérase a été évaluée selon la méthode d'Ellman ; Selon le test d'Ellman et al. (1961), qui utilise l'acétylcholine (ACh) comme substrat pour l'acétylcholinestérase (AChE), la quantité d'acétylcholine dans l'organisme a été mesurée (AChE). L'hydrolyse enzymatique du substrat produit la thiocholine (SCh), qui produit une couleur jaune lorsqu'elle entre en contact avec le réactif d'Ellman (DTNB).

Le taux auquel (SCh) est produit est directement lié à l'activité enzymatique. 100 mm de tampon de phosphate, 75 mm d'acétylcholine, 10 mm de DTNB et 30 μl de surnageant ont constitué le volume d'essai final, qui était égal à 0,9 ml. En mesurant le changement des densités optiques (DOs) à 412 nm toutes les minutes pendant cinq minutes, l'activité enzymatique de l'AChE a été évaluée. Les concentrations d'AChE ont été exprimées en nmol/min/mg de protéine.

$$AS = \frac{(\Delta \text{ DO/min}) \times Vt \times F}{E \times L \times Vs \times C \text{ protéines}}$$

4.10. Dosage de la métallothionéine (MT)

Selon la méthode de Viarengo et al. (1997), le niveau de métallothionéine (Mt) a été évalué. La méthodologie de cet essai, qui a été initialement appliqué aux invertébrés marins,

consiste à fractionner le contenu cytotologique à l'aide d'éthanol et de chloroforme pour obtenir une fraction MT partiellement purifiée, qui est ensuite mesurée spectrophotométriquement en utilisant le réactif d'Ellman (DTNB) pour déterminer la teneur en thiol (-SH) à 412 nm. Par la suite, les taux de métallothionéine (Mt) ont été calculés en utilisant l'équation 1 mol Mt = 20 mol GSH et exprimés en nmol/g de tissu.

Les étapes expérimentales sont résumées dans les points suivants :

- ✚ Prélèvement d'1 ml de surnageant à doser ;
- ✚ Additionner 1.05 ml d'éthanol absolu froid (conserver à -20 °C) et 80 µl de chloroforme pur ;
- ✚ Vortexer le mélange pendant quelques secondes ;
- ✚ Centrifugation à 6000 xg pendant 10 min à 4 °C ;
- ✚ Récupérer le surnageant et ajout de 3 volumes d'éthanol absolu froid (conserver à - 20 °C) ;
- ✚ Additionner 1 mg d'ARN et 40 µl d'HCl à 37%
- ✚ Mélange au vortex pendant quelques secondes ;
- ✚ Conserver le mélange à - 20 °C pendant une 1 heure ;
- ✚ Centrifugation à 6000 xg pendant 10 min à 4 °C ;
- ✚ Elimination du surnageant ;
- ✚ Lavage du culot en utilisant 3 ml d'une solution de lavage (Tris-HCL, éthanol, Chloroforme) ;
- ✚ Centrifugation à 6000 xg pendant 10 min à 4 °C ;
- ✚ Elimination du surnageant puis séchage du culot dans l'étuve à 37 °C ;
- ✚ Ajout au culot 150 µl d'une solution NaCl et 150 µl d'une solution d'HCl contenant de l'EDTA ;
- ✚ Agitation au vortex pendant quelques secondes jusqu'à la remise en suspension totale du culot ;

- + Ajout de 4.2 ml du DTNB ;
- + Centrifugation à 3000 xg pendant 5 min ;
- + Prélèvement du surnageant et lecture des DO's à $\lambda = 412 \text{ nm}$; La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon Tris-HCL remplaçant le surnageant.
- + Traçage de la droite d'étalonnage du GSH : Absorbance = f (concentrations en GSH) ;
- + La concentration en Mt est déduite par rapport à la quantité de GSH (1 mol de MT = 20 mol de GSH).
- + La quantité en Mt est exprimée en nmol/mg de tissu.

4.11. Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

La formation de Malondialdéhyde (MDA) a été employée comme un indicateur primaire de la peroxydation lipidique par plusieurs études toxicologiques et chez divers organismes vivants terrestre et aquatique ; le dosage du taux d'MDA a été effectué selon la méthode des espèces réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), la méthode employée dans notre étude et celle décrite par Fatima et al. (2000) avec des modifications reportées par Zhao et al. (2009). Ce dosage est principalement fondé sur la condensation du MDA avec l'acide thiobarbiturique (TBA) en milieu chaud et par résultat la formation d'un pigment de couleur rose pouvant être mesuré par spectrophotométrie.

Les étapes du protocole de quantification du MDA sont brièvement décrites dans les points suivants :

- + Incubation des homogénats dans l'étuve à 37 °C
- + Prélèvement de 1 ml du surnagent
- + Ajout de 1 ml d'une solution TCA à 5 %
- + Ajout de 1ml d'une solution TBA à 0.67 %
- + Agitation du mélange au vortex pendant quelques secondes

- ✚ Centrifugation à 3000 Rpm pendant 10 min/ 4 °C
- ✚ Incubation au bain-marie pendant 40 min à 100 °C
- ✚ Laissez refroidir le mélange
- ✚ Mesure de l'absorbance des échantillons à $\lambda = 532$ nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions
- ✚ La proportion du MDA est exprimée par rapport à la concentration des protéines dans un échantillon (nmol/mg protéines)

$$\text{MDA(nmoles MDA/mg protéines)} = \frac{\text{DO} \times 10^6}{\text{E} \times \text{L} \times \text{X} \times \text{F}_d}$$

- ✓ **DO** : Densité optique mesurée à 530 nm (sans unité),
- ✓ **E** : Coefficient d'extinction molaire du MDA à 530 nm ($E = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- ✓ **X** : Concentration en protéines en mol/L (ou mg/ml),
- ✓ **L** : Longueur du trajet optique, $L = 1$ cm

5. Etude histologique

5.1 Étapes de l'évaluation histopathologique

Une évaluation histologique sur deux organes de *S. haemastoma* (la glande digestive et les branchies) a été effectuée pour mesurer les altérations et effets au niveau histologique potentiellement induit par les nanoparticules Cr_2O_3 et Al_2O_3 ; à la fin de la période d'exposition (après 28j), des individus de chaque Lot de l'étude ont été sélectionnés et retirés des aquariums puis immédiatement disséqués par cassure de leurs coquilles à moyen physique.

La méthode adaptée dans notre étude est inspirée de celle reportée par Hould (1984) et comporte une série d'étapes brièvement présentées dans les points suivants :

5.1.1. Prélèvement

Immédiatement après l'obtention de la fraction molle des escargots marins, l'identification et le prélèvement de la glande digestive et le cténidium (Branchies) a été effectué délicatement pour éviter la dégradation des tissus.

5.1.2. Fixation

Pour assurer une conservation adéquate des tissus et organes prélevés une phase de fixation a été employée ; les échantillons tissulaires ont été directement conservés dans une solution de Formaldéhyde à 10% préservés hors de lumière et loin de l'humidité dans des boîtes en verre de fixation.

5.1.3. Déshydratation

La phase de Déshydratation a pour but l'élimination des liquides et l'eau intracellulaire pour pouvoir effectuer proprement des coupes histologiques ; une série de bain d'éthanol à divers concentration a été employée pour assurer cette phase (éthanol à 50%, 70%, 90%)

5.1.4. Phase d'imprégnation

Cette étape a pour objectif d'éliminer les traces de l'éthanol et donc assurer une pureté des tissus ; le Xylène a été utilisé comme solvant pour cette étape et les échantillons ont été imprégnés par ce solvant.

5.1.5. Inclusion à la paraffine

Les échantillons tissulaires des deux organes de *S. haemastoma* pour chaque Lot ont été mis dans des cassettes d'inclusion, puis enrobage dans un milieu de paraffine chauffé dans

l'étuve jusqu'à la liquéfaction ; le but de cette étape est de former des blocs de tissus-paraffine durs afin d'assurer la réalisation de coupes (épaisseur entre 2.5 et 5 μm).

5.1.6. Réalisation des coupes histologiques

Des sections de 2.5 à 5 μm ont été effectuées sur les blocs de paraffine préalablement préparés, les sections ont été réalisées à l'aide d'un microtome ; les sections ont subi 3 étapes sur une lame qui sont : l'étalement, le collage et le séchage.

5.1.7. Déparaffinage

Le but de cette étape est l'élimination de la paraffine, les lames préalablement préparées sont placées sur une plaque chauffante pendant 10 minutes pour assurer la liquéfaction totale de la paraffine et donc l'élimination complète.

5.1.8. Réhydratation

Une phase de Réhydratation est nécessaire pour éliminer les résidus de paraffine, cette étape est réalisée en immergant les lames dans une série d'alcool à concentration décroissante (éthanol absolu – 50%) puis dans l'eau distillée.

5.1.9. Coloration

Les tissus contenus dans les lames préparées subissent une coloration pour mettre en évidence les principaux éléments cellulaires tel que le noyau, le cytoplasme et les membranes plasmiques et collagène ; la coloration est effectuée avec l'Hématéine-Eosine (H.E.) avec l'éosine qui colore les cytoplasmes en rose et l'hématoxyline qui colore les noyaux en violet.

5.1.10. Montage microscopique et observation

La dernière étape comporte le montage des lames avec les lamelles en verre avec une substance appropriée pour éviter n'importe quel dégâts ou altération dans les tissus ; puis montage dans un microscope afin d'effectuer une interprétation des altérations potentielles au niveau histologique.

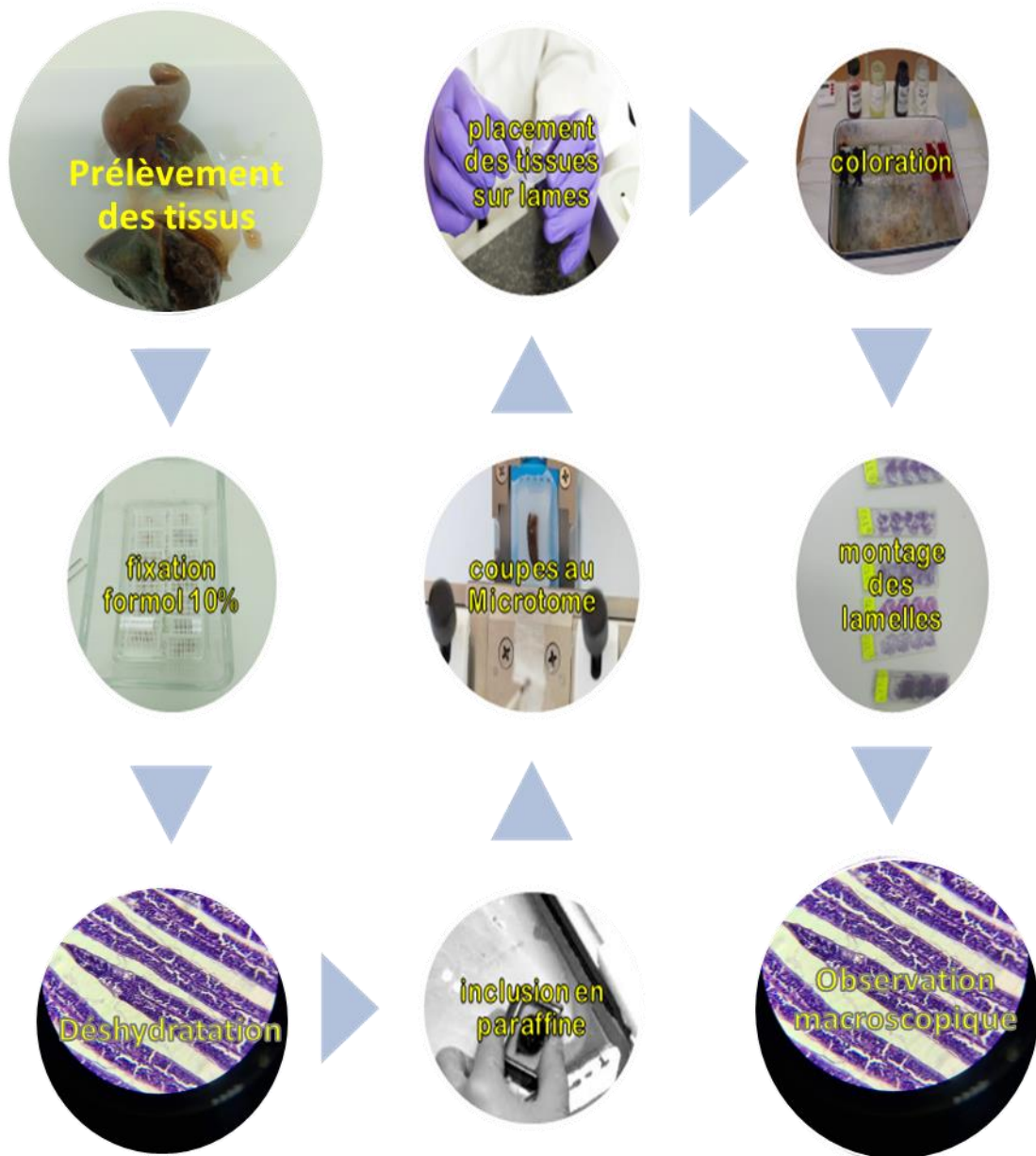


Figure 33: Etapes de l'étude histologique.

5.2. Indice de condition histopathologique (Hi)

Une approche quantitative a été appliquée en calculant l'indice histologique et en intégrant les altérations observées, comme le proposent Costa et al. (2013) pour les palourdes, Cuevas et al. (2015) pour les moules et Arrighetti et al. (2022) pour les escargots d'eau douce. L'indice de condition histopathologique (Hi) a été calculé en fonction du poids des altérations (Tableau 6) et du score de sévérité, les valeurs de poids sont comprises entre 1 et 3 selon l'importance de l'altération et le score entre 0 et 6 selon la sévérité et gravité.

L'indice a été calculé selon la formule de Costa et al. Comme suit :

$$Hi = \frac{\sum w_j \cdot a_j}{\sum_1^j = M_j} \quad (1)$$

Où Hi est l'indice d'état histopathologique des glandes digestives, w_j le poids de l'altération, a_j le score attribué à l'altération. Glandes digestives, w_j le poids de l'altération, a_j le score attribué à l'altération et M_j la valeur maximale attribuable à l'altération. L'altération et M_j la valeur maximale attribuable à l'altération. L'équation normalise Hi à une valeur comprise entre 0 et 1, permettant ainsi des comparaisons entre tous les groupes.

Tableau 6 : Poids des altérations histologiques pour l'Indice moyen de l'état histopathologique

Tissus	altération	Poids
Tubules digestifs	lipofuscine	1
	Infiltration hémocytaire	1
	Interstitialium	1
	Hypertrophie	2
	Atrophie	2
	Nécrose	3
	Fibrose	2
	Conduit central	2

6. Synthèse et Caractérisation des Nanoparticules d' Al_2O_3 et de Cr_2O_3

6.1. Préparation des nanoparticules de Cr_2O_3

Dans la présente étude, des nanoparticules d'oxyde de chrome ont été synthétisées par la méthode solvothermique. Pour ce faire, 1 g de nitrate de chrome $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a été dissous dans 60 ml d'eau désionisée. De l'hydroxyde de sodium (NaOH) a été ajouté à la solution pour ajuster le pH à 10 tout en étant agité pendant 45 minutes. La solution a ensuite été placée dans un autoclave en acier recouvert de téflon et chauffée à 140 °C pendant 24 heures. Le précipité a été isolé et lavé plusieurs fois avec de l'eau désionisée. Après séchage du matériau pendant un jour et calcination dans un four à 500 °C pendant 3 heures, un précipité noir-vert de nanoparticules d'oxyde de chrome a été obtenu.

6.2. Caractérisation des nanoparticules de Cr_2O_3

Différentes méthodes ont été utilisées pour caractériser les échantillons préparés. La diffraction des rayons X (DRX) a été utilisée pour effectuer la caractérisation structurale, avec le diffractomètre Siemens D-5000 avec le rayonnement $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda \approx 1,5418 \text{ \AA}$), dans la gamme $20^\circ - 90^\circ 2\theta$. La microscopie électronique à balayage (SEM : Thermo Fisher Scientific) a été utilisée pour apprécier les observations morphologiques. Les spectres d'absorption UV-Vis ont été mesurés par spectrophotomètre UV-Vis (Shimadzu UV-2401).

6.3. Préparation les nanoparticules d' Al_2O_3

Pour préparer les nanoparticules d' Al_2O_3 , une série d'étapes ont été suivies. Initialement, 0,4 mol d' $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a été dissous dans 50 ml d'eau distillée. Ensuite, sous forte agitation, 0,6 mol de NH_4OH a été ajouté goutte à goutte jusqu'à ce que le pH atteigne environ 8. Une solution transparente contenant de l' $\text{Al}(\text{OH})_3$ s'est alors formée. Le mélange a ensuite été soumis à une centrifugation et lavé jusqu'à ce qu'il atteigne le pH naturel. Le précipité obtenu a été dispersé dans de l'eau distillée et transféré dans un autoclave en acier inoxydable revêtu de téflon. L'autoclave a été scellé et maintenu à une température de 200°C pendant 16 heures. Ensuite, l'autoclave a été laissé refroidir naturellement jusqu'à la température ambiante. Pour purifier l'échantillon, il a été lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée et de l'éthanol, puis séché sous vide à 90 °C pendant 8 heures.

6.4. Caractérisation des nanoparticules d' Al_2O_3

Différentes méthodes ont été utilisées pour caractériser les échantillons préparés. La diffraction des rayons X (DRX) a été utilisée pour effectuer la caractérisation structurale, avec le diffractomètre Siemens D-5000 avec le rayonnement $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda \approx 1,5418 \text{ \AA}$), dans la gamme $20^\circ - 90^\circ 2\theta$. La microscopie électronique à balayage (SEM : Thermo Fisher Scientific) a été utilisée pour apprécier les observations morphologiques. Les spectres d'absorption UV-Vis ont été mesurés par spectrophotomètre UV-Vis (Shimadzu UV-2401).

6.5. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) sur les nanoparticules (potentiel zêta)

Le potentiel zêta et l'analyse de la taille des particules, en fonction du pH des échantillons d' Al_2O_3 , de Cr_2O_3 ont été réalisés par la mesure de la mobilité électrophorétique et la diffusion dynamique de la lumière (DLS), respectivement, à l'aide d'un Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical, Royaume-Uni) équipé d'un titrateur MPT-2 et de cellules capillaires plissées jetables DTS 1070.

Le pH de la solution a été modifié à l'aide de solutions de NaOH (0,03M) et de HCl (0,03M). La taille des particules et le potentiel zêta des nanoparticules étudiées ont été obtenus en calculant la moyenne de 20 mesures. Avant les mesures, les NPs ont été dispersées dans des solutions aqueuses par ultrasons pendant 1 heure à l'aide d'un homogénéisateur ultrasonique Pulse 150 (Benchmark Scientific, Sayreville, USA).

7. Analyse de l'IBR (Integrated Biomarker Response)

L'IBR est une méthode permettant l'intégration de multiples réponses de biomarqueurs et de tous les facteurs expérimentaux en un seul indice afin de mieux encadrer les principaux impacts et réactions des biomarqueurs, cette méthode a été utilisée pour évaluer les effets des NPs sur les biomarqueurs du stress oxydant chez les bivalves avec succès (Beliaeff et Burgeot, 2002 ; Marigómez et al., 2013). Dans cette étude, l'IBR a été appliqué à différents biomarqueurs et concentrations d'exposition pour chaque période d'exposition afin d'identifier les impacts potentiels de chaque NP.

L'IBR a été calculé selon les modifications apportées par Sanchez et al. (2013) pour adapter l'IBR v2 aux biomarqueurs de stress oxydatif comme suit :

Les données des biomarqueurs individuels (X_i) ont été comparées aux références moyennes des biomarqueurs (X_0) pour obtenir (Y_i), et une transformation logarithmique a été appliquée pour réduire les variations.

$$Y_i = \log (X_i / X_0)$$

La réponse standardisée des biomarqueurs (Z_i) est obtenue en estimant la moyenne globale (μ) et l'écart-type (σ) de Y_i .

$$Z_i = (Y_i - \mu) / \sigma$$

Un indice d'écart (A_i) est calculé pour établir une ligne de base de 0 comme centre dans lequel les changements de réponse des biomarqueurs sont représentés, en appliquant les données moyennes des biomarqueurs de référence (Z_0) et (Z_i).

$$A_i = (Z_i - Z_0)$$

Enfin, les valeurs des paramètres A_i pour chaque biomarqueur sont calculées pour obtenir les valeurs IBR.

$$IBR = \sum |A_i|$$

8. Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques des données ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Team, 2023), et une permutation ANOVA a été réalisée pour comparer les groupes, les concentrations de NPs et la Durée. L'exposition a été comparée en appliquant le test Post hoc de Dunnett pour les comparaisons multiples de moyennes ; suivi du test de comparaison multiple de Dunn, les valeurs p étant ajustées avec la méthode de Bonferroni. Le test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis a été utilisé.

Le test de Scheirer-Ray-Hare a été appliqué pour comparer statistiquement les composés/effets pour les deux groupes. Le test de Scheirer-Ray-Hare a été appliqué pour comparer statistiquement les composés/effets pour les deux Nanoparticules. Les statistiques descriptives sont exprimées sous forme de moyenne et d'écart-type et la signification statistique a été déterminée à un niveau de signification de $p < 0,05$ pour toutes les analyses.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour identifier les modèles cachés au sein de l'ensemble de données. La signification statistique a été déterminée à un niveau de signification de $p < 0,05$ pour toutes les analyses.

Résultats et interprétation

1. Résultats au niveau de la glande digestive de *S. haemastoma*

1.1. Biomarqueurs du stress oxydatif

La variation des niveaux de GSH dans les glandes digestives des escargots marins exposés aux NPs de Cr₂O₃ et d'Al₂O₃ est représentée dans la Fig. 34 A&B ; les deux NPs ont été capables d'induire des changements dans les niveaux de GSH, les individus exposés à 2,5 mg/L et 5 mg/L (22,47 ± 6 et 22,2 ± 0.7 nmol/mg de protéines) de NPs de Cr₂O₃ ont montré une diminution significative (p<0,05) des niveaux de GSH par rapport au contrôle (36,72 ± 5,73 nmol/mg de protéines) au jour 7, d'autre part les NPs d'Al₂O₃ ont induit une diminution dose-dépendante des niveaux de GSH avec une déplétion significative (p<0,05) chez les individus traités avec 5 mg/L (9,97 ± 1,31 nmol/mg de protéines).

Au jour 14, les escargots exposés aux NPs de Cr₂O₃ présentaient des niveaux accrus de GSH par rapport à leur contrôle respectif (14,65 ± 4,4 nmol/mg de protéines) avec une induction significative (p<0,05) de GSH dans tous les groupes ; les individus exposés à l'Al₂O₃ présentaient également des taux plus élevés de GSH avec une augmentation significative (p<0,05) à 1 mg/L (28,62 ± 4,95 nmol/mg de protéines) au jour 14. Selon les résultats et comme représenté dans la Fig. 34 A&B, des niveaux plus élevés dans tous les groupes traités et une induction significative du GSH peuvent être notés à 1 mg/L (p<0,05) et 2,5 mg/L (p<0,05) chez les individus exposés aux NPs de Cr₂O₃ après 28 jours ; de même, les NPs d'Al₂O₃ ont généré des niveaux de GSH plus élevés par rapport au contrôle (6,43 ± 2,87 nmol/mg de protéines) avec une induction significative (p<0,05) de GSH à 5 mg/L (35,08 ± 5,35 nmol/mg de protéines). D'autre part, la comparaison entre les trois durées d'exposition (7, 14 et 28 jours) a montré une différence significative dans les niveaux de GSH pour les deux NPs.

Les variations de l'activité GST dans les glandes digestives des escargots exposés aux NPs de Cr₂O₃ et d'Al₂O₃ sont présentées dans les Fig. 34 A'&B' ; après 7 jours, l'exposition à 2,5 mg/L (12,4 ± 0,69 nmol/min/mg de protéines) de NPs de Cr₂O₃ a généré une augmentation significative (p<0,05) de l'activité de la GST par rapport au groupe témoin (3,29 ± 0,84 nmol/min/mg de protéines), l'activité de la GST a également augmenté de manière significative (p<0,05) chez les individus traités avec 5 mg/L de NPs d'Al₂O₃.

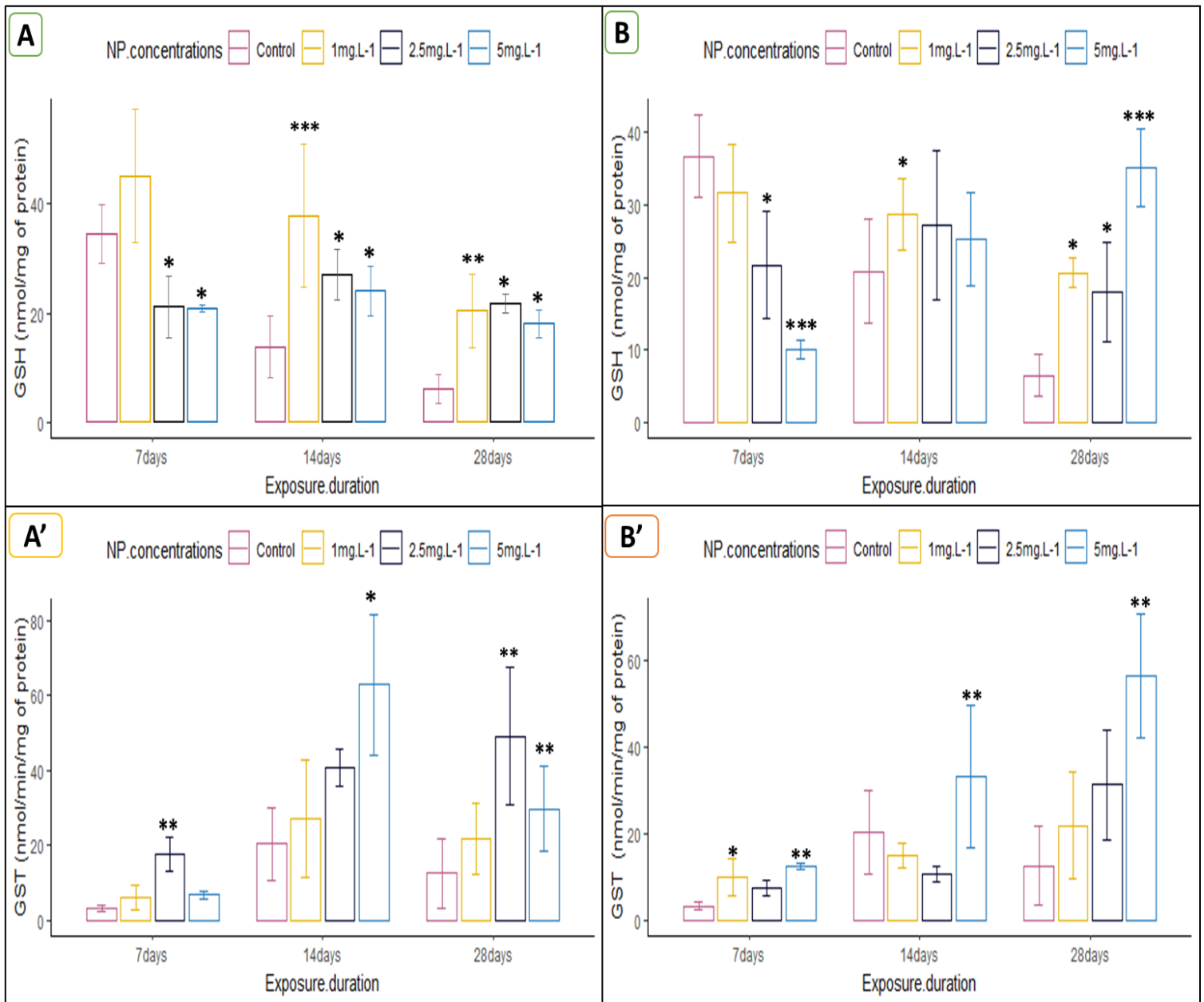


Figure 34: Valeurs de GSH et de GST dans la glande digestive de *S. haemastoma* exposée aux NPs de Cr_2O_3 (A, A') et d' Al_2O_3 (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.d. (2R, n= 3), .

Au jour 14 de l'exposition aux NPs de Cr₂O₃, une induction dose-dépendante de l'activité GST a pu être notée, tous les groupes ont montré des valeurs plus élevées par rapport au groupe témoin (20,33 ± 9,6 nmol/min/mg de protéines) avec une induction significative (p < 0,05) dans le groupe exposé à 5 mg/L (62,86 ± 18,7 nmol/min/mg de protéines). L'activité de la GST s'est réduite chez les escargots traités avec 1 mg/L et 2,5 mg/L et a augmenté de manière significative (p < 0,05) à 5 mg/L de NPs d'Al₂O₃ (34 ± 15,2 nmol/min/mg de protéine).

Une augmentation significative de l'activité GST a été observée dans le groupe exposé à 2,5 mg/L (44,1 ± 16,4 nmol/min/mg de protéine) de NPs de Cr₂O₃ au jour 28 et les deux autres groupes ont également montré une activité GST plus élevée ; d'autre part, au cours de la même période, une augmentation dose-dépendante de l'activité GST a été observée chez les individus exposés aux NPs d'Al₂O₃ avec une induction significative (p < 0,05) dans le groupe traité avec 5 mg/L. Globalement, à toutes les périodes, les deux NPs ont induit des modifications de l'activité des GST, bien que ce déséquilibre ait été plus dominant chez les individus traités avec les NPs de Cr₂O₃. La comparaison des durées d'exposition pour les deux NPs a montré une différence significative entre les trois périodes pour l'activité GST.

La Fig. 35A&B représente les changements de l'activité GPx dans la glande digestive des escargots marins exposés aux deux NPs sélectionnées dans notre étude. Au jour 7, par rapport à leur contrôle respectif (62 ± 13,54 nmol GSH/mg de protéine), l'activité GPx était significativement (p < 0,05) réduite dans tous les groupes exposés aux NPs de Cr₂O₃. L'activité GPx des individus exposés aux NPs d'Al₂O₃ a montré une diminution significative (p < 0,05) à 2,5 mg/L d'activité GPx.

Au jour 14, les groupes exposés aux NPs de Cr₂O₃ n'ont pas montré de changements dans l'activité GPx avec une augmentation significative (p < 0,05) de la GPx à 5 mg/L de NPs d'Al₂O₃. Après 28 jours d'exposition, une augmentation significative (p < 0,05) de l'activité GPx en fonction de la dose a été observée pour les groupes exposés aux NPs d'Al₂O₃, l'induction la plus forte étant observée à 5 mg/L (25,9 ± 6,79 nmol GSH/mg de protéines). Au jour 28, l'activité GPx a montré une augmentation significative (p < 0,05) après l'exposition à 2,5 mg/L (34,9 ± 14,2 nmol GSH/mg de protéines) de Cr₂O₃ par rapport au contrôle respectif (5,98 ± 1,99 nmol GSH/mg de protéines). En outre, une différence significative a été établie en comparant l'activité GPx pour les deux nanoparticules sélectionnées.

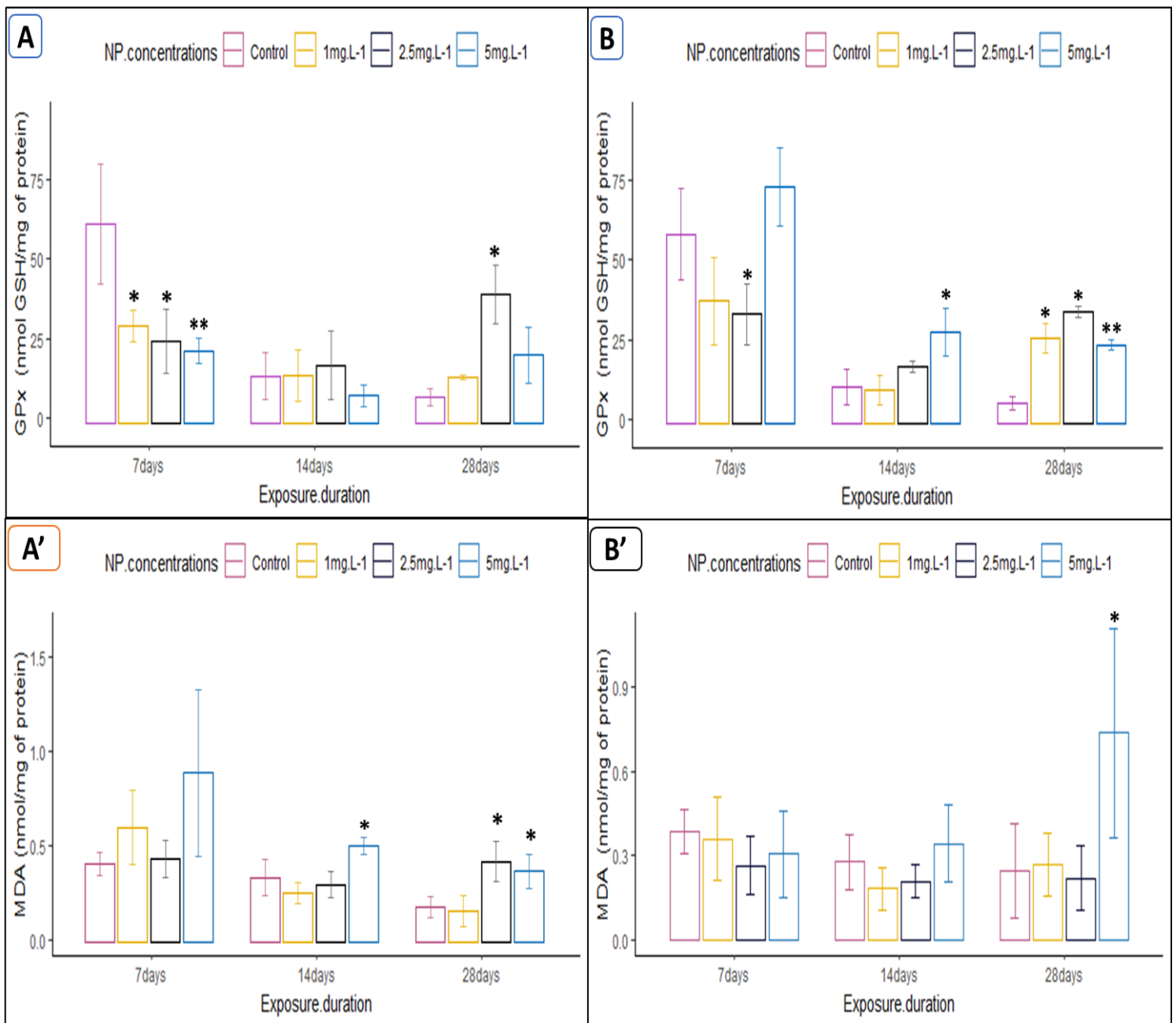


Figure 35: Valeurs du GPx et MDA dans la glande digestive de *S. haemastoma* exposée aux NPs de Cr_2O_3 (A, A') et d' Al_2O_3 (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.d. (2R, n= 3).

Les variations de l'activité enzymatique de la CAT dans les glandes digestives de *S. haemastoma* aux deux NPs sont illustrées dans la Fig. 36 A&B ; globalement, le déséquilibre enzymatique le plus important a été remarqué au jour 7 de l'exposition pour les deux NPs par rapport au jour 14 et au jour 28. L'activité CAT a été significativement ($p < 0,05$) réduite dans tous les groupes traités par rapport au contrôle ($84,30 \pm 8,45$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine), avec une diminution significative dans tous les groupes exposés aux NPs de Cr_2O_3 , plus importante à 5 mg/L ($7,22 \pm 0,99$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) et de même pour les individus exposés à Al_2O_3 avec l'inhibition la plus importante ($p < 0,05$) à 1 et 2,5 mg/L ($19,52 \pm 11,66$ et $19,80 \pm 7,47$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine). D'autre part, l'activité CAT a montré des valeurs plus élevées à 1 mg/L et 2,5 mg/L ($p < 0,05$) de NPs de Cr_2O_3 et une augmentation significative ($p < 0,05$) à 5 mg/L d' Al_2O_3 par rapport au contrôle respectif après 14 jours

Après 28 jours, une augmentation significative ($p < 0,05$) de la CAT à 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 a été notée et a montré une réduction mineure à 2,5 mg/L chez les individus traités avec les NPs de Cr_2O_3 . Une variation significative a été notée dans la comparaison des durées d'exposition pour les deux NP.

La variation de l'activité de la SOD est représentée dans la Fig. 36A'&B' selon les résultats, aucun changement significatif majeur n'a été remarqué dans la variation de l'activité enzymatique de la SOD entre les trois paramètres d'exposition choisis dans cette étude à la fois pour le Cr_2O_3 et l' Al_2O_3 . Une diminution significative ($p < 0,05$) de l'activité de la SOD a été observée chez les individus ayant reçu 1 mg/L ($0,28 \pm 0,09$ (U) sod/mg de protéines) de NPs d' Al_2O_3 , aucun changement marqué de l'activité de la SOD n'ayant été observé dans les groupes exposés aux NPs de Cr_2O_3 au 7^{ème} jour. Après 14 jours de traitement, 1 mg/L et 2,5 mg/L ($0,39 \pm 0,08$ (U) sod/mg de protéines) de NPs de Cr_2O_3 et 1 mg/L ($0,49 \pm 0,06$ (U) sod/mg de protéines) de NPs d' Al_2O_3 ont induit une activité enzymatique plus élevée dans les glandes digestives par rapport au contrôle respectif ($0,32 \pm 0,05$ (U) sod/mg de protéines) ; au 28^{ème} jour, une augmentation significative ($p < 0,05$) à 5 mg/L d' Al_2O_3 dans l'activité de la SOD a été observée. Les deux NPs n'ont pas eu d'impact majeur sur l'activité de la SOD dans la glande digestive des escargots marins.

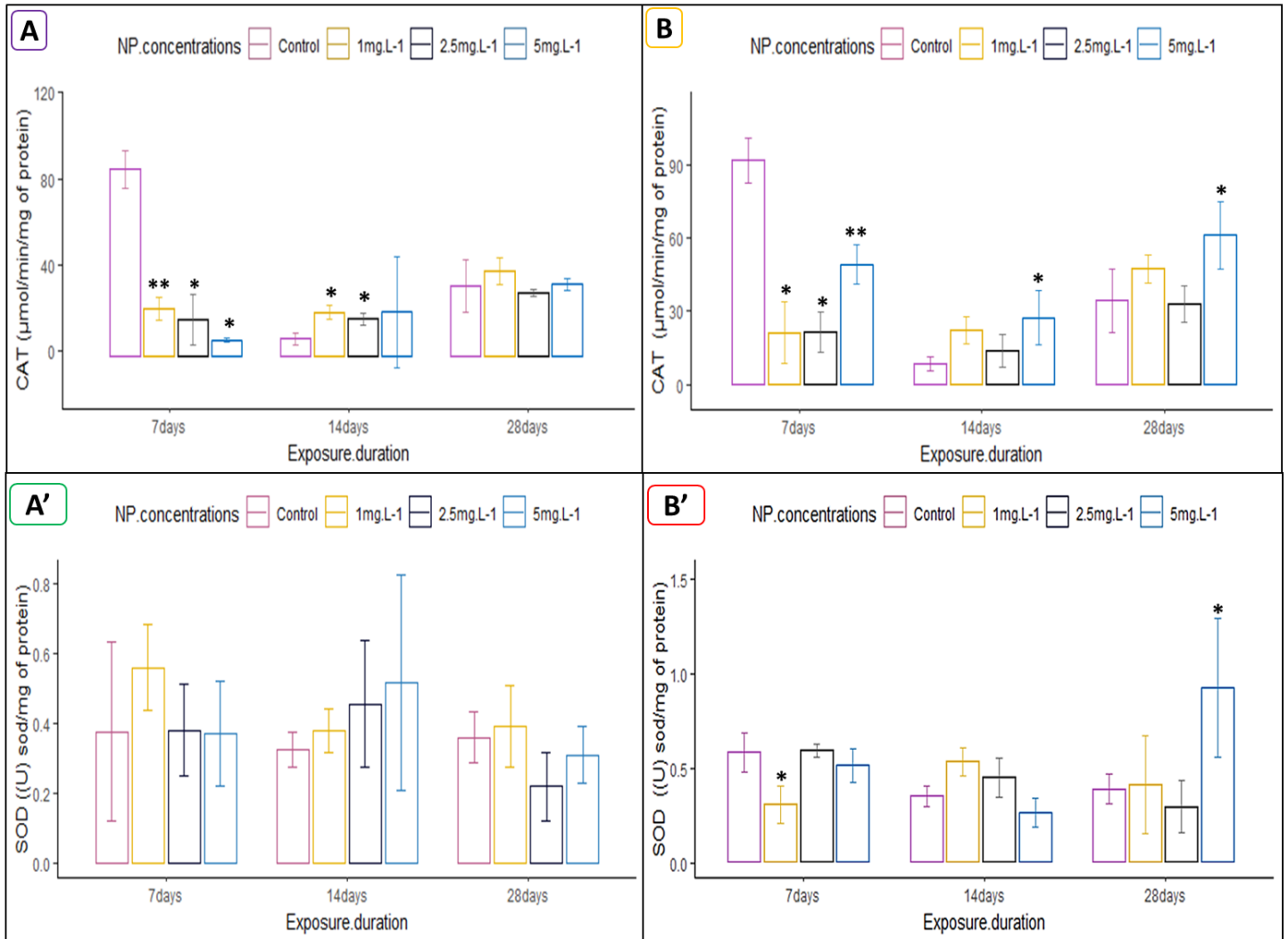


Figure 36: Valeurs de la CAT et la SOD dans la glande digestive de *S. haemastoma* exposée aux NPs de Cr₂O₃ (A, A') et d'Al₂O₃ (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.d. (2R, n= 3).

1.2. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique (LPO)

Les résultats ont indiqué une différence significative ($p < 0,05$) lors de la comparaison de la variation des niveaux de Malondialdéhyde (MDA) entre les trois périodes d'exposition (7, 14 et 28 jours). Les niveaux de MDA ont montré une variation significative dans la comparaison entre Cr₂O₃ et Al₂O₃ conjointement et les points finaux de la période d'exposition. D'autre part, les taux de MDA ont révélé un caractère évolutif dépendant du temps dans les trois durées d'exposition, exprimé par les changements significatifs des concentrations de MDA aux jours 7, 14 et 28 observés dans les glandes digestives des escargots exposés à la gamme de concentrations de Cr₂O₃ (Fig. 35A'). En revanche, aucun changement significatif majeur des

taux de MDA n'a pu être constaté entre les périodes d'exposition dans les glandes digestives des escargots exposés à l' Al_2O_3 (Fig. 35B').

Après 7 jours d'exposition, aucun changement notable dans les taux de MDA n'a été observé pour tous les groupes traités avec des NPs d' Al_2O_3 par rapport au groupe témoin ; les taux de MDA étaient plus faibles dans les groupes ayant reçu 1 mg/L et 2,5 mg de Cr_2O_3 . Au jour 14, les taux de MDA étaient plus élevés ($p < 0,05$) dans le groupe traité avec 5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 ; les mêmes résultats ont presque été observés chez les individus exposés aux NPs d' Al_2O_3 . Une augmentation significative ($p < 0,05$) des niveaux de MDA a été remarquée chez les individus exposés à 2,5 mg/L et 5 mg/L ($0,43 \pm 0,1$ et $0,38 \pm 0,09$ nmol/mg de protéines) de Cr_2O_3 et à 5 mg/L ($0,85 \pm 0,34$ nmol/mg de protéines) d' Al_2O_3 après 28 jours d'exposition par rapport au contrôle ($0,17 \pm 0,05$ nmol/mg de protéines) ; de la même manière, tous les autres groupes ont montré des taux de MDA plus élevés que le groupe contrôle pour les deux NPs exposées. D'après les résultats, la formation de MDA a été induite par le Cr_2O_3 et l' Al_2O_3 après 28 jours d'exposition.

1.3. Biomarqueur de la neurotoxicité

Les différences dans l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase (AChE) dans les glandes digestives de *S. haemastoma* exposées aux NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 sont illustrées dans les Fig. 37 A&B. Par rapport au témoin ($0,11 \pm 0,04$ nmol/min/mg de protéine), les nanoparticules de Cr_2O_3 ont significativement inhibé l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) à toutes les concentrations testées : 1 mg/L ($0,04 \pm 0,01$), 2,5 mg/L ($0,03 \pm 0,02$) et 5 mg/L ($0,05 \pm 0,03$ nmol/min/mg de protéine), avec des différences statistiquement significatives observées après 7 jours d'exposition ($p < 0,05$). Une inhibition de l'activité de l'AChE a été notée chez les individus exposés à 1 mg/L de NP d' Al_2O_3 .

Le 14e jour, bien qu'aucune modification significative de l'AChE n'ait été observée chez les individus traités avec les NPs de Cr_2O_3 , une activité enzymatique plus élevée a été notée dans tous les groupes par rapport au contrôle ; une induction significative ($p < 0,05$) de l'activité de l'AChE a été observée chez les individus traités avec 2,5 mg/L à la même période d'exposition dans le groupe exposé aux NPs d' Al_2O_3 .

Après 28 jours, 1 mg/L ($0,089 \pm 0,02$ nmol/min/mg de protéine) de NPs de Cr_2O_3 a induit une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité AChE, l'exposition à 2,5 mg/L et 5 mg/L ($0,07 \pm 0,01$ nmol/min/mg de protéine) de NPs d' Al_2O_3 a induit une augmentation significative de l'activité AChE dans la glande digestive.

La comparaison des durées d'exposition a montré des différences significatives dans l'activité de l'AChE et des variations différentes entre les points de fin de période ($p < 0,05$) pour les individus exposés aux NPs d' Al_2O_3 .

1.4. Méthallothionéine (MT)

Les variations des taux de MT dans le temps et pour chaque concentration de nanoparticules par rapport aux groupes de contrôle respectifs est représenté dans la Fig. 37 A' & B'. Au jour 7, une diminution significative ($p < 0,05$) en MT a été observée chez les individus exposés à 1 mg/L ($94,1 \pm 18,4$ nmol/g de tissu) et à 5 mg/L ($104 \pm 14,7$ nmol/g de tissu) de NPs de Cr_2O_3 . Les individus traités avec des NPs d' Al_2O_3 ont également montré une induction significative ($p < 0,05$) des niveaux de MT à 2,5 mg/L (392 ± 84 nmol/g de tissu) par rapport au groupe témoin (187 ± 24 nmol/g de tissu).

Au jour 14, les niveaux de MT étaient significativement ($p < 0,05$) augmentés dans les glandes digestives des escargots exposés à 5 mg/L (395 ± 94 nmol/g de tissu) de NPs d' Al_2O_3 et la concentration de 1 mg/L a également entraîné des taux de MT plus élevés par rapport au contrôle ; d'autre part, les groupes exposés à 1 mg/L ($19,9 \pm 13$ nmol/g de tissu) de NPs de Cr_2O_3 ont montré une diminution significative ($p < 0,05$) du taux de MT par rapport à leur contrôle respectif ($146 \pm 81,2$ nmol/g de tissu). Après 7 jours puis 14 jours de traitement, il est important de noter que les taux de MT étaient sensibles même à 1 mg/L pour les deux NPs et qu'ils ont été modifiés dans toutes les gammes de concentration.

Au jour 28, une augmentation significative ($p < 0,05$) des taux de MT a été observée dans les glandes digestives des individus traités avec les NPs de Cr_2O_3 à 2,5 mg/L et 5 mg/L ; les taux de MT ont également été élevés ($p < 0,05$) chez les individus exposés à 1 mg/L et 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 , la MT a montré une différence significative entre les durées d'exposition aux NPs de Cr_2O_3 , une variation significative des niveaux de MT entre les trois gammes de

concentrations et le contrôle a également été notée pour 7, 14 et 28 jours conjointement chez les individus exposés aux NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 .

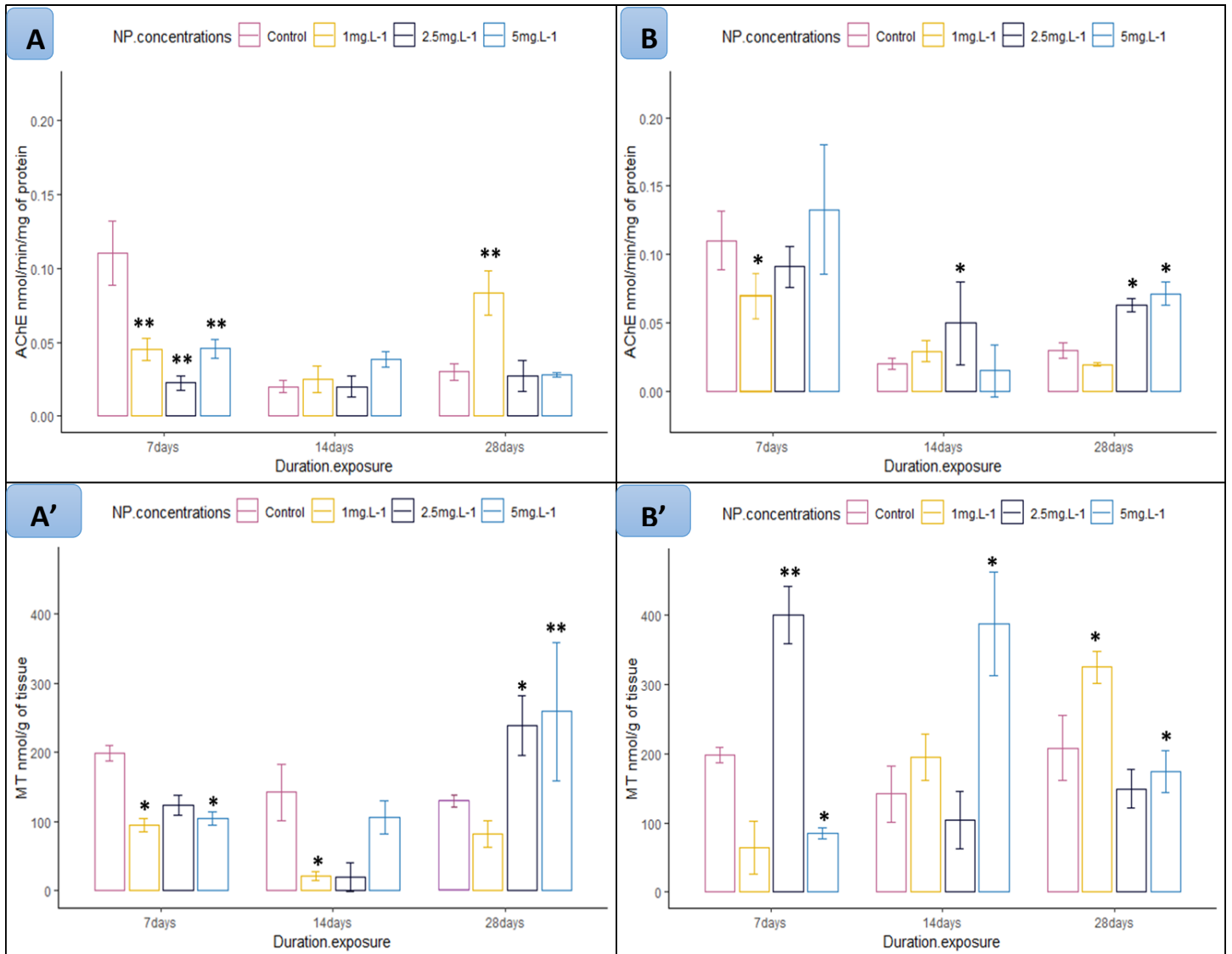


Figure 37: Valeurs de MT et AchE dans la glande digestive de *S. haemastoma* exposée aux NPs de Cr_2O_3 (A, A') et d' Al_2O_3 (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.d. (2R, n= 3).

1.5. Étude histologique

1.5.1. Observation des altérations histologiques

La figure 38 illustre les structures histologiques des tissus des glandes digestives des escargots marins inclus dans notre étude avec tous les groupes, c'est-à-dire les individus exposés aux deux NPs et le groupe témoin après 28 jours.

Les échantillons de tissus de la glande digestive du groupe témoin ont montré une structure normale avec des caractéristiques histologiques régulières ; en outre, pour les individus non exposés, la glande digestive de *S. haemastoma* révèle brièvement des glandes internes régulières et un canal central non endommagé.

Globalement, l'exposition aux NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 a pu induire des altérations histologiques de différents degrés de gravité dans la glande digestive de *S. haemastoma*.

L'exposition à 1 mg/L de NPs de Cr_2O_3 a induit une détérioration du réseau interstitiel avec une nécrose liquéfactive. Une nécrose a été observée dans la glande digestive des escargots exposés à 2,5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 avec un mélange notable de débris nécrotiques et hémolysés ; la glande digestive des escargots traités à 5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 a montré également un autre type de nécrose glandulaire, accompagnée de la préservation de l'interstitium.

Une nécrose cellulaire liquéfactive avec un interstitium endommagé a été observée dans l'échantillon histologique des individus exposés à 1 mg/L de NPs d' Al_2O_3 ; les lames histologiques des individus exposés à 2,5 mg/L et 5 mg/L présentaient des altérations comparables, à savoir une nécrose partiellement glandulaire de la glande digestive interne avec la préservation du réseau interstitiel. La comparaison entre les sévérités des impacts histologiques induits par les deux expositions indique que les NPs de Cr_2O_3 induit des altérations tissulaires plus sévères et plus apparentes.

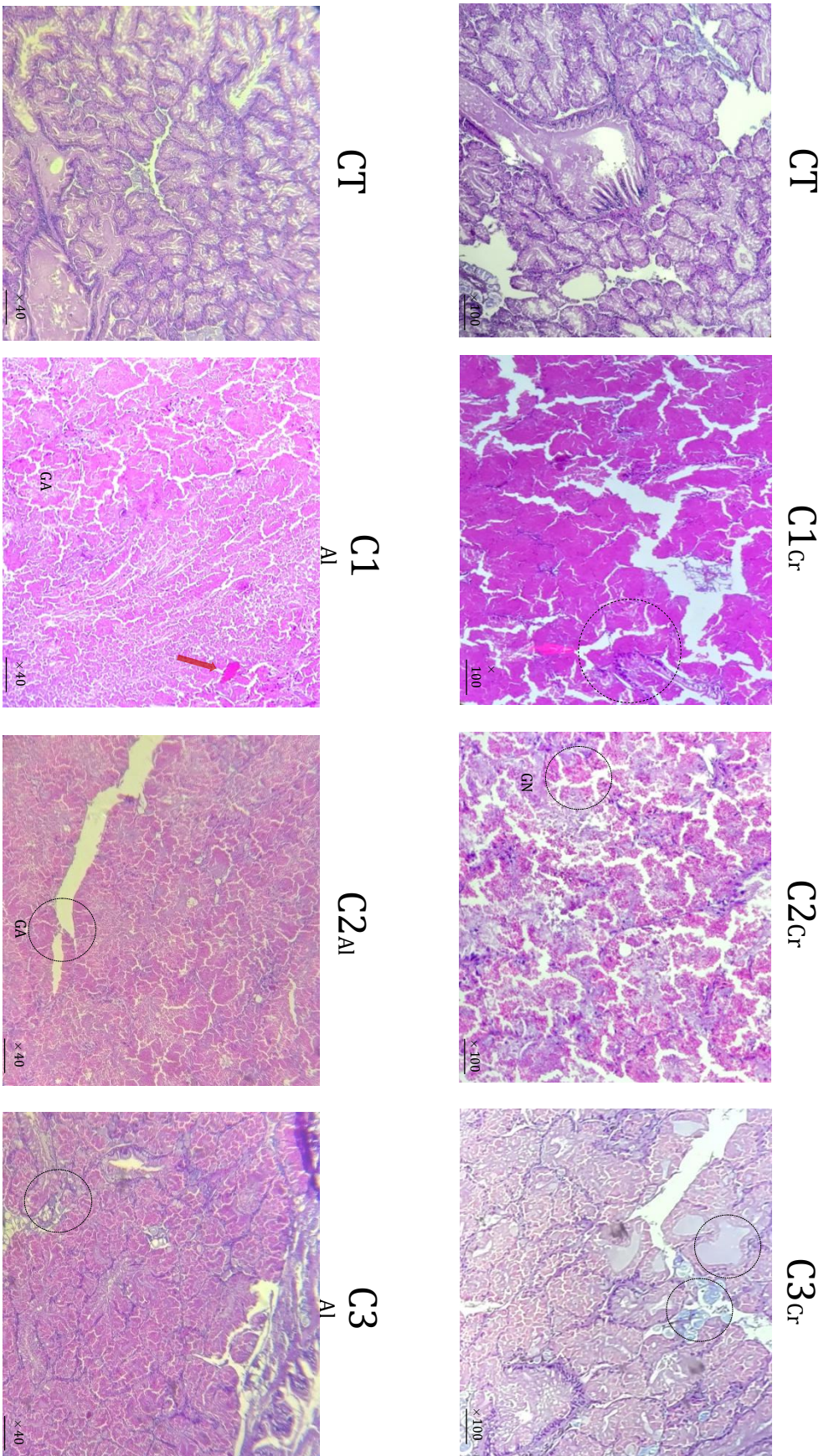


Figure 38. Altérations histologiques observées dans les glandes digestives de *S. haemastoma* après 28 jours d'exposition aux NPs de Cr₂O₃ (C1, C2 et C3 Cr) et d'Al₂O₃ (C1, C2 et C3 Al), CT : groupe témoin avec structure normale (DG), coloration H&E X100, X40 faible. Effets montrés : GN : nécrose, destruction du tissu interstitiel et GA : altérations glandulaires.

1.5.2. Indice d'état histopathologique (Hi)

L'indice histologique (Hi) des glandes digestives exposées aux deux NPs et au groupe témoin est représenté dans le tableau 7 et la figure 39. Dans l'ensemble, tous les groupes exposés ont présenté un indice histologique plus élevé que le groupe témoin, les valeurs de l'indice histologique des glandes digestives exposées aux NPs de Cr₂O₃ et d'Al₂O₃ ont montré une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au groupe témoin, avec une augmentation des valeurs de l'indice histologique en fonction de la dose observée.

Les valeurs Hi les plus élevées ont été observées chez les individus exposés à 5 mg/L de NPs de Cr₂O₃, l'exposition à 2,5 et 5 mg/L a montré des valeurs Hi significativement ($p < 0,05$) plus élevées que celles du contrôle. Une différence significative ($p < 0,05$) a également été observée dans les groupes traités avec 2,5 et 5 mg/L de NPs d'Al₂O₃ par rapport au groupe témoin, les valeurs Hi les plus élevées étant observées à 5 mg/L.

D'autre part, les valeurs Hi des groupes exposés à 2,5 et 5 mg/L de NPs de Cr₂O₃ étaient plus élevées que celles de tous les autres groupes, y compris ceux exposés aux NPs d'Al₂O₃, les valeurs Hi les plus élevées chez les escargots traités avec les NPs d'Al₂O₃ n'étant supérieures qu'à celles des escargots exposés à 1 mg/L de NPs de Cr₂O₃.

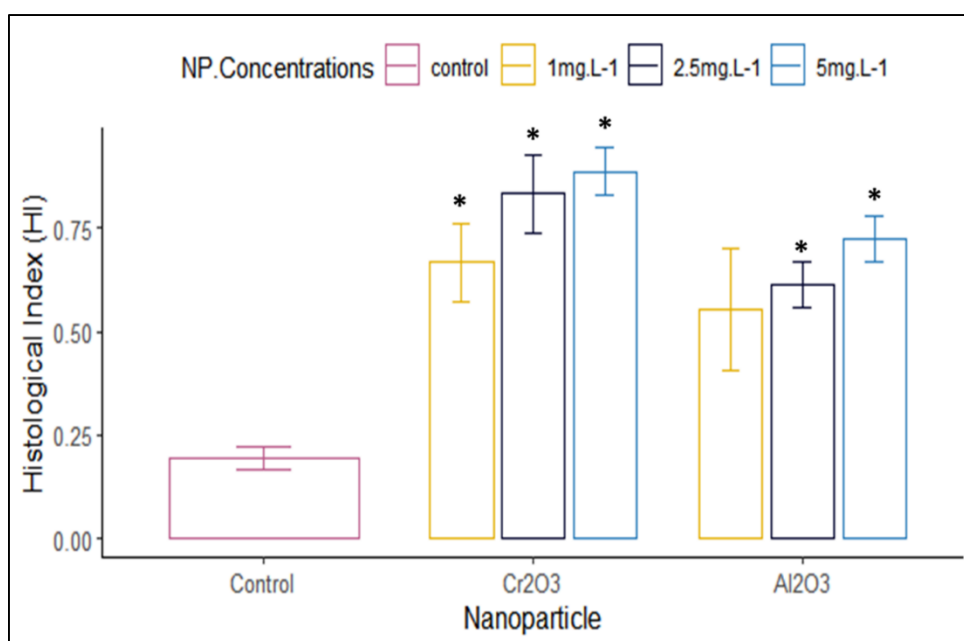


Figure 39. Médianes moyennes de l'indice d'état histopathologique (Hi) du groupe témoin et des glandes digestives des individus exposés aux deux NPs.

Tableau 7 : Indices moyens de l'état histopathologique des glandes digestives (\pm) pour chaque groupe : Contrôle, Cr : exposé aux NPs de Cr_2O_3 et Al : exposé aux NPs d' Al_2O_3 et poids d'altération respectifs (w_j)

Groupe (Hi)									
Tissus	Modification ou altération	Poids	Contrôle	C1 _{Cr}	C2 _{Cr}	C3 _{Cr}	C1 _{Al}	C2 _{Al}	C3 _{Al}
Tubules digestifs	lipofuscine	1	0.19	0.67*	0.83*	0.89*	0.54	0.61*	0.72*
	Infiltration hémocytaire	1	\pm 0.05	\pm 0.17	\pm 0.17	\pm 0.12	\pm 0.21	\pm 0.10	\pm 0.11
	Interstitium	1							
	Hypertrophie	2							
	Atrophie	2							
	Nécrose	3							
	Fibrose	2							
	Conduit central	2							

1.6. Analyse en composantes principales (ACP)

L'ACP des glandes digestives exposées aux NPs de Cr_2O_3 (Fig. 40AA') montre clairement que les deux premiers axes factoriels ont restitué près de 44,09% de la variation totale dans la glande digestive. L'axe 1 (PC1) explique 24,51% de la variation totale, il est négativement corrélé avec les variables CAT ($r = - 0,76$), GPx ($r = - 0,65$), GSH ($r = - 0,64$), SOD ($r = - 0,52$) et AChE ($r = - 0,51$) qui ont fortement contribué à la construction de cet axe. De plus, la variable la plus représentative sur cet axe est la CAT avec $\cos^2 = 0,57$. Par ailleurs, l'axe 2 (PC2) explique 19,59% de la variation totale, il est essentiellement construit par la corrélation positive de la variable GSH ($r = 0,55$) et les corrélations négatives des variables MT ($r = - 0,86$) et CAT ($r = - 0,56$) qui ont contribué à sa construction. Le paramètre MT est la variable la plus représentative sur le 2^{ème} axe avec $\cos^2 = 0,74$.

Les résultats de l'ACP des individus exposés aux NPs d' Al_2O_3 (Fig. 40BB') ont révélé que les deux premières composantes principales restituaient près de 44,93% de l'information. L'axe 1 (PC1) explique 23,94% de la variation totale, il est négativement corrélé avec les variables MDA ($r = - 0,83$), GST ($r = - 0,69$), SOD ($r = - 0,58$) et GSH ($r = - 0,44$) qui ont fortement contribué à la construction de cet axe.

De plus, la variable la plus représentative de cet axe est la MDA avec $\cos^2 = 0,69$. En outre, l'axe 2 (PC2) explique 20,99% de la variation totale, il a été principalement construit par la corrélation positive de la variable MT ($r = 0,55$) et les corrélations négatives des variables AChE ($r = - 0,75$), GPx ($r = - 0,57$) et CAT ($r = - 0,51$) qui ont fortement contribué à sa construction. Le paramètre AChE est la variable la plus représentative sur le 2^{ème} axe avec $\cos^2 = 0,57$.

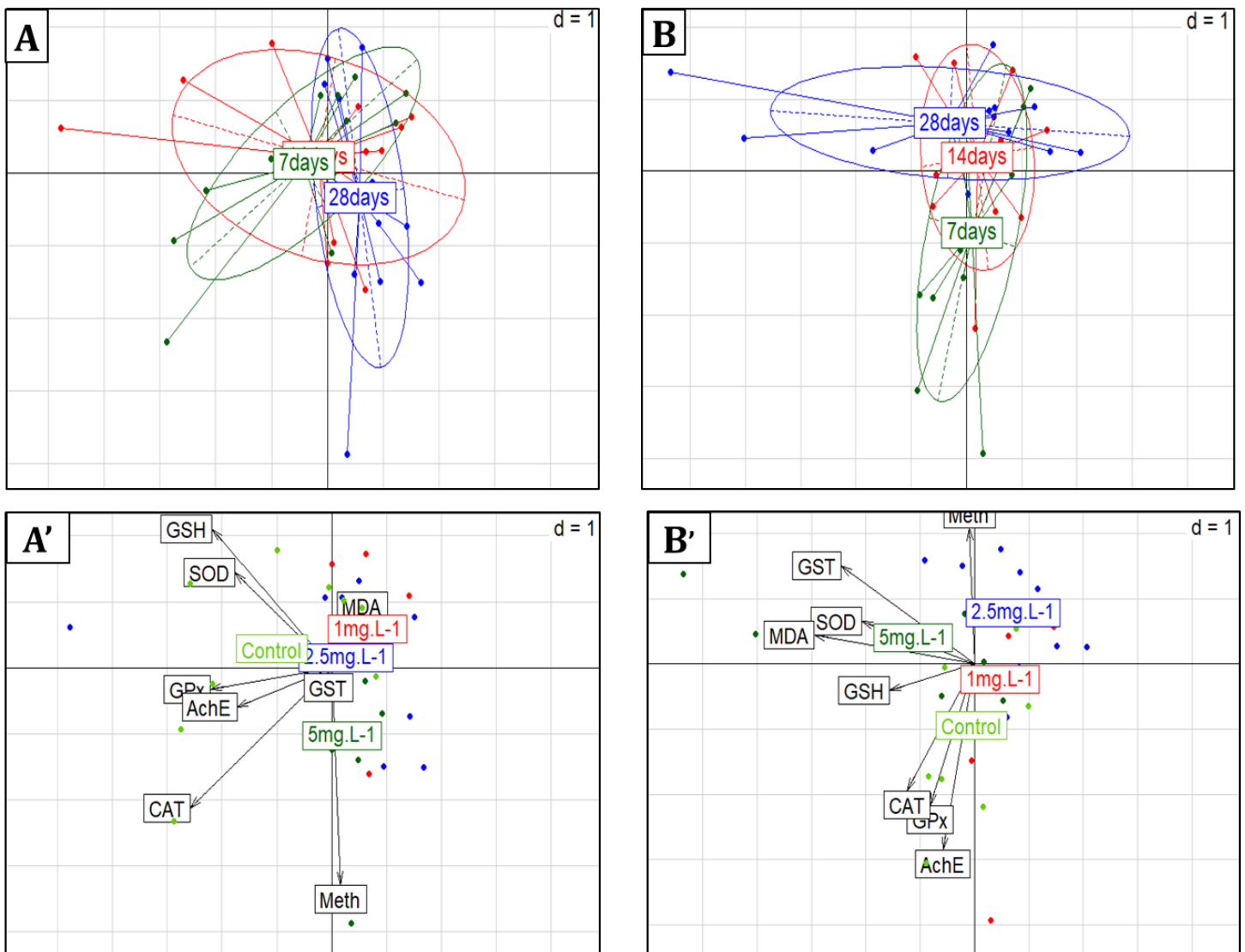


Figure 40. Biplot de l'analyse en composantes principales dans la glande digestive des escargots exposés aux NPs de Cr_2O_3 (A, A') et d' Al_2O_3 (B, B') avec toutes les variables mesurées intégrées (GSH, GPx, GST, CAT, SOD, MDA, MT et AChE) dans toutes les durées et concentrations.

2. Au niveau des branchies de *S. haemastoma*

2.1. Biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques

Les taux de variation en pourcentage de l'activité des biomarqueurs dans les branchies des escargots ont été calculés pour quantifier les changements relatifs entre le groupe témoin et le groupe exposé pour chaque durée, les résultats de l'approche multi-biomarqueurs seront présentés par période d'exposition.

Les tendances des variations des biomarqueurs étudiés pour les groupes témoins et les groupes exposés (NPs de Cr_2O_3 ou d' Al_2O_3) sont représentées dans la Fig 49. Dans les branchies de *S. haemastoma*, les niveaux et les activités de GSH, CAT, AChE, MT et MDA ont montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les périodes d'exposition (7, 14 et 28 jours). Les activités GST et SOD ont montré des différences significatives ($p < 0,05$) entre les concentrations et les groupes de contrôle pour les deux NPs.

2.1.1. Après 7 jours d'exposition

Les modifications des activités GSH, GST, GPx et CAT dans les branchies des escargots sont représentées dans les Fig. 41 et Fig. 42 pour les deux NPs. Après 7 jours, l'exposition à 1 mg/L ($p < 0,05$) et 2,5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 a entraîné une augmentation de 55,9 % et 42,6 % du GSH, tandis que 1 mg/L de NPs de Cr_2O_3 a entraîné une diminution de 34,08 % du GSH. La GST a montré une augmentation de 145 % et 290 % ($p < 0,05$) dans les groupes exposés à 1 mg/L et 5 mg/L d' Al_2O_3 et d'environ 133,01 % dans le groupe exposé à 5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 . L'activité GPx a eu tendance à augmenter dans les branchies de tous les groupes exposés, allant de 105 à 170 % pour les NPs d' Al_2O_3 et de 117 à 385 % pour les groupes traités aux NPs de Cr_2O_3 .

L'activité CAT a été réduite de 70,9 % après l'exposition à 1 mg/L de NPs de Cr_2O_3 , tandis que les groupes exposés à 2,5 mg/L et 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 ont montré une activité CAT plus élevée ($p < 0,05$), allant de 37,4 % à 65,4 %. Les variations de la SOD, de la MDA, de la MT et de l'AChE dans les branchies des escargots pour les deux NPs sont représentées dans les Fig. 43 et Fig. 44.

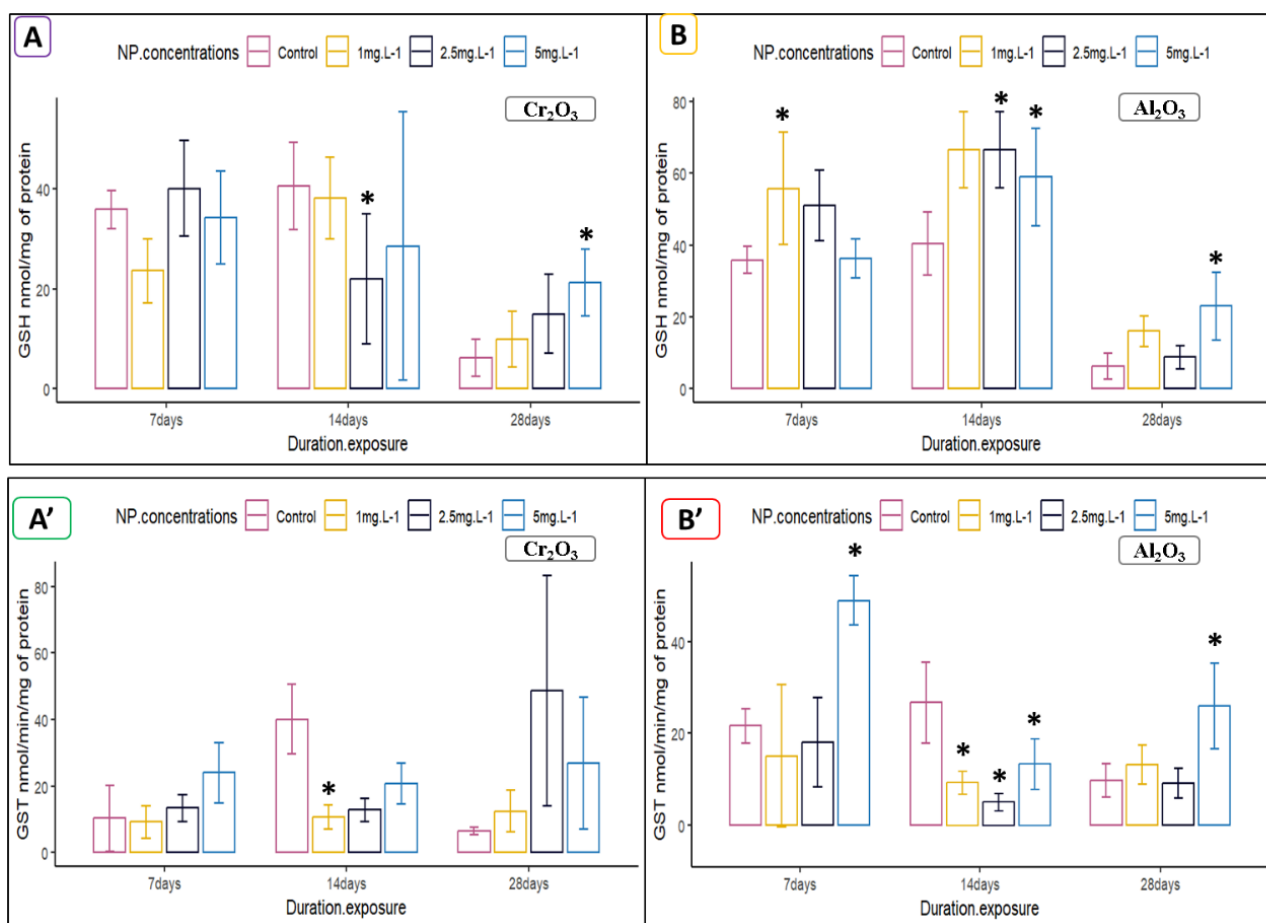


Figure 41: Les taux de GSH et GST dans les branchies de *S. haemastoma* traitées avec les NPs de Cr_2O_3 (A, A') et d' Al_2O_3 (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.d. (2R, n= 3).

Une diminution significative ($p < 0,05$) allant de 50 % à 66 % de l'activité SOD a été observée dans tous les groupes traités avec les NPs d' Al_2O_3 , avec une réduction similaire ($p < 0,05$) de 71 % dans le groupe exposé à 2,5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 .

Les taux d'MDA dans tous les groupes exposés ont montrés des niveaux plus élevés allant de 156 % à 300 % pour les NPs d' Al_2O_3 et une réduction significative ($p < 0,05$) des taux de MT a été observée dans les branchies de tous les groupes exposés aux NPs de Cr_2O_3 allant de 45 % à 49 %. L'exposition à 2,5 et 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 a induit des taux de MT significativement plus faibles ($p < 0,05$), allant de 44 % à 109 %. L'activité AChE dans les branchies de *S. haemastoma* a diminué de manière significative ($p < 0,05$) de 263,28 % à la suite d'une exposition à 2,5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 , tandis qu'une augmentation significative de 215 % et une diminution de 75 % à 2,5 mg/L et 1 mg/L ont été observées, respectivement, pour les NPs d' Al_2O_3 .

2.1.2. Après 14 jours d'exposition

Après 14 jours, les niveaux de GSH ont augmenté de manière significative ($p < 0,05$) de 65 % à 1 mg/L et 2,5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 tandis que l'épuisement du GSH a été observé dans tous les groupes exposés aux NPs de Cr_2O_3 avec une diminution significative ($p < 0,05$) de 46 % observée à 2,5 mg/L. L'activité GST a montré des concentrations significativement réduites dans tous les groupes, allant de 33 % à 74 % pour les NPs d' Al_2O_3 et de 6 % à 45 % pour les NPs de Cr_2O_3 . L'activité GPx a diminué de 24 % (1 mg/L) ($p < 0,05$) et de 35 % (5 mg/L) en raison de l'exposition aux NPs de Cr_2O_3 .

D'autre part, l'activité GPx a augmenté de 15,5 % (2,5 mg/L) et de 24 % (5 mg/L) dans les branchies exposées aux NPs d' Al_2O_3 . L'activité CAT a augmenté de 125 % à 1 mg/L et une diminution significative ($p < 0,05$) de 64 % à 5 mg/L a été notée dans les groupes exposés aux NPs de Cr_2O_3 avec des diminutions allant de 46 % à 56 % à 2,5 mg/L et 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 .

Après 14 jours, la SOD a été fortement affectée par les NPs d' Al_2O_3 ($p < 0,05$), avec une diminution significative allant de 45 % à 55 % dans tous les groupes traités. De la même manière, les niveaux de MDA étaient significativement ($p < 0,05$) plus élevés (95 %) à 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 .

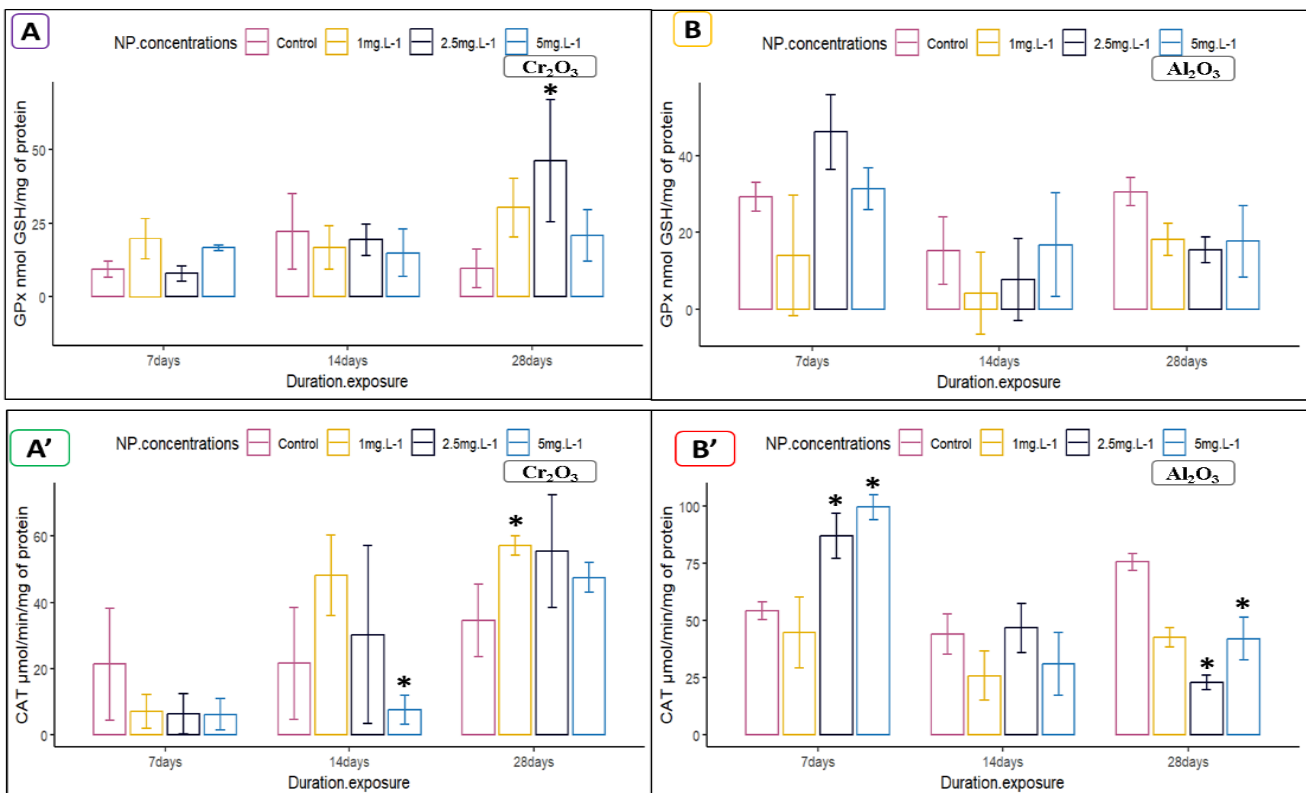


Figure 42: Les taux de GPx et CAT dans les branchies de *S. haemastoma* traitées avec les NPs de Cr_2O_3 (A, A') et d' Al_2O_3 (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.d. (2R, n= 3).

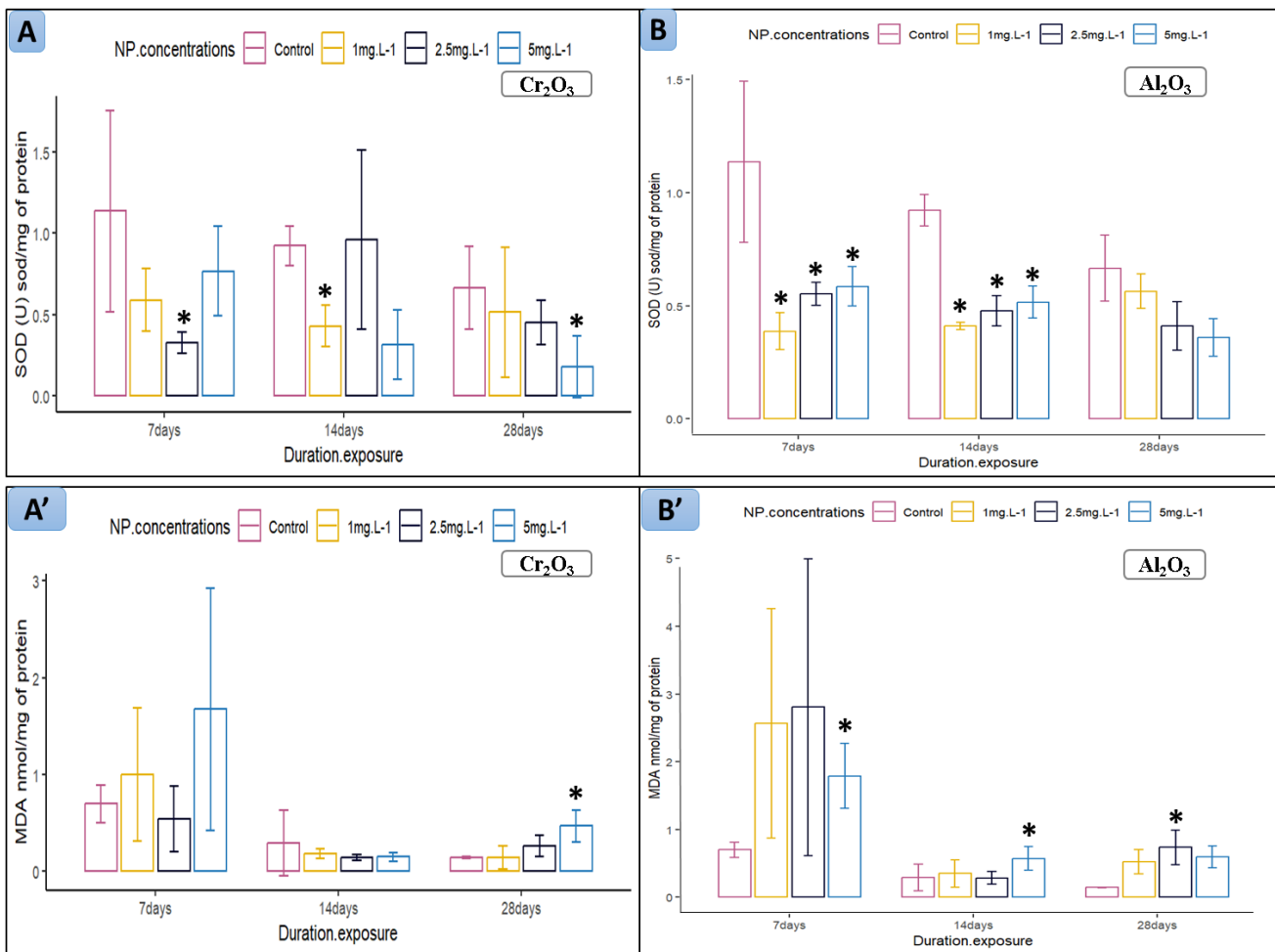


Figure 43: Les taux de SOD et MDA dans les branchies de *S. haemastoma* traitées avec les NPs de Cr_2O_3 (A, A') et d' Al_2O_3 (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.d. (2R, n= 3).

L'exposition à 1 mg/L et 2,5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 a entraîné une diminution significative ($p < 0,05$) des taux de MT (76 % et 83 %, respectivement), tandis que 1 mg/L de NPs d' Al_2O_3 a induit une réduction (183 %) des taux de MT. Une inhibition significative (60 % à 81 %) de l'activité de l'AcHe a été observée dans tous les groupes traités aux NPs de Cr_2O_3 , et de la même manière, tous les groupes exposés aux NPs d' Al_2O_3 ont présenté une activité enzymatique réduite (36 % à 63 %).

2.1.3. Après 28 jours d'exposition

À la fin de la durée d'exposition (28 jours), les deux NPs ont augmenté les niveaux de GSH dans tous les groupes, avec une induction significative ($p < 0,05$) à 5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 (239 %) et de NPs d' Al_2O_3 (268 %). Il y a eu une induction prononcée de l'activité GST dans tous les groupes traités, avec une augmentation significative ($p < 0,05$) à 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 (351 %).

De même, tous les groupes pour les deux NPs ont montré une augmentation de l'activité GPx avec une variation significative ($p < 0,05$) à 2,5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 (382 %) et une augmentation à 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 (272 %). De même, l'activité CAT a augmenté pour tous les groupes au jour 28, avec une induction significative ($p < 0,05$) à 1 mg/L de NPs de Cr_2O_3 (65 %) et 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 (132 %). En revanche, l'activité de la SOD a été réduite dans tous les groupes exposés pour les deux NPs, avec une inhibition significative observée à 5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 (73 %).

Les niveaux de MDA dans les branchies des escargots ont été fortement affectés par les NPs d' Al_2O_3 , avec des taux d'augmentation allant de 214 % à 41 %. De même, l'exposition aux NPs de Cr_2O_3 a entraîné une augmentation ($p < 0,05$) des niveaux de MDA à 2,5 mg/L (81 %) et à 5 mg/L (227 %). Une diminution significative ($p < 0,05$) des taux de MT a été observée à 1 mg/L de NPs de Cr_2O_3 (53 %) et une induction significative ($p < 0,05$) à 1 mg/L de NPs d' Al_2O_3 . L'activité AChE a été induite par les deux NP, avec une augmentation dose-dépendante allant de 5 % à 46 % due à l'exposition aux NPs de Cr_2O_3 . Une augmentation allant de 152 % à 203 % a également été observée après l'exposition aux NPs d' Al_2O_3 .

Une augmentation significative ($p < 0,05$) entre les points de durée d'exposition a été observée pour le GSH, la CAT, le MDA, la MT et l'AChE dans les branchies des escargots traités aux NPs de Cr_2O_3 , et pour le GSH, la GST, la CAT et le MDA chez les individus exposés aux NPs d' Al_2O_3 .

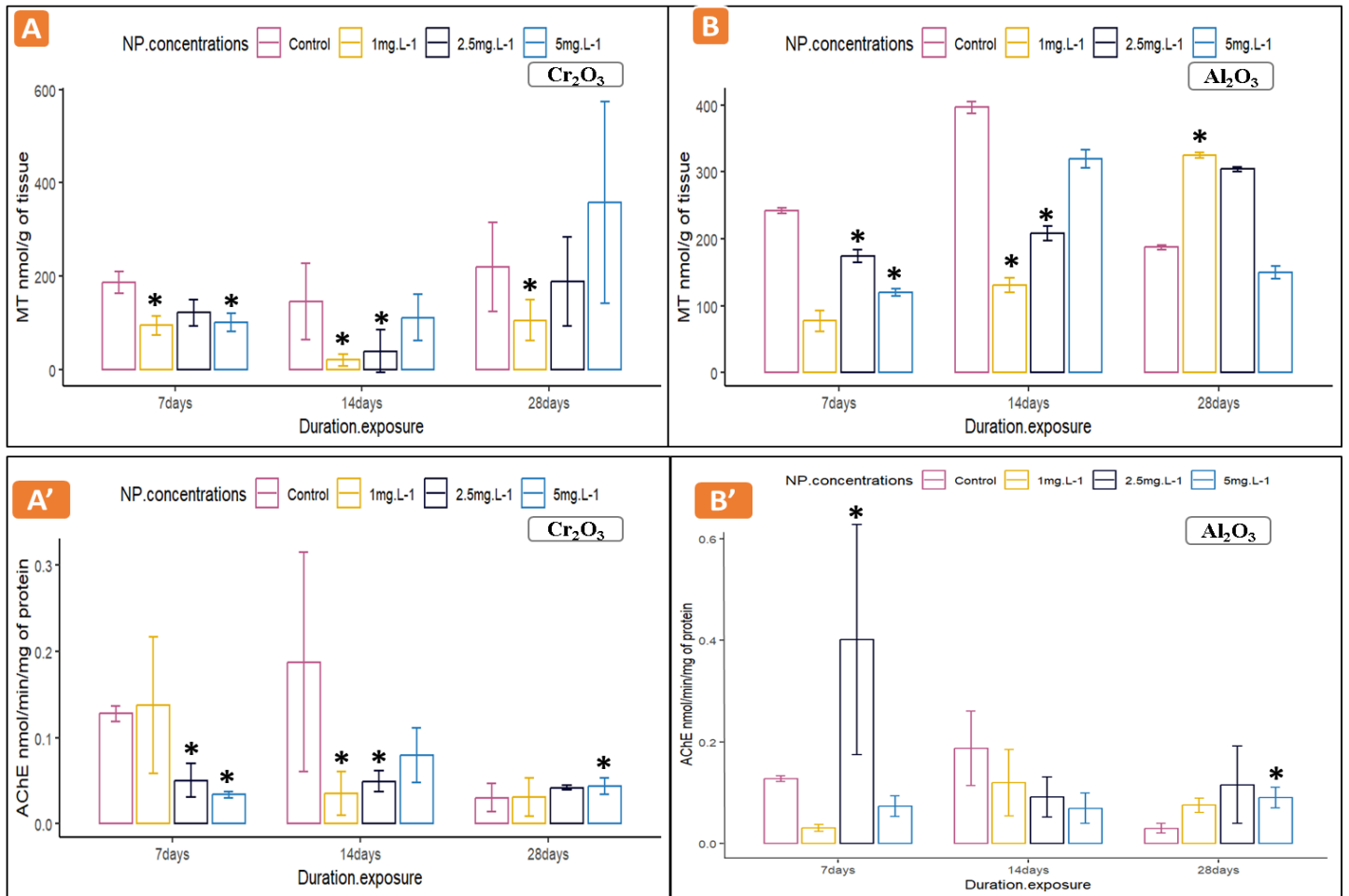


Figure 44: Les taux de MT et AChE dans les branchies de *S. haemastoma* traitées avec les NPs de Cr_2O_3 (A, A') et d' Al_2O_3 (B, B'). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.d. (2R, n= 3).

2.2. Analyse IBR

L'application de l'approche multi-biomarqueurs est un défi pour les aspects comparatifs entre les biomarqueurs ou même les effets des polluants. Au cours de cette étude, IBR v2 a été utilisé pour analyser divers biomarqueurs et présenter leurs réponses sous forme de résumés graphiques avec des valeurs numériques normalisées, permettant une meilleure identification des impacts (Liu et al., 2017 ; Li et al., 2021).

Les valeurs positives de l'IBR indiquent une induction du biomarqueur, tandis que les valeurs négatives correspondent à une inhibition, conformément à la recommandation de la conception de l'IBR v2 qui signifie version 2 ou version améliorée de celui de base (Sanchez et al., 2013).

Les valeurs de l'IBR ont été tracées et organisées en deux catégories : 1- biomarqueurs enzymatiques, et 2- biomarqueurs non enzymatiques, permettant une meilleure compréhension des résultats et une identification spécifique.

Les résultats de l'IBR v2 sont représentés sur la Fig. 45 pour les individus exposés aux NPs de Cr_2O_3 et sur la Fig. 46 pour les individus exposés aux NPs d' Al_2O_3 . L'évolution globale de l'IBR v2 en fonction des périodes d'exposition et des concentrations pour chaque NP et pour les deux est représentée dans la Fig. 47 et pourrait servir d'outil de synthèse pour identifier la tendance de la sensibilité des biomarqueurs potentiels et donc le comportement et la réponse des biomarqueurs à l'exposition aux deux NPs.

2.2.1 Après 7 jours

Après 7 jours d'exposition aux NPs de Cr_2O_3 à 1 mg/L, les valeurs IBR ont montré des réponses négatives (Comportement d'inhibition) pour la SOD, la CAT, la MT, et des réponses positives (Comportement d'induction) pour la MDA. À 2,5 mg/L, la CAT et la SOD ont eu un impact plus négatif, de même que la MT. A 5 mg/L, les valeurs IBR ont mis en évidence des réponses négatives pour l'AChE, la MT, et des réponses positives, pour la GST et la MDA. Les valeurs IBR montrent À 7 jours, les NPs d' Al_2O_3 ont induit fortement la GPx, le MDA et le GSH, signalant un stress oxydatif installé. La SOD et la CAT sont sévèrement inhibées, traduisant une atteinte des premières lignes de défense enzymatique.

2.2.2. Après 14 jours

Au jour 14, les niveaux d'IBR à 1 mg/L (NPs de Cr_2O_3) montrent que la CAT est plutôt induite, contrairement à la réponse négative de l'AChE, la MT, la GST, et le MDA. La SOD et la GPx étaient les biomarqueurs les plus affectés à 5 mg/L.

D'autre part, chez les individus exposés à 1 mg/L de NPs d' Al_2O_3 , les valeurs IBR reflétaient l'inhibition de la SOD et l'induction du GSH. À 2,5 mg/L, la GST et la SOD étaient principalement inhibées et le GSH était induit. L'indice IBR représentait une réponse positive de la MT, de la MDA et une réponse négative de l'AChE à 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 . Dans l'ensemble, lorsque l'on établit les valeurs moyennes de l'indice IBR par concentration de NP, la tendance était principalement dose-dépendante à toutes les périodes.

2.2.3. Après 28 jours

Après 28 jours, l'IBR a montré la coaction de tous les biomarqueurs dans une tendance dose-dépendante, montrant des réponses élevées pour tous les biomarqueurs pour les deux NP. L'induction de CAT < GST < GPx < AChE < MDA avec l'inhibition de la SOD représentait la réponse principale pour les deux NPs avec les valeurs IBR les plus élevées observées pour les NPs d'Al₂O₃.

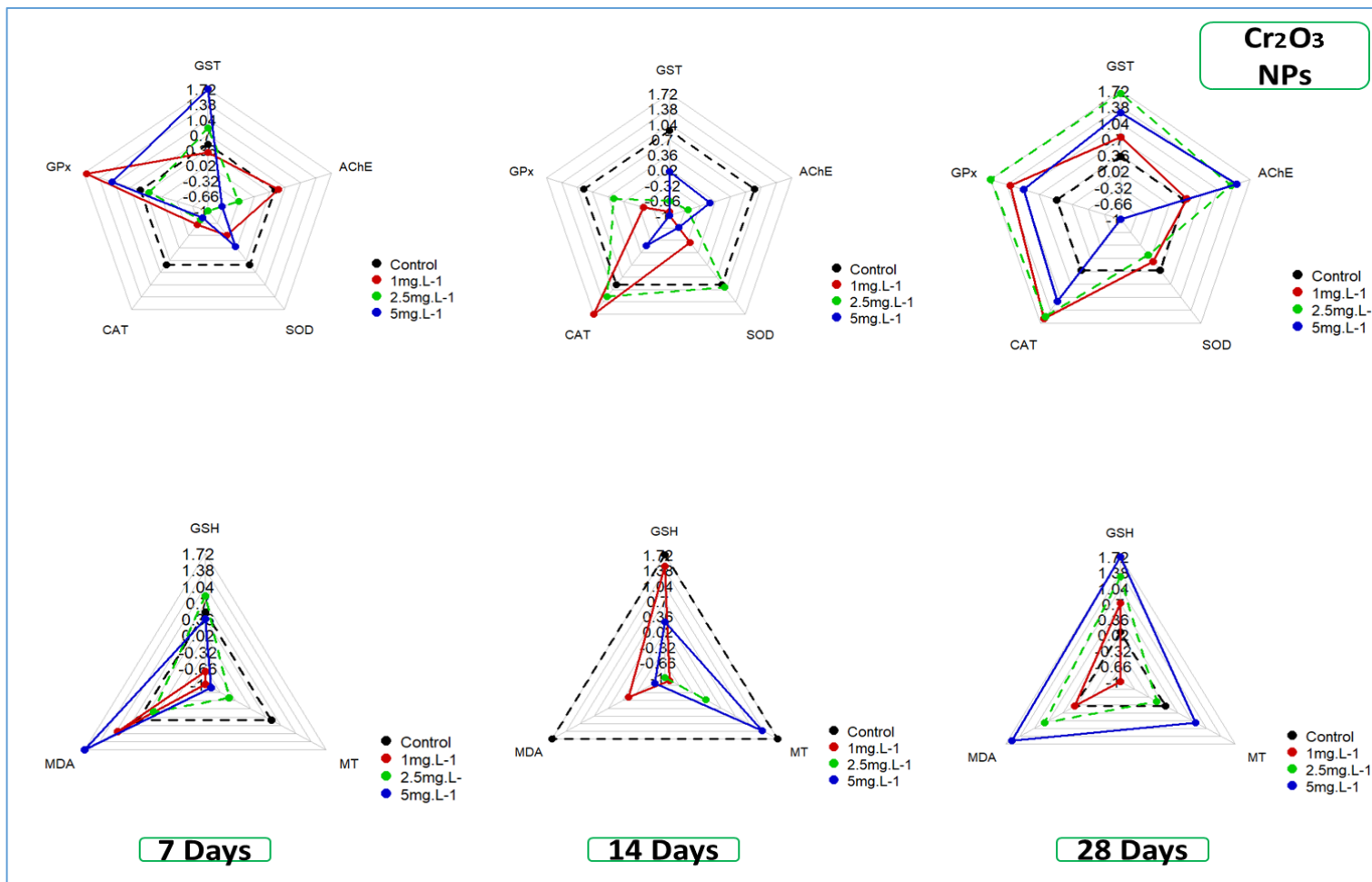


Figure 45: Représentation des résultats de l'IBR v2 des activités GST, GPx, CAT, SOD et AChE (biomarqueurs enzymatiques) et du contenu en GSH, MT, MDA (biomarqueurs non enzymatiques) dans les branchies de *S. haemastoma* traitées avec les NPs de Cr₂O₃. Pour 7, 14 et 28 jours d'exposition.

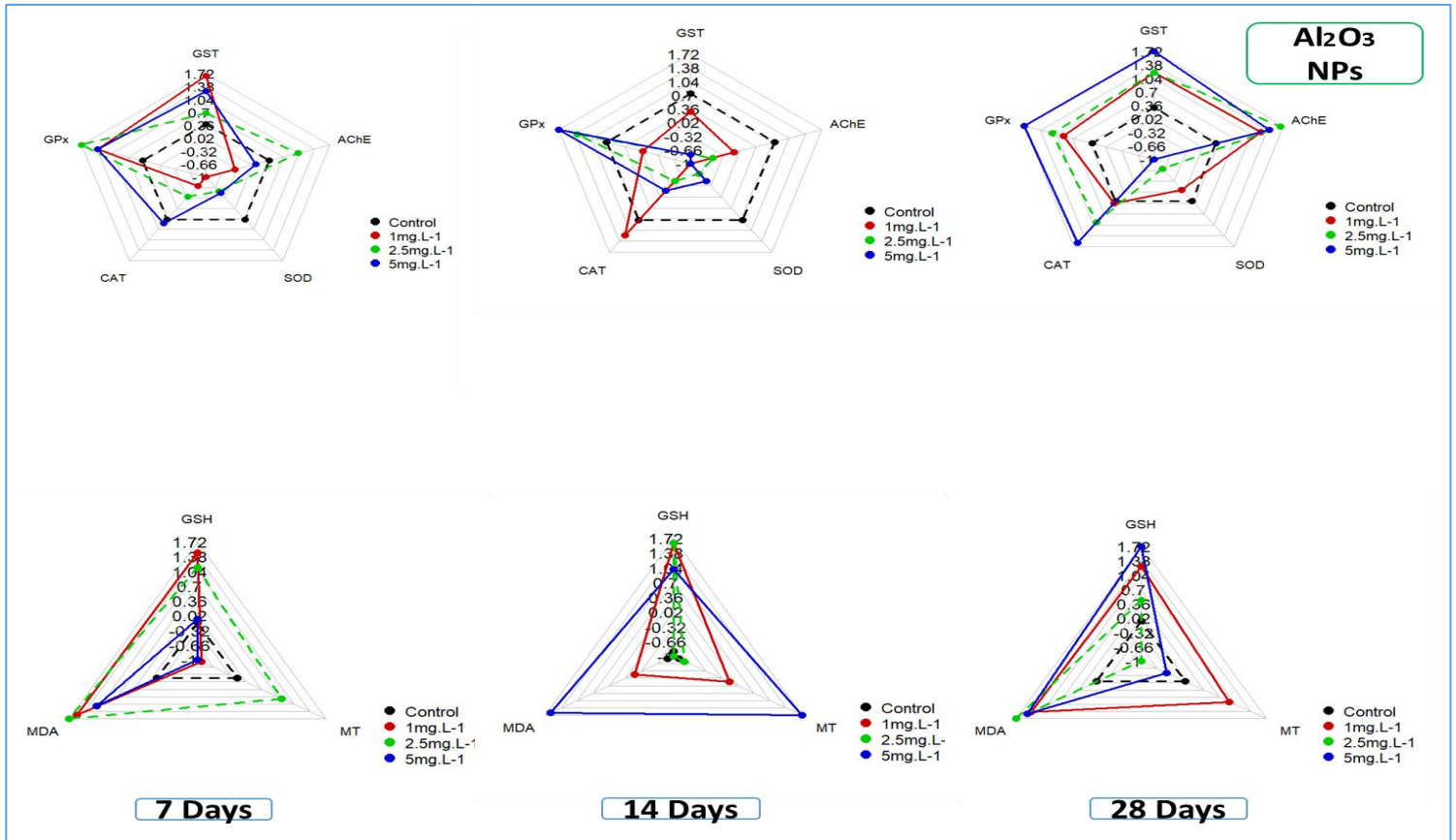


Figure 46: Représentation des résultats de l'IBR v2 des activités GST, GPx, CAT, SOD et AChE (biomarqueurs enzymatiques) et du contenu en GSH, MT, MDA (biomarqueurs non enzymatiques) dans les branchies de *S. haemastoma* traitées avec les NPs d'Al₂O₃. Pour 7, 14 et 28 jours d'exposition.

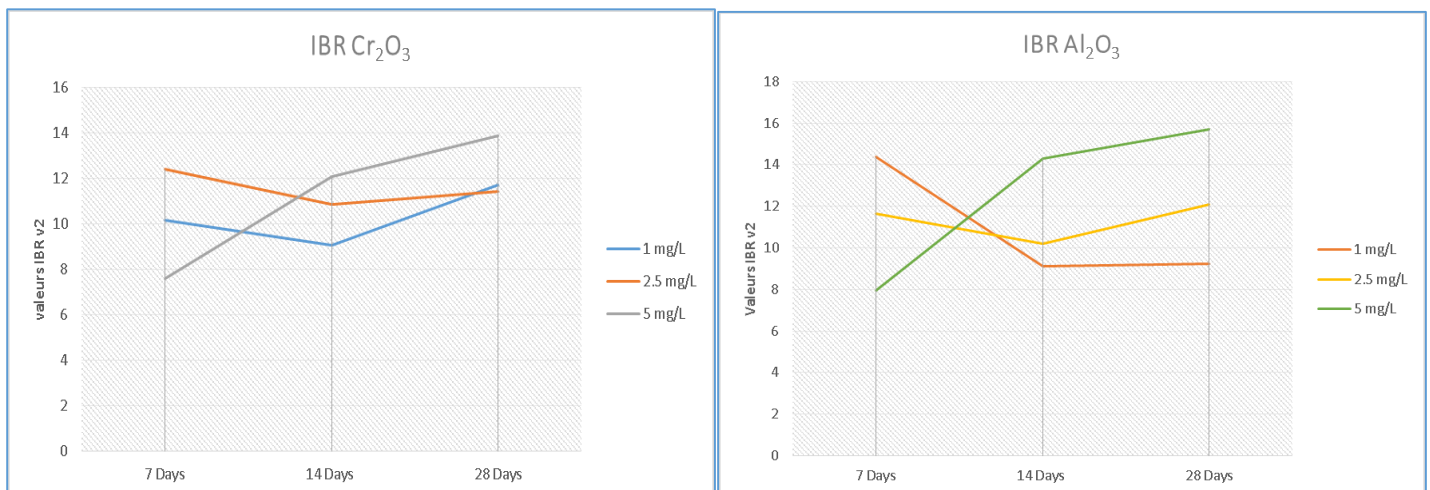


Figure 47: Evolution des valeurs IBR v2 en fonction des périodes d'exposition (7, 14 et 28 jours) et des concentrations de NPs de Cr₂O₃ et d'Al₂O₃ (contrôle, 1, 2,5 et 5 mg/L) dans les branchies de *Stramonita haemastoma*.

3. Analyse histologique

L'anatomie du système respiratoire des *Muricidae* comme *S. haemastoma* est considérée comme très développée. Cependant, les informations disponibles dans la littérature sont limitées. D'après nos observations et la littérature (Beesley et al., 1998), les branchies de *S. haemastoma* sont principalement composées d'un cténidium gauche comme organe respiratoire primaire suspendu par des membranes à la cavité du manteau et d'un organe sensible appelé ospharidium qui joue principalement un rôle de goûteur d'eau.

Les branchies sont composées principalement de feuillets (filaments) contenant des vaisseaux sanguins courants. Les clichés histologiques présentés à la figure 48 ont révélé que les branchies des poissons témoins présentaient une structure régulière, une organisation normale des filaments et une cavité centrale (figure 48. A, B).

Cependant, après 28 jours d'exposition à 1 mg/L de NPs de Cr_2O_3 . Il y avait une pluri-stratification des cellules de gobelet dans les extrémités des filaments des branchies. L'exposition à 1 mg/L de NPs d' Al_2O_3 et à 2,5 mg/L des deux NPs a entraîné un épaissement focal de l'épithélium et des filaments des branchies, avec une perte progressive de l'organisation de la structure (Fig 48. G, H, I). La fusion des lamelles a également été observée (Fig 48. F, I).

D'autre part, l'exposition à 5 mg/L de NPs de Cr_2O_3 a entraîné une forte prolifération des cellules à gobelet dans l'ensemble des lames et des filaments branchiaux, ainsi qu'une régression partielle des filaments et des signes d'inflammation (Fig. 48. D, E). L'exposition à 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 a induit un épaissement focal de l'épithélium du cténidium et des filaments (Fig, 48. H, F). À toutes les concentrations d'exposition aux NP, on a observé une hypertrophie partielle de la cavité centrale du cténidium et/ou de l'ospharidium, accompagnée d'une augmentation des cellules à mucus par rapport au témoin.

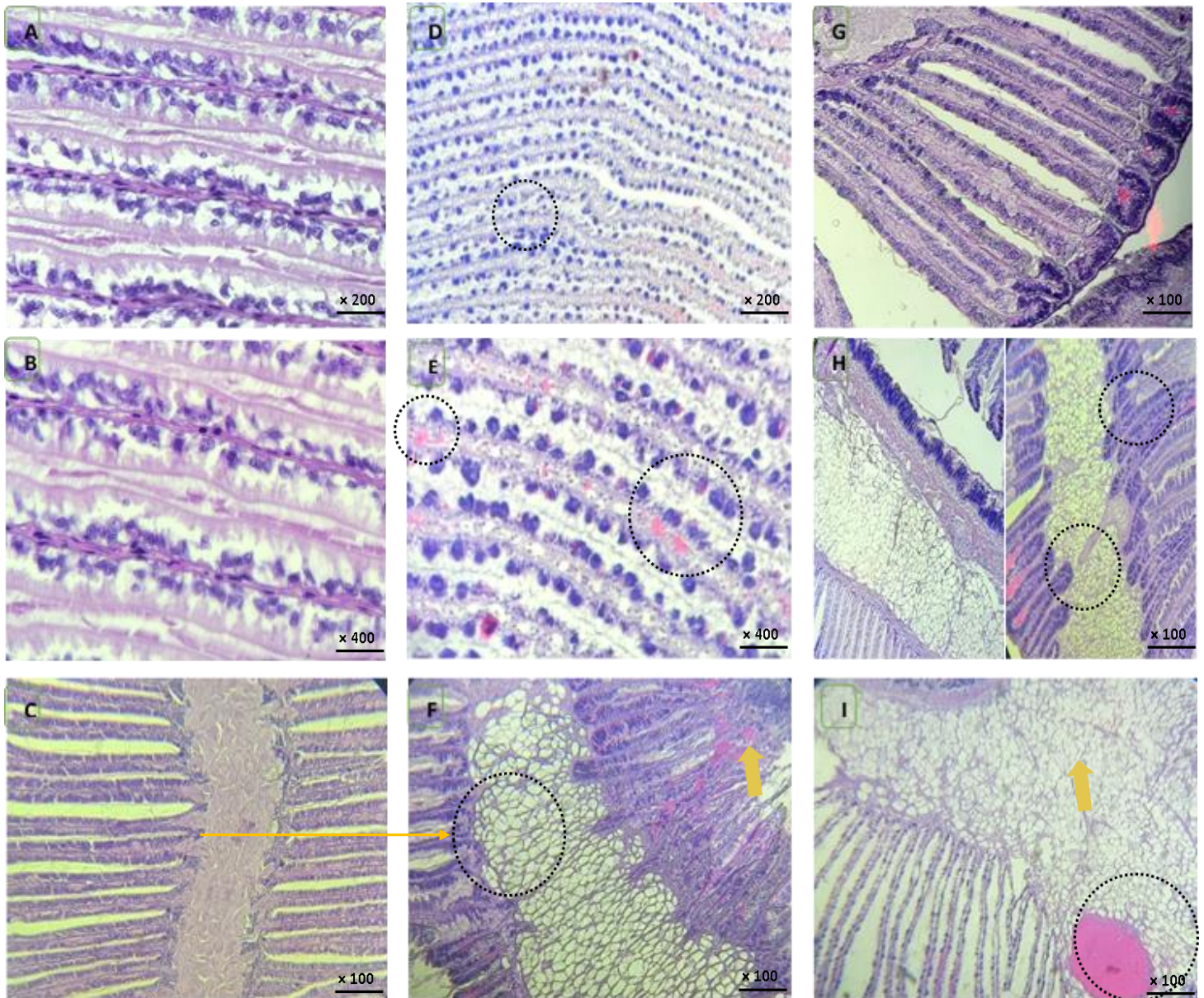


Figure 48: Altérations histologiques observées dans les branchies de *S. haemastoma* après 28 jours d'exposition aux NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 . A,B : Filaments de branchies témoins, C : Osphradium témoin, D (exposition au Cr_2O_3), E (exposition à l' Al_2O_3) : Prolifération des cellules à gobelets, F (exposition Cr_2O_3), H (les deux NP), I (exposition Al_2O_3) : hypertrophie de la cavité centrale, fusion des lamelles G (exposition Al_2O_3) : épaissement des filaments (observé dans l'exposition des deux NP), I (exposition Cr_2O_3) : altération des filaments . Coloration H&E X100, X200, X400 à faible puissance.

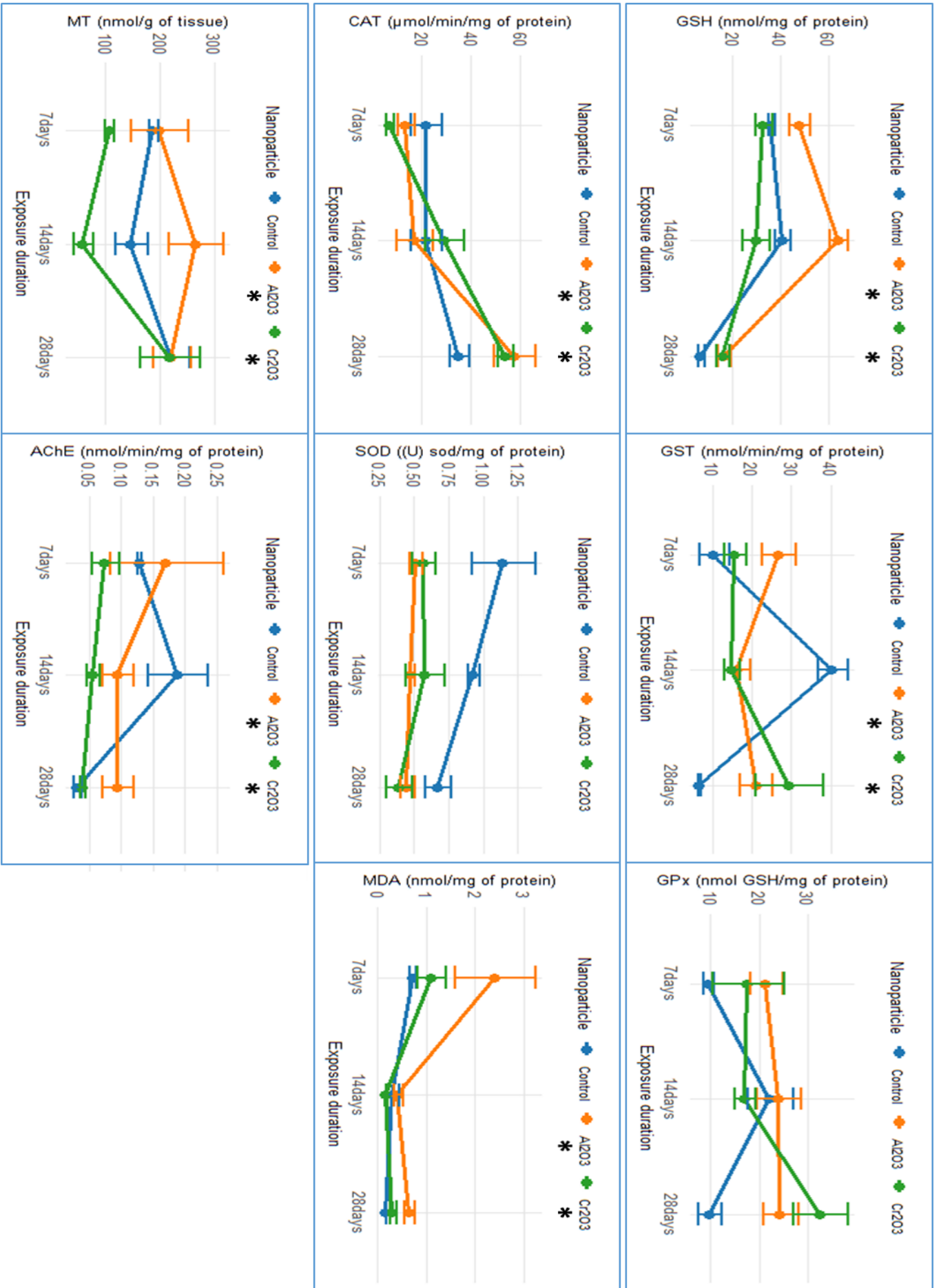


Figure 49: La variation de tendance des biomarqueurs (GSH, GST, GPx, CAT, SOD, MDA, AChE, et MT dans les branchies de *Stramonita haemastoma* exposées aux NP d'Al₂O₃ et de Cr₂O₃ en fonction des durées d'exposition (* p < 0,05).

Discussion

Discussion

La caractérisation des NPs étudiées est une première étape cruciale pour une bonne connaissance des NPs étudiées (Medici et al., 2021). Dans la présente étude, la caractérisation des NPs Cr₂O₃ et Al₂O₃ a fourni des données très précieuses sur leur taille, leur charge de surface et leur structure cristallographique. Le potentiel zêta est un paramètre important pour détecter la stabilité des NPs dans le milieu (Garcés et al., 2021). D'après le potentiel zêta, les deux NPs sont stables à un pH plus élevé, ce qui signifie qu'elles ne peuvent pas former d'agglomérations de taille extrêmement élevée.

Ils ont également montré un potentiel zêta chargé négativement, ce qui suggère leur stabilité relative dans l'eau de mer naturelle (Mezni et al., 2018). Outre le potentiel zêta et la force ionique, nous devrions discuter de l'impact des particules en suspension

. Pour notre étude, nous avons préféré utiliser de l'eau de mer naturelle plutôt que de l'eau de mer artificielle (ASW) pour imiter autant que possible les conditions de vie naturelles des escargots, ce qui inclut que les particules en suspension sont également un facteur qui joue un rôle central dans la stabilité des NPs, ils interagissent avec les NPs et augmentent leur taille d'agglomération, formant Bio-corona ou Eco-corona, ce qui pourrait augmenter la toxicité, la mobilité, et l'absorption des NPs par les organismes (Canesi et al., 2017 ; Arvidsson et al., 2020 ; Abramenko et al., 2021).

Le GSH est une molécule tripeptidique appartenant aux antioxydants non enzymatiques, il joue un rôle crucial dans le maintien de la stabilité du système redox, y compris le piégeage direct ou indirect des EROs toxiques comme l'anion superoxyde (O₂⁻) et les peroxydes (H₂O₂), la séquestration des ions métalliques en formant un complexe direct avec les xénobiotiques et la régénération des autres antioxydants ; cela implique que le GSH joue un rôle clé dans la détoxification des NPs (Valko et al., 2007 ; Forman et al., 2009).

L'évaluation des niveaux de GSH dans les glandes digestives des gastéropodes marins a révélé un déséquilibre considérable pour les deux NPs. Après 7 jours, les NPs Cr₂O₃ ont induit une forte déplétion en GSH, en particulier à 5 mg/L ; de même, une déplétion dose-dépendante a été notée pour les NPs d'Al₂O₃. Ces résultats pourraient être attribués à une réponse à l'exposition aux NPs avec une activation du système de défense contre le stress oxydatif. Des résultats similaires ont été rapportés par Xiong et al. (2011), l'exposition à ZnO et TiO₂ dans le foie du poisson zèbre a induit une diminution en GSH après 96 h. La réduction des niveaux de

GSH a été rapportée après une exposition à de faibles concentrations de NPs de Cr₂O₃ dans des cellules (L929) pendant 24 h (Alarifi et al., 2016) et *Daphnia magna* traitée par de fortes concentrations d'alpha (α-Al₂O₃) et d'eta (η-Al₂O₃) NPs (Nogueira et al., 2020).

Après 14 et 28 jours d'exposition, nos résultats indiquent une augmentation distinctive du GSH dans la glande digestive des escargots exposés aux deux NPs. Un impact similaire a été noté ; une telle augmentation, en particulier à des concentrations plus faibles, pourrait être la conséquence d'une réponse adaptative pour atténuer le stress oxydatif installé, le point crucial est la capacité de 1 mg/L à provoquer une induction constante dans les niveaux de GSH, soulignant le rôle important du GSH dans le processus de détoxification des deux NPs de Cr₂O₃ et d'Al₂O₃ (Sarkar et al., 2017), ce rôle principal attribué au GSH a été mis en évidence dans l'étude sur les NPs de Cr₂O₃ et d'Al₂O₃.

Les résultats de Gupta et al. (1999) ont suggérés l'implication du GSH dans la détoxification des éléments métalliques par le biais de réactions complexes. L'induction du GSH en réponse à la contamination par les NPs est une réaction typique chez les organismes marins, l'exposition pendant 14 jours aux NPs de TiO₂ (0,1 et 1 mg/L) chez le poisson *Oncorhynchus mykiss* a provoqué des taux de GSH plus élevés en fonction de la dose (Federici et al., 2007). De même, Cordeiro et al. (2021) ont rapporté que l'exposition de la crevette *Litopenaeus vannamei* aux NPs de TiO₂ (1 mg/L) entraînait une augmentation des niveaux de GSH.

La GST est la principale molécule enzymatique responsable de la biotransformation des xénobiotiques, y compris les NPs, en métabolites solubles, facilitant ainsi leur élimination ; elle joue un rôle important dans le processus de détoxification en catalysant la conjugaison du GSH et des xénobiotiques. La GST contribue à maintenir la stabilité du système redox cellulaire et a également des attributs pour éliminer les ERO prévenant ainsi les effets du stress oxydatif (Strange et al., 2001 ; Board et al., 2013).

D'après nos résultats, l'activité de la GST a été déclenchée au jour 7 ; globalement, les NPs de Cr₂O₃ ont eu plus d'impact que les NPs d'Al₂O₃. L'induction de la GST pourrait suggérer l'activation des voies de détoxification dans la glande digestive via le processus de biotransformation et la tentative d'éliminer les NPs avec une action spécifique de la GST dans le processus de détoxification. Les NPs utilisées dans cette étude ont induit l'activation de la GST après 14 et 28 jours avec toutes les concentrations. Par rapport aux NPs de Cr₂O₃, les NPs d'Al₂O₃ ont eu moins d'influence sur la GST.

Le processus de métabolisation a été déclenché directement depuis le début de l'exposition jusqu'à la fin de l'exposition et s'est amplifié avec le temps, ce qui s'explique par l'activation pendant toute la durée de la GST qui tente d'éliminer les deux NPs. Nos résultats concordent avec ceux de Benavides et al. (2016), qui ont rapporté une activité élevée de la GST après une exposition aux NPs Al_2O_3 et/ou ZnO_2 chez le poisson d'eau douce *Carassius auratus*, de faibles concentrations (10 et 100 $\mu\text{g/L}$) ont pu induire l'activité enzymatique de la GST à 7, 14 et 21 jours dans les branchies et le foie du poisson, Canli et al. (2022) ont rapporté des résultats similaires après une exposition au TiO_2 et à l' Al_2O_3 pendant 14 jours à 1 mg/L dans la glande digestive de la moule *Unio tigridis*.

Une augmentation de l'activité de la GST dans le foie des rats a également été observée après l'administration orale de NPs de TiO_2 , les NPs Al_2O_3 n'ont pas eu d'impact significatif sur l'activité de la GST, ce qui suggère la plus faible toxicité des NPs Al_2O_3 (Canli et al., 2019). L'induction de l'activité GST en réaction à différentes expositions aux NPs (NPs Au, CuO et CdS) chez le bivalve marin *Scrobicularia plana* a été rapportée (Mouneyrac et al., 2014), ce qui suggère qu'une activité GST élevée est un signe d'installation d'un stress oxydatif.

La GPx est un antioxydant enzymatique important, qui joue un rôle vital dans le processus de détoxification par l'élimination de la peroxydase toxique primaire H_2O_2 et EROs, via l'utilisation du GSH comme cofacteur, la GPx assure la conversion de la peroxydase toxique en eau et empêche ainsi la détérioration oxydative des cellules (Brigelius-Flohé et Maiorino, 2013).

Dans notre étude, l'activité GPx a montré des réponses nuancées à chaque NPs et à chaque période d'exposition. Après 7 jours, les NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 ont provoqué un fort déclin de l'activité GPx, seul un cas d'augmentation a été signalé après l'exposition à 5 mg/L de NPs d' Al_2O_3 . La variation des réponses de la GPx suggère la complexité des impacts des NPs sur la glande digestive des escargots et sur le système redox. Ce déséquilibre révèle que les NPs étaient capables de générer des EROs, en particulier pour les NPs de Cr_2O_3 , alors que les NPs d' Al_2O_3 peuvent ne pas avoir fortement affecté directement la capacité de la GPx à éliminer les peroxydes toxiques à ce stade précoce. Les NPs de Cr_2O_3 ont généré une réponse similaire chez le poisson d'eau douce *Labeo rohita*, 25 mg/L ont provoqué une baisse de l'activité de la GPx dans le foie et les reins, ce qui prouve que les NPs d'oxyde de chrome étaient plus toxiques que les NPs Ag, Ni et Co_3O_4 (Kanwal et al., 2019).

Globalement après 14 et 28 jours, les deux NPs ont induit une augmentation de l'activité GPx avec une tendance dose-dépendante. L'induction continue des niveaux de GPx suggère que cet antioxydant enzymatique a été stimulé par la génération de radicaux libres comme H_2O_2 et OH^* , cette réaction pourrait être expliquée par les mécanismes adaptatifs pour minimiser les altérations cellulaires. Nos résultats sont cohérents avec Huang et al. (2018), qui ont mis en évidence l'augmentation de l'activité enzymatique de la GPx après 14 jours d'exposition aux NPs de TiO_2 (2,5 et 10 mg/L) dans la glande digestive et les branchies de la moule d'eau de mer *Mytilus coruscus*. La même chose a été signalée avec les NPs de Cr_2O_3 dans les cellules (L929) (Alarifi et al., 2016), l'hépatopancréas de *Mytilus galloprovincialis* traité par gamma $\gamma-Al_2O_3$ pendant 96 h (5, 20 et 40 mg/L) (Ertürk Gürkan et Gürkan, 2021), et la glande digestive de la moule bleue *Mytilus edulis* exposée à 0,2 et 2 mg/L de TiO_2 (Farkas et al., 2015).

La CAT est un élément important de la ligne de défense du système antioxydant. Agissant avec d'autres antioxydants enzymatiques comme la GPx et la SOD, la CAT contribue efficacement à la réduction du stress oxydatif en neutralisant les EROs. Avec l'activité enzymatique, la fonction principale de la CAT est l'élimination de H_2O_2 par sa décomposition en composants non toxiques et par conséquent assure la préservation du système redox des effets nocifs des radicaux libres induits par l'état de stress oxydatif, elle a également la capacité de prévenir d'autres radicaux libres comme le peroxy-nitrite ($ONOO^-$) (Aebi, 1984 ; Sahoo et al., 2009).

L'évaluation de la tendance à la variation de l'activité CAT dans notre étude a indiqué des réponses variées en fonction des NPs, des concentrations d'exposition, et surtout du temps d'exposition. Après 7 jours d'exposition aux NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 , une inhibition dose-dépendante de la CAT a été notée. Nos résultats suggèrent qu'à ce stade précoce, les deux NPs étaient capables de déclencher un stress oxydatif dans les glandes digestives des escargots, induit par la génération des EROs qui a par conséquent provoqué l'inhibition de la CAT. Le comportement de la CAT en réaction à l'exposition aux NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 était globalement similaire à la réponse de la GPx. L'inhibition de la CAT pourrait également s'expliquer par l'importante quantité de peroxyde d'hydrogène mélangée à d'autres EROs toxiques, ce qui entraîne une saturation enzymatique, ce qui signifie que la majorité des molécules disponibles ont été submergées par la génération des EROs. Nos résultats sont cohérents avec les résultats précédents, en particulier sur les espèces aquatiques.

L'exposition à 25 mg/L de NPs de Cr₂O₃s a induit une diminution de l'activité CAT dans le foie et les reins du poisson *Labeo rohita* (Kanwal et al., 2019). Les NPs Al₂O₃, Ti₂O et CuO ont provoqué une inhibition de l'activité de la CAT après une exposition à 1, 3 et 9 mg/L chez la moule *Unio tigridis* (Canli et Canli, 2021). L'activité de la CAT a montré une activité plus faible après l'exposition aux NPs d'Al₂O₃ sur les souris et les rats (Morsy et al., 2016 ; Kozima et al., 2020), TiO₂ sur la moule *Limnoperna fortunei* (Girardello et al., 2016 ; Nunes et al., 2020).

Après 14 et 28 jours d'exposition, une sorte de mécanisme adaptatif dans le système d'oxydoréduction des escargots a été observé, la CAT a eu tendance à montrer une activité plus élevée par rapport au contrôle pour les deux NPs. Cette réponse adaptative suggère la complexité des réactions se produisant dans la glande digestive des escargots marins, il semble que les escargots se sont adaptés à l'apparition du stress oxydatif en augmentant l'expression de l'antioxydant comme un contrat pour atténuer le stress oxydatif. Mahjoubian et al. (2023) ont récemment rapporté une activation de l'activité CAT chez le poisson zèbre *Danio rerio* après 28 jours d'exposition à des NPs d'Ag et de ZnO, l'activité CAT a continué à augmenter après la période de dépuración également chez *D. rerio* traité par des NPs de SiO₂ pendant 28 jours (Rashidian et al., 2023) et chez la palourde *Ruditapes decussatus* exposée à des NPs d'Au et de TiO₂ pendant 14 jours (Saidani et al., 2019), des résultats similaires ont également été rapportés chez *Paramecium* sp. après exposition au ZnO (Khaldi et Grara, 2016).

La SOD est considérée comme une enzyme antioxydante clé dans la ligne de défense redox ; la SOD contribue à la prévention des impacts du stress oxydatif grâce à sa forte activité enzymatique contre les EROs. Elle joue un rôle crucial dans la détoxification des NPs en piégeant l'anion superoxyde (O₂⁻) et en dismutant l'O₂⁻ en H₂O₂ et H₂O (Bresciani et al., 2015 ; Dayem et al., 2017). Le comportement de l'activité enzymatique de la SOD a montré une stabilité relative par rapport à la GPx et à la CAT. Les NPs de Cr₂O₃ augmentent l'activité SOD après 7 et 14 jours, puis diminuent après 28 jours à 2,5 et 5 mg/L. Cependant, les NPs d'Al₂O₃ ont induit des impacts variés sur la SOD, le point le plus remarquable étant l'exposition à 1 mg/L qui a été capable de diminuer l'activité SOD au 7^{ème} jour, puis d'activer la SOD à 14 et 28 jours, ce qui est globalement la réaction à d'autres concentrations avec l'activité SOD la plus élevée.

De manière relativement comparable aux impacts des NPs de Cr_2O_3 sur la SOD observés dans nos résultats, Hao et al. (2009) ont rapporté que l'exposition au TiO_2 chez le poisson *Cyprinus carpio*, a provoqué une augmentation de l'activité de la SOD au début de la période d'exposition, puis une diminution de cette activité a été notée. Huang et al. (2018) ont également rapporté une réponse variable de l'activité de la SOD en fonction du temps d'exposition. L'activité de la SOD a augmenté lors du premier jour d'exposition aux NPs de TiO_2 , puis a diminué chez la moule *M. coruscus*, aussi dans la glande digestive et les branchies de *M. galloprovincialis* (Leite et al., 2019). Une activation de l'activité enzymatique de la SOD dépendante du temps (1-14 jours) a été observée suite à l'exposition de la coquille Saint-Jacques *Chlamys farreri* à 1 mg/L (NPs de TiO_2) (Xia et al., 2017).

Hao et Chen (2012) ont observé une différence dans le comportement de GPx, CAT et SOD, ils ont conclu que la dismutation du radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) n'était pas la seule source de H_2O_2 générée en réponse aux NPs de ZnO chez le poisson *C. carpio*. Il est bien connu qu'un grand nombre d'organismes peuvent réagir à la contamination par des xénobiotiques, y compris les NPs, en stimulant leur système de défense antioxydant pour se protéger des effets néfastes du stress oxydatif (génération des EROs). Le GSH, le GPx, la CAT et la SOD appartiennent au système redox, la génération des EROs comprend diverses molécules toxiques, à savoir l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), le peroxyde (ROO^{\cdot}), l'alkoxyde (RO^{\cdot}), les oxydes nitriques (NO^{\cdot}) et les hydroxydes (HO^{\cdot}), leur production accrue a été signalée en raison de l'exposition au TiO_2 et à d'autres NPs dans divers organismes aquatiques (Nel et al., 2006 ; Xia et al., 2015 ; Gulcin, 2020 ; Howard et al., 2020).

Les MT sont des protéines caractérisées par leur capacité élevée à fixer les métaux, leur affinité avec les ions métalliques et leur capacité de liaison liée à leurs résidus de cystéine et aux groupes -SH. Elles jouent un rôle important dans le processus de détoxification et la présentation du stress oxydatif par le piégeage direct ou indirect des EROs. Les NPs pourraient interagir avec les MT et affecter leur taux de liaison aux métaux et leur taux d'expression, l'augmentation des niveaux de MT étant un biomarqueur de la toxicité des NPs (Pedrini-Martha et al., 2017 ; Giannetto et al., 2018).

Dans la présente étude, les NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 ont pu déclencher des niveaux de MT dans la glande digestive de *S. haemastoma* à toutes les concentrations. La MT était sensible à l'exposition aux NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 , ce qui suggère leur rôle essentiel dans la détoxification des NPs dont la surexpression de la MT est de contracter les dommages oxydatifs, en outre, la MT pourrait être une cible de la toxicité des NPs et par conséquent initier

une cascade de réactions conduisant à la diminution de la stabilité du système d'oxydoréduction. L'induction de la MT a été précédemment rapportée chez le bivalve *M. galloprovincialis* en réponse à l'exposition aux NPs de CuO et CuO (Gomes et al., 2011 et 2012).

Des résultats similaires ont également été observés après l'exposition du bivalve *S. plana* à la fois aux NPs de CuO et ZnO solubles, les niveaux de MT ont augmenté par rapport au contrôle, ce qui pourrait être directement lié à la libération d'ions (Buffet et al., 2011 et 2012). Les NPs de TiO₂ (0,1 mg/L) n'ont pas affecté les niveaux de MT dans les branchies du bivalve *M. galloprovincialis*, cependant, la co-exposition aux NPs Cd-TiO₂ a été capable de générer des taux de MT plus élevés avec l'induction de l'expression du gène MT (Della Torre et al., 2015). Après exposition à des NPs d'Ag, Patricia et al. (2017) ont rapporté une induction de MT dépendante de la dose et du temps chez le ver de terre *Eisenia fetida*.

La surproduction des EROs pourrait provoquer une peroxydation lipidique (LPO), qui est le résultat de l'action des EROs et de la dégradation des lipides intracellulaires et extracellulaires. La LPO génère des sous-produits toxiques, dont la MDA, couramment utilisée comme biomarqueur de la LPO, l'évaluation des niveaux de MDA est une balise importante de l'étude du stress oxydatif (Li et al., 2010 ; Yonny et al., 2016).

Dans la présente étude, les niveaux de MDA ont eu tendance à être plus faibles dans les groupes exposés au jour 7 pour les deux NPs, ce qui suggère que la réponse enregistrée de la défense antioxydante a été en mesure de contrer la production des EROs et donc de prévenir les principales altérations du stress oxydatif ; par rapport aux niveaux de MDA dus aux deux NPs, les antioxydants (GSH, GST, GPx, CAT, SOD et MT) ont été fortement déséquilibrés et sollicités, ce qui explique la consommation observée de cet antioxydant au jour 7. Gornati et al. (2016) ont rapporté les effets protecteurs des gènes SOD et CAT surexprimés contre le stress oxydatif et donc la LPO, dont les niveaux ont été diminués après 96 h d'exposition aux NPs de TiO₂ (1, 5 et 10 mg/L).

Après 14 jours d'exposition, les niveaux de MDA ont commencé à augmenter à 5 mg/L de NPs de Cr₂O₃, et des niveaux similaires de MDA ont été observés dans les glandes digestives des escargots exposés aux NPs d'Al₂O₃. Après 28 jours d'exposition aux NPs de Cr₂O₃, les niveaux de MDA étaient très élevés, tandis que les NPs d'Al₂O₃ avaient moins d'impact, il induisait également des niveaux élevés de MDA, en particulier à 5 mg/L. Nos résultats

indiquent que la production des EROs ainsi que le temps et la concentration d'exposition ont eu un impact direct sur le système redox des escargots.

L'augmentation des niveaux de biomarqueurs signalée après 14 et 28 jours suggère que les escargots ont essayé de s'adapter à l'état de stress oxydatif établi afin de minimiser autant que possible les dommages oxydatifs, confirmés par les niveaux élevés de MDA. En outre, les niveaux de MDA ont montré des différences considérables entre les périodes d'exposition pour les NPs de Cr_2O_3 , ce qui indique le caractère évolutif de la LPO en fonction du temps et des concentrations d'exposition. Costa et al. (2015) ont observé l'induction de la production des EROs due à l'exposition aux NPs de Cr_2O_3 dans l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

L'AChE fait partie des enzymes qui jouent un rôle vital dans les fonctions neuromusculaires du système nerveux. Elle module la neurotransmission par une activité enzymatique comprenant l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh) (Soreq et Seidman, 2001). Souvent utilisée comme biomarqueur spécifique de la neurotoxicité, l'évaluation de l'activité de l'AChE est également considérée comme un indicateur de la neurotoxicité des NPs, mais l'évaluation de l'activité de l'AChE chez les organismes marins est encore peu utilisée (Rocha et al., 2015).

Les résultats indiquent que les NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 ont provoqué une inhibition de l'AChE après 7 jours d'exposition à toutes les concentrations. Parallèlement à la durée d'exposition, les NPs d' Al_2O_3 et de Cr_2O_3 ont déclenché l'activité de l'AChE (jours 14 et 28), l'activité enzymatique de l'AChE semble être sensible à toutes les concentrations de NPs utilisées dans cette étude. Les NPs d' Al_2O_3 ont induit un impact plus important sur l'AChE que les NPs de Cr_2O_3 . Les données présentées suggèrent la capacité des deux NPs à provoquer une neurotoxicité via un déséquilibre de l'activité de l'AChE à 1, 2,5 et 5 mg/L de chaque NPs (inhibition puis déclenchement progressif).

Hu et al. (2010) ont observé une activation de l'AChE due à une exposition de 60 jours aux NPs de TiO_2 chez la souris, associée à des effets neurologiques. L'activité de l'AChE diminue chez le poisson zèbre *D. rerio* exposé à de fortes doses (20 - 200 mg/kg) de NPs d'oxyde de fer enrobé (De Oliveira et al., 2014) et à des NPs d'Ag (2,4 mg/L) pendant 21 jours (Katuli et al., 2014). Des effets négatifs sur la mémoire et la capacité d'apprentissage de *D. rerio* adultes ont été signalés en raison de l'exposition aux NPs d' Al_2O_3 lorsque les poissons étaient

des embryons; ces effets étaient également accompagnés d'une diminution de l'ACh et d'une accumulation de NPs d' Al_2O_3 (Chen et al., 2020).

L'analyse en composantes principales (ACP) était un outil utile dans notre étude pour identifier les relations entre les réponses des biomarqueurs à l'exposition aux NPs dans la glande digestive. Chez les individus exposés aux NPs de Cr_2O_3 , PC1 a efficacement lié les biomarqueurs de stress oxydatif et confirmé la co-réponse de GSH, GPx, CAT, SOD et AChE, indiquant que les lignes de défense antioxydantes étaient sollicitées, suggérant l'importance des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans la stabilité cellulaire. De plus, la forte représentation de MT dans PC2 pourrait impliquer un rôle important dans le processus de détoxification pour atténuer le stress oxydatif.

Pour les escargots exposés aux NPs d' Al_2O_3 , les résultats de PC1 ont séparé les biomarqueurs liés au stress oxydatif tels que GSH, SOD, GST et MDA. Cet axe pourrait représenter la réponse de l'organisme aux NPs d' Al_2O_3 et l'induction du stress oxydatif. De plus, MDA montre la plus forte représentation, suggérant qu'il est un marqueur clé du stress oxydatif. PC2 reflète le processus de neurotoxicité avec l'AChE montrant la plus forte représentation dans cet axe et sa relation avec GPx et CAT. MT n'était pas liée aux autres antioxydants, indiquant une fonction détachée et des mécanismes complexes de réponse de la MT.

L'ACP est considérée comme une analyse appropriée pour comprendre la co-réponse et la relation entre les biomarqueurs, et a montré de bons résultats dans la littérature lors de l'évaluation de la toxicité des NPs (Walters et al., 2016 ; Laouati et al., 2021).

L'investigation histologique a révélé que les NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 étaient capables d'induire des dommages structurels dans la glande digestive de *S. haemastoma* après 28 jours d'exposition aquatique. La gravité des effets observés était principalement dépendante de la dose, en particulier pour les NPs de Cr_2O_3 . Les altérations histologiques notées suggèrent en outre que les deux NPs étaient transloqués et étaient en contact avec les tissus de la glande digestive, suggérant leur toxicité via leur contact direct avec les membranes cellulaires et/ou leur action indirecte par leur internalisation (Bonany et al., 2022). Plusieurs études ont rapporté des altérations histologiques dues aux NPs d' Al_2O_3 , de Cr_2O_3 et d'autres NPs, chez les bivalves (Cid et al., 2015 ; Canli et al., 2022), les crustacés (Purrari et al., 2016) et les poissons (Ramsden et al., 2013).

Les deux NPs avaient des effets toxiques sur la glande digestive de *S. haemastoma*, les NPs de Cr_2O_3 ont montré une capacité de toxicité plus élevée qu'aux NPs d' Al_2O_3 . La toxicité

médiée par les EROs via la libération d'ions est considérée comme le mécanisme d'action central des NPs. Il a été rapporté que l'absorption des agglomérats de NPs formés dans l'eau de mer par les espèces marines se faisait principalement par les branchies, puis leur translocation vers la glande digestive. Le sort des agglomérats de NPs pourrait alors être leur absorption intracellulaire et la libération d'ions, induisant ainsi de multiples impacts tels que des perturbations lysosomales et des perturbations du système redox (Ciacci et al., 2012 ; Canesi et al., 2015).

Dans la présente investigation, l'analyse DLS a montré que le diamètre moyen de zeta (Z_{avg}) des NPs de Cr_2O_3 indique une taille d'environ 250 nm à haute force ionique ($pH \approx 8$) et d'environ 150 nm pour les NPs d' Al_2O_3 ($pH \approx 8$). Les impacts observés dans notre étude suggèrent que les deux NPs ont été absorbés dans les glandes digestives des escargots. La taille, la forme, la concentration et la pureté des NPs constituent un facteur prédominant pour leur internalisation dans les cellules et leur rejet chez les organismes marins (Barmo et al., 2013). Les deux NPs évalués dans cette étude présentent une taille relativement petite et une haute pureté même à pH élevé.

La toxicité des NPs pourrait être expliquée par leur capacité à libérer des ions très actifs en contact avec les cellules. La libération d'ions hexavalents de Cr après exposition *in vitro* des cellules (A549) aux NPs de Cr_2O_3 a été rapportée, avec une cytotoxicité élevée due à la libération d'ions toxiques et à la génération des EROs via la réaction de Fenton (Horie et al., 2013 ; Alarifi et al., 2016). Les NPs de Cr_2O_3 dans notre étude étaient capables d'induire une toxicité principalement via la libération d'ions (Cr_{IV}) entraînant une augmentation du stress oxydatif. Par rapport aux NPs de Cr_2O_3 , les NPs de Al_2O_3 sont considérés comme moins toxiques. Leurs mécanismes de toxicité passent par l'augmentation de la production des EROs et la propagation de l'inflammation suite à leur internalisation par plusieurs mécanismes, notamment l'endocytose médiée par récepteur, la phagocytose et la pinocytose simple (Yang et al., 2012 ; Park et al., 2017).

Dans cette étude, la toxicité des deux NPs a été évaluée par divers indicateurs au fil du temps dans les branchies du gastéropode marin *S. haemastoma*. D'autre part, la taille, la forme, le potentiel zêta et d'autres caractérisations des NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 ont été étudiés car ce sont des facteurs importants qui pourraient améliorer ou réduire la stabilité des NPs dans le milieu et donc leur toxicité (Mezni et al., 2018 ; Arvidsson et al., 2020). Les deux NPs ont

montré des valeurs de zêta leur permettant d'être plus stables dans l'eau de mer naturelle (NSW), avec une taille moyenne de zêta allant de 200 nm à 700 nm pour les NPs de Cr₂O₃, et relativement plus faible avec un maximum de 300 nm pour les NPs d'Al₂O₃, ce qui pourrait suggérer une biodisponibilité plus élevée. Le NSW dans cette étude a été utilisé pour imiter les conditions naturelles et donc prendre en compte l'impact des particules en suspension (Canesi et al., 2017).

Les biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques sont des défenses antioxydantes cellulaires cruciales contre les dommages oxydatifs causés par les NPs. Ils jouent un rôle clé dans le processus de détoxification, soit par leur interaction directe avec les xénobiotiques dans la voie de biotransformation, soit indirectement en maintenant l'homéostasie du système redox et l'élimination des EROs (Valko et al., 2007 ; Forman et al., 2009 ; Board and Menon, 2013).

Les biomarqueurs non enzymatiques comme le GSH et la MT jouent un rôle important dans la détoxification des NPs en éliminant les EROs tels que l'anion superoxyde O₂⁻ et d'autres radicaux comme le HO, en ayant des propriétés de liaison métallique et en modulant les NPs, en particulier pour la MT, tandis que le GSH est un substrat important des antioxydants.

Leur déséquilibre est un marqueur de la toxicité des NPs (Saad et al., 2016 ; Gulcin, 2020 ; Roma et al., 2020). Le déclenchement ou l'inhibition des biomarqueurs enzymatiques est considéré comme des indicateurs de la survenue de la toxicité des NPs principalement par l'induction du stress oxydatif. La fonction principale de la GST, la GPx, la CAT et la SOD est l'élimination de nombreux types d'EROs spécifiques à chaque antioxydant. De plus, l'AChE est cruciale dans la neurotransmission en inhibant l'ACH et a été utilisée comme marqueur de la neurotoxicité dans plusieurs études. De la même manière, le MDA est une molécule résultant du processus de peroxydation lipidique causé par l'apparition du stress oxydatif. Le MDA a également été largement utilisé comme excellent marqueur de la toxicité des NPs (Hu et Gao, 2010 ; Shaw et al., 2011 ; Brigelius-Flohé et Maiorino, 2013 ; Vale et al., 2016).

L'exposition de *S. haemastoma* aux deux NPs a induit des effets variés sur les biomarqueurs dans les branchies en fonction des concentrations et des périodes. Globalement, après 7 jours, les NPs de Cr₂O₃ ont provoqué une diminution des activités de MT, AChE, CAT et SOD avec des taux plus élevés de MDA, tandis que les NPs d'Al₂O₃ ont induit une augmentation de GSH, GST, CAT et MDA avec une diminution des taux de SOD et MT. Cela suggère que les escargots marins répondent à l'exposition aux NPs par l'activation des défenses

antioxydantes pour contrer le stress oxydatif atténué, indiqué par l'augmentation des taux de MDA et l'inhibition de l'AChE. La réduction des niveaux de MT indique également le processus de détoxification des NPs. Puerari et al. (2016) ont rapporté l'induction de la toxicité médiée par les EROs par les NPs de Cr₂O₃ chez *Daphnia Magna*. Nos résultats concordent avec les conclusions de Kanwal et al. (2019) chez le poisson *Labeo rohita*, montrant une diminution de la CAT et la SOD et une induction de MDA due à 25 mg/L de Cr₂O₃.

L'exposition à des concentrations élevées de NPs d'Al₂O₃ a été rapportée pour induire une diminution de SOD et GSH, suivie par une augmentation de CAT et MDA chez *Daphnia magna* (Nogueira et al., 2020). L'induction de GST, MDA, CAT et SOD a également été rapportée chez le poisson *Carassius auratus* à faibles concentrations (10 et 100 µg/L) après 7 jours (Benavides et al. 2016). L'augmentation de CAT, MDA et du contenu en EROs a été observée chez le poisson zèbre *Danio rerio* et la palourde *Ruditapes decussatus* en raison des NPs d'Ag, ZnO, SiO₂ et TiO₂ (Saidani et al., 2019 ; Rashidian et al., 2023). La formation de filaments de mucus avec des NPs dans les branchies de la moule *Perna perna* accompagnée d'une augmentation des contenus de GST, CAT et MDA due à l'exposition aux NPs de TiO₂ (48 h) a été rapportée par Nunes et al. (2020). Dans cette étude, des phénomènes similaires ont été observés avec des microfilaments accumulant des NPs.

Ce phénomène était plus clair dans le cas des NPs de Cr₂O₃ potentiellement en raison de leur pigmentation verte. À notre connaissance, cette observation est le premier rapport d'un tel cas chez les gastéropodes et pourrait indiquer la biodisponibilité des NPs. Similaire aux résultats observés dans cette étude, l'inhibition de l'activité de l'AChE chez le poisson zèbre *D. rerio* a été rapportée après une exposition aiguë à des doses élevées (20-200 mg/kg) de NPs d'oxyde de fer (NPs IOs) et une exposition subaiguë aux NPs d'Ag (De Oliveira et al., 2014 ; Katuli et al., 2014). Des effets neurotoxiques sur les fonctions branchiales des bivalves en raison de l'exposition à des traces de métaux ont été couramment rapportés dans des études antérieures (Nelson et al., 2018).

Au jour 14, les deux NPs ont induit une diminution des activités de GST, SOD, MT et AChE, une augmentation du GSH due à l'exposition aux NPs d'Al₂O₃ tandis que les NPs de Cr₂O₃ ont provoqué une déplétion globale de GSH et une induction de la CAT. Les taux de MDA étaient moins élevés par rapport aux résultats du jour 7. Les résultats observés pourraient suggérer le début de mécanismes adaptatifs face aux dommages oxydatifs, marqués par la diminution continue de l'AChE et du MT, les variations du GSH et la diminution du GST pouvant se référer à la consommation enzymatique et au processus de détoxification des NPs.

La diminution du SOD indique également la haute production d'O₂- entraînant une instabilité du redox cellulaire. La réponse différentielle des biomarqueurs pour chaque exposition aux NPs met en évidence la complexité de l'interaction des gastéropodes en réponse à la contamination par des polluants. Les gènes du système antioxydant à régulation positive et négative ont été rapportés avec des conclusions similaires dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* exposé aux NPs de TiO₂ (Gornati et al., 2016).

Les organismes marins possèdent une diversité de mécanismes complexes et de cascades biochimiques comme adaptation au stress oxydatif allant de l'expression génique aux activités catalytiques pouvant varier en fonction du temps et des doses d'exposition (Regoli et Giuliani, 2014). Federici et al. (2007) ont rapporté une induction du GSH et une accumulation de NPs après une exposition de 14 jours à 1 mg/L de NPs de TiO₂ dans les branchies de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*. Les résultats de cette étude étaient cohérents avec les conclusions de Ray et al. (2020) qui ont rapporté une réduction des activités de SOD et CAT après 7 et 14 jours d'exposition aux NPs de CuO dans les branchies de la moule *Lamellidens marginalis* à 0,5 à 5 mg/L. Cordeiro et al. (2021) ont rapporté l'impact plus élevé des NPs de TiO₂ (1 mg/L) sur la glande digestive de la crevette *Litopenaeus vanname* par rapport à leurs branchies, où une diminution de la GST et une induction de GSH ont été rapportées. Ramsden et al. (2013) ont rapporté une induction des taux de GSH dans les branchies de *D. rerio* après une exposition à 1 mg.

Dans l'ensemble, à la fin de la période d'exposition (28 jours), les deux NPs ont induit des changements variés dans la réponse des biomarqueurs avec certaines similitudes et divergences. Par exemple, globalement, les deux NPs ont entraîné une augmentation du contenu en GSH, GST, MDA et AChE par rapport au témoin. Une augmentation de l'activité de GPx et CAT a été observée dans les groupes exposés aux NPs de Cr₂O₃, tandis qu'une diminution des niveaux due aux NPs d'Al₂O₃ a été observée, accompagnée d'une forte induction de la MT.

Les résultats suggèrent que les dommages oxydatifs cumulatifs ont été amplifiés avec le temps, avec une perte de stabilité du système redox. Les antioxydants déséquilibrés et les niveaux de MDA confirment que les systèmes de défense n'ont pas été capables de préserver la stabilité cellulaire face à l'action des EROs et indiquent que les branchies sont potentiellement une cible de la toxicité des NPs. L'induction de la GST et de GSH suggère la présence continue des NPs et leur absorption dans les branchies, agissant ainsi sur le processus de détoxification qui pourrait potentiellement participer à la libération des ions des NPs (Caixeta et al., 2020 ; Dube et Okuthe, 2023). L'induction de la CAT, la GPx, la GST et l'augmentation de MDA,

ainsi que l'inhibition de la SOD ont été précédemment rapportées par Huang et al., (2018) en raison de l'exposition au TiO₂ (2,5 mg/L-10 mg/L) chez la moule *Mytilus coruscus*. De même, l'exposition au TiO₂ (0,05-5 mg/L) a provoqué l'induction de la CAT et la GST dans les branchies de *Mytilus galloprovincialis* (Canesi et al., 2010b).

Conformément à nos résultats, l'induction du niveau de la MT et la régulation génique ont été précédemment rapportées chez les bivalves en raison de l'exposition aux NPs, indiquant que le déséquilibre de la MT est un marqueur clé de la toxicité des NPs (Buffet et al., 2011 et 2012 ; Gomes et al., 2011 et 2012). L'exposition aux TiO₂, CuO et Al₂O₃ a induit des effets similaires sur les biomarqueurs avec un impact moindre pour Al₂O₃, incluant une diminution de la CAT et la SOD et une induction de l'activité GST dans la glande digestive et les branchies de la moule *Unio tigridis* (Canli et Canli, 2021). L'accumulation d'Al₂O₃ dans les branchies a également été rapportée chez *Unio tigridis* (Canli et al., 2022) tandis que l'Al₂O₃ a été rapporté pour induire une toxicité plus élevée que les autres NPs, incluant une diminution de la SOD et une induction de la GPx chez les rats (Canli et al., 2018). Des effets neurotoxiques ont été rapportés chez *D. rerio* en raison des NPs d'Al₂O₃, incluant l'inhibition de l'ACh, l'accumulation de NPs d'Al₂O₃ et l'altération de la capacité de mémoire résultant de dommages oxydatifs (Chen et al., 2020).

L'évaluation histologique est un outil crucial et fiable qui pourrait fournir des preuves de la toxicité des NPs et de leurs impacts au niveau cellulaire à tissulaire (Cid et al., 2015 ; Leite et al., 2020). Dans la présente étude, les résultats de l'évaluation histologique ont montré des preuves claires d'altérations dans les branchies de *S. haemastoma* pour les deux NPs. Divers dommages histologiques ont été observés, allant de la fusion des lamelles à l'hypertrophie des cavités centrales des branchies avec des signes d'inflammation et de destruction des tissus.

Les branchies des escargots marins étaient sensibles aux deux concentrations de NPs et ont montré après 28 jours des preuves claires d'altération histologique progressive. Les résultats suggèrent en outre l'échec des défenses du système redox pour préserver les dommages oxydatifs et indiquent que les deux NPs de Cr₂O₃ et d'Al₂O₃ ont été absorbés et transloqués à travers les branchies de *S. haemastoma*, induisant des effets nocifs par interaction directe le long des membranes cellulaires ou par leur internalisation (Canesi et al., 2008 ; Bonany et al., 2022).

Les résultats présents sont cohérents avec les observations histologiques précédemment rapportées, plusieurs études ayant noté des altérations histologiques des branchies chez les bivalves (Cuevas et al., 2015 ; Canli et al., 2022), les gastéropodes (Arrighetti et al., 2022), les poissons (Xiong et al., 2011) et *Daphnia magna* (Puerari et al., 2016) en raison de la contamination par les NPs.

Les NPs de Cr₂O₃ ont été rapportés pour induire une inflammation et un œdème dans le foie et les reins de *Labeo rohita* après 21 jours d'exposition (Kanwel et al., 2019). La dilatation et la dégénérescence cellulaire ont également été rapportées chez les rats (Fatima et Ahmed, 2019).

Les NPs d'Al₂O₃ ont induit des agrégats de lipofuscine, une fusion des lamelles et une infiltration hémolytique après une exposition de 96 h dans les branchies de *Mytilus galloprovincialis* (Ertürk Gürkan et Gürkan, 2021). Similaire à nos résultats, Al₂O₃ a été rapporté pour induire la fusion des lamelles et l'hyperplasie dans les branchies de *Carassius auratus*, à de faibles concentrations (10 et 100 µg/L) (Benavides et al., 2016). La nécrose, l'hyperplasie et l'inflammation ont également été observées chez le poisson d'eau douce *Oreochromis mossambicus* (Murali et al., 2018).

L'utilisation de l'approche multi-biomarqueurs pour évaluer la toxicité des polluants est importante, cependant, l'interprétation des réponses de divers biomarqueurs dues à la contamination de manière indépendante pourrait être difficile à réaliser, et les chercheurs se trouvent souvent face à un dilemme difficile pour obtenir une interprétation correcte des résultats. La réponse intégrée des biomarqueurs (IBR) est un outil précieux et l'une des méthodes les plus adaptées pour évaluer les tendances des biomarqueurs de stress oxydatif (Beliaeff et Burgeot, 2002 ; Sanchez et al., 2013 ; Roma et al., 2024). Dans cet article, l'IBR a été utilisée pour clarifier et valider les résultats obtenus, car de nombreux biomarqueurs ont été évalués. En bref, les résultats de l'IBR ont montré clairement pour les deux NPs les réponses marquées des biomarqueurs en fonction des concentrations et des périodes d'exposition. À 7 et 14 jours, l'IBR a indiqué que les deux NPs avaient un impact important sur les biomarqueurs, cependant, ces périodes se caractérisaient par une réponse plus élevée de seulement 2 à 3 biomarqueurs.

À 28 jours, la réponse globale était plus élevée pour presque tous les biomarqueurs, indiquant l'apparition du stress oxydatif et des mécanismes d'adaptation pour réduire les dommages.

Les résultats pour les deux NPs confirment que les effets déclenchés à 7 jours, suggérant une réponse précoce, étaient légèrement réduits à 14 jours, suggérant l'activation des mécanismes de défense, et ont induit des valeurs plus élevées à 28 jours, indiquant les dommages oxydatifs cumulatifs entraînant une co-régulation de l'action de tous les biomarqueurs (les valeurs globales de l'IBR en fonction des périodes d'exposition et de la concentration sont présentées dans la Fig. 47). De tels résultats ne pourraient pas être détectés en évaluant les biomarqueurs individuellement, ce qui implique l'utilité de l'IBR dans l'évaluation de la toxicité des NPs. À notre connaissance, la présente étude est la première à évaluer la toxicité des NPs en utilisant l'IBR chez les gastéropodes marins, bien que l'IBR reste peu utilisée dans la littérature.

Plusieurs études connexes ont rapporté son application avec succès, mais principalement limitées aux bivalves (Xia et al., 2013 ; Devin et al., 2017 ; Liu et al., 2017 ; Li et al., 2021 ; Gonçalves et al., 2022 ; Roma et al., 2024). Les impacts dépendant du temps et de la dose sur l'IBR de SOD, CAT, AChE et MDA ont été rapportés par Xia et al. (2017) après une exposition à 1 mg/L de NPs de TiO₂ dans les branchies et les glandes digestives de la palourde *C. farreri*. L'exposition à des concentrations élevées de NPs de ZnO₂ (1 à 100 mg/L) a montré des valeurs élevées après 5 jours, puis des valeurs d'IBR réduites chez les bactéries de biofilm fluvial de GPx, CAT, SOD et GR (Hou et al., 2016). La présente est la première à utiliser cette variété de biomarqueurs incluant les réponses de l'AChE et la MT chez les gastéropodes marins.

Il est intéressant de discuter de la réponse globale des biomarqueurs. En bref, les résultats de la présente étude indiquent que l'exposition aux NPs de Cr₂O₃ a principalement diminué les niveaux de GSH, GPx, CAT, MT et AChE, en plus d'augmenter les niveaux de GST, MDA et SOD, bien que l'impact soit moindre. La SOD a montré une activité globalement plus élevée après 7 jours. Des effets similaires ont été induits par les NPs d'Al₂O₃, sauf pour la MT dont les niveaux ont augmenté.

Ce déséquilibre reflète la réponse à court terme de *S. haemastoma* à l'exposition aux NPs et ses effets. Cela pourrait par conséquent indiquer l'activation des voies de détoxification

ainsi que les effets des NPs sur le système redox des escargots. Par exemple, le ratio d'inhibition de l'ACHé met particulièrement en évidence les impacts des NPs de Cr₂O₃. Puisque tous les biomarqueurs évalués sont considérés comme des indicateurs de l'instabilité de l'homéostasie et de l'apparition du stress oxydatif, leur déséquilibre reflète l'atténuation du taux de stress.

Cette étude a investigué une variété de biomarqueurs et appartient aux rares études, voire à la première, à évaluer ce nombre de biomarqueurs, ce qui rend difficile la correspondance complète avec d'autres études. Des effets similaires sur GSH, GST, GPX, CAT, SOD et MDA ont été précédemment rapportés chez les bivalves en raison de diverses expositions aux NPs (Bour et al., 2015 ; Huang et al., 2018 ; Nunes et al., 2018 ; Cordeiro et al., 2021). La déplétion de GSH, ainsi que l'augmentation de GPx, SOD, MDA et ROS, a été rapportée dans les cellules L292 après une exposition aiguë au Cr₂O₃ (Alarifi et al., 2016).

Aux jours 14 et 28, globalement, tous les marqueurs enzymatiques et non enzymatiques ont tendance à augmenter par rapport aux groupes témoins pour les deux NPs, tout en remarquant un impact plus élevé pour les NPs de Cr₂O₃.

Cette réponse pourrait refléter l'apparition du stress oxydatif et des impacts cumulatifs des NPs, comme chez les escargots. De plus, l'augmentation des biomarqueurs, en particulier des niveaux de MDA, est un indicateur fort de dommages oxydatifs. Les niveaux élevés de MT pourraient également indiquer la réponse à la présence de NPs métalliques, car leur fonction principale est la liaison métallique et constitue une voie de détoxification principale. L'augmentation des niveaux de biomarqueurs suggère les mécanismes d'adaptation des escargots pour atténuer les effets prolongés observés par l'analyse histologique, par la régulation à la hausse du système antioxydant, avec des phénomènes similaires rapportés dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* en réponse à l'exposition au TiO₂ (Gornati et al., 2016).

Les résultats suggèrent en outre l'augmentation du statut de stress et l'accumulation de dommages oxydatifs avec l'instabilité des défenses antioxydantes. L'augmentation des niveaux d'antioxydants après l'exposition aux NPs a été rapportée dans plusieurs études sur les bivalves (Canesi et al., 2010a ; Farkas et al., 2015 ; Benavides et al., 2016 ; Nunes et al., 2020). Bien que la SOD a montré des niveaux globalement plus élevés, les deux NPs ont eu un impact moindre. Cela pourrait être attribué au fait que la toxicité des NPs passe principalement par des altérations lysosomales, augmentant ainsi la production des EROs et l'efflux des composants lysosomaux dans le cytosol, suggérant la moindre implication de la SOD, qui est principalement mitochondrial (Koehler et al., 2008 ; Roma et al., 2020). Hao et Chen (2012) ont observé une

différence dans le comportement de GPx, CAT et SOD et ont conclu que la dismutation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) n'était pas la seule source de H_2O_2 générée en réponse aux NPs de ZnO chez le poisson *C. carpio*.

L'implication des résultats présents concernant l'écosystème marin est également un point crucial à discuter. Dans notre étude, les résultats ont révélé la sensibilité de *S. haemastoma* à l'exposition aux NPs au fil du temps, ce qui indique que ces gastéropodes marins sont des bioindicateurs prometteurs des niveaux de pollution par les NPs et de la santé des écosystèmes.

Les gastéropodes ont été identifiés comme des espèces sentinelles pour l'évaluation de la contamination aquatique (Caixeta et al., 2020), en raison de leur rôle important dans la chaîne trophique marine, par exemple *S. haemastoma* est un prédateur principal des bivalves connus pour être des accumulateurs et une cible de la contamination par les NPs (Canesi et al., 2012), et même d'autres gastéropodes comme les patelles. Les escargots marins pourraient également accumuler des NPs et assurer leur transfert à des prédateurs plus grands à travers des effets en cascade, y compris la bioamplification dans la chaîne trophique. D'autre part, les NPs possèdent plusieurs caractéristiques qui leur permettent d'absorber d'autres polluants et ont suscité de l'intérêt pour la remédiation environnementale (Izadkhah et al., 2023). Une fois dans les environnements marins, les NPs pourraient interagir avec d'autres polluants et augmenter leur toxicité potentielle via une absorption et faciliter leur absorption, avec un processus nommé cheval de Troy.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

En se basant sur les données et les statistiques économiques mondiales, il est plus que probable désormais de prévoir une grande augmentation des taux de NPs métalliques libérés dans l'environnement. En effet, le développement des diverses industries globales a clairement largement influencé le marché mondial des NPs métalliques. Avec le temps la production, l'utilisation, et les échanges totaux dans ce marché sont en constante développement ce qui signifie et implique l'énorme fraction de NPs pouvant être libérées dans les divers compartiments environnementaux, et l'augmentation des risques de contaminations.

L'écosystème aquatique étant considéré comme la destination finale des NPs libérées dans les divers écosystèmes et donc potentiellement le compartiment cible des effets toxiques des NPs.

Les applications étendues des NPs pourraient accroître leur présence dans les écosystèmes aquatiques, amplifiant ainsi les dangers qu'elles représentent pour les organismes.

Cette étude est la première à enregistrer la toxicité des NPs de Cr_2O_3 et d' Al_2O_3 sur *S. haemastoma* et est également la première à évaluer les effets des NPs de Cr_2O_3 sur les organismes marins. En résumé, les résultats ont révélé les effets dépendants de la dose et du temps des deux NPs, y compris la perturbation du système antioxydant, la neurotoxicité en perturbant l'activité AChE, la peroxydation des lipides (LPO), et des altérations histologiques considérables dans la glande digestive et au niveau des branchies de *S. haemastoma* après 28 jours d'exposition.

Les données ont mis en évidence la fonction synergique des antioxydants et la réponse distincte des MT, ce qui suggère leur implication dans les voies complexes de détoxification des NPs par rapport à d'autres antioxydants. Sur la base des données présentées, les NPs de Cr_2O_3 ont montré une toxicité relativement plus élevée que les NPs d' Al_2O_3 , mais les deux NPs ont causé une toxicité élevée même à la plus faible concentration d'exposition sélectionnée, ce qui indique la nécessité d'une étude plus approfondie pour comprendre leurs impacts et leurs mécanismes de toxicité.

Par exemple, la toxicité médiée par les EROs via la libération d'ions est la voie communément suggérée dans la littérature, qui est principalement limitée aux NPs et aux espèces typiques comme TiO₂, CuO, Ag, et ZnO et les bivalves. D'autres études étendues à d'autres NPs sont recommandées, en particulier en incluant l'aspect comparatif afin d'améliorer la contextualisation de leur comportement et de leurs impacts sur les espèces marines, en particulier en raison du manque de données concernant la toxicité marine des NPs de Cr₂O₃.

Le fait que l'évaluation toxicologique des divers NPs dans la littérature scientifique actuelle soit clairement limitée et se contente sur uniquement quelques types de NPs est tout à fait alarmant à tous les niveaux, des nouvelles dispositions d'évaluation des risques et des impacts sur les écosystèmes aquatiques, notamment marins, doivent être prise afin d'assurer une prise en charge et une identification plus précise des effets de ces NPs.

La biodisponibilité des NPs étant principalement affectée par leur taille, leur forme et d'autres facteurs, il est vivement recommandé d'inclure des informations détaillées sur les NPs dans les recherches prospectives afin de pouvoir comparer efficacement les résultats.

L'influence des NPs sur le réseau trophique marin, leur aspect réglementaire et l'interaction avec d'autres polluants dans l'écosystème marin sont également des lacunes qui doivent être prises en compte. D'autre part, la présente étude a contribué à améliorer les connaissances sur la toxicité des NPs en utilisant une évaluation multi-biomarqueurs, en particulier la MT et l'ACHé qui sont trop peu étudiés dans la littérature actuelle et a mis en évidence la sensibilité de *S. haemastoma* en tant que nouveau bio-indicateur potentiellement prometteur de la pollution et de la toxicité des NPs.

Les résultats obtenus dans cette étude soulignent l'intérêt d'approfondir l'évaluation des nanoparticules métalliques dans les milieux marins. Il serait pertinent, dans de futures recherches, d'explorer les effets à long terme de ces NPs sur le cycle de vie complet de *Stramonita haemastoma*, incluant la reproduction, et la bioaccumulation transgénérationnelle. L'intégration de nouvelles approches omiques (transcriptomique, protéomique) permettrait de mieux comprendre les voies moléculaires impliquées dans la réponse au stress oxydatif et la détoxification. Par ailleurs, l'étude de mélanges de nanoparticules ou leur interaction avec d'autres polluants (métaux lourds, microplastiques) représenterait un prolongement réaliste et écologiquement pertinent.

Au-delà des réponses antioxydantes évaluées dans cette étude, il serait essentiel que de futurs travaux explorent les effets génotoxiques et immunotoxiques des nanoparticules métalliques chez *Stramonita haemastoma*. L'analyse de marqueurs tels que les cassures d'ADN (test Comet), la formation de micronoyaux ou encore les variations de l'expression des gènes liés à la réparation de l'ADN apporterait des éléments clés sur la génotoxicité potentielle de ces NPs. Parallèlement, l'examen de la réponse immunitaire, notamment à travers l'activité lysosomale, la phagocytose, ou les taux d'hémocytes, permettrait de mieux cerner leur impact sur les défenses de l'hôte.

Le recours à des techniques avancées (microscopie électronique, imagerie confocale, marquage fluorescent) pourrait élucider les mécanismes d'internalisation, la localisation subcellulaire et la dynamique des interactions entre les NPs et les structures cellulaires (membranes, noyau, organites). Ces investigations offriraient une vision intégrée et mécanistique de la toxicité à l'échelle cellulaire, essentielle pour anticiper les risques environnementaux liés aux nanomatériaux.

Enfin, la validation du modèle *Stramonita haemastoma* en biosurveillance pourrait être consolidée par des comparaisons interspécifiques et par l'élargissement des sites d'échantillonnage à d'autres zones côtières soumises à des pressions anthropiques variables.

Productions scientifiques



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere



In vivo assessment of oxidative stress, neurotoxicity and histological alterations induction in the marine gastropod *Stramonita haemastoma* exposed to Cr₂O₃ and Al₂O₃ nanoparticles

Fateh Sedrati ^a, Hana Bouzahouane ^{b,c,*}, Fadila Khaldi ^{a,b}, Mohcen Menaâ ^b, Tayeb Bouarroudj ^d, Lassaad Gzara ^e, Hadjer Zaidi ^f, Mounira Bensalem ^g, Omar Laouar ^{b,h}, Noomene Sleimi ⁱ, Hichem Nasri ^j, Kheireddine Ouali ^k

^a Laboratory of Sciences and Technology of Water and Environment, Mohamed Cherif Messouadia University, BP 1533, 41000, Souk Ahras, Algeria

^b Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Mohamed Cherif Messouadia University, Souk Ahras, 41000, Algeria

^c Laboratory of Environmental Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badj Mokrane University, BP 12, El Hadjar, Annaba, 23000, Algeria

^d Scientific and Technical Research Center in Physico-Chemical Analysis (CRAPC), Industrial Zone, PO-Box 204 Boussaid, Tlata, Algeria

^e Center of Excellence in Desalination Technology, King Abdulaziz University, P.O. Box: 80200, Jeddah, 21589, Saudi Arabia

^f Laboratory of Biodiversity and Ecosystems Pollution, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Chouli Benfoudil, El Tarf, Algeria

^g University August 20, 1955, Sétif, BP26 El Mahelk Sétif, Algeria

^h Central Laboratory of Pathology and Molecular Biology, CPE, Annaba, Algeria

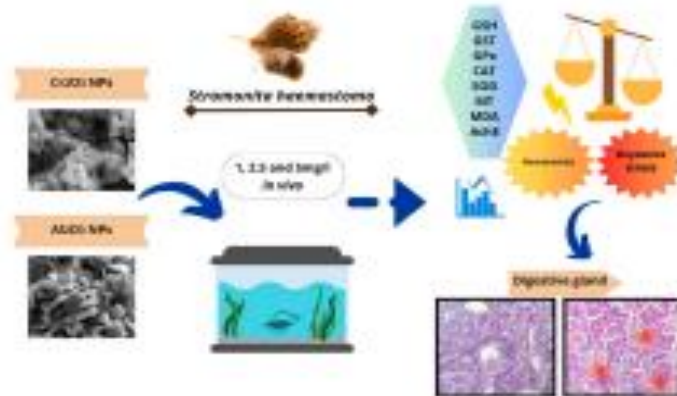
ⁱ Faculty of Medicine, Badj Mokrane University, BP 12, El Hadjar, Annaba, 23000, Algeria

^j RME-Laboratory of Resources, Materials, and Ecosystems, Faculty of Sciences of Bzerna, University of Carthage, Bzerna, 7021, Tunisia

HIGHLIGHTS

- Both nanoparticles induced oxidative stress confirmed by antioxidants imbalance.
- Npe concentrations caused multiple histological alterations after 28 days.
- Metallothionein seems to act separately from other antioxidants.
- Both Npe induced neurotoxic effects after 7 exposure days by disturbing AChE activity.

GRAPHICAL ABSTRACT



* Corresponding author. Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Mohamed Cherif Messouadia University, Souk Ahras, 41000, Algeria. E-mail address: h.bouzahouane@univ-soukahras.dz (H. Bouzahouane).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143434>

Received 8 March 2024; Received in revised form 6 August 2024; Accepted 27 September 2024

Available online 30 September 2024

0045-6535/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpc



Research article

Histological and biochemical evidence of Cr₂O₃ and Al₂O₃ nanoparticles toxicity in the marine gastropod *Stramonita haemastoma*: A preliminary application of integrated biomarker response (IBR)

Fateh Sedrati ^a, Hana Bouzahouane ^{b,c,*}, Mohcen Menaa ^b, Fadila Khaldi ^{a,b}, Tayeb Bouarroudj ^d, Lassaad Gzara ^e, Mounira Bensalem ^f, Omar Laouar ^{g,h}, Noomene Sleimi ⁱ, Hichem Nasri ^j, Carla O. Silva ^k, Kheireddine Ouali ^c

^a Laboratory of Sciences and Technology of Water and Environment, Mohamed Cherif Messadia University, BP 1533, 41000 Souk Ahras, Algeria

^b Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Mohamed Cherif Messadia University, Souk Ahras 41000, Algeria

^c Laboratory of Environmental Bioassessment, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, BP 12, El Hadjar, Annaba 23000, Algeria

^d Center for Scientific and Technical Research in Physico-Chemical Analysis (CRAPC), BP264, Bou-Jonail, Tlemcen, BP 42004, Algeria

^e Center of Excellence in Desalination Technology, King Abdulaziz University, P.O. Box: 80200, Jeddah 21589, Saudi Arabia

^f University August 20, 1955, Skikda, Sp6, El Madak, Skikda, Algeria

^g Central laboratory of pathology and molecular biology, CHU, Annaba, Algeria

^h Faculty of Medicine, Badji Mokhtar University, BP 12, El Hadjar, Annaba 23000, Algeria

ⁱ EMM-Laboratory of Resources, Materials, and Ecosystems, Faculty of Sciences of Bizerte, University of Carthage, Bizerte 7021, Tunisia

^j Laboratory of Biodiversity and Ecosystems Pollution, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Chadli Bendjedid, El Taref, Algeria

^k MARIE - Marine and Environmental Science Centre, ARNET - Aquatic Research Network Associate Laboratory, NOVA School of Science and Technology, NOVA University Lisbon, Caparica, Portugal



ARTICLE INFO

Edited by Martin Grosell

Keywords:
Stramonita haemastoma
 Al₂O₃ NPs
 Cr₂O₃ NPs
 Integrated biomarker response (IBR)
 Oxidative stress
 Histopathology

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) have actively contributed to nanotechnologies advancement over the last years, due to the unique properties they possess compared to their pristine counterparts. Consequently, NPs found wide applications in various fields such as the medical, biomedical, chemical, agro-food industries, and cosmetology. NPs extensive uses could lead to their release into the environment, especially in the marine ecosystems, considered as NPs sink, resulting in harmful effects on organisms. Concerns regarding NPs' toxicity in aquatic organisms have emerged, however, several points remain unexplained. In the present study, the toxicity of chromium oxide (Cr₂O₃ – 42 nm) and aluminum oxide (Al₂O₃ – 38 nm) NPs (1 mg/L, 2.5 mg/L, and 5 mg/L) in the gills of the marine gastropod *Stramonita haemastoma* was assessed through time (7, 14, and 28 days) by a multi-biomarker, integrated biomarker response (IBR), and histological analysis. Both NPs induced varied changes in the anti-oxidant system, suggesting the onset of oxidative stress marked by superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), acetylcholinesterase (AChE), metallothionein (MT), and malondialdehyde (MDA) levels imbalance. Varied histological alterations in the gills of *S. haemastoma* were also observed including inflammation, hypertrophy, and lamellar fusion. IBR proved to be a promising tool for assessing NPs toxicity in gastropods. In this study results indicated the co-response of reduced glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), CAT, SOD, and MT after 28 days of exposure. *S. haemastoma* showed sensitivity to all exposure concentrations of NPs thus validating this species as a suitable indicator of NPs contamination and toxicity.

1. Introduction

The advances in nanotechnologies over the last decade have contributed to extending the interest given to Nanoparticles (NPs) in a

wide range of application areas. NPs are typically defined as particles with at least one dimension varying from 1 to 100 nm, allowing them to exhibit specific functional characteristics superior to their bulk elements (Abdel-Latif et al., 2020; Abramenko et al., 2021). Consequently, NPs

* Corresponding author at: Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Mohamed Cherif Messadia University, Souk Ahras 41000, Algeria. E-mail address: h.bouzahouane@univ-soukahrass.dz (H. Bouzahouane).
<https://orcid.org/0009-0001-9096-0000> (F. Sedrati)

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2025.110159>

Received 14 October 2024; Received in revised form 29 January 2025; Accepted 20 February 2025

Available online 24 February 2025

1532-0456/© 2025 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Séminaires et Conférences Internationaux

1. **3rd International Conference on Contemporary Academic Research (ICCAR 2024)**, 10-11 novembre 2024, **Orale**, "*Analysis of Enzymatic Reactions of Catalase, Glutathione S-Transferase, and Reduced Glutathione to Cr₂O₃ Nanoparticle Exposure in Stramonita haemastoma*", **Konya, Turquie**.
2. **Mediterranean Conference on Environment, Risks and Health (MCERH' 2024)**, 15-16 octobre 2024, **Orale**, "*Exploration des Relations entre l'exposition à l'Al₂O₃ et les Réponses des Biomarqueurs chez Stramonita haemastoma*", **Université Mohamed Cherif Messaadia, Souk Ahras, [MCERH'2024](#)**.
3. **International Conference on Environmental Biology and Biotechnology (ICEBAB-24)**, 26-27 septembre 2024, **Orale**, "*Évaluation de la pollution marine par l'accumulation saisonnière des éléments traces métalliques chez S. haemastoma sur la côte Est algérienne*", **Université d'Istanbul, Turquie**.
4. **International Seminar on Agri-Food & Industrial Biotechnology (ISABI 2024)**, 26-27 juin 2024, **Poster**, "*S. haemastoma : Un Bioindicateur de la Pollution Marine par les Éléments Métalliques Trace le Long de la Côte Est Algérienne*", **Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana, Algérie**.
5. **International Seminar on Agri-Food & Industrial Biotechnology (ISABI 2024)**, 26-27 juin 2024, **Orale**, "*Nanotoxicologie et biotechnologie : induction de stress oxydant chez S. haemastoma suite à l'exposition aux nanoparticules Al₂O₃*", **Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana, Algérie**.
6. **Deuxième Séminaire International sur la Biodiversité, Environnement et Santé**, 9-10 décembre 2024, **Orale**, "*Le gastéropode marin S. haemastoma comme bioindicateur de contamination par les nanoparticules d'Al₂O₃ : étude de la neurotoxicité*", **Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie**.
7. **Deuxième Séminaire International sur la Biodiversité, Environnement et Santé**, 9-10 décembre 2024, **Poster**, "*Variations Spatiotemporelles des Biomarqueurs chez S. haemastoma : Implications pour la Surveillance Environnementale*", **Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie**.
8. **The Second International Congress on Energy and Industrial Processes Engineering (ICEIPE'24)**, 14-16 mai 2024, **Poster**, "*Acute Toxicity of Al₂O₃ Nanoparticles in the Marine Gastropod Stramonita haemastoma: Oxidative Stress and Neurotoxicity*", **Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Alger, Algérie**. DOI : <http://dx.doi.org/10.21467/abstracts.17>

9. **1^{er} Séminaire International Scientifique Tuniso-Algérien « Valorisation des Ressources Naturelles et Biosurveillance » (SISTA-VRNB)**, décembre 2023, **Poster**, "*Impact des nanoparticules du Cr₂O₃ sur l'espèce marine méditerranéenne Stramonita haemastoma*", Amir Palace - Monastir, Tunisie. Site : [SISTA-VRNB](#)
10. **First International Seminar on Ecology and Biotechnology, in Mediterranean Atmosphere Climate (ISEBMCE)**, novembre 2023, **Poster**, "*Évaluation de la toxicité subaiguë des Nanoparticules métalliques d'Al₂O₃ sur S. haemastoma (Gastropoda: Muricidae)*", Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie. Site : [ISEBMCE](#)

Séminaires et Conférences Nationaux

11. **1st National Environmental Biology And Ecology Day (NEBED1)**, 5 juin 2024, **Poster**, "*Influence des nanoparticules de Cr₂O₃ sur l'activité de la catalase, du glutathion et de la glutathion-S-transférase chez l'escargot méditerranéen Stramonita haemastoma*", Université Badji Mokhtar - Annaba, Algérie.
12. **1st National Online Seminar on the Restoration and the Rehabilitation of the Natural Ecosystems (RRNE 2024)**, 24 juin 2024, **Poster**, "*Effets neurotoxiques des nanoparticules d'Al₂O₃ sur S. haemastoma : une étude de la réponse globale*", Université de Relizane, Algérie.
13. **Séminaire national sur les bioindicateurs et la santé environnementale (SNBSE-24)**, 3-4 mai 2024, **Orale**, "*Toxicité in vivo des nanoparticules d'oxyde d'aluminium (Al₂O₃) sur l'espèce marine méditerranéenne Stramonita haemastoma*", Université Chadli Bendjedid - El Tarf, Algérie.
14. **1^{er} Séminaire National sur la Biodiversité, Risques Environnementaux et Santé Publique**, 23-24 avril 2024, **Orale**, "*Toxicité subaiguë des nanoparticules d'Al₂O₃ chez le gastéropode marin S. haemastoma : étude des effets neurotoxiques*", Université Chadli Bendjedid - El Tarf, Algérie
15. **National Doctoral Day and Research Posters "Biological Sciences"**, 2021, **Poster**, "*The toxicity of nanoparticles on a marine gastropod Stramonita haemastoma*", Université Mohamed Cherif Messaadia, Souk Ahras, Algérie.

Références Bibliographiques

- Abdel-Latif, H. M. R., Dawood, M. A. O., Menanteau-Ledouble, S., & El-Matbouli, M. (2020). Environmental transformation of n-TiO₂ in the aquatic systems and their ecotoxicity in bivalve mollusks: A systematic review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 200. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110776>
- Abramenko, N., Mashkin, P., Volkov, S., Olshanskiy, V., & Kustov, L. (2021). Fresh-Water Mollusks as Biomonitors for Ecotoxicity of Nanomaterials. *Nanomaterials*, 11(4), 944. <https://doi.org/10.3390/nano11040944>
- Adnan, W. G., & Mohammed, A. M. (2024). Green synthesis of chromium oxide nanoparticles for anticancer, antioxidant and antibacterial activities. *Inorganic Chemistry Communications*, 159, 111683. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111683>
- Akbaba, G. B., & Türkez, H. (2018). Investigation of the Genotoxicity of Aluminum Oxide, β -Tricalcium phosphate, and Zinc Oxide Nanoparticles In Vitro. *International Journal of Toxicology*, 37(3), 216–222. <https://doi.org/10.1177/1091581818775709>
- Alarifi, S., Ali, D., & Alkahtani, S. (2016). Mechanistic investigation of toxicity of chromium oxide nanoparticles in murine fibrosarcoma cells. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 1253–1259. <https://doi.org/10.2147/IJN.S99995>
- Alessandrelli, M., & Polci, M. L. (2011). CLP application to nanomaterials: a specific aspect. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 47, 146–152. https://doi.org/10.4415/ANN_11_02_05
- Al-Fakeh, M. S., & Al-Otaibi, N. F. (2022). Nd₂O₃, Cr₂O₃, and V₂O₃ Nanoparticles via Calcination: Synthesis, Characterization, Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Journal of Nanotechnology*, 2022, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2022/7794939>
- Ali, D., & Ali, H. (2015). Susceptibility of the freshwater pulmonate snail *Lymnea luteola* L. to copper oxide nanoparticle. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 97(5), 576–587. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1054607>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.081>
- Alshatwi, A. A., Subbarayan, P. V., Ramesh, E., Al-Hazzani, A. A., Alsaif, M. A., & Alwarthan, A. A. (2013). *Aluminium oxide nanoparticles induce mitochondrial-mediated oxidative stress and alter the expression of antioxidant enzymes in human mesenchymal stem cells*. 11.
- Alshatwi, A. A., Vaiyapuri Subbarayan, P., Ramesh, E., Al-Hazzani, A. A., Alsaif, M. A., & Alwarthan, A. A. (2012). Al₂O₃ Nanoparticles Induce Mitochondria-Mediated Cell Death and Upregulate the Expression of Signaling Genes in Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 26(11), 469–476. <https://doi.org/10.1002/jbt.21448>

- Ameh, T., & Sayes, C. M. (2019). The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review. *Environmental Toxicology and pharmacology*, 71, 103220. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103220>
- Andujar, P., Lanone, S., Brochard, P., & Boczkowski, J. (2009). Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées. *Revue des Maladies Respiratoires*, 26(6), 625–637. [https://doi.org/10.1016/S0761-8425\(09\)74693-5](https://doi.org/10.1016/S0761-8425(09)74693-5)
- Anu Mary Ealia, S., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263, 032019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>
- Arrighetti, F., Landro, S. M., & Lavarías, S. M. L. (2022). Sensitivity of histopathological and histochemical parameters in the digestive gland of the apple snail *Pomacea canaliculata* exposed to cypermethrin. *Aquatic Toxicology*, 252, 106292. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106292>
- Arvidsson, R., Hansen, S. F., & Baun, A. (2020). Influence of natural organic matter on the aquatic ecotoxicity of engineered nanoparticles: Recommendations for environmental risk assessment. *NanoImpact*, 20, 100263. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100263>
- Arvizo, R. R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R. A., Giri, K., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2012). Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: Past, present and future. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2943. <https://doi.org/10.1039/c2cs15355f>
- Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., & Farah, I. O. (2013). Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: Assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4), 3339–3348. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2794-7>
- Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Daniels, J., Farah, I. O., & Bogatu, C. (2015). Evaluation of alpha and gamma aluminum oxide nanoparticle accumulation, toxicity, and depuration in *Artemia salina* larvae: Al₂O₃ NP and *Artemia Salina* Larvae. *Environmental Toxicology*, 30(1), 109–118. <https://doi.org/10.1002/tox.21917>
- Atluri, R., & Jensen, K. A. (2017). Engineered Nanomaterials: Their physicochemical Characteristics and How to Measure Them. In L. Tran, M. A. Bañares, & R. Rallo (Eds.), *Modelling the Toxicity of Nanoparticles* (Vol. 947, pp. 3–23). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47754-1_1
- Ayari, T. E. (2014). *Barrières au flux génique en Méditerranée Occidentale: Étude de la différenciation génétique chez deux mollusques marins, Mytilus galloprovincialis & Stramonita haemastoma.*

- Ayari, T. E. (2015). *Barrières au flux génique en Méditerranée Occidentale: étude de la différenciation génétique chez deux mollusques marins, Mytilus galloprovincialis & Stramonita haemastoma*. l'Université Montpellier II.
- Baalousha, M., Sikder, M., Prasad, A., Lead, J., Merrifield, R., & Chandler, G. T. (2016). The concentration-dependent behaviour of nanoparticles. *Environmental Chemistry*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1071/EN15142>
- Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K., & Abdollahi, M. (n.d.). Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran. Biomed. J.*, 11.
- Baker, T. J., Tyler, C. R., & Galloway, T. S. (2014). Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*, 186, 257–271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.014>
- Barmo, C., Ciacci, C., Canonico, B., Fabbri, R., Cortese, K., Balbi, T., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., & Canesi, L. (2013). In vivo effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 132–133, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.014>
- Becker, L. C., Boyer, I., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., & Andersen, F. A. (2016). Safety Assessment of Alumina and Aluminum Hydroxide as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 35(3_suppl), 16S–33S. <https://doi.org/10.1177/1091581816677948>
- BEERS, R. F., & SIZER, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133–140.
- Beesley, Pamela L., Beesley, P. L., Ross, G. J. B., Wells, A., Study, A. B. R., & CSIRO. (1998). *Mollusca: The Southern Synthesis [Fauna of Australia. Vol. 5]*. CSIRO Publishing. <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/176878>
- Belhamel, C., Boulekbache–Makhlouf, L., Bedini, S., Tani, C., Lombardi, T., Giannotti, P., Madani, K., Belhamel, K., & Conti, B. (2020). Nanostructured alumina as seed protectant against three stored-product insect pests. *Journal of Stored Products Research*, 87, 101607. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101607>
- Beliaeff, B., & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6), 1316–1322.
- Benavides, M., Fernández-Lodeiro, J., Coelho, P., Lodeiro, C., & Diniz, M. S. (2016). Single and combined effects of aluminum (Al₂O₃) and zinc (ZnO) oxide nanoparticles in a freshwater fish, *Carassius auratus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 24578–24591. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7915-3>

- Bendoula, M. C., & Taibi, A. (2017). ABONDANCE ET STRUCTURE DÉMOGRAPHIQUE D'UN PRÉDATEUR DES PATELLES *S. HAEMASTOMA* (LINNÉ, 1767) À L'OUEST DU LITTORAL ALGÉRIEN. *Bulletin de la Société zoologique de France*, 9.
- Benkendorff, K., Rudd, D., Nongmaithem, B., Liu, L., Young, F., Edwards, V., Avila, C., & Abbott, C. (2015). Are the Traditional Medical Uses of Muricidae Molluscs Substantiated by Their pharmacological Properties and Bioactive Compounds? *Marine Drugs*, 13(8), 5237–5275. <https://doi.org/10.3390/md13085237>
- Bharti, S., Kaur, G., Jain, S., Gupta, S., & Tripathi, S. K. (2019). Characteristics and mechanism associated with drug conjugated inorganic nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, 27(8), 813–829. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1561888>
- Bhatia, S. (2016). Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In S. Bhatia, *Natural Polymer Drug Delivery Systems* (pp. 33–93). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3_2
- Biswas, P., & Wu, C.-Y. (2005). Nanoparticles and the Environment. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 55(6), 708–746. <https://doi.org/10.1080/10473289.2005.10464656>
- Blaise, C., Gagné, F., Férard, J. F., & Eullaffroy, P. (2008). Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environmental Toxicology*, 23(5), 591–598. <https://doi.org/10.1002/tox.20402>
- Blasco, J., Corsi, I., & Matranga, V. (2015). Particles in the oceans: Implication for a safe marine environment. *Marine Environmental Research*, 111, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.10.001>
- Board, P. G., & Menon, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), 3267–3288. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>
- Boczkowski, J., & Lanone, S. (2010). Nanoparticules: Une prévention est-elle possible ? *Revue Française d'Allergologie*, 50(3), 214–216. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2010.01.023>
- Bonany, M., Pérez-Berná, A. J., Dučić, T., Pereiro, E., Martín-Gómez, H., Mas-Moruno, C., van Rijt, S., Zhao, Z., Espanol, M., & Ginebra, M. P. (2022). Hydroxyapatite nanoparticles-cell interaction: New approaches to disclose the fate of membrane-bound and internalised nanoparticles. *Biomaterials Advances*, 142. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213148>
- Bouarroudj, T., Aoudjit, L., Nessaibia, I., Zioui, D., Messai, Y., Bendjama, A., Mezrag, S., Chabbi, M., & Bachari, K. (2023). Enhanced photocatalytic Activity of Ce and Ag Co-Doped ZnO Nanorods of Paracetamol and Metronidazole Antibiotics Co-Degradation in Wastewater Promoted by Solar Light. *Russian Journal of physical Chemistry A*, 97(5), 1074–1087. <https://doi.org/10.1134/S0036024423050278>

- Bouche de sang de Bonifacio, Francia le 28 juillet 2021 à 12:51 PM par osoandino · iNaturalist.* (n.d.). Retrieved January 9, 2022, from <https://www.inaturalist.org/observations/89031044>
- Boulajfene, W., Boukhicha, J., Deidun, A., Berto, D., Romeo, T., Ben Hassine, O. K., & Tlig-Zouari, S. (2015). Biomonitoring of the environmental contamination by organotins in the Gulf of Tunis: occurrence of imposex in *S. haemastoma* (Linnaeus, 1767). *Marine and Freshwater Research*, 66(9), 778. <https://doi.org/10.1071/MF13301>
- Boulajfene, W., Boukhicha, J., Hassine, O. K. B., & Tlig-Zouari, S. (2015). *Distribution and demographic structure of S. haemastoma (linnaeus, 1767) populations on the rocky shores of the gulf of tunis. 2.*
- Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., & Pinelli, E. (2015). Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 764–777. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.021>
- Bourhane Eddine, B., & Aicha Djabourabi et Mourad Bensouilah. (2008). Teneurs en Plomb, Cadmium, Mercure et Zinc relevées dans la chair de la moule, *Perna perna*, dans le littoral d'Annaba. *Revue Synthèse*, 18.
- Bouzahouane, H. (2018). *Biosurveillance environnementale du littoral Est-Algérien à travers l'utilisation d'un mollusque gastéropode S. haemastoma (Linnaeus, 1767) : approche multi-marqueurs et évaluation de la pollution métallique.* UNIVERSITÉ BADJI-MOKHTAR ANNABA.
- Bouzahouane, H., Barour, C., Sleimi, N., & Ouali, K. (2018). Multi-biomarkers approach to the assessment of the southeastern Mediterranean Sea health status: Preliminary study on *S. haemastoma* used as a bioindicator for metal contamination. *Chemosphere*, 207, 725–741. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.118>
- Bouzahouane, H., Kouki, R., Amri, S., Barour, C., Sleimi, N., & Ouali, K. (2024). Investigating seasonal metal impact on *S. haemastoma* gastropod along the Algerian East Coast: Understanding through various pollution indicators. *Marine Pollution Bulletin*, 199, 116006. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.116006>
- Bradford, M. M. (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding* (ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Vol. 72, pp. 248–254).
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Brown, K. M., & Lydeard, C. (2014). Mollusca Gastropoda. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*, 30.

- Buffet, P. E., Amiard-Triquet, C., Dybowska, A., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Valsami-Jones, E., & Mouneyrac, C. (2012). Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.010>
- Buffet, P.-E., Tankoua, O. F., Pan, J.-F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Bérard, J.-B., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Reip, P., Valsami-Jones, E., & Mouneyrac, C. (2011). Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 84(1), 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.003>
- Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M. S., Metreveli, G., Schaumann, G. E., Schulz, R., & Wagner, S. (2018). Nanoparticles in the environment: Where do we come from, where do we go to? *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>
- Buteler, M., Lopez Garcia, G., & Stadler, T. (2018). Potential of nanostructured alumina for leaf-cutting ants *Acromyrmex lobicornis* (Hymenoptera: Formicidae) management. *Austral Entomology*, 57(3), 292–296. <https://doi.org/10.1111/aen.12277>
- Caixeta, M. B., Araújo, P. S., Gonçalves, B. B., Silva, L. D., Grano-Maldonado, M. I., & Rocha, T. L. (2020). Toxicity of engineered nanomaterials to aquatic and land snails: A scientometric and systematic review. *Chemosphere*, 260, 127654. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127654>
- Calugaru, V., Magné, N., Hérault, J., Bonvalot, S., Le Tourneau, C., & Thariat, J. (2015). Nanoparticules et radiothérapie. *Bulletin du Cancer*, 102(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2014.10.002>
- Canesi, L., Balbi, T., Fabbri, R., Salis, A., Damonte, G., Volland, M., & Blasco, J. (2017). Biomolecular coronas in invertebrate species: Implications in the environmental impact of nanoparticles. *NanoImpact*, 8, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.08.001>
- Canesi, L., Ciacci, C., & Balbi, T. (2015). Interactive effects of nanoparticles with other contaminants in aquatic organisms: Friend or foe? *Marine Environmental Research*, 111, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.03.010>
- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Fabbri, R., Canonico, B., Fantinati, A., Marcomini, A., & Pojana, G. (2008). Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environment International*, 34(8), 1114–1119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.04.002>
- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., & Gallo, G. (2012). Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research*, 76, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.06.005>

- Canesi, L., Ciacci, C., Vallotto, D., Gallo, G., Marcomini, A., & Pojana, G. (2010). *In vitro* effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. *Aquatic Toxicology*, 96(2), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.017>
- Canesi, L., Fabbri, R., Gallo, G., Vallotto, D., Marcomini, A., & Pojana, G. (2010). Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquatic Toxicology*, 100(2), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.009>
- Canli, E. G., & Canli, M. (2021). Antioxidant system biomarkers of freshwater mussel (*Unio tigridis*) respond to nanoparticle (Al₂O₃, CuO, TiO₂) exposures. *Biomarkers*, 26(5), 434–442. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2021.1909655>
- Canli, E. G., Celenk, A., & Canli, M. (2022). Accumulation and Distribution of Nanoparticles (Al₂O₃, CuO, and TiO₂) in Tissues of Freshwater Mussel (*Unio tigridis*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 108(4), 702–707. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03410-5>
- Canli, E. G., Dogan, A., & Canli, M. (2018). Serum biomarker levels alter following nanoparticle (Al₂O₃, CuO, TiO₂) exposures in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology and pharmacology*, 62, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.07.009>
- Canli, E. G., Ila, H. B., & Canli, M. (2019). Response of the antioxidant enzymes of rats following oral administration of metal-oxide nanoparticles (Al₂O₃, CuO, TiO₂). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1), 938–945. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3592-8>
- Cattaneo, A., Gornati, R., Chiriva-Internati, M., & Bernardini, G. (2009). *Ecotoxicology of nanomaterials: The role of invertebrate testing*. 20.
- Chader, G., & Thassu, D. (n.d.). *Ocular Drug Delivery Systems*.
- Chen, J., Fan, R., Wang, Y., Huang, T., Shang, N., He, K., Zhang, P., Zhang, L., Niu, Q., & Zhang, Q. (2020). Progressive impairment of learning and memory in adult zebrafish treated by Al₂O₃ nanoparticles when in embryos. *Chemosphere*, 254. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126608>
- Chiavarini, S., Massanisso, P., Nicolai, P., Nobili, C., & Morabito, R. (2003). Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere*, 50(3), 311–319. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00601-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00601-X)
- Chiu, D. T. Y., Stults, F. H., & Tappel, A. L. (1976). Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 445(3), 558–566. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(76\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0005-2744(76)90110-8)
- Chuto, G., & Chaumet-Riffaud, P. (2010). Les nanoparticules. *Médecine Nucléaire*, 34(6), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2010.03.003>

- Ciacci, C., Canonico, B., Bilaničová, D., Fabbri, R., Cortese, K., Gallo, G., Marcomini, A., Pojana, G., & Canesi, L. (2012). Immunomodulation by different types of N-oxides in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036937>
- Cid, A., Picado, A., Correia, J. B., Chaves, R., Silva, H., Caldeira, J., de Matos, A. P. A., & Diniz, M. S. (2015). Oxidative stress and histological changes following exposure to diamond nanoparticles in the freshwater Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Journal of Hazardous Materials*, 284, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.055>
- Cioni, C., di Patti, M. C. B., Venturini, G., Modica, M. V., Scarpa, F., Oliverio, M., & Toni, M. (2011). Cellular, biochemical, and molecular characterization of nitric oxide synthase expressed in the nervous system of the prosobranch *Stramonita haemastoma* (Gastropoda, Neogastropoda). *Journal of Comparative Neurology*, 520(2), 364–383. <https://doi.org/10.1002/cne.22729>
- Claremont, M., Vermeij, G. J., Williams, S. T., & Reid, D. G. (2013). Global phylogeny and new classification of the Rapaninae (Gastropoda: Muricidae), dominant molluscan predators on tropical rocky seashores. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 66(1), 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.09.014>
- Cordeiro, L., Müller, L., Manske Nunes, S., Kist, L. W., Bogo, M. R., Ruas, C. P., Gelesky, M., Wasielesky, W., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J. M., & Ventura-Lima, J. (2021). Co-exposure to nTiO₂ impairs arsenic metabolism and affects antioxidant capacity in the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Drug and Chemical Toxicology*, 44(1), 30–38. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1563610>
- Corsi, I., Bellingeri, A., Eliso, M. C., Grassi, G., Liberatori, G., Murano, C., Sturba, L., Vannuccini, M. L., & Bergami, E. (2021). Eco-Interactions of Engineered Nanomaterials in the Marine Environment: Towards an Eco-Design Framework. *Nanomaterials*, 11(8), 1903. <https://doi.org/10.3390/nano11081903>
- Corsi, I., Bergami, E., & Grassi, G. (2020). Behavior and Bio-Interactions of Anthropogenic Particles in Marine Environment for a More Realistic Ecological Risk Assessment. *Frontiers in Environmental Science*, 8, 60. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00060>
- Costa, C. H. da, Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S. P., Popovic, R., & Matias, W. G. (2015). Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of the Total Environment*, 565, 951–960. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.028>
- Cranford, P. J., Ward, J. E., & Shumway, S. E. (2011). Bivalve Filter Feeding: Variability and Limits of the Aquaculture Biofilter. In S. E. Shumway (Ed.), *Shellfish Aquaculture and the Environment* (pp. 81–124). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470960967.ch4>

- Cranford, P. J., Ward, J. E., & Shumway, S. E. (2011). Bivalve Filter Feeding: Variability and Limits of the Aquaculture Biofilter. In S. E. Shumway (Ed.), *Shellfish Aquaculture and the Environment* (pp. 81–124). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470960967.ch4>
- Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Franco, J., & Larreta, J. (2015). Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: Integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquatic Toxicology*, *162*, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.011>
- Dalal, C., & Jana, N. R. (2018). Chemical Functionalization of Nanoparticle for Different Applications. In *Encyclopedia of Interfacial Chemistry* (pp. 604–613). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13190-7>
- De Biasi, J. B., Tomás, A. R. G., & Hilsdorf, A. W. S. (2016). Molecular evidence of two cryptic species of *Stramonita* (Mollusca, Muricidae) in the southeastern Atlantic coast of Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, *39*(3), 392–397. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0199>
- De Felice, B., & Parolini, M. (2020). Can Proteomics Be Considered as a Valuable Tool to Assess the Toxicity of Nanoparticles in Marine Bivalves? *Journal of Marine Science and Engineering*, *8*(12), 1033. <https://doi.org/10.3390/jmse8121033>
- de Oliveira, G. M. T., Kist, L. W., Pereira, T. C. B., Bortolotto, J. W., Paquete, F. L., de Oliveira, E. M. N., Leite, C. E., Bonan, C. D., de Souza Basso, N. R., Papaleo, R. M., & Bogo, M. R. (2014). Transient modulation of acetylcholinesterase activity caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in brain of adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and physiology Part C: Toxicology & pharmacology*, *162*, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.03.010>
- Denes, E., Barrière, G., Poli, E., & Lévêque, G. (2018). Alumina Biocompatibility. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, *28*(1), 9–13. <https://doi.org/10.1615/JLongTermEffMedImplants.2018025635>
- Deng, J., & Gao, C. (2016). Recent advances in interactions of designed nanoparticles and cells with respect to cellular uptake, intracellular fate, degradation and cytotoxicity. *Nanotechnology*, *27*(41), 412002. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/41/412002>
- Deng, Y., Yang, F., Cocco, E., Song, E., Zhang, J., Cui, J., Mohideen, M., Bellone, S., Santin, A. D., & Saltzman, W. M. (2016). Improved i.p. Drug delivery with bioadhesive nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(41), 11453–11458. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523141113>
- Devin, S., Buffet, P. E., Châtel, A., Perrein-Ettajani, H., Valsami-Jones, E., & Mouneyrac, C. (2017). The integrated biomarker response: A suitable tool to evaluate toxicity of metal-based nanoparticles. *Nanotoxicology*, *11*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1269374>

- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., & Pain-Devin, S. (2014). The integrated biomarker response revisited: Optimization to avoid misuse. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4), 2448–2454. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2169-9>
- DeVoll, J. R. (2010). Nanoparticle Toxicity. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 81(2), 152–153. <https://doi.org/10.3357/ASEM.2722.2010>
- Di Bella, G., Pizzullo, G., Bua, G. D., Potortì, A. G., Santini, A., & Giacobbe, S. (2018). Mapping toxic mineral contamination: The southern oyster drill, *S. haemastoma* (L., 1767), as evaluable sentinel species. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6380-x>
- Ditta, A., Arshad, M., & Ibrahim, M. (2015). Nanoparticles in Sustainable Agricultural Crop Production: Applications and Perspectives. In M. H. Siddiqui, M. H. Al-Whaibi, & F. Mohammad (Eds.), *Nanotechnology and Plant Sciences* (pp. 55–75). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0_4
- Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., & Adibkia, K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 44, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.031>
- Dobrovolskaia, M. A., Germolec, D. R., & Weaver, J. L. (2009). Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. *Nature Nanotechnology*, 4(7), 411–414. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.175>
- Donahue, N. D., Acar, H., & Wilhelm, S. (2019). Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 143, 68–96. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>
- Dong, L., Tang, S., Deng, F., Gong, Y., Zhao, K., Zhou, J., Liang, D., Fang, J., Hecker, M., Giesy, J. P., Bai, X., & Zhang, H. (2019). Shape-dependent toxicity of alumina nanoparticles in rat astrocytes. *Science of the Total Environment*, 690, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.532>
- Dossier : nanomatériaux, nanoparticules. (2020). Institut français de recherche et de sécurité INRS.
- Drbohlavova, J., Adam, V., Kizek, R., & Hubalek, J. (2009). Quantum Dots—Characterization, Preparation and Usage in Biological Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2), 656–673. <https://doi.org/10.3390/ijms10020656>
- Dube, E., & Okuthe, G. E. (2023). Engineered nanoparticles in aquatic systems: Toxicity and mechanism of toxicity in fish. *Emerging Contaminants*, 9(2), 100212. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2023.100212>
- Dussert, F. (2020). Vers des quantum dots moins toxiques, une approche “safer by design.” UNIVERSITE GRENOBLE.

- Eisler, R. (2010). Molluscs. In *Compendium of Trace Metals and Marine Biota* (pp. 143–397). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53439-2.00006-0>
- El Ayari, T., Abidli, S., Lahbib, Y., González, P. R., García Alonso, J. I., & Trigui-El Menif, N. (2015). The effect of size and epibiotic barnacles on imposex in *S. haemastoma* collected from the northern coast of Tunisia. *Marine Biology Research*, 11(3), 313–320. <https://doi.org/10.1080/17451000.2014.914223>
- El Ayari, T., Bierne, N., & El Menif, N. T. (2018). Imposex incidence in *S. haemastoma* (Gastropoda: Muricidae) from the Mediterranean and Atlantic coast after Tributyltin global ban. *Journal of Sea Research*, 134, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.12.004>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). *A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY* (Biochemical pharmacology, Vol. 7, pp. 88–95). Pergamon Press Ltd.
- El-Sayed, A., & Kamel, M. (2020). Advanced applications of nanotechnology in veterinary medicine. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19073–19086. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3913-y>
- Ertürk Gürkan, S., & Gürkan, M. (2021). Toxicity of gamma aluminium oxide nanoparticles in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*): Histopathological alterations and antioxidant responses in the gill and digestive gland. *Biomarkers*, 26(3), 248–259. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2021.1878558>
- European Chemicals Agency. (2017). *Guidance for identification and naming of substances under REACH and CLP: Version 2.1, May 2017*. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2823/538683>
- Fahmy, S. R., & Sayed, D. A. (2017). Toxicological perturbations of zinc oxide nanoparticles in the *Coelatura aegyptiaca* mussel. *Toxicology and Industrial Health*, 33(7), 564–575. <https://doi.org/10.1177/0748233716687927>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0020-z>
- Fan, X., Wang, C., Wang, P., Hu, B., & Wang, X. (2018). TiO₂ nanoparticles in sediments: Effect on the bioavailability of heavy metals in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. *Journal of Hazardous Materials*, 342, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.041>
- Fanny, d'Orlyé. (2008). Caractérisation physicochimique par électrophorèse capillaire de nanoparticules magnétiques, anioniques et cationiques: distribution de taille, densité de charge et coefficient de diffusion collectif. UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE.

- Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M., & Raisuddin, S. (2000). *Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues* (Aquatic Toxicology, Vol. 49, pp. 243–250). www.elsevier.com/locate/aquatox
- Fatima, R., & Ahmad, R. (2017). Assessment of Chromium Oxide Nanoparticles Intake in *Rattus norvegicus* by Primary Renal Function Markers and RBC Architecture. *Global Journal of Zoology*, 2(1), 008–012. <https://doi.org/10.17352/gjz.000005>
- Fatima, R., & Ahmad, R. (2019). Hepatotoxicity and chromosomal abnormalities evaluation due to single and repeated oral exposures of chromium oxide nanoparticles in Wistar rats. *Toxicology and Industrial Health*, 35(8), 548–557. <https://doi.org/10.1177/0748233719863632>
- Fatima, R., Akhtar, K., Hossain, M. M., & Ahmad, R. (2017). Chromium oxide nanoparticle–induced biochemical and histopathological alterations in the kidneys and brain of Wistar rats. *Toxicology and Industrial Health*, 33(12), 911–921. <https://doi.org/10.1177/0748233717735266>
- Federici, G., Shaw, B., & Handy, R. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84(4), 415–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- Fernandez, M. A., Limaverde, A. M., Castro, I. B. de, Almeida, A. C. M., & Wagener, A. de L. R. (2002). Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: Possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18(2), 463–476. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2002000200011>
- Flahaut, E., Evariste, L., Gauthier, L., Larue, C., Line, C., Meunier, É., & Mouchet, F. (2018). Toxicité des nanotubes de carbone envers l’homme et l’environnement. *Nanosciences et nanotechnologies*. <https://doi.org/10.51257/a-v1-nm8155>
- Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.013>
- Garcés, M., Cáceres, L., Chiappetta, D., Magnani, N., & Evelson, P. (2021). Current understanding of nanoparticle toxicity mechanisms and interactions with biological systems. *New Journal of Chemistry*, 45(32), 14328–14344. <https://doi.org/10.1039/D1NJ01415C>

- García-Saucedo, C., Field, J. A., Otero-Gonzalez, L., & Sierra-Álvarez, R. (2011). Low toxicity of HfO₂, SiO₂, Al₂O₃ and CeO₂ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials*, 192(3), 1572–1579. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.081>
- Ghotekar, S., Pansambal, S., Bilal, M., Pingale, S. S., & Oza, R. (2021). Environmentally friendly synthesis of Cr₂O₃ nanoparticles: Characterization, applications and future perspective – a review. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 3, 100089. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100089>
- Giacoletti, A., Rinaldi, A., Mercurio, M., Mirto, S., & Sarà, G. (2016). Local consumers are the first line to control biological invasions: A case of study with the whelk *S. haemastoma* (Gastropoda: Muricidae). *Hydrobiologia*, 772(1), 117–129. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2645-6>
- Gibot, P. (2020). Centimetric-Sized Chromium (III) Oxide Object Synthesized by Means of the Carbon Template Replication. *Ceramics*, 3(1), 92–100. <https://doi.org/10.3390/ceramics3010010>
- Gigault, J. (2011). Développement de méthodes de Fractionnement par couplage Flux-Force (FFF) – multi-détection pour la caractérisation de nanotubes de carbone dispersés en milieu aqueux. Université de Pau et des Pays de l'Adour.
- Gill, S., Löbenberg, R., Ku, T., Azarmi, S., Roa, W., & Prenner, E. J. (2007). Nanoparticles: Characteristics, Mechanisms of Action, and Toxicity in Pulmonary Drug Delivery—A Review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(2), 107–119. <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.015>
- Gomes, T., Pereira, C. G., Cardoso, C., Pinheiro, J. P., Cancio, I., & Bebianno, M. J. (2012). Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 118–119, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.017>
- Gomes, T., Pinheiro, J. P., Cancio, I., Pereira, C. G., Cardoso, C., & Bebianno, M. J. (2011). Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science & Technology*, 45(21), 9356–9362. <https://doi.org/10.1021/es200955s>
- Gonçalves, J. M., Sousa, V. S., Teixeira, M. R., & Bebianno, M. J. (2022). Chronic toxicity of polystyrene nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 287, 132356. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132356>
- González-Gálvez, D., Janer, G., Vilar, G., Vílchez, A., & Vázquez-Campos, S. (2017). The Life Cycle of Engineered Nanoparticles. In L. Tran, M. A. Bañares, & R. Rallo (Eds.), *Modelling the Toxicity of Nanoparticles* (Vol. 947, pp. 41–69). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47754-1_3
- Gornati, R., Longo, A., Rossi, F., Maisano, M., Sabatino, G., Mauceri, A., Bernardini, G., & Fasulo, S. (2016). Effects of titanium dioxide nanoparticle exposure in *Mytilus galloprovincialis* gills

and digestive gland. *Nanotoxicology*, 10(6), 807–817.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1132348>

Gosling, E. M. (2015). *Marine bivalve molluscs* (Second edition). John Wiley & Sons Inc.

Greco, F., Courbière, B., Rose, J., Orsière, T., Sari-Minodier, I., Bottero, J.-Y., Auffan, M., & Perrin, J. (2015). Reprotoxicité des nanoparticules. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 43(1), 49–55.
<https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2014.11.014>

Guidance document for the testing of dissolution and dispersion stability of nanomaterials and the use of the data for further environmental testing and assessment strategies series on testing and assessment no. 318. (2021) OCED. [guidance].

Guidance on information requirements and Chemical Safety Assessment. (2016). [Guidance]. L'Agence européenne des produits chimiques (ECHA).

Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

Habig, W. H., Pabst, M. J., And, ~, & Jakoby, W. B. (1974). *Glutathione S-Transferases THE FIRST ENZYMIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION** (THE JOURNAL OF BROMOCHEMISTRY, Vol. 249, Issue 22, pp. 7130–7139). <http://www.jbc.org/>

Handy, R. D., Henry, T. B., Scown, T. M., Johnston, B. D., & Tyler, C. R. (2008). Manufactured nanoparticles: Their uptake and effects on fish—A mechanistic analysis. *Ecotoxicology*, 17(5), 396–409. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0205-1>

Handy, R. D., Owen, R., & Valsami-Jones, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17(5), 315–325. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0206-0>

Hao, L., & Chen, L. (2012). Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.017>

Haszprunar, G., & Wanninger, A. (2012). Molluscs. *Current Biology*, 22(13), R510–R514. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.039>

Horie, M., & Tabei, Y. (2021). Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free Radical Research*, 55(4), 331–342. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1859108>

Horie, M., Nishio, K., Endoh, S., Kato, H., Fujita, K., Miyauchi, A., Nakamura, A., Kinugasa, S., Yamamoto, K., Niki, E., Yoshida, Y., & Iwahashi, H. (2013). Chromium(III) oxide nanoparticles induced remarkable oxidative stress and apoptosis on culture cells. *Environmental Toxicology*, 28(2), 61–75. <https://doi.org/10.1002/tox.20695>

- Hou, J., Wang, L., Wang, C., Zhang, S., Liu, H., Li, S., & Wang, X. (2019). Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 75, 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.010>
- Hou, J., You, G., Xu, Y., Wang, C., Wang, P., Miao, L., Dai, S., Lv, B., & Yang, Y. (2016). Antioxidant enzyme activities as biomarkers of fluvial biofilm to ZnO NPs ecotoxicity and the Integrated Biomarker Responses (IBR) assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.014>
- Houdeau, E., Lamas, B., Lison, D., & Pierre, F. (2018). Nanoparticules et alimentation: Un risque émergent en santé humaine? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 53(6), 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2018.09.001>
- Hu, Y.-L., & Gao, J.-Q. (2010). Potential neurotoxicity of nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 394(1–2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.04.026>
- Huang, C.-W., Li, S.-W., & Liao, V. H.-C. (2019). Long-term sediment exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science: Nano*, 6(8), 2602–2614. <https://doi.org/10.1039/C9EN00039A>
- Huang, X., Liu, Z., Xie, Z., Dupont, S., Huang, W., Wu, F., Kong, H., Liu, L., Sui, Y., Lin, D., Lu, W., Hu, M., & Wang, Y. (2018). Oxidative stress induced by titanium dioxide nanoparticles increases under seawater acidification in the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Marine Environmental Research*, 137, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.02.029>
- INRS. (2020). *Nanomatériaux, nanoparticules*. INRS. [Www.inrs.fr/risques/nanomateriaux](http://www.inrs.fr/risques/nanomateriaux)
- Jeevanandam, J., Chan, Y. S., & Danquah, M. K. (2016). Biosynthesis of Metal and Metal Oxide Nanoparticles. *ChemBioEng Reviews*, 3(2), 55–67. <https://doi.org/10.1002/cben.201500018>
- Julia Martínez García, M. (2017). Dyestuff, dyeing. In R. S. Bagnall, K. Brodersen, C. B. Champion, A. Erskine, & S. R. Huebner (Eds.), *The Encyclopedia of Ancient History* (pp. 1–3). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781444338386.wbeah30040>
- Ju-Nam, Y., & Lead, J. (2016). Properties, Sources, Pathways, and Fate of Nanoparticles in the Environment. In B. Xing, C. D. Vecitis, & N. Senesi, *Engineered Nanoparticles and the Environment: Biophysicochemical Processes and Toxicity* (pp. 93–117). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119275855.ch6>
- Kafi-Ahmadi, L., Khademinia, S., Poursattar Marjani, A., & Nozad, E. (2022). Microwave-assisted preparation of polysubstituted imidazoles using Zingiber extract synthesized green Cr2O3 nanoparticles. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24364-6>
- Kahru, A., & Dubourguier, H.-C. (2010). From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269(2–3), 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.016>

- Kanwal, Z., Raza, M. A., Manzoor, F., Riaz, S., Jabeen, G., Fatima, S., & Naseem, S. (2019). A comparative assessment of nanotoxicity induced by metal (Silver, Nickel) and metal oxide (cobalt, chromium) nanoparticles in *Labeo rohita*. *Nanomaterials*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/nano9020309>
- Kaplan, E. H. (2006). *Sensuous Seas: Tales of a Marine Biologist*. Princeton University Press. <https://doi.org/10.1515/9781400835645>
- Katuli, K. K., Massarsky, A., Hadadi, A., & Pourmehran, Z. (2014). Silver nanoparticles inhibit the gill Na⁺/K⁺-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.001>
- Khan, F. R., Misra, S. K., Bury, N. R., Smith, B. D., Rainbow, P. S., Luoma, S. N., & Valsami-Jones, E. (2015). Inhibition of potential uptake pathways for silver nanoparticles in the estuarine snail *Peringia ulvae*. *Nanotoxicology*, 9(4), 493–501. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.948519>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J., & Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1825–1851. <https://doi.org/10.1897/08-090.1>
- Koehler, A., Marx, U., Broeg, K., Bahns, S., & Bressling, J. (2008). Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas – A new threat to marine life? *Marine Environmental Research*, 66(1), 12–14. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.009>
- Köerich, J. S., Nogueira, D. J., Vaz, V. P., Simioni, C., Silva, M. L. N. D., Ouriques, L. C., Vicentini, D. S., & Matias, W. G. (2020). Toxicity of binary mixtures of Al₂O₃ and ZnO nanoparticles toward fibroblast and bronchial epithelium cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 83(9), 363–377. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1761496>
- Kozima, E. T., Souza, A. B. F. D., Castro, T. D. F., Matos, N. A. D., Philips, N. E., Costa, G. D. P., Talvani, A., Cangussú, S. D., & Bezerra, F. S. (2020). Aluminum hydroxide nebulization-induced redox imbalance and acute lung inflammation in mice. *Experimental Lung Research*, 46(3–4), 64–74. <https://doi.org/10.1080/01902148.2020.1728595>
- Krzyżewska, I., Kyzioł-Komosińska, J., Rosik-Dulewska, C., Czupioł, J., & Antoszczyszyn-Szpicka, P. (2016). Inorganic nanomaterials in the aquatic environment: Behavior, toxicity, and interaction with environmental elements. *Archives of Environmental Protection*, 42(1), 87–101. <https://doi.org/10.1515/aep-2016-0011>

- Kshtriya, V., Koshti, B., & Gour, N. (2021). Green synthesized nanoparticles: Classification, synthesis, characterization, and applications. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 94, pp. 173–222). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2020.12.009>
- Kumar, N., & Sinha Ray, S. (2018). Synthesis and Functionalization of Nanomaterials. In S. Sinha Ray (Ed.), *Processing of Polymer-based Nanocomposites* (Vol. 277, pp. 15–55). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97779-9_2
- Lahbib, Y., Abidli, S., & El Menif, N. T. (2011). Spawning and intracapsular development of *S. haemastoma haemastoma* (Gastropoda: Muricidae) collected in northern Tunisia. *Marine Biology Research*, 7(7), 719–726. <https://doi.org/10.1080/17451000.2011.558099>
- Lanone, S., & Boczkowski, J. (2010). Les sources de nanoparticules. *Revue Française d'Allergologie*, 50(3), 211–213. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2010.01.039>
- Lapresta-Fernández, A., Fernández, A., & Blasco, J. (2012). Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 32, 40–59. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.09.007>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3753-2>
- Latchere, O., Roman, C., Métails, I., Perrein-Ettajani, H., Mouloud, M., Georges, D., Feurtet-Mazel, A., Gigault, J., Catrouillet, C., Baudrimont, M., & Châtel, A. (2023). Toxicity assessment of environmental MPs and NPs and polystyrene NPs on the bivalve *Corbicula fluminea* using a multi-marker approach. *Comparative Biochemistry and physiology Part C: Toxicology & pharmacology*, 273, 109714. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109714>
- Leite, C., Coppola, F., Monteiro, R., Russo, T., Polese, G., Lourenço, M. A. O., Silva, M. R. F., Ferreira, P., Soares, A. M. V. M., Freitas, R., & Pereira, E. (2020). Biochemical and histopathological impacts of rutile and anatase (TiO₂ forms) in *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, 719. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134886>
- Leon, L., Chung, E. J., & Rinaldi, C. (2020). A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications. In *Nanoparticles for Biomedical Applications* (pp. 1–4). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00001-1>
- Li, H., Turner, A., & Brown, M. T. (2013). Accumulation of Aqueous and Nanoparticulate Silver by the Marine Gastropod *Littorina littorea*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(1), 1354. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1354-7>
- Li, H., Xia, P., Pan, S., Qi, Z., Fu, C., Yu, Z., Kong, W., Chang, Y., Wang, K., Wu, D., & Yang, X. (2020). The Advances of Ceria Nanoparticles for Biomedical Applications in Orthopaedics. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 7199–7214. <https://doi.org/10.2147/IJN.S270229>

- Li, J. J., Hartono, D., Ong, C. N., Bay, B. H., & Yung, L. Y. L. (2011). Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials*, 31(23), 5996–6003. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.014>
- Li, L., Gu, H., Chang, X., Huang, W., Sokolova, I. M., Wei, S., Sun, L., Li, S., Wang, X., Hu, M., Zeng, J., & Wang, Y. (2021). Oxidative stress induced by nanoplastics in the liver of juvenile large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Marine Pollution Bulletin*, 170, 112661. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112661>
- Li, Y., Yang, Y., Qing, Y., Li, R., Tang, X., Guo, D., & Qin, Y. (2020). Enhancing ZnO-NP Antibacterial and Osteogenesis Properties in Orthopedic Applications: A Review. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 6247–6262. <https://doi.org/10.2147/IJN.S262876>
- Limaverde, A. M., de L. Rebello Wagener, A., Fernandez, M. A., de L. Scofield, A., & Coutinho, R. (2007). *S. haemastoma* as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. *Marine Environmental Research*, 64(3), 384–398. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.03.001>
- Liu, H., Zhang, W., Fang, Y., Yang, H., Tian, L., Li, K., Lai, W., Bian, L., Lin, B., Liu, X., & Xi, Z. (2020). Neurotoxicity of aluminum oxide nanoparticles and their mechanistic role in dopaminergic neuron injury involving p53-related pathways. *Journal of Hazardous Materials*, 392. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122312>
- Liu, Y., Yan, Z., Xia, J., Wang, K., Ling, X., & Yan, B. (2017). Potential Toxicity in Crucian Carp Following Exposure to Metallic Nanoparticles of Copper, Chromium, and Their Mixtures: A Comparative Study. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26(5), 2085–2094. <https://doi.org/10.15244/pjoes/69251>
- López-Muñoz, D., Ochoa-Zapater, M. A., Torreblanca, A., & Garcerá, M. D. (2019). Evaluation of the effects of titanium dioxide and aluminum oxide nanoparticles through tarsal contact exposure in the model insect *Oncopeltus fasciatus*. *Science of The Total Environment*, 666, 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.218>
- Louisiane, V. (2015). *Les oxydes de chrome dans les pigments et les décors de porcelaine*. L'université pierre et marie curie.
- Lu, K. (2012). *Nanoparticulate Materials: Synthesis, Characterization, and Processing* (1st ed). John Wiley & Sons, Incorporated.
- Madeira, C., Mendonça, V., Flores, A. A. V., Diniz, M. S., & Vinagre, C. (2018). High thermal tolerance does not protect from chronic warming – A multiple end-point approach using a tropical gastropod, *Stramonita haemastoma*. *Ecological Indicators*, 91, 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.044>

- Mahaye, N., Thwala, M., Cowan, D. A., & Musee, N. (2017). Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 773, 134–160. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.004>
- Marano, F., & Guadagnini, R. (2013). Les nanoparticules dans l'alimentation: Quels risques pour le consommateur? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48(3), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2013.01.005>
- Marigómez, I., Garmendia, L., Soto, M., Orbea, A., Izagirre, U., & Cajaraville, M. P. (2013). Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: A comparative study after the Prestige oil spill “Mussel Watch.” *Ecotoxicology*, 22(3), 486–505. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1042-4>
- Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- Măruțescu, L., Chifiriuc, M. C., Postolache, C., Pircalabioru, G. G., & Bolocan, A. (2019). Nanoparticles' toxicity for humans and environment. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy* (pp. 515–535). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00012-6>
- Masse, R., & Boudène, C. (2013). Les nanoparticules constituent-elles une nouvelle classe de toxiques environnementaux? *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 74(3), 316–319. <https://doi.org/10.1016/j.admp.2012.11.001>
- Matranga, V., & Corsi, I. (2012). Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Marine Environmental Research*, 76, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.01.006>
- Maurer-Jones, M. A., Gunsolus, I. L., Murphy, C. J., & Haynes, C. L. (2013). Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Analytical Chemistry*, 85(6), 3036–3049. <https://doi.org/10.1021/ac303636s>
- Medici, S., Peana, M., Pelucelli, A., & Zoroddu, M. A. (2021). An updated overview on metal nanoparticles toxicity. *Seminars in Cancer Biology*, 76, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.06.020>
- Messai, Y., Vilen, B., Martel, D., Turek, P., & Mekki, D. E. (2018). Milling effect on the photo-activated properties of TiO₂ nanoparticles: Electronic and structural investigations. *Bulletin of Materials Science*, 41(2). <https://doi.org/10.1007/s12034-018-1572-8>
- Metal nanoparticles global market to reach \$4.2 bn by 2026 at a CAGR of 11.5%. (2023). *Focus on Catalysts*, 2023(1), 4. <https://doi.org/10.1016/j.focat.2022.12.013>

- Mezni, A., Alghool, S., Sellami, B., Ben Saber, N., & Altalhi, T. (2018). Titanium dioxide nanoparticles: Synthesis, characterisations and aquatic ecotoxicity effects. *Chemistry and Ecology*, 34(3), 288–299. <https://doi.org/10.1080/02757540.2017.1420178>
- Minetto, D., Libralato, G., & Volpi Ghirardini, A. (2014). Ecotoxicity of engineered TiO₂ nanoparticles to saltwater organisms: An overview. *Environment International*, 66, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.01.012>
- Minetto, D., Volpi Ghirardini, A., & Libralato, G. (2016). Saltwater ecotoxicology of Ag, Au, CuO, TiO₂, ZnO and C₆₀ engineered nanoparticles: An overview. *Environment International*, 92–93, 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.041>
- Modica, M. V., & Holford, M. (2010). The Neogastropoda: Evolutionary Innovations of Predatory Marine Snails with Remarkable pharmacological Potential. In P. Pontarotti (Ed.), *Evolutionary Biology – Concepts, Molecular and Morphological Evolution* (pp. 249–270). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12340-5_15
- Morsy, G. M., Abou El-Ala, K. S., & Ali, A. A. (2016). Studies on fate and toxicity of nanoalumina in male albino rats: Oxidative stress in the brain, liver and kidney. *Toxicology and Industrial Health*, 32(2), 200–214. <https://doi.org/10.1177/0748233713498462>
- Mouneyrac, C., Buffet, P.-E., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Guibbolini, M., Faverney, C. R., Gilliland, D., Berhanu, D., Dybowska, A., Châtel, A., Perrein-Ettajni, H., Pan, J.-F., Thomas-Guyon, H., Reip, P., & Valsami-Jones, E. (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. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2745-7>
- Moustafa, M. A., Mossalem, H. S., Sarhan, R. M., Abdel-Rahman, A. A., & Hassan, E. M. (2018). The potential effects of silver and gold nanoparticles as molluscicides and cercaricides on *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 117(12), 3867–3880. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6093-2>
- Mui, J., Ngo, J., & Kim, B. (2016). Aggregation and Colloidal Stability of Commercially Available Al₂O₃ Nanoparticles in Aqueous Environments. *Nanomaterials*, 6(5), 90. <https://doi.org/10.3390/nano6050090>
- Murali, M., Athif, P., Suganthi, P., Sadiq Bukhari, A., Syed Mohamed, H. E., Basu, H., & Singhal, R. K. (2018). Toxicological effect of Al₂O₃ nanoparticles on histoarchitecture of the freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. *Environmental Toxicology and pharmacology*, 59, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.004>
- Murali, M., Suganthi, P., Athif, P., Sadiq Bukhari, A., Syed Mohamed, H. E., Basu, H., & Singhal, R. K. (2017). Histological alterations in the hepatic tissues of Al₂O₃ nanoparticles exposed freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 44, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.07.001>

- Nam, D.-H., Lee, B., Eom, I., Kim, P., & Yeo, M.-K. (2014). Uptake and bioaccumulation of titanium- and silver-nanoparticles in aquatic ecosystems. *Molecular & Cellular Toxicology*, *10*(1), 9–17. <https://doi.org/10.1007/s13273-014-0002-2>
- Nanotechnologie – Nanoparticules : Quels dangers, quels risques ? Depuis le 1er rapport du Comité de la prévention et de la précaution en 2006. (2020). Comité de la Prévention et de la Précaution (CPP).
- Nanotechnologies — Explication en langage simple des termes choisis de la série de normes ISO/IEC 80004. (2017). ISO/TR 18401.
- Nasri, H., Hadjer, Z., Fateh, S., Ferial, L., & Wang, Z. (2022). The potential exposure and hazards of zirconia nanoparticles: A review. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL CONTAMINATION*, *17*(1), 1–21. <https://doi.org/10.5132/eec.2022.01.01>
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Sajjadi, M., & Issaabadi, Z. (2019). Applications of Nanotechnology in Daily Life. In *Interface Science and Technology* (Vol. 28, pp. 113–143). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00004-3>
- Nelson, M., Adams, T., Ojo, C., Carroll, M. A., & Catapane, E. J. (2018). Manganese toxicity is targeting an early step in the dopamine signal transduction pathway that controls lateral cilia activity in the bivalve mollusc *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and physiology Part - C: Toxicology and pharmacology*, *213*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.07.002>
- Ng, A. M. C., Guo, M. Y., Leung, Y. H., Chan, C. M. N., Wong, S. W. Y., Yung, M. M. N., Ma, A. P. Y., Djurišić, A. B., Leung, F. C. C., Leung, K. M. Y., Chan, W. K., & Lee, H. K. (2015). Metal oxide nanoparticles with low toxicity. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, *151*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.06.020>
- Nho, R. (2020). Pathological effects of nano-sized particles on the respiratory system. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *29*, 102242. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102242>
- Nogueira, D. J., Arl, M., Köerich, J. S., Simioni, C., Ouriques, L. C., Vicentini, D. S., & Matias, W. G. (2019). Comparison of cytotoxicity of α -Al₂O₃ and η -Al₂O₃ nanoparticles toward neuronal and bronchial cells. *Toxicology in Vitro*, *61*, 104596. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104596>
- Nogueira, D. J., Vaz, V. P., Neto, O. S., Silva, M. L. N. da, Simioni, C., Ouriques, L. C., Vicentini, D. S., & Matias, W. G. (2020). Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward *Daphnia magna* and ecological risk assessment. *Environmental Research*, *182*. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108987>
- Nowack, B., & Bucheli, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, *150*(1), 5–22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>

- Nunes, S. M., Müller, L., Simioni, C., Ouriques, L. C., Gelesky, M. A., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J. M., & Ventura-Lima, J. (2020). Impact of different crystalline forms of nTiO₂ on metabolism and arsenic toxicity in *Limnoperna fortunei*. *Science of the Total Environment*, 728. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138318>
- Ortiz, A. C., & Griffin, N. B. (Eds.). (2011). *Pollution monitoring*. Nova Science Publishers.
- Ostiguy, C., & Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail. (2010). Les nanoparticules de synthèse Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST: rapport. Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail IRSST. <http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSST/R-646.pdf>
- Ostiguy, C., Roberge, B., Woods, C., & Soucy, B. (n.d.). *Les nanoparticules de synthèse— Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST - 2e édition*.
- Otero, M., Cebrian, E., Francour, P., Galil, B., & Savini, D. (2013). *Surveillance des espèces envahissantes marines dans les aires marines protégées (AMP) méditerranéennes*. Centre de Coopération pour la Méditerranée de l'UICN. www.medpan.org, www.iucn.org/mediterranean
- Overstreet, R. M. (1978). *MARINE MALADIES? Worms, Germs, and Other Symbionts From the Northern Gulf of Mexico*. Blossman Printing, Inc.. Ocean Springs, Mississippi.
- Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., & Manavalan, R. (n.d.). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7.
- Papp, M. G., & Duarte, L. F. L. (2001). Locomotion of *S. haemastoma* (Linnaeus) (Gastropoda, Muricidae) on a mixed shore of rocks and sand. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18(1), 187–195. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752001000100022>
- Paris, J. L. (n.d.). *Chapter 1—Nanostructures for imaging, medical diagnostics and therapy*. 28.
- Peng, C., Zhang, W., Gao, H., Li, Y., Tong, X., Li, K., Zhu, X., Wang, Y., & Chen, Y. (2017). Behavior and potential impacts of metal-based engineered nanoparticles in aquatic environments. *Nanomaterials*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/nano7010021>
- 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. *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.020>
- Pezy, J.-P. (2019). First record of the gastropod *S. haemastoma* (Linnaeus, 1767) in the English Channel. *BioInvasions Records*, 8(2), 266–272. <https://doi.org/10.3391/bir.2019.8.2.08>
- Piconi, C. (2017). 1.5 Alumina ☆. In *Comprehensive Biomaterials II* (pp. 92–121). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.09247-X>
- Ponce Del Castillo, A. M. (2010). La réglementation européenne en matière de nanotechnologies. *Courrier hebdomadaire du CRISP*, n° 2065(20), 5. <https://doi.org/10.3917/cris.2065.0005>

- Poppe, G. T., & Goto, Y. (1991). *European Seashells: Scaphopoda, Bivalvia, Cephalopoda*. C. Hemmen.
- Prajitha, N., Athira, S. S., & Mohanan, P. V. (2019). Bio-interactions and risks of engineered nanoparticles. *Environmental Research*, *172*, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.003>
- Puerari, R. C., da Costa, C. H., Vicentini, D. S., Fuzinato, C. F., Melegari, S. P., Schmidt, É. C., Bouzon, Z. L., & Matias, W. G. (2016). Synthesis, characterization and toxicological evaluation of Cr₂O₃ nanoparticles using *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *128*, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.011>
- Quik, J. T. K., Vonk, J. A., Hansen, S. F., Baun, A., & Van De Meent, D. (2011). How to assess exposure of aquatic organisms to manufactured nanoparticles? *Environment International*, *37*(6), 1068–1077. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.01.015>
- Ramírez, R., Tuya, F., & Haroun, R. J. (2009). Spatial patterns in the population structure of the whelk *S. haemastoma* (Linnaeus, 1766) (Gastropoda: Muricidae) in the Canary Archipelago (eastern Atlantic). *Scientia Marina*, *73*(3), 431–437. <https://doi.org/10.3989/scimar.2009.73n3431>
- Ramsden, C. S., Henry, T. B., & Handy, R. D. (2013). Sub-lethal effects of titanium dioxide nanoparticles on the physiology and reproduction of zebrafish. *Aquatic Toxicology*, *126*, 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.021>
- Ramskov, T., Croteau, M.-N., Forbes, V. E., & Selck, H. (2015). Biokinetics of different-shaped copper oxide nanoparticles in the freshwater gastropod, *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology*, *163*, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.020>
- Ramskov, T., Forbes, V. E., Gilliland, D., & Selck, H. (2015). Accumulation and effects of sediment-associated silver nanoparticles to sediment-dwelling invertebrates. *Aquatic Toxicology*, *166*, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.002>
- Ramskov, T., Selck, H., Banta, G., Misra, S. K., Berhanu, D., Valsami-Jones, E., & Forbes, V. E. (2014). Bioaccumulation and effects of different-shaped copper oxide nanoparticles in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus antipodarum*: Bioaccumulation and effects of CuO nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *33*(9), 1976–1987. <https://doi.org/10.1002/etc.2639>
- Rashidian, G., Mohammadi-Aloucheh, R., Hosseinzadeh-Otaghvari, F., Chupani, L., Stejskal, V., Samadikhah, H., Zamanlui, S., Multisanti, C. R., & Faggio, C. (2023). Long-term exposure to small-sized silica nanoparticles (SiO₂-NPs) induces oxidative stress and impairs reproductive performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and physiology Part C: Toxicology & pharmacology*, *273*, 109715. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109715>

- Ray, A., Gautam, A., Das, S., Pal, K., Das, S., Karmakar, P., Ray, M., & Ray, S. (2020). Effects of copper oxide nanoparticle on gill filtration rate, respiration rate, hemocyte associated immune parameters and oxidative status of an Indian freshwater mussel. *Comparative Biochemistry and physiology Part - C: Toxicology and pharmacology*, 237. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108855>
- Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. (2011). Journal officiel de l'Union européenne, 3.
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>
- René Hould. (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie* (1984 Montréal : Décarie, Ed.; p. 400 p).
- Ribeiro, B., Botelho, E. C., Costa, M. L., & Bandeira, C. F. (2017). Carbon nanotube buckypaper reinforced polymer composites: a review. *Polímeros*, 27(3), 247–255. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.03916>
- Rilov, G., Gasith, A., & Benayahu, Y. (2002). Effect of an exotic prey on the feeding pattern of a predatory snail. *Marine Environmental Research*, 54(1), 85–98. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00096-X)
- Rilov, G., Gasith, A., & Benayahu, Y. (2002). Effect of an exotic prey on the feeding pattern of a predatory snail. *Marine Environmental Research*, 54(1), 85–98. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00096-X)
- Rilov, G., Gasith, A., & Benayahu, Y. (2005). Effect of disturbance on foraging: Whelk activity on wave-exposed rocky shores with minimal tidal range. *Marine Biology*, 147(2), 421–428. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-1568-y>
- Rocha, T. L., Gomes, T., Sousa, V. S., Mestre, N. C., & Bebianno, M. J. (2015). Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview. *Marine Environmental Research*, 111, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.013>
- Roma, J., Matos, A. R., Vinagre, C., & Duarte, B. (2020). Engineered metal nanoparticles in the marine environment: A review of the effects on marine fauna. *Marine Environmental Research*, 161, 105110. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105110>
- Roma, J., Missionário, M., Madeira, C., Matos, A. R., Vinagre, C., Costa, P. M., & Duarte, B. (2024). Comparative responses and effects of exposure to metallic and nanoparticle zinc in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 297, 108616. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2024.108616>

- Romero-Castillo, L., Posadas, I., & Ceña, V. (2017). Exploring the in vivo toxicity of nanoparticles. *Canadian Journal of Chemistry*, 95(9), 917–926. <https://doi.org/10.1139/cjc-2017-0203>
- Rossato, M., Castro, I. B., & Pinho, G. L. L. (2014). Imposex in *Stramonita haemastoma*: A preliminary comparison between waterborne and dietborne exposure. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 9(1), 87–92. <https://doi.org/10.5132/eec.2014.01.011>
- S. haemastoma* - EL LITORAL DE GRANADA. (n.d.). [Université de Granada Espagne]. Retrieved January 9, 2022, from <https://litoraldegranada.ugr.es/el-litoral/el-litoral-sumergido/fauna/moluscos/gasteropodos/subclase-caenogastropoda/stramonita-haemastoma/>
- S. haemastoma* (Linnaeus, 1767) | COL. (n.d.). Catalogue of Life. Retrieved January 10, 2022, from <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/52V98>
- Saad, A. A., El-Sikaily, A., & Kassem, H. (2016). Metallothionein and Glutathione Content as Biomarkers of Metal Pollution in Mussels and Local Fishermen in Abu Qir Bay, Egypt. *Journal of Health and Pollution*, 6(12), 50–60. <https://doi.org/10.5696/2156-9614-6-12.50>
- Sackey, J., R. Morad, Bashir, A. K. H., L.Kotsedi, C.Kaonga, & Maaza, M. (2021). Bio-synthesised black α -Cr₂O₃ nanoparticles; experimental analysis and density function theory calculations. *Journal of Alloys and Compounds*, 850, 156671. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.156671>
- Saidani, W., Sellami, B., Khazri, A., Mezni, A., Dellali, M., Joubert, O., Sheehan, D., & Beyrem, H. (2019). Metal accumulation, biochemical and behavioral responses on the Mediterranean clams *Ruditapes decussatus* exposed to two photocatalyst nanocomposites (TiO₂ NPs and AuTiO₂NPs). *Aquatic Toxicology*, 208, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.003>
- Sánchez, A., Recillas, S., Font, X., Casals, E., González, E., & Puentes, V. (2011). Ecotoxicity of, and remediation with, engineered inorganic nanoparticles in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(3), 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.011>
- Sanchez, W., Burgeot, T., & Porcher, J.-M. (2013). A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
- Santos, Jjb., & Boehs, G. (2011). Spatial-temporal distribution and recruitment of *S. haemastoma* (Linnaeus, 1758) (Mollusca) on a sandstone bank in Ilhéus, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 71(4), 799–805. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000500001>
- Sao Mai, D. (2014). SHELLFISH (MOLLUSCS AND CRUSTACEA) | Characteristics of the Groups. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 376–388). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00305-0>
- Sendra, M., Sparaventi, E., Novoa, B., & Figueras, A. (2021). An overview of the internalization and effects of microplastics and nanoplastics as pollutants of emerging concern in bivalves.

Science of The Total Environment, 753, 142024.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142024>

Shard, A. G., Hodoroaba, V.-D., & Unger, W. E. S. (2020). Introduction. In *Characterization of Nanoparticles* (pp. 1–6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00001-8>

Sharma, A., Vishwakarma, K., Singh, N. K., Prakash, V., Ramawat, N., Prasad, R., Sahi, S., Singh, V. P., Tripathi, D. K., & Sharma, S. (2022). Synergistic action of silicon nanoparticles and indole acetic acid in alleviation of chromium (CrVI) toxicity in *Oryza sativa* seedlings. *Journal of Biotechnology*, 343, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.005>

Sharma, V. K., Filip, J., Zboril, R., & Varma, R. S. (2015). Natural inorganic nanoparticles – formation, fate, and toxicity in the environment. *Chemical Society Reviews*, 44(23), 8410–8423. <https://doi.org/10.1039/C5CS00236B>

Shaw, B. J., & Handy, R. D. (2011). physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. *Environment International*, 37(6), 1083–1097. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.009>

Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Firoz, M., & Al-Khaishany, M. Y. (2015). Role of Nanoparticles in Plants. In M. H. Siddiqui, M. H. Al-Whaibi, & F. Mohammad (Eds.), *Nanotechnology and Plant Sciences* (pp. 19–35). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0_2

Sierra-Marquez, L., Sierra-Marquez, J., De la Rosa, J., & Olivero-Verbel, J. (2017). Imposex in *S. haemastoma* from coastal sites of Cartagena, Colombia. *Brazilian Journal of Biology*, 78(3), 548–555. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.173301>

Singh, A. K. (2016). Mechanisms of Nanoparticle Toxicity. In *Engineered Nanoparticles* (pp. 295–341). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00007-8>

Singh, P., Kumari, K., Vishvakarma, V. K., Aggarwal, S., Chandra, R., & Yadav, A. (2018). Nanotechnology and Its Impact on Insects in Agriculture. In D. Kumar & C. Gong (Eds.), *Trends in Insect Molecular Biology and Biotechnology* (pp. 353–378). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61343-7_17

Singh, S. P., Chinde, S., Kamal, S. S. K., Rahman, M. F., Mahboob, M., & Grover, P. (2016). Genotoxic effects of chromium oxide nanoparticles and microparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3914–3924. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5622-0>

Smita, S., Gupta, S. K., Bartonova, A., Dusinska, M., Gutleb, A. C., & Rahman, Q. (2012). Nanoparticles in the environment: Assessment using the causal diagram approach. *Environmental Health*, 11(S1), S13. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-S1-S13>

- Smith, W. R., Hudson, P. W., Ponce, B. A., & Rajaram Manoharan, S. R. (2018). Nanotechnology in orthopedics: A clinically oriented review. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *19*(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12891-018-1990-1>
- Song, B., Zhang, Y., Liu, J., Feng, X., Zhou, T., & Shao, L. (2016). Is Neurotoxicity of Metallic Nanoparticles the Cascades of Oxidative Stress? *Nanoscale Research Letters*, *11*(1), 291. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1508-4>
- Spight, T. M., Birkeland, C., & Lyons, A. (1974). Life histories of large and small murexes (Prosobranchia: Muricidae). *Marine Biology*, *24*(3), 229–242. <https://doi.org/10.1007/BF00391898>
- Streicher, R. M., Schmidt, M., & Fiorito, S. (2007). Nanosurfaces and nanostructures for artificial orthopedic implants. *Nanomedicine*, *2*(6), 861–874. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.6.861>
- Tavares, K. P., Oliveira, Á. C. D., Vicentini, D. S., Melegari, S. P., Matias, W. G., Barbosa, S., & Kummrow, F. (2024). Acute toxicity of copper and chromium oxide nanoparticles to *Daphnia similis*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, *9*(1), 43–50. <https://doi.org/10.5132/eec.2014.01.006>
- The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2021). OECD'S work on chemicals safety. www.oecd.org/env/nanosafety
- Thirupurasundari, C. J., Padmini, R., & Devaraj, S. N. (2009). Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Chemico-Biological Interactions*, *177*(3), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.027>
- Thul, S. T., & Sarangi, B. K. (2015). Implications of Nanotechnology on Plant Productivity and Its Rhizospheric Environment. In M. H. Siddiqui, M. H. Al-Whaibi, & F. Mohammad (Eds.), *Nanotechnology and Plant Sciences* (pp. 37–53). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0_3
- Torchilin, V. P. (Ed.). (2006). *Nanoparticulates as drug carriers*. Imperial College Press ; Distributed by World Scientific Pub.
- Tou, F., Wu, J., Fu, J., Niu, Z., Liu, M., & Yang, Y. (2021). Titanium and zinc-containing nanoparticles in estuarine sediments: Occurrence and their environmental implications. *Science of The Total Environment*, *754*, 142388. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142388>
- Triboulet, S. (2006). Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique. UNIVERSITÉ DE GRENOBLE.
- Turan, N. B., Erkan, H. S., Engin, G. O., & Bilgili, M. S. (2019). Nanoparticles in the aquatic environment: Usage, properties, transformation and toxicity—A review. *Process Safety and Environmental Protection*, *130*, 238–249. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.08.014>

- United Nations Environment Programme. (2005). *MEDITERRANEAN ACTION PLAN Seventh Meeting of National Focal Points for SPAs*.
- Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., & Domingos, R. F. (2016). Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquatic Toxicology*, 170, 162–174. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.019>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vermeij, G. J., & Carlson, S. J. (2000). The muricid gastropod subfamily Rapaninae: phylogeny and ecological history. *Paleobiology*, 26(1), 19–46. [https://doi.org/10.1666/0094-8373\(2000\)026<0019:TMGSRP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1666/0094-8373(2000)026<0019:TMGSRP>2.0.CO;2)
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., & Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44(1), 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)
- Vidya, P., & Chitra, K. (2016). *Assessment of acute toxicity (LC50-96 h) of aluminium oxide, silicon dioxide and titanium dioxide nanoparticles on the freshwater fish, Oreochromis mossambicus (Peters, 1852)*.
- Volland, M., Hampel, M., Martos-Sitcha, J. A., Trombini, C., Martínez-Rodríguez, G., & Blasco, J. (2015). Citrate gold nanoparticle exposure in the marine bivalve *Ruditapes philippinarum*: Uptake, elimination and oxidative stress response. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 17414–17424. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4718-x>
- Vynokurov, D. (2021, December 26). *Bouche de Sang (Stramonita haemastoma)*. iNaturalist. <https://www.inaturalist.org/observations/103682241>
- Wang, H., Burgess, R. M., Cantwell, M. G., Portis, L. M., Perron, M. M., Wu, F., & Ho, K. T. (2014). Stability and aggregation of silver and titanium dioxide nanoparticles in seawater: Role of salinity and dissolved organic carbon: Stability and aggregation of silver and titanium dioxide. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(5), 1023–1029. <https://doi.org/10.1002/etc.2529>
- Wanninger, A., & Wollesen, T. (2019). The evolution of molluscs. *Biological Reviews*, 94(1), 102–115. <https://doi.org/10.1111/brv.12439>
- Weckbecker, G., & Cory, J. G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters*, 40(3), 257–264. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(88\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0304-3835(88)90084-5)

- Weinberg, H., Galyean, A., & Leopold, M. (2011). Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(1), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.006>
- Whitney, D. (2014). Ceramic Cutting Tools. In *Comprehensive Hard Materials* (pp. 491–505). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096527-7.00037-4>
- Wu, H., Zhang, R., Liu, J., Guo, Y., & Ma, E. (2011). Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere*, 83(4), 599–604. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.004>
- Xia, B., Zhu, L., Han, Q., Sun, X., Chen, B., & Qu, K. (2017). Effects of TiO₂ nanoparticles at predicted environmental relevant concentration on the marine scallop *Chlamys farreri*: An integrated biomarker approach. *Environmental Toxicology and pharmacology*, 50, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.016>
- Xia, J., Zhao, H. Z., & Lu, G. H. (2013). Effects of selected metal oxide nanoparticles on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 26(9), 742–749. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.09.005>
- Xing, B., Vecitis, C. D., & Senesi, N. (2016). *Engineered Nanoparticles and the Environment: Biophysicochemical Processes and Toxicity: Biophysicochemical Processes and Toxicity* (1st ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119275855>
- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., & Zhu, W. (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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.015>
- Xu, L., Wang, Z., Zhao, J., Lin, M., & Xing, B. (2020). Accumulation of metal-based nanoparticles in marine bivalve mollusks from offshore aquaculture as detected by single particle ICP-MS. *Environmental Pollution*, 260, 114043. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114043>
- Yang, S.-T., Wang, T., Dong, E., Chen, X.-X., Xiang, K., Liu, J.-H., Liu, Y., & Wang, H. (2012). Bioavailability and preliminary toxicity evaluations of alumina nanoparticles in vivo after oral exposure. *Toxicology Research*, 1(1), 69–74. <https://doi.org/10.1039/c2tx20008b>
- Yetisgin, A. A., Cetinel, S., Zuvun, M., Kosar, A., & Kutlu, O. (2020). Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules*, 25(9), 2193. <https://doi.org/10.3390/molecules25092193>
- Yung, M. M. N., Mouneyrac, C., & Leung, K. M. Y. (2014). Ecotoxicity of Zinc Oxide Nanoparticles in the Marine Environment. In B. Bhushan (Ed.), *Encyclopedia of Nanotechnology* (pp. 1–17). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6178-0_100970-1
- Zaidi, H., Amrani, A., Sedrati, F., Maaref, H., Leghrib, F., Benamara, M., Amara, H., Wang, Z., & Nasri, H. (2021). Histological and chemical damage induced by microcystin-LR and

- microcystin-RR on land snail *Helix aspersa* tissues after acute exposure. *Comparative Biochemistry and physiology Part - C: Toxicology and pharmacology*, 245. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109031>
- Zainab, Ahmad, S., Khan, I., Saeed, K., Ahmad, H., Alam, A., Almeahmadi, M., Alsaiari, A. A., Haitao, Y., & Ahmad, M. (2022). A study on green synthesis, characterization of chromium oxide nanoparticles and their enzyme inhibitory potential. *Frontiers in pharmacology*, 13, 1008182. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1008182>
- Załęska-Radziwiłł, M., & Duskocz, N. (2016). DNA changes in *Pseudomonas putida* induced by aluminum oxide nanoparticles using RAPD analysis. *Desalination and Water Treatment*, 57(3), 1573–1581. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.996015>
- Załęska-Radziwiłł, M., Duskocz, N., Affek, K., & Muszyński, A. (2020). Effect of aluminum oxide nanoparticles on aquatic organisms – a microcosm study. *Desalination and Water Treatment*, 195, 286–296. <https://doi.org/10.5004/dwt.2020.25882>
- Zhang, Y., Chen, Y., Westerhoff, P., Hristovski, K., & Crittenden, J. C. (2008). Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water. *Water Research*, 42(8–9), 2204–2212. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.036>
- Zhao, Y., Xie, P., & Zhang, X. (2009). Oxidative stress response after prolonged exposure of domestic rabbit to a lower dosage of extracted microcystins. *Environmental Toxicology and pharmacology*, 27(2), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.10.005>
- Zheng, X., Su, Y., Chen, Y., Wan, R., Li, M., Huang, H., & Li, X. (2016). Carbon nanotubes affect the toxicity of CuO nanoparticles to denitrification in marine sediments by altering cellular internalization of nanoparticle. *Scientific Reports*, 6(1), 27748. <https://doi.org/10.1038/srep27748>
- Zhu, X., Zhou, J., & Cai, Z. (2011). The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Marine Pollution Bulletin*, 63(5–12), 334–338. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.006>