

ORIGINAL RESEARCH PAPER

OXIDATIVE STRESS AND HISTOLOGICAL CHANGES INDUCED BY THE NANO-Fe₂O₃ IN *HELIX ASPERSA*

STRESS OXYDATIF ET CHANGEMENTS HISTOLOGIQUES INDUITENT PAR LES NANO-Fe₂O₃ CHEZ *HELIX ASPERSA*

Sana Besnaci^{1,2*}, Samira Bensoltane^{2,3}, Mohamed Djekoun⁴

¹University Badji Mokhtar, Faculty of Sciences, Department of
Biochemistry, B.P. 12, Sidi-Ammar 23000, Annaba, Algeria

²University Badji Mokhtar, Faculty of Sciences, Department of Biology, B.P. 12,
Sidi-Ammar 23000, Annaba, Algeria

³University Badji Mokhtar, Faculty of Medicine, Department of Dental Medicine,
23000, Annaba, Algeria

⁴University of 08 May 1945 Guelma, Faculty Sciences of Nature and of Life and
Sciences of the Earth and the Universe, 24000, Guelma, Algeria

*Corresponding author: s.besnaci@yahoo.fr

Received: May, 09, 2018

Accepted: April, 01, 2019

Abstract: Several studies show that nanoparticles (NPs) can penetrate the body through several routes and have systemic toxic effects on human health. This study aims to provide answers to the understanding of the nature and origin of the biological effects of NPs of metal oxide: Fe₂O₃ on a bioaccumulator and bioindicator species, the terrestrial snail *Helix aspersa*. Their effects were studied on snail adults by a laboratory-focused approach, and we evaluated the effect of three doses of these nanoparticles (1, 2 and 3 mg·g⁻¹ of food) in wheat flour for six weeks; the control group receives only flour alone. At the end of the treatment, we measured the levels of antioxidant enzymatic defences: glutathione (GSH), glutathione-S-transferase (GST), glutathione-peroxydase (GPx), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), and histological sections at the kidney level of each group were performed. Our results reveal triggered oxidative stress and an induction of the detoxification system, with an increase in GSH, GST, GPx and MDA levels with a decrease in catalase activity. Very clear renal tissue damage confirms the results obtained at the beginning dosages.

Keywords: *Helix aspersa*, histological, iron oxide "Fe₂O₃", kidney, nanoparticles, oxidative stress

INTRODUCTION

Les nanoparticules d'oxyde de fer offrent à la médecine des applications très intéressantes pour des applications *in vivo*, y compris l'imagerie par résonance magnétique pour le diagnostic médical, l'hyperthermie dans le traitement du cancer, la réparation des tissus, l'administration de médicaments et la thérapie cellulaire [1].

En raison de leur petite taille et de leurs propriétés superficielles, les nanoparticules peuvent traverser les barrières biologiques, diffuser à travers les membranes cellulaires [2] et atteindre différents tissus, par rapport aux molécules de plus grande taille ; en effet, l'accumulation de nanoparticules métalliques a déjà été observée dans de nombreux organes [1, 3].

Une étude récente sur les souris [4] a rapporté que la bioaccumulation et le transport des NPs d'oxyde de fer dans le foie et la rate dépend de la taille. De plus, l'expression des gènes associés au système de défense antioxydant, le transport et le métabolisme du fer a été signalée suite à un traitement avec des NPs d'oxyde de fer. Des souris gestantes traitées avec des doses multiples d'oxyde de fer nanométrique ont montré une biodistribution du fer dans le foie fœtal, le placenta et l'augmentation des décès fœtaux [5]. Des études d'instillation intratrachéale des nano-Fe₂O₃ chez la souris ont signalé une augmentation de la perturbation cellulaire dans l'épithélium respiratoire avec hémostasie affectée [6]. L'initiation de la prolifération microgliale et des altérations pathologiques dans le cerveau a été observée chez des souris traitées avec des NPs d'oxyde de fer par voie intranasale [7]. Les NPs d'oxyde de fer ont induit des niveaux très élevés d'inflammation et d'immunosuppression chez la souris [8].

La génération des espèces réactives à l'oxygène (ERO) convient à la mesure de la toxicité cellulaire car les cellules répondent au stress oxydatif en exerçant un certain nombre de réponses protectrices qui peuvent généralement être mesurées sous forme de réponses d'expression enzymatique ou génétique [9].

Nombreuses études ont démontré que le stress oxydatif était un biomarqueur primordial dans l'évaluation de la toxicité des nanoparticules [10 – 12]. Nous nous focaliserons dans cette étude sur certains des biomarqueurs les plus utilisés actuellement sur les organismes terrestres [13 – 16] afin de mettre en évidence le stress induit et vérifier le système de défense (détoxification) au niveau de l'hépatopancréas de *Helix aspersa* suite à un traitement aux nanoparticules d'oxyde de fer, des coupes histologiques au niveau du rein ont été réalisées pour vérifier l'impact tissulaire.

MATERIEL ET METHODES

Matériel chimique

L'oxyde de fer nanométrique nous a été élaboré au laboratoire de magnétisme et spectroscopie des solides de département physique, il est de taille de 26 nm. L'élaboration des nanoparticules de α -Fe₂O₃ a été effectuée par broyage mécanique à haute énergie, à partir de la poudre élémentaire de l'hématite. Le broyage a été réalisé dans un broyeur planétaire Pulvérisant 7 (Fritsch, France), en utilisant deux jarres en acier (inoxydable de volume 45 mL). La préparation de la charge (billes + poudres) a été effectuée dans une boîte à gants sous atmosphère d'argon. Le rapport massique billes/poudres est de 1/20 environ et la vitesse de broyage est de l'ordre de 500 tr·min⁻¹.

Pour minimiser les effets relatifs à l'augmentation de la température à l'intérieur des jarres, le broyage a été fait avec des séquences d'une demi-heure suivie de 15 min de pause et cela pendant 3 h.

Matériel biologique et mode de traitement

Les animaux utilisés dans notre expérimentation sont les adultes d'escargot *Helix aspersa* ou le petit gris, c'est un escargot appartient à l'embranchement des Mollusques, animaux à corps mou dépourvu de squelette, sa masse viscérale présente une torsion de 180° par rapport au pied d'où une asymétrie de certain de ses organes [16]. C'est un gastropode, pulmoné terrestre, très abondant dans la région d'étude et très connu par ses capacités de bioaccumulation.

Notre matériel est ramené d'une ferme d'élevage situé au Nord-Est d'Algérie (site non contaminé), la masse moyenne étant de 8.86 ± 1.15 g et d'un diamètre coquillère moyen de 32.3 ± 0.39 mm. Ces petits gris sont ensuite transférés au laboratoire, où ils sont adaptés aux conditions contrôlées : photopériode de 18 h de lumière / 24 h, température 20 ± 2 °C.

Les individus choisis sont répartis dans des boîtes en plastique transparentes, avec couvercle perforé, chaque boîte contient une éponge humide pour maintenir l'humidité, l'alimentation est fournie dans des boîtes de Pétri (elle est pesée avant qu'elle ne soit fournie). Les boîtes sont nettoyées régulièrement tous les 3 jours [17].

Le traitement des animaux a été effectué par des doses croissantes des nanoparticules d'oxyde de fer (fine poudre de 1, 2 et 3 mg·g⁻¹ de farine) bien mélangées avec la farine de blé, nous avons retenu en plus, un lot témoin qui ne reçoit que de la farine, chaque lot comporte 10 escargots. Pendant les six semaines de traitement, le nettoyage et le changement de nourriture est effectué chaque trois jours.

Dosage des paramètres de stress oxydatif

Après sacrifice et dissection, les hépatopancréas sont prélevés et subdivisés en quatre fragments respectivement, pour le dosage : du glutathion (GSH) après déprotéinisation selon Weckbecker et Cory [18] ; de la glutathion-S-transférase (GST) selon Habig et *al.* [19] ; de la glutathion-péroxydase (GPx) selon Flohé et Gunzler [20] ; de la catalase (CAT) selon Aebi [21] ; du malondialdéhyde (MDA) selon Esterbauer et *al.*, [22].

Réalisation des coupes histologiques

Les sections rénales ont été immédiatement fixées dans le formol à 10 % pendant 24 h (le témoin et les groupes traités). Les échantillons ont été préparés pour des analyses après plusieurs stades de rinçages dans de l'eau déminéralisée, la déshydratation dans des bains d'alcool à un degré croissant et une imprégnation dans un bain de paraffine. Ensuite, les échantillons de rein ont été inclus dans la paraffine puis coupées en tranches de 5 µm par un microtome de type Leica (Leitz, Allemagne) et colorées à l'éosine-hématoxyline. Les sections ont été observées et photographiées.

Analyse statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins ($M \pm SD$) l'écart type moyen, la comparaison entre les différents groupes sont effectuées après une analyse de la variance (ANOVA) à un critère de classification, les moyennes sont comparées par un test t de Student. La probabilité de 0,05 ou moins a été considérée comme significative. L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel Minitab version 16.2.

RESULTATS

Les paramètres de stress oxydant

Les résultats obtenus montrent une augmentation du taux de glutathion (GSH), de GST de GPx et de MDA des trois groupes contaminés par rapport aux taux des échantillons témoins.

Les tests statistiques de dosage de GSH montrent qu'il existe une différence non significative entre les moyennes des doses des échantillons de la 1^{ère} dose et le groupe témoins. Alors qu'elle est très hautement significative entre les échantillons témoins et les deux autres groupes traités (Figure 1(a)). Pour la GST l'analyse statistique révèle une augmentation significative pour le groupe traité à la dose 1 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, hautement significative pour le groupe traité avec la dose 2 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ et très hautement significative pour le groupe traité avec la dose 3 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de Fe_2O_3 nanométrique par rapport au témoin (Figure 1(b)). Les résultats statistiques de dosage de GPx montrent que cette augmentation n'est significative que pour le 3^{ème} groupe traités (Figure 1(c)) Pour le malondialdéhyde, les résultats statistiques montrent qu'il existe des différences significatives entre les moyennes des échantillons de la 1^{ère} dose et le groupe témoins et hautement significatives entre les échantillons témoins et les deux autres groupe traités (Figure 1(e)).

Les moyennes des différents groupes étudiés font ressortir une diminution des taux de la catalase hépato-pancréatique. Statistiquement cette diminution est non significative pour le lot traité à la plus forte dose (3 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), mais elle est hautement significative pour les deux autres groupes traités (avec 1 et 2 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) par rapport au témoin (Figure 1(d)).

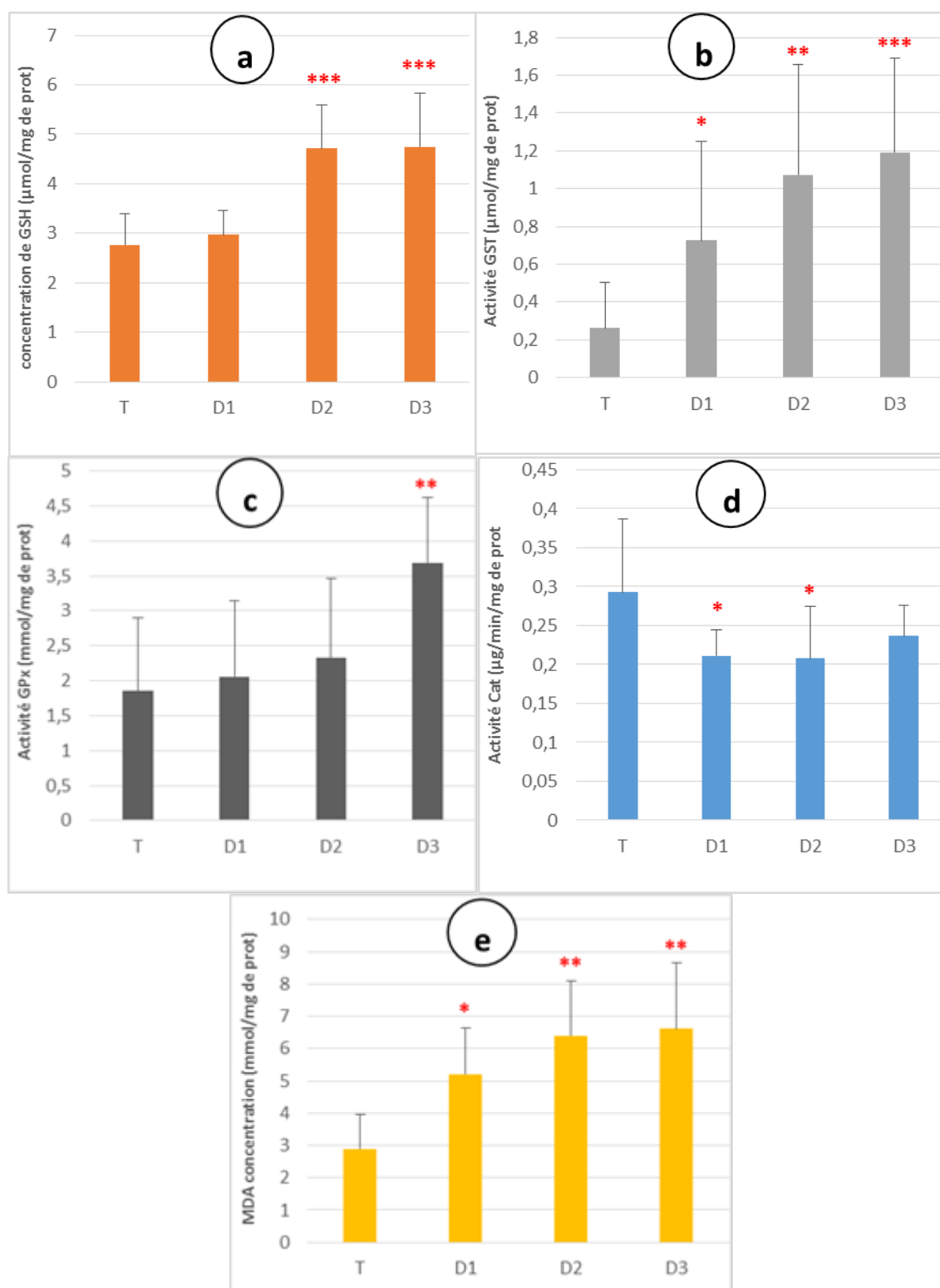


Figure 1. Taux des paramètres de stress hépato-pancréatiques de *Helix aspersa* après six semaines de traitement à l'oxyde de fer nanométrique (0, 1, 2 et 3 mg·g⁻¹) : (a) GSH, (b) GST, (c) GPx, (d) CAT, (e) MDA

Observation des coupes histologiques du rein

Le rein est constitué d'un épithélium excréteur tapissé de lamelles rénales, lamelles conjonctives creuses, un sinus sanguin doté de fibres musculaires lisses, constituées de cellules prismatiques avec une bordure en brosse. L'épithélium renferme un seul type de cellules excrétrices avec un noyau et une membrane granulaire, ces cellules excrétrices ont des formes bâtonnet (les plus nombreux) et ciliées [23]. La production de l'urine primitive est le rôle des néphrocytes : ils produisent également des concrétions à partir de molécules prélevées dans l'hémolymphe. Il s'agit de dépôts de couches concentriques d'acide urique et de lipide autour d'un noyau d'urate de calcium, élaborés au sein des vacuoles, ces concrétions sont expulsées dans la lumière rénale [24]. L'aspect du tissu rénal chez les escargots témoins est illustré dans la Figure 2(a).

L'examen histologique du rein des escargots traité par la dose $1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ des NPs de Fe_2O_3 , met en évidence des acini avec un contour irrégulier, des nécroses et des lyses au niveau des replis accompagné d'une dégénérescence des cellules excrétoires, une hypertrophie du tissu conjonctif (épithélium rénal) (Figure 2 (b)).

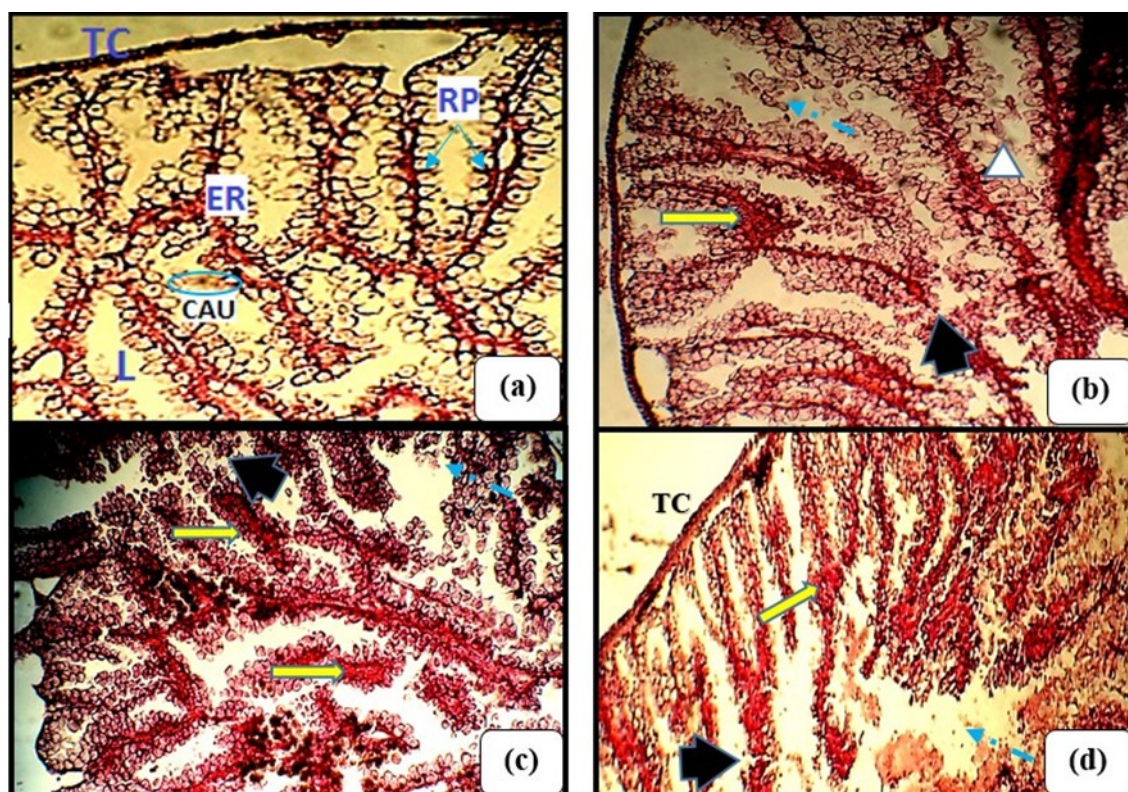






Figure 2. Coupes histologiques du rein (a) des escargots témoins (X100), (b) des escargots traités par la dose $1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ des NPs de Fe_2O_3 (X100), (c) des escargots traités par la dose $2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ des NPs de Fe_2O_3 (X100), (d) des escargots traités par la dose $3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ des NPs de Fe_2O_3 (X400)

() Nécrose, () infiltrats inflammatoires, () hypertrophies cellulaires, () débris cellulaires

Concernant les tissus des traités par la dose 2 et 3 mg·g⁻¹ les mêmes observations ont été notées de manière dose dépendante. Nous remarquons les hypertrophies des cellules excrétrices et parallèlement la prolifération du tissu conjonctif engendrant ainsi la disparition de leur membrane d'où la présence des infiltrats inflammatoires et des débris cellulaires dans la totalité de tissu, des nécroses touchent le tissu conjonctif (Figures 2 (c) et (d)).

DISCUSSION

Le stress oxydatif provoqué par une particule est considéré comme l'un des mécanismes les plus importants de toxicité des nanoparticules, en particulier pour les particules contenant des métaux de transition. Zhu et *al.* [6] ont démontré que les nanoparticules et les submicroniques de Fe₂O₃ pourraient générer l'inflammation et la médiation du stress oxydatif dans les poumons des rats aussi bien aux faibles ou aux fortes doses d'exposition intratrachéale. Le stress oxydatif a été proposé comme un mécanisme de lésions cellulaires induites par de nombreux types de nanoparticules [25, 26].

Il n'a été proposé que les métaux de transition tels que le fer peuvent contribuer à la production des ERO intracellulaire par réaction du type Fenton [27]. Fe³⁺ théoriquement peut être réduit par l'anion superoxyde en Fe²⁺, qui réagissent ensuite avec H₂O₂ pour produire des groupements OH [27]. En effet, il a été démontré que les nanoparticules Fe₂O₃ sont capables de pénétrer à travers la membrane des cellules épithéliales respiratoires et libérer Fe³⁺ dans les lysosomes acides [28]. Fahmy et Cormier ont proposé que l'activité de surface des nanoparticules d'oxydes métalliques influence l'effet biologique de ces particules. Les procédés de fabrication utilisés rendent les particules hydrophiles ou lipophiles, catalytiquement actives ou passives et modifient les propriétés électroniques de la surface des particules [29]. La production des ERO de manière extracellulaire peut oxyder les lipides de la membrane cellulaire, peut diffuser à l'intérieur de la cellule et initier la production des ERO intracellulaire ou intramitochondriale [30].

Fukui et *al.* [31] suggère qu'il existe deux possibilités pour le mécanisme de génération des ERO. On pense que le mécanisme direct est une réaction du type Fenton. Le mécanisme indirect est induit par un dysfonctionnement du système de transport d'électrons mitochondriale causé par les ions libéré par les NPs métalliques.

Une augmentation du taux des trois paramètres GSH, GPx et GST a été notée, ce qui est en faveur d'un dépassement du système de défense antioxydant dans le tissu hépatopancréatique. Il est connu que les ERO peuvent réagir avec le NO et les produits cytotoxiques d'azote, tels que le peroxynitrite (ONOO-) et de l'acide peroxynitrique (ONOOH), qui peuvent modifier diverses molécules, telles que les lipides, l'ADN et les protéines, ce qui entraîne un déficit fonctionnel.

Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales : c'est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, y compris les ERO et les métaux [15, 32].

Cette augmentation peut être expliquée par la liaison directe du glutathion au métal [33] car le glutathion dispose d'un groupement acide carboxylique, d'un groupement amine, d'un groupement sulfhydryle (-SH) et de deux pontages peptidiques susceptibles d'être

impliqués dans des réactions avec les métaux lourds, et par conséquent l'inhibition de leur transformation en GSSG. Dans le même sens d'idée, on peut aussi utiliser l'hypothèse d'Ali et *al.* [26] qui stipule qu'il y a une forte affinité des nanoparticules métalliques pour la molécule de GSH. Après une étude Hatcher et *al.* [34] suggère que la synthèse de GSH en présence de métaux serait un mécanisme de protection dans lequel le métal se fixe aux groupements thiols du GSH, prévenant ainsi les dommages cellulaires.

En effet, l'affinité des métaux *vis-à-vis* des groupements thiols forme des complexes avec ces entités chimiques. Cette interaction métal-glutathion conduit généralement à la formation des radicaux éthyles ($-S^0$). Bien que ces radicaux soient relativement stables et puissent interagir entre eux pour former des ponts disulfures non radicalaires, ils peuvent également réagir avec l'oxygène et générer ainsi des espèces réactives de l'oxygène [35] et des radicaux libres responsables de lésions tissulaires importantes, ceci souligne le rôle important du glutathion dans la gestion d'un stress métallique [15, 36, 37].

D'une part les réactions des métaux avec le glutathion se traduisent soit par la formation de complexes ou l'oxydation du GSH [38] et ces deux réactions pourraient expliquer l'augmentation du glutathion. D'autre part, le GSH est à l'origine de la synthèse de métallothionines. Ces dernières sont spécialisées dans la chélation des métaux, ce qui explique l'augmentation du GSH.

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

Cette enzyme joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant [39]. D'après nos résultats, on observe des augmentations très significatives de la GST dans l'hépatopancréas. Donc la GST est impliquée dans la détoxification et l'élimination de l'oxyde de fer nanométrique et de ces métabolites. Les résultats de Boucenna en parfait accord avec les nôtres. En effet, quatre doses de Fe_2O_3 nanométrique (100, 500, 1000 et 1500 $\mu g \cdot g^{-1}$) sont testées sur l'escargot *Helix aspersa* durant 8 semaines [15].

L'activité de GST élevée suggère l'utilisation de GSH dans les réactions de conjugaison qui sont augmentées dans le cadre du mécanisme de détoxification. Un statut antioxydant altéré comme indiqué dans notre étude est confirmé par les résultats d'autres enquêtes, Prabhakar et *al.* [11] ont signalé une augmentation des activités enzymatiques de SOD et de la GST dans les tissus des rats exposés aux NPs d'oxyde d'aluminium de 500, 1000 et 2000 $mg \cdot kg^{-1}$ pendant 14 jours. L'administration des NPs TiO_2 à des souris pendant 14 jours, induit un stress oxydatif significatif prouvé par une augmentation du taux de GST [40].

Dans d'autres travaux, différents xénobiotiques ont été testés sur *Helix aspersa*, comme des ETM [41], des métaux lourds [36], des poussières métalliques [37] et des nanoparticules d'oxydes métalliques « Fe_2O_3 et Al_2O_3 » [15] où une induction de l'activité GST a été signalée.

Sur d'autres mollusques, le bivalve *Scrobicularia plana* et le polychète *Hediste diversicolor*, Mouneyrac et *al.* [42] notent que les effets des nanoparticules métalliques

d'Ag, Au, Cu Cd et de Zn induisent une augmentation de la GST. Aussi Buffet et *al.* [43, 44] a enregistré une augmentation du GST après exposition des mollusques bivalves *Scrobicularia plana* à des NPs d'Ag.

Chez le poisson *Anguilla anguilla* une augmentation très significative de l'activité GST est également observée après 72 heures d'exposition aux nanoparticules d'oxyde de fer par Radu et *al.* [45]. Une étude *in vitro* sur des cellules de la même espèce (*Anguilla anguilla*) exposées aux NPs d'oxyde de fer montre une augmentation significative de la GST et un changement dans le mécanisme de désintoxication, Srikanth et *al.* [46] suggère que le GST joue un rôle de protection contre les dommages oxydatifs des cellules. Sur des branchies *Oncorhynchus mykiss* Johari et *al.* [47] et suite à une exposition chronique à des concentrations sublétales des nanoparticules d'argent a mis en évidence à la fin de l'étude un taux élevé de GST.

La GPx est une enzyme antioxydante clé qui règle le niveau des ERO (la GPx est capable non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés) et donc protège les cellules contre les dégâts générés par les xénobiotiques [48, 49].

L'augmentation significative de l'activité de l'enzyme GPx dans les cellules maillantes d'*A. anguilla* exposées à des IONPs est due à l'élimination des excès de peroxyde d'hydrogène en évitant d'endommager les cellules [46].

Fahmy et Cormier [29] ont déclaré que toutes les nanoparticules d'oxyde métallique sont en mesure de générer des ERO; cependant, le CuO nanométrique est capable d'inhiber l'activité de la catalase et d'augmenter l'activité de la GPx par rapport aux cellules témoins, et même de bloquer les défenses antioxydantes de la cellule par une augmentation du taux de glutathion total.

D'après nos résultats, on observe une augmentation de l'activité GPx dans l'hépatopancréas des escargots traités par le NanoFe₂O₃. Cette augmentation serait due principalement à un début de production de peroxyde d'hydrogène et l'augmentation de GSH. Ce qui entraînerait une augmentation de l'activité enzymatique de la GPx (GPx a besoin du glutathion pour fonctionner correctement) [50]. GPx initie la rupture du H₂O₂ seulement à des concentrations faibles, alors que la CAT a besoin des niveaux élevés de H₂O₂ pour commencer son activité [12].

La catalase est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Avec le fer comme cofacteur, la catalase est essentiellement présente dans les peroxysomes hépatiques, mais aussi dans les hématies et les mitochondries de cellules cardiaques [51].

Fahmy et *al.*, postulent que le NanoFe₂O₃ inhibe l'activité enzymatique catalase des cellules exposées [52]. Siddiqui et *al.*, suggèrent que le stress oxydatif peut-être le principal mécanisme de toxicité dans la lignée cellulaire de fibroblastes de peau de souris (L929) induite par les Mo-NPs (molybdène NPs), par la diminution de l'activité enzymatique catalase antioxydante. Ils ont également constaté une diminution du potentiel membranaire mitochondrial (mitochondrial membrane potential - MMP) qui indique le rôle du stress oxydatif dans la toxicité des Mo-NPs. Cette diminution, suggère une intégrité mitochondriale moins préservée. Le nombre de cellules peut être diminué (diminution de division cellulaire) en raison de la production de radicaux d'oxygène pendant la respiration mitochondriale, ce qui suggère une corrélation possible entre le stress oxydatif et l'activité mitochondriale [53].

La superoxyde dismutase (SOD) est spécialisée pour convertir le radical superoxyde moins toxique à un composé hautement toxique l' H_2O_2 , alors que la catalase réduit H_2O_2 en H_2O . La diminution de la SOD signifie la diminution de la catalase suggère Alarifi et al. [54] la superoxyde dismutase assure l'eau oxygéné qu'est le substrat de la catalase.

Fahmy et al. [52], mentionnent une activité catalase et SOD au niveau de l'hémolymph de l'escargot *Biomphalaria alexandrina* traité par des différentes doses de NPs d'oxyde de zinc. L'auteur postule que le ZnO inhibe la catalase.

Chez d'autres escargots des eaux douces « *Lymnaea luteola* L., *Dreissena polymorpha* et *Gammarus roeseli*, des NPs d'argent et de dioxyde de cérium sont appliqués et une activité catalase est diminué [55, 56].

Une étude de l'effet des nano-Ag mais cette fois sur les vers de terre *Eisenia foetida* est traduite par un déséquilibre dans le système antioxydant et une diminution de l'activité catalase a été marqué [14, 15]. Sarkar et Sil, mentionnent également une augmentation des ERO accompagné par une diminution de la catalase au niveau des hépatocytes isolées de souris et exposées à des NPs de Fe_2O_3 [57].

Le MDA fait partie des aldéhydes réactifs issus de la décomposition des produits de la peroxydation lipidique. Il a été proposé comme biomarqueur du stress oxydant, en raison de son caractère mutagène et athérogène, il est le produit le plus étudié de la dégradation des LPO [58, 59].

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

Les résultats de Boucenna [15] de l'évaluation toxicologique des NPs de Fe_2O_3 sur *Helix aspersa* soutient nos résultats. L'étude d'Utkarsh et al. [12] montre que le taux de MDA a été augmenté dans les tissus d'une manière dépendante de la dose des IONPs des rats traités, ils ont expliqués ces niveaux élevés de MDA par la formation de radicaux hydroxyle qui à son tour associé aux lipides peroxydés des tissus. Dans les hépatocytes des rats traités avec le Fe_2O_3 nanométrique, un taux élevé de MDA a été enregistré [57].

Fahmy et al. [52] a trouvé une augmentation du taux MDA dans les tissus mous et l'hémolymph suite à une évaluation de l'oxyde de zinc nanométrique sur les escargots des eaux douces *Biomphalaria alexandrina*.

Les altérations cellulaires observées au niveau des coupes rénales peuvent être causées par l'exposition aux nanoparticules d'oxyde de fer qui peuvent induire des ERO et des ERA (espèce réactive à l'azote). Nous avons démontré que les particules d'oxyde de fer de taille nanométrique pouvaient générer un stress oxydatif à travers les perturbations des paramètres de stress GSH, GST, GPx, MDA et CAT. Les mêmes doses de nano- Fe_2O_3 ont induis des hypertrophies, des nécroses et des infiltrats inflammatoires au niveau des hépatopancréas de *Helix aspersa* pendant six semaines de traitement et une suggestion d'un stress oxydatif en cause [60].

Kumari et al. [61] trouvent que l'histopathologie des rats traités avec des fortes doses de Fe_2O_3 a montré une dilatation de la veine centrale et des nécroses des cellules rondes péri vasculaires et des zones focales du foie. En plus, cette étude décrit que le traitement des Fe_2O_3 a causé des dommages tubulaire focal dans les reins et la rate des rats traités. Parallèlement Chen et al. [62] ont rapporté des lésions pathologiques dans les reins, le foie et la rate de souris exposées à des doses aiguës des nanoparticules de Cu, des

dommages de cellules tubulaires proximales rénales, glomérulonéphrite, stéatose autour de veines centrales dans le foie ainsi qu'une diminution des unités spléniques.

Hsieh et al. [63] mentionnent que l'oxyde de fer nanométrique cause la mort cellulaire par apoptose dépendante de mitochondries dans des cultures cellulaires. Des nécroses et des apoptoses ont été également observées au niveau du foie et des reins des rats traités par des NPs d'argent et d'or [64]. Des lésions histopathologiques ont été observées dans le foie et les reins chez les souris après un traitement de 13 semaines par l'oxyde d'aluminium nanométrique. Thit et al. [65] indiquent que les effets histopathologiques signalés chez *Xenopus laevis* traité par les NPs de Cu se manifestent par l'apoptose des cellules épithéliales rénales.

L'étude de Boucenna [15] met en évidence un dommage tissulaire incontestable au niveau de la glande digestive et le rein de *Helix aspersa* comme réponse à la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer aux doses étudiées (50, 100, 200, 400 µg·g⁻¹) par voie digestive (dans l'alimentation), qui entraîne des changements structuraux tels que, la dilatation des espaces hemolymphatiques entre tubules, la dégénérescence et la nécrose cellulaires et l'atrophie du tissu conjonctif.

Les modifications de la structure du rein ont également été soulevées dans les études de Marigomez et al. [66] et Ali et al. [67], qui ont étudié respectivement l'évaluation des effets de l'exposition sublétales au cadmium sur le rein de *Littorea littorina* et l'impact des NPs d'argent sur l'escargot *Eobania vermiculata*. Ces auteurs suggèrent que la vacuolisation des cellules épithéliales détectées et l'agrégation des organites peut être due à une altération de l'activité excrétrice due à l'exposition aux métaux et aux NPs.

La capacité accumulatrice de *Helix aspersa*, est d'ailleurs un caractère de sélection pour cette espèce. La capacité de l'oxyde de fer de pénétrer au niveau cellulaire est déjà prouvée par les dégâts tissulaires causés au niveau du rein.

CONCLUSION

Nous avons montré à l'issue de ce travail que l'exposition subchronique de *Helix aspersa* à des nanoparticules d'oxyde de fer n'est pas suffisamment différente de celle des oxydes métalliques micrométriques. Aux doses choisies, nous avons vu aussi que les nanoparticules présentent une grande capacité de pénétration et d'internalisation au niveau cellulaire accompagnée par le déclenchement d'un stress oxydant qui suggère une augmentation dans le taux des radicaux libres qui sont responsables des lésions tissulaires et pouvant aboutir à la mort cellulaire.

En effet, suite aux perturbations trouvées au niveau du système enzymatique antioxydant (augmentation des taux de GSH, GST, GPx et MDA et diminution de l'activité catalase), il semblerait que le Fe₂O₃ nanométrique est déclencheur du stress oxydant en raison de l'induction des ERO et des ERA qui induisent par l'histo-accumulation hépatopancréatique des nanoparticules de fer.

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

REFERENCES

1. Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S., Alhader, M.S.: Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line, *Biological trace element research*, **2014**, 159 (1-3), 416-424;
2. Lin, J., Zhang, H., Chen, Z., Zheng, Y.: Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: Insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship, *ACS Nano*, **2010**, 4 (9), 5421-5429;
3. Moore, M.N.: Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?, *Environment International*, **2006**, 32, 967-976;
4. Yang, L., Kuang, H., Zhang, W., Aguilar, Z.P., Xiong, Y., Lai, W., Xu, H., Wei, H.: Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice, *Nanoscale*, **2015**, 7, 625-636;
5. Di Bona, K.R., Xu, Y., Ramirez, P.A., DeLaine, J., Parker, C., Bao, Y., Rasco, J.F.: Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice, *Reproductive Toxicology*, **2014**, 50, 36-42;
6. Zhu, M.T., Feng, W.Y., Wang, B., Wang, T.C., Gu, Y.Q., Wang, M., Wang, Y., Ouyang, H., Zhao, Y.L., Chai, Z.F.: Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats, *Toxicology*, **2008**, 247, 102-111;
7. Wang, Y., Wang, B., Zhu, M.T., Li, M., Wang, H.J., Wang, M., Ouyang, H., Chai, Z.F., Feng, W.Y., Zhao, Y.L.: Microglial activation, recruitment and phagocytosis as linked phenomena in ferric oxide nanoparticle exposure, *Toxicology Letters*, **2011**, 205, 26-37;
8. Ban, M., Langonne, I., Huguet, N., Guichard, Y., Goutet, M.: Iron oxide particles modulate the ovalbumin-induced Th2 immune response in mice, *Toxicology Letters*, **2013**, 216, 31-39;
9. Kovochich, M., Xia, T., Xu, J., Yeh, J.I., Nel, A.E: Principles and procedures to assess nanomaterial toxicity in: *Environmental nanotechnology: applications and impacts of nanomaterials* (Editors: Wiesner, M.R., Bottero, J.Y.), McGraw Hill, New York, **2007**, 205-229;
10. Park, E.J., Park, K.: Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro, *Toxicology Letters*, **2009**, 184, 18-25;
11. Prabhakar, P.V., Reddy, U.A., Singh, S.P., Balasubramanyam, A., Rahman, M.F., Indu Kumari, S., Agawane, S.B., Murty, U.S., Grover, P., Mahboob, M.: Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in wistar rats, *Journal of Applied Toxicology*, **2012**, 32, 436-445;
12. Reddy, U.A., Prabhakar, P.V., Mahboob, M.: Biomarkers of oxidative stress for in vivo assessment of toxicological effects of iron oxide nanoparticles, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **2015**, 24 (6), 1172-1180;
13. Tsyusko, O.V., Hardas, S.S., Shoults-Wilson, W.A., Starnes, C.P., Joice, G., Butterfield, D.A., Unrine, J.M.: Short-term molecular-level effects of silver nanoparticle exposure on the earthworm, *Eisenia fetida*, *Environmental Pollution*, **2012**, 171, 249-255;
14. Gomes, S.I., Hansen, D., Scott-Fordsmand, J.J., Amorim, M.J.: Effects of silver nanoparticles to soil invertebrates: Oxidative stress biomarkers in *Eisenia fetida*, *Environmental Pollution*, **2015**, 199, 49-55;
15. Boucenna, M. : Etude de la toxicité des particules métalliques d'origine industrielle chez *Helix aspersa*. Evaluation nanotoxicologique du Fe₂O₃ et Al₂O₃, Thèse de Doctorat Université Badji Mokhtar, Annaba Algérie, **2016**, 193;
16. Bonnet, J.C., Vrillon, J.L.: L'escargot *Helix aspersa* biologie-élevage, Edition INRA, **1990**, 14-15;
17. Gomot, A.: Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **1997**, 33, 209-216;
18. Weckbecker, G., Cory, J.G.: Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 1210 cells in vitro, *Cancer Letters*, **1988**, 40, 257-264;
19. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *Journal of Biological Chemistry*, **1974**, 249, 7130-7139;
20. Flohé, L., Günzler, W.A.: Assays of glutathione peroxidase, *Methods in enzymology*, **1984**, 105, 114-120;
21. Aebi, H.: Catalase in vitro, *Methods in enzymology*, **1984**, 105, 121-126;

22. Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jungens, G.: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Radical Biology and Medicine*, **1992**, 13, 341-390;
23. Chabicoovsky, M., Niederstatter, H., Thaler, R., Hodl, E., Parson, W., Rossmanith, W., Dallinger, R.: Localization and quantification of Cd and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2003**, 190, 25-36;
24. Heusser, S., Dupuy, H.G. : De la structure tissulaire à la réalisation des fonctions chez les gastéropodes pulmonés (I) Élément d'histologie et de physiologie des espèces *Helix aspersa* et *Helix pomatia*, *Folia conchyliologica*, **2011**, 10, 16-25;
25. Stone, V., Johnston, H., Clift, M.J.: Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions, *IEEE Transactions on Nanobioscience*, **2007**, 6, 331-340;
26. Ali, D., Alarifi, S., Kumar, S., Ahamed, M., Siddiqui, M.A.: Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L, *Aquatic toxicology*, **2012**, 124, 83-90;
27. Stohs, S.J., Bagchi, D.: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radical Biology & Medicine*, **1995**, 18, 321-336;
28. Guo, B., Zebda, R., Drake, S.J., Sayes, C.M.: Synergistic effect of co-exposure to carbon black and Fe₂O₃ nanoparticles on oxidative stress in cultured lung epithelial cells, *Particle and Fibre Toxicology*, **2009**, 6:4, doi:10.1186/1743-8977-6-4;
29. Fahmy, B., Cormier, S.A.: Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells, *Toxicology In Vitro*, **2009**, 23 (7), 1365-1371;
30. Landar, A., Zmijewski, J.W., Dickinson, D.A., LeGoffe, C., Johnson, M.S., Milne, G.L., Zaroni, G., Vidari, G., Morrow, J.D., Darley-Usmar, V.M.: Interaction of electrophilic lipid oxidation products with mitochondria in endothelial cells and formation of reactive oxygen species, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **2006**, 290, H1777-H1787;
31. Fukui, H., Iwahashi, H., Endoh, S., Nishio, K., Yoshida, Y., Hagihara, Y., Horie, M.: Ascorbic acid attenuates acute pulmonary oxidative stress and inflammation caused by zinc oxide nanoparticles, *Journal of Occupational Health*, **2015**, 57 (2), 118-125;
32. Dickinson, D.A., Forman, H.J.: Cellular glutathione and thiols metabolism, *Biochemical pharmacology*, **2002**, 64, 1019-26;
33. Barillet, S.: Toxicocinetique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), Thèse de doctorat de l'université Paul Verlaine de Metz, France, **2007**, 476;
34. Hatcher, E.L., Chen, Y., Kang, Y.J.: Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities, *Free Radical Biology and Medicine*, **1995**, 19, 805-812;
35. Galaris, D., Evangelou, A.: The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **2002**, 42 (1), 93-103;
36. Grara, N.: Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux, Thèse de Doctorat Université Badji Mokhtar, Annaba Algérie, **2011**, 280;
37. Larba, R., Soltani, N.: Use of the land snail *Helix aspersa* for monitoring heavy metal soil contamination in northeast Algeria, *Environmental Monitoring and Assessment*, **2014**, 186 (8), 4987-4995;
38. Regoli, F., Principato, G.: Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to, metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers, *Aquatic Toxicology*, **1995**, 31, 143-164;
39. Hayes, J.D., Pulford, D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Biochemistry and Molecular Biology*, **1995**, 30, 445-600;
40. Ma, L., Liu, J., Li, N., Wang, J., Duan, Y., Yan, J., Liu, H., Wang, H., Hong, F.: Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity, *Biomaterials*, **2010**, 31, 99-105;
41. Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F.: Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: An integrated approach, *Environmental Health Perspectives*, **2006**, 114, 63-69;

42. Mouneyrac, C., Buffet, P.E., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Guibbolini, M., Risso-de Faverney, C., Perrein-Ettajni, H.: 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*, **2014**, **21** (13), 7899-7912;
43. Buffet, P.E., Tankoua, O.F., Pan, J.F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Guibbolini, M.: Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles, *Chemosphere*, **2011**, **84** (1), 166-174;
44. Buffet, P.E., Pan, J.F., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Gaudin, P., Mouneyrac, C.: Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food, *Ecotoxicology and environmental safety*, **2013**, **89**, 117-124;
45. Radu, M., Munteanu, C.M., Petrache, S., Serban, A.I., Dinu, D., Hermenean, A., Sima, C., Dinischiotu, A.: Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells, *Acta Biochimica Polonica*, **2010**, **57** (3), 355;
46. Srikanth, K., Ahmad, I., Rao, J.V., Trindade, T., Duarte, A.C., Pereira, E.: Modulation of glutathione and its dependent enzymes in gill cells of *Anguilla anguilla* exposed to silica coated iron oxide nanoparticles with or without mercury co-exposure under in vitro condition, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **2014**, **162**, 7-14;
47. Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Lee, S.B., Dong, M.S., Yu, I.J.: Silver nanoparticles affects the expression of biomarker genes mRNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Comparative Clinical Pathology*, **2016**, **25** (1), 85-90;
48. Wang, T.S., Shu, Y.F., Liu, Y.C.: Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite, *Toxicology*, **1997**, **121**, 229-237;
49. Jing, Y., Dai, J., Chalmers-Redman, R.M.: Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway, *Blood*, **1999**, **94**, 2102-2111;
50. Nielson, F.: Other trace elements in: *Present Knowledge in Nutrition*, (Editors: Ziegler, E.E., Filer, L.J.), 7th edition Press, Washington, DC, **1995**, 353-377;
51. Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., Tainer, J.A.: Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism, *Journal of Molecular Biology*, **2000**, **296**, 295-309;
52. Fahmy, S.R., Abdel-Ghaffar, F., Bakry, F.A., Sayed, D.A.: Ecotoxicological effect of sublethal exposure to zinc oxide nanoparticles on freshwater snail *Biomphalaria alexandrina*, *Archives of environmental contamination and toxicology*, **2014**, **67**, (2), 192-202;
53. Siddiqui, M.A., Saquib, Q., Ahamed, M., Farshori, N.N., Ahmad, J., Wahab, R., Pant, A.B.: Molybdenum nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress, G2/M arrest, and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2015**, **125**, 73-81;
54. Alarifi S., Ali D., Alkahtani S., Verma A., Ahamed M., Ahmed M., Alhadlaq H.A.: Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, **2013**, **8**, 983-993,
55. Ali, D., Yadav, P.G., Kumar, S., Ali, H., Alarifi, S., Harrath, A.H.: Sensitivity of freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L. to silver nanoparticles, *Chemosphere*, **2014**, **104**, 134-140;
56. Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., Giamberini, L.: Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*, *Aquatic Toxicology*, **2015**, **158**, 63-74;
57. Sarkar, A., Sil, P.C.: Iron oxide nanoparticles mediated cytotoxicity via PI3K/AKT pathway: role of quercetin, *Food and Chemical Toxicology*, **2014**, **71**, 106-115;
58. Douki, T., Delatour, T., Bianchini, F., Cadet, J.: Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method, *Carcinogenesis*, **1996**, **17**, 347-353;
59. Guo, C., Xia, Y., Niu, P., Jiang, L., Duan, J., Yu, Y., Sun, Z.: Silica nanoparticles induce oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction in vitro via activation of the MAPK/Nrf2 pathway and nuclear factor- κ B signalling, *International Journal of Nanomedicine*, **2015**, **10**, 1463;
60. Besnaci, S., Bensoltane, S., Zerari, L., Chraïria, S., Ait-hamlet, S., Berrebbah, H.: Impact of nanometric iron oxide in the hepatopancreas of terrestrial gastropod *Helix Aspersa*: Histological

- Changes and Biochemical Parameters, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **2016**, 36 (2), 234-241;
61. Kumari, M., Rajak, S., Singh, S.P., Kumari, S.I., Kumar, P.U., Murty, U.S., Rahman, M.F.: Repeated oral dose toxicity of iron oxide nanoparticles: biochemical and histopathological alterations in different tissues of rats, *Journal of nanoscience and nanotechnology*, **2012**, 12 (3), 2149-2159;
 62. Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., Zhao, F.: Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo, *Toxicology Letters*, **2006**, 163, 109-120;
 63. Hsieh, H.C., Chen, C.M., Hsieh, W.Y., Chen, C.Y., Liu, C.C., Lin, F.H.: ROS-induced toxicity: exposure of 3T3, RAW264. 7, and MCF7 cells to superparamagnetic iron oxide nanoparticles results in cell death by mitochondria-dependent apoptosis, *Journal of Nanoparticle Research*, **2015**, 17 (2), 1-14;
 64. Rathore, M., Mohanty, I.R., Maheswari, U., Dayal, N., Suman, R., Joshi, D.S.: Comparative in vivo assessment of the subacute toxicity of gold and silver nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research*, **2014**, 16 (4), 1-12;
 65. Thit, A., Banta, G.T., Selck, H.: Bioaccumulation, subcellular distribution and toxicity of sediment-associated copper in the ragworm *Nereis diversicolor*: The relative importance of aqueous copper, copper oxide nanoparticles and microparticles, *Environmental Pollution*, **2015**, 202, 50-57;
 66. Marigomez, J.A., Cajaraville, M.P., Angulo, E.: Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry, *Histochemistry*, **1990**, 94 (2), 191-199;
 67. Ali, D., Ali, H., Alarifi, S., Kumar, S., Serajuddin, M., Mashih, A.P., Ansari, A.A.: Impairment of DNA in a freshwater gastropod (*Lymnea luteola* L.) after exposure to titanium dioxide nanoparticles, *Archives of environmental contamination and toxicology*, **2015**, 68 (3), 543-552.