



Etude biochimique et histopathologique de la toxicité des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord- Est Algérien) chez *Helix aspersa* (Biochemical and Histopathology study of the toxicity of metal dust emitted by the Annaba steel complex in Northeastern Algeria in the snail *Helix aspersa*)

Grara Nedjoud¹, Atailia Amira², Boucenna Mounir², Berrebbah Houria²,
Djebar Mohamed Réda²

¹ Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des sciences de la Terre et de l'Univers,
Université 8 Mai 1945 - Guelma, BP 401, 24000 - Algérie.

² Laboratoire de Toxicologie Cellulaire. Université Badji Mokhtar- Annaba, BP 12, Annaba, 23000, Algérie.

Received 15 Feb 2016, Revised 27 Oct 2016, Accepted 1 Nov 2016

*Corresponding author: E-mail: grara120@yahoo.fr

Abstract

The aim of the study is to examine the impact of metal dust collected at the EL-Hadjar (Algeria) steel complex on the snail *Helix aspersa*, a gastropod that considered as a bioindicator and bioaccumulator of environmental pollution. Biochemical study of metal dust toxicity showed a significant increase in proteins with a significant reduction in the carbohydrates and lipids in the two studied tissues (Hepatopancreas and kidney). Histopathological analyzes showed very significant deteriorations in this tissues. In addition, the renal and hepato pancreatic epithelium showed inflammatory and lymphoplasmocytic infiltrates even at low concentrations of metallic dust. These results, would demonstrate a first biological response to environmental xenobiotics.

Keywords: *Helix aspersa* (Snails), Hepatopancreas, Kidney, heavy metals, metabolites, Histology.

Résumé

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'impact des poussières métalliques recueillies au niveau du complexe sidérurgique d'EL-Hadjar d'Annaba (Nord- Est Algérien) et leurs effets sur l'escargot *Helix aspersa*, considéré comme organisme bioaccumulateur et bio indicateur de pollution. L'étude biochimique de la toxicité des ces poussières a permis de mettre une augmentation significative des protéines avec une diminution significative des glucides et des lipides au niveau des deux organes étudiés (Hépatopancréas et rein). L'analyse histopathologique montre des atteintes tissulaires sans équivoque au niveau de ces tissus. En effet, l'épithélium rénal et hépatopancréatique montrent des infiltrats inflammatoires lymphoplasmocytaires même à faible concentration de poussière métallique. Ces résultats témoigneraient d'une première réponse biologique aux xénobiotiques du milieu

Mots clés : *Helix aspersa* (escargot), hépatopancréas, métaux lourds, rein, métabolites, Histologie.

1. Introduction

Les gastéropodes terrestres (escargots et limaces) présentent un important pouvoir bio-accumulateur de métaux. Ces organismes capables de survivre sur des sites contaminés en métaux sont ainsi, considéré comme des concentrateurs efficaces de métaux traces des habitats terrestres pollués. Cette résistance résulte de leur capacité de retenir et d'inactiver les métaux toxiques soit par compartimentation intracellulaire et excrétion, soit par liaison avec des protéines dont les métallothionéines (surtout le Cadmium) permettent leur stockage durant de longues périodes [1].

Selon des études d'organotropisme de ce stockage chez l'escargot, la glande digestive (ou hépatopancréas) serait l'organe des plus fortes concentrations en Cd, Pb et Zn, alors que le tube digestif semblerait jouer un rôle dans le stockage du Cd [2], les fortes capacités d'accumulation des éléments traces sont liés à l'efficacité des systèmes de détoxification impliquant des structures de séquestration et de compartimentation intracellulaire mais aussi à leur capacité limitée de cette espèce à excréter certains métaux conditionnés notamment par la nécessité d'éviter les pertes excessives d'eau [3]. Cette intoxication métallique est souvent accompagnée d'altérations structurales et ultrastructurales des cellules basophiles et digestives sont d'autant plus prononcées que les concentrations en Cd, Pb et Zn sont élevées [4]. Selon l'intensité de ces altérations, au niveau des membranes de l'apex des cellules, des microvillosités ainsi que l'aspect du cytoplasme, du noyau, des mitochondries, des vacuoles, du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, 3 états physiologiques de l'animal peuvent être considérés: *i*) l'état « contrôle » pour les animaux non exposés, *ii*) l'état de compensation caractérisé par des symptômes de réaction qui indiquent que les animaux sont capables de tolérer un empoisonnement subléthal en activant des processus de détoxification et *iii*) l'état de non-compensation s'accompagnant de symptômes de destruction qui correspondent à des dommages évidents des structures intracellulaires dus aux effets toxiques. Chacune de ces structures présente des sensibilités propres aux métaux testés [5,6].

L'objectif de cette étude est d'évaluer dans les conditions de laboratoire les effets des poussières métalliques d'origine industrielles sur les paramètres biochimiques (métabolique) et histopathologiques au niveau des deux organes (glande digestive et du rein) chez l'escargot *Helix aspersa* exposé à des concentrations croissantes de ces poussières.

2- Matériel et Méthodes

2-1-Matériel Biologique

Le matériel biologique utilisé est un gastéropode terrestre: l'escargot *Helix aspersa* collecté de la région de Guelma (zone non polluée) (Nord - Est Algérien). Des escargots (de Poids moyen de $8,5 \pm 0,15$ g) sont maintenus en acclimatation au laboratoire dans les conditions d'environnement optimales suivantes : Photopériodes 18h de lumière sur 24h, température ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), hygrométrie de 80 à 95% , aliment en farine de blé, les animaux sont répartis dans des boîtes de polystyrène transparents (Dimensions : 23,5 x 16,5 x 10,5 cm) avec couvercle perforé. Chaque boîte contient une éponge mouillée pour maintenir l'humidité. L'alimentation à base de farine est fournie dans des boîtes de pétri tous les 3 jours [7,8].



Figure 1: Localisation du site de collecte des escargots *Helix aspersa* (Wilaya de Guelma) Nord-est de l'Algérie.

2-2-Matériel chimique :

2-2-1-Les rejets métalliques :

Les poussières métalliques utilisées dans notre étude ont été collectées, au complexe sidérurgique d'EL-Hadjar Annaba, Ce dernier se situe à 13Km de la ville d'Annaba sur la route N° 44 (Nord - Est Algérien).

La composition métallique des poussières a été effectuée par spectrométrie d'absorption atomique. Cette analyse a déterminé la présence de 07 métaux lourds indiqués dans le tableau (01).

Tableau 1 : Composition en ppm des poussières rejetées par l'aciérie électrique 1 (ACE 1) et l'aciérie électrique 2 (ACE 2) du complexe sidérurgique d'El Hadjar [9].

Echantillon	Cu	Zn	Pb	Cr	Ni	Mn	Fe
Poussières ACE1 (ppm)	3,70	240,00	24,00	10,00	1,20	320,00	3000,00
Poussières ACE 2(ppm)	7,00	480,00	62,40	12,00	1,30	540,00	3600,00
Total	10,70	720,00	88,40	22,00	2,50	860,00	6600,00

2-3-Traitement des animaux

L'intoxication des animaux a été effectuée durant 28 jours par voie alimentaire par addition de concentrations croissantes de poussières métalliques dans l'alimentation (0,100, 500, 1000, 1500 µg/g d'aliment)). Les escargots sont répartis en 10 lots de (5 escargots / lot.) [8,10].

Après exposition, les animaux sont sacrifiés par congélation direct à -80°C, et sans jeûne préalable qui pourrait modifier les niveaux d'expression des molécules recherchées. Les organes (Hépatopancréas et rein) sont prélevés puis utilisés pour l'analyse biochimique et histopathologique [11].

2-4-Analyse biochimique

L'extraction des glucides, lipides et protéines métabolites des tissus étudiés a été réalisée selon le procédé de Shibko et al. [12], le dosage des glucides est réalisé selon la méthode de Duchateau & Florquin [13], celui des lipides selon la méthode de Goldsworthy et al. [14] et celui des protéines selon la méthode de Bradford [15].

2-5- Analyse histologique

Des fragments des tissus prélevés (Hépatopancréas ou rein) sont fixés dans le liquide de Bouin alcoolique pendant 48h, Puis déshydratés dans l'éthanol 95°. Après déshydratation, les pièces sont conservées dans du butanol. Après imprégnation dans la paraffine (3 bains de 24 h.) les pièces sont coupées (2µm) à l'aide d'un microtome Anglia scientific 0325, étalées avec l'eau gélatinée et séchées à l'étuve (37 °C) pendant au moins 48h. Elles sont ensuite déparaffinées avant d'être colorées à l'hémalum éosine. Après déshydratation dans des bains : éthanol 95° et de xylène pur. Les coupes montées à l'aide du baume de Canada sont observées au microscope (Gx40) [16].

2-6- Analyse statistique :

Les résultats sont exprimés par la moyenne ±écart type de n expériences (ou n représente le nombre d'essais) et comparés par une analyse de variance à l'aide d'un logiciel d'analyse des données: Minitab (Version 14.0) [17], les différences sont considérées significatives à $P \leq 0.05$.

3-Résultats et Discussion

3-1-Effet des rejets métalliques sur le taux de protéines totales

La figure (1) illustre les variations du taux de protéine totales au niveau de l'hépatopancréas (H) et du rein (R) à la suite de l'intoxication alimentaire d'*Helix aspersa* en présence de concentration croissante de poussières métalliques. Chez les escargots intoxiqués, le taux de protéines totales au niveau de l'hépatopancréas tend à augmenter de manière dose- dépendante et significative par rapport aux animaux témoins pour les concentrations (1000 et 1500 µg /g) cependant au niveau du rein, cette tendance devient significative à partir des faibles concentrations.

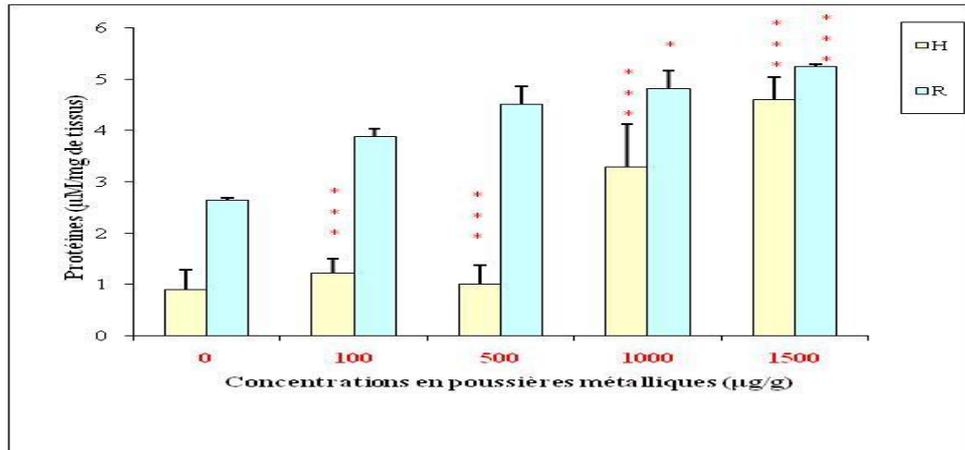


Figure 1 : Evolution du taux de protéines au niveau de l'hépatopancréas (H) et le rein (R) chez *Helix aspersa* exposé à des concentrations croissantes de poussières métalliques dans l'alimentation (µg/g)

2-2--Effet des rejets métalliques sur le taux de glucides totaux

La figure (2) illustre les variations du taux de glucides totaux chez *Helix aspersa* en présence de poussières métalliques. Au niveau de l'hépatopancréas, ce taux diminue légèrement chez les escargots traités avec la concentration 100µg par rapport aux témoins, cependant ce taux tend à diminuer d'une manière dose – dépendante, de manière significative pour les traités par la concentration 500,1000 et 1500µg. Au niveau du rein, la présence de poussières métalliques, entraîne une diminution significative et dose- dépendante.

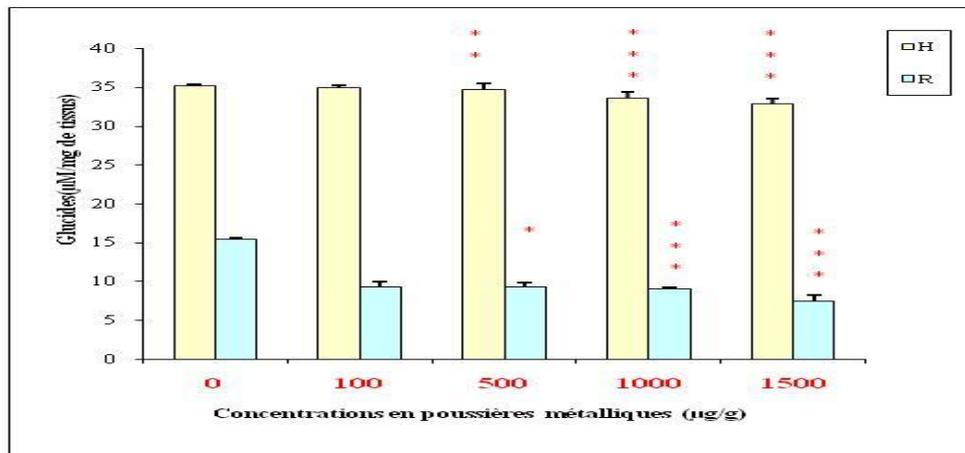


Figure 2 : Evolution du taux de glucides au niveau de l'hépatopancréas (H) et le rein (R) chez *Helix aspersa* exposé à des concentrations croissantes de poussières métalliques dans l'alimentation (µg/g)

2-3-Effet des rejets métalliques sur le taux de lipides totaux

La figure (3) illustre les variations du taux de lipides totaux au niveau de l'hépatopancréas et du rein d'*Helix aspersa* en présence de concentrations croissantes de poussières métalliques. Ce taux diminue, d'une manière significative, pour l'ensemble des concentrations testées. Cette tendance a été enregistrée au niveau du rein, même s'elle n'est qu'à partir de la concentration 500µg/g.

2-4-Aspect du tissu de l'hépatopancréas après traitement par les différentes concentrations de poussières métalliques (Figure 4).

L'analyse histopathologique des hépatopancréas des escargots traités aux poussières métalliques a permis de mettre en évidence les altérations qui ont affectés le tissu hématique chez les escargots. En effet chez les animaux témoins, celui-ci est constitué de lobules formés d'un ensemble d'acini maintenus cohérents par un

tissu conjonctif. Ces acini renferment trois types de cellules : les cellules digestives (CD) (les plus abondantes), les cellules excrétoires (CE) et les cellules à calcium (CC).

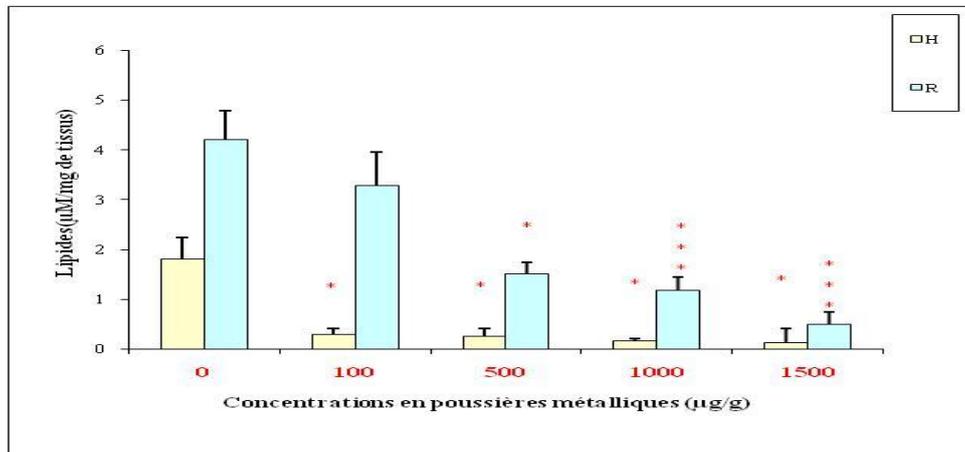


Figure 3 : Evolution du taux de lipides au niveau de l'hépatopancréas (H) et le rein (R) chez *Helix aspersa* exposé à des concentrations croissantes de poussières métalliques dans l'alimentation (µg/g)

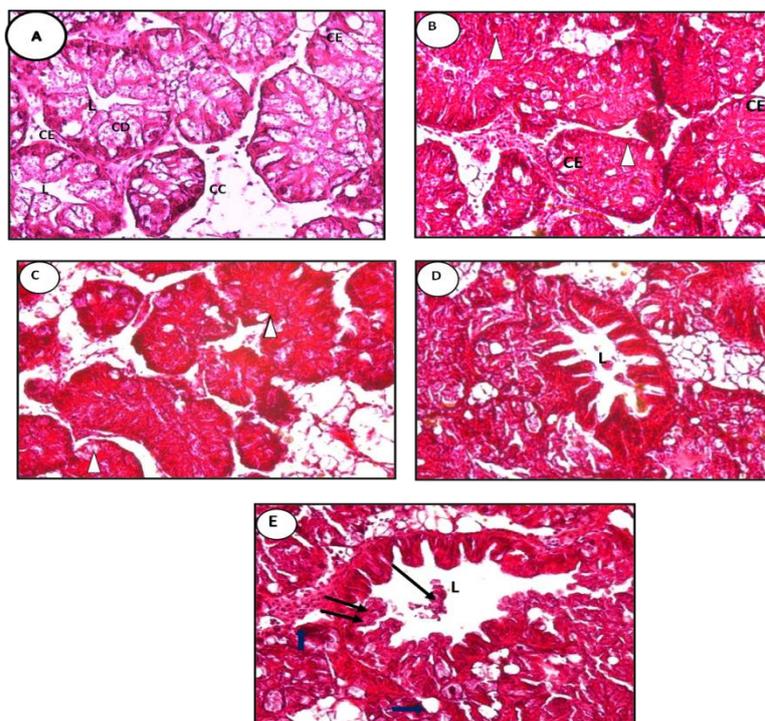


Figure 4 : Coupes histologiques de l'hépatopancréas (H) chez *Helix aspersa* témoins (A) et exposés à des concentrations croissantes de poussières métalliques dans l'alimentation [100µg/g (B), 500µg/g (C), 1000µg/g (D) et 1500µg/g (E)] (Gx40)

CC : Cellule à Calcium, CD : Cellule digestive, CE : Cellule excrétoire, L : Lumière de l'acini ,

→ : Infiltrat inflammatoire, → : Débris cellulaire, △ : Dégénérescence des cellules digestives

⇒ : Hypertrophie cellulaire, ↑ : Nécrose.

Cependant chez les animaux traités, un contour irrégulier des acini accompagné d'une dégénérescence des cellules digestives et un aspect inflammatoire des tissus allant jusqu'à la disparition de la lumière de l'acini sont apparus chez les animaux traités par des poussières métalliques à 100 µg/g (Figure 4B). Le même phénomène est observé à 500µg/g (B), mais avec une détérioration de la membrane basale de l'acini (Figure 4C). Enfin, la

destruction du parenchyme de l'acini a lieu pour les concentrations 1000 et 1500 µg/g (Figures 4D, 4E). Celle-ci est accompagnée de rupture de l'acini, et des nécroses cellulaire et parfois une hyperplasie cellulaire pour la plus forte concentration.

2-5-Aspect du tissu rénal après traitement par les différentes concentrations de poussières métalliques

L'examen histologique comparatif de tissu rénal chez les escargots témoins et traités aux poussières métallique a permis d'abord d'identifier l'organisation histologique témoin (Figure 5A). Celle-ci montre que le tissu rénal d'*Helix aspersa* est constitué d'un épithélium excréteur tapissé de lamelles rénales, lamelles conjonctives creuse, de sinus sanguin et de fibres musculaires lisses, constitués en cellules prismatiques avec une bordure en brosse. Cet épithélium renferme un seul type de cellules excrétoires, à bâtonnets (les plus nombreuses) et ciliées et qui présentent un noyau et une membrane granulaire. Le traitement par les poussières métalliques à 100 et 500 µg/g a entraîné des altérations marquées avec un contour irrégulier du tissu rénal qui est accompagné d'une dégénérescence des cellules excrétoires et une hyperplasie du tissu conjonctif (Figures 5B et 5C). Ces altérations deviennent plus accentuées chez les animaux traités aux concentrations 1000 et 1500µg/g (Figures 5D et 5E)

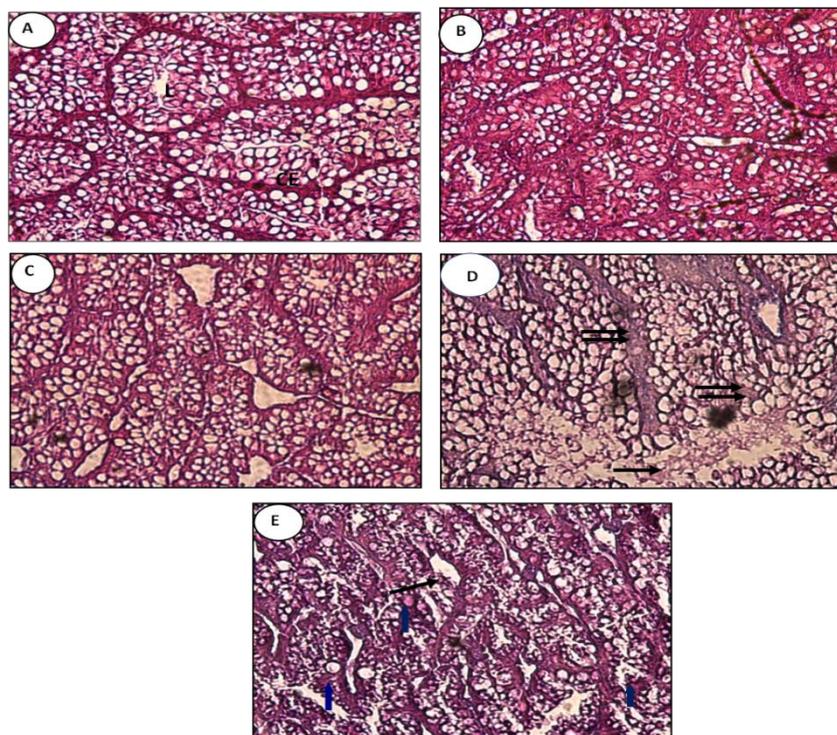


Figure 5 : Coupes histologiques du rein chez *Helix aspersa* témoins (A) et exposés à des concentrations croissantes de poussières métalliques dans l'alimentation [100µg/g (B), 500µg/g (C), 1000µg/g (D) et 1500µg/g (E)] (Gx40)

CC : Cellule à Calcium, CD : Cellule digestive, CE : Cellule excrétoire, L : Lumière de l'acini,

→ : Infiltrat inflammatoire, → : Débris cellulaire, △ : Dégénérescence des cellules digestives
 ⇒ : Hypertrophie cellulaire, ↑ : Nécrose.

Les métaux lourds sont considérés comme de véritables agents toxiques, perturbant certains systèmes enzymatiques et également les activités métaboliques et physiologiques chez l'homme et l'animal [18]. Ces composés engendrent des radicaux oxygénés (tels que le puissant radical hydroxyle OH) toxiques au niveau cellulaire qui sont à l'origine du phénomène connu sous le terme plus général de « stress oxydatif ». Chez les

mollusques, les métaux lourds peuvent induire un état de stress général, entraînant la réduction de leurs capacités d'adaptation à l'anoxie [19].

Les Gastéropodes Pulmonés sont des indicateurs écologiques pertinents de la pollution métallique et organique de l'écosystème terrestre par l'utilisation des biomarqueurs qui constituent un outil biologique naturel qui peut signaler la pollution d'un milieu ainsi que la biodisponibilité des substances toxiques. L'utilisation de l'escargot *Helix aspersa*, comme modèle d'étude de la toxicité des nanoparticules trouve un premier argument, l'escargot Petit Gris *Helix aspersa*, connu pour ses capacités à accumuler les polluants (Zn, Cu, Pb.....) à des concentrations importantes dans ses tissus [20, 11,16].

Les résultats concernant l'évolution du taux de protéines dans les deux organes ont permis de mettre en évidence une augmentation d'une manière dose –dépendante en présence de poussières métalliques, ces résultats vont dans le même sens que ceux de Peccini et al.[21] ; Masaya et al.[22] qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins).D'autre part Köhler et al.[23-25] suggèrent une induction de la synthèse des structures de stockage (MTs et granules) liée à la toxicocinétique c'est-à-dire que Chez différentes espèces de gastéropodes, le Cd accumulé dans l'hépatopancréas est majoritairement fixé à des protéines cytosoliques qui montrent des propriétés proches des métallothionéines et dont la synthèse est induite par l'exposition des animaux au Cd, dans l'hépatopancréas, le Zn aussi est principalement associé à des granules de pyrophosphate dans les cellules basophiles. La part restante est fixée à des MTs ou à d'autres protéines cytosoliques de faible poids moléculaire [6] .De plus l'exposition de la limace *Deroceras reticulatum* à des concentrations élevées de Cd, Pb et Zn dans l'aliment a également induit une synthèse dose- dépendante des protéines de stress hsp70 [6].

D'un autre coté et concernant l'évolution du taux de glucides, les résultats obtenus montrent que ce taux diminue d'une manière dose –dépendante en présence de poussières métalliques dans les deux organes choisis , cette diminution serait due à l'oxydation des glucides en présence des ions métalliques conduisant à la libération d'aldéhydes et de peroxyde d'hydrogène [26] .En effet, les hydrates de carbone sont les sources primaires et immédiates de l'énergie, dans les condition de stress , les réserves d'hydrates de carbone sont épuisées pour satisfaire les demandes énergétiques, ces résultats sont conformes avec ceux de EL-Wakil et Radwan [27] ,qui ont suggéré que l'épuisement du contenu de glycogène dans le tissu de l'escargot d'eau douce, *Bellamya dissimilis*, serait la conséquence de l'utilisation directe du glycogène pour la génération d'énergie à la suite de l'exposition de l'animal exposé à l'Endosulfane, au parathion méthylique, des quinalphos et au Nuvan (pesticides),, cette demande serait due à l'induction de l'hypoxie provoquée par les pesticides .

Les résultats concernant l'évolution du taux de lipides dans les deux organes ont permis de mettre en évidence une diminution significative des lipides chez les escargots traités et ce de manière dose – dépendante par les différentes concentrations .Selon Aourousseau [28], les radicaux oxygénés libres sont toxique via la dégradation des lipides dont la β oxydation , De plus les métaux comme le Cuivre et le Fer ont été largement utilisés comme agents initiateurs de l'oxydation des lipides [26] .Ces résultats convergent avec ceux de Padjama et Rao [29] qui ont mis en évidence une diminution des taux de lipides dans les tissus de *Bellamya dissimilis* exposés aux pesticides .

Sur le plan histopathologique, l'exposition aux métaux lourds peut causer des altérations cytologiques et ultra structurales très importantes au niveau de l'hépatopancréas, qui constitue l'organe de détoxification des polluants [30]. En effet, plusieurs réponses histopathologiques de plusieurs organes (glande digestive, rein, ovaires...) d'*Helix aspersa* exposé à des concentrations croissantes de Cd dans la nourriture [31].

Ces réponses histopathologique se manifestent par des réactions qui impliquent une hyperplasie des épithéliums aux plus faibles concentrations testées et une destruction cellulaire importante qui s'accompagne d'une prolifération de tissus conjonctifs ainsi que des nécroses aux fortes concentrations [32] .

Notre étude histologique montre que les poussières métalliques provoquent des atteintes tissulaires sans équivoque chez *Helix aspersa*. En effet l'examen histologique de l'épithélium rénal et hépatopancréatique met en évidence l'apparition d'infiltrats inflammatoires lymphoplasmocytaires dès la plus faible concentration de poussières métalliques, ceci pourrait être une première réponse biologique due à la présence des xénobiotiques

dans ces poussières, ces observations sont en accord avec les travaux de Tadjine [33], de Russell *et al.*[34] et de Chabicovsky *et al.*[32]. Notre étude a permis également de mettre en évidence une déformation des acini et une destruction des cellules digestives de manière dose- dépendante, qui ont conduit à une perte très importante de ces cellules aux plus fortes concentrations.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Triebkorn et Köhler [35,36] qui ont mis en évidence des altérations structurales et ultra structurales des cellules basophiles et digestives qui sont d'autant plus prononcées que les concentrations d'exposition en Cd, Pb et Zn sont élevées dans la glande digestive de la limace *Deroceras reticulatum*.

Les cellules digestives sont les plus abondantes dans l'épithélium de l'hépatopancréas [37], selon Porcel *et al.* [38] et Chabicovsky *et al.*[32], la perte de ces cellules semble être une réponse générale après une exposition aux métaux lourds chez les gastéropodes terrestres.

Les atteintes histologiques au niveau du tissu rénal d'*Helix aspersa* par les poussières métalliques et qui se sont manifestées par une hypertrophie des cellules excrétoires et une déformation des acini suivis de nécroses cellulaires, sont en accords avec celles décrites par Russell *et al.* [34] et Chabicovsky *et al.* [32]. Ces résultats témoigneraient du pouvoir cytotoxique des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'EL-Hadjar Annaba, Nos résultats sont en accord avec ceux de Boucenna *et al.*[9] qui ont mis en évidence des dommages tissulaires au niveau de la glande digestive et du rein d'*Helix aspersa* en réponse à la toxicité des particules métalliques d'origine industrielles et des nanoparticules d'oxyde de Fer et d'Aluminium (Fe_2O_3 et Al_2O_3)

Conclusion

Au terme de ce Travail, nous pouvons conclure que l'espèce *Helix aspersa* est sensible à la présence de poussières métalliques, cette sensibilité s'est manifestée par :

1. Une perturbation du métabolisme global à travers l'augmentation significative du taux de protéines totales avec une diminution significative du taux de lipides et de glucides.
2. l'apparition d'infiltrats inflammatoires lymphoplasmocytaires avec déformation des acini, une destruction des cellules digestives, conduisant à une perte très importante de ces cellules aux plus fortes concentrations, une hypertrophie des cellules excrétoires et une déformation des acini suivi de nécroses cellulaires dans l'hépatopancréas et le tissu rénal
3. Il semble donc évident que les poussières métalliques ont un pouvoir cytotoxique très important.

Remerciements - Ce travail a été soutenu par la Direction Générale de la Recherche du Ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Références

1. Le Bras G.J., Isa & Université Catholique de Lille, (2007) 91.
2. Cooke M., Jackson A., Nickless G., Roberts D.J., *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 23, (1979)445-451.
3. Dallinger R., Berger B., Triebkorn R., Köhler H., CAB International, Oxon, Wallingford, UK, (2001) 489-525.
4. Zaldibar B., Cancio I., Soto M., Marigomez I., *Environmental Pollution*, 156, (2008) 367-379.
5. Zaldibar B., Cancio I., Soto M., Marigomez I., *Chemosphere*, 70, (2007)144-154.
6. Coeurdassier M., Thèse de doctorat, université de franche comté, France (2001) 281.
7. Gomot A., *Bull. Acad. Natle.Méd*, 181, (1997)59-75.
8. Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M., *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, (2001)1951-1957.
9. Boucenna M., Berrebbah H., Atailia A., Grara N., Djebbar M.R., *Global Veterinaria* .14 (2) (2015) 189-198.

10. Coeurdassier M., Gomot-de Vaufleury A., Lovy C., Badot P.M., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53, (2002) 425-431.
11. Grara N., Berrebbah H., Rouabhi R., Atilia A and Djebbar ,M.R , *Global Veterinaria* 3 (4),(2009) 276-280.
12. Shibko S., Koivistoinen P., Tratyneck C., Newhall A., Freidman L., *Analyt. Biochem*, 19, (1966) 415-428
13. Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J., *Gen. Comp. Endocrinol*, 18 (3) (1972) 545.
14. Duchateau G., Florkin A., *Arch. Insect. Physiol. Biochem*, 67 (1959) 306-314.
15. Bradford M.M., *Anal. Biochem* 72 (1976) 278-254.
16. Grara N., Thèse de Doctorat, Université d'Annaba (2011) 120 .
17. Dagnelie P., *Bruxelles. Univ De boeck et Larcier* (1999) 659.
18. Grara N., Atilia A., Boucenna M., Berrebbah H and Djebbar M. R., *Environnement Risque et Santé* 11 (2012) 221-229.
19. Grara N., Bouloudenine M., Khaldi F., Zenir Z., Abdemadjid S., *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (9) (2015) 2596-2603
20. Hamdi-Ourfella A. N., Soltani N., *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (S2) (2014) 2527-2533
21. Peccini E., Staudenmann W., Albergoni V., Gabriel R.D., James P., *European journal of Biochemistry*.226, (1994) 853-859.
22. Masaya M., Yoshinobu H., Ai Y., Maki K., Yasuo O., *Journal of Phycology* 38(5) (2002)983.
23. Köhler H.R., Rahman B., Rahmann H., *Verh. Dtsch. Zool. Des.* 87 (1994) 328-329.
24. Köhler H.-R., Rahman B., Gräff S., Berkus M., et Triebskorn R., *Chemosphere*, 33 (1996) 1327-1340.
25. Köhler H.-R., Belitz B., Eckwert H., Adam R., Rahman B., Trontelj P., *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1998) 2246-2253.
26. Nzengue Y., Thèse de doctorat, Université JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1, France (2008) 299.
27. EL-wakil H.B., Radwan M.A., *J. Environ .Sci .Health.* B26 (1991) 479-489.
28. Arousseau B., *INRA Prod. Anim.*15(1) (2002) 67-82.
29. Padmaja R.J., Rao M.B, *bull. Environ. contam. toxicol.* 53 (1994)142-148.
30. Frías-Espéricueta M., Abad-Rosales S., Aidée C.N.V., IsidroOsuna L., Páez-Osuna F., Olvera R.L., Voltolina D ., *Aquatic Toxicology*. 89 (2008) 152157.
31. Radwan, M.A., Essawy, A.E., Abdelmeguid, N.E., Hamed, S.S., Ahmed, A.E., *Pesticide Biochemistry and Physiology* .90 (2008) 154–167.
32. Chabicoovsky M., Klepal W., Dallinger R., *Mechanisms Environmental Toxicology and Chemistry*. 23 (2004) 648- 655.
33. Tadjine A., Thèse de doctorat. Université d'Annaba (2007) 104.
34. Russell L.K., DeHaven J.I., Botts R.P., *Bull. Environm. Contam. Toxicol*, 26 (1981) 634-640.
35. Triebskorn R. Köhler H.R. , *Environ. Pollut.* 93 (1996) 317-343.
36. Triebskorn R. Köhler H.R., *Biomarkers*, 3 (1998) 109-127.
37. Dimitriadis VK., *Wallingford: CABI Publishing* (2001) 237– 257.
38. Porcel D., Bueno J.D., Almendros A., *Comparative Biochemistry and Physiology* .115 (1996) 11-17.

(2016) ; <http://www.jmaterenvirosci.com>