

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITÉ de BLIDA 1
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Procédé de Traitement des Effluents et Protection de l'Environnement.

Intitulé du mémoire

**Etude de l'effet des xénobiotiques sur la réponse catalase
chez les moules : Cas de la pollution organique**

Présenté par :

Melle. Chahrazad HAMADAT

Soutenu le 20/ 09/2016 devant le jury compose de :

O. CHEKNANE	Dr, U Blida 1	Président
BOUTEMAK	Dr, U Blida 1	Examineur
ALLEL	Dr, U Blida 1	Examineur
A. BADIS	Pr, U Blida 1	Promoteur
A.MEKNACHI	Attaché de recherche, CNRDPA	Promoteur

Année universitaire 2015/2016

ملخص

الأعمال المنجزة و المعروضة في هذه المذكرة غايتها الرئيسية تتمثل في دراسة تجارب التسمم الايكولوجي باستخدام نوعين من بلح البحر (*Perna perna et Mytilus galloprovincialis*) كدلائل حيوية للتلوث من خلال قياس مستويات CAT التي تمثل المؤشر الفيزيولوجي لدفاع ضد الأوكسدة و Protéase الذي يحث إنزيمات الهضم. من أجل ذلك. قمنا بعدة تجارب مخبرية وسطية من خلال تعريض بلح البحر بنوعيه لعدة ملوثات عضوية مثل Phénol و الصبغة الكيميائية مثل (vert malachite oxalate et rouge congo) مع تطبيق تركيزات مختلفة لهاته الملوثات بسلسلة من التلوث وإزالة التلوث الحاد في 9 /4 أيام. تم تسجيل زيادة في نسبة حث إنزيم الدفاع CAT ونقصان في نشاط إنزيم الهضم Protéase. عند إزالة التلوث سجلنا تراجع في نسب حث إنزيم CAT دلالة على الرجوع إلى الحالة الابتدائية.

الكلمات المفتاحية : التلوث البحري، التلوث العضوي، المؤشر الفيزيولوجي ، CAT ، Protéase

. *Mytilus galloprovincialis*، *Perna perna*

ABSTRACT

In this work we investigated the ecotoxicological tests using two species of mussels (*Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis*) as bio-indicators of pollution by the quantification of the activity catalase which represents the defense biomarker of oxidative stress and protease which reflects the achievement of digestive enzymes.

To do so, the assessment of the effects of organic pollution of marine waters, the response of catalase (CAT), protein content and protease activity was determined using a series of acute contamination and decontamination for 04/09 days under the effect of phenol and two dyes (malachite green oxalate and congo red).

An increase in CAT and a decrease in protease activity was recorded during the infection cycle. The decontamination passage yielded comparable levels between control and decontaminated individuals.

Keywords : Marine pollution, Organic pollution, biomarkers, Catalase, Protéase, *Perna perna*, *Mytilus galloprovincialis*, biomonitoring.

RESUME

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pour objectifs l'étude des essais écotoxicologiques en utilisant deux espèces de moules (*Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis*) en tant que bioindicateurs de pollution *via* la quantification de la catalase qui représente le biomarqueur de défense du stress oxydatif et la protéase qui traduit l'atteinte des enzymes digestives. Pour se faire, l'évaluation des effets de la pollution organique des eaux marines, les réponses catalase (CAT), les teneurs en protéines et l'activité protéase ont été déterminées avec une série de contaminations et de décontaminations *aiguë* pendant 04/09 jours sous l'effet de phénol et deux colorants (vert malachite oxalate et rouge congo). Une augmentation de la CAT et une diminution de l'activité protéase a été enregistrée au cours du cycle de contamination. Le passage en décontamination a permis d'obtenir des teneurs comparables entre les témoins et les individus décontaminés.

Mots-clés : Pollution marine, Pollution organique, Biomarqueurs, Catalase, Protéase *Perna perna*, *Mytilus galloprovincialis*, Biosurveillance.

REMERCIEMENTS

Au nom de Dieu le clément et le miséricordieux.

Louange à lui le grand, le tout puissant auquel je rends une grâce infinie pour m'avoir donné la volonté et la santé d'entreprendre, continuer et mener à terme ce modeste travail.

Je tiens en cette occasion, à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.

*Mes remerciements s'adressent tout d'abord à mon promoteur **Pr. BADIS. A** de m'avoir offert l'opportunité de travailler avec lui dans mon projet de fin d'étude.*

Je tiens à remercier mon *promoteur* **Mr. MEKNACHI. A** pour le temps qu'il m'a consacré tout au long de mon projet de fin d'étude ainsi que pour toutes les commodités qu'il a mis à ma disposition afin de faciliter mon travail.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude aux membres du jury qui m'ont honoré en acceptant de juger ce présent travail.

Je tiens à remercier *s'adressant tout d'abord à la direction* du Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) à Bou-Ismaïl et plus particulièrement **Mr. ANNANE.R** directeur du centre de m'avoir accepté, **Mr. DJLLALI. M** directeur adjoint pour m'avoir aidé dans mes recherches tout au long du stage et **Mr. BOUDJNAHE. M** directeur de la ferme conchylicole CNRDPA pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens à exprimer ma gratitude à M^{elle} BOUNAKOUSSE .N, et toute l'équipe de laboratoire de CNRDPA pour la confiance qu'ils y ont témoigné en accordant une totale liberté dans le déroulement de ce travail et pour leur assistance permanente lorsque je fais appel à leur.

Mes plus vifs remerciements vont à l'ensemble du département chimie industrielle de l'Université de Blida.

A TOUS, SANS EXCEPTION UN GRAND MERCI

DÉDICACE

J e dédie ce travail :

*A la lumière de ma vie, mes parents qui ont consentis d'énorme
Sacrifice pour me prodiguer une bonne éducation qui m'on permit
d'acquérir les
Connaissances nécessaires à l'accession aux études supérieures pour
arriver à ce stade de la vie. Je leur dis merci du fond de mon cœur.*

A mes frère Hichem, Rayane et ma petite sœur adorable Chahinaz.

*A mes amis, qui m'ont fourni une aide précieuse et une épaule
amicale sur laquelle nous pouvions compter spécialement Imene,
Ahlem, kamel.*

*A toute la promotion 2015/2016 avec qui j'ai partagé d'inoubliables
moments de joie, de doute et de bonheur.*

HAMADAT chakrazad



TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION.....	01

CHAPITRE1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Définition de pollution marine.....	03
1.1. Pollution des eaux.....	03
1.1.1 Définition des eaux résiduaires industrielles.....	03
1.1.2 Origine des polluants et types de pollutions industrielles.....	04
1.1.2.1 Pollution physique.....	04
1.1.2.1.1 Pollution mécanique.....	04
1.1.2.1.2 Pollution thermique.....	04
1.1.2.1.3 Pollution radioactive.....	04
1.1.2.2 Pollution chimique.....	05
1.1.2.2.1 Pollution organique.....	05
1.1.2.2.1.1 Hydrocarbures.....	05
1.1.2.2.1.2 Phénols.....	06
1.1.2.2.1.3 Les colorants.....	08
1.1.2.1.3.1 Utilisation des colorants.....	08
1.1.2.1.3.2 Toxicité des colorants sur les milieux	
aquatiques	09
1.2.1 Ecotoxicologie.....	10
1.2.2 La biosurveillance.....	10
1.2.2.1 Approches active et passive de biosurveillance.....	11
1.2.3 Les bioessais.....	11
1.2.4 Les biomarqueurs de stress environnemental.....	12
1.2.4.1 Classification des biomarqueurs.....	12
1.2.4.2 Place des biomarqueurs dans l'indentification des sources de	
contaminants	14
1.2.5 Le stress oxydant.....	14
1.2.6 Biomarqueurs étudié : la catalase (CAT).....	15
1.3.1 Choix du matériel biologique test.....	17
1.3.2 Avantage du modèle moule.....	17
1.3.3 Présentation des espèces biologique étude.....	17
1.3.4 Les principaux systèmes de la moule.....	19
1.3.5 Systématiques.....	20
1.3.6 Répartition géographique.....	21

CHAPITRE 2 : MATRIELS ET METHODES

2.1 Stratégie, démarche et dispositif expérimental.....	22
2.2 Méthodes et protocoles analytiques.....	25
2.2.1 Mesure des paramètres biométriques.....	25
2.2.2 Suivi de la mortalité.....	25
2.2.3 Mesure des paramètres	26
physicochimiques.....	
2.2.4 Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée.....	26
❖ Dosage de l'azote ammoniacal par la méthode au bleu d'indophénol....	27
❖ Dosage de l'azote nitreux.....	27
❖ Dosage de l'azote nitrique.....	28
❖ Dosage du phosphore.....	29
2.2.5 Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses biochimiques..	29
❖ Homogénéisation des tissus.....	30
2.2.6 Dosages des protéines par la méthode de Lowry.....	30
2.2.7 Dosages de la Catalase par mode Cinétique.....	31
2.2.8 Dosage de la protéase.....	32

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Résultats des paramètres physicochimiques.....	33
3.1.1 Température.....	34
3.1.2 Salinité.....	34
3.1.3 Potentiel d'hydrogène.....	35
3.2. Résultat de l'étude de l'effet des colorants chimiques sur l'excrétion Azotée et Phosphorée (eau d'élevage).....	35
3.2.1 Azote Ammoniacal.....	35
3.2.2 Nitrites.....	37
3.2.3 Nitrates.....	38
3.2.4 Phosphorées.....	39
3.3. Résultats des dosages biochimiques.....	40
<i>A : 1^{ère} série d'expérience - Exposition au phénol.....</i>	<i>40</i>
3.3.A.1. Variations des concentrations en protéines au niveau de la chair.....	40
3.3.A.2. Résultats de dosage de l'activité catalase.....	42
3.3.A.3. Variations de l'activité de l'enzyme digestive (protéase).....	46
<i>B : 2^{ème} série d'expérience – Exposition aux colorants.....</i>	<i>50</i>
3.3.B.1. Variations des concentrations en protéines au niveau de la chair.....	50
3.3.B.2. Résultats de dosage de l'activité catalase.....	51
3.3.B.3. Variations de l'activité de l'enzyme digestive (protéase).....	52
3.4 Résultats des mesures biométriques.....	53
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	56

APPENDICES

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

GLOSSAIRE

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET DES GRAPHIQUES

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE		
Figure 1.1	Anatomie générale d'un mollusque bivalve	19
Figure 1.2	Les deux espèces des moules	21

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES		
Figure 2.1	Dispositif expérimental.....	24
Figure 2.2	Planning expérimental des tests d'écotoxicité.....	25
Figure 2.3	Procédures expérimentales des dosages biochimiques.....	30

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION		
Figure 3.1	Etude de l'effet du rouge congo sur les teneurs en Azote ammoniacal en fonction de la Période d'études.....	36
Figure 3.2	Etude de l'effet du vert malachite oxalate sur les teneurs en Azote ammoniacal en fonction de la Période d'études.....	36
Figure 3.3	Etude de l'effet du vert malachite oxalate sur les teneurs en nitrites en fonction de la Période d'études.....	37
Figure 3.4	Etude de l'effet du rouge congo sur les teneurs en nitrites en fonction de la Période d'études.....	37
Figure 3.5	Etude de l'effet du vert malachite oxalate sur les teneurs en nitrates en fonction de la Période d'études.....	38
Figure 3.6	Etude de l'effet du rouge congo sur les teneurs en nitrates en fonction de la Période d'études.....	38
Figure 3.7	Etude de l'effet du rouge congo sur les teneurs en phosphore en fonction de la Période d'études.....	39
Figure 3.8	Etude de l'effet du vert malachite oxalate sur les teneurs en phosphore en fonction de la Période d'études.....	39
Figure 3.9	Résultats du dosage des protéines des moules <i>Perna perna</i> exposée au phénol.....	40
Figure 3.10	Résultats du dosage des protéines des moules <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposée au phénol.....	41
Figure 3.11	Variation des activités catalase des moules <i>Perna perna</i> exposées au phénol.....	43
Figure 3.12	Variation des activités catalase des moules <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposées au phénol.....	43
Figure 3.13	Evolution de l'activité protéase des moules <i>Perna perna</i> exposées au phénol.....	46

Figure 3.14	Evolution de l'activité protéase des moules <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposées au phénol.....	47
Figure 3.15	Résultats du dosage des protéines des moules <i>Perna perna</i> exposées au rouge congo et vert malachite oxalate.....	50
Figure 3.16	Variation des activités catalase des moules <i>Perna perna</i> exposées aux (vert malachite oxalate et rouge congo).....	51
Figure 3.17	Evolution de l'activité protéase des moules <i>Perna perna</i> exposées aux (vert malachite oxalate et rouge congo).....	52
Figure 3.18	Evolution de l'indice de condition de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposée au phénol en fonction de la période d'études.....	53
Figure 3.19	Evolution de l'indice de condition de la moule <i>Perna perna</i> exposée au phénol en fonction de la période d'études.....	53
Figure 3.20	Evolution de l'indice de condition de la moule <i>Perna perna</i> exposée aux (vert malachite oxalate et rouge congo) en fonction de la période d'études.....	54

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1.1	Les principales classifications des deux espèces.....	20
--------------------	---	----

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 3.1	Résultats des paramètres physicochimiques pour l'exposition des moules au phénol.....	33
Tableau 3.2	Résultats des paramètres physicochimiques pour l'exposition des moules aux deux colorants.....	33

INTRODUCTION

Depuis des siècles, les milieux côtiers sont considérés comme des espaces d'intérêts écologiques et socio-économiques majeurs, ces derniers connaissent une forte pression d'usage et sont sujet d'une pollution qui est le résultat de processus d'urbanisation, des processus démographiques et du développement des activités industrielles et agricoles.

Les activités humaines s'accompagnent de dispersion volontaire ou involontaire, de quantités, parfois considérables de substances d'origine naturelle ou de synthèse, parmi les quels un bon nombre possèdent des propriétés toxiques, y compris à des concentrations faibles [1]. Pareillement la contamination des écosystèmes aquatiques par les polluants organiques a pris une ampleur considérable durant ces dernières décennies [2].

Face aux dangers que représente la pollution marine sur les organismes vivants, sa menace pour la santé humaine ainsi que ses effets délétères sur la qualité des eaux, de nombreux programmes de surveillances nationaux et internationaux notamment dans la région méditerranéenne se sont fixés des objectifs d'estimer d'une façon continue le degré de la pollution dans cette zone pour assurer une prévention précoce des risques dus aux différents polluants d'où une protection des espèces et une préservation de la qualité des eaux marines.

Traditionnellement le niveau de contamination du milieu marin est présenté en terme de concentrations des contaminants chimiques présents dans le milieu, cependant ces mesures font appel à des techniques analytiques sophistiquées et coûteuses et qui ne donnent pas une estimation ni même une prédiction de l'impact de ces substances sur les organismes vivants atteignant ainsi leurs limites en tant qu'outils d'aide à la gestion environnementale. De ce fait d'autres voies ont été explorées aux moyens de bioessais écotoxicologiques réalisés sur les matières vivantes tel que les coquillages, poissons et les végétaux [1,3,4].

Les organisations internationales de surveillance de la pollution marine revendiquent l'utilisation des réponses biologiques ou biomarqueurs comme un complément aux analyses chimiques dans les programmes de surveillance. Effectivement leur utilisation permet une évaluation d'une part des concentrations des contaminants et leur

biodisponibilité dans les sédiments, les colonnes d'eau et les organismes et d'autre part les effets de ces polluants sur la composante biologique des écosystèmes. L'utilisation des biomarqueurs permet d'évaluer les effets des teneurs analysées par les outils de la chimie conventionnelle sur les réponses biologiques des organismes tests [1,5,6].

Les moules dont *Mytilus galloprovincialis*, *Perna perna* et d'autres bivalves marins sont couramment utilisées comme espèces sentinelles pour la biosurveillance des milieux côtiers à travers le monde en raison de leurs caractéristiques qui font d'eux de bons bioindicateurs [7].

Dans cette optique de biomonitoring, le Centre National de la Recherche et du Développement de la pêche et de l'Aquaculture CNRDPA, Bou-Ismaïl développe actuellement un programme de gestion des écosystèmes aquatiques et de surveillance environnementale et contribuant ainsi aux recherches des indicateurs de pollution.

Ce travail se veut une étude des biomarqueurs catalase et protéase autant que réponse biologique à un stress induit par une exposition *aiguë* aux contaminants chimiques (à savoir le phénol et les deux colorants vert malachite et rouge congo) chez les moules *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna* dans un but global d'essai d'adoption d'une technique rapide et susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de santé de la baie de Bou-Ismaïl de la wilaya de Tipasa.

Ce labour est structuré en trois chapitres et présenté comme suit :

- Le premier chapitre se veut une synthèse bibliographique des notions de pollution, le stress oxydant et les biomarqueurs ;
- Le deuxième chapitre sera consacré au matériel utilisé de même que les différentes analyses effectuées lors de la réalisation de nos expérimentations ;
- Le troisième chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus, au cours de nos expérimentations ainsi que leurs discussions ;
- Une synthèse sur l'utilité de l'utilisation de la catalase ainsi que des perspectives concluront ce travail.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Définition de pollution marine

La définition de la pollution marine la plus couramment acceptée est celle donnée par le groupe mixte d'expert chargé d'étudier les aspects scientifiques de la protection de l'environnement marin.

Elle est définie comme : " l'introduction directe ou indirecte, par l'homme, de substances ou d'énergie, dans le milieu marin (y compris les estuaires), lorsqu'elle a des effets nuisibles tels que dommages aux ressources biologiques, risques pour la santé de l'homme, entraves aux activités maritimes, y compris la pêche, altération de la qualité de l'eau de mer du point de vue de son utilisation et dégradation des valeurs d'agrément " [8].

1.1. Pollution des eaux

La pollution ou la contamination de l'eau peut être définie comme la dégradation de celle-ci en modifiant ses propriétés physique, chimique et biologique; par des déversements, rejets, dépôts directs ou indirects de corps étrangers ou de matières indésirables telles que les microorganismes, les produits toxiques, les déchets industriels. Ces substances polluantes peuvent avoir différentes origines:

- ✚ Urbaine (activités domestiques; eaux d'égout, eaux de cuisine...)
- ✚ Agricole (engrais, pesticides)
- ✚ Industrielle (chimie-pharmacie, pétrochimie, raffinage...).

1.1.1 Définition des eaux résiduaires industrielles

Tous effluents ou rejets industriels obtenus lors de l'extraction et de la transformation des matières premières en produits industriels. Les eaux de rejets des services généraux des industries (sanitaire et cuisine) sont considérées également comme eaux résiduaires industrielles [9-10].

1.1.2 Origine des polluants et types de pollutions industrielles

Les eaux résiduaires industrielles sont spécifiques par leur volume et leur composition. On distingue trois types de pollution :

1.1.2.1 Pollution physique

C'est une pollution due aux agents physiques (tout élément solide entraîné par l'eau), elle est d'origine domestique, essentiellement industrielle. On peut la répartir en trois classes: mécanique, thermique et radioactive [9,11].

1.1.2.1.1 Pollution mécanique

Elle résulte des décharges de déchets et de particules solides apportés par les ERI (eaux résiduaires industrielles), ainsi que les eaux de ruissellement. Ces polluants sont soit les éléments grossiers soit du sable ou bien les matières en suspension MES.

1.1.2.1.2 Pollution thermique

Les eaux rejetées par les usines utilisant un circuit de refroidissement de certaines installations (centrales thermiques, nucléaires, raffineries, aciéries..); ont une température de l'ordre de (70 à 80°C). Elle diminue jusqu' à (40 à 45°C) lorsqu'elle contacte les eaux des milieux aquatiques entraînant un réchauffement de l'eau, qui influe sur la solubilité de l'oxygène. En outre tout changement de température cause des effets significatifs sur la survie des organismes aquatiques. Un abaissement important de température ralentit la plupart des réactions chimiques vitales voire les arrêter. Au contraire, des augmentations de température peuvent tuer certaines espèces, mais également favoriser le développement d'autres organismes causant ainsi un déséquilibre écologique [9,12].

1.1.2.1.3 Pollution radioactive

C'est celle occasionnée par une éventuelle radioactivité artificielle des rejets qui trouvent leur source dans l'utilisation de l'énergie nucléaire sous toutes ces formes (installations et centrales d'exploitation de mine d'uranium, traitement des déchets radioactifs). Les éléments radioactifs s'incorporent dans les molécules des organismes

vivants. Plus on s'élève dans la chaîne alimentaire plus les organismes sont sensibles aux rayonnements [9,12].

1.2.2 Pollution chimique

Elle résulte des rejets chimiques, essentiellement d'origine industrielle. La pollution chimique des eaux est regroupée dans deux catégories :

- ✚ Organiques (hydrocarbures, pesticides, détergents, phénols, colorants..) ;
- ✚ Minérales (métaux lourds, cyanure, azote, phosphore...)

1.2.2.1 Pollution organique

C'est les effluents chargés de matières organiques fermentescibles (biodégradables), fournis par les industries. Ils provoquent une consommation d'oxygène dissous de ces eaux, entraînant la mort des poissons par asphyxie et le développement (dépôts de matières organiques au fond des eaux marines) de fermentation anaérobie (putréfaction) génératrices de nuisances olfactives [12,13].

La pollution organique réfère aux substances polluantes contenant du carbone tels les AHP, BPC, organochlorés comme les DDT, etc... Ces substances se dégradent très lentement, très toxiques à long terme.

1.2.2.1.1 Hydrocarbures

La pollution par les hydrocarbures résulte de plusieurs activités liées à l'extraction du pétrole, à son transport et en aval à l'utilisation de produits finis (carburants et lubrifiants), ainsi qu'aux rejets effectués par les navires (marées noires). Les effets des hydrocarbures dans le milieu marin sont considérables. Ils dépendent largement de leur composition.

En fait leurs activités peuvent s'exercer selon plusieurs modalités très différentes [11,14].

- ✚ **Toxicité aiguë:** elle s'exerce sur l'ensemble des êtres vivants du milieu (végétaux, animaux ou bactéries) provoquant des disparitions immédiates des

poissons s'effectuent par colmatage des bronchites. Les oiseaux sont également tués en masses par engluage des plumes. On n'estime que 150 000 à 400 000 le nombre d'oiseaux tués annuellement par les hydrocarbures [14].

✚ **Toxicité à long terme:** les hydrocarbures ou les produits de dégradation, peuvent être accumulés par les différents organismes marins, après leur ingestion, leurs effets peuvent s'étaler sur des périodes très longues. Ce danger est évidemment plus grave lorsqu'il s'agit des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HPA) cancérigènes (méthyle chlorolanthrène, benzanthracènes, benzopyrènes). Ils sont repris par les chaînes alimentaires et concentrés jusqu'à des taux très élevés. On imagine le danger que peut présenter ce phénomène pour le consommateur humain [14].

1.1.2.2.1.2 Phénols

Le phénol est une substance irritante et fortement corrosive. Il a une forte capacité à pénétrer dans l'organisme en traversant la peau et les muqueuses. Les systèmes cardiovasculaire et nerveux sont également des cibles.

Le phénol est classé par l'Union Européenne comme mutagène catégorie III [15]. La majorité des phénols et de leurs dérivés sont des substances toxiques. Beaucoup d'entre eux sont classés comme des déchets dangereux, et certains d'entre eux sont connus ou soupçonnés d'être cancérogènes.

Aussi le phénol est répertorié sur la liste prioritaire des substances dangereuses identifiées par (ATSDR, 2007) [16]. Le phénol est rapidement absorbé lors de son introduction dans l'organisme. L'absorption percutanée d'une solution de concentration égale à 25 mg.kg⁻¹ de 14C-phénol est d'environ 19% pour la peau humaine [17]. Après absorption, le phénol se distribue rapidement dans tout l'organisme avec des concentrations supérieures à celle du sérum dans le foie, la rate, les reins et les surrénales [17]. Il existe peu de données expérimentales chez les volontaires sains publiées dans les bases de données bibliographiques et/ou toxicologiques.

Une étude a consisté à déposer du phénol de concentrations égales à 2,5-5-10 g.L⁻¹ sur les bras de personnes volontaires. Le phénol est absorbé de façon constante pendant une heure avec un flux égal à 0,08 mg.cm⁻² .h⁻¹ [17]. L'application du phénol concentrée

sur la peau peut provoquer des lésions cutanées sévères [18]. Il existe des cas d'intoxications mortelles [19]. L'ingestion de 5-500 mg, accidentelle ou intentionnelle est mortelle chez les nourrissons et des décès d'adultes apparaissent après l'ingestion de 1-32 g [20].

Le phénol présent dans l'eau ou dans des aliments entre rapidement dans l'organisme par le tube digestif. Il est ensuite rapidement distribué dans tous les tissus et exerce une action corrosive. Les organes cibles sont le cerveau et les reins [21]. En raison de sa forte toxicité dans l'eau, il est nécessaire de traiter les solutions aqueuses du phénol, avant de les rejeter dans le milieu naturel. La faune et la flore sont les principales cibles des effluents industriels contenant du phénol.

Le phénol est un produit répandu et très toxique dans l'eau, des polluants du sol et la vie aquatique. Les composés phénoliques sont solubles dans l'eau et très mobiles et sont donc susceptibles d'atteindre sources d'eau potable en aval des rejets, où, même à faibles concentrations, ils peuvent causer de graves odeur et un goût désagréables et posent des 10 risques pour les populations même à une faible concentration [22]. USEPA recommande une limite maximale autorisée de $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ [23]. La limite générale norme de rejet des effluents du phénol est de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, avant d'être déversés dans les cours d'eau [23].

L'Organisation mondiale de la Santé a donc limité la concentration du phénol dans l'eau potable à $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ [24]. L'Union Européenne impose une concentration totale du phénol inférieure à $0,0005 \text{ mg.L}^{-1}$ dans l'eau potable [25]. En France la concentration en phénols, doit être inférieure ou égale à $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. Les expositions au phénol peuvent être nombreuses : soit au contact de milieux naturels, soit en consommant de l'eau ou une denrée alimentaire contaminée, soit en utilisant des produits de consommation contenant du phénol [26].

La bioaccumulation du phénol d'une concentration de 2 mg.L^{-1} ou plus dans l'environnement aquatique peut déjà provoquer des effets secondaires sur le développement de certains poissons et des concentrations entre 10 et 100 mg.L^{-1} entraînent la disparition de la vie aquatique dans les 96 heures [27]. Lorsque cet effluent est rejeté dans l'environnement sans traitement préalable, il provoque de graves

dommages par contamination du sol, de la surface et des eaux. Des législations ont donc été mises en place pour réguler la teneur en phénol des eaux résiduaires.

Ainsi, pour l'Agence de Protection Environnemental des Etats-Unis, la limite maximale acceptable de la concentration du phénol dans les eaux usées est estimée à moins de 1 mg.L⁻¹ [27] afin de protéger la santé humaine contre les effets toxiques potentiels causés par l'exposition au phénol. Cependant le phénol est rapidement métabolisé par les poissons et ces résultats indiquent une rétention de certains métabolites du phénol [28].

1.1.2.2.1.3 Les colorants

Un colorant doit posséder, outre sa couleur propre, la propriété de teindre. Cette propriété résultant d'une affinité particulière entre le colorant et la fibre, est à l'origine des principales difficultés rencontrées lors des traitements. En effet, selon le type d'application et d'utilisation, les colorants synthétiques doivent répondre à un certain nombre de critères afin de prolonger la durée de vie des produits textiles sur lesquels ils sont appliqués: résistance à l'abrasion, stabilité photolytique des couleurs, résistance à l'oxydation chimique (notamment par les détergents) et aux attaques microbiennes.

L'affinité entre le colorant et la fibre est particulièrement développée pour les colorants qui possèdent un caractère acide ou basique accentué. Ces caractéristiques sont propres aux colorants organiques accroissent leur persistance dans l'environnement et les rendent peu biodégradables [29].

1.1.2.1.3.1 Utilisation des colorants

L'industrie des colorants constitue un marché économique considérable car de nombreux produits industriels peuvent être colorés, principalement :

- Pigments (industrie des matières plastiques) ;
- Encre, papier (imprimerie) ;
- Colorants alimentaires (industrie agro-alimentaire) ;
- Pigments des peintures, matériaux de construction, céramiques (industrie du bâtiment) ;
- Colorants capillaires (industrie des cosmétiques) ;

- Colorants et conservateurs (industrie pharmaceutique)
- Carburants et huiles (industrie automobile etc,...) ;
- Colorants textiles à usage vestimentaire, de décoration, du bâtiment, du transport, colorants textiles à usage médical etc... [30].

1.1.2.1.3.2 Toxicité des colorants sur les milieux aquatiques

Un certain nombre de colorants présente un caractère toxique sur le milieu aquatique provoquant la destruction directe des communautés aquatiques [31].

- ✚ La fuchsine, en concentration supérieure à 1mg/l, exerce un effet de ralentissement sur l'activité vitale des algues [32].
- ✚ Les rejets des usines de teinturerie et de textile sont à l'origine de diverses pollutions telles que : l'augmentation de la DBO5 et la DCO, diminuant la capacité de ré-aération des cours d'eau et retardant l'activité de photosynthèse [33].

a) Toxicité sur les poissons

Le poisson est un très bon modèle de l'essai de toxicité, non seulement parce qu'il est un bon indicateur des conditions générales des eaux, mais aussi parce qu'il est une source d'alimentation importante de l'homme. Ainsi, l'analyse des données disponibles de la toxicité, par rapport au poisson, sur plus de 3000 produits commercialisés par des firmes membres de l'Association des colorants indique qu'environ 98% ont des valeurs de concentration létale CL50 supérieures à 1 mg/l, concentration à laquelle la pollution colorée d'une rivière peut être observable. Les 2% restants se décomposent sur 27 structures chimiques différentes y compris 16 colorants basiques parmi lesquels 10 sont de type triphénylméthane [34]. Le colorant "noir de luxanthol G" utilisé pour la teinture de la viscose, est déjà toxique pour de jeune Guppies à la concentration de 5 mg/l, mais ne le devient, pour le Hotu, qu'à partir de 75mg/l. Par contre, l'éosine, la fluorescine et l'auramine, très utilisées en hydrologie pour les essais de coloration, se sont montrées inoffensives pour la Truite et le Gardon en concentration jusqu'à 100 mg/l [35].

1.2.1 Ecotoxicologie

L'écotoxicologie a pour but d'étudier le comportement et les effets de polluants dans les écosystèmes. Face aux nombreuses substances issues des activités technologiques qui se retrouvent quotidiennement dans l'environnement, la détection rapide d'une présence excessive de contaminants, la détermination de leur toxicité et une prévention des atteintes nuisibles sont nécessaires pour assurer la protection des écosystèmes [36].

L'écotoxicologie est définie comme « *le domaine d'étude qui intègre les effets écologiques et toxiques des polluants chimiques sur les populations, les communautés et les écosystèmes ainsi que leur devenir (transfert, transformation, dégradation) dans l'environnement* » [37].

Cette discipline comporte plusieurs aspects ou domaines d'étude, tous interdépendants les uns des autres [37] :

- L'étude du devenir des polluants dans un écosystème récepteur ; leur transfert entre les différents compartiments abiotiques des écosystèmes ainsi qu'entre ces compartiments abiotiques et les organismes vivants, les transformations physico-chimiques et biologiques qu'ils peuvent subir et les conséquences sur leurs potentiels toxiques, etc. ;
- Les modalités et mécanismes d'action des polluants ;
- La prévision des effets des polluants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes.

1.2.2 La biosurveillance

1.2.2.1 Définition

La biosurveillance se définit comme « l'utilisation des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre

l'évolution » [38]. C'est aussi « l'étude de la réponse biologique des organismes aux contaminants chimiques » [39].

1.2.2.2 Approches active et passive de biosurveillance

Les études environnementales portant sur les effets des contaminants sur les organismes peuvent être divisées en deux catégories distinctes : les études utilisant une approche active et celles utilisant une approche passive.

- ✚ **Approche passive** : appelée méthode *in situ* (ou biosurveillance passive), utilise les organismes déjà présents sur le site (organismes indigènes) [40]. Elle a l'avantage d'être rapide. En effet, les organismes ayant déjà été exposés aux polluants, il ne reste plus qu'à les collecter et à les analyser.
- ✚ **Approche active** : appelée méthode des transplants (ou biosurveillance active) emploie des organismes dits transplantés [40]. Elle peut être utilisée par exemple lorsque la méthode *in situ* n'est pas envisageable.

1.2.3 Les bioessais

Les tests écotoxicologiques en laboratoire (bioessais ou biotests) ont fait l'objet d'un développement et d'une standardisation conséquente afin de fournir des outils adaptés à l'évaluation des dangers des substances dans la démarche d'évaluation des risques. L'objet de tels essais est la mise en évidence d'effets toxiques sur des populations représentatives des écosystèmes et appartenant à des niveaux trophiques différents et permettent de déterminer les seuils de toxicité potentielle des substances susceptibles d'arriver dans le milieu marin, de manière accidentelle ou chronique, ainsi que la « qualité biologique » d'un milieu ou la toxicité potentielle d'une eau de rivière ou d'un rejet arrivant [41.42].

Ces tests de toxicité, sont de deux types :

- ✚ **Les tests de toxicité aiguë** se réalisent sur une durée très courte (par rapport au temps de génération de l'organisme). Leurs avantages sont leur rapidité et leur faible coût. Ces tests impliquent généralement des concentrations élevées du

polluant dans le milieu marin de ce fait, les effets à long terme des faibles concentrations ne sont pas mis en évidence.

- ✚ **Les tests de toxicité chronique** se déroulent sur une relativement longue durée par rapport au temps de génération de l'organisme. Ce sont par exemple les tests sur la reproduction. Ils sont plus longs et plus coûteux que les tests aigus, mais ils permettent de mettre en évidence des effets à long terme d'un polluant [43, 44, 45].

1.2.4 Les biomarqueurs de stress environnemental

La notion du biomarqueur est donc relativement récente et le développement de son utilisation comme outil de surveillance et d'évaluation de l'environnement est étroitement liée à la connaissance des mécanismes moléculaires des processus toxique chez différentes espèces animales ou végétales appartenant aux différents écosystèmes.

D'après Lagadic *et al* [46] ; un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveaux moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à une ou plusieurs substance chimique à caractère polluant. Ce changement peut alors être associé à l'exposition en elle-même, aux effets toxiques ou à la sensibilité vis-à-vis du contaminant environnemental.

Les expérimentations en conditions contrôlées ont largement démontré que les biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques dans certains cas, les effets de ceux-ci sur les structures et fonction vitales d'organisme. Ce bases expérimentales ont permis d'envisager l'utilisation des biomarqueur dans le milieu naturel, notamment dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement.

1.2.4.1 Classification des biomarqueurs

Dans la classification des biomarqueurs, il à été longtemps utilisé une division en trois classes (biomarqueurs d'exposition, d'effets et de sensibilité). Et selon de Lafontaine *et al.* [47]

- **Biomarqueurs d'exposition** : ils indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Ils sont généralement le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans les tissus ou les liquides corporels. Parmi ces derniers, l'induction de la synthèse des métallothionéines, protéines soufrées de faible poids moléculaire capables de fixer les ions métalliques, est typique de la pollution métallique. L'induction de ces métallothionéines correspond à un mécanisme adaptatif détoxifiants, induisant la liaison de ces protéines aux métaux lourds et les empêchant ainsi d'interférer avec les enzymes dont ils perturberaient l'activité.

- **Biomarqueurs d'effet** : ils permettent de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, il a exercé un effet, toxique ou non, sur une cible critique. Ces biomarqueurs d'effets diagnostiquent un dépassement, pouvant être transitoire, des capacités de régulation de l'organisme entraînant des conséquences sur la viabilité (cellules, tissu, individu).

- **Biomarqueurs de sensibilité** : c'est une variation, d'origine génétique, de la réponse à la contamination par les polluants. Des facultés acquises génétiquement comme, par exemple, l'augmentation de la quantité de glutathion S-transférase et d'enzymes du système à monooxygénases, ou encore la diminution de la sensibilité des Acétylcholinestérases constituent des manifestations communes de ce phénomène.

Selon Amiard *et al*(2008) [48], Les biomarqueurs sont classés en deux catégories suivantes : les biomarqueurs de défense et les biomarqueurs de dommages. Cette dernière permet de lever l'ambiguïté du terme effet qui peut être bénéfique ou néfaste.

- **Les biomarqueurs de défense** : Ce sont des réponses de type adaptatif, les enzymes de biotransformation des HAP (Hydrocarbures Aromatiques polycycliques), les PCB (polychlorobiphényle) et les défenses antioxydantes enzymatiques qui sont des systèmes de système détoxification ou de dégradation et dont la teneur augmente en présence de contaminants dans le milieu. Cette

adaptation peut empêcher les effets au niveau de l'individu et par conséquent au niveau des populations, communautés et écosystèmes

En effet, dans des zones fortement contaminées, de nombreuses espèces de plantes et d'animaux sont capables de faire face à la présence de substances chimiques potentiellement toxiques.

- **Les biomarqueurs de dommages :** la réponse dans ce cas peut indiquer un effet néfaste. C'est le cas de neurotoxiques qui entraînent des effets au niveau du comportement, pouvant être évalués indirectement par la mesure de biomarqueurs caractéristiques du fonctionnement du système nerveux, par exemple de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'importance des effets néfastes en fonction du degré de contamination du milieu est quantifiée par la relation dose/effet. Aux doses les plus faibles, aucun effet néfaste n'est observé mais lorsque la dose augmente, une réponse biologique va apparaître et s'amplifier.

1.2.4.2 Place des biomarqueurs dans l'identification des sources de contaminants

Pour identifier les sources de contamination, deux voies sont possibles, deux voies sont possibles (PEREZ *et al* 2000)[43].

- Les marqueurs spécifiques représentent à la fois un moyen de mesure des effets au niveau infra-individuel et une méthode d'identification de la contamination, peu précise, mais relativement peu onéreuse.
- Les dosages de contaminants dans des organismes aquatiques donnent une image précise des niveaux de contamination du compartiment biologique, mais nécessitent des moyens financiers et matériels beaucoup plus importants.

1.2.5 Le stress oxydant

L'origine du stress oxydant chez les organismes aérobies provient de la consommation intracellulaire de la molécule d'oxygène qui est essentielle pour de nombreuses fonctions physiologiques mais qui génère dans le même temps la formation

d'espèces réactives de l'oxygène ou « *reactive oxygen species* » (ROS) qui sont potentiellement toxiques pour la cellule [48].

Par ailleurs, les polluants chimiques sont d'importants producteurs de ROS. En effet, les xénobiotiques connus pour leurs propriétés redox comme les quinones, les métaux de transition, les colorants diazoïques, les herbicides bipyridyles et les composés aromatiques nitrés induisent la formation de radicaux superoxydes.

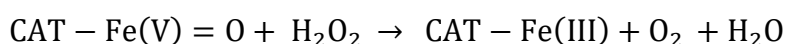
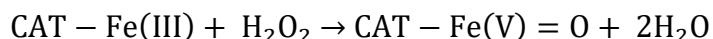
On définit le stress oxydant lorsque la formation des ROS excède les capacités de défense du système antioxydant. Au niveau cellulaire, il se traduit par l'altération et plus particulièrement l'oxydation des composants tels que l'ADN, les protéines et les lipides et par une perturbation généralisée de la balance redox. Ses effets cytotoxiques se traduisent par des perturbations structurales et fonctionnelles comme des inhibitions enzymatiques, des dégradations des protéines, de la peroxydation lipidique, des processus inflammatoires et des phénomènes de morts cellulaires [48].

1.2.6 Biomarqueurs étudié : la catalase (CAT)

La catalase (CAT : EC1.11.1.6) est une hémoprotéine tétramérique qui possède un atome de fer par sous-unité, chacune des sous-unités (quatre chaînes polypeptidiques, contenant chacune plus de 500 acides aminés). Sa masse moléculaire est d'environ 240 kDa chez les mammifères. Ces groupes hémiques ferriques responsables de l'activité catalytique. Cette enzyme est présente chez tous les organismes aérobies, eucaryotes et procaryotes, et chez beaucoup d'organismes anaérobies. Chez les eucaryotes, elle est principalement située à l'intérieur des peroxysomes. Ces derniers contiennent également des oxydases, génératrices de peroxyde d'hydrogène. Le substrat de cette enzyme est l'eau oxygénée H_2O_2 [49,50-51]. Il représente un système efficace est donc afin d'éviter l'accumulation de peroxyde d'hydrogène résultant de l'activité de SOD et contenir un stress pro-oxydant. La catalase intervient lorsque la concentration en peroxyde d'hydrogène est assez importante car elle possède une faible affinité pour leur substrat, mais une très forte vitesse de réaction, catalysant la réaction [52].

La catalase, qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire, durant le métabolisme basal chez les organismes aérobies, mais aussi pour être stimulée de façon assez claire et rapide par les contaminants générateurs de stress

oxydant. Elle est sensible à certains contaminants inducteurs de stress oxydatifs au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, les PCB, certains pesticides et les métaux, ce qui fait un biomarqueur largement utilisé. Il joue un rôle clé dans la protection des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène, dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée selon les réactions suivantes [49,50,53,54] :



Le stress oxydant se traduit par la formation de nombreuses espèces réactives de l'oxygène potentiellement toxiques dont l'activité CAT nous renseigne sur le degré d'altération de la cellule. Ainsi, cette activité augmente-t-elle aussi bien chez des poissons que chez des bivalves exposés à des polluants organiques. Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress oxydant au laboratoire et surtout *in situ* montrent que le caractère aspécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte [55].

Certaines études ont montré que l'induction des biomarqueurs chez des bivalves témoins ou exposés à des contaminants pouvait avoir une spécificité tissulaire d'expression. Lors d'une étude réalisée pendant une période de 1 an chez la moule *Perna viridis*, il a été démontré que les activités de la CAT et des GST sont plus élevées dans la glande digestive par rapport aux branchies tout au long de l'année. Par contre, chez *Perna perna* les activités de la SOD et des GST sont supérieures dans les blanchies et l'activité de la CAT se révèle plus élevée dans les glandes digestives [56].

1.3.1 Choix du matériel biologique test

Les mollusques, et plus particulièrement les bivalves, sont parfaitement désignés pour être employés comme espèces sentinelles dans la biosurveillance de la pollution. On les considère parmi les organismes qui accumulent le plus de polluants dans l'environnement (un facteur de bioaccumulation de l'ordre de 10^5 a été rapporté dans certains cas chez (*Mytilus edulis*). Les mesures des contaminants chimiques dans les tissus de bivalves fournissent une évaluation de la biodisponibilité. En effet, celles-ci ne

sont pas apparentes dans des compartiments tels que l'eau, les particules en suspension ou le sédiment.

De nombreux travaux ont recommandé l'utilisation particulière des moules comme support biologique pour évaluer l'état de santé des écosystèmes aquatiques. Ces animaux ont été intégrés dans plusieurs programmes de biosurveillance comme le Mussel watch aux USA et le RNO (Réseau National d'Observation) en France [57] [58].

1.3.2 Avantage du modèle moule

En effet, ces bivalves présentent des caractéristiques qui en font d'eux de bons bioindicateurs en raison de [59] :

- Leur large répartition géographique allant des régions tempérées aux régions subarctiques ;
- Leur mode de vie sessile et euryhalin ;
- Leur aptitude d'accumuler présents dans l'environnement avec un facteur de concentration de l'ordre de 10^3 à 10^5 par rapport à l'eau environnante ;
- La stabilité de leur population ;
- Leur tolérance aux divers stress ;
- La possibilité de les transplanter ;
- Vecteur de contamination par leur consommation par l'homme.

1.3.3 Présentation des espèces biologique étude

La moule est un animale aquatique dont le corps est mou, d'où le nom de mollusque enveloppé dans une coquille (bivalve) calcaire. Elle vit en colonies sur les roches auxquels elles se fixent par des filaments qu'elles sécrètent : le byssus. Elles se déplacent en rompant, les fils du byssus se fixent en sécrétant d'autres.

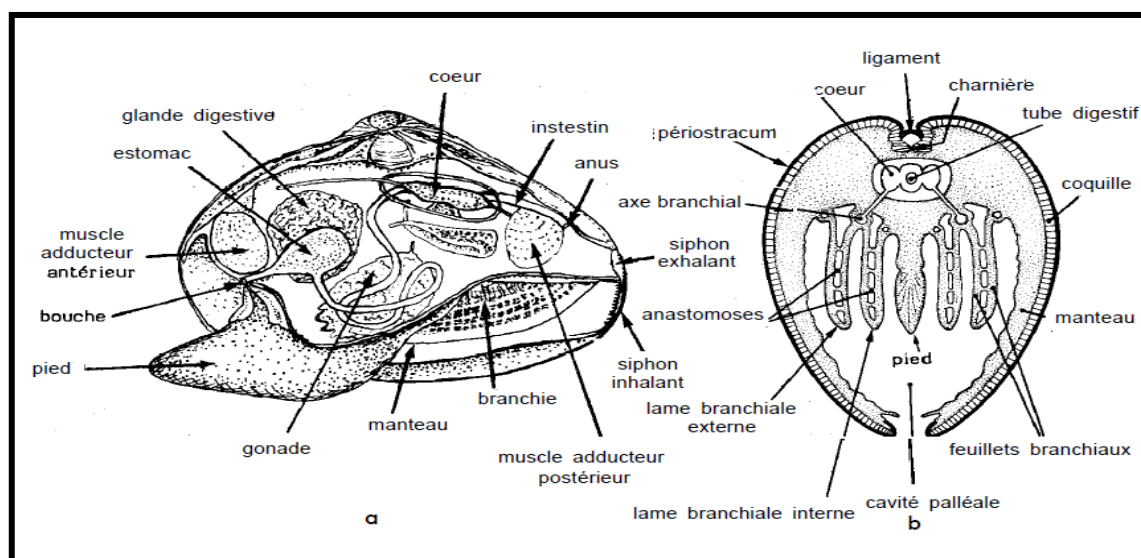
La moule comme la plus part des mollusques bivalves, est un suspensivore, elle consomme les particules en suspension dans l'eau filtrée par ses branchies [60].

La moule ingère la plupart des particules présentes dans le milieu qui l'entoure : diatomées, dinoflagellés détritiques organiques, bactéries, flagellés et protozoaires divers, spores, fragment d'algues, débris inorganique [60].

La moule utilise son appareil branchial pour filtrer les particules en suspension. La collecte des particules en suspension dans l'eau est assurée par les branchies. Une fois captées, ces particules sont dirigées vers les sillons marginaux (jonction des branches directes et réfléchies des filaments branchiaux) ou dorsaux (extrémités des branches réfléchies) et convoyées vers les palpes labiaux et la bouche. La digestion, presque exclusivement intercellulaire, a lieu dans les cellules des tubules digestifs et dans les phagocytes du sang. Les éléments non digérés sont rejetés avec les fèces [61].

Selon Barnabé (1989) [62] la vitesse de filtration est définie par la quantité de l'eau exprimée en litre. Epurée à 100%, par heure, par individu ou par gramme de poids sec.

La moule peut filtrer l'eau pendant 18.5 à 24 heures par jours sans interruption avec une vitesse moyenne de 20 l/h. Cependant, la durée et le temps de filtration varient en fonction des différents paramètres à savoir : la température, salinité, l'oxygène dissous, la concentration et la nature de l'élément en suspension [61].



- a. vue latérale interne après ablation du manteau et de la valve gauche
 b. coupe transversale schématique

Figure 1.1: Anatomie générale d'un mollusque bivalve [63].

1.3.4 Les principaux systèmes de la moule

La moule compte pour sa survie sur six systèmes :

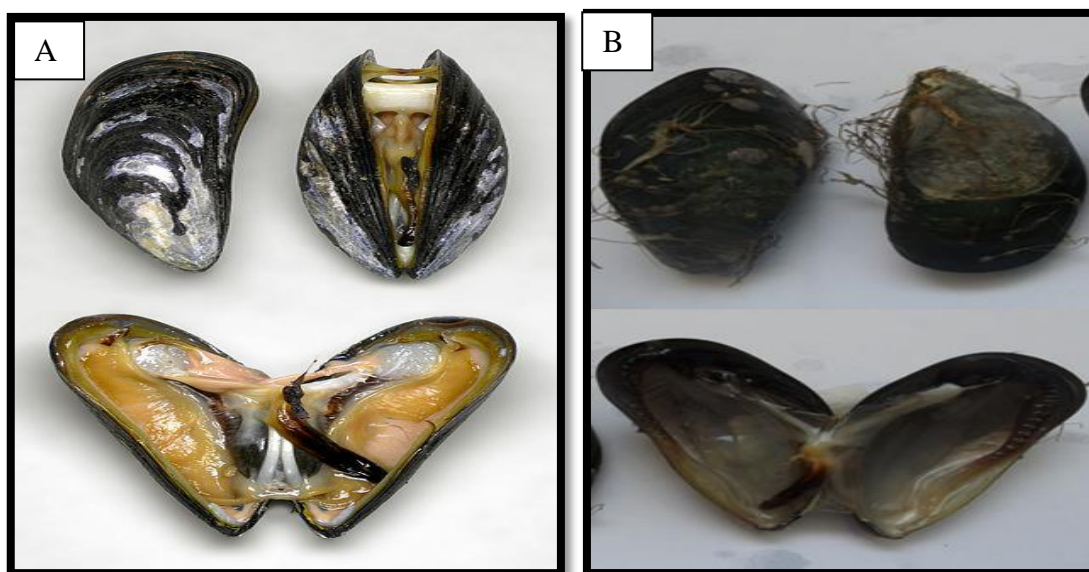
1. **Le système digestif** : Représenté par une bouche située à la partie antérieure du corps et l'œsophage très court, débouche sur l'estomac.
2. **Le système circulaire** : Le cœur, situé sur la face dorsale du corps, comprend deux oreillettes et ventricule : il est entouré d'une mince membrane transparente le péricarde (membrane séreuse, formé de deux feuillets, qui enveloppe le cœur).
3. **Le système excréteur** : Comprend deux reins, disposés de chaque côté du corps entre le péricarde et muscle adducteur postérieur et des glandes péricardiques auriculaires qui sont particulièrement développées chez la moule et entourent les oreillettes.
4. **Le système nerveux** : C'est un système rudimentaire représenté par trois paires de ganglions.
5. **Le système reproducteur** : Chez la moule, la glande génitale ou gonade s'étend de ganglions.
6. **Le système respiratoire** : les branchies ont une double fonction, la respiration et l'alimentation. Tout fois, le manteau participe aussi à la respiration grâce à un échange direct de gaz avec l'eau de l'environnement [61]. la moule respire en extrayant une partie de l'oxygène qui est dissous dans l'eau circulant entre ces lamelles. De nombreux vaisseaux sanguins minuscules y extraient l'oxygéné tout en rejetant les déchets gazeux de CO₂ [64].

1.3.5 Systématiques

La moule *Mytilus galloprovincialis* est classée Selon Lindner [65] et Kornprobest [66], et la moule *Perna perna* comme suit:

Tableau (1.1) : Les principales classifications deux espèces.

	La moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	La moule <i>Perna perna</i>
Règne	Animal	Animal
Sous règne	Métazoaire	Métazoaire
Embranchement	Mollusques	Mollusques
Classe	<i>Bivalvia</i>	<i>Bivalvia</i>
Sous-classe	<i>Lamellibranchia</i>	<i>Lamellibranchia</i>
Ordre	<i>Mytiloidale</i>	<i>Mytiloidale</i>
Superfamille	<i>Mytilacae</i>	<i>Mytilacae</i>
Famille	<i>Mytilidae</i>	<i>Mytilidae</i>
Sous-famille	<i>Mytilinae</i>	<i>Mytilinae</i>
Genre	<i>Mytilus</i>	<i>Perna</i>
Espèce	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Perna(Picta)</i>



A : La moule *Mytilus galloprovincialis*,

B : La moule *Perna perna* .

Figure 1.2 : les deux espèces des moules.

1.3.6 Répartition géographique

L'espèce *Mytilus galloprovincialis* se rencontre sur les côtes Atlantiques du sud de l'Irlande et la Cornouaille, sur les côtes Atlantiques de l'Europe et de l'Afrique du Nord, sur le littoral de la Méditerranée à l'exception du sud de la Méditerranée orientale et sur les côtes de l'Adriatique et de mer noire [67].

Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) moule de Méditerranée ou moule d'Espagne vit surtout en Méditerranée, et sur les cotes Atlantiques.

Perna perna (1780) moule rencontre beaucoup plus sur les cotes congolaises de l'Afrique, sur le littoral de la Méditerranée et sur les cotes d'Afrique du Nord (Tunisie, Maroc...) [68].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

Dans cette partie, nous allons présenter la méthodologie utilisée pour l'étude de la biométrie, les analyses chimiques et biochimiques. En un mot la stratégie expérimentale, les dispositifs et méthodes analytiques sont exposés.

Dans le cadre du programme de gestion des écosystèmes aquatiques et de la surveillance environnementale adopté par le CNRDPA de Bou-Ismaïl, dont l'objectif principal est la contribution à la recherche de biomarqueurs comme réponse précoce et susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de santé des milieux marins, nous nous sommes intéressés à étudier la catalase (CAT) et la protéase autant que réponse biologique chez les deux espèces de moule *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* suite à une exposition aiguë en laboratoire à différentes concentrations de polluants chimiques, à savoir le phénol et les deux colorant vert de malachite et rouge congo.

Les différentes expérimentations ont été conduites et réalisées au centre pilote de conchyliculture de CNRDPA-Bou-Ismaïl (Voir appendice B). Les dosages biochimiques de la protéase, catalase et protéines ont été réalisé au sein du Laboratoire siège d'analyse physico chimique du CNRDPA (Voir appendice B).

2.1 Stratégie, démarche et dispositif expérimental

Dans une Stratégie basée sur l'emploi des moules comme bioindicateurs du niveau de pollution par les contaminants chimiques, une approche utilisant des tests d'écotoxicité à courtes durées a été adoptée au niveau du laboratoire du centre conchylicole du CNRDPA dans des bacs d'élevage (54 x 45 x 30 cm) (Voir appendice B). La stratégie des tests d'écotoxicité aiguë adoptée, fait appel aux moules *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* comme organismes bioindicateurs et le phénol et les colorants chimiques vert de malachite et rouge Congo comme agents polluants.

Une période de deux semaines d'adaptation des moules (acclimatation) dans les conditions expérimentales précède le test de contamination par les différentes

concentrations des différents polluants. L'ensemble des moules est maintenu dans des conditions environnementales identiques, et l'emploi des pompes à air assure l'aération de l'eau des bacs.

Étant dans l'impossibilité de se procurer une alimentation artificielle (micro-algues), un renouvellement quotidien de l'eau d'élevage est effectué pour assurer l'apport en nutriment.

L'acclimatation est une étape cruciale dans la mise en place d'une expérimentation puisqu'elle doit couvrir une période suffisante pour que les organismes s'adaptent aux conditions de laboratoire. Il est généralement admis qu'un maintien au laboratoire durant une période minimale de deux semaines après réception des organismes est nécessaire à l'adaptation de ces derniers au nouvel environnement que constitue le dispositif expérimental [69].

Avant la mise en place de notre dispositif expérimental et afin de s'assurer que les agents chimiques utilisés comme polluants sont seuls le facteur stressant, nous avons essayé de minimiser au maximum les autres facteurs pouvant constituer une source de perturbation ou d'interférence des résultats, nous sommes donc partis de cette valeur et avons :

- Après la collecte des moules, ces dernières sont triées, nettoyées, débarrassées de leur épibiontes, et mesurées à l'aide d'un pied à coulisse avant leur mise en adaptation ;
- choisi des moules appartenant à une même classe de taille de [40-60mm] dans le but de limiter la variabilité des réponses liées aux différences individuelles.
- mesuré les paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage : température, salinité et le pH avant et après le changement d'eau à l'aide d'un multiparamètre.

Dans la première série d'expérience, les individus de moules des deux espèces sont par la suite de l'étape d'acclimatation répartis en quatre groupes de tests. L'ensemble des moules est maintenu dans des conditions environnementales identiques pour une

période de 04 jours comme cycle de contamination et 12 jours comme cycle de décontamination ($0\mu\text{g/l}$ polluants) (**Figure 2.1**). Ainsi, les moules sont exposés pendant 96h à quatre concentrations croissantes ($C1= 0.16\text{mg/l}$, $C2= 0.32\text{mg/l}$, $C3= 0.48\text{mg/l}$ et $C4= 0.64\text{mg/l}$) en polluant organique le phénol. La manipulation est automatiquement comparée à un aquarium témoin (0mg/l polluant).

Les concentrations ($C1= 0.16\text{mg/l}$, $C2= 0.32\text{mg/l}$, $C3= 0.48\text{mg/l}$ et $C4= 0.64\text{mg/l}$) ont été testées en vue d'établir des relations doses-réponses entre les concentrations représentée par le xénobiotique et les réponses biologiques observées chez les moules.

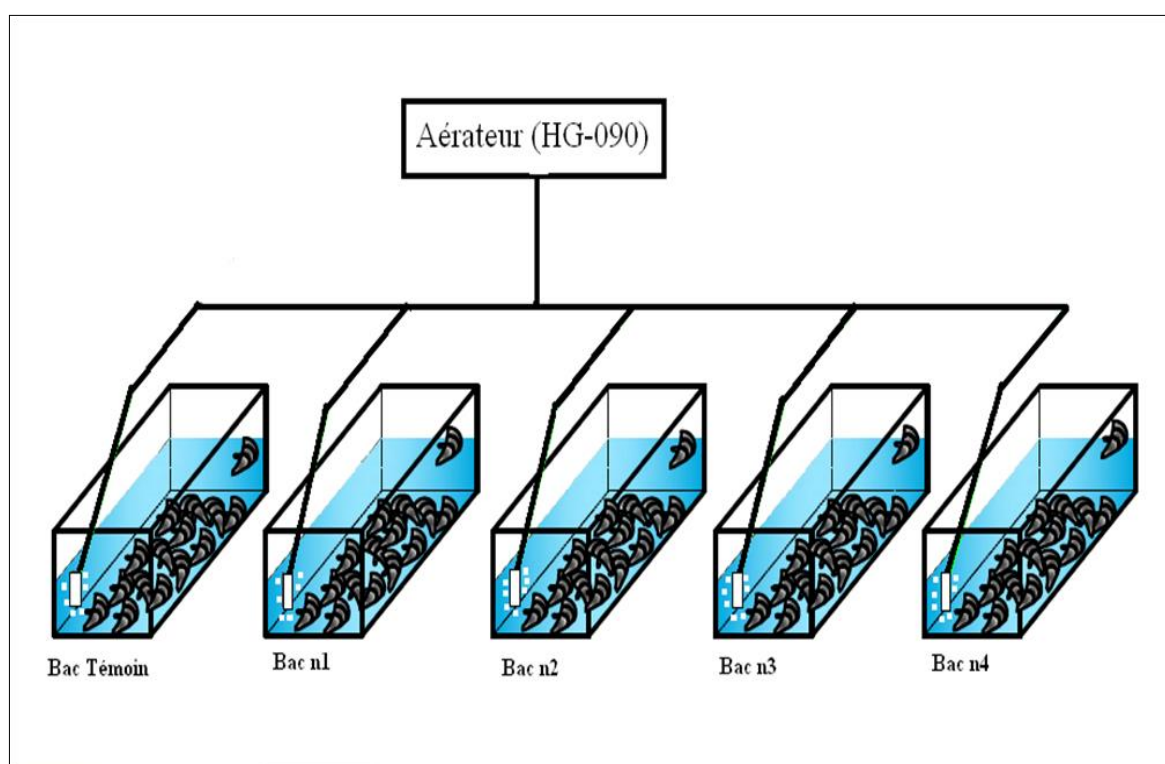


Figure 2.1 : Dispositif expérimental.

Durant le cycle de contamination, les prélèvements de moules sont fait au 4^{ème} jour d'exposition alors qu'en décontamination la récupération est faite tous les quatre jours. 4 à 5 individus de chaque espèce de moules sont prélevées pour faire objet des dosages biochimiques des protéines, de l'enzyme antioxydante la catalase et de l'enzyme digestive la protéase.

Dans la deuxième série d'expérience, seuls les moules de l'espèce *Perna perna*, qui ont été exposées à deux concentrations (0.1 et 0.2 mg/l) des deux colorants chimique,

pendant 72h pour le vert de malachite et 96h pour le rouge congo. La même démarche adoptée dans la première série est reproduite dans cette deuxième partie d'expérience.

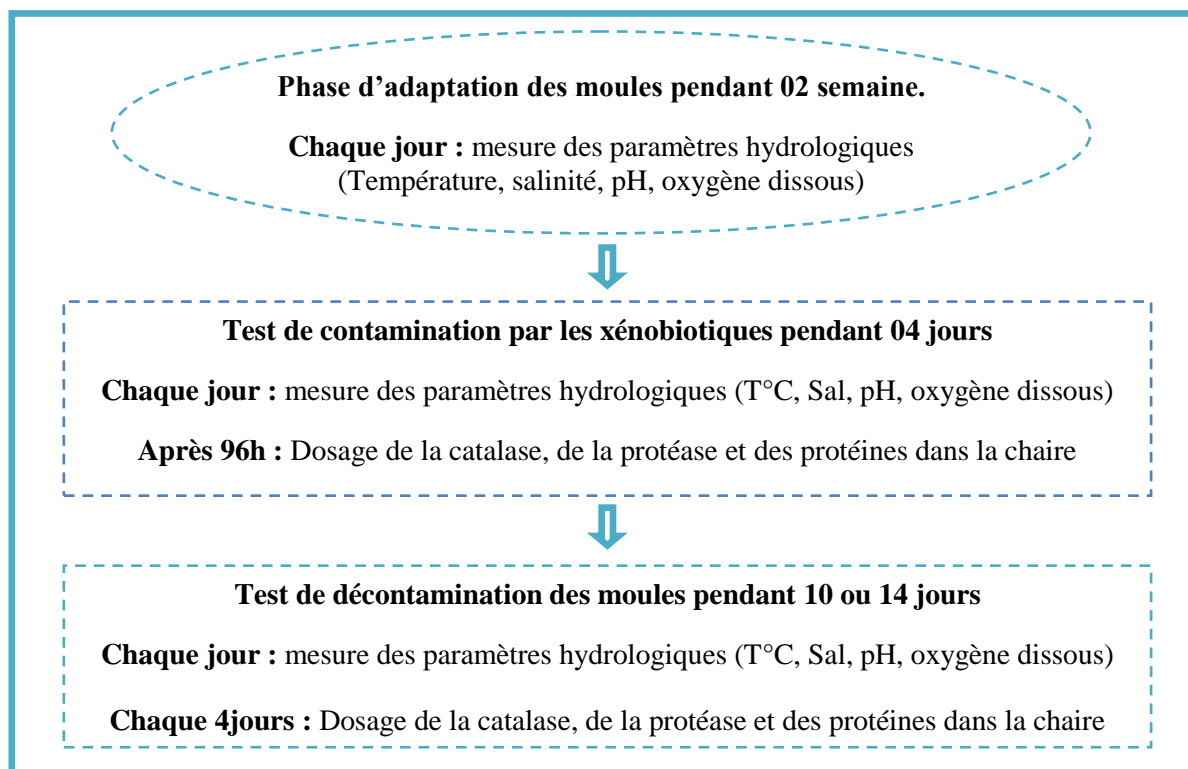


Figure 2.2 : Planning expérimental des tests d'écotoxicité.

2.2 Méthodes et protocoles analytiques

2.2.1 Mesure des paramètres biométriques

Les bivalves sont triés, nettoyés et débarrassés de leurs épibiontes, avant de prendre les différentes mesures de la coquille réalisée à l'aide d'un pied à coulisse de précision 1/10mm. Cette opération est réalisée rapidement afin d'éviter tout stress, phénomène biologique pouvant être à l'origine d'une baisse de poids de la masse molle totale et par la suite de l'indice de condition. Ainsi, les paramètres linéaires (en mm) retenus sont :

- La longueur totale (L : prise suivant l'axe antéro -postérieur)
- La hauteur (h : distance maximale suivant l'axe dorsa-ventral).
- L'épaisseur (l: est la largeur maximale de la convexité des 2 valves réunies)

Chaque individu a été pesé à l'aide d'une balance électronique de précision (0,001g près) pour déterminer les paramètres pondéraux suivants:

- Poids total de l'animal (coquille, masse molle et liquide intervalvaire).
- Poids total de la coquille
- Poids frais total de la chaire : poids de la masse molle humide totale en gramme de l'animal vivant.

Dans une étude de suivi environnemental, les indices de condition (IC) ne sont pas des biomarqueurs au sens strict de la définition mais ils donnent une idée de l'état de santé des individus d'une population et sont simples à réaliser et de faible coût. Ils se calculent par le rapport du poids des tissus mous sur le poids total et sont exprimés en pourcentage (norme AFNOR NF V 45056, septembre 1985).

$$IC (\%) = \left(\text{Poids des tissus mous} / \text{Poids total} \right) * 100$$

2.2.2 Suivi de la mortalité

Avant chaque renouvellement du milieu d'essai, la mortalité est contrôlée dans chaque unité expérimentale pendant la période d'exposition. Une moule est considérée comme morte quand les valves sont ouvertes et ne se ferment pas en réponse à un stimulus tactile [70,71].

Les individus morts sont retirés de l'unité expérimentale et comptabilisés. A la fin de l'essai, il sera calculé la mortalité cumulée pour chaque concentration. Pour la validité de l'essai, il a été fixé la condition qu'il n'y ait pas de mortalité parmi les témoins.

2.2.3 Mesure des paramètres physicochimiques

Les différents paramètres physicochimiques de l'eau (oxygène dissous, température, pH et salinité) ont été suivis quotidiennement, avant et après chaque renouvellement de l'eau des bacs, au moyen d'un Multi-paramètre.

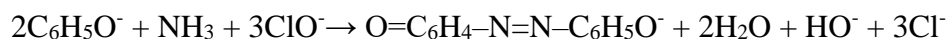
2.2.4 Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée

Pour la deuxième série d'expérience uniquement, environ 500ml sont prélevées chaque jours de chaque bac pour être par la suite filtrées en utilisant une rampe de filtration avec des filtres ordinaires. Le filtrat ainsi récupéré est destiné au dosage du phosphore et des différentes formes d'azote dissous.

❖ **Dosage de l'azote ammoniacal par la méthode au bleu d'indophénol** [72].

▪ Principe

La méthode décrite mesure la totalité de l'azote ammoniacal, soit $N-NH_3 + N-NH_4^+$, symbolisé par $N-NH_{3,4}$. Il s'agit de la méthode de Koroleff (1969) qui est simple et qui offre une bonne précision ainsi qu'une bonne sensibilité.



Dans un premier temps, l'ammoniac forme une monochloramine avec l'hypochlorite en milieu légèrement basique. Cette dernière réagit avec le phénol en présence d'un excès d'hypochlorite pour former le bleu d'indophénol absorbant à 630 nm.

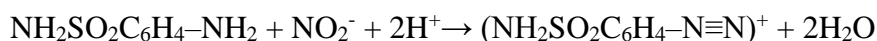
▪ Mode opératoire

03ml du réactif (A), solution de phénol-nitroprussiate (Voir appendice C), sont additionnés à 100ml du filtrat récupéré. Directement après homogénéisation, 03ml du réactif (B) solution alcaline d'hypochlorite (Voir appendice C) sont ajoutés au mélange. L'échantillon final homogénéisé est placé à l'obscurité pendant une nuit à température ambiante. Ainsi l'absorbance est mesuré à 630nm. Dans le blanc l'eau distillée remplace les 100ml du filtrat.

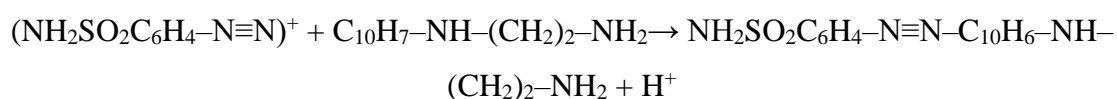
❖ **Dosage de l'azote nitreux [72].**

▪ Principe

Les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfanilamide en milieu acide ($\text{pH} < 2$) selon la réaction :



Puis le diazoïque réagit avec le N-naphtyl-éthylènediamine pour former le colorant :



Le colorant rose absorbe à la longueur d'onde de 543 nm.

▪ Mode opératoire

01ml de réactif (C), solution de sulfanilamide (Voir appendice C), est ajouté à 50ml de filtrat. Après homogénéisation, on laisse reposer 02 à 08 minutes et on ajoute 01ml de réactif (D) solution de n-naphtyl-éthylènediamine (Voir appendice C) au mélange. Après au moins 10 minutes (sans dépasser les 02h) de repos la lecture de l'absorbance des échantillons est faite à 543nm.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 50ml du filtrat.

❖ **Dosage de l'azote nitrique [72].**

▪ Principe

La méthode retenue quasi universellement est celle fondée sur le dosage des ions NO_2^- obtenus par réduction quantitative ($> 95\%$) des ions NO_3^- . On mesure donc en réalité la somme des concentrations des ions NO_2^- et NO_3^- . Par déduction de la concentration en nitrites, déterminée sans réduction, on obtient la concentration en nitrates.

La réduction est effectuée par passage de l'échantillon sur une colonne de cadmium traité au cuivre.

- Mode opératoire

02ml de la solution concentrée de chlorure d'ammonium (Voir appendice C), est additionné à 100ml de filtrat, le tout est versé dans une colonne réductrice en cadmium traité par le cuivre. Les premiers 50ml sont rejetés et le reste est récupéré afin de le traité de la même façon que le cas des nitrites.

- ❖ **Dosage du phosphore** [72].

- Principe

Les ions phosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium, en présence d'antimoine(III), pour former un complexe que l'on réduit par l'acide ascorbique ; cette forme réduite, de coloration bleue, a un maximum d'absorption à 885 nm. Ce composé bleu contient le phosphore. Les polyphosphates et le phosphore organique ne sont pas dosés par cette méthode.

- Mode opératoire

10ml du mélange-réactif phosphore (Voir appendice C), préparé à chaque série d'analyses, sont ajoutés à 100ml de filtrat et on homogénéise aussitôt. Après 05minutes de repos la lecture de l'absorbance des échantillons est faite à 885nm.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 100ml du filtrat.

2.2.5 Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses biochimiques

Les dosages biochimiques relatifs aux suivis des biomarqueurs Catalase (enzyme de défense antioxydante) et Protéase (enzyme digestive), ainsi que le dosage des protéines nécessitent que les tissus biologiques (chaire des moules) fassent l'objet préalable d'une homogénéisation et d'un fractionnement subcellulaire (**Figure 2.3**). L'ensemble de ces procédures se déroulent dans des tampons adaptés. Le tampon dans lequel on homogénéisera devra avoir les propriétés physicochimiques permettant de maintenir la stabilité des molécules ou organites qu'on désire étudier. On devra apporter une attention particulière à sa composition et à son pH surtout.

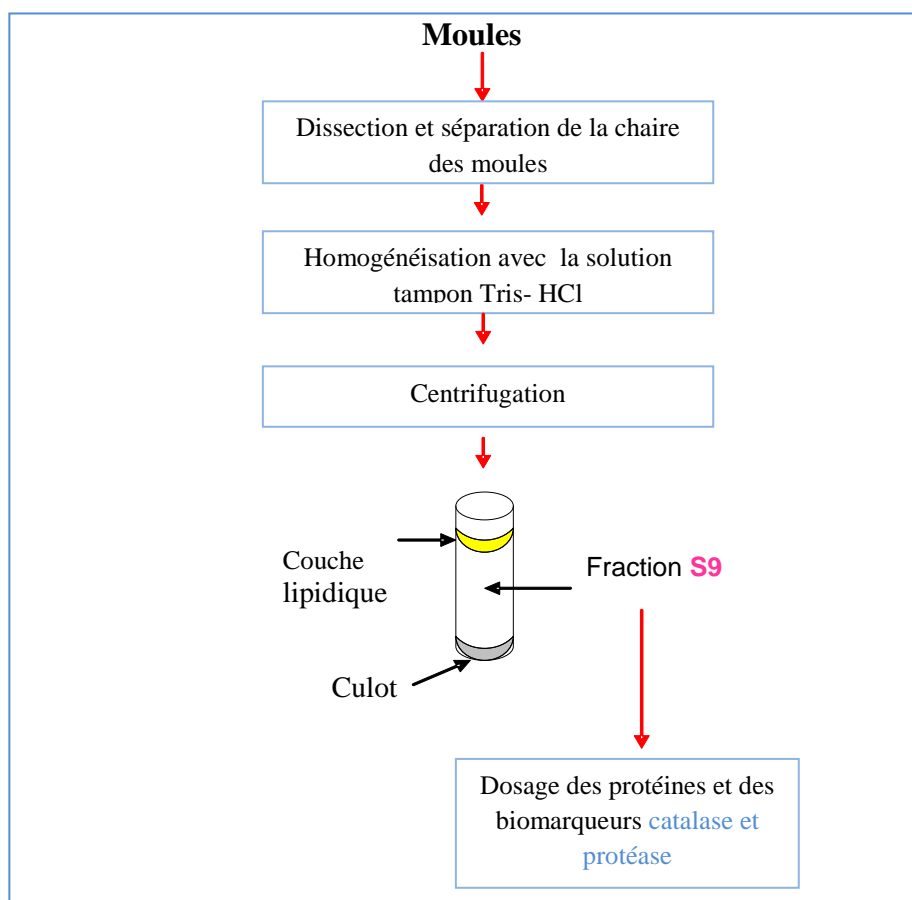


Figure 2.3 : Procédures expérimentales des dosages biochimiques.

❖ Homogénéisation des tissus

Les tissus sont homogénéisés à raison de (1/10 P/V) dans le tampon Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane) (20mM ; pH7,8) en utilisant un mixeur déchiqueteur.

La centrifugation de l'homogénat est faite à 10 000g pendant 20min à 10°C. Le surnageant ainsi obtenu (Fraction S9) est utilisé pour doser, les protéines, la catalase et la protéase.

2.2.6 Dosages des protéines par la méthode de Lowry [73]

▪ Principe

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des techniques spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines.

La méthode développée par Lowry *et al* [73] combine une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. Cette méthode a été tellement utilisée que l'article original de Lowry est un des articles scientifiques les plus cités au monde.

- Mode opératoire

Dans des tubes à essais, les prises d'échantillons de la fraction S9 (surnageant) sont diluées au 1/5 et 1/10 et complétées à 1 ml avec de l'eau distillée. Le tube de blanc contient 01ml d'eau distillée.

05ml de réactif Lowry (Voir appendice C) sont ajoutés à chaque tube. On homogénéise et on attend 10min.

Par la suite, 0.5ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué extemporanément au 1/2 est additionné au mélange (il est important d'agiter juste après l'addition de ce dernier). L'ensemble est mis au repos à l'obscurité au moins 30min. Ainsi la lecture de l'absorbance est faite à 660nm.

La gamme d'étalonnage est réalisée à partir de la solution de sérum albumine bovine (SAB) étalon mère à 7,6%. Les étalons filles sont ainsi obtenus par dilution de la solution mère.

2.2.7 Dosages de la Catalase par mode Cinétique

- Principe

L'activité enzymatique est une mesure de la quantité d'enzyme active dans une préparation. L'unité d'activité enzymatique (U) est définie en terme de quantité de substrat disparaissant par unité de temps ou de quantité de produit apparaissant par unité de temps.

L'approche cinétique consiste à suivre en continu la quantité du composé voulu. La méthode typique consiste donc à mélanger les réactifs et la préparation enzymatique dans une cuvette de spectrophotomètre puis à suivre la variation temporelle du paramètre mesuré (Voir absorbance C).

Dans notre pratique l'activité catalase est déterminée selon la méthode de Lartillot décrite par Gülüzar *et al* [74].

- Mode opératoire

Dans notre pratique, 2.5ml du substrat (100µl solution de H₂O₂ à 30% ; 2.4ml tampon phosphate 75mM à pH7) sont placés dans une cuvette du spectrophotomètre déjà réglée sur le mode cinétique. (Voir appendice C)

50µl de la fraction S9 (source d'enzyme) sont ajoutés au mélange, ainsi on déclenche le mode cinétique du spectrophotomètre et on suit la décomposition de peroxyde d'hydrogène dans un intervalle de temps de 60s. (Voir appendice C)

2.2.8 Dosage de la protéase

- Principe

L'approche du dosage de la protéase souvent utilisée est celle à temps fixe. Elle consiste essentiellement à mélanger les composants de la réaction et à incuber durant un certain temps. A la fin de l'incubation (généralement de 30min à 02h), on prélève des échantillons. On y mesurera alors la quantité des sous-produits issus de la dégradation du substrat (dans le cas de protéases la tyrosine est le sous-produit issu de la dégradation de la caséine).

- Mode opératoire

Le dosage de l'activité protéase est déterminé selon la méthode décrite par Ranilson *et al* [75].

02ml de la solution de caséine (01% P/V dans le Tris-HCl pH7.2) utilisée comme substrat est incubée avec 02ml de surnageant (source d'enzyme **S9**), préalablement dilué à différentes rations, à une température de 50°C pendant 01heure.

La réaction est stoppée en ajoutant 01ml du TCA à 10% (Acide trichloroacétique). On laisse reposer pendant 15 min et on effectuera une deuxième centrifugation à 6000g pendant 15min. La lecture de l'absorbance est faite à 280nm.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 02ml du **S9**.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats de mesure des paramètres physicochimiques

Les eaux marines possèdent un ensemble de caractères physico-chimiques relativement stables dont les principaux sont la température, la salinité, l'oxygène dissous et le pH. Ces facteurs deviennent des marqueurs importants de l'influence continentale anthropique dans le cas des mélanges des eaux de mer avec les eaux des rejets industriels.

Les différents résultats des mesures de la température, salinité, conductivité et le pH sont regroupés dans les tableaux 3.1 et 3.2 ci-dessous :

Tableaux 3.1 : Résultats des paramètres physicochimiques du test d'exposition des moules au phénol.

Bac	T (°C)	Salinité (‰)	pH	Conductivité (mS.cm ⁻¹)
Témoin	25	35,125 ± 0,189	8,62 ± 0,100	53,675 ± 0,15
C ₁ = 0,16mg.l ⁻¹	25	35,225 ± 0,125	8,6 ± 0,15	53,77 ± 0,15
C ₂ = 0,32mg.l ⁻¹	25	35,275 ± 0,09	8,612 ± 0,1	53,85 ± 0,129
C ₃ = 0,48mg.l ⁻¹	25	35,35 ± 0,129	8,625 ± 0,13	53,95 ± 0,17
C ₄ = 0,64mg.l ⁻¹	25	35,35 ± 0,129	8,63 ± 0,128	54 ± 0,16

Tableaux 3.2 : Résultats des paramètres physicochimiques du test d'exposition des moules aux deux colorants chimiques.

Bac	T (°C)	Salinité (‰)	pH	Conductivité (mS.cm ⁻¹)
Témoin	25,6 ± 0,42	37,05 ± 0,05	7,79 ± 0,398	55,5 ± 0,15
[R C] = 0,1mg.l ⁻¹	25,533 ± 0,377	37 ± 0	7,838 ± 0,421	55,49 ± 0,045
[R C] = 0,2mg.l ⁻¹	25,533 ± 0,377	37 ± 0,121	8,041 ± 0,148	55,56 ± 0,23
[V M] = 0,1mg.l ⁻¹	25,6 ± 0,42	37,066 ± 0,047	8,028 ± 0,07	56,12 ± 0,02
[V M] = 0,2mg.l ⁻¹	25,533 ± 0,377	37,066 ± 0,047	8,031 ± 0,084	55,96 ± 0,33

D'après les deux tableaux 3.1 et 3.2 nous constatons que :

3.1.1 Température

La variation de la température (Moyenne = 25°C) est presque la même dans tous les bacs expérimentaux et dans l'intervalle de tolérance des spécimens pendant toute la période d'étude. De fait, les températures mesurées dans les bacs de contamination des moules ne présente pas un stress naturel pouvant perturber le métabolisme et l'activité physiologique des moules.

Selon Amiard *et al* [48], la variation de température influe considérablement sur les activités des enzymes digestives des invertébrés. L'observation chez un copépode (*calanus sinicus*) montrait une corrélation négative entre les degrés d'activités protéase ou amylase et la température.

Khessiba *et al* [49], Dans leurs travaux, ont observé une corrélation positive entre l'activité anti-oxydante catalase, mesurée chez les moules témoin (*Mytilus galloprovincialis*), et les paramètres environnementaux tel que la température, la salinité et la photopériode.

Aussi, Pellerin-Massicotte [76] a signalé que, chez la moule bleue, *Mytilus edulis*, une augmentation de l'activité anti-oxydante catalase a été associée à l'augmentation des peroxydations lipidiques lorsque les températures sont plus élevées. En plus, il a été remarqué que l'augmentation de la température, induit l'augmentation de la teneur en protéines chez les mollusques bivalves tels que les moules et les huîtres [77].

3.1.2. Salinité

Les valeurs de salinité (Maximum de 37‰), mesurées durant tous les tests expérimentaux, restaient toujours dans l'intervalle de tolérances physiologiques des deux espèces de moule *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* qui est entre 19 à 44‰.

Choi *et al.* [78] Ont conclu que les deux enzymes étudiées (la glutathion peroxydase et glutathion-S-transférase) jouaient un rôle important dans la détoxification des ROS, et donc ceux-ci pourraient servir des indicateurs des réponses de stress oxydatif aux changements de salinité dans l'olive flet *olivaceus Paralichthy*.

3.1.3. pH

Il est connu que les différentes activités biologiques y compris les réponses enzymatiques des biomarqueurs sont étroitement influencées par le pH qui est un facteur déterminant. Dans notre pratique, les mesures de pH sont presque identiques dans chaque bac ce qui n'influe pas sur les réponses biologique des moules traduite par les biomarqueurs catalase et protéase. Les valeurs relevées étaient optimales pour la croissance des deux espèces de moules de la présente étude et exclue l'effet gênant ou stressant du pH sur les individus contaminés.

Comme conclusion des paramètres physico-chimiques, les stress pouvant exercer ces derniers ne sont pas probables à exister, l'unique stress altérant les moules est bien les agents chimiques phénol et colorants comme xénobiotique.

3.2. Résultat de l'étude de l'effet des colorants chimiques sur l'excrétion Azotée et Phosphorée (eau d'élevage)

3.2.1. Azote Ammoniacal

Les résultats relatifs à l'évolution de l'azote ammoniacal excrété pendant la durée d'exposition des moules *Perna perna*, en présence du : rouge congo et vert malachite oxalate sont représentés par les figures 3.1 et 3.2

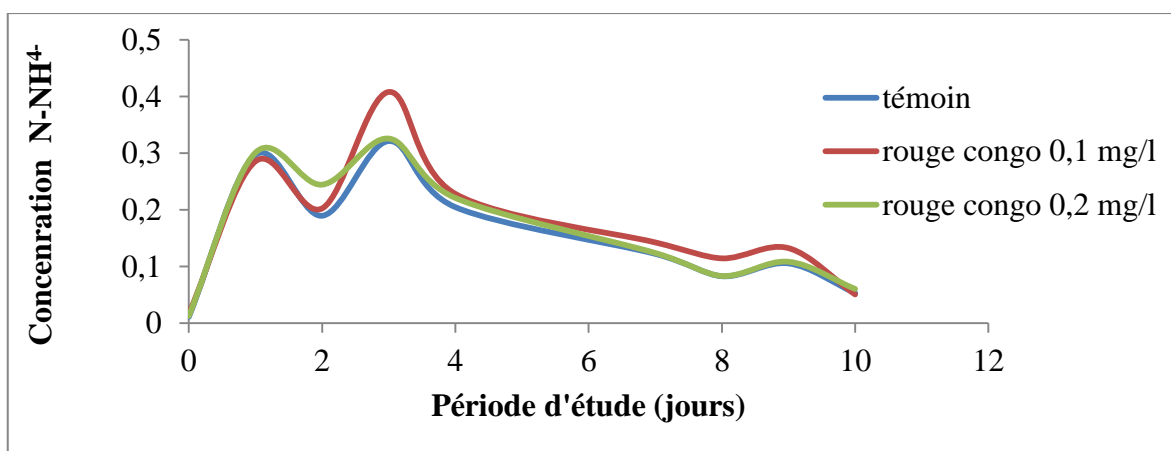


Figure 3.1 : Etude de l'effet du rouge congo sur les teneurs en azote ammoniacal en fonction de la période d'études.

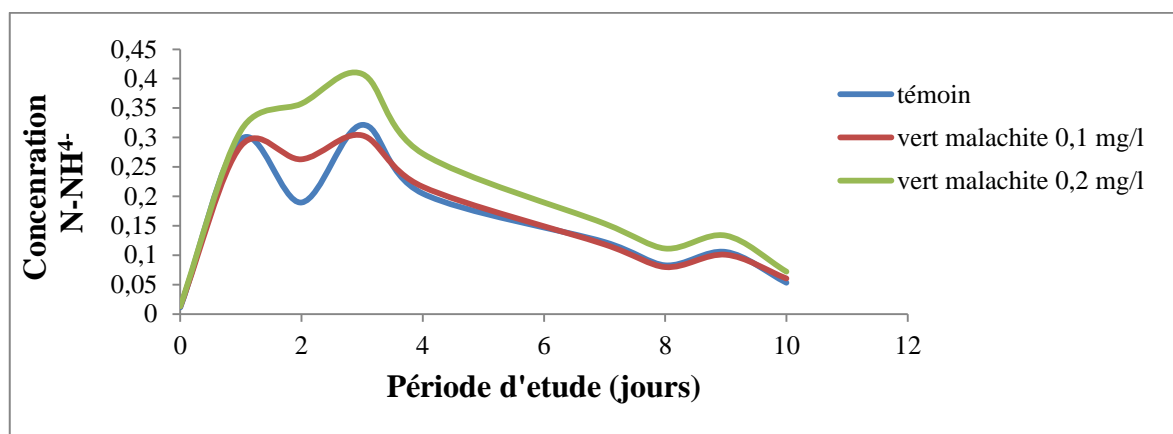


Figure 3.2 : Etude de l'effet du vert malachite oxalate sur les teneurs en azote ammoniacal en fonction de la période d'études.

D'après Les deux figures 3.1 et 3.2, les effets de l'exposition à la verte malachite oxalate et rouge congo sur l'excrétion d'azote ammoniacal sont variables selon les concentrations du xénobiotiques et la période d'études. Une légère augmentation des teneurs ammoniacales est mesurée chez les spécimens contaminés comparativement aux individus témoins.

Par ailleurs, une tendance de diminution de l'excrétion ammoniacale est observée chez l'ensemble des groupes de test à partir du 3^{ème} jour jusqu'au fin de cycle de décontamination.

3.2.2. Nitrites

Les variations des teneurs en nitrites en fonction des concentrations du vert malachite oxalate et rouge congo sont graphiquement indiquées les figures 3.3, 3.4

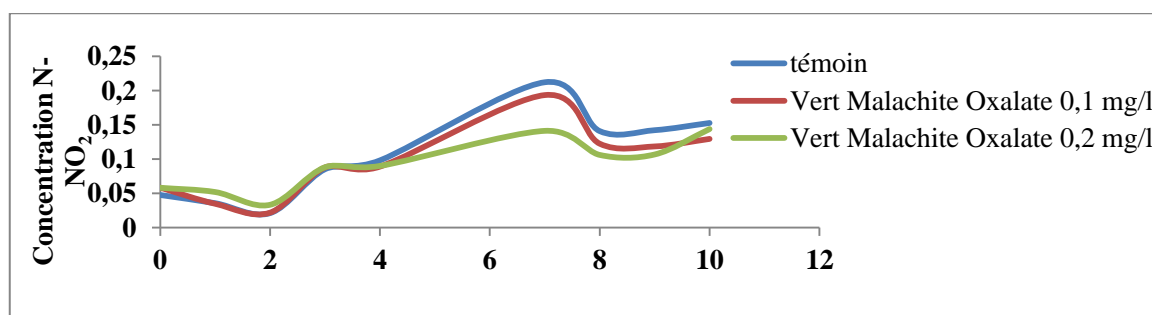


Figure 3.3 : Etude de l'effet du vert malachite oxalate sur les teneurs en nitrites en fonction de la période d'études.

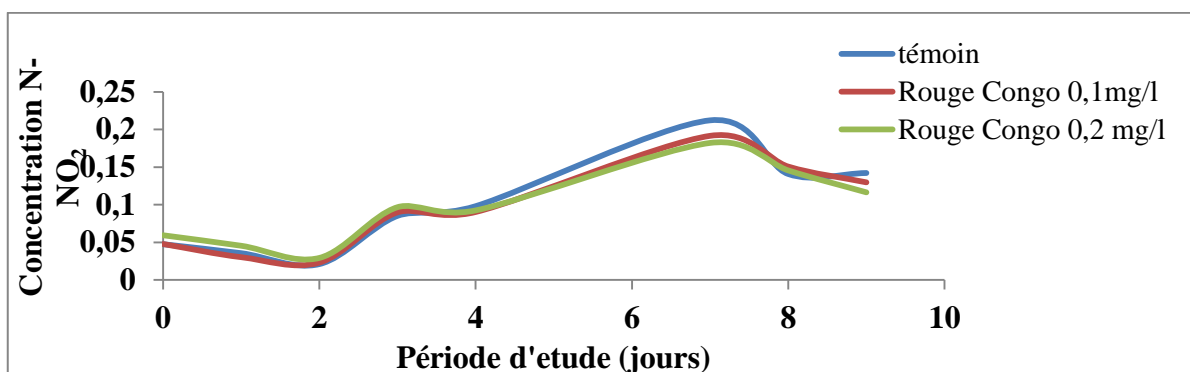


Figure 3.4 : Etude de l'effet du rouge congo sur les teneurs en nitrites en fonction de la période d'études.

D'après les figures ci-dessus, nous remarquons que les effets de l'exposition aux colorants sur les teneurs en nitrite sont variables selon les concentrations et la durée d'exposition et varient entre déplétion, augmentation ou sans effets remarquables.

La différenciation entre les teneurs mesurées en nitrite n'est observée qu'après le 4^{ème} jour d'exposition dont on mesurait une diminution des teneurs chez les individus contaminés comparativement aux témoins et ceci pour les deux colorants appliqués. Cependant, la tendance générale était vers une augmentation des teneuses en nitrite pour l'ensemble des groupes de test ce qui rend l'interprétation des résultats difficile.

3.2.3. Nitrates

Les variations des teneurs des nitrates en fonction des concentrations des colorants sont représentées dans Les figures 3.5, 3.6

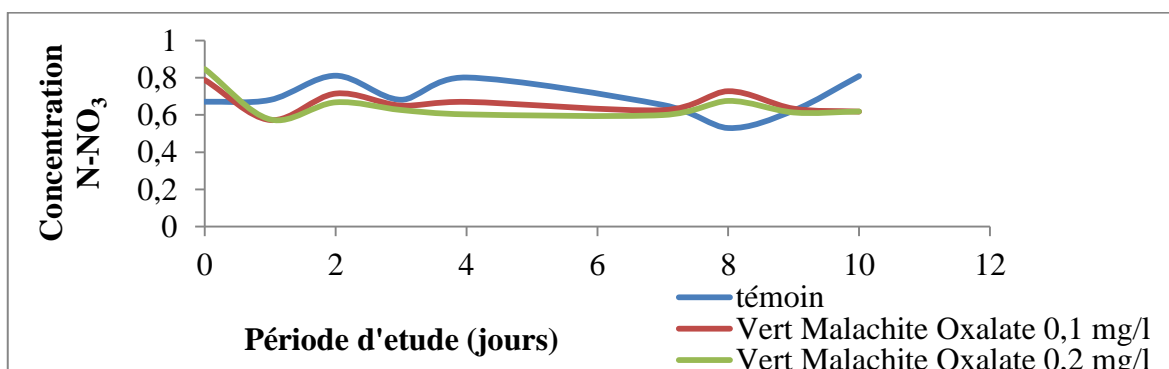


Figure 3.5 : Etude de l'effet du vert malachite oxalate sur les teneurs en nitrates en fonction de la période d'études.

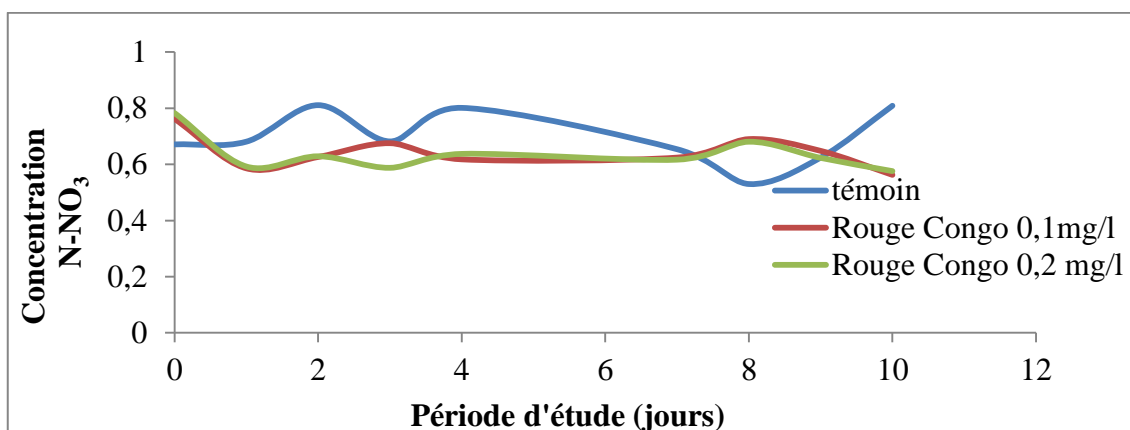


Figure 3.6 : Etude de l'effet du rouge congo sur les teneurs en nitrates en fonction de la période d'études.

Les teneurs en nitrates mesurées dans les bacs de contamination avaient une allure proches de celle mesurée dans le bac témoin. Les concentrations appliquées ne semblent pas avoir d'effets notables sur l'excrétion des nitrates.

Toute fois, il est à noter que l'excrétion des composés azotés est fortement influencées par les facteurs abiotiques plus particulièrement la température. Ainsi, Novas *et al.*, (2007) dans leurs études ont signalé des fortes productions des composés azotés en été qu'en hiver sous l'effet d'exposition des moules *Mytilus galloprovincialis* aux composés organiques HAP. D'autres paramètres comme l'état physiologique, le stress... entrent en ligne de compte et peuvent aussi influencer l'activité métabolique [79].

3.2.4. Excrétion Phosphorées

Les résultats relatifs à l'évolution du phosphores excrétés par les moules *P. perna* dans les milieux expérimentaux sont représentés par les figures 3.7et 3.8.

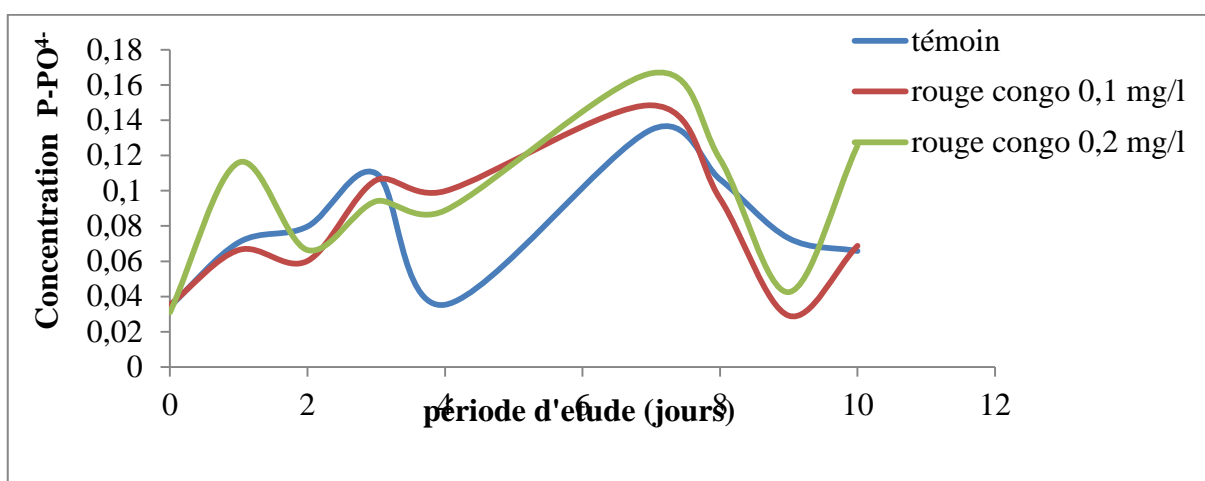


Figure 3.7 : Etude de l'effet du rouge congo sur les teneurs en phosphore en fonction de la Période d'études.

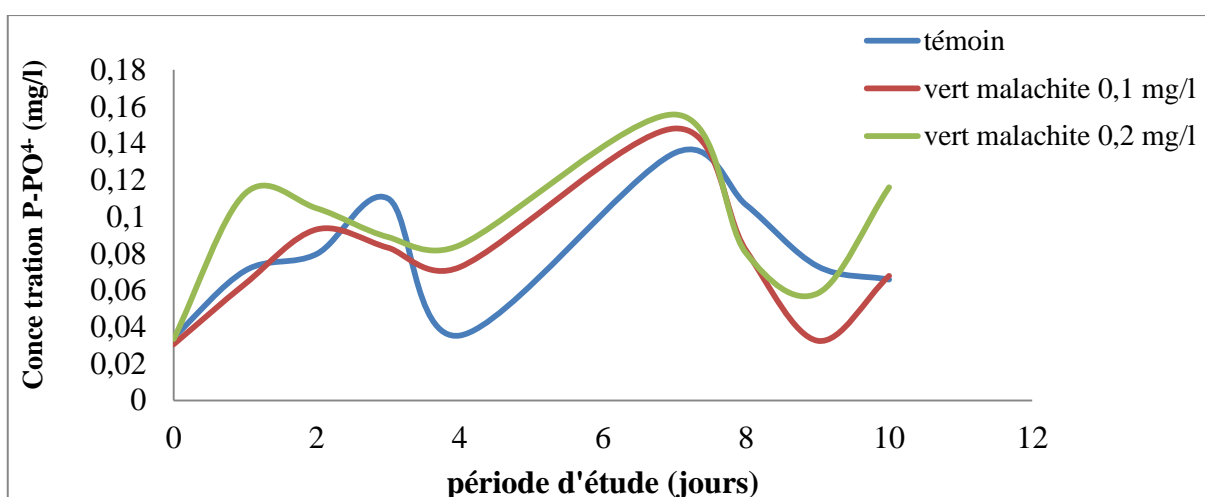


Figure 3.8 : Etude de l'effet du vert malachite oxalate sur les teneurs en phosphore en fonction de la Période d'études.

Comme le montre les figures ci-dessus, l'excrétion phosphorée des spécimens tests varie avec les concentrations du colorant auxquels ils étaient exposés. Ainsi, la tendance générale est vers une augmentation de l'excrétion phosphorée chez les individus contaminés comparativement aux spécimens témoins.

3.3. Résultats des dosages biochimiques

A : 1^{ère} série d'expérience - Exposition au phénol

3.3.A.1. Variations des concentrations en protéines au niveau de la chair

Les différents résultats relatifs aux dosages des protéines aux niveaux de la chair des deux espèces tests de moules *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* sont représentés par les figures ci-dessous.

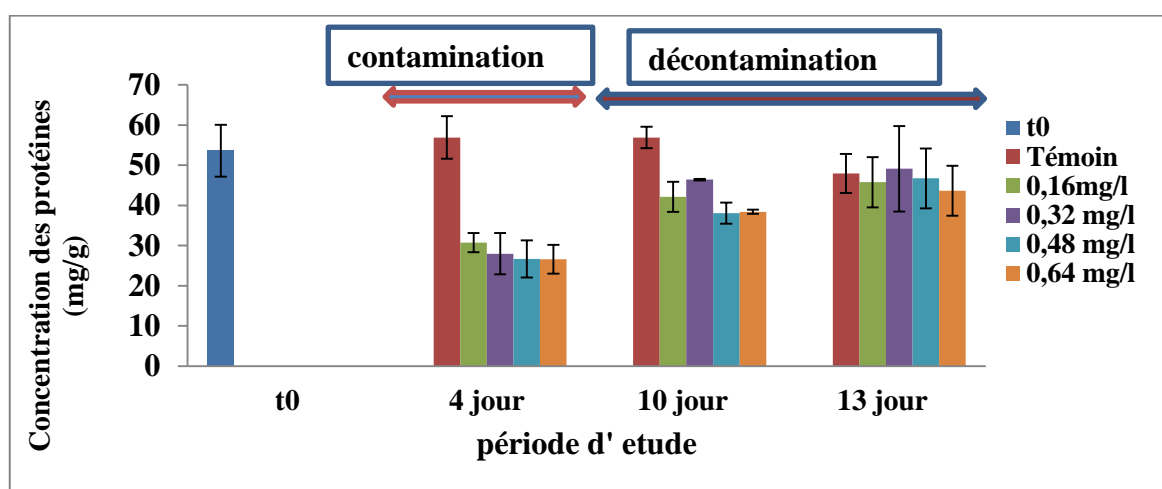


Figure 3.9 : Résultats du dosage des protéines des moules *Perna perna* exposées au phénol.

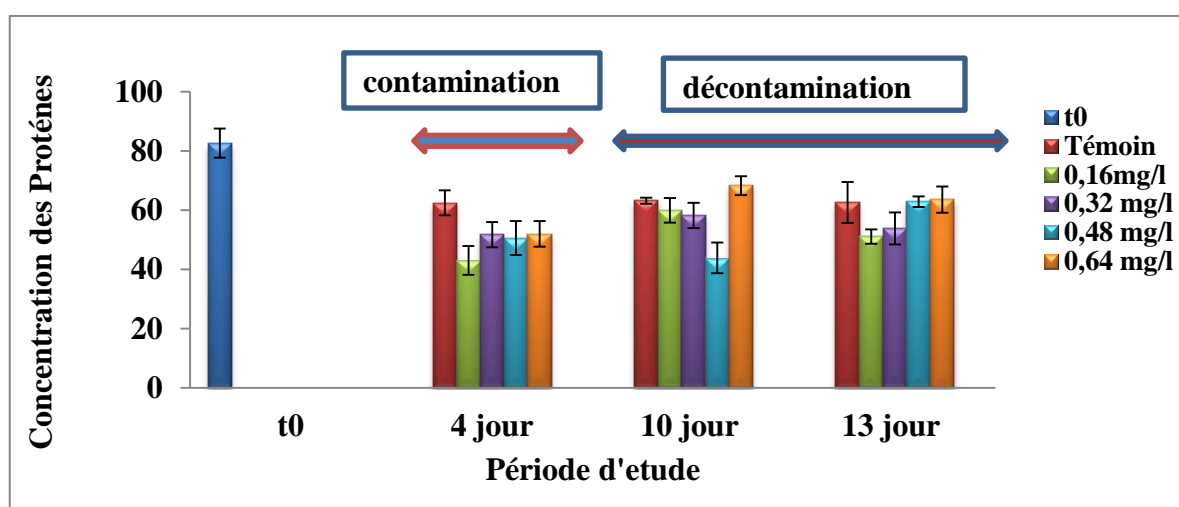


Figure 3.10 : Résultats du dosage des protéines des moules *Mytilus galloprovincialis* exposées au phénol.

❖ *Cycle de contamination*

D'après la (figure 3.9), un effet d'exposition des moules *Perna perna* au phénol sur les réserves énergétiques est perçu. Une déplétion des teneurs en protéines est produite après 96h suite à l'exposition aux différentes concentrations du phénol. Cette diminution est considérable pour toutes les concentrations examinées par rapport au témoin.

Dans le cas de l'exposition des moules *Mytilus galloprovincialis* aux différentes concentrations de phénol (figure 3.10), la diminution des teneurs en protéines enregistrée (42.99 ± 4.89 , 51.74 ± 4.25 , 50.599 ± 5.73 , 51.94 ± 4.31 mg/g de chair) était moins importante comparativement au témoin (62.44 ± 4.19 mg/g de chair). Il en résulte que l'espèce *Perna perna* est plus sensible à la mobilisation des réserves protéique après 96h d'exposition et ceci comparativement à l'espèce *Mytilus galloprovincialis*.

De nombreux stress (physiques et/ou chimiques) peuvent entraîner la mobilisation des réserves énergétiques (glycogène, lipides, protéines) [80,81]. D'une manière générale, la réponse est vers une diminution des réserves énergétiques suite à l'exposition en laboratoire où *in situ* à différents types de contaminants. Cette réponse est mesurable après quelques heures ou jours d'exposition. Cependant, la mobilisation de l'un ou l'autre des constituants de réserves est fonction du type de contaminant [80].

❖ *Cycle de décontamination*

Une reprise des réserves protéiques est observée chez les deux espèces de moules précédemment exposés au phénol, et ceci à la suite d'un séjour de 06 jours en détoxification. Après 09 jours de décontamination (fin de cycle 13^{ème} jour), les teneurs protéiques mesurées chez les individus ex-contaminés se rapprochaient à celles mesurées chez les témoins pour les deux espèces test. La reprise des réserves protéiques chez l'espèce *Mytilus* était plus rapide à celle relevée chez l'espèce *Perna*.

Selon Mosleh *et al.*, (2007) la déplétion des protéines est une réponse de défense précoce face à un stress chimique. Ainsi, la déplétion des teneurs en protéines peut être attribuée au catabolisme des protéines comme réponse à la demande énergétique. Pour surmonter la situation de stress les organismes ont besoin d'une grande énergie et cette

demande peut induire le catabolisme protéique, de plus la diminution des teneurs protéiques peut être due à la formation de lipoprotéines qui seront utilisées pour la réparation des dommages au niveau des cellules, des tissus et des organes.

En conclusion des tests d'écotoxicité de la présente étude, les réserves protéiques étaient diminuées d'une façon plus au moins importante selon les concentrations testées et l'espèce considérée. Cependant, pour connaître l'effet du phénol sur les atteintes des réserves énergétiques, d'autres paramètres doivent être pris en considération. Ces résultats doivent être complétés par des mesures des teneurs du glucose et des lipides afin de mieux expliquer les variations des réserves énergétiques.

Outre les variations liées à l'exposition à des toxiques, la variabilité des concentrations en réserves énergétiques des organismes est fonction de nombreux facteurs biotiques et abiotiques [02, 80, 82]. Il n'est donc pas étonnant que l'utilisation des réserves énergétiques en tant que biomarqueur strict de pollution soit toujours discutée [80].

3.3.A.2. Résultats de dosage de l'activité catalase

Plusieurs travaux relatent l'utilisation de la catalase comme biomarqueur de défense traduisant l'état de santé des organismes indicateurs [38-83].

En effet, de nombreuses recherches réalisées *in vivo* et *in vitro* ou *in situ*, optent pour l'utilisation de la catalase comme réponse précoce dans l'évaluation de l'état de santé des écosystèmes aquatiques [36-84].

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) chez les deux espèces de moules *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis*, dans les différents milieux d'élevages contaminés par le phénol à différentes concentrations, sont représentés dans les figures ci-dessous.

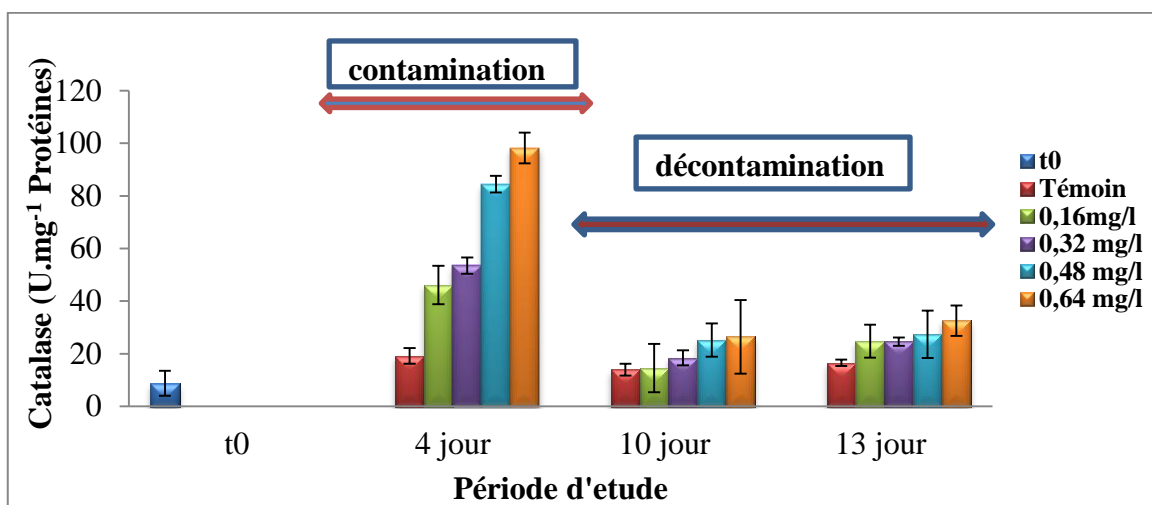


Figure 3.11 : Variation des activités catalase des moules *Perna perna* exposées au phénol.

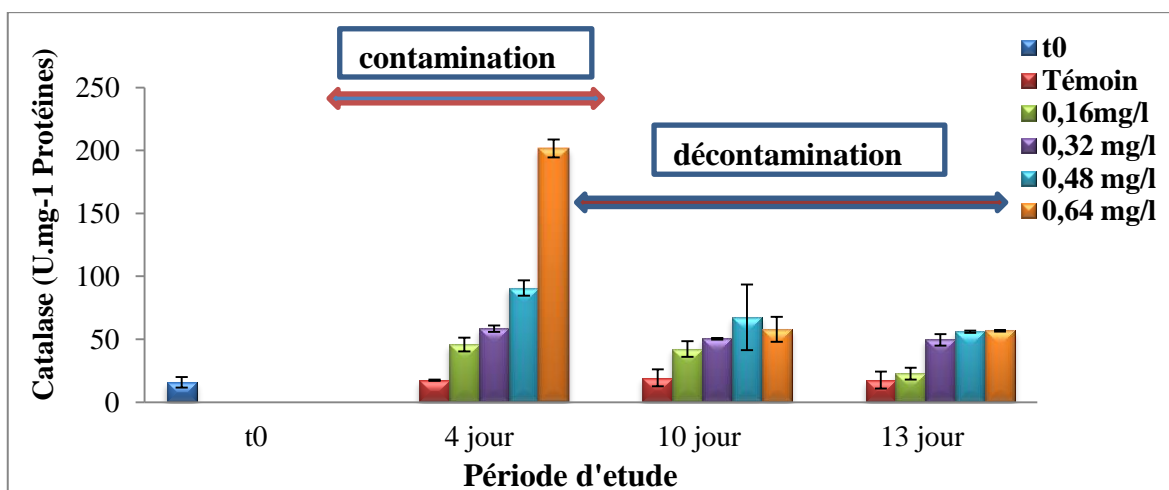


Figure 3.12 : Variation des activités catalase des moules *Mytilus galloprovincialis* exposées au phénol.

❖ Cycle de contamination

D'après les figures (3.13 et 3.14), les observations suivantes peuvent être perçues:

En générale, les activités catalase (CAT) mesurées chez individus témoins ont montré une très faible variation le long du cycle expérimental. Ainsi, l'adaptation des moules aux conditions expérimentales paraît parfaite et aucun effet du milieu d'élevage sur les réponses biologique de la moule n'est donc probable.

Par ailleurs, et durant la période de contamination (04 jours), une relation proportionnelle est notée entre les niveaux d'induction de l'enzyme antioxydante CAT et les concentrations du phénol testées pour les deux espèces sentinelles utilisées. En effet, la plus forte activité catalase au niveau de la chaire des moules *Mytilus galloprovincialis* (201,58 U/mg de protéine) est mesurée au 04^{ème} jour d'exposition à la plus grande concentration du xénobiotique phénol (0,64mg/l).

La moule est un bivalve filtreur accumulateur des micropolluants. Elle peut concentrer les éléments traces à des concentrations supérieures à celles rencontrées dans son environnement [36]. Pendant tout processus physiologique d'échange avec le milieu environnant, les molécules exogènes pénètrent à travers les barrières biologiques séparant l'environnement interne de l'organisme du milieu externe [05]. L'accumulation des substances chimiques dans les organismes est à l'origine du stress oxydant [07].

En effet, par leurs propriétés redox, de nombreux xénobiotiques tels que les hydrocarbures, les métaux, les quinones ou encore certains pesticides sont connus pour exercer leurs effets délétères par le biais de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : peroxyde d'hydrogène, des radicaux superoxydes...) [38]. La réactivité des ROS peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes (oxydation des composants tels que l'ADN, les protéines, les lipides et perturbation généralisée de la balance redox) chez les invertébrés [86, 87-85]. En effet, les organismes aquatiques ont développé des systèmes antioxydants leur permettant de faire face à la production de ROS [04, 80, 86]. La catalase CAT (enzyme antioxydante) est une hémoprotéine présente au niveau des peroxysomes qui participent à la défense contre les dérivés de l'oxygène. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau selon ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) [80, 36-86]. Donc l'induction de l'activité CAT est le signe de l'exposition des moules au stress oxydatif causé par le phénol. Mesurée chez les deux espèces de moule *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis*, l'activité catalase peut nous renseigner sur le niveau de contamination [49] et le degré d'altération de la cellule [36].

Les biomarqueurs de défense comme la catalase sont de plus en plus employés dans divers programmes de recherche et en utilisant différentes espèces indicatrices de

vertébrés et d'invertébrés. Ainsi, les résultats de l'activité catalase obtenus dans ce travail semblent être en accord avec ceux reportés par de nombreux chercheurs, et c'est ainsi que Akcha *et al.*, [88] ont remarqué une induction de cette enzyme par le benzo[a]pyrene, par le Malathion (pesticide organophosphoré)[89], par le Phénanthrène(Hydrocarbure Polycyclique Aromatique) (Oliveira *et al.*, 2008), par le lindane (Khessiba *et al.*, 2005) [49], par les PAH et les OC(les organochlorés) (Buet *et al.*, 2006 ; Richardson *et al.*, 2008).

❖ *Cycle de décontamination*

Après 06 jours de décontamination, les moules ont montré une réversibilité de leur homéostasie dont on relevait des diminutions continues des activités catalases à la suite du cycle de contamination.

La moule *Perna perna* a montré une baisse considérable de l'activité CAT dès le 06^{ème} jour de décontamination. A la fin du cycle de détoxifications les activités CAT relevées chez les individus ex-contaminés ont montré une tendance de retour vers l'état initial. Ainsi, les valeurs relevées traduit la curabilité de l'état de santé des moules et la réversibilité du mécanisme physiologique suite à l'action des différents processus d'excrétion et de décontamination des polluants. Selon plusieurs auteurs, les biomarqueurs de défense comme la CAT contribuent au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Cette dernière dépend de la relation dose, durée/effet [02, 84, 90-91].

En revanche, le retour vers l'homéostasie chez les moules *Mytilus* n'était pas rapide et la durée du cycle de détoxification n'était pas suffisante pour que les individus puissent avoir une curabilité de leur état de santé comparable à celle observée chez spécimens de l'espèce *Perna perna*.

Les mêmes observations de l'effet de la décontamination ont été rapporté par Company *et al.*, (2008) après un cycle de dépuración des moules (6 jours) *Bathymodiolus azoricus*. En effet, les activités catalase branchiale relevés étaient inférieures à celles obtenues en phase de contamination. Meknachi (2010) quant à lui a signalé une diminution de la CAT suite à un séjour de décontamination chez les tilapias, de même, les moules transférées des milieux contaminés vers un site ouvert non contaminé ont présenté des activités enzymatiques inférieures à celles obtenues dans les sites pollués.

Les réponses obtenues de la catalase étaient relevées sous l'effet d'un seul facteur de stress qui est le phénol comme polluant chimique. Néanmoins, il est connu que les différentes activités biologiques mesurées chez les bivalves, sont étroitement influencées par les facteurs abiotiques du milieu environnant [87-91].

Dans notre étude la température, l'oxygène dissous et la salinité du milieu étaient stables durant tous les cycles expérimentaux, ainsi, leur influence sur l'activité catalase est peu probable.

3.3.A.3. Variations de l'activité de l'enzyme digestive (protéase)

Les résultats relatifs au dosage de la protéase (enzyme digestive) chez les deux espèces de moules *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* sont représentés dans les figures ci-dessous.

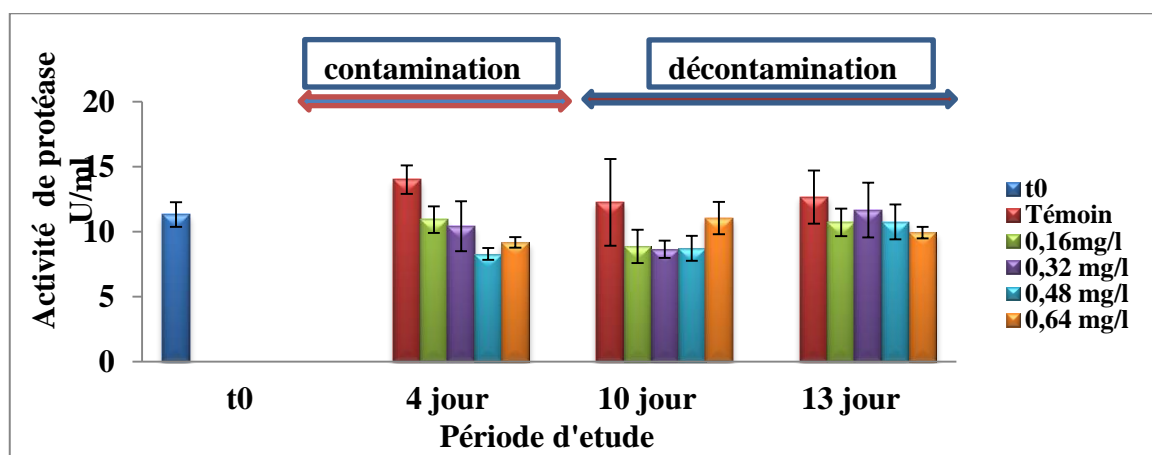


Figure 3.13 : Evolution de l'activité protéase des moules *Perna perna* exposées au phénol.

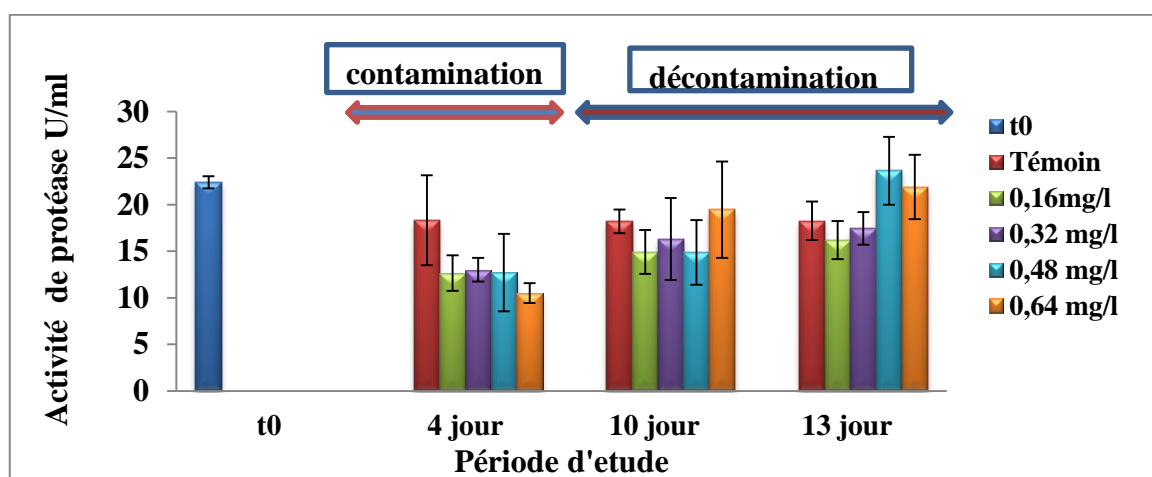


Figure 3.14 : Evolution de l'activité protéase des moules *Mytilus galloprovincialis* exposées au phénol.

D'après les figures obtenues (3.16 et 3.17), nous remarquons que les activités de l'enzyme digestive, la protéase, mesurées chez les témoins des deux espèces sentinelles restent quasiment stable durant tout le cycle expérimental.

En général, une diminution de l'activité protéase est constatée à la fin du cycle de contamination chez les deux espèces de moules exposés aux différentes concentrations du phénol.

Durant le cycle de décontamination les activités protéases mesurées chez les moules *Mytilus* ont montré un retour vers l'activité initiale après 06 jours de détoxification. Le même constat est relevé à la fin du cycle de décontamination.

Une baisse d'activité continue de l'enzyme digestive est mesurée chez les moules *Perna* exposées aux différentes concentrations du phénol, et ce ci à la fin du cycle de contamination. Par ailleurs, la reprise de l'activité enzymatique n'a été relevé qu'après le 09 jours de détoxification des moules ex-contaminées pour se rapprocher à celle relevée chez les témoins.

La moule est un bivalve filtreur accumulateur des micropolluants. Elle peut concentrer les éléments traces à des concentrations supérieures à celles rencontrées dans son environnement [78, 87, 92, 93, 94]. L'exposition des spécimens aux substances chimiques peut être à l'origine d'atteintes des enzymes digestives.

Des effets négatifs des polluants chimiques ont été observés chez différentes espèces d'invertébrés. Les activités amylase et sucrase ont été réduites chez la moule *Perna viridis* exposée aux polluants chimiques [95]. Chez la moules (*Mytilus galloprovincialis*) prélevées le long d'un gradient de contamination, les activités d'enzymes digestives ont montré des taux plus faibles de l' α -amylase chez les individus présentant les teneurs en contaminant les plus élevées [96].

Dans notre étude, l'atteinte de l'enzyme digestive (protéase) est donc le résultat direct de l'effet du xénobiotique phénol testé à différentes concentrations.

Les effets des contaminants sur les enzymes digestives peuvent également fluctuer en fonction de la température et du pH du milieu. Selon Amiard *et al*, la température est le facteur le plus influençant de la performance des enzymes digestives. Cependant différentes réponses des différentes enzymes digestives de bivalves ont montré des variations en fonction de la saison. Une synthèse des résultats expérimentaux regroupés par Amiard *et al*, donne des exemples d'inhibition de différentes enzymes digestives de différents organismes aquatiques exposés aux polluants métalliques et organiques y compris la contamination mixte.

La glande digestive des bivalves joue un rôle très important dans la digestion des aliments, en synthétisant et en sécrétant les enzymes digestives [78, 80, 97]. Cependant, cet organe est aussi la cible des contaminants chimiques qui y sont transportés pour leur détoxification. Selon Lagadic *et al* [46] ; Van der Oost *et al* [98], les variations d'activités enzymatiques sont souvent une des premières réponses au stress, elles représentent donc des points utiles dans la confirmation des effets toxiques avant que ces derniers ne soient perceptibles à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (cellulaire, tissulaire, physiologique). Différentes études ont précisé le caractère précoce de la réponse des enzymes digestives par rapport à l'apparition d'effets au niveau individuel (croissance...) ou communautaire (diversité biologique) ce qui confère une forte pertinence écologique aux enzymes digestives employées comme biomarqueurs d'exposition [80].

Ainsi, le suivi de l'impact potentiel des contaminants sur les activités des enzymes digestives est un paramètre intéressant présentant une pertinence écologique forte. Ces

activités enzymatiques jouent un rôle capital sur les processus d'assimilation de la nourriture. Une diminution de la digestion pourra conduire à une diminution de la croissance et de la reproduction avec un impact possible sur la sauvegarde de l'espèce.

Dans une perspective de synthèse des résultats des mesures biochimiques des biomarqueurs catalase et protéase, on peut dire que l'augmentation des dépenses énergétiques allouées à la défense traduite par l'induction de l'enzyme antioxydante CAT ainsi que la perturbation de l'enzyme digestive protéase ainsi discutée pourront être à l'origine de l'atteinte de la biométrie et du métabolisme bioénergétique suite à l'exposition au xénobiotique pour une durée plus élevée. De fait, une forte pertinence est accordée à ces deux biomarqueurs comme un signal précoce de la dégradation de l'état de santé des organismes indicateurs ce qui donne aux gestionnaires de l'environnement une information sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer la qualité des écosystèmes, ou protéger la biodiversité et l'intégrité des milieux avant que les effets soient perceptibles à des niveaux supérieurs aboutissant en phase finale à une dégradation de la qualité écologique d'un écosystèmes dans sa totalité.

En conclusion, les systèmes de défenses antioxydants (ex CAT) sont des biomarqueurs capables d'établir un diagnostic individuel des effets des dommages dus au stress oxydant et constituent des signaux d'alarmes précoces d'éventuels dommages au niveau de l'écosystème. Cependant pour les utiliser comme éléments prédictifs des effets aux niveaux des populations et des communautés, il est nécessaire d'établir le lien entre les défenses antioxydantes et les indicateurs de l'état de santé des individus (croissance, réserves énergétiques, fonctions métaboliques...).

En effet, une très forte pertinence est accordée à l'intégration des deux biomarqueurs CAT et protéase pour définir leur capacité à prédire d'éventuels effets au niveau populationnel.

B : 2^{ème} série d'expérience – Exposition aux colorants

3.3.B.1. Variations des concentrations en protéines au niveau de la chair

Les différents résultats relatifs aux dosages des protéines aux niveaux de la chair des moules *Perna perna* en présence des deux colorants (vert malachite oxalate et rouge congo) sont illustrés dans les figures ci-dessous :

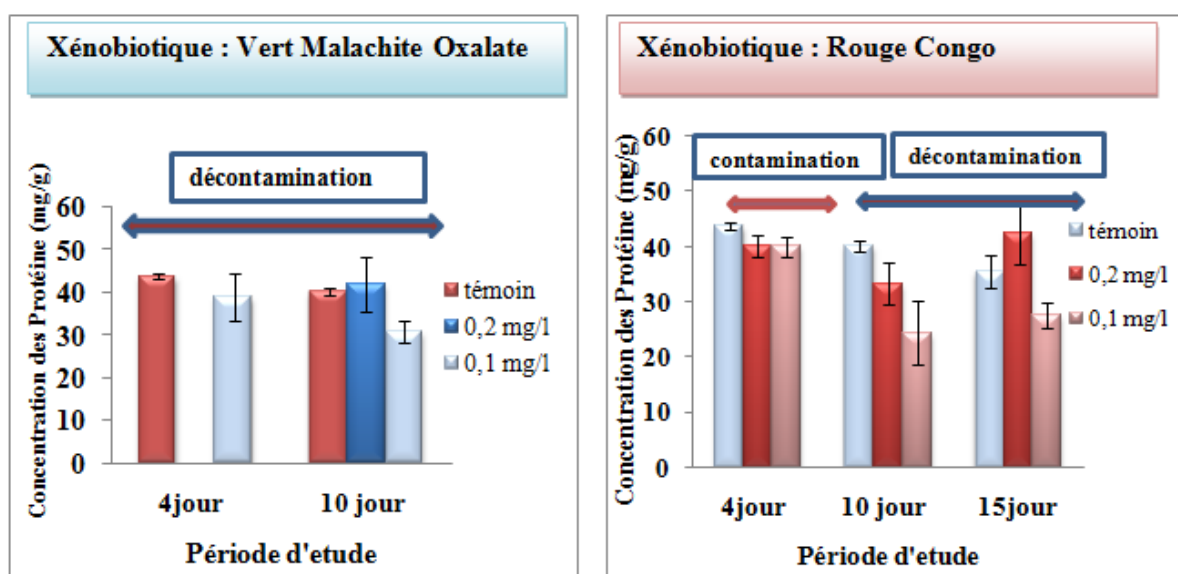


Figure 3.15 : Résultats du dosage des protéines des moules *Perna perna* exposées aux (rouge congo et vert malachite oxalate).

Faisant suite à la discussion des résultats biochimique de la première série d'expérience, le constat général cette fois-ci est le même que celui observé chez les moules *Perna perna* exposées au phénol. Une déplétion des teneurs protéiniques est ainsi relevée sous l'effet des deux colorants chimique rouge congo et vert malachite oxalate.

Le vert malachite utilisé comme xénobiotique a montré un effet délétère, sur les individus de moule *Perna perna*, dont on mesurait des mortalités continues dès le 2^{ème} jour d'exposition. L'objectif principal de notre étude était de provoquer juste un stress mesurable par une réponse biologique. La comparaison des réponses sous l'effet des deux colorants n'étant pas donc évidente. Le résultat certain est que le vert malachite est plus toxique que le rouge congo, cependant les concentrations choisies ne sont pas attitrées.

Par ailleurs, la reprise des teneurs en protéines n'est enregistrée qu'après 11 jours de décontamination des moules exposées au xénobiotique rouge congo.

3.3.B.2. Résultats de dosage de l'activité catalase

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) chez les moules *Perna perna* dans les différents milieux d'élevages contaminés par les deux colorants (vert malachite oxalate et rouge congo), à différentes concentrations sont représentés dans les figures ci-dessous :

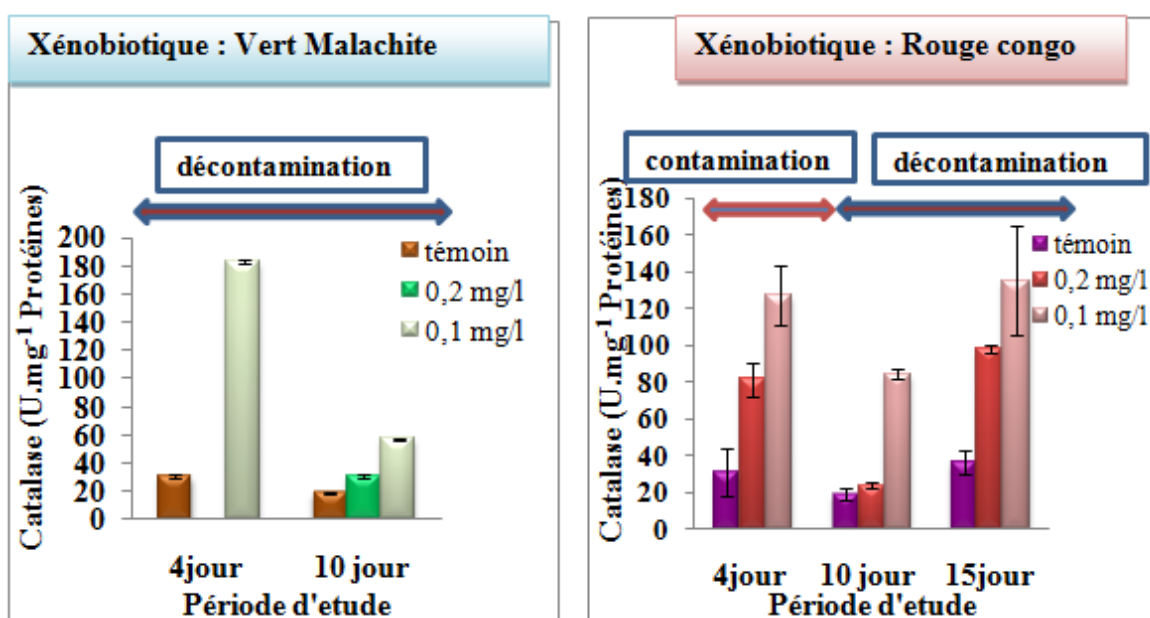


Figure 3.16 : Variation des activités catalase des moules *Perna perna* exposées aux (vert malachite oxalate et rouge congo).

Une corrélation positive est relevée sous l'effet du xénobiotique rouge congo, dont on mesurait des augmentations continues de l'induction de l'enzyme antioxydante catalase. Par ailleurs, une diminution de l'induction catalase est relevée après 06 jours de décontamination. Nonobstant, les activités atteintes à la fin du cycle expérimental (15 jours) traduisait l'irréversibilité des mécanismes de détoxication. La durée de la décontamination étant insuffisante pour que les moules puissent reprendre la curabilité de leur état de santé et la réversibilité du mécanisme physiologique.

En revanche, la mortalité observée sous l'effet du xénobiotique vert malachite rend l'interprétation des résultats difficile.

3.3.B.3. Variations de l'activité de l'enzyme digestive (protéase)

Les résultats relatifs au dosage de la protéase chez les moules *Perna perna* en présence des deux colorants (vert malachite oxalate et rouge congo), à différentes concentrations sont représentés dans les figures ci-dessous.

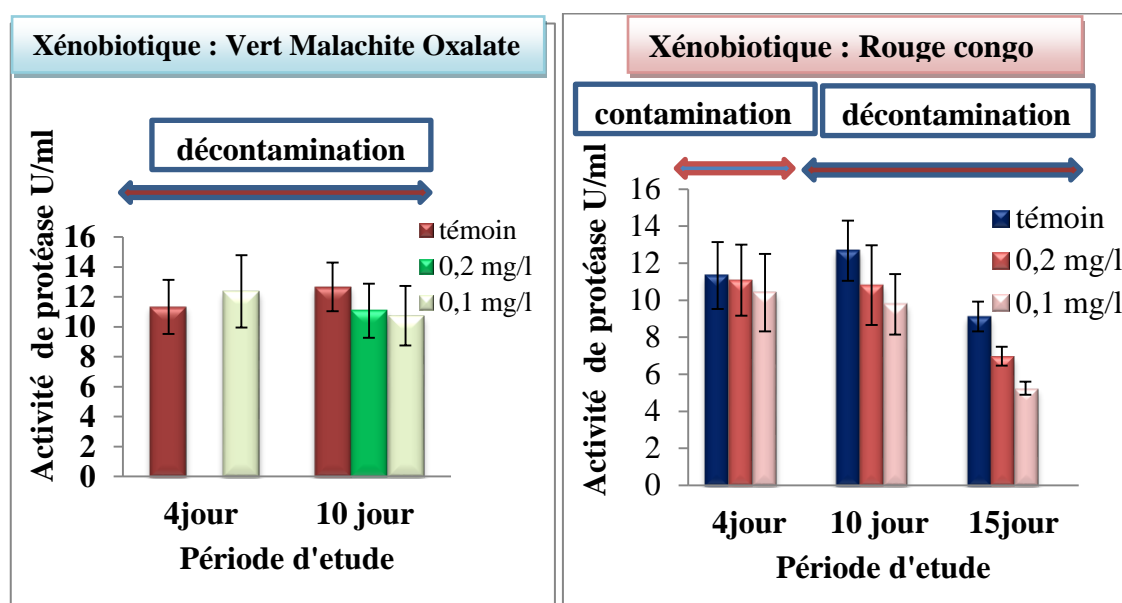


Figure 3.17 : Evolution de l'activité protéase des moules *Perna perna* exposées aux (vert malachite oxalate et rouge congo).

D'après la figure (3.19), nous remarquons que :

Après 04 jours d'exposition au rouge congo, l'enzyme digestive protéase n'a montré aucune atteinte de leur activité dont les valeurs relevées chez les individus contaminés étaient identiques à celles mesurées chez les spécimens témoins.

Une baisse proportionnelle des activités protéase est relevée à la fin du cycle expérimental. Le résultat obtenu ne semble pas dû à l'effet du contaminant.

Les activités de l'enzyme digestive, la protéase, mesurées chez les témoins restèrent quasi stable durant tout le cycle expérimental.

3.4. Résultats des mesures biométriques

Des mesures biométriques peuvent être utilisées pour déterminer les indices de conditions chez divers organismes tels que les bivalves. Ainsi, les indices biométriques offrent un grand intérêt pour évaluer les effets chroniques des polluants. Les plus usuels sont les relations taille-poids (condition) et les indices somatiques.

Aussi, les indices corporels (indice de condition, facteur de condition selon les sources) basés sur la mesure des masses et longueurs des organismes sont utilisés pour apprécier leur état de santé générale [99-100].

Les résultats des mesures des indices de condition de la moule *Perna* et *Mytilus* de la présente étude sont illustrés par les figures suivantes :

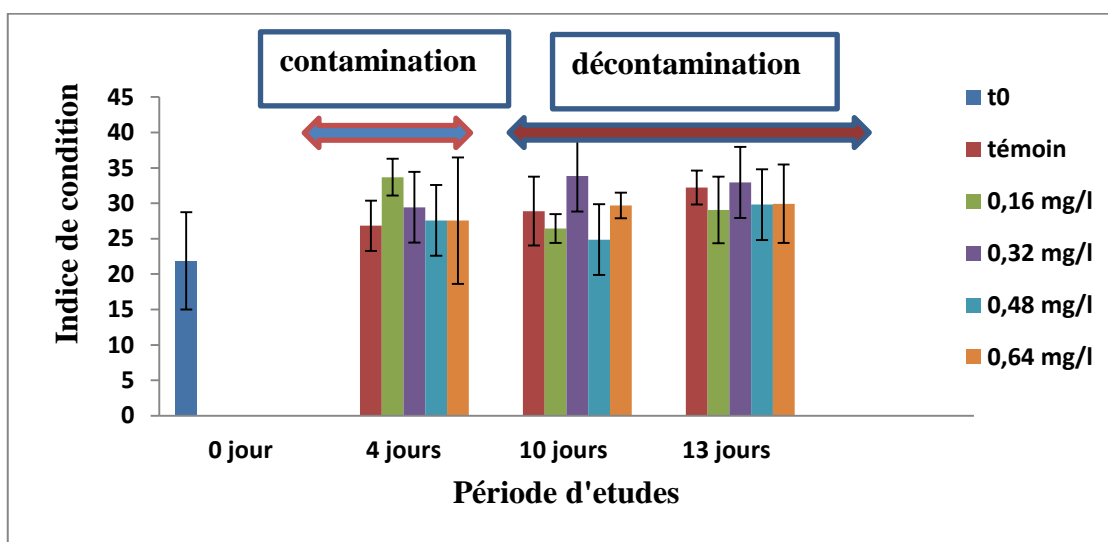


Figure 3.18 : Evolution de l'indice de condition de la moule *Mytilus galloprovincialis* exposée au phénol en fonction de la période d'études.

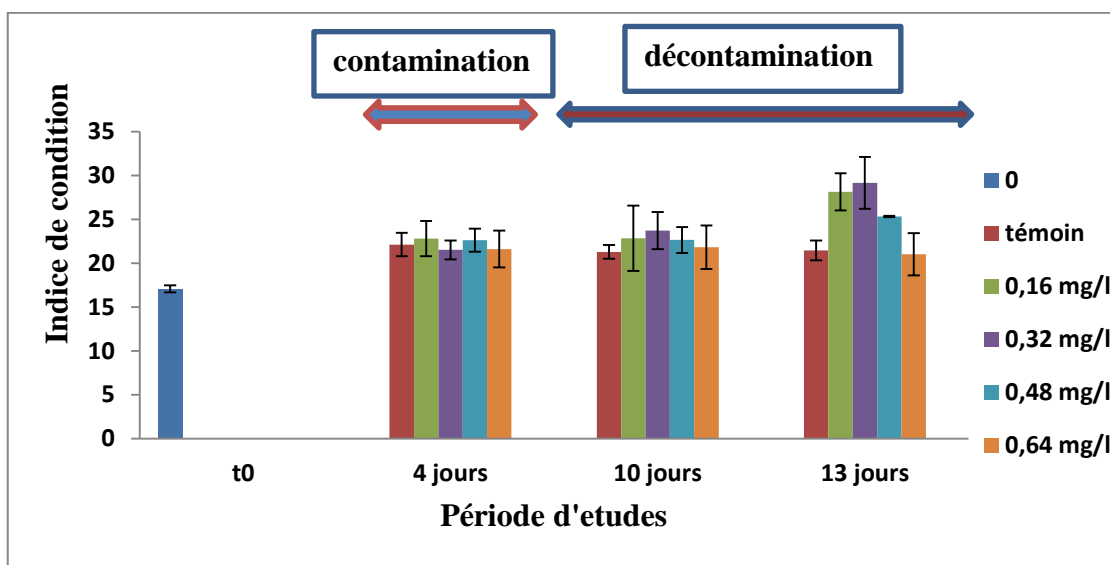


Figure 3.19 : Evolution de l'indice de condition de la moule *Perna perna* exposée au phénol en fonction de la période d'études.

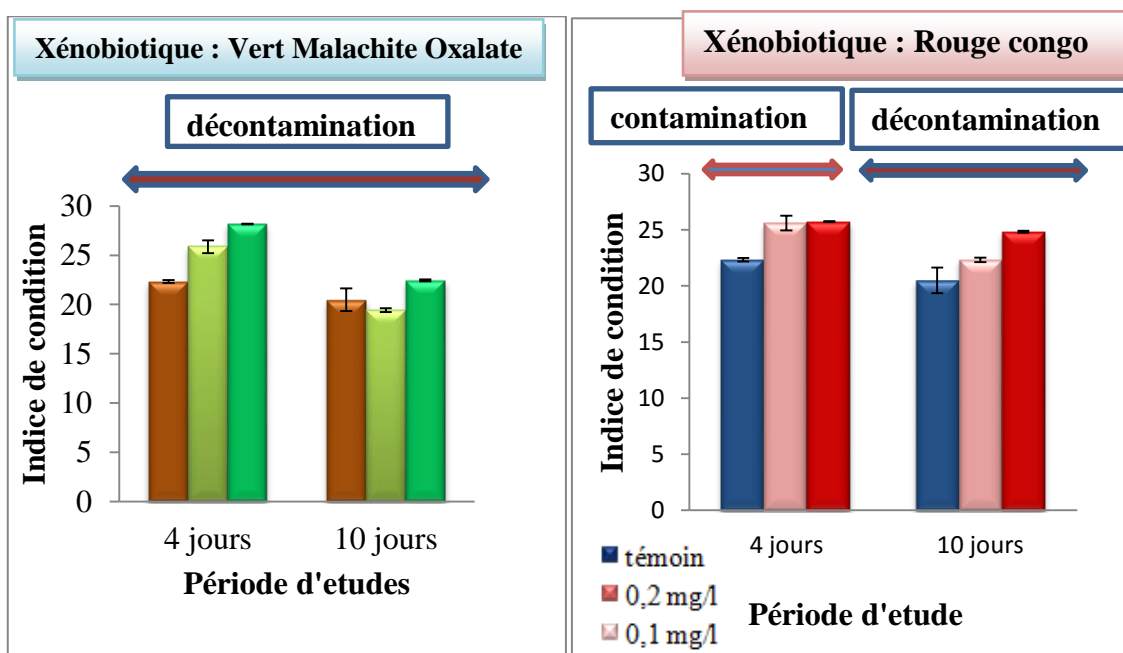


Figure 3.20 : Evolution de l'indice de condition de la moule *Perna perna* exposée au xénobiotique vert malachite oxalate en fonction de la période d'études.

D'après les figures ci-dessous présentées, on n'observe pas une atteinte claire de la biométrie sous l'effet des différentes concentrations des différents polluants examinés. La durée d'exposition au xénobiotiques ne semble pas donc suffisante pour que des manifestations biométriques soient observées. Par ailleurs, et dans les milieux naturels

contaminés l'effet des polluants sur l'état globale des espèces vivantes aura le temps pour engendrer des modifications significatives des activités physiologiques des organismes et donc des atteintes directes de la croissance et de la biométrie.

Les molécules toxiques entrent en interaction avec les molécules biologiques. Des lors, les organismes exposés développent divers mécanismes de défense : évitement et / ou isolement, élimination active, neutralisation par complexation avec des protéines etc [78]. Des études du métabolisme et de la production de biomasse chez les organismes exposés aux toxiques [101] ont mis en évidence que ces mécanismes de défense sont coûteux pour l'organisme en terme énergétique. Ces coûts de défense s'ajoutent aux coûts de maintenance : il existe donc une corrélation quantitative entre la capacité de défense de l'organisme (survie) et sa capacité de production de biomasse (croissance et reproduction).

Par ailleurs, l'allocation énergétique pour la défense, la réparation et la régénération des cellules est privilégié à la croissance et à la reproduction [101].

Chez les moules la stratégie d'évitement ou l'isolement n'étant pas possible, le recours aux enzymes antioxydantes semble être la meilleure stratégie pour faire face aux xénobiotiques. il est démontré que les premières réponses à la présence des contaminants sont celles liées au système antioxydant.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les êtres vivants évoluent à l'heure actuelle dans des milieux endommagés par différents types de pollution. La pollution chimique par les xénobiotique (composés exogènes) constitue une grande part des agressions constamment subies par les organismes.

De par leur spécificité et leur précocité, les biomarqueurs sont des outils de gestion à fort potentiel, en particulier dans le cadre d'un diagnostic environnemental préalable à des investigations plus couteuses en temps et énergie, sans préjuger de la nature, en termes de toxicité ou d'adaptation, des informations qu'ils fournissent à l'observateur, et même si d'autres investigations reste a faire sur leur valeur prédictive quant a des impacts au niveau des population.

Dans ce sens, la présente étude a permis de mettre en évidence l'impact des contaminants chimiques (phénol, Vert malachite et rouge congo) sur les activités enzymatiques de la moule et de valider l'emploi de test éco-toxicologique et le choix d'un biomarqueur en tant qu'indicateur biologique de stress.

Ainsi, une déplétion des teneurs en protéines de la chaire totale traduit la perturbation des réserves protéiques des moules produite durant le cycle de contamination et de décontamination. Cependant, la compréhension de l'influence des polluants sur le métabolisme énergétique nécessite que ces résultats soit complétés par davantage de paramètres et notamment la mesure des teneurs du glucose et des lipides.

Les réponses enzymatiques obtenues dans ce travail permettent de qualifier la catalase comme biomarqueur de défense très pertinent, sensible et rapide. Cette qualification est justifiée par la corrélation positive entre l'activité enzymatique et les teneurs de l'eau en contaminants ; par l'induction rapide de l'enzyme même par les faibles concentrations du polluant. En plus, le test de décontamination a montré l'efficacité de ce biomarqueur dans l'évaluation de la qualité du milieu par le retour des activités enzymatiques à un niveau qui se rapproche à celui relevé chez les organismes témoins.

Le retour à l'état initial, traduit la curabilité et la réversibilité de l'état de santé des organismes ainsi que la sensibilité de ce biomarqueur à la présence de contaminants.

La catalase peut être influencée par des facteurs intrinsèques ou extrinsèques indépendants de la volonté du chercheur. Ainsi, pour pallier les variations des réponses des biomarqueurs dues à ces facteurs l'approche multimarqueurs semble être une clé prometteuse pour une interprétation meilleure des résultats et ainsi une évaluation plus précise de l'état de santé du milieu aquatique. Cette approche est basée sur le dosage simultané des autres biomarqueurs de stress oxydant tel que la Glutathion γ -S-Transférase (GST), le Glutathion réduit (GSH) ainsi que la Malondialdéhyde (MDA) qui est liée à la peroxydation lipidique, résultat du stress oxydant causé par les ROS et dont la génération est en relation avec la présence de polluants organiques et/ou métalliques.

Aussi, une très forte pertinence est accordée à l'intégration des deux biomarqueurs CAT et protéase pour définir leur capacité à prédire d'éventuels effets au niveau populationnel. Par ailleurs, les différentes mesures réalisées sur la moule à savoir : biomarqueurs (CAT et protéase), paramètres biométriques constituera donc une excellente référence pour un diagnostic complet de l'état des écosystèmes dans le cas d'un programme de surveillance en milieu naturel ou en aquaculture.

APPENDICE A**LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS**

AchE : l'acétylcholinestérase.

CAT : Catalase.

CNRDPA : Centre Nationale de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture.

ERI : eaux résiduaires industrielles

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques.

H₂O₂ : Hydrogen peroxide.

IC : Indices de condition.

MES : Matières en suspension.

pH : Potentiel d'hydrogène.

RC : Rouge Congo

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

Sal : Salinité.

T (°C) : Température.

TCA : Acide trichloracétique.

UV : Ultra- Violet.

USEPA : United States Environmental Protection Agency

VM : Vert Malachite Oxalate

APPENDICE B

DISPOSITIF EXPERIMENTAL

AB.1 Présentation de la région d'étude

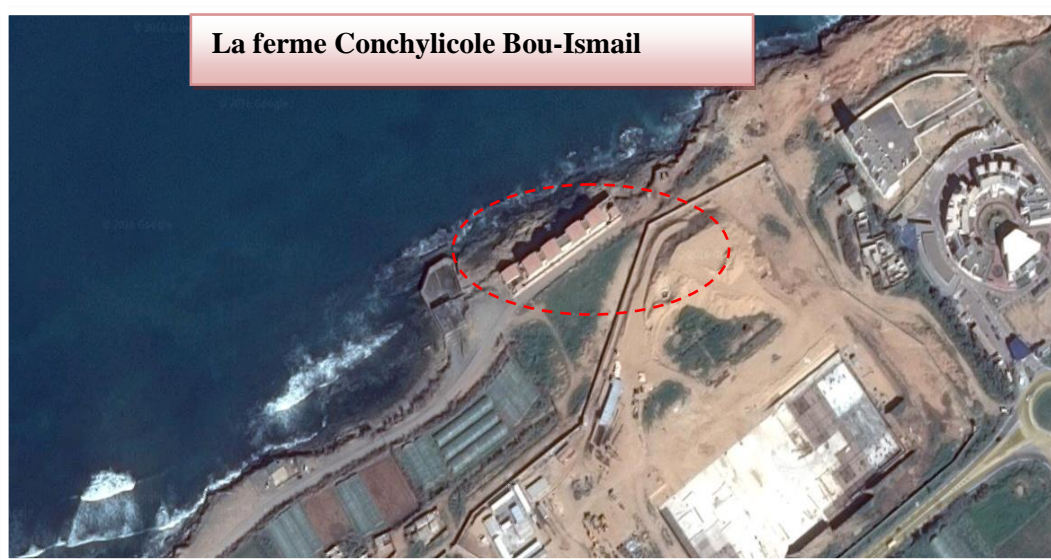


Figure AB.1: Localisation de la ferme conchylicole CNRDPA.

Cette étude est réalisée à la ferme conchylicole CNRDPA en baie de Bou-Ismaïl pour l'élevage des moules ($36^{\circ}36' N$; $2^{\circ}37' E$), qui se situe à 45 km à l'Ouest du littoral algérois. Cette zone est connue pour son climat doux et tempéré durant l'été et l'hiver. La température moyenne y est de $25,8 \pm 2,5$ °C ($18-26,5$ °C). Pour une salinité moyenne de 36 ‰.

AB.2 Choix des polluants organiques

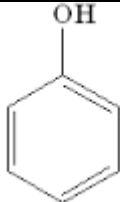
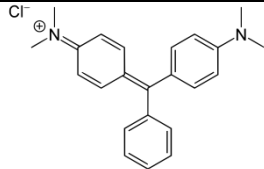
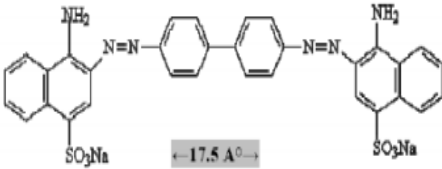
Les polluants organiques ont longtemps été les principaux polluants des milieux aquatiques. Certaines substances organiques sont facilement biodégradables et peuvent donc être décomposées et éliminées grâce aux capacités naturelles d'auto-épuration des milieux aquatiques. Mais, lorsqu'elles sont en excès, leur décomposition peut entraîner l'asphyxie de la faune aquatique.

Dans le cadre de la biosurveillance marine, le suivi de l'état de santé des écosystèmes aquatique repose sur l'étude de réponse biologique des êtres vivants exposés aux différents polluants organiques.

Pour cette étude nous avons étudié la toxicité des trois polluants organiques (phénol et les deux colorantes le rouge congo et verte malachite oxalate).

Les principales caractéristiques des polluants sont regroupées dans le Tableau 1 :

Tableau 1 : Propriétés des polluants utilisés.

Polluants	Phénol	Vert Malachite	Rouge Congo
Structure			
Formule	C ₆ H ₅ OH	C ₂₃ H ₂₅ N ₂	C ₃₂ H ₂₂ N ₆ Na ₂ O ₆ S ₂
Masse molaire	94.11124 g/mol	364.911±0.02g/mol	696,663 ± 0,04 g/mol

AB. 3 Préparation des solutions

Les solutions des polluants utilisés sont préparées en tenant compte de leurs solubilités. Pour tous les composés étudiés, nous avons utilisé la même méthode, qui consiste à préparer d'abord une solution mère de concentration donnée, à partir de laquelle nous préparons, par dilutions successives.

Préparation des solutions ont été réalisé au sein du Laboratoire siège d'analyse physico chimique du CNRDPA



Figure AB. 2 : Laboratoire d'analyse physico chimique du CNRDPA.

AB.4 Les différentes expérimentations réalisées au centre pilote de conchyliculture de
CNRDPA-BouIsmail



Figure AB.3 : Schéma montrant les différents matériels utilisés au niveau de La ferme Conchylicole Bou-Ismail.

APPENDICE C

MODES OPERATOIRES ET REACTIFS CHIMIQUES

AC.1. L'azote ammoniacal



Figure AC. 1 : Dosage de L'azote ammoniacal.

AC.3. Dosage de l'azote nitreux et l'azote nitrique



Figure AC. 2 : Dosage de l'azote nitreux et l'azote nitrique.

AC.5. Protéines

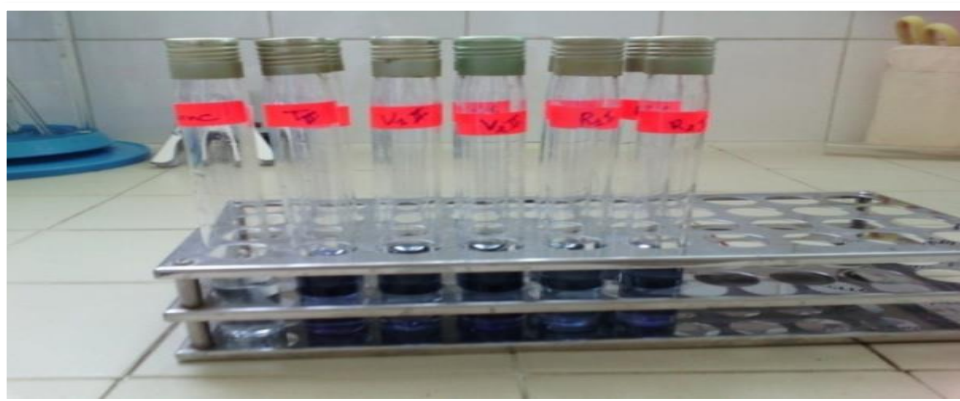


Figure AC. 3 : Dosage des protéines par la méthode de folin-lowry.

AC.6. L'activité de la CAT

L'activité CAT est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Activité CAT} = \frac{(\Delta\text{DO}/\text{min}) \cdot 1000}{[\text{Prot}] \cdot \varepsilon}$$

- $\Delta\text{DO}/\text{min}$: variation de densité optique/ minute,
- ε coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène à 280 nm en $\text{mmole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$
- $[\text{Prot}]$ concentration en protéines dans le milieu réactionnel en $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

Les résultats sont exprimés en μmoles de H_2O_2 consommées par minute / mg de protéines, ce qui correspond à unité (U) de catalase / mg de protéines.



Figure AC. 4 : Spectromètres UV-Visible.

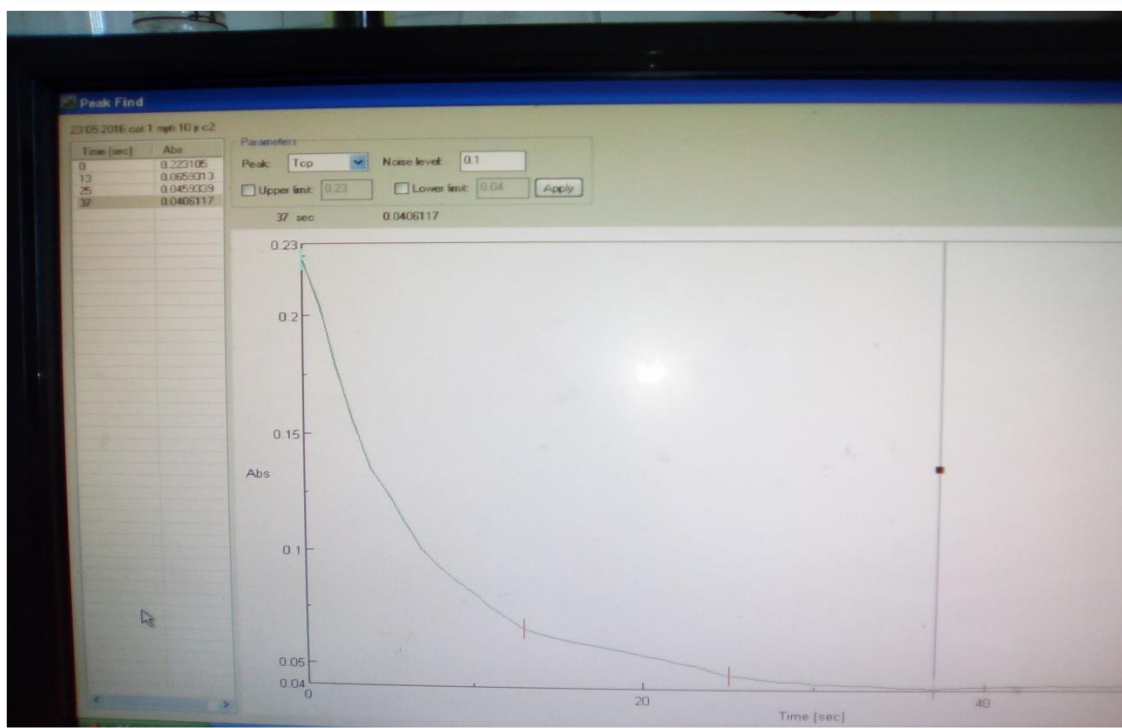


Figure AC. 5: Dosage de catalase par mode cinétique.

AC.7. Dosage de l'activité protéase

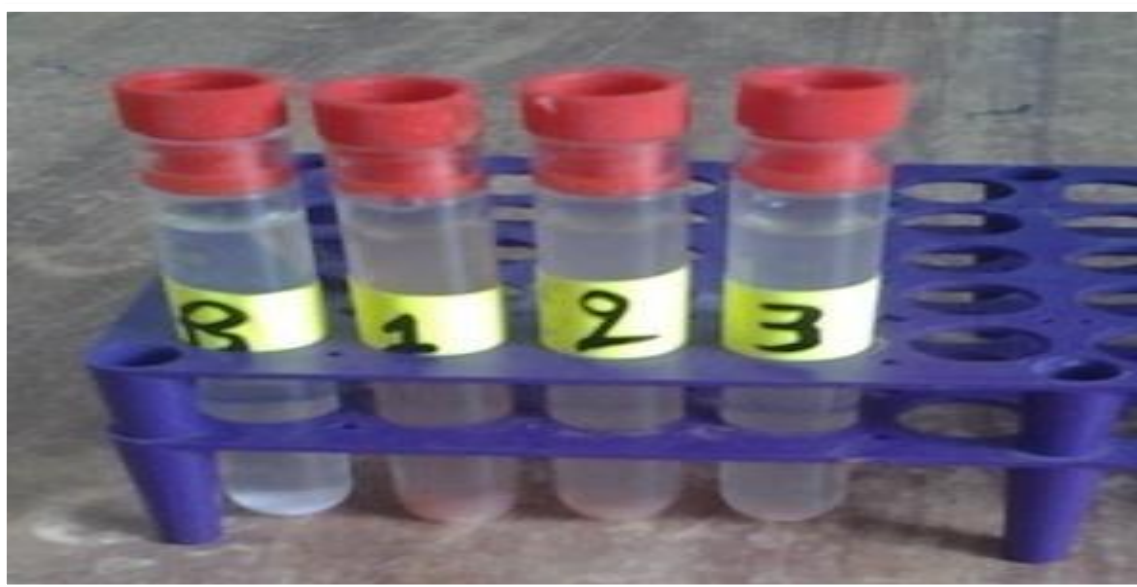


Figure AC. 6: Dosage de l'activité protéase.

AC.8 Les Réactifs chimiques

AC.8.1. Dosage de l'azote ammoniacal

Réactif (A) : Solution de phénol-Nitroprussiate de sodium (eau distillée, 35g de phénol, 400mg de Nitroprussiate de sodium pour 1litre) ;

Réactif (B) : Solution alcaline d'hypochlorite (280g de citrate trisodique, 22g de soude, solution d'hypochlorite <<de sodium correspondant à 1,4g de chlore soit 44ml d'une solution à 10° de chlore).

AC.8.2. Dosage des nitrites

Réactif (C) : Solution de Sulfanilamide (eau distillée, 5g de Sulfanilamide, 50ml d'acide chlorhydrique d=1,18 pour 500ml).

Réactif (D) : Solution de N-Naphthyléthylène-diamine (eau distillée, 0,5g dichlorohydrate de N-Naphthyléthylène-diamine

AC.8.3. Dosage de phosphore (Mélange-Réactif)

Réactif (R₁) : Solution de Molybdate d'ammonium (eau distillée déminéralisée ,15g de paramolybdate d'ammonium pour 500 ml).

Réactif (R₂) : Acide Sulfurique (eau distillée, 140 ml d'acide Sulfurique d=1.84pour 900ml).

Réactif (R₃) : Solution Acide Ascorbique (eau distillée, 54g d'acide Ascorbique pour 500 ml).

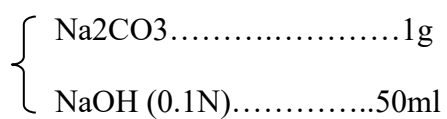
Réactif (R₄) : Solution d'oxytatrate de potassium et d'antimoine (eau distillée, 0.34g d'oxytatrate de potassium et d'antimoine pour 250ml)



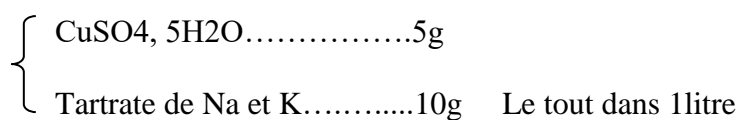
Figure AC.7 : Mélange des réactifs pour le dosage de phosphore.

AC.8.4. Dosages des protéines par la méthode de Lowry :

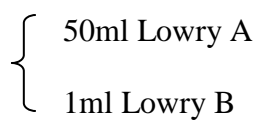
1- Réactif de Lowry A



2- Réactif de Lowry B



3- Réactif de Lowry : Mélanger le jour de la manipulation



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Abada-Boudjema Y-M., Dauvin J-C., 1995.** Recruitment and life-span of two natural mussel populations *Pernaperna*(Linnaeus) and *Mytilusgalloprovincialis*(Lamarck) from the Algerian coast.*J.Moll. Stud.*,61 : 467-481.
- [2]. **Abada-Boudjema Y-M., 1996.** Cinétique, croissance, production et composition biochimique de deux bivalves mytilidés, *Pernaperna*(L) et *Mytilusgalloprovincialis*(Lmk) du littoral algérois. Thèse Doctorat. Muséum National Hist. nat. Paris, Fr: i-iv + 1-243
- [3].**Beaumont,A., Cassier,P.,2004.** Biologie animale: Des protozoaires aux Métazoairesépithéliioncuriens.Tome 1. 3èmeédition. Edt. Dunod. 459p.
- [4]. **BELHAOUARI Benkhedda 2012.**Etude écotoxicologique chez un Gastéropode marin , *Osilinus turbinatus* (Born, 1780) dans le littoral algérien occidental Thèse de doctorat,Université d'oran
- [5]. **BENGHALI sofiane Med el Amine 2009,** biosurveillance biomonitoring biomarqueurs bioindicateur acétylcholinesterase oursin moule patelle paracentrotus lividus mytilus galloprovincialis.Université de Mostaganem Abdelhamid Ibn Badis.
- [6]. **BENGUEDDA-RAHAL Wacila 2012** Contribution à l'étude de la bioaccumulation métallique dans les sédiments et différents maillons de la chaîne trophique du littoral extrême ouest algérien Thèse de doctorat Université de Tlemcen.
- [7]. **Bill Indge Dunod, 2007** La biologie de A à Z, 1100 entrées et des conseils pour réviser,
- [8]. **Calamari, D., Naeve, H., 1994** "Revue de la pollution dans l'environnement aquatique africain, document technique du Comité des pêches continentales pour l'Afrique(CPCA) ", N°. 25. Rome", 129 p
- [9]. **MIZI. A.** Traitement des eaux de rejets d'une raffinerie des corps gras région de BEJAIA et valorisation des déchets oléicoles. Thèse de doctorat. Université de Badji Mokhtar. ANNABA.
- [10]. **Emilian Koller.** Traitement des pollutions industrielles: Eau, Air, Déchets, Sols, Boues. DUNOD. PARIS. Avril 2004.
- [11]. **GALAF. F et GHANNAM. S.** Contribution à l'élaboration d'un manuel et d'un site web sur la pollution du milieu marin. Mémoire d'ingénieur d'état. Université HASSAN II. RABAT. ROYAUME du MAROC. 2003.

- [12]. **Traité l'environnement.** Technique de l'ingénieur. Volume G1210.
- [13]. **Pollution des eaux.** Dosage des nitrites. (Internet)
- [14]. **Brigitte DONNIER.** La pollution chimique en méditerrané. Laboratoire. C. E. R. B. O. M. Nice. France.
- [15]. **SFC.** "**Données industrielles, économiques, géographiques sur les principaux produits chimiques, métaux et matériaux.**" Société Française de Chimie, 8e Edition, (2009).
- [16]. **ATSDR.** "Notice of the revised priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles." Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (2007).
- [17]. **INRS.** "Fiche Toxicologique." Institut National de Recherche et de Sécurité, (2008).
- [18]. **ATSDR.** "Toxicological profile for phenol." Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (2008).
- [19]. **Mathieu, J-M.** "Phénol. Acétone. α -Méthylstyrène." Techniques de l'Ingénieurs : J 6490, (2002).
- [20]. **ATSDR.** "Management guidelines for phenol." Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (2003).
- [21]. **INERIS.** "Phénol: Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques." Institut National de l'Environnement Industriel et des risques, (2005).
- [22]. **Adak, A, et Pal, A.** "Removal of phenol from aquatic environment by SDS-modified alumina: Batch and fixed bed studies." Separation and Purification Technology 50(2): 256-262, (2006).
- [23]. **Mohanty, K., Das, D, et Biswas, M. N.** "Adsorption of phenol from aqueous solutions using activated carbons prepared from Tectona grandis sawdust by ZnCl₂ activation." Chemical Engineering Journal 115(1-2): 121-131, (2005).
- [24]. **Barrios-Martinez, A., Barbot, Marrot, B., Moulin, P, et Roche, N.** "Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR." Journal of Membrane Science 281(1-2): 288-296, (2006).
- [25]. **Jiang, H., Fang, Y., Fu, Y, et Guo, Q-X.** "Studies on the extraction of phenol in wastewater." Journal of Hazardous Materials 101(2): 179-190, (2003).

- [26]. **Vasu, A. E.** "Removal of Phenol and o-Cresol by Adsorption onto Activated Carbon." *EJournal of Chemistry* 05: 224-232, (2008).
- [27]. **Huang, J., Wang, X., Jin, Q., Liu, Y, et Wang, Y.** "Removal of phenol from aqueous solution by adsorption onto OTMAC-modified attapulgite." *Journal of Environmental Management* 84(2): 229-236, (2007).
- [28]. **INERIS.** "Phénol: Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques." Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, (2005).
- [29]. **Capon M., V. Courilleu, C. Valette, (1999)** "Chimie des couleurs et des odeurs", Nantes, Culture et technique.
- [30]. **Belegald J.,** "Les colorants industriels", Encyclopédie médico-chirurgicale pathologie du travail, intoxications maladies par agents physiques à Paris. Editions techniques.
- [31]. **H.M. Asfour, M.M. Nasar, N.G. Pinto,** «Effect of salt on the mechanism of adsorption of aromatics on activated carbon». *Langmuir*, 15, 1985, 5997-6003.
- [32]. **G. Bringmann, R. Kuhn,** *Ges. Ing.*, 80, 1959, 115-120.
- [33]. **V.J.P. Poots, G. McKay, J.J. Heal,** «Removal of acid dye from effluent natural and adsorbent II». *J. Water Wood Research*.10, 1978, 926-935.
- [34]. **T.E. Tooby, P.A. Hursey, J.S. Alabaster,** *Chem. Ind.*, 12, 1957, 523.
- [35]. **H.J. Bandt,** *Dische. Fisch. Ztg.* 4, 1957, 170-171.
- [36]. **Sergio Santiago.,** Kristin Becker van Slooten., Nathalie Chèvre., Michel Pardor., Christophe Benninghoff., Marc Dumas., Eric Thyband., Frédéric Garrinier., 2002. Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement. Edition Soluval Santiago. 56p.
- [37]. **Bernard Clement., 2006.** Apports des essais en microcosmes aquatiques lenticules de laboratoire à l'évaluation écotoxicologique des polluants. Mémoire pour obtenir le diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches délivré conjointement par l'institut national des sciences appliquées et l'université LYON 1, 288p.
- [38]. **Benard A., Durif M., Lavrilloux P., Vandamme L., Meunier L., Defrenne B., 2004.** Utilisation d'une technique de biosurveillance pour évaluer les retombées de métaux lourds : Cas d'un site de seconde fusion du plomb. Rapport final : INIRES-DRC-04-55891-AIR-n°0565-MDu/LVa, 66p.

- [39]. **Arzul G., Bocquené G., Claisse D., Grossel H., Marchand M., Munsch C., Tissier C., Tixier C., Tronczynski J., 2004.** Stratégies pour la surveillance des produits phytosanitaires en milieu marin côtier. Ifremer, R.INT-DEL/PC/2004.17 : 46p.
- [40]. **Bruno Andral, 2002.** Guide méthodologique, Le réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO) en Méditerranée, Evaluation de la contamination chimique basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules. Ifremer : 21p.
- [41]. **Megateli, S.,** “ Étude de la toxicité de trois métaux lourds (cuivre, cadmium et zinc) et d'un fongicide (diméthomorphe) sur une plante aquatique : perspectives d'utilisation en phytoremédiation ”, Thèse de Doctorat, Université Saâd Dahlab De Blida, Algérie, (2010) 144p.
- [42]. **Bénédicte, V. R.,** “ Mise au point et validation, sur sites contaminés, (ETM-HAP) d'un test de biosurveillance en microcosme : croissance et bioaccumulation par le gastéropode terrestre *hélix aspersa aspersa* ”, Thèse de doctorat, Université de Metz, France, (2004) ,266p
- [43]. **Perez, T., Sartoretto, S., Soltan, D., Capo S., Fourt, M., Dutrieux, E., Vacelet, J., Harmelin, J.G., Rebouillon P.,** “ Etude bibliographique sur les bioindicateurs de l'état du milieu marin. Système d'évaluation de la Qualité des Milieux Littoraux ”, 4 fascicules, (2000), 642 pp.
- [44]. **Jourdain, M.J., Charissou, A.M.,** “ Etat des connaissances sur le devenir de polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitements : identification des composés « métabolites » et des cinétiques, rapport final, n° 05-0513/1a, (France), (2007) ,60p
- [45]. **Pay, A.,** Réponses biochimiques et physiologiques des symbioses marines tempérées face aux changements climatiques, Thèse de doctorat, université de Nice-Sophia Antipolis, (France), (2012) ,191p.
- [46]. **Lagadic Laurent., Caquet Thierry., Amiard Jean- Claude., Ramande François., 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie, Aspects fondamentaux. Edition Masson, paris, ISBN.
- [47]. **De Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon p, Chan HM (2000).** Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). Aquatic Toxicol.
- [48]. **Amiard Jean-Claude., Claude Amiard-Triquet., 2008.** Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Edition Tec et Doc Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-1017-1.

- [49]. **Khessiba, A., Rome M., Aïssa, P.**, “Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane”, *Environmental Pollution*, 133, (2005), pp 275–281.
- [50]. **Gazeau, F., Nzigou, A.R.**, “Effet de l’augmentation de la pression partielle du CO₂ sur la calcification des moules (*Mytilus edulis*)”, Rapport, Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), France, (2008), 43 p.
- [51]. **Rodgers, J.H., Cherry, D.S., Graney, R.L., Dickson, K.L., Cairns, J.**, “Comparison of heavy metals interactions in acute and artificial stream bioassay techniques for the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*).In: *Aquatic Toxicology*, ASTM STP 707. Eaton, J. G., Parrish, P. R., Hendricks, A.C., Eds ASTM, Philadelphia, (1980), pp 266-280.
- [52]. **Vincendeau, M. L., Robert, J.M.**, “Variations qualitatives saisonnières des produits excrétés par deux mollusques bivalves *Crassostrea gigas* (Thunberg) et *Ruditapes philippinarum* (Adam et Reeve)”, *Océanis*, 13, (1987), pp 543-556.
- [53]. **Masilamoni, J.G., Azariah, J., Nandakumar, K.**, “Excretory products of green mussel *Perna viridis* L. and their implications on power plant operation. *Turk. J. Zool.* 25, (2001), pp 117-125.
- [54]. **Buchet, V., Bluteau, A.**, “ Etude d’un élevage intégré Bars-huîtres Influence de deux gestions hydrauliques de l’élevage piscicole sur le pré grossissement d’huîtres ”, Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes de l’IFREMER, Franc, (1996) ,74 p.
- [55]. **Dellali, M., Romeo, M., Aissa, P.**, “ Suivi annuel de l’activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte”, *Oceanologica Acta*, Vol.24, N° : 3, (2001), pp 263-271.
- [56]. **Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P.**, “Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed“. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* (2005), 318, pp 21-30.
- [57]. **Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F.**, “ Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l’environnement ”, Edition TEC & DOC , Paris,(1998),320p.
- [58]. **El-Bekkaye, K., Melhaoui, M.**, Evaluation de la bioaccumulation des métaux traces chez *Donax trunculus* dans la côte méditerranéenne marocaine (depuis Saidia à Al Hoceima), Conférence Méditerranéenne Côtière et Maritime, Edition 2, Tanger, Maroc, (2011) ,4p.

- [59]. **Stellio Casas., 2005.** Modélisation de la bioaccumulation des métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule *Mytilus galloprovincialis* en milieu méditerranéens. Thèse de doctorat, université Sud Toulon VAR, 314p.
- [60]. **Roberts, S., Bennett, A., Bernard, F., Blanchot, J., Bougrier, S., Buestel, D., Caisey, X., Cochard, J.C., Dormoy J.M., Geairon P., Jonquières G., Pellan A., Pouvreau S., Prou J., Remoissant G., Stiger V., Teissier H et Tiapari J., 1995.** Etude de la respiration et de la filtration de l'huitre *Perlière Pinctada Mararitifera*. Programme général de recherche sur la nacre, action de recherche n°8 Ecophysiologie, Rapport final ; Centre IFREMER-COP de Varirao., Centre ORSTOM de Nouméa., Centre IFRMER de la Tremblade, VAAM 95p
- [61]. **Marteil.,1978.** La conchyliculture française : biologie de l'huitre et de la moule. 319p.
- [62]. **Barnabé G.,1989.** Aquaculture volume. Lavoisier tec et Doc . 565p.
- [63]. **Reginald, H. G., Charles, M., G.,** “Biochimie”, Boeck Université, Paris, France, (2000), 1125p.
- [64]. **Pelvin C., 2000.** Aptitude de quatre tests simples à qualifier la vitalité de moules soumises à des épreuves graduelles. Analyse et valorisation des produits naturels. Université de Bretagne-sud. 35p
- [65]. **Lindner, G., 1989.** Guide des coquillages marins. Paris, 255p.
- [66]. **Kornprobest, J-M., 2005.** Substances naturelles d'origine marine. Edition Tec et Doc. Lavoisier, p 248.
- [67]. **Barnabe G., 1991.** L'aquaculture, Edition Lavoisier, Paris volume 1, 2^{ème} édition, Technique et documentation, 12,95p.
- [68]. **Shafée. M.S., 1999.** Pêche des bivalves sur la cote Méditerranéenne. Institut agronomique et vétérinaire, Hassan Rabat, Maroc. 63P.
- [69]. **Barillet Sabrina., 2007.** Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*danio rerio*). Thèse de doctorat, université Paul Verlaine de Metz, 475p.
- [70]. **Davenport. , Woolmington, A.D.,** “A new method of monitoring ventilator activity of mussels and its use in a study of the ventilator pattern of *Mytilus edulis*”, J. Exp. Biol .Ecol, (1982), 62, pp 55-67.
- [71]. **Manly, A.R.,** “The effects of copper on the behaviors, filtration and ventilation activity of *Mytilus edulis*”.J.Mar.Biol.Ass.U.K, (1983), 63, pp 205-222.

- [72]. **Aminot A., et K erouel R., 2004.** Hydrologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses. *Edition : Ifremer, France, 336 P.*
- [73]. **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr N.J., Randall R.J.,** “Protein measurements with the Folin phenol reagent”, *J. Biol. Chem.* (1951), 193, 265–275.
- [74]. **G l zar A., Ozlem A., Seyhan T., Mustapha C.,** “ Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*”, Elsevier. 143, (2006), pp 218-224.
- [75]. **Ranilson S., Eduardo J., Rodrigo B., Patricia M., Maria E., Luana C., Coelho L, 2005.** Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry* 40, 1826-1834. Elsevier.
- [76]. **Pellerin-Massicotte, J.,** “Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves”, *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 3, (1994), 101-111.
- [77]. **Soumady ,D., Asokan,S.,** “A Study on Protein Content in Selected Organs of *Perna viridis* at Tranquebar Coastal Waters, Tamilnadu, India”, *World Journal of Zoology*, 6 (4),(2011), 360-363.
- [78]. **Choi, C.Y., An, K.W., An, M.I.,** “Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)”, *Comp. Biochem. Physiol*, (2008), 149, 330-337.
- [79]. **Borthagaray AI, & Carranza A (2007)** Mussels as ecosystem engineers: their contribution to species richness in a rocky littoral community. *Acta Oecologica*,31(3), 243-250.
- [80]. **Vidal-li n n L., Bellas J., Campillo J.A., Beiras R., 2010.** Intergrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 78, 265-272. Elsevier.
- [81]. **Ribeyre F, Boudou A. 1989.** Trophic chains and experimental ecosystems: study of bioaccumulation and transfer processes. In: A. Boudou & R. Ribeyre (eds). *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies*, CRC Press, Boca Raton, FL.1, 3-46.
- [82]. **VINDIMIAN Eric. 2001.** La surveillance biologique des impacts toxiques dans l’environnement. *Cellular and Molecular Biology* 47,67-79.
- [83]. **Almeida J.A., Diniz Y.S., Marquesa S.F.G., Faine L.A., Ribasc B.O., Burneikob R.C., Novellib E.L.B., 2002.** The use of the oxidative stress responses as

biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International* 27, 673–679, Elsevier.

[84]. Linde-Arias Ana Rosa., Alan F. Inácio., Carla de Albuquerque., Marina M. Freire., Josino C. Moreira., 2008. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of the total environment* 399, 186 – 192. Elsevier.

[85]. BELHAOUARI Benkhedda 2012. Etude écotoxicologique chez un Gastéropode marin , *Osilinus turbinatus* (Born, 1780) dans le littoral algérien occidental Thèse de doctorat, Université d'Oran.

[86]. FOURNIER Elodie. 2005. Bioaccumulation du sélénium et effets biologiques induits chez le bivalve filtreur *Corbicula fluminea*. Prise en compte de l'activité ventilatoire, de la spéciation du sélénium et de la voie de contamination. Thèse de doctorant, université Bordeaux 1, 252p.

[87]. Hülya Durmaz., Yusuf Sevgiler., Nevin Üner., 2006. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84, 215–226. Elsevier.

[88]. F Akcha., C Izuel., P Venier., H Budzinski., T Burgeot., J-F Narbonne., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 49, 269–287. Elsevier.

[89]. G Damiens., E His., M Gnassia-Barelli., F Quiniou., M Roméo., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138(2), 121-128.

[90]. Sandra M. Monteiro., Juan M. Mancera., Antonio Fontainhas Fernandes., Mario Sousa., 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 141, 375 – 383. Elsevier.

[91]. Nevin Üner., Elif Özcan Oruç., Yusuf Sevgiler., Nesli Şahin., Hülya Durmaz., Demet Usta., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21, 241–245. Elsevier.

[92]. Dabbadie L., 1996. Etude de la viabilité d'une pisciculture rurale à faible niveau d'intrant dans le centre ouest de la Côte d'Ivoire : approche du réseau trophique. Thèse de doctorat, université Paris 6, 214 p.

- [93]. **Cenac A, Simonoff M and Djibo A.1996**, Nutritional status and plasma trace elements in peripartum cardiomyopathy. A comparative study in Niger. *J Cardiovasc Risk* 3:483-487.
- [94]. **CHARO-KARISA Harrison. A. REZKC Mahmoud. BOVENHUISB Henk. KOMEN Hans .2005**. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. *Aquaculture* 249, 115-123.Elsevier.
- [95]. **Pullin R.S.V., Lowe Me Connel R.H., 1982**. The biology and culture of tilapias. ICLARM Conference Proceedings, 7 Manila, Philippines, 432p.
- [96]. **LEMARIE Gilles. BAROILLER Jean Francois. CLOTAC Frederic. LAZARD Jerome. DOSDATA Antoine. 2004**. A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application. *Niloticus and S. Melanotheron*. *Aquaculture* 240,575-587. Elsevier.
- [97]. **HELENE J. 2006**. Manger ou Nager faut-il choisir, Influence de la demande métabolique sur la hiérarchisation des fonctions chez le Bar *Dicentrarchus labrex*. UMR :24p.
- [98]. **Ron van der Oost., Jonny Beyer., Nico P.E. Vermeulen., 2003**. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149. Elsevier.
- [99]. **Veltman Karin. Hendriks Jan. Huijbregts Mark. Pim Leonards. Van Den Heuvel- Greve Maritine. Vethaak Dick.2005**. Accumulation of organochlorines and brominated flame retardants in estuarine and marine food chains : field measurements and model calculations. *Marine Pollution Bulletin* 50,1085-1102.
- [100]. **Kumar Shefali., Kumar Mohit. Thurow kerstin . Stoll Regina. KRAGL Udo.2008**. Fuzzy filtering for robust bioconcentration factor modelling. *Environnemental modelling & Software* xxx, 1-10. Elsevier.
- [101]. **K.M. Lai. M.D.Scrimshaw.J.N.Lester.2002**. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *The Science of the Total Environment*289, 159-168. Elsevier

GLOSSAIRE

A

Abiotique : désigne dans toute entité écologique, ce qui est de nature strictement physico-chimique, ou encore minéral lorsqu'il s'agit de la dimension géologique d'un biotope (Ramade, 1998).

Aigue : qui se manifeste sur une courte période (en seconde, en minute, en heure ou quelques jours relativement à la durée du cycle de vie de l'organisme).

Anthropique : Relative à l'activité humaine.

Auto-épuration : Ensemble des processus biologique, chimique ou physiques permettant à un écosystème (rivière, lacs, mer et océan...) de transformer lui-même les substances le plus souvent organique qu'il produit ou qui lui sont apportées de l'extérieur.

B

Bioaccumulation : processus par lequel les substances chimiques sont emmagasinées par les organismes aquatiques directement à partir de l'eau ou via la consommation de nourriture contenant ces substances.

Bioconcentration : Accumulation par l'organisme aquatique de substances à une concentration supérieure à celle mesurée dans l'eau. Cette accumulation est estimée au travers d'un facteur appelé * facteur de bioconcentration*, égal au rapport de la concentration de cette substance dans les tissus de l'organisme divisé par sa concentration dans l'eau.

Biodégradable: Composé chimique qui peut être naturellement dégradé, assimilé par les agents biologiques.

Bio-disponible : fraction de la quantité totale d'un produit chimique dans l'environnement qui peut être absorbée par des organismes. Cet environnement peut être constitué d'eau, de sédiments, de particules en suspension ou d'aliments.

Bioessai : Test expérimental réalisé pour identifier le potentiel toxique d'une substance ou d'un mélange de substances par la réponse biologique de l'organisme test.

Bioindicateur : désigne des espèces biologiques ou animal, qui de fait de leur particularités écologiques, constituent l'indice précoce de modifications biologiques ou abiotiques de l'environnement dues à des activités humains (ex : les moules)

Biomarqueur : Mesure de changements observables à différents niveaux d'organisation biologique permettant de révéler l'exposition à une substance chimique à caractère polluant et/ou les effets biologiques induits.

Biotique : désigne tout ce qui est propre à la vie.

Biotope : faciès, milieu défini, où vit une espèce.

N

Néritique : Qualifie la zone marine peu profonde, située au dessus de la plateforme continentale. Par extension ce vocable qualifie tout organisme ou formation qui se trouve dans cette province.

S

Stress : Ensemble des réactions non spécifiques de l'organisme déclenchées par l'action d'un agent nocif dit : « agent stressant » qui peut être physique, chimique ou émotionnel et qui s'exerce sur l'organisme et provoque une agression ou une tension pouvant devenir pathologique.

T

Toxicité aiguë : Cette toxicité est évaluée par le biais de tests de courte durée comparativement à la durée de vie de l'organisme soumis à l'essai (généralement moins de quatre jours pour les poissons).

Toxicité chronique : Cette toxicité est évaluée par le biais de tests de couvrant une partie appréciable de la vie de l'organisme soumis à l'essai et permettant d'examiner les effets sur certains paramètres tels que le métabolisme, la croissance, la reproduction et la survie.

X

Xénobiotique : Substance chimique étrangère à l'organisme (**Xéno = étranger, bio = vie**) Et se comportant comme un toxique ou un allergène vis-à-vis de l'organisme même à faible concentration.