



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière: Hydrobiologie Marine et Continentale

Option : Ecosystèmes Aquatiques

Thème

Contribution à l'étude de la toxicité du pesticide Linuron et des
microplastiques sur les moules « *Mytilus galoprovincialis* »

Présenté par:

Soutenu le: 30/06/2024

BOUKHALFA Yasmine

HADDAD Meriem

Devant le jury:

Mme. OURIACHE H.

MCB /USDB1

Présidente

Mr. HACHOUR K.

MAB/USDB1

Examineur

Mme. BELMESKINE H.

MCA/USDB1

Promotrice

Mr. MEKNACHI A.

Chercheur/CNRDPA

Co-promoteur

Année universitaire: 2023 /2024

REMERCIEMENT

Avant tout on remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté d'entamé et de terminer ce mémoire.

On voudrait remercier notre directrice de mémoire Mme HAYET BELMESSKINE pour la qualité de son encadrement. Ce travail ne serait pas aussi riche sans l'encadrement de monsieur ABDELLAH MEKNACHI pour son disponibilité exceptionnel et sa patience durant notre préparation de ce travail, pour son suivi et aide très précieux. Un grand nombre de ses remarques pertinentes a amélioré la présentation et la clarification de ce manuscrit.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres du jury qui ont bien voulu évaluer ce travail :

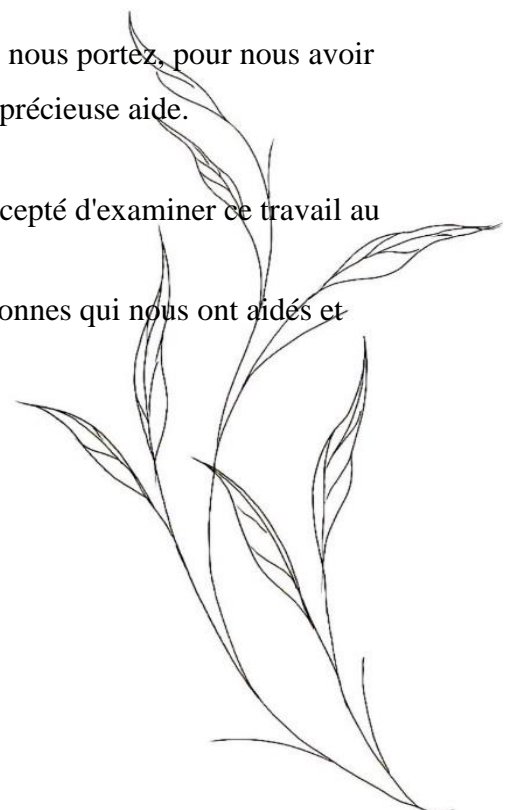
Mme OURIACHE à la présidence de ce jury et Mr. HACHOUR.K de nous avoir examiné.

Nous tenons nos remerciement a Monsieur KOURDALI S. Attaché de recherche au CNRDPA- Bou-Ismaïl pour ses conseils enrichissants, merci de nous avoir permis de profiter de son expérience et professionnalisme.

Un grand merci à IAYED.M pour tous les sentiments que vous nous portez, pour nous avoir chaleureusement accueillis, pour son aimable et précieuse aide.

Nous sommes reconnaissantes pour le grand honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail au

Nos profonds remerciement vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenus de près ou de loin.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes parents

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour, dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mes sœurs " Maria et Nour ".

A mes frères " Oussama et Abdellah ".

A mes chères cousines " Chaïmaa, Khaoula, Rîmas, Rahma".

A toute ma famille.

A tous mes amies

A mon cher binôme Meriem ensemble nous avons pu faire ce travail et avec qui j'ai partagé de bons moments. Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.



Yassmine

Dédicace

Je dédie ce travail

A Mes chers parents

A ma famille.

A mes amies.

*A mon binôme Yasmine qui a fait de ce travail une expérience
exceptionnelle*

*A tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin pour l'achèvement ce
travail.*

Meriem

Résumé

Ce présent travail consiste à étudier l'effet d'une exposition aiguë de *Mytilus galloprovincialis* à deux concentrations de pesticide "linuron" (les concentrations de 50 et 100µg/L), et les microplastiques "MPS"(les concentrations de 10 et 15µg/L) sur les activités métaboliques, enzymatiques (catalase, protéase) et les réserves protéiques.

Les résultats montrent une perturbation générale du métabolisme sous l'effet des polluants "linuron et microplastique" (augmentation des teneurs d'azote ammoniacal, du nitrite et aussi avec les teneurs en protéine).

L'exposition aux différents types de contaminants de la présente étude a conduit à une induction significative de l'enzyme de défense catalase entre (61.99 et 88,90 Unité/ml) et ce par rapport au témoin (40.64U/ml) au 4^{ème} jour d'exposition.

La catalase et la protéase étaient induites rapidement (Les activités maximales) par l'effet synergique de pesticide "linuron" et MPS, une corrélation positive entre l'activité enzymatique et les concentrations du pesticide "linuron" et les Microplastiques ont été établie même en faible concentration.

Cette étude permet de qualifier la catalase et la protéase comme biomarqueurs de défense pertinent, sensible, rapide et efficace dans l'évaluation de l'état de santé du milieu environnant, cependant plus d'études doivent être faites sur les activités métaboliques et les réserves énergétiques.

Mots clés : Microplastique, Linuron, *Mytilus galloprovincialis*, Catalase, Protéase.

Abstract

This study aimed to investigate the acute effects of *Mytilus galloprovincialis* exposure to two concentrations of the pesticide "linuron" (concentration of 50 and 100 µg/L), and microplastics "MPS" (concentration of 10 and 15 µg/L), on metabolic activities, enzymatic activities (catalase, protease), and protein reserves.

The results show a general perturbation of metabolism under the influence of the pollutants "Linuron and microplastic" (increased ammonia nitrogen, nitrite, and protein levels).

Exposure to the different types of contaminants in the present study led to a significant induction of the defense enzyme catalase between (61.99 and 88.90 U/ml) compared to the control (40.64 U/ml) in the 4th day of exposure.

Catalase and protease were rapidly induced by the synergistic effect of the pesticide "linuron" and Microplastic, and a positive correlation was established between enzymatic activity and concentrations of the pesticide "linuron" and Microplastics (maximum activities), even at low concentrations.

This study allows us to qualify catalase and protease as relevant defense biomarkers, sensitive, rapid, and effective in evaluating the health status of the surrounding environment. However, more studies are needed on metabolic activities and energy reserves.

Keywords: Microplastic, Linuron, *Mytilus galloprovincialis*, Catalase, Protease.

ملخص

يهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير التعرض الحاد قصير المدى على الميتيلوس جالوبرونسيس لتركيزين مختلفين من المبيد الحشري "لينورون" (تراكيز 50 و100 مكغ/ل). و البلاستيكات الدقيقة (تراكيز 10 و15 مكغ/ل) على الأنشطة الايضية والانزيمية (الكاتالاز و البروتياز) واحتياطي البروتينات.

أظهرت النتائج اضطرابا عاما في الأنشطة الايضية تحت تأثير الملوثات " لينورون و البلاستيك الدقيق" (زيادة في قيم نيتروجين الأمونيا، النترت وكذلك بالنسبة لقيم البروتين).

أدى التعرض لأنواع مختلفة من الملوثات في هذه الدراسة الى تحفيز كبير لانزيم الكاتالاز الدفاعي بين (61.66 و88.90 وحدة / مل) مقارنة بالشواهد (40.64 وحدة / مل) في اليوم الرابع من التعرض.

تم تحفيز الكاتالاز والبروتياز بسرعة نتيجة التأثير المزدوج للمبيد "لينورون" و البلاستيكات الدقيقة، حيث اصبحت علاقة طردية بين النشاط الأنزيمي وتراكيز المبيد "لينورون" و البلاستيكات الدقيقة، حتى عند التراكيز المنخفضة .
تؤهل هذه الدراسة الكاتالاز والبروتاز كمؤشرات حيوية دفاعية حساسة، سريعة، وفعالة في تقييم حالة الصحة البيئية للمحيط. ولكن يجب اجراء المزيد من الدراسات على الأنشطة الايضية واحتياطات الطاقة.

الكلمات المفتاحية: البلاستيكات الدقيقة، لينورون، ميتيلوس جالوبرونسيس، كاتالاز، البروتياز.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de transfert des pesticides vers les eaux de surfaces et souterraines en milieux agricole et urbain.....	8
Figure 2 : Structure moléculaire du Linuron.....	9
Figure 3 : Proposition de nomenclature des débris plastiques selon la taille.....	12
Figure 4 : Endocytose.....	12
Figure 5 : Persorption	13
Figure 6 : Structures moléculaires du PE, du PS et du PP et du PVC.....	13
Figure 7 : L'espèce <i>Mytilus galloprovincialis</i>	19
Figure 8 : Vue interne de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	20
Figure 9 : place des biomarqueurs dans l'évaluation de la contamination de l'environnement.....	22
Figure 10 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateur de leur production.....	24
Figure 11 : Dispositif expérimental.....	28
Figure 12 : schéma de Dispositif expérimental.....	29
Figure 13 : Planning expérimental des tests d'écotoxicité de courte durée.....	30
Figure 14 : Analyseur à flux continu.....	32
Figure 15 : Procédures expérimentales des dosages biochimiques.....	33
Figure 16 : Suivi de la variation de la salinité de l'eau durant l'expérience.....	38
Figure 17 : Suivi de la variation du pH de l'eau durant l'expérience.....	39

Figure 18 : Suivi de la variation de la température de l'eau durant l'expérience.....	40
Figure 19 : suivi de la variation de l'oxygène dissout dans l'eau durant l'expérience.....	40
Figure 20 : Étude de l'effet conjugué de la contamination par linuron et MPs sur l'excrétion phosphorée.....	41
Figure 21 : Étude de l'effet conjugué de la contamination par linuron et MPs sur les teneurs en nitrites.....	42
Figure 22 : Étude de l'effet conjugué la contamination par linuron et MPs sur les teneurs en azote ammoniacale.....	43
Figure 23 : Étude de l'effet de linuron et les MPs sur les teneurs en protéines des moules au cours du cycle de toxication et de détoxication.....	44
Figure 24 : Variation de la réponse catalase chez la moule <i>Mytilus galloprovincialice</i> en fonction des jours.....	45
Figure 25 : Evolution de l'activité protéase durant la période d'étude.....	47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents types de pesticides.....	6
Tableau 2 : Les propriétés physico-chimiques du linuron.....	10
Tableau 3 : Certaines applications des polymères.....	14

Liste des abréviations

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

EOA : Espèces oxygénées activées.

CAT : Catalase.

SOD : Superoxyde dismutase.

T : Température.

MPs : Microplastiques.

DO₂ : Oxygène dissous.

PP: Polypropylène.

EOA: Espèces oxygénées activées

SOMMAIRE

Résumés

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Sommaire

Introduction.....1

CHAPITRE I : Revue bibliographique

I.1. La pollution marine

1.1.1	Définition.....	3
1.1.2	Les sources de la pollution.....	3
1.1.3	Les différents contaminants de l’eau de mer.....	4
1.1.3.1	Les polluants physico-chimiques.....	4
1.1.3.2	Les polluants microbiologiques	5
1.1.4.	les pesticides dans le milieu marin.....	5
1.1.4.1.	Les pesticides : types et domaines d'applications	5
1.1.4.2.	la contamination de l’eau de mer par les pesticides.....	8
1.1.4.3.	Le pesticide «Linuron»	8
1.1.5.	Les micros plastiques dans le milieu marin.....	11
1.1.5.1.	Le mode d’action.....	12
1.1.5.2.	Composition, propriétés et utilisation.....	13
1.1.6.	Les effets de linuron et MPs sur la santé humaine.....	16

I.2. La surveillance de la qualité du milieu aquatique.....16

1.2.1.	La surveillance chimique.....	16
1.2.2.	La surveillance biologique (Bio surveillance).....	17
1.2.3.	Les bio indicateurs.....	17
1.2.3.1.	Présentation de l’espèce <i>mytilusgalloprovincialis</i>	18
1.2.4.	Les biomarqueurs de stress.....	21
1.2.4.1.	Le stress oxydant.....	22
1.2.4.2.	Activités enzymatiques (enzymes antioxydants).....	23
1.2.5.	Les tests écotoxicologiques	25

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

II.1. Présentation de la zone d'étude.....	26
II.2. Matériels utilisés.....	27
II.3. Préparation expérimentale.....	27
II.4. Les tests écotoxicologiques.....	29
II.4.1. Stratégie, démarche et dispositif expérimental.....	29
II.4.2. Méthodes et protocoles analytiques.....	30
II.4.2.1. Mesure des paramètres physicochimiques.....	30
II.4.2.2. Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée.....	31
II.4.2.3. Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses biochimiques.....	32
II.4.2.4. Dosages des protéines.....	34
II.4.2.5. Dosages de la Catalase.....	35
II.4.2.6. Dosage de la protéase.....	35

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Résultats de mesure des paramètres physico-chimiques.....	37
III.1.1. Résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques préliminaires des moules et de leur eau d'élevage.....	37
III.1.2. Résultats des paramètres physicochimiques au cours des cycles expérimentaux.....	38
III.1.3. Étude de l'effet des polluants (linuron et MPs) sur l'excrétion Azotée et Phosphorée (eau d'élevage).....	41
III.2. Résultats des dosages biochimiques et enzymatiques.....	44
III.2.1. Résultats des dosages biochimiques des protéines.....	44
III.2.2. Résultats du dosage de la catalase.....	45
III.2.3. Résultats du dosage de la protéase.....	46

CONCLUSION	49
-------------------------	----

Références bibliographiques	51
--	----

Annexes	59
----------------------	----

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La pollution présente un danger énorme sur les écosystèmes. Elle touche l'air, le sol et l'eau. La contamination de ces milieux affecte directement la santé de l'homme et d'autres êtres vivants à la fois et provoque ainsi un déséquilibre écologique.

La pollution des écosystèmes marins et littoraux est un problème environnemental, ces milieux sont affectés d'une façon ou d'une autre par le développement technologique des villes, les rejets agricoles, urbains et industriels qui conduisent à une pollution agressive. Aujourd'hui, les milieux aquatiques drainent et recueillent la majorité de contamination. A cause de ces rejets, la mer méditerranée est classée parmi les sept mers les plus menacées (**Boudouresque, 1996**).

En particulier, les substances chimiques susceptibles de constituer un danger pour la vie aquatique, les hydrocarbures, les pesticides, les détergents, de divers composés de synthèse et les métaux lourds...etc., (**Wingforset al, 2006**). En conséquence, ils affectent les organismes en s'accumulant dans leurs corps ou par leur transfert à travers la chaîne alimentaire.

Des programmes de recherche et de surveillance ont été mis en œuvre permettant de détecter la présence des contaminants dans le milieu naturel, ainsi que de déterminer la réponse biologique des êtres vivants aquatiques aux polluants (**Moore et al, 2004**) tel que, le Mussel Watch Projet aux Etats-Unis (**Wade et al, 1998**). Ces programmes visent l'influence des polluants sur des espèces bio-indicatrices, par des modifications comportementales modifieront leurs capacités à s'alimenter, à se reproduire et certainement par une surmortalité, qui conduise à des perturbations au niveau des chaînes trophiques.

En effet, les organismes aquatiques en particulier les mollusques bivalves tels que les moules, sont des modèles d'intérêt pour étudier les effets biologiques des polluants. Les bivalves filtreurs constituent d'excellents bio-accumulateurs car ils sont capables d'accumuler et de concentrer des niveaux élevés d'éléments métalliques et de composés organiques présents dans leur environnement avec des réponses physiologiques observables. La physiologie des bivalves est relativement bien étudiée et répondent aux critères d'espèce cible pour des applications de surveillance. Ils ont tendance à s'établir dans des régions où des espèces moins robustes ne peuvent pas survivre (**Cossa, 1985 ; Lopez-Barea et Pueyo, 1998**).

INTRODUCTION

Selon Alexandre Beaudry (2016), Les bivalves sont des organismes filtreurs largement utilisés en écotoxicologie afin de mieux comprendre les impacts de l'activité humaine sur l'environnement et les risques que cela représente.

Dans cette optique de biomonitoring, le Centre National de la Recherche et du Développement de la pêche 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.

Le présent travail consiste à l'utilisation des mollusques bivalves espèces « *Mytilus galloprovincialis* » comme bioindicateur.

Il se veut une étude du biomarqueur catalase, protéine et protéase autant que réponse biologique à un stress induit par une exposition aiguë au pesticide (linuron) et aux microplastiques chez la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* dans un but de savoir l'effet de pesticide et les microplastiques sur les moules.

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

- Le premier chapitre se veut une synthèse bibliographique des notions de pesticides notamment linuron et les microplastiques, le stress oxydant, les biomarqueurs et les tests écotoxicologiques.
- Le deuxième chapitre sera consacré au matériel et méthodes 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.
- La conclusion, on fait une conclusion qui couronne le travail.

CHAPITRE I :
Revue bibliographique

I.1. La pollution marine

1.1.1. Définition

La pollution marine a été définie par la Commission Océanographique Internationale de l'UNESCO comme étant :

“l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, de substances ou d'énergie dans l'environnement marin pouvant entraîner des effets délétères, tels que dommages aux ressources biologiques, dangers pour la santé humaine, entraves aux activités maritimes, y compris les pêcheries, détérioration des qualités de l'eau de mer pour son utilisation et réduction des possibilités dans le domaine des loisirs.”

1.1.2. Les sources de la pollution

1.1.2.1. Pollution domestique : C'est une pollution due principalement aux rejets domestiques (eaux domestiques, eaux collectives de lavage, médicaments périmés fécales ...etc.). Elle est liée aux grandes concentrations urbaines. Les eaux usées des habitations et des commerces entraînent la pollution urbaine de l'eau. Les polluants urbains sont représentés par les déchets domestiques, les eaux d'égouts, les restes d'aliments, les déversements d'abattoirs, les déversements hospitaliers, les lessives, les détergents, les insecticides, les hydrocarbures, les déchets de la petite industrie et divers produits toxiques dont se débarrassent les habitants d'une agglomération. Le flot déversé est très variable en fonction de l'importance de l'agglomération et de son activité (**Habbar, 2005**).

1.1.2.2. Pollution industrielle : Les besoins industriels en eaux sont considérables, ce qui constitue un volume d'eau résiduaire important. Leur composition est extrêmement variable puisqu'elles sont susceptibles de receler les pertes de tout ce qu'il est possible de fabriquer (**Roquer, 1980**).

1.1.2.3. Pollution agricole : Provenant des fermes ou des cultures, elle se caractérise par des fortes teneurs en sels minéraux (azote, phosphore, potassium) provenant :

- Des engrais.

Chapitre I : Revue bibliographique

- Des purins et lisiers (élevage)
- La présence de produits chimiques des traitements (Ex. : Pesticides) (**Gaujous, 1995**)

1.1.3. Les différents contaminants de l'eau de mer

1.1.3.1. Les polluants physico-chimiques

- **La pollution physique** : Elle est due à une charge importante des eaux en éléments fins qui demeurent en suspension : particules de charbon et de silice, sable, limons, provenant d'effluents industriels ou d'eaux issues de chantiers (**Aminot et guillaud, 1993**).
- **La pollution chimique**
 - **Les matières organiques** sont les principaux polluants des milieux aquatiques. Elles proviennent des déchets domestiques, de l'agriculture, ou de l'industrie. Certaines Substances organiques sont facilement biodégradables et peuvent donc être décomposées et éliminées grâce aux capacités naturelles d'autoépuration des milieux aquatiques. Les composés azotés contribuent à la pollution organique, suite à la dégradation de l'urée, et des acides aminés. Ce sont d'abord les formes ammoniacales qui dominent en milieu désoxygéné ; la fraction d'ammoniaque non dissociée (NH_4) est toxique pour le poisson. Lorsque les eaux sont ré-oxygénées, l'ammoniaque se transforme en nitrates, avec un stade intermédiaire ; les nitrites (eux-mêmes toxiques). L'oxydation des matières organiques donne de l'anhydride carbonique et de l'eau, et celle des composés minéraux de l'azote aboutit à des substances quaternaires. Elle conduit à une consommation de l'oxygène de l'eau, renouvelé par l'oxygène de l'air. En principe, les matériaux carbonés sont utilisés comme nutriments par les germes aérobies ; les ions ammonium sont oxydés (par les nitrosomonas) en nitrites, ceux-ci étant à leur tour oxydés (par les nitrobacters) en nitrates (**Rodier et al. 2009**). Ainsi, les impacts de la pollution organique sont très importants sur les écosystèmes aquatiques.

Les métaux : Les éléments métalliques se trouvent dans notre environnement quotidien sous des formes chimiques très diverses et en faible concentration. Ils peuvent former des liaisons métalliques et perdre des électrons pour former des cations avec des précipités non solubles (**Lacoue-Labarthe, 2007**). Les principaux métaux lourds sont :

Chapitre I : Revue bibliographique

l'arsenic(As), le cadmium (cd), le chrome (Cr), le mercure(Hg), le nickel(Ni), le plomb(Pb), le sélénium(Se), et le zinc(Zn). Mais ces éléments sont présents dans tous les compartiments de l'environnement en quantités faibles. Cependant, d'autres comme le cuivre, le zinc sont essentiels à la majorité des organismes vivants (**Bryan, 1984**). Lorsque ces métaux dépassent la quantité normale, ils entraînent la perturbation des systèmes et surtout la pollution des ressources en eau (**Thomazeau, 1981**).

1.1.3.2. Les polluants microbiologiques

Un grand nombre de microorganismes peut proliférer dans les eaux et les milieux naturels grâce aux conditions favorables que l'homme a créées. Les principaux microorganismes pathogènes qui se multiplient ou qui sont Transportés dans l'eau provoquent des maladies dangereuses et même des effets néfastes Comme : les bactéries pathogènes par exemple Bactéries Legionella peuvent provoquer la Légionellose (infection pulmonaire). Et même des maladies hydriques (origine bactérienne) Tel que : Fièvre typhoïde et paratyphoïde qui sont causés par *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphoïde* A, B et C (**Belaid et Redjimi., 2013**).

Au cours de ces dernières années, le barrage de Zeralda en Algérie a noté une prolifération de quelques espèces cyanobactériennes tel que : *Planktothrix agardhii*, *Microcystis wesenbergi* et *Chamaesiphon polymorphus*. Ces espèces peuvent produire des toxines dans l'eau comme le macrocystis et d'autres toxines qui ont un effet mortel sur la biodiversité Aquatique (**Bidi-Akli, 2014**).

1.1.4 les pesticides dans le milieu marin

1.1.4.1 les pesticides : types et domaines d'application

Les pesticides sont destinés à protéger les plantes cultivées et les récoltes des attaques d'insectes, d'acariens, de rongeurs champêtres et de celles des champignons parasites, et à détruire les adventices : ce sont les produits « phyto-pharmaceutiques ».

D'un point de vue réglementaire, on distingue les pesticides utilisés principalement pour la protection des végétaux que l'on appelle produits **phyto-pharmaceutiques** (relevant de la directive 91/414/CE) ou plus communément produits phytosanitaires, des autres dénommés **biocides** (définis notamment dans la directive 98/8/CE). Une autre catégorie est constituée par

Chapitre I : Revue bibliographique

les produits utilisés comme médicaments vétérinaires ou pour la santé humaine (Devillers et al, 2005).

Les pesticides comprennent une vaste gamme de produits. Le tableau ci-après énumère certains pesticides courants, leur usage et les produits dans lesquels on les trouve normalement. Il existe de nombreux types de pesticides (**Tableau 1**) :

Tableau 1 : Les différents types de pesticides

Catégorie	Usage	Exemples
Insecticides	Détruisent ou repoussent les insectes, les tiques et les mites.	. Insectifuges . Appâts pour souris et blattes .Poudre ou liquide à vaporiser pour le jardin . Produits commerciaux à vaporiser pour fermes/vergers . Shampoing contre les puces, colliers contre les puces et les tiques . Boules-à-mites
Herbicides	Détruisent les mauvaises herbes ou les plantes indésirables.	. Herbicides ou désherbants . Produits d'entretien du gazon (engrais et herbicides)

Chapitre I : Revue bibliographique

		. Traitements pour souches/pour plaies d'élagage
Fongicides	Détruisent les moisissures, le mildiou et autres champignons.	. Liquides à vaporiser pour roses et fleurs . Produits commerciaux à vaporiser pour fermes/vergers . Grains traités . Adjuvants de peinture
Rodenticides	Détruisent les rongeurs tels que les souris et les rats.	Points d'appâts pour souris et rats
Désinfections	Détruisent les bactéries, les moisissures et le mildiou.	. Javellisant . Ammoniaque . Détersifs pour cuisine et salles de bain . Détersifs pour piscines et spa
Produits de préservation du bois	Protègent le bois contre les insectes et les champignons.	Bois traité sous pression.

1.1.4.2. La contamination de l'eau de mer par les pesticides

Le milieu aquatique est le récepteur ultime de nombreux contaminants toxiques d'origine anthropique. L'agriculture est actuellement à l'origine d'une pollution de l'eau préoccupante dans beaucoup de pays dont les pays méditerranéens (Keddal, 2007). Les pesticides et leurs résidus sont parmi les composés qui affectent le plus les écosystèmes et les organismes aquatiques (Shahidul et Tanaka, 2004), et qui peuvent entraîner la présence de produits de transformation dans les écosystèmes aquatiques présentant un risque potentiel ou réel similaire ou plus élevé que le pesticide d'origine.

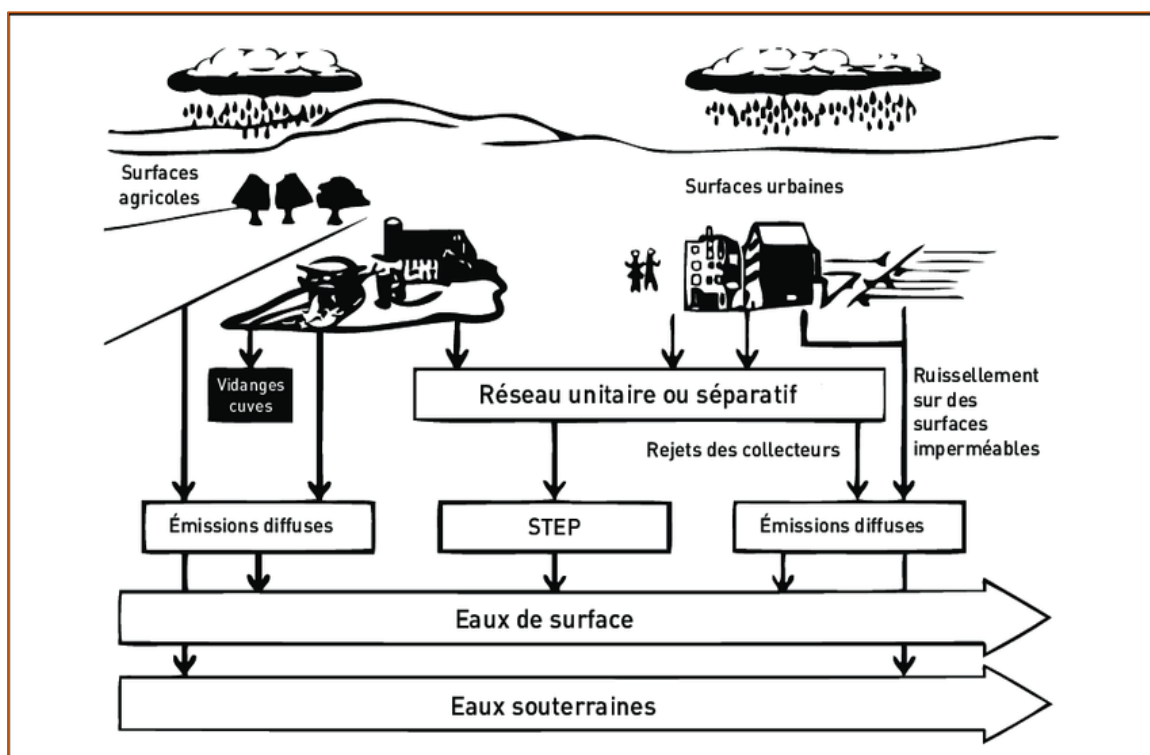


Figure 1 : Schéma de transfert des pesticides vers les eaux de surfaces et souterraines en milieux agricole et urbain (botta et al. 2009, d'après burkhardt et al. 2007).

1.1.4.3 Le pesticide «Linuron»

Le Linuron ($C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$) est une phényl-urée substituée à action herbicide dont le nom et le numéro CAS sont N-(3, 4-dichlorophényl)- N-méthoxy-N-méthylurée et 41205-21-4,

Chapitre I : Revue bibliographique

respectivement. Le Linuron pur est un solide cristallin incolore dont l'hydrosolubilité est de 81 mg·L⁻¹ à 24 °C et le coefficient de partage du carbone organique (K_{co}) est de 2,83. Le Linuron est vendu sous diverses appellations commerciales, dont Afalon et Lorox, et entre dans la composition du Dulain, un produit formulé qui renferme également du métolachlore. Le

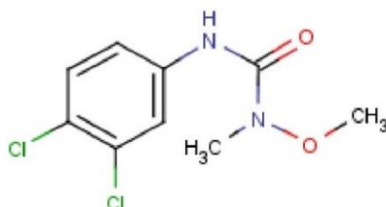


Figure 2 : Structure moléculaire du Linuron (WSSA, 1989).

Linuron est un produit homologué utilisé pour lutter contre diverses mauvaises herbes annuelles dans les cultures de grande production et les cultures de jardin, comme le maïs, les carottes, les pommes de terre, les arbres fruitiers, le blé, l'avoine et l'orge (Du Pont, 1991 ; Tomlin, 1994). Les usages homologués non agricoles du Linuron comprennent l'éradication des dicotylédones, des mauvaises herbes résistantes à la triazine et des graminées annuelles qui envahissent les gazons, les plantations brise-vent et les emprises routières (WSSA, 1989).

- **La contamination des milieux aquatiques par le Linuron**

Les milieux aquatiques peuvent être contaminés directement, par épandage du produit, ou indirectement, sous l'effet de la dérive de brouillards de pulvérisation, de la lixiviation, du ruissellement pluvial et de phénomènes de dépôt sec ou humide. Les déversements et les opérations de vidange des réservoirs et de lavage des équipements peuvent entraîner une très grave contamination. Compte tenu de l'hydrosolubilité et du K_{co} moyens du Linuron. Le risque que ce produit soit lixivié dans le sol et contamine l'eau souterraine serait préoccupant (McRae, 1991). En 1 mois, 94 % du Linuron pulvérisé sur la surface d'un sol 1 jour après le semis étaient disparus par lixiviation, ruissellement et photodégradation (Abraham et coll., 1987). D'autres études ont toutefois montré que le linuron est rapidement adsorbé dans les sols riches en matières organiques et se dissipe surtout sous l'effet d'une dégradation microbienne (Grover, 1975 ; Heinonen-Tanski, 1989).

Chapitre I : Revue bibliographique

Le Linuron est absorbé par les racines des plantes et transporté passivement par le xylème vers les feuilles, où il inhibe la photosynthèse en perturbant le fonctionnement du photosystème (le transport d'électrons dans la photosynthèse) (USEPA, 1984). Le Linuron présente ordinairement une efficacité maximale lorsqu'il est appliqué sur le sol, l'absorption du produit par les feuilles et sa translocation à partir de celles-ci étant faibles (Bayer et Yamaguchi, 1965). Le caractère sélectif de la phytotoxicité du Linuron provient des différences qui existent entre les caractéristiques d'absorption, de translocation et de métabolisation de chaque espèce végétale (MAAO, 1989). Les plantes résistantes dégradent ou métabolisent le Linuron par N-désalkylation, désamination, décarboxylation ou libération de 3,4-dichloroaniline (McEwen et Stephenson, 1979).

- **Propriétés physico-chimiques**

Les propriétés physico-chimiques du Linuron sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Les propriétés physico-chimiques du Linuron (DG SANCO, 2002)

	Valeurs	Source
Poids moléculaire [g/mol]	249.1	DG SANCO, 2002
Hydrosolubilité [mg/L]	52.7 à pH = 5 63.8 à pH = 7 74.5 à pH = 9	
Pression de vapeur [Pa]	$5.1.10^{-3}$ à 20°C	
Constante de Henry [Pa.m³/mol]	2.10^{-4}	
log du coefficient de partage Octanol-eau (log Kow)	3	
Coefficient de partage carbone organique-eau (Koc) [L/kg]	555 – 987	
Constante de dissociation (pKa)	Pas d'information disponible.	

1.1.5 Les micros plastiques dans le milieu marin

Les microplastiques primaires proviennent des cosmétiques et des usines libérant des pastilles de résine plastique alors que les microplastiques secondaires sont générés par les touristes et les pêcheurs, par l'industrie de démantèlement des navires et les abrasifs industriels, ainsi que par les plastiques lessivés provenant de sites de déchets. Les vêtements synthétiques sont aussi une source de microplastiques, puisqu'en un seul lavage 1900 fibres peuvent être libérées dans les eaux (**Pruter, 1987 ; Andraday, 2011 ; Browne et al, 2011**).

Le mécanisme produisant la majorité des microplastiques dans l'environnement marin est l'altération de déchets plastiques abandonnés par les touristes ou par les engins de pêche : 18% des plastiques marins (polystyrène expansé, bouées, filets) viennent de l'industrie de la pêche (**Derraik, 2002 ; Cole et al, 2011 ; Andraday, 2011**).

L'apport des microplastiques au milieu marin se fait majoritairement par les cours d'eau. Il existe aussi des phénomènes météorologiques tels que les inondations, les crues ou les ouragans, qui peuvent exacerber ce transfert de débris de la terre à la mer (**Barnes et al, 2009 ; Thompson et al, 2005**). Les stations d'épuration des eaux usées peuvent piéger les macroplastiques mais une grande proportion de microplastiques passent par les systèmes de filtration (**Gregory, 1996 ; Browne et al, 2007 ; Moore et al, 2008 ; Fendall & Sewell, 2009**).

Des chercheurs optent pour inclure uniquement les plastiques avec une taille supérieure à 1 ou 2 mm pour une identification plus facile (**Baztan et al, 2014 ; Do Sul et al, 2009**). **Arthur (2009)** propose que les microplastiques puissent inclure tous les fragments de moins de 5 mm, mais certains auteurs considèrent les microplastiques comme étant inférieur à 1 mm (**Browne et al, 2010 ; Claessens et al, 2011 ; Van Cauwenbergue et al, 2013**). Cette différence dans la caractérisation des microplastiques est essentielle à souligner du fait de l'utilisation du terme « microplastique » pour différentes tailles de plastiques. Une classification est proposée pour différencier les nanoplastiques, microplastiques, mésoplastiques et macroplastiques.

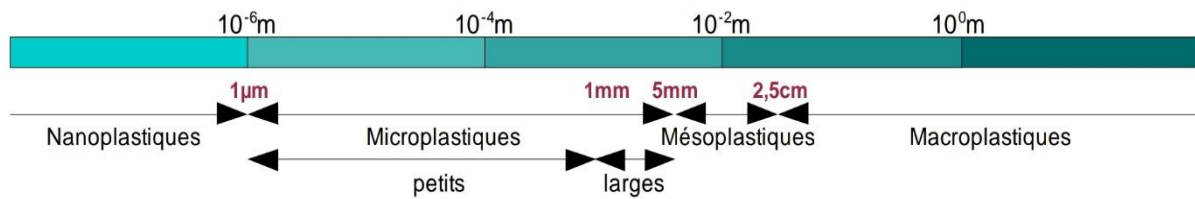


Figure 3 : Proposition de nomenclature des débris plastiques selon la taille (MSFD GES Technical Subgroup on Marine Litter, 2013).

1.1.5.1 Le mode d'action

Toutefois les particules pourraient être absorbées au niveau de tube digestif par autre mécanisme de transport. Deux hypothèses sont émises : l'absorption par endocytose et par persorption. L'endocytose se ferait par les cellules M des plaques de Peyer, principalement au niveau de l'iléon. Les microplastiques entre 0,1 et 10 µm seraient donc transportés de la lumière intestinal vers les tissus le lymphoïdes du tractus digestif. La persorption consisterait en un transport paracellulaire, c'est-à-dire l'absorption de particules inférieures à 130 µm entre 2 cellules. Cela aurait principalement lieu au niveau des épithéliums unistratifiés et là où il y a une faiblesse jonctionnelle entre les cellules. Ensuite, les cellules dendritique phagocyteraient les particules et les transporteraient vers les vaisseaux lymphatiques et la veine porte. Par conséquent, il y aurait une distribution possible vers les tissus tels que le foie, les muscles et l'encéphale. (Wright et Kelly, 2017)

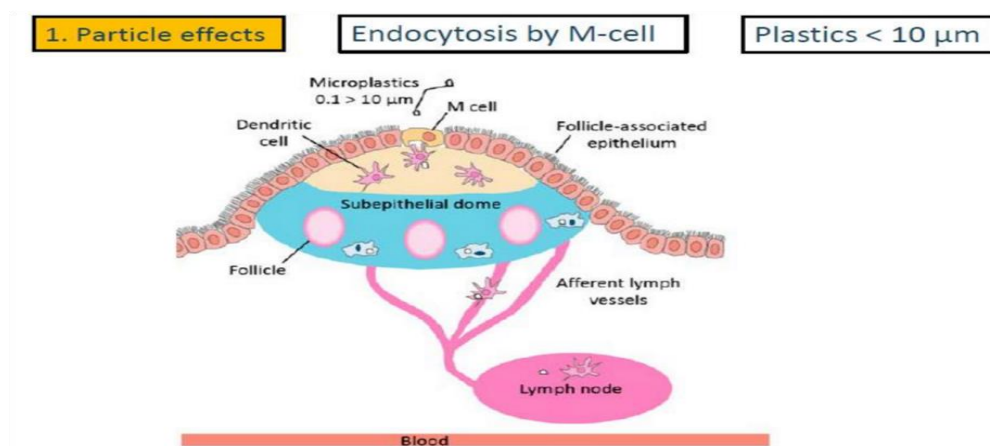


Figure 4 : Endocytose (Wright et Kelly, 2017).

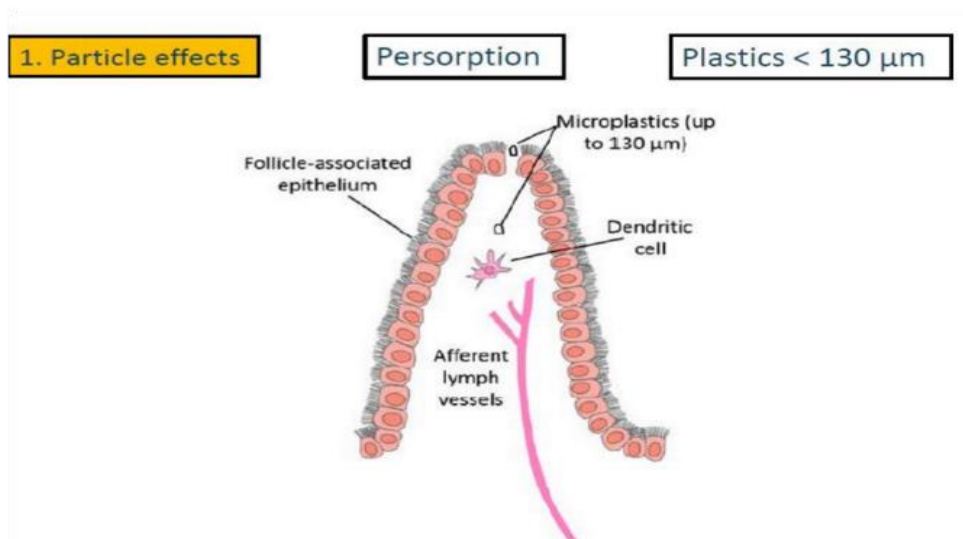


Figure 5 : Persorption (Wright et Kelly, 2017).

1.1.5.2 Composition, propriétés et utilisations

Le concept de « *polymère* » étant lié de très près à celui de « matière plastique », certains auteurs renvoient directement la définition de « matière plastique » à ce concept (**Helmenstine, 2012**). Les matières plastiques sont faites de polymères. Puisque la plupart des matières plastiques sont constituées d'un seul type de polymère (**Figure 6**), par exemple : le polyéthylène (PE), le terme « *polymère* » est généralement employé par extension pour désigner celles-ci. Un polymère est un assemblage de plusieurs monomères, des molécules de base chimiquement liées en une macromolécule (**Reyne, 1998**).

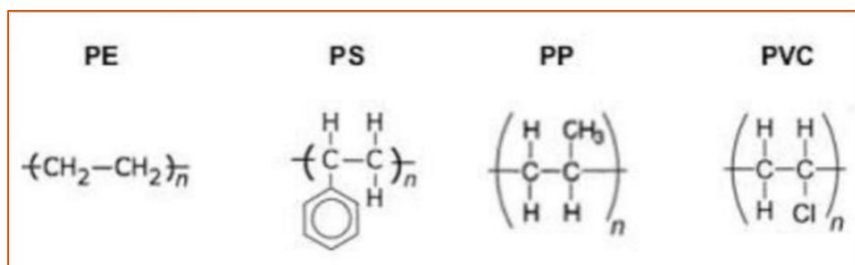


Figure 6 : Structures moléculaires du PE, du PS et du PP et du PVC (**Lower, 2009**).

Chapitre I : Revue bibliographique

La polymérisation (la synthèse des polymères) peut être réalisée grâce à deux procédés principaux : la polymérisation en chaîne et la polymérisation par étapes. Le procédé utilisé pour la synthèse du polymère influence grandement ses propriétés physiques. Parmi les structures de polymère courantes, citons le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP), le polystyrène (PS) et le polychlorure de vinyle (PVC), et les polymères obtenus par étapes comprennent les nylons, le polyéthylène téréphtalate (PET), le polycarbonate (PC) et le polyuréthane (PU). Ces polymères constituent la majeure partie des formes les plus courantes de matière plastique généralement présentes dans l'environnement comme contaminants (**Sperling, 2006**).

Les propriétés physiques d'une matière plastique, comme sa rigidité, sa souplesse et son élasticité, dépendent de la distribution des masses moléculaires du polymère et de l'organisation des chaînes polymères (**Versicolor, 2015**). Généralement, les polymères de masse moléculaire élevée ayant une organisation de chaînes complexe présentent des liaisons covalentes fortes entre les chaînes et forment un plastique rigide ayant un point de fusion élevé. À l'opposé, les polymères à organisation linéaire et de masse moléculaire faible sont plus souples et ont un point de fusion faible. En combinant différentes distributions des masses moléculaires, organisations des chaînes polymères et/ou mélanges de polymères, on obtient des matériaux efficaces adaptés à l'utilisation prévue (**Eckert, 2018**).

La majorité des produits en plastique sont utilisés dans les secteurs de l'emballage et de la construction. Les autres grands secteurs sont ceux de l'automobile, de l'équipement électrique et électronique, des textiles et de l'agriculture. Nous donnons dans le tableau 1 des exemples d'utilisations de divers polymères (**Sperling, 2006**).

Tableau 3 : Certaines applications des polymères (Sperling, 2006).

Acronyme	Nom	Principales applications
PP	Polypropylène	Emballage rigide, semi-rigide et souple Automobile Articles ménagers Isolation électrique

Chapitre I : Revue bibliographique

PE	Polyéthylène	Emballage rigide, semi-rigide et souple Pellicule pour l'agriculture Articles ménagers Isolation électrique Construction Produits personnels
PS	Polystyrène	Emballage Mousses
PMMA	Poly (méthacrylate de méthyle)	Application transparentes pour l'automobile et la construction Dispositifs médicaux Electronique
PC	Polycarbonate	Application transparentes pour l'automobile et la construction Dispositifs médicaux Electronique
PLA	Poly lactide	Emballage rigide, semi-rigide et souple
PET	Polyéthylène téréphtalate	Emballage rigide, semi-rigide et souple Fibres textiles synthétiques
PVC	Polychlorure	Feuilles et tissus enduits Construction Isolation électrique
PTFE	Polytétrafluoroéthylène	Pièces techniques Revêtements antiadhésifs

1.1.6. Les effets de Linuron et MPs sur la santé humaine

- **Linuron** : Des expériences ont montré qu'une exposition in utero au Linuron altérerait la différenciation sexuelle de rats males par effet de perturbation endocrinienne (**Wolf et al, 1999**), en inhibant la conversion des androgènes en œstrogènes par l'aromatase (**hirsch et al, 1986**).
- **Microplastiques** : Il a été démontré que les microplastiques peuvent fragiliser la barrière épithéliale intestinale, par la diminution de la résistance électrique transépithéliale (i.e. résistance ohmique de la couche cellulaire permettant de caractériser la perméabilité intestinale) après exposition (**Carr et al, 2012**).

Des études menées parmi les travailleurs du flocage du nylon (fibre) suggèrent qu'il n'existe aucune preuve d'une augmentation du risque de cancer, bien que les travailleurs aient une prévalence plus élevée d'irritation respiratoire (**WHO, 1997**). La maladie pulmonaire interstitielle est une affection liée au travail qui induit de la toux, de la dyspnée (essoufflement) et une capacité pulmonaire réduite chez les travailleurs transformant des fibres de para aramide de polyester et/ou de nylon. Les travailleurs présentent également des symptômes cliniques similaires à ceux de l'alvéolite allergique (**Pimentel et al, 1975**).

1.2. La surveillance de la qualité du milieu aquatique

Selon la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE) fixe les objectifs et les méthodes pour atteindre le bon état des eaux. L'évaluation de l'état des masses d'eau prend en compte différents paramètres (biologiques, chimiques ou quantitatifs. Pour les eaux superficielles, le bon « état » se définit lorsque l'état chimique et l'état écologique d'une masse d'eau sont bons.

1.2.1. La surveillance chimique

L'état chimique est destiné à vérifier le respect des normes de qualité environnementales (NQE) fixées par des directives européennes pour 41 substances dites "prioritaires" ou "dangereuses"

1.2.2. La surveillance biologiques (biosurveillance)

La biosurveillance est l'utilisation à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d'un organisme

Chapitre I : Revue bibliographique

ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution (**Jean-Pierre 2002**).

La biosurveillance est une méthode d'évaluation environnementale visant à détecter et mesurer la concentration des polluants ou de leurs métabolites au sein des différents milieux (eau, air, sol) et niveaux de l'organisation biologique, autrement que par des méthodes physicochimiques directes et coûteuses à grande échelle.

Cette notion appelle celle d'indicateurs d'effet utilisés pour le suivi de l'état de l'environnement : biomarqueurs (changements au niveau moléculaire, cellulaire ou tissulaire d'un individu choisi comme espèce sentinelle). Bioindicateurs (suivi des changements, présence ou absence, et de l'abondance des individus, souvent des plantes ou des espèces animales ou fongiques considérées comme « bioindicatrices »), biointégrateurs dans le cadre de suivi d'une communauté d'espèces ou d'un écosystème (utilisation d'indicateurs biologiques : présence ou absence d'un cortège d'espèces, abondance « recouvrement, biomasse », diversité spécifique et indices écologiques). Elle fait aussi appel à des indicateurs d'accumulation à toutes les échelles (depuis le niveau moléculaire jusqu'à l'écosystème), les bioaccumulateurs.

1.2.3. Les bioindicateurs

Un bioindicateur (ou bio-indicateur ou indicateur biologique) est un organisme (espèce végétale, fongique, animale ou bactérienne) ou un groupe d'organismes dont la présence ou l'état renseigne sur certaines caractéristiques écologiques (c'est-à-dire physico-chimiques, pédologiques, microclimatiques, biologiques ou fonctionnelle) d'un écosystème ou sur l'incidence de modifications naturelles (par exemple, épisode de sécheresse) ou provoquées (par exemple, pollution chimique) (**Argillier et al, 2008**).

Un bio-indicateur écologiques de toxicité repose sur le principe de la sélection des organismes aquatiques résistants aux pollutions au détriment des organismes sensibles (**Pascale, N. 2017**).

Les bio-indicateurs sont utilisés pour :

- L'étude de l'impact de rejets toxiques sur les organismes aquatiques.

Chapitre I : Revue bibliographique

- Dans les secteurs contaminés, l'application d'un bio-indicateur permet d'évaluer l'effet réel de la pollution identifiée sur les organismes et de mesurer le niveau de perturbation de l'écosystème.
- Suivi de l'état écologique des masses d'eau. (**Pascale, N. 2017**)

L'utilisation d'un bio-indicateur permet d'estimer la qualité des peuplements aquatiques, toutes pressions polluantes confondues et de révéler d'éventuelles perturbations a priori non visibles et sur lesquelles il convient d'agir.

1.2.3.1. Présentation de l'espèce *Mytilus galloprovincialis*

Mytilus galloprovincialis est une espèce de mollusques bivalves, de la famille des Mytilidés. Cet animal marin, vit fixé aux rochers dans la zone de balancement des marées où il se nourrit du plancton qu'il filtre dans l'eau (**Lamarck, 1819**).

Cette moule vit solidement accrochée aux rochers ou aux objets immergés à marée haute, dans la partie basse de la zone intertidale et un peu au-delà. Cette espèce est trouvée dans toute la zone méditerranéenne, avec également des populations sur le littoral de l'Afrique du Sud, de la frontière namibienne à Port Alfred (**Branc et al, 2005**).

On en trouve aussi sur le littoral de Californie du Sud et en Japon, où il s'agit de colonisations à partir de propagules introduites sous les coques de navires ou via des eaux de ballast (**Hawaiien Shell News, Octobre 1980**).

La moule de Méditerranée est un organisme filtreur qui en tant que tel joue un rôle important dans le maintien de la qualité de l'eau et de sa limpidité. Comme les moules filtrent beaucoup d'eau quand elles se nourrissent, elles constituent un formidable outil pour tester la qualité de l'eau. Les scientifiques peuvent découvrir quels types d'éléments chimiques sont présents dans l'habitat de la moule en examinant ce que les moules ingèrent dans leurs corps (**Kelly et al, 2007**).

Les moules sont constituées d'un corps mou et d'une coquille externe dure en deux parties appelées **valves** (**figure7**). Cette caractéristique leur vaut le nom de **bivalves** « bi » signifiant deux. à l'extérieur de la coquille, on peut voir le **pied** de la moule. Il s'agit d'un organe musculaire qui aide la moule à se déplacer d'un endroit à l'autre. De grands muscles appelés **adducteurs** permettent de garder les valves étroitement fermées (**Rainer, 2006**)



Figure 7 : L'espèce *Mytilus galloprovincialis*

➤ **Taxonomie**

Règne : Animalia

Embranchement : Mollusca (Mollusques)

Classe : Lamellibranchia (Lamellibranches, Bivalves)

Sous classe : Pteriomorphia (Ptériomorphes)

Ordre : Mytilida (Mytiloïdés)

Famille : Mytilidae (Mytilidés)

Genre : Mytilus

Espèce : *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

➤ **Morphologie interne**

Le corps de l'espèce est mou et forme une masse viscérale globuleuse (Gauroy, 1972), la tête est réduite, d'où le nom d'Acéphale recouvert par le manteau. Ce dernier est composé de deux lobes palléaux, il se prolonge et forme un compartiment rempli d'eau, appelé cavité palléale,

Chapitre I : Revue bibliographique

dans lequel baignent les branchies. Le pied est un organe musculueux situé à la base de la masse viscérale. Il peut servir au déplacement chez le jeune.

La fonction des deux tubes nommés les siphons inhalant et exhalant, est aspirer et expulser l'eau lui autorisant de circuler dans la cavité palléale. Elles ont deux paires de branchies, assurant la double fonction respiration et nutrition, les branchies sont lamellaires et constituées de filaments ciliés (**figure 8**).

Le système digestif est composé de la bouche, l'œsophage, l'estomac, la glande digestive, l'intestin, le rectum et l'anus. L'estomac contient un caecum postérieur long, où se trouve une tige cristalline qui tourne sur elle-même grâce à des cils, elle a pour rôle de dissociation physique et digestion enzymatique (**Jurd, 2000**), la glande digestive est encore appelée hépatopancréas car elle joue chez cet invertébré un rôle analogue au foie des Vertébrés, elle assure la digestion et l'absorption des aliments captés par les branchies (**Pagliassoti et al, 1994**).

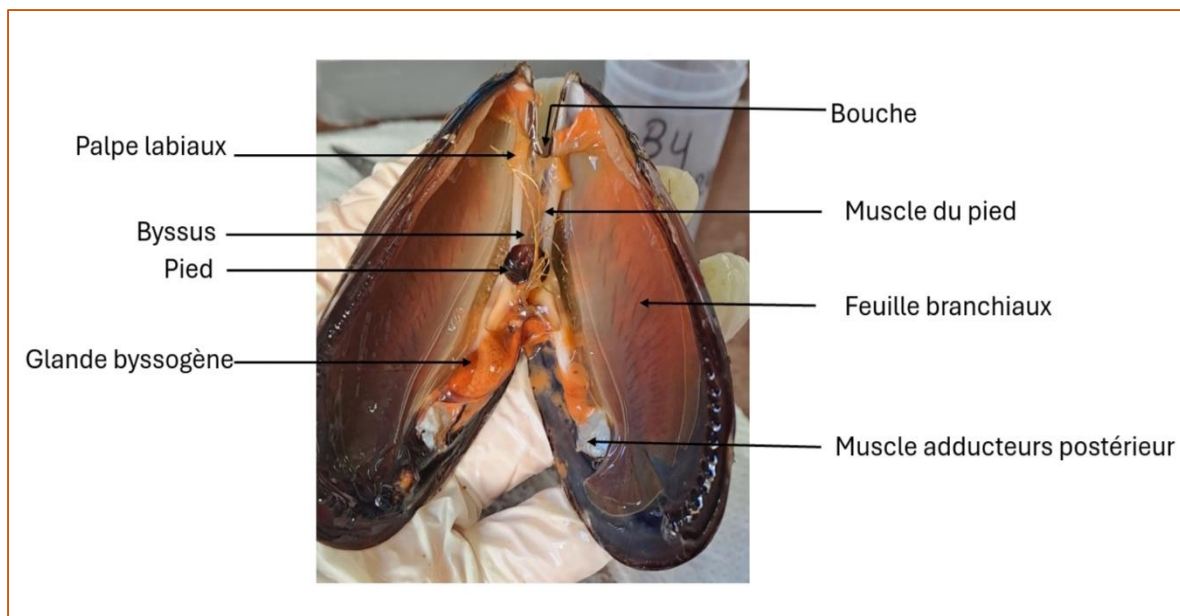


Figure 8 : Vue interne de la moule *Mytilus galloprovincialis* (**originale, 2024**).

1.2.4. Les biomarqueurs de stress

Un biomarqueur de stress est défini comme « *un changement observable et / ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* » (**Lagadic et al, 1997**).

D'après (**Sies, 1991**), le biomarqueur de stress est défini comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, conduisant à une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et/ou à des dommages moléculaires

L'idée de base est que, dans le système métabolique ouvert, un équilibre redox à l'état d'équilibre est maintenu à un point de consigne donné, ce qui fournit un tonus redox basal, et qu'un écart par rapport à l'équilibre redox à l'état d'équilibre est considéré comme un stress, déclenchant une réponse au stress (**Sies, 2017**).

La réponse des systèmes antioxydants des organismes aquatiques aux polluants a été étudiée in situ (**Cossu et al, 1997**). Les activités antioxydantes sont en général augmentées en présence de polluants, mais les modifications d'activité peuvent être transitoires, accompagnées ou non d'effets de lipoperoxydation.

La lipoperoxydation se mesure fréquemment à l'aide de la concentration en Malondialdéhyde (MDA), produit terminal de la dégradation des lipides (**Amiard, 2008**).

Les bio-indicateurs sont utilisés pour (**Figure 9**) :

- L'étude de l'impact de rejets toxiques sur les organismes aquatiques.
- Dans les secteurs contaminés, l'application d'un bio-indicateur permet d'évaluer l'effet réel de la pollution identifiée sur les organismes et de mesurer le niveau de perturbation de l'écosystème.
- Suivi de l'état écologique des masses d'eau. (**Pascale, N. 2017**)

Selon la Directive Cadre européenne donne comme objectif à atteindre le bon état écologique des masses d'eau. L'utilisation d'un bio-indicateur permet d'estimer la qualité des peuplements aquatiques, toutes pressions polluantes confondues et de révéler d'éventuelles perturbations a priori non visibles et sur lesquelles il convient d'agir.

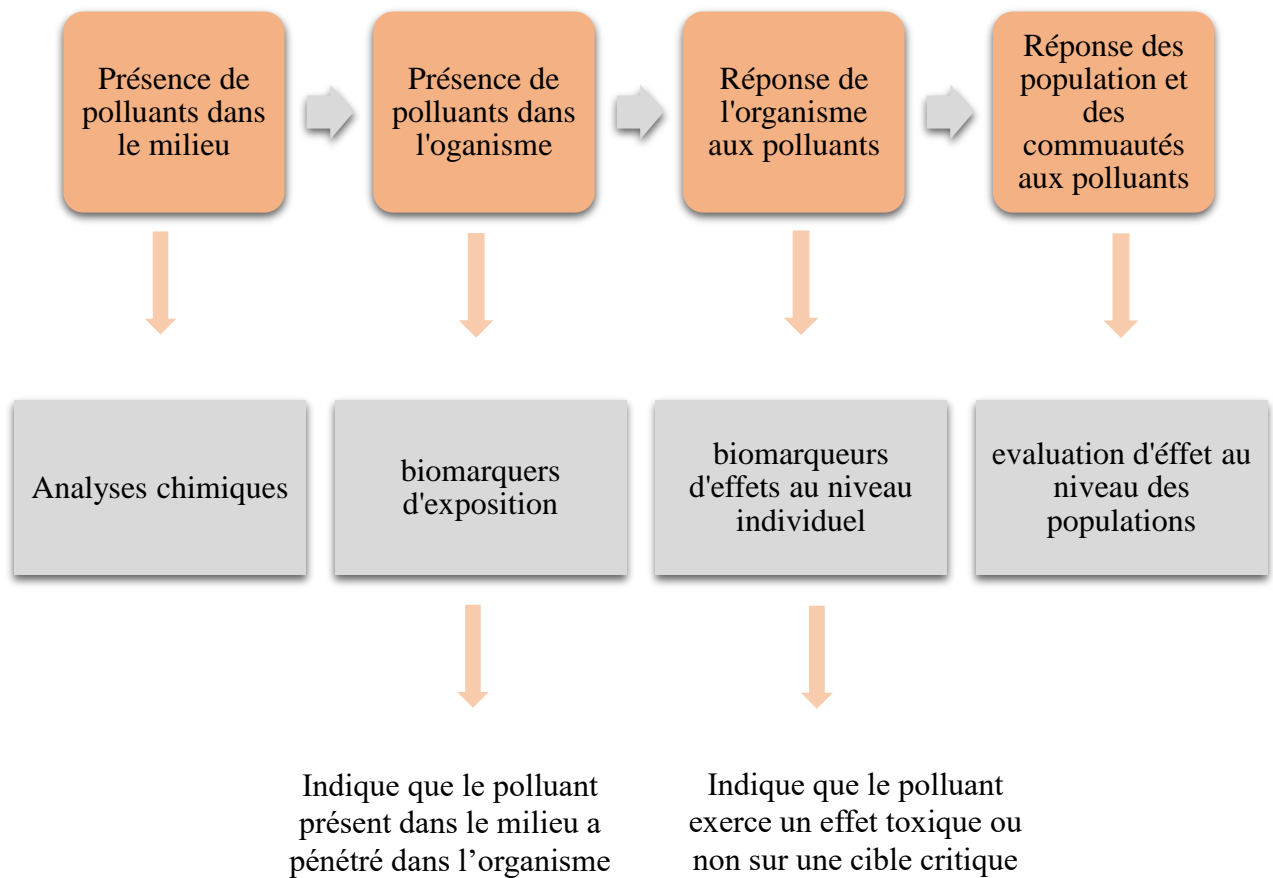


Figure 9 : Place des biomarqueurs dans l'évaluation de la contamination de l'environnement (Lagadic et al, 1997).

1.2.4.1. Le stress oxydant

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA).

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP (Adenosine DiPhosphate) en ATP (Adenosine TriPhosphate).

Chapitre I : Revue bibliographique

Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des EOA. Celles-ci sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), ou le radical hydroxyle OH^\bullet , soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (1O_2). Dans cette chimie particulière, les métaux de transition, comme le Fe^{2+} et le Cu^{2+} , agissent comme catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle. (Delattre et al, 2005)

La définition de stress oxydant est donc un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières (Haleng et al, 2007).

1.2.4.2. Activités enzymatiques (enzymes antioxydants)

➤ *Les défenses antioxydantes*

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (**figure 10**). On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Haleng et al, 2007).

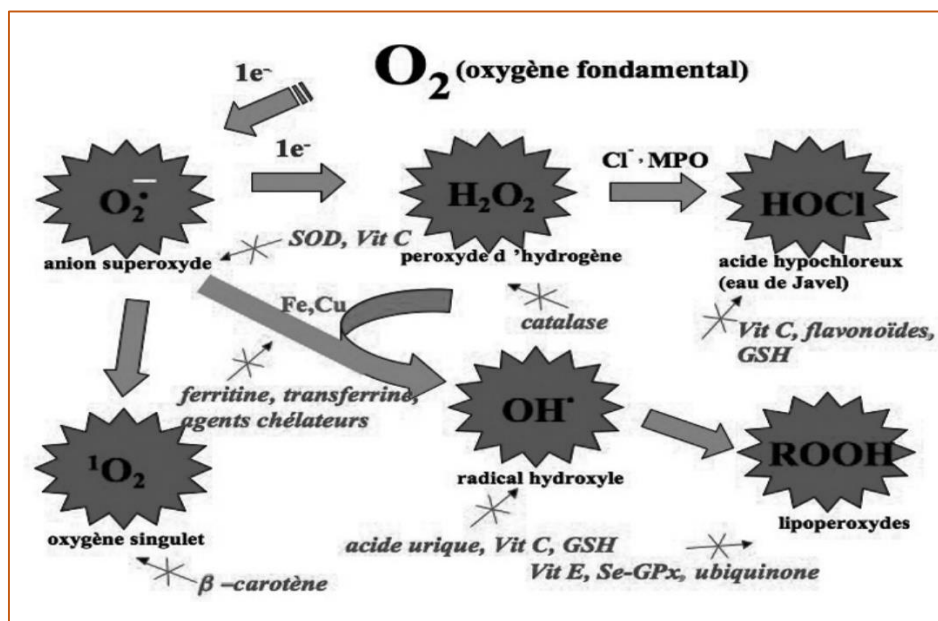


Figure 10 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production (**Haleng et al, 2007**).

Une activité enzymatique correspond au calcul de l'effet catalytique d'une enzyme, reposant sur la quantité de substrat transformée par unité de temps.

Les enzymes antioxydantes les plus connues sont le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutarédoxine (GRx). Le rôle de ces enzymes est de transformer les radicaux libres pour qu'ils deviennent inoffensifs. Ces enzymes s'associent à des éléments comme le zinc, le sélénium, le cuivre ou encore le manganèse, qui leur permettent d'exercer leur activité. C'est ce que l'on appelle des « cofacteurs » (**Limón-Pacheco, 2009**). L'activité d'une enzyme se mesure :

1. Soit par la vitesse de disparition d'un substrat.
2. Soit par la vitesse d'apparition d'un produit.
3. Soit par la vitesse d'utilisation d'un cofacteur.

Par :

- Méthode en point final ou « à deux points »
- Méthodes cinétiques : Colorimétrie, UV.

1.2.5. Les tests écotoxicologiques

Un test écotoxicologique est un essai expérimental déterminant l'effet d'un ou de plusieurs produits sur un groupe d'organismes sélectionnés, dans des conditions bien définies (**Keddy et al, 1994**).

La plupart des tests de toxicité apportent une estimation de la dose qui affecte 50% de la population. On distingue généralement deux types de tests de toxicité :

- Tests de toxicité aiguë : réalisés sur une durée très courte
- Tests de toxicité chronique : réalisés sur une durée relativement longue par rapport au temps de génération de l'organisme.

CHAPITRE II :
Matériels et Méthodes

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Dans ce chapitre, nous présentons la méthodologie utilisée pour l'étude de la biométrie, les analyses chimiques et biochimiques.

Notre objectif principal est de rechercher des biomarqueurs en tant que réponse précoce, susceptibles de fournir une information intégrée sur l'état de santé des milieux marins. Nous avons donc étudié la catalase et protéase en tant que réponse biologique chez la moule méditerranéenne « *Mytilus galloprovincialis* », suite à une exposition aiguë en laboratoire à différentes concentrations de pesticide « *Linuron* » et de microplastiques.

Cette étude s'est déroulée sur une période de trois mois, de mars à mai 2024. Les expérimentations ont été menées au CNRDPA- Bousmail (wilaya de Tipaza).

II.1. Présentation du lieu de stage

Notre étude a été réalisée au Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) de Bou Ismail – Tipaza, au sein de la division écosystèmes aquatiques.

Le Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture est l'unique institution de recherche en Algérie spécialisée dans le domaine de la pêche et de l'aquaculture. Le CNRDPA, établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST) a été créé en 2008 suite à la restructuration du centre national d'études et de documentation pour la pêche et l'aquaculture CNRDPA. Le CNRDPA s'attèle à développer des connaissances scientifiques et des outils d'aide à la décision pour un développement durable des activités de la pêche et de l'aquaculture et ce tout en préservant les ressources naturelles et l'environnement.

Le CNRDPA est organisé en quatre divisions de recherche :

- **Division pêche** : La division pêche a pour principale mission l'évaluation de la ressource halieutique et sa dynamique, elle est appelée à mettre au point des outils et des méthodes d'études d'aide à la gestion de cette ressource. Elle œuvre aussi pour le développement des techniques et des technologies des pêches.
- **Division écosystèmes aquatiques** : c'est une division transversale, qui s'intéresse particulièrement à la connaissance des écosystèmes aquatiques marins et continentaux,

- notamment par l'étude des interactions milieux – ressources pour une gestion intégrée et durable de ces milieux aquatiques changeants, mal connus et soumis à de fortes pressions d'exploitation ou de dégradation.
- **Division aquaculture** : activités aquacoles (continentales et marines). Un programme qui veille à l'exploitation rationnelle de la ressource et la préservation des milieux d'élevage.
- **Division industrie et transformation des produits de la pêche et de l'aquaculture** : A pour mission le développement et l'amélioration des techniques de valorisation des produits et coproduits de la pêche et de l'aquaculture. Elle est également appelée, à développer et améliorer les aliments artificiels pour les élevages aquacoles.

II.2. Matériels utilisés

II.2.1. Matériels biologiques

- La moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*).
- Les microalgues pour alimentation (voir annexe 2).

II.2.2. Matériels non biologiques

Pour effectuer l'expérience et les analyses physico-chimiques, biochimiques, nous avons utilisé des appareils, des réactifs, et la verrerie (voir annexe 3).

II.3. Préparation expérimentale

Dans le cadre d'une stratégie basée sur l'utilisation des moules comme bioindicateurs du niveau de pollution par les pesticides et microplastiques, nous avons adopté une approche impliquant des tests d'écotoxicité à courte durée au laboratoire du CNRDPA.

Les moules *Mytilus galloprovincialis* (d'une classe de taille [50mm à 80mm]) sont collectées au mois de mars 2024 (Filière Mytilicole du CNRDPA Bou-Ismaïl).

Une période de deux semaines d'adaptation des moules (acclimatation) sous les normes de CNRDPA, dans les conditions expérimentales précède les tests d'écotoxicité par les différentes

Chapitre II : Matériels et Méthodes

types de contaminant. 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.

Un renouvellement quotidien de l'eau d'élevage est effectué durant la période d'adaptation et le long du cycle expérimental en entier. La nourriture était offerte 2 fois par jour en utilisant une suspension algale cultivée au niveau de la station expérimentale de pisciculture marine du CNRDPA.

Afin de minimiser au maximum les autres facteurs pouvant constituer une source de perturbation ou d'interférence des résultats, une mesure des paramètres hydrologiques (température, pH, oxygène dissous, salinité) est effectuée chaque jour durant tout le cycle expérimental avant et après le changement d'eau à l'aide d'un multiparamètres de terrain de type *Hnna* (voir annexe).



Figure 11 : Dispositif expérimental (Photo originale 2024).

L'acclimatation est une étape essentielle dans la mise en place d'une expérimentation, car elle permet aux organismes de s'adapter aux conditions du laboratoire. Il est généralement admis qu'une période minimale de deux semaines après la réception des organismes est nécessaire pour qu'ils s'adaptent au nouvel environnement du dispositif expérimental.

II.4. Les tests écotoxicologiques

II.4.1. Stratégie, démarche et dispositif expérimental

Après l'étape d'acclimatation (adaptation) dans des conditions expérimentales semblables, les moules sont répartis en sept groupes (B1 ; B2 ; B3 ; B4 ; B5 ; B6 ; B7) de tests. La démarche adaptée étant la suivante (Figure 12) :

- Bac B1 : Groupe d'individus Témoins (contrôle) sans contaminants ;
- Bacs B2 et B3 : Groupe d'individus contaminés par le pesticide (Linuron) aux concentrations de 50 et 100µg/L, respectivement ;
- Bacs B4 et B5 : Groupe d'individus contaminés par le pesticide adsorbé sur les particules de microplastiques (MPs+Linuron) aux mêmes concentrations précédentes ;
- Bacs B6 et B7 : Groupe d'individus exposés aux particules de microplastiques (MPs) à des concentrations de 10 et 15µg/L (concentrations jugées retrouvée en milieu marin).

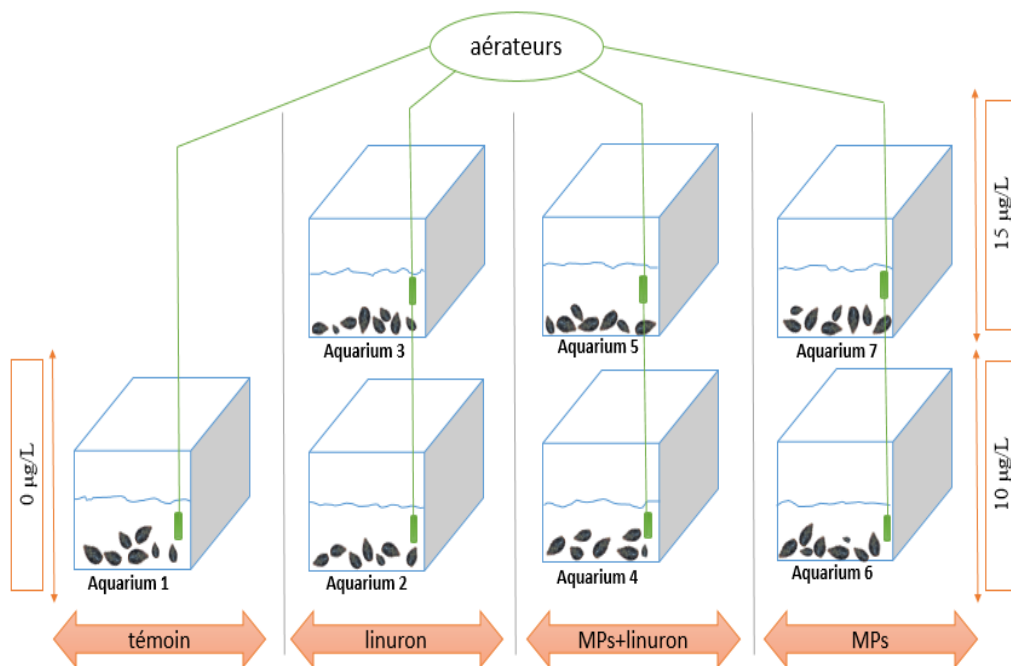


Figure 12 : Schéma du dispositif expérimental de différents traitements (original 2024).

Chapitre II : Matériels et Méthodes

A chaque jour du cycle expérimental (Figure 13), les moules sont prélevées (deux individus de chaque bac) pour faire objet des dosages biochimiques des protéines, et des enzymes antioxydants ; la catalase et de l'enzyme digestive la protéase.

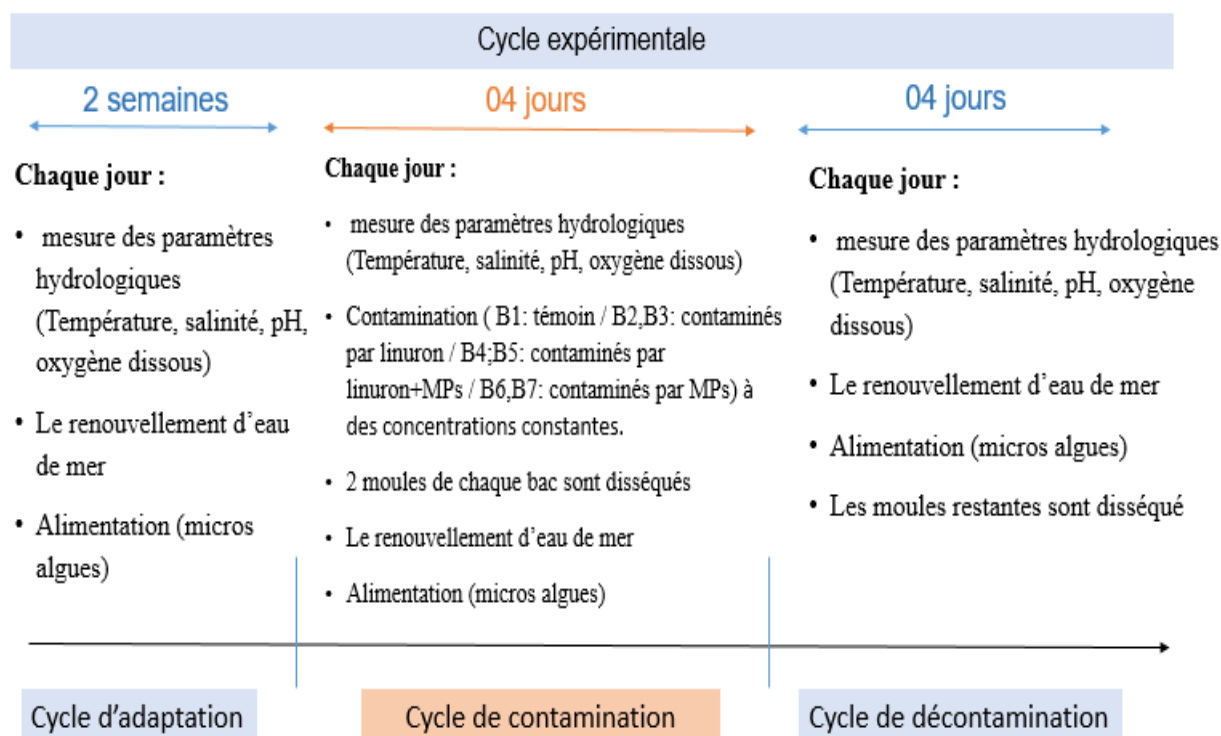


Figure 13 : Planning expérimental des tests d'écotoxicité de courte durée. (Originale 2024).

II.4.2. Méthodes et protocoles analytiques

II.4.2.1. Mesure des paramètres physicochimiques

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

Le protocole est le suivant :

- ✓ Allumer le Multi-paramètre et rincer plusieurs fois l'électrode avec de l'eau distillée.
- ✓ Plonger ensuite l'électrode dans le bac et agiter doucement.
- ✓ Laisser stabiliser un moment, puis noter les valeurs finales du pH, température, salinité et oxygène dissous.

II.4.2.2. Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée

Environ 50 ml d'eau sont prélevés chaque jour de chaque bac pour être par la suite filtrées à l'aide des filtres seringues. Le filtrat ainsi récupéré est destiné au dosage du phosphore et des différentes formes d'azote dissous. Les éléments nutritifs Phosphates, Nitrites, ammoniacque, Nitrates et Silicates sont mesurés à l'aide d'un auto analyseur à flux continu (automatiquement) de Type Quatro.

Analyseur à flux continu

Cet appareil est ce qu'on appelle un « analyseur à flux continu », un système automatisé pour la détermination des nutriments inorganiques dissous, en particulier dans l'eau de mer. Nous déterminons les composants orthophosphates, nitrites, nitrates et silicates dans les échantillons d'eau de mer.

❖ *Principe*

Un analyseur à flux continu segmenté de base (Figure 14) comprend un préleveur automatique d'échantillon, une pompe péristaltique, une cassette analytique, un détecteur et un logiciel d'acquisition de données. L'échantillon et les réactifs sont continuellement pompés à travers la cassette analytique et des bulles d'air sont introduites à intervalles précis pour former des segments de réaction uniques, qui sont mélangés à l'aide de bobines de verre.

Avec les analyseurs à flux continu segmenté, même les réactions lentes sont menées à terme et le ratio échantillon-réactifs dans le détecteur atteint une valeur maximale constante : le plateau de la réaction, la condition pour des analyses parfaites.



Figure 14 : Analyseur à flux continu (Originale, 2024).

Les analyseurs à flux continu segmenté ont été développés pour exécuter quelques paramètres sur un grand nombre d'échantillons. Ces systèmes sont utilisés par les instituts de recherche marine et d'autres organismes pour analyser des eaux à très faible teneur en nutriments. Ces analyseurs offrent une sensibilité maximale en veillant à ce que la réaction soit toujours menée à terme. De plus, un système de détection à double faisceau numérique avec référence en temps réel garantit une reproductibilité maximale et des limites de détection minimales.

II.4.2.3. Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses biochimiques

Pour mesurer les activités biochimiques relatives aux biomarqueurs tels que la catalase, il est essentiel de préparer les échantillons tissulaires de manière appropriée. Avant toute analyse, les tissus biologiques (la chair des moules) doivent subir une homogénéisation et un fractionnement subcellulaire préalables (La figure 15). L'ensemble de ces procédures se déroulent dans des tampons adaptés. De plus, le choix du tampon utilisé pour l'homogénéisation doit prendre en compte les propriétés physicochimiques nécessaires pour maintenir la stabilité des molécules ou organites étudiés.

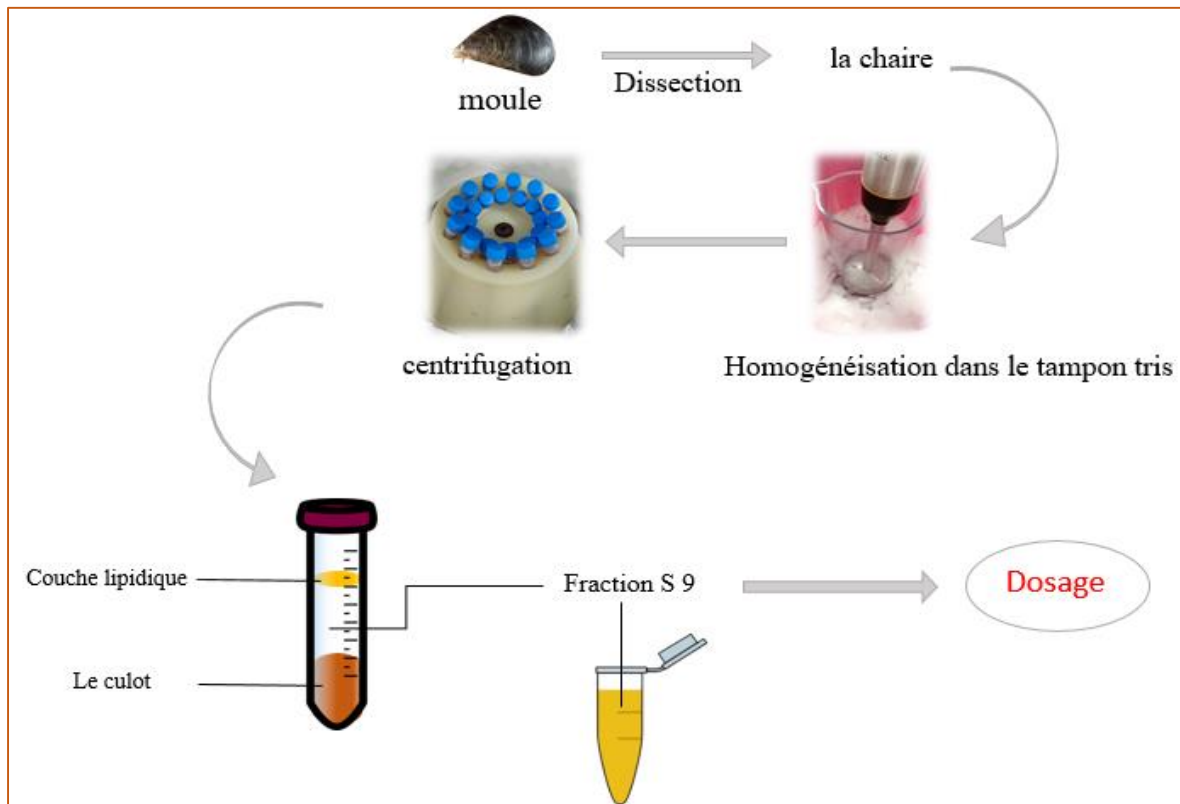


Figure 15 : Procédures expérimentales des dosages biochimiques (Originale, 2024)

❖ *Homogénéisation des tissus*

Les tissus sont homogénéisés dans un tampon Tris (20mM, pH7.8) à raison de 1/10 (poids/volume) en utilisant un mixeur déchiqueteur (une température constante a été maintenue à l'aide des glaçants).

L'homogénat est ensuite divisé dans des tubes coniques (15 ml) et centrifugé pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant obtenu après centrifugation (appelé Fraction S9) est utilisé pour doser les protéines, notamment la catalase et la protéase.

II.4.2.4. Dosages des protéines par méthode de Lowry

❖ *Principe*

La protéine réagit tout d'abord avec réactif cuivrique alcalin puis un second réactif dit Phosphotungstomolybdique. Il est composé d'un mélange de tungstate de sodium et de Molybdate de sodium dans l'acide phosphorique et de l'acide chlorhydrique.

L'analyse des protéines est effectuée selon la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951). En milieu alcalin, le réactif cuivrique catalyse l'oxydation des acides aminés aromatiques, avec réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique (réactif Folin-Ciocalteu) pour donner lieu à la formation d'un complexe coloré bleu foncé, qui a une absorbance maximale à 660 nm.

✓ *Solution analytique :*

- 50 ml de sodium carbonate à 2% avec 50ml de NaOH 0,1N.
- (B) 10ml de sulfate de cuivre à 1.56% avec 10ml de sodium potassium tartrate à 2.37%.

La solution analytique est préparée en mélangeant 2 ml de la solution (B) avec 100 ml de la solution (A).

❖ *Mode opératoire :*

Dans une série de tubes à essai, les prises d'échantillons de la fraction S9 (surnageant) sont mélangées avec 2 ml de la solution analytique. On laisse incuber pendant 10 min à température ambiante.

Par la suite, 0,2ml 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. Les étalons filles sont ainsi obtenus par dilution de la solution mère.

II.4.2.5. Dosages de la Catalase par mode Cinétique

✓ *Principe :*

L'activité enzymatique est la quantité de substrat convertie par l'enzyme active en moles par l'unité de temps. Elle mesure la quantité d'enzyme active présente dans un mélange à un instant donné.

L'activité enzymatique est mesurée en unités qui indiquent la vitesse de réaction enzymatique catalysée par cette enzyme exprimée en micromoles de substrat transformé (ou de produit formé) par minute.

✓ *Mode opératoire :*

2,5 ml du substrat (2,4ml tampon phosphate 50 mM à pH7 et 100 µl de solution de H₂O₂ à 3%) sont placés dans une cuvette du spectrophotomètre déjà réglée sur le mode cinétique.

Après 50 µl de la fraction S9 (source d'enzyme) est ajouté au mélange, ainsi on déclenche spectrophotomètre et on suit la décomposition de peroxyde d'hydrogène dans un intervalle de temps de 60s. La réaction est suivie par mode cinétique.

II.4.2.6. Dosage de la protéase

✓ *Principe*

Le dosage des protéases a été effectué selon la méthode décrite par Cupp-Enyard (2008) et Anasori et al. (2015), en utilisant la caséine comme substrat. L'hydrolyse enzymatique de la caséine libère la tyrosine ainsi que d'autres acides aminés et des fragments de peptides. Le réactif de Folin-Ciocalteu réagit principalement avec la tyrosine libre en donnant une coloration bleue permettant un dosage colorimétrique. Les valeurs de l'absorbance sont comparées à une courbe d'étalonnage établie en utilisant une solution standard de tyrosine.

✓ *Réactifs*

- Tampon potassium phosphate 50mM (pH 7.5).

Chapitre II : Matériels et Méthodes

- Caséine à 1% : Préparation d'une solution de 10 mg/ml de caséine dans le tampon potassium phosphate. La température est élevée progressivement à 80-85°C avec agitation douce jusqu'à dissolution complète, puis le pH est ajusté à 7.5 avec le NaOH.
- Acide trichloroacétique (TCA) à 5%.
- Carbonate de sodium anhydre 500 mM.

❖ Mode opératoire :

Dans une série de tube à essais déposés dans un bain marie à 37°C, on met 1ml de caséine (1%), puis on rajoute 1ml de S9. Après une incubation à 37°C pendant 10 min la réaction est stoppée en ajoutant 4 ml de TCA. Un blanc est préparé en ajoutant le volume de la fraction S9 après le TCA. Les tubes sont incubés pendant 30minutes à 37°C, puis centrifugés à 6000 tr/mn pendant 7 min.

Ensuite, 1ml de surnageant obtenu est mélangé avec 2,5 ml de Na_2CO_3 et 0,5ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 4 fois. Les tubes sont vortexés puis maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes avant d'être centrifugés de nouveau à 6000 tr/mn pendant 7min pour permettre la lecture de l'absorbance du surnageant à 660nm.

CHAPITRE III :

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Résultats de mesure des paramètres physico-chimiques

III.1.1. Résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques préliminaires des moules et de leur eau d'élevage

La moule est très sensible aux variations des divers paramètres environnementaux tels que la température, la salinité et l'abondance de nourriture. Ainsi, dans le but de minimiser au maximum les facteurs stressants, l'assurance des conditions environnementales optimales pour l'élevage des individus était l'étape primaire avant de commencer les tests d'écotoxicité et ce pour l'ensemble des séries d'expériences. En effet, et dans le même contexte un contrôle de qualité physico-chimique et bactériologique de l'eau d'élevage et des moules était une étape cruciale.

L'eau destinée à l'élevage des moules, présentait une bonne qualité bactériologique dont les résultats obtenus révèlent l'absence d'une contamination fécale pouvant infecter les moules et modifier l'activité physiologique de ces derniers (surtout la réponse des biomarqueurs). L'objectif du contrôle bactériologique de l'eau d'élevage était de s'assurer que cette dernière ne présentant aucun stress pathogénique pouvant induire une maladie ou un mauvais état de santé des moules.

Les eaux marines possèdent un ensemble de caractères physico-chimiques relativement stables dont les principaux sont la température, la salinité, le pourcentage de saturation d'oxygène et le pH. Ces facteurs deviennent des marqueurs importants de l'influence anthropique. Nos résultats ont montré des valeurs très stables et dans l'intervalle des valeurs normales des eaux marines et ce pour chaque approvisionnement en eau pour l'ensemble des séries de tests expérimentales.

L'analyse bactériologique des moules a révélé l'absence totale des germes témoins d'une contamination fécale. On en conclue donc la bonne qualité bactériologique pour traduire un bon état de santé de nos spécimens. On conclue la bonne qualité bactériologique des moules prises comme espèce sentinelle. Ainsi, le stress que peut exercer un pathogène n'est pas probable à exister. Aussi, les résultats physico-chimiques et bactériologiques de l'eau de mer traduisent la bonne qualité de cette dernière prise comme source d'approvisionnement dans le cas de nos tests d'écotoxicité. Comme conclusion les moules seront soumises à l'unique stress exercé par l'exposition aux xénobiotiques (Linuron, MPs).

III.1.2. Résultats des paramètres physicochimiques au cours des cycles expérimentaux

Dans le but de minimiser au maximum l'effet stressant de ces facteurs, l'assurance des conditions environnementales optimales pour l'élevage des individus était l'étape primaire avant de commencer les tests d'écotoxicité.

Dans la présente étude, les paramètres hydrologiques ont été mesurés chaque jour avant et après le renouvellement d'eau des bacs expérimentaux.

Les différents résultats des mesures de la Salinité (Sal %), le pH, la température (T°C), et Oxygène dissous (DO₂ mg/l) sont illustrés dans les figures 16, 17, 18 et 19, respectivement.

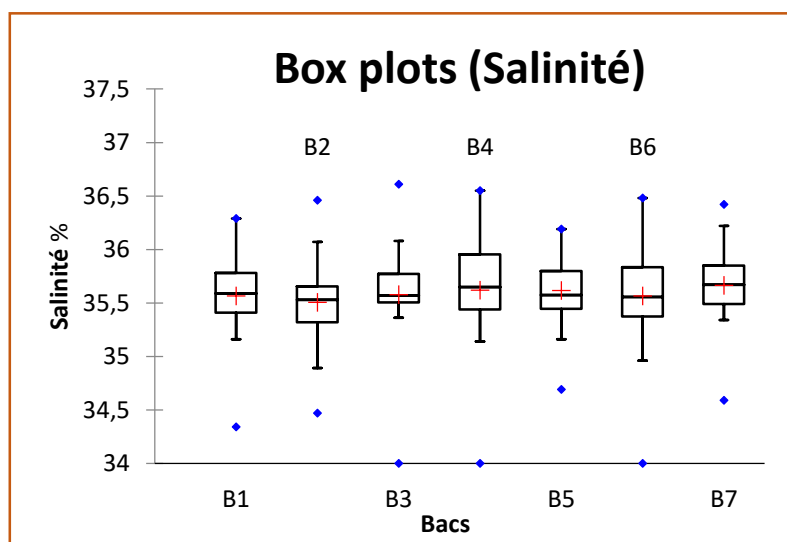


Figure 16 : Suivi de la variation de la salinité de l'eau durant l'expérience.

- La variation de la salinité était quasi nulle ($35,58 \pm 0,1\text{‰}$), et dans l'intervalle des salinités optimales pour la croissance des moules *Mytilus galloprovincialis*. Aussi, aucune différence n'est observée chez les groupes témoins et ceux contaminés. De ce fait, la salinité ne peut constituer un paramètre d'interférence des activités métaboliques surtout des réponses enzymatiques des espèces indicatrices.

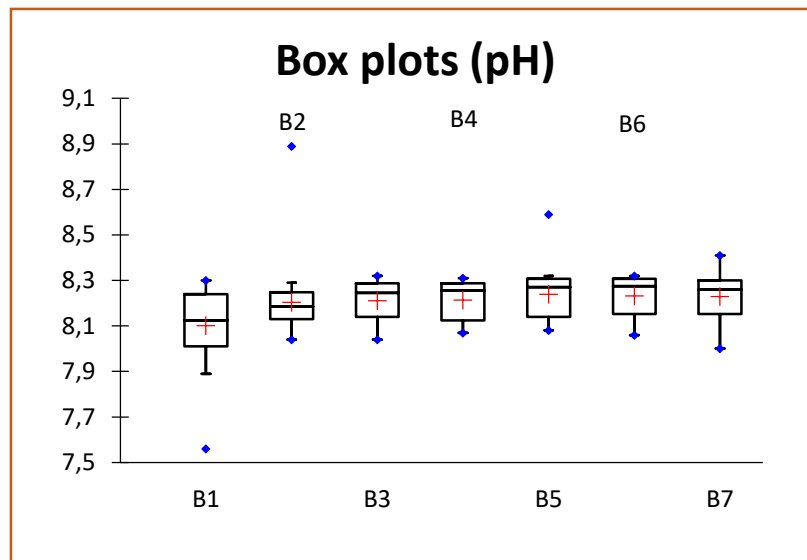


Figure 17 : Suivi de la variation du pH de l'eau durant l'expérience.

- Les mesures du pH sont presque identiques dans chaque bac ce qui n'influe pas sur les réponses biologique des moules traduites par les biomarqueurs catalase et protéase. Les valeurs relevées étaient optimales pour la croissance des moules de genre *Mytilus galloprovincialis*.

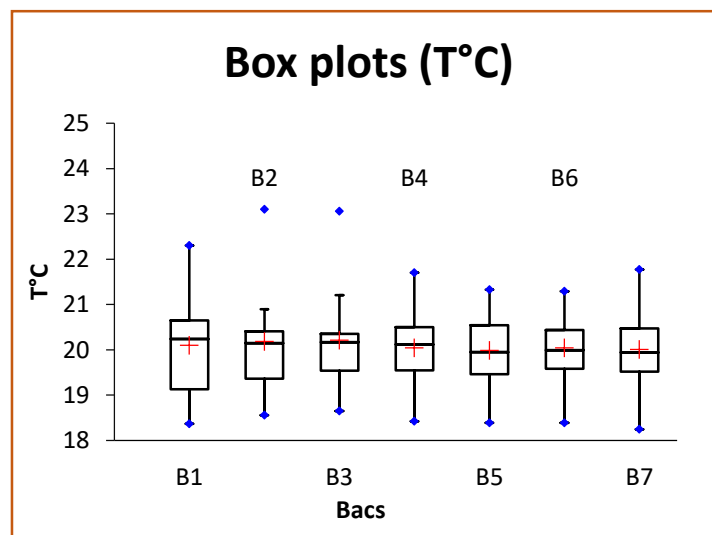


Figure 18 : Suivi de la variation de la température de l'eau durant l'expérience.

- nous constatons que la variation de la température est presque la même dans tous les bacs expérimentaux et dans l'intervalle de tolérance des spécimens pendant toute la période d'étude.

De ce 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.

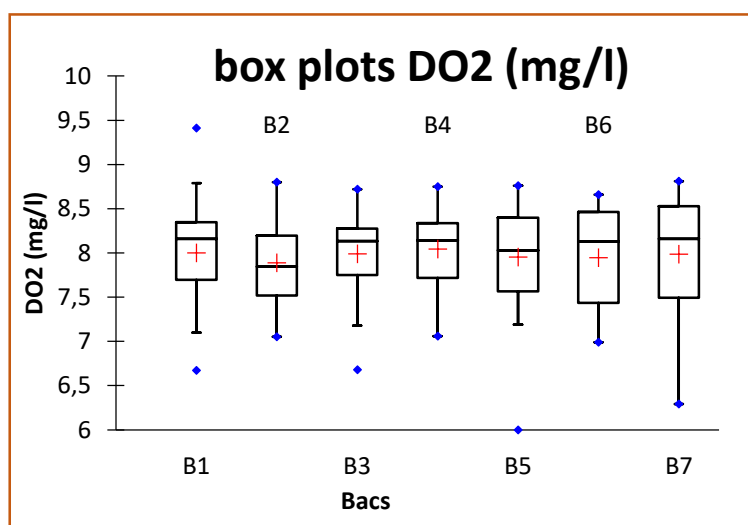


Figure 19 : Suivi de la variation de l'oxygène dissout dans l'eau durant l'expérience.

- Les valeurs journalières de l'oxygène dissout mesurées durant le cycle expérimental (moyenne de 7mg/l) répondaient aux exigences des spécimens.

Ainsi, il est facile de conclure la stabilité des conditions expérimentales des tests d'écotoxicité traduite par la stabilité des paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage, l'unique stress altérant les moules est bien le pesticide « *linuron* » et le microplastique comme xénobiotiques.

III.1.3. Étude de l'effet des polluants (linuron et MPs) sur l'excrétion Azotée et Phosphorée (eau d'élevage)

❖ *L'excrétion phosphorée :*

Les résultats obtenus concernant l'excrétion phosphorée sont représentés dans la figure 20.

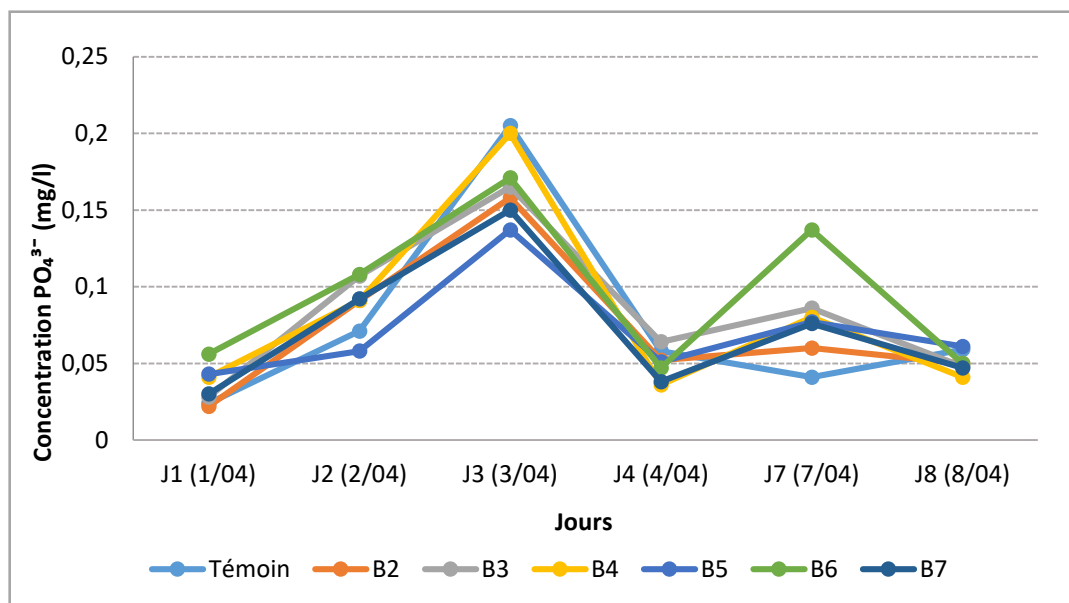


Figure 20 : Étude de l'effet conjugué de la contamination par linuron et MPs sur l'excrétion phosphorée.

Dans le but d'étudier la variation de l'excrétion phosphorée dans les bacs d'élevages durant le cycle expérimentale, on a comparé les concentrations (PO_4^{3-}) des individus exposés par différentes concentrations du linuron et MPs aux témoins (B1).

L'objectif était de différencier les concentrations du bac témoin de celles qui résultent de l'activité métaboliques des moules dans les bacs d'élevage contaminés.

Ainsi, on remarque d'après la figure (19), que les concentrations en phosphore dans les bacs de contamination, sont presque identiques et ceci comparativement au bac témoin de jour 1 à jour 8, et la tendance en fonction des groupes est la même.

Ainsi, on constata, que les variations des teneurs en phosphore sont faibles dans tous les bacs entre 0 et 0,2 mg/l.

Chapitre III : Résultats et discussion

Par ailleurs, l'effet du linuron et/ou des MPs sur l'excrétion phosphorée des individus n'est pas remarquable durant le cycle de contamination, et pas d'une différence de l'effet de stress par rapport le témoin.

❖ *L'excrétion azotée*

Dans les figures 21 et 22, sont illustrées les valeurs moyennes du suivi des paramètres azotés.

- Les variations des teneurs en nitrites en fonction du temps, chez les deux groupes de tests témoins et contaminés, sont graphiquement indiquées dans la figure 21.



Figure 21 : Étude de l'effet conjugué de la contamination par linuron et MPs sur les teneurs en nitrites.

En générale, Les teneurs en nitrites des individus contaminés aux pesticides et microplastiques sont trouvées très proches de celle mesurées chez les témoins.

Aussi, Aucune variation significative des concentrations de l'élément nutritif NO₂ n'est relevée chez les individus exposés aux différents types de polluants et témoins (entre 0.05 et 0.2 mg/l).

Chapitre III : Résultats et discussion

La concentration maximale de nitrite (0,23mg/l) est relevée sous l'effet d'exposition au microplastique C1.

L'effet de pesticide « *linuron* » et des microplastiques sur les individus ne semble pas claires, dont on mesure des faibles augmentations en concentration nitrites. Ces concentrations ne semblent pas avoir effets notables sur l'excrétion azotée.

- Les variations des teneurs en azote ammoniacal en fonction du temps, chez les deux groupes de tests témoins et contaminés, sont illustrées dans la figure 22.

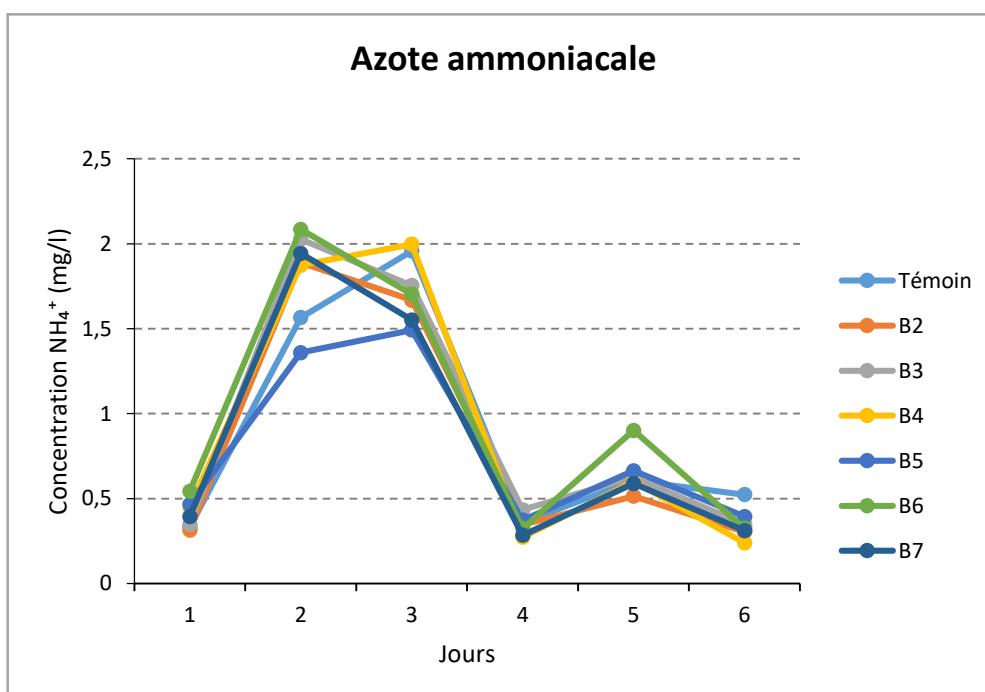


Figure 22 : Étude de l'effet conjugué de la contamination par linuron et MPs sur les teneurs en azote ammoniacale.

D'après la figure, les teneurs de l'élément azoté NH_4^+ chez les individus contaminés aux différents contaminants pesticides « linuron » et microplastiques semble proches des teneurs des individus témoins (Bac B1).

L'élément azoté NH_4^+ , l'introduction des polluants (linuron et MPs) a conduit cette fois-ci à une augmentation très faible de la concentration ammoniacale dans l'eau des bacs de contamination (entre 0,3 et 2).

La valeur de concentration en azote ammoniacale maximale est de 2,1mg/l est relevé chez les moules exposés aux microplastiques C1.

Ainsi, et à la lumière de ces résultats, on peut conclure que la contamination des moules *Mytilus* par (pesticide et microplastiques) a eu un aucun effet sur l'excrétion phosphorée et azotée.

III.2. Résultats des dosages biochimiques et enzymatiques

III.2.1. Résultats des dosages biochimiques des protéines

L'ensemble des résultats relatifs aux dosages des protéines aux niveaux de la chair des moules sont représentées ci-dessous (figure 23).

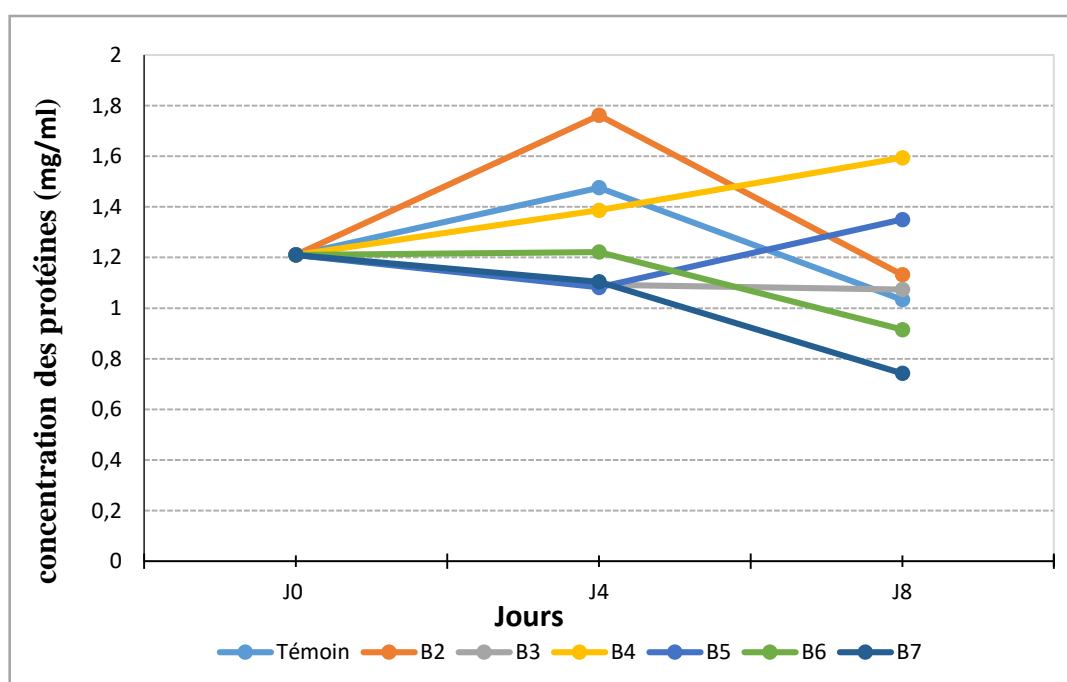


Figure 23 : Étude de l'effet de linuron et les MPs sur les teneurs en protéines des moules au cours du cycle de toxication et de détoxication.

D'après le graphe (figure 23), les observations suivantes peuvent être aperçues :

En générale, les teneurs en protéines mesurées chez individus témoins ont montré une très faible variation le long du cycle expérimental. Ainsi, l'adaptation des moules aux conditions

Chapitre III : Résultats et discussion

expérimentales paraît parfaite et aucun effet du milieu d'élevage sur les réponses biologiques de la moule n'est donc probable.

Par ailleurs, les variations relevées chez les autres groupes de tests varient entre augmentation et déplétion des taux protéique. En effet, la plus forte teneur en protéines au niveau de la chair des moules *Mytilus galloprovincialis* (1,76 mg/ml) est mesurée au 4^{ème} jour d'exposition à la plus grande concentration du pesticide C2 (Bac B2 :100µg/l). La mobilisation des réserves protéiques peut être attribuable à l'effet stressant pour justement assurer les besoin énergétiques pour contrer le surplus de ROS généré lors de l'exposition aux xénobiotiques.

III.2.2. Résultats du dosage de la catalase

La figure 24 ci-dessous représente les variations du dosage du biomarqueur catalase au niveau de la chaire des moules

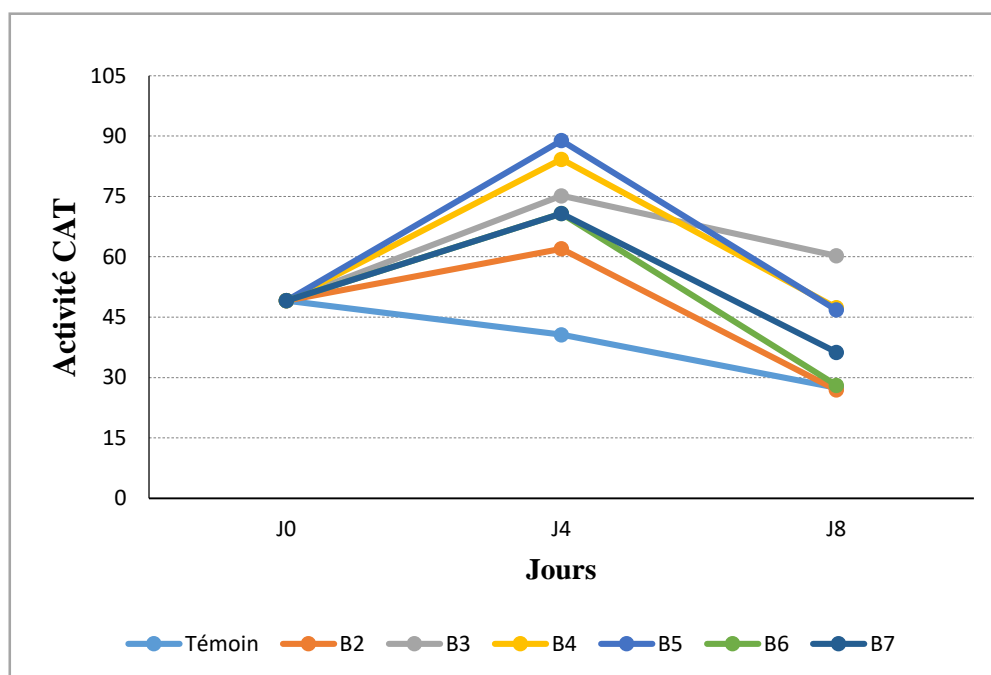


Figure 24 : Variation de la réponse catalase chez la moule *Mytilus galloprovincialis* en fonction des jours.

Chapitre III : Résultats et discussion

D'après le graphe (figure 24), aucune variation significative de l'activité catalase n'est relevée chez les témoins (entre 40 et 49 U/ml). Ceci ne peut que traduire une stabilité physiologique chez les témoins. L'effet des conditions expérimentales est exclu comme facteur de stress.

Par ailleurs, l'exposition aux différents types de contaminants de la présente étude a conduit à une induction significative de l'enzyme de défense catalase et ce par rapport au témoin. Aussi, l'effet de la concentration est perçu dans les différents traitements.

Les activités maximales de la défense antioxydante catalase sont relevées sous l'effet synergique de mélange (pesticide et microplastiques).

L'examen de la décontamination avait pour objectif d'étudier la réversibilité des mécanismes physiologiques de la moule *Mytilus galloprovincialis* et la possibilité de retour vers l'état initial.

Effectivement, l'ensemble des groupes de tests a montré une baisse significative du stress traduite par la diminution de l'activité antioxydante catalase relevée au 8^{ème} jour (fin du cycle de décontamination). Les activités relevées se rapprochaient de celle mesurées initialement.

Du fait la durée de détoxification semble suffisante pour que les individus *Mytilus galloprovincialis* regagnent leur état de santé initial. Nonobstant chez les individus antérieurement exposés à la concentration C2 (Bac B3 :100µg/L) du pesticide, la baisse de l'activité antioxydante n'était pas significative pour traduire un retour vers l'homéostasie. Une prolongation de la détoxification pourrait probablement conduire à une baisse significative de l'état de stress.

III.2.3. Résultats du dosage de la protéase

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 25 :

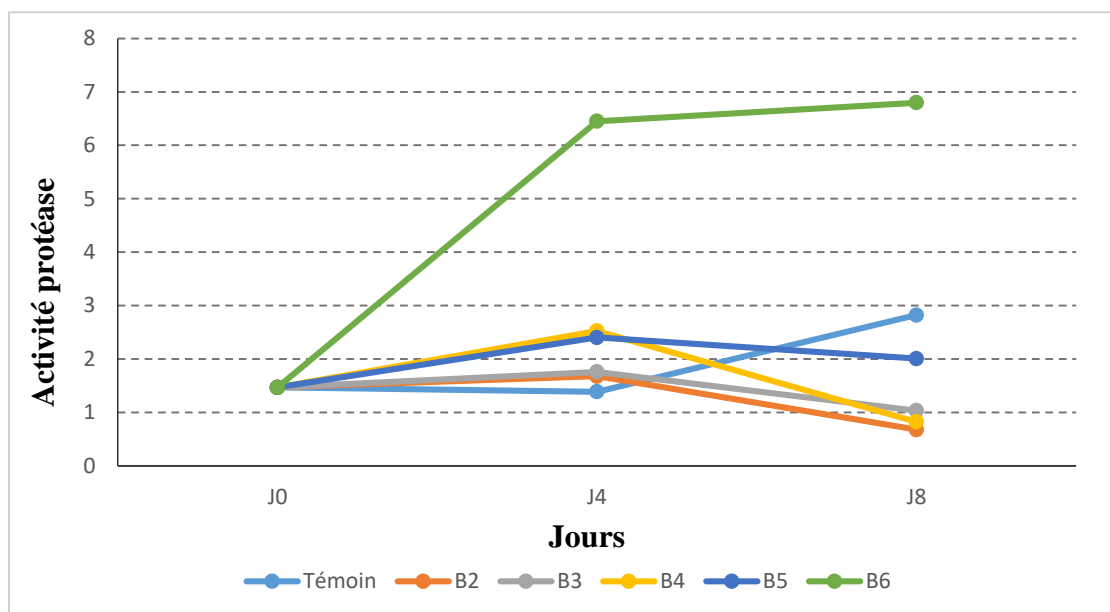


Figure 25 : Evolution de l'activité protéase durant la période d'étude.

Comme première constatation, les témoins n'ont montré aucune variation de leur activité digestive, du 1^{er} au 4^{ème} jour de cycle expérimental. Nonobstant, une augmentation significative de l'activité digestive est notée à la fin du cycle de décontamination chez les témoins.

Généralement, l'activité enzymatique digestive est accélérée pour surmonter les demandes énergétiques de l'organisme face aux situations de stress causées par les xénobiotiques. Toutefois, si la pression chimique exercée par les xénobiotiques est importante (en termes de concentration et/ou durée d'exposition), l'inhibition des enzymes digestives est perçue.

Chez les témoins, l'augmentation de l'activité des enzymes digestives peut être expliquée par une disponibilité importante de la nourriture dans l'eau d'élevage. Toutefois, les conditions expérimentales pourraient provoquer un stress chez les moules. Or, ceci n'est pas probable dans notre étude dont on n'a relevé aucune induction de l'enzyme de défense catalase.

Sous l'effet de l'exposition à linuron, l'activité digestive a montré une faible augmentation par rapport au témoin. Alors, l'effet synergique de l'exposition au mélange (linuron et MPs) a

Chapitre III : Résultats et discussion

conduit à une augmentation remarquable de l'activité digestive avec un effet clair de la concentration.

Comme déjà expliqué, pour contrer le stress, l'organisme mobilise les réserves énergétiques en faveur de la défense, ceci peut être assuré par une activité digestive accélérée, justement pour dégrader la nourriture dans un but de libérer les nutriments énergétiques.

Le résultat est encore confirmé par les taux maximales d'induction de l'activité des enzymes de d'efface CAT.

Par ailleurs, une augmentation très significative de l'activité digestive est relevé chez les moules exposés aux microplastiques, probablement les particules MPs peuvent être traités par la moule comme une nourriture. Or la dégradation des particules plastique par les enzymes digestives ne semblent pas être facile et efficace. Du fait, l'augmentation de l'activité digestive est continuelle.

En revanche, les particules plastiques peuvent provoquer un stress physiologique conduisant à une augmentation des activités enzymatiques dans un but de conserver l'homéostasie de l'organisme. Dans notre étude, les taux d'induction de la catalase sous l'effet du microplastique ne peuvent que traduire un état de stress et un surplus de ROS au niveau cellulaire.

CONCLUSION:

Conclusion

Cette étude avait comme objectif l'étude de l'effet d'une exposition aiguë à 2 concentrations de pesticide (linuron) et les microplastiques sur les activités enzymatiques et métaboliques de la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Les facteurs environnementaux dont la température et la salinité de l'eau d'élevage étaient constants durant tous les cycles expérimentaux, ainsi leur l'influence sur les réponses biologiques est peu probable.

Les 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 du pesticide 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 l'ensemble des expérimentations 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 pesticide et microplastiques ; 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 similaire relevé chez les organismes maintenus dans un milieu exempt de polluant.

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 une variation 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 –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 métalliques et/ou organiques.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Abraham, C.T., S.P. Singh et G. Kulshrestha. 1987. Persistence of herbicides in soil in sorghum-legume intercropping system. Indian J. Agron. 32 (3):253–257.
- Alexandre Beaudry, (2016). Modulation immunologique chez les bivalves par l'environnement et la contamination dans l'optique des changements climatiques Mémoire. Québec, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique, Maîtrise en sciences expérimentales de la santé, 76 p
- AMINOT; A; GUILLAUD, J .F.1993 : Spéciation du phosphore et apports en baie de seine orientale, IFREMER, Océanologie acta, Vol 16, N°5-6, pp 617-623.
- Amiard Jean-Claude., Claude Amiard-Triquet, les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, France, 2008.
- Andrady A.L. (2011). Microplastics in the marine environment. Marine Pollution Bulletin. 62, 1596- 1605.
- Argillier C. et al., « Qu'entend-on par bio-indicateurs de la qualité des eaux continentales ? », L'eau, une ressource durable ?. Montpellier : CRDP,-2-ISBN 978) 175-pp 170 ,2008 .1-333-86626
- Argillier C. et al., « Qu'entend-on par bio-indicateurs de la qualité des eaux continentales ? », L'eau, une ressource durable ?. Montpellier : CRDP,.175-pp 170 ,2008
- Aurélie Doyotte ,Carole Cossu , Marie-Cécile Jacquin , Marc Babut , Paule Vasseur , September 1997 [doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00024-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00024-6).

B

- Barnes D.K.A., Galgani F., Thompson R.C., Barlaz M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences. 364,1985-1998.
- Bayer, P.E. et S. Yamaguchi. 1965. Adsorption and distribution of diuron-C14. Weeds 13:232–235.
- Baztan J., Carrasco A., Chouinard O., Cleaud M., Gabaldon J.E., Huck T., Jaffres L., Jorgensen B., Miguelez A., Paillard C., Vanderlinden J.P. (2014). Protected areas in the

Références Bibliographiques

- Atlantic facing the hazards of micro-plastic pollution: First diagnosis of three islands in the Canary Current. *Marine Pollution Bulletin*. 80, 302-311.
- Belaid S, Redjimi M, Etude de la qualité physico-chimique et bactériologique de l'eau de barrage Zit-Emba (W.Skikda), Jun 2013.
 - Bidi-Akli, A Arab, B Samraoui – Revue d'écologie, Terre et vie, 2014 – hal.science
 - Bonnomet François, U. L.P.- Faculté de Médecine Strasbourg - DCEM1 2004/ 2005 - Module 12B - Appareil Loco-Moteur1 Les entorses de la cheville
 - Branch, G.M., Branch, M.L, Griffiths, C.L. & Beckley, L.E (2005). *Two Oceans: a guide to the marine life of southern Africa* (ISBN [0-86486-672-0](#))
 - Botta et al. 2009, d'après burkhardt et al. 2007. Les pesticides dans le bassin de la Seine – scientific figure on researchgate. Availablefrom : https://www.researchgate.net/figure/Schema-de-transfer-des-pesticides-vers-les-eaux-de-surface-et-souterraines-en-milieus_fig13_281471024 (accessed 20 jun, 2024).
 - Boudouresque, C.F. (1996). Impact de l'homme et conservation du milieu marin en Méditerranée. 2^e édition. GIS Posidonie publ. Fr. 1-243 p.
 - Browne M.A., Crump P., Niven S.J., Teuten E., Tonkin A., Galloway T., Thompson R. (2011). Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environmental Science & Technology*. 45, 9175-9179.
 - Browne M.A., Galloway T., Thompson R. (2007). Microplastic - an emerging contaminant of potential concern? *Integrated environmental assessment and Management*. 3, 559-561.
 - Bryan, G.W. (1984). Pollution due to heavy metals and their compounds. In : *Marine Ecology*. Kinne O. 5^{ème} ed. chp3. John willy et Son. Ltd. New-York. Paris.205p.
 - Browne M.A., Galloway T.S., Thompson R.C. (2010). Spatial Patterns of Plastic Debris along Estuarine Shorelines. *Environmental Science & Technology*. 44. 3404-3409.

C

- Carr KE, Smyth SH, McCullough MT, Morris JF, Moyes SM. Morphological aspects of interactions between microparticles and mammalian cells: intestinal uptake and onward movement. *Prog Histochem Cytochem* 2012;46:185—252, <http://dx.doi.org/10.1016/j.proghi.2011.11.001>.

Références Bibliographiques

- Claessens M., De Meester S., Van Landuyt L., De Clerck K., Janssen C.R. (2011). Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 2199-2204.
- Cossa, D. (1985). Le cadmium et le mercure en milieu côtier : biogéochimie et utilisation du genre *Mytilus galloprovincialis* comme indicateur quantitatif. Thèse de Doctorat d'état, Université de Bretagne Occidentale. Brest. 387 p.
- Cole M., Lindeque P., Halsband C., Galloway T.S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 2588-2597.

D

- David J. Kelly, Paul C. Quinn, Alan M. Slater,³ Kang Lee, Liezhong Ge, and Olivier Pascalis. *Psychol Sci.* 2007 Dec; 18(12): 1084–1089. doi: 10.1111/j.1467-9280.2007.02029.x
- Delattre J, Beaudeau J-L, Bonnefont-Rousselot D.— *Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques*. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 2005, 547 pages.
- Delattre, J.; Beaudeau, J.-L.; Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant. Aspect biologique et pathologie . Lavoisier édition TEC &DOC édition médicales international paris, 335-376
- Derraik J.G.B. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 44, 842-852.
- Deviller.J, Jarret.R, Girutie.P, Soudas.G, Farret.R, Rivière. Indicateurs pour évaluer les risques liés à L'utilisation des pesticides. (2005). France
- DG SANCO (2002). Review report for the active substance Linuron. Finalised in the Standing Committee in the Food Chain and Animal Health at its meeting on 3 December 2002 in view of the inclusion of linuron in Annex I of Directive 91/414/CEE, European Commission Directorate-General Health & Consumer Protection - Unit E1 Plant Health.
- Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE).
- Do Sul J.A.I., Spengler A., Costa M.F. (2009). Here, there and everywhere. Small plastic fragments and pellets on beaches of Fernando de Noronha (Equatorial Western Atlantic). *Marine Pollution Bulletin*. 58, 1236-1238.

Références Bibliographiques

- Du Pont. 1991. Lorox® DF™ herbicide specimen label. Agricultural Products, Du Pont Canada Inc., Mississauga, ON.

E

- ECKERT EM, DI CESARE A, KETTNER MT, ARIAS-ANDRES M, FONTANETO D, GROSSART HP, CORNO G. (2018) Microplastics increase impact of treated wastewater on freshwater microbial community. Environ Pollut. 234:495-502

F

- Fendall L.S., Sewell M.A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. Marine Pollution Bulletin. 58, 1225-1228.

G

- Gaujous, 1995 : « la pollution des milieux aquatique »Ed Tec et Doc. PARIS, 1995.P .P.25- 30 .60-61, 100, 101,172-174,220.
- Gauroy, P. (1972). Le monde animal au laboratoire. Manuel de travaux pratiques de sciences naturelles. Pierron-editeur.217 p.
- Gregory M.R. (1996). Plastic 'scrubbers' in hand cleansers: A further (and minor) source for marine pollution identified. Marine Pollution Bulletin. 32, 867-871.
- Grover, R. 1975. Adsorption and desorption of urea herbicides on soils. Rev. can. phytotechnie. 55:127–135.

H

- Habbar Chafika ,2005 : surveillance de la qualité bactériologique des eaux de baignade, cas des plages d'Ain-Franin et de Kristel .2005 .Mémoire de magister en science de l'environnement et climatologie.D.pt, de physique. Université d'Oran.
- Heinonen-Tanski, H. 1989. The degradation of linuron in sandy soil. J. Agric. Sci. Finl. 61(1): 39–44

Références Bibliographiques

- HELMENSTINE A. (2012) Plastic Definition. In Chemistry About.com. Chemistry. 49(1-2):3342
- Hirsch KS, Adams ER, Hoffman DG, Markham JK, Owen NV. Studies to elucidate the mechanism of fenarimol-induced infertility in male rats. Toxicol Appl Pharmacol. 1986 Dec ;86(3) :391-9.

J

- Jean-Pierre Garrec, Chantal Van Haluwyn, Bio-surveillance végétale de la qualité de l'air, Tec & Doc, 2002, p. 7.
- J. Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, c. cHarlier, J.P. cHaPelle, Le stress oxydant, Rev Med Liege 2007; 62 : 10 : 628-638
- Jorge Limón-Pacheco 1, María E Gonsebatt DOI:10.1016/j.mrgentox.2008.09.015
- Jurd, R.D. (2000). Instants notes in animal biology. Scientific Publishers. 294p.

K

- Keddal, H. 2007. Atmosphère. (Maroc). <http://www.agire-maroc.org>
- Kelly, B. C., Ikonomou, M. G., Blair, J. D., Morin, A. E. & Gobas, F. A. P. C. (2007) Food web-specific biomagnification of persistent organic pollutants.Science,317(5835),236-239.DOI: 10.1126/science.1138275

L

- Lacoue-Labarthe, T. (2007). Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune Sepiaofficinalis et effets potentiel sur les fonctions digestives et immunitaires. Université de la Rochelle.200 p.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C., Ramade F., 1998. Utilisation des Biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Éd Tec et Doc Lavoisier Paris, ISBN : 2-7430-0230-1.
- Lamarck, J. (1819). Histoire naturelle des animaux sans vertèbres. Présentant les caractères généraux et particuliers de ces animaux ... précédée d'une introduction. Verdière. Paris. 343. 8(2) : 462p

Références Bibliographiques

- Lamarck. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 300:189-215 Lower S. (2009). Polymers and Plastics: an Introduction. In Chem1 Virtual Textbook. States of Matter. <http://www.chem1.com/acad/webtext/states/polymers.html>.

M

- MAAO (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation de l'Ontario). 1989. 1990 Guide de lutte contre les mauvaises herbes.
- McEwen, F.L. et G.R. Stephenson. 1979. The use and significance of pesticides in the environment. John Wiley & Sons, Inc., Toronto, ON.
- McRae, B. 1991. Backgrounder: The characterization and identification of potentially leachable pesticides and areas vulnerable to groundwater contamination by pesticides in Canada.
- Moore, M. N. ; Depledge, M. H. ; Readman, J. W., et Leonard, P. D. R. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutat. Res. 18 : 247-268.
- Moore C.J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. Environmental Research. 108, 131-139.

P

- Pagliassotti, M. J. ; Davis, S. N. et Cherrington, A. D. (1994). The role of the liver in maintaining glucose homeostasis : Austin R.G. Landes Company.
- Pagliassotti, M. J. ; Davis, S. N. et Cherrington, A. D. (1994). The role of the liver in maintaining glucose homeostasis : Austin R.G. Landes Company.
- Pascale, Naim, (2017). Bio-surveillance et évaluation du risque toxique en milieu aquatique, <https://acces.ens-lyon.fr>
- PIMENTEL J, AVILA R, LOURENÇO A. (1975) Respiratory disease caused by synthetic fibres : A new occupational disease. Thorax, 30:204–219.

Références Bibliographiques

- Pruter A.T. (1987). Sources, quantities and distribution of persistent plastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 18, 305-310.

R

- REYNE, M. (1998) Les plastiques. Paris, PUF. p 125.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N et al. (2009). L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer, chimie, phisico-chimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats (9e éd). Paris.
- Roquer, 1980 : fondement théoriques du traitement biologiques des eaux volume 1,2 édition, technique et documentation, Lavoisier Paris, P : 132-145.

S

- Shahidul I, Tanaka M. impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review ans synthesis. Avril 2004.
- Sies, H. (1991) Oxidative Stress: Introduction. In: Sies, H., Ed., Oxidative Stress: Oxidant and Antioxidants, Academic Press, San Diego, 15-22.
- SPERLING LH. (2006) Introduction to physical polymer science. 4th ed. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Inc. p 845.

T

- Thomazeau, R. (1981). Station d'épuration eaux potables eaux usées. Précis théorique et technologique. Technique et documentation. Paris. 435 p.
- Thompson R.C., Moore C., Andrady A., Gregory M., Takada H., Weisberg S. (2005). New directions in plastic debris. *Science*. 310, 1117-1117
- Tomlin, C. (éd.). 1994. The pesticide manual: A world compendium. 10e éd. (Incorporating the Agrochemicals handbook.) British Crop Protection Council et Royal Society of Chemistry, Thornton Heath, GB.

Références Bibliographiques

U

- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1984. Pesticide fact sheet: Linuron. USEPA, Office of Pesticide Program, Washington, DC.

V

- Van Cauwenberghe L., Vanreusel A., Mees J., Janssen C.R. (2013). Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environmental Pollution*. 182, 495-499.
- VERSICOLOR AJ. (2015) towards a definition of microplastics: Considerations for the specification of physico-chemical properties. RIVM Letter report. Bilthoven (NL): National Institute for Public Health and the Environment. p 38.

W

- Wade, T.L. ; Sericano, J.L. ; Gardinali, P.R. ; Wolff, G. et Chambers, L. (1998). NOAA's 'Mussel Watch' project : current use organic compounds in bivalves. *Marine Pollution Bulletin*. 37 : 20-26 p.
- WHO (1997) Determination of airborne fibre number concentrations: a recommended method, by phasecontrast optical microscopy (membrane filter method).
- Wingfors, H. ; Seldén, AI. ; Nilsson, C. et Haglund, P. (2006). Markers for PCB exposure in plasma from Swedish construction workers. *Ann Occup. Hyg.* 50 :65-73
- Wolf C Jr, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J, Gray LE Jr. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health*. 1999 Jan-Mar ;15(1-2) :94-118. PubMed PMID 10188194.

ANNEXES :

Annexe 1

• Préparation des réactifs :

Réactifs Lowry : (Mélanger le jour de la manipulation)

- Réactif (A) : Na_2CO_3 ($m = 1\text{g}$) + NaOH (0.1N / $V = 50\text{ml}$).
- Réactif (B) : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($m = 5\text{g}$) + Tartrate de Na et K ($m = 10\text{g}$) + Eau distillé ($V = 1\text{L}$).

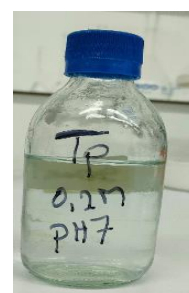
Réactifs Lowry = réactif A (50ml) + réactif B (01ml).



• Préparation des tampons :

Tampon phosphates (0.1M , $\text{PH} = 7$) :

- HPO_4^{2-} ($C = 0.0002\text{ mol/L}$) + H_2PO_4^- ($C = 0.0398\text{ mol/L}$)
- MK_2HPO_4 (174g/mol , $m = 2.618$) + MK_2HPO_4 (136g/mol , $m = 1.353$)
- Eau distillé ($V = 250\text{ml}$).



Tampon phosphates (0.05M , $\text{PH} = 7.8$) :

- HPO_4^{2-} ($C = 0.0905\text{ mol/L}$) + H_2PO_4^- ($C = 0.0095\text{ mol/L}$)
- MK_2HPO_4 ($m = 3.937\text{g}$) + MK_2HPO_4 ($m = 0.323\text{g}$)
- Eau distillé ($V = 500\text{ml}$).

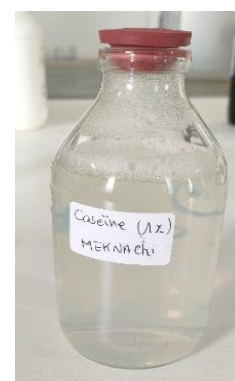


Tampon phosphates (0.1M , $\text{PH} = 8$) :

- HPO_4^{2-} ($C = 0.0938\text{ M}$) + H_2PO_4^- ($C = 0.00620\text{ }\mu$)
- MK_2HPO_4 ($m = 3.937\text{g}$) + MK_2HPO_4 ($m = 0.323\text{g}$)
- Eau distillé ($V = 500\text{ml}$).

Caséine (1%) :

- Caséine ($m = 1\text{ g}$)
- tampon phosphate (0.05M , $\text{PH} = 7.8$) ($v = 100\text{ ml}$)



Annexe 2

- **Matériels biologiques**

1. **La moule « *Mytilus galloprovincialis* » :**

Mytilus galloprovincialis est une espèce de mollusques bivalves couramment utilisée par les réseaux de biosurveillance, on peut utiliser des populations sauvages ou des spécimens transplantés.
(Photo originale)



Systématique :

Règne : Animal

Sous règne : Métazoaire

Embranchement : Mollusques

Classe : Bivalvia

Sous-classe : Lamellibranchia

Ordre : Mytiloidale

Superfamille : Mytilacae

Famille : Mytilidae

Sous-famille : *Mytilinae*

Genre : *Mytilus*

Espèce : *Mytilus galloprovincialis*. (Lamarck, 1819)



2. **Les Micros algues**

L'utilisation des micro algues pour l'alimentation des moules (photos originale)



Annexes

Annexe 3

- Matériels non biologiques de laboratoire physico-chimiques CNRDPA :



Agitateur magnétique



Analyseur à flux continu



Multiparametre



Centrifugeuse



Spéctrophotomètre



Distillateur d'eau



Micropipette



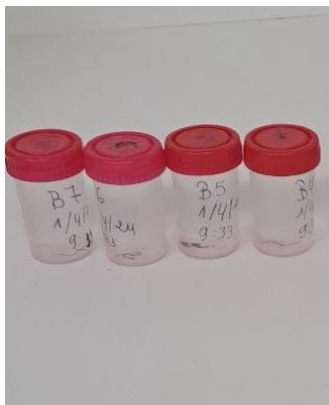
Bain-marie



Une balance de précision

Annexes

- Matériels non biologiques utilisé dans l'expérience :



Flacon stérile 50 ml



Réservoir d'eau de mer



Bacs d'élevage en polyéthylène



Pompe vide cave immergée



Pied à coulisse



Scalpel



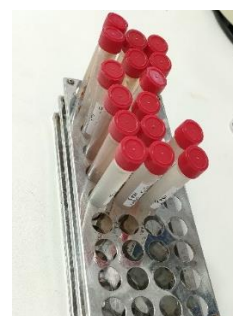
Congélateur (-50C°)



Aérateurs



Vortex



Tubes coniques

Annexes



Glacière



Bras mixeur



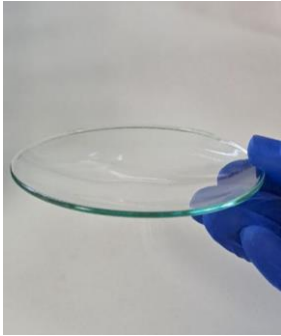
Linuron



Cuvettes en quartz

Annexes

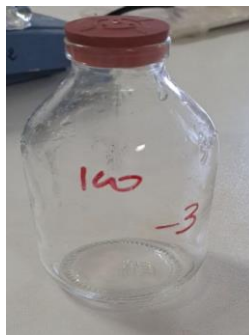
- **Verreries utilisées**



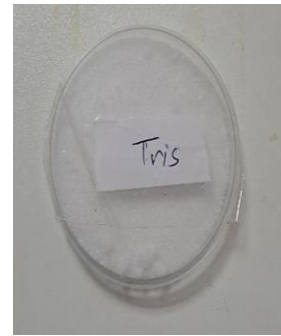
Plaque des verre



Entonnoir



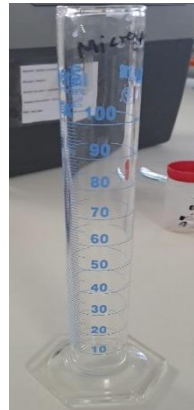
Flacon stérile



Boite de pétrie



Tubes à essai



Eprouvette graduée



Fiolle



Pipette stérile



Spatule



Bécher



Barreau magnétique



Tubes eppendorf

Annexe 4

• Divers travaux sur les moules

Auteurs, régions	Espèces	Contexte de l'étude
Meknachi A., (2010) BOU-ISMAIL ALGERIE	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Biosurveillance active : transplantation des moules d'un site de référence dans trois sites pollués (port GOURAYA, KHEMISTI ; BOUISMAIL) suivi d'une décontamination dans un endroit ouvert dans une approche d'évaluation de l'état de santé dans la baie de BouIsmaïl.
Benali I., (2008) Oran, Algérie	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Évaluation de la qualité de la baie d'Oran par mesure de l'ACHé après transplantation des moles (biosurveillance active).
Abdlouahab et Naceur ALGERIE (1985)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Étude de la pollution dans la baie d'Alger par le dosage de métaux traces (Zn, Cu, Hg, Cd).
Ait Fdil <i>et al.</i> (2006) Maroc	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Étude des mouvements des valves de <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposées aux métaux traces et aux effluents industriels dans les côtes Marocaines sur l'atlantique.
Khessiba <i>et al.</i> (2005) Tunisie	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Étude de l'effet de certains paramètres environnementaux sur l'activité CAT de la moule exposé au Lindane au laboratoire.

Annexes

Orbea <i>et al</i> , (2002). Baie de Biscay Espagne	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Biosurveillance passive .étude des niveaux de contamination par PCB et HAP dans 2 estuaires (Urdaibai et Plentzia) et leur influence sur les réponses des enzymes antioxydantes.
Nesto <i>et al</i> , (2007) Italie	<i>M. galloprovincialis</i> + <i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	Étude de la bioaccumulation et réponses des biomarqueurs de certains métaux traces et micropolluants organiques dans la lagune de Venise, Italie.
Mamaca <i>et al</i> , (2005) France	<i>M.edulis</i>	Étude de biomarqueurs des hémocytes de <i>M.edulis</i> après exposition au styrène dans le laboratoire.
Richardson <i>et al</i> , (2008). HonKong	<i>Perna viridis</i>	Étude de la relation dose réponse des paramètres antioxydantes et des PAH et OC dans laboratoire après l'exposition au xénobiotique.
Rajalakshmi <i>et</i> Mohands, (2005). Inde	<i>Lamellidens corrianus</i>	Étude de l'activité enzymatique de l'ACP des moules d'eau douce après exposition au Cu ²⁺ .
Borkovic <i>et al</i> , (2005) Serbie, Montenegro	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Étude de l'activité des enzymes de défense chez les moules prélevées de la mer adriatique.
Nicholson (2003) Honkong	<i>Perna viridis</i>	Étude de la stabilité membranaire après exposition au Cu ²⁺ .

Annexes

Vidal-Linan <i>et al</i> , (2010) Espagne	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Surveillance de la pollution marine dans les zones côtières fortement polluées par les métaux traces. La mesure des enzymes antioxydant sur <i>Mytilus galloprovincialis</i> .
Baissant <i>et al</i> , (2009) Norvège	<i>M. edulis</i> <i>Chlamys islandica</i>	Étude de la réponse cellulaire et enzymatique après exposition à deux huiles brutes dispersées provenant de la mer du nord et de la mer Barents.
Wepener <i>et al</i> , (2006) Afrique du sud	<i>Melanoides tuberculata</i>	Biosurveillance active, mesure de biomarqueurs après 28jrs de transplantation dans une rivière recevant des effluants industriels et des eaux usées traitées.
Thomas <i>et al</i> , (1999), USA Californie	<i>Mytilus trossulus</i>	Étude des teneurs tissulaires en PAH dans <i>Mytilus trossulus</i> provenant de trois plages contaminées, par le pétrole brute <i>Exxon Valdez</i> échoué dans Prince William Sound
Company <i>et al</i> , (2004) France	<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Étude de l'effet du Cu, Cd et Hg sur l'activité des enzymes antioxydantes et la peroxydation lipidiques.
Farès Nekhli Kheled, (2003) Liban	<i>Brachidontes variabilis</i>	Surveillance de métaux traces dans les eaux Libanaises
Farès Nekhli Khaled, (2003) Egypte, Syrie	<i>Mytilus minimus</i>	Contrôle du (Hg et du Cd, Pb).

Annexes

Farès Nekhli Khaled, (2003) Syrie	<i>Strombus decorus</i> <i>persicus</i> <i>Monodonta turbinata</i>	Contrôle du (Hg, Cd, Pb, Zn, Cu).
Farès Nekhli Khaled, (2003) Maroc	<i>M. galloprovincialis</i> <i>Cerastroderma edule</i>	Contrôle des métaux traces.
Bocquené <i>et al</i> , (2004) France	<i>Mytilus edulis</i>	Suivi de plusieurs biomarqueurs dans des moules exposées au pétrole échoué après naufrage de l'ERIKA sur les côtes Bretonnes.