

17A 540-117-1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Présentée par

**RAIA Abderazak**

Pour l'obtention du diplôme de Master

*Option: Chimie des Substances Naturelles*

*Intitulée*

**Contribution à l'étude de l'activité enzymatique chez la moule  
sous l'effet d'un xénobiotique**

*Soutenue le 29 Septembre 2015 devant le jury composé de :*

<b>Y. Daghbouche</b>	Pr	Présidente	Université de Blida
<b>M. Kasmi</b>	MCA	Examinatrice	Université de Blida
<b>Badis</b>	Pr	Promoteur	Université de Blida
<b>Meknachi</b>	Attaché de Recherche	Co-Promoteur	CNRDPA

MA-540-117-1

**Année universitaire 2014/2015**

## *Dédicaces*

*Au nom d'ALLAH, celui qui fait miséricorde, le miséricordieux, louange à ALLAH, qui m'a donné la force de concevoir ce travail. J'implore notre seigneur pour que cet humble effort lui soit sincère, et que le salut et la bénédiction de Dieu soient sur notre prophète MOHAMED.*

*Je dédie ce travail*

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

*Pour leur aide moral et affectif durant toutes les années de mes études. Que dieu les préserve et leur accorde santé et bonheur. Qu'ils trouvent dans ce mémoire le fruit de mes années d'études et le témoignage de mes reconnaissances.*

## REMERCIEMENTS

Le monde marin a toujours été pour moi un univers attractif qui a baigné ma jeunesse et qui fera toujours partie intégrante de ma vie.

Lorsque j'ai commencé mes études supérieures, mon vœu était de pouvoir appliquer les sciences à ce lieu aussi captivant qu'envoûtant et qui n'a pas fini de livrer ses secrets.

L'occasion m'est donnée ici de pouvoir remercier les nombreuses personnes que j'ai rencontrées et qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude en vers notre Créateur, pour sa clémence et pour m'avoir donné le courage, la volonté, l'espoir et surtout la santé pour réaliser ce mémoire.

Je tiens à remercier mon Co-promoteur Monsieur MEKNACHI.A, pour son suivi et aide très précieux, un grand nombre de vos remarques pertinentes a amélioré la présentation et la clarification de ce manuscrit, merci de m'avoir consacré de votre précieux temps, trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude et mon attachement respectueux.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon promoteur, Monsieur le Pr Badis A, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir confié ce sujet de thèse.

Je remercie tous mes enseignants et professeurs de tous les cycles, qui ont contribué à ma formation, Mme Deghbouche, Mme Bouzidi., Mr el Hattab, Mr Benamar, Mme kasmi, Mme zeffoni

Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur le directeur du CNRDPA pour m'avoir permis de réaliser mes travaux dans les meilleures conditions possibles.

Un immense merci également à l'ensemble des membres du laboratoire CNRDPA, pour m'avoir aidé de réaliser mes travaux dans les meilleures conditions possibles.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe et le Personnel du (CNRDPA) et **Centre Conchylicole** pour leur disponibilité, leur gentillesse et surtout leurs encouragements continuels et leur soutien moral.

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

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers tous mes amis et collègues qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de mon travail, Merci pour votre écoute, compréhension et réconfort durant ces derniers mois difficiles.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ce travail.

# SOMMAIRE



Liste des figures	
Resumer	
Introduction générale.....	1

## CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralité sur la pollution marine.....	3
2. Définition de la pollution marine.....	3
3. Les métaux en Méditerranée.....	4
3.1 Origine et importance des métaux.....	4
3.2 Effets de la pollution métallique sur les organismes aquatiques.....	5
3.2.1 Le cuivre.....	5
4. L'écotoxicologie.....	5
5. La surveillance des écosystèmes aquatiques.....	6
6. Métabolisme des métaux chez les moules.....	7
6.1 Bioaccumulation.....	7
6.2 Bioconcentration.....	7
6.3 La bioamplification.....	8
6.4 Stockage et excrétion.....	9
7. L'idée d'utiliser les mécanismes biochimiques.....	9
8. Utilisation des mollusques pour le suivi de la contamination chimique.....	10
8.2 Organismes utiles pour le suivi de la contamination.....	10
8.3 La moule dans l'écosystème.....	11
8.4 Choix des mollusques bivalves.....	11
8.4.1 Présentation de la moule espèce bioindicatrice.....	12
I.8.5.1 Systématique.....	12
I.1.8.5.2 Description de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	12
I.8.5.3 Répartition géographique.....	13
9. Les biomarqueurs.....	13
9.1 Classification des biomarqueurs.....	14
9.2 Place des biomarqueurs dans l'identification des sources de contaminants.....	15

10. Le stress oxydant.....	15
I.10.1 Les superoxydesdismutases (SOD's).....	16
I.10.2 Les glutathion peroxydases (GPx).....	16
I.10.3 Le glutathion.....	17
I.10.4 Catalase (CAT).....	17
I.10.5 Les protéases.....	18

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

II.1 Stratégie, démarche et dispositif expérimental .....	19
II.2 Méthodes et protocoles analytiques.....	22
II.2.1 Mesure des paramètres biométriques.....	22
II.2.2 Mesure des paramètres physicochimiques.....	23
II.2.3 Suivi de la mortalité .....	23
II.2.4 Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses biochimiques .....	24
II.2.5 Dosages des protéines par la méthode de Lowry .....	25
II.2.6 Dosages de la Catalase par mode Cinétique.....	26
II.2.7 Dosage de la protéase .....	26

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

III.1. Résultats de mesure des paramètres physico-chimiques.....	28
III.2 Résultats des mesures biométriques.....	30
III.3 Résultats des dosages biochimiques et enzymatiques.....	32
III.3.1 Résultats des dosages biochimiques des protéines.....	32
III.3.2. Résultats du dosage de la catalase.....	33
III.3.3 Résultats du dosage de la protéase.....	37
Conclusion.....	41
References Bibliographiques.....	43

## Liste des figures

Figure 1 : la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	10
Figure 2 : Pays producteurs de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	11
Figure 3 : Intégration des biomarqueurs dans la démarche d'analyse écotoxicologique.....	13
Figure 4 : Dispositif expérimental .....	18
Figure 5 : Planning expérimental des tests d'écotoxicité .....	19
Figure 6 : Procédures expérimentales des dosages biochimiques .....	21
Figure 7 : Evolution de l'indice de condition IC1 en fonction de période d'étude.....	25
Figure 8 : Evolution de l'activité CAT durant la période d'étude.....	28
Figure 9 : Evolution de l'activité protéase durant la période d'étude.....	30

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Paramètres physicochimiques de l'eau d'élevage.....	24
Tableau (2) : Résultats du dosage des protéines.....	27

## RESUME

Le présent travail a pour objectif d'étudier la toxicité du Cuivre chez la moule *Mytilusgalloprovincialis*, choisie comme espèce sentinelle, via les mesures des niveaux de la catalase «CAT» (marqueur biochimique de défense antioxydant) et de la protéase (enzyme digestive) prises comme model de biomarqueurs.

L'exposition aigüe des moules à l'élément trace métallique ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a révélé une corrélation positive entre l'activité CAT et le gradient de contamination du milieu. Aussi, une déplétion des teneurs en protéines est perçue avec une atteinte claire de l'enzyme digestive protéase dont on mesurait des diminutions de leur activité.

Par ailleurs, la décontamination (relargage du métal accumulé) est remarquable et permet de réduire les niveaux d'activité antioxydante chez les moules déjà exposées au contaminant.

Cette étude a permis de qualifier la catalase comme biomarqueur de défense antioxydant : sensible, rapide et efficace dans l'évaluation de l'état de santé de l'espèce indicatrice (la moule *Mytilus*) du niveau de pollution par l'élément trace  $\text{Cu}^{2+}$ . Elle pourrait être donc intégré utilement dans un réseau pérenne de mesure en routine de la qualité et de la santé des écosystèmes marins.

Mots-clés : Cuivre, *mytilusgalloprovincialis*, catalase, protéase, décontamination, Biomarqueur.



## ABSTRACT

In this work we investigated to study the toxicity of heavy metal (Copper) for the marine bivalve mollusc mussel *mytilus galloprovincialis* selected sentinel species via the measures the levels of biochemical markers of antioxidant defense (catalase CAT) and some physiological parameters in acute.

Acute exposure to heavy metal (Cu) reveals a positive correlation between the activity of CAT and the gradient of metal contamination in the environment. Thus, the results show a physiological disturbance as a result of metals (decreased levels of proteins and the activity of digestive enzyme). Moreover, the decontamination of mussels is particularly interesting because it reduces activity levels of the antioxidant enzyme in mussels exposed to metal.

This study supports the use of catalase as sensitive, rapid and effective, biomarker that can be used in water quality assessment, and could be integrated usefully in a perennial network of measurement in routine of quality and health of the Marine watery ecosystems.

Keywords: heavy metals, marine pollution, toxicity, oxidative stress biomarker, *mytilus galloprovincialis*, biological monitoring.

## المخلص

الأعمال المنجزة و المعروضة في هذه المذكرة غايتها الرئيسية تتمثل في دراسة الآثار التسممية لمعدن النحاس على نوع من ثنائية المصراع بلح البحر ميتيليسقالوبروفينسياليس من خلال قياس مستويات الكتلاز ( إنزيم دفاع ضد الأكسدة الخلوية) و بعض المؤشرات الفيزيولوجية بواسطة الاختبار الحاد في المختبر .

كشفت نتائج تعريض بلح البحر إلى معدن النحاس ، وجود علاقة ايجابية بين تحريضا الكتلاز و التدرج في تركيز المعدن في الوسط. وأظهرت النتائج اضطرابات فيزيولوجية تحت تأثير زيادة مستويات الملوثات المعدنية. وأظهرت نتائج أن نقل بلح البحر المتسمم بمعدن الثقيلة إلى وسط اقل تلوثا يؤدي إلى نقص مستويات نشاط الإنزيم.

هذه الدراسة تسمح بتأهيل الكتلاز كمؤشر بيوكيميائي حساس وفعال للدفاع ضد الأكسدة الخلوية بصورة سريعة وفعالة في تقييم صحة البيئة و يمكن إدماجها بشكل مفيد و فعال في إطار شبكة دائمة لقياس النوعية ومراقبة صحة الأنظمة البيئية البحرية.

الكلمات المفتاحية : ، النحاس ، ميتيليسقالوبروفينسياليس ، المؤشر البيوكيميائي ، الكتلاز ، الاضطراب.

## INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

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

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

Ce travail se veut une étude des biomarqueurs catalase et protéase autant que réponse biologique à un stress induit par une exposition aiguë au cuivre chez la moule *Mytilus galloprovincialis* dans un but global d'essai d'adoption d'une technique rapide et susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de santé de la baie de Bou-Ismaïl de la wilaya de Tipasa.

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

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

# **CHAPITRE I**

## **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I.1 Généralité sur la pollution marine**

Le développement industriel, agricole et urbain est accompagné inévitablement par des problèmes de pollution de l'environnement aquatique. En effet, du fait de l'activité humaine, plusieurs milliers de substances chimiques arrivent à la mer via l'atmosphère ou les eaux continentales exoréiques. Quelques-unes de celles-ci, comme les pesticides, les métaux lourds et les hydrocarbures, sont étrangers au milieu marin; d'autres existent déjà naturellement mais leurs concentrations sont altérées par l'intervention humaine. [8-9]

Les eaux de surface et côtières sont souvent contaminés par de nombreux produits chimiques dont des éléments métalliques rejetés par l'industrie, l'agriculture et les communautés urbaines. Les zones estuariennes et côtières, sous forte influence continentale, sont les plus touchées par ce type de contamination. Les problèmes posés par la dispersion de polluants dans l'environnement ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis de nombreuses décennies. La prise de conscience de la nécessité de préserver les écosystèmes aquatiques a ainsi fait émerger certaines questions, notamment celles du devenir de ces polluants dans l'environnement ainsi que de leurs effets sur la biodiversité animale et végétale. [9-10]

La pollution métallique est l'une des formes de pollution anthropique les plus dangereuses menaçant la zone côtière en Algérie dont les origines sont des industries de métallurgie et d'électrolyse (Zn, Hg, Pb), de tannerie et de papeterie (Cd, Zn, Cu, Hg, Cr et Ni), des eaux usées et du trafic maritime (Hg, Zn, Cu, Cd, Pb et Ni), ainsi que de l'agriculture par usage abusif des pesticides (Cu, Zn et Hg). Sachant que ces métaux lourds sont des micropolluants qui peuvent affecter la salubrité du milieu marin, car ils ne subissent pas de dégradation biologique ou chimique. Ils peuvent, de ce fait, s'accumuler dans les différents compartiments des écosystèmes tels que l'eau, les sédiments, et le biote (animal ou végétal). [9]

## **I.2 Définition de la pollution marine**

La définition de la pollution marine la plus couramment acceptée est celle donnée par le groupe mixte d'expert chargé d'étudier les aspects scientifiques de la protection de l'environnement marin : " l'introduction directe ou indirecte, par l'homme, de substances ou d'énergie, dans le milieu marin (y compris les estuaires),

lorsqu'elle a des effets nuisibles tels que dommages aux ressources biologiques, risques pour la santé de l'homme, entraves aux activités maritimes, y compris la pêche, altération de la qualité de l'eau de mer du point de vue de son utilisation et dégradation des valeurs d'agrément.[9]

### **I.3 Les métaux en Méditerranée**

La Méditerranée est une mer semi fermée, entourée de trois continents, les apports atmosphériques et telluriques sont donc importants.

Les premières mesures fiables d'éléments traces, réalisées en 1983, ont montré des profils verticaux très différents en Méditerranée de ceux mesurés dans les océans Atlantique et Pacifique. Dans ces deux océans, pour le zinc et le cadmium, par exemple, les profils verticaux s'apparentent à ceux des éléments nutritifs, à savoir de très faibles concentrations en surface et une augmentation progressive en profondeur. En Méditerranée, ces métaux traces sont plus concentrés dans les couches supérieures que dans les couches inférieures où ils restent en quantité relativement stable. Ces profils particuliers en Méditerranée ont été interprétés par un état non stationnaire, les apports superficiels étant plus forts que le transfert vertical par l'activité biologique et les mouvements hydrologiques. Cette caractéristique a permis aux chercheurs d'analyser avec plus de facilité l'évolution de la concentration des métaux traces (mercure, cadmium, plomb, cuivre et zinc) provenant de l'atmosphère et des rivières: dus pour l'essentiel aux activités humaines[11]

#### **I.3.1 Origine et importance des métaux**

Les éléments traces métalliques sont des éléments dont la concentration dans la croûte terrestre est inférieure à  $1 \text{ g. Kg}^{-1}$ .

Les métaux sont réputés toxiques, alors que certains sont des oligo-éléments (Cu, Zn, Fe). C'est pourquoi le terme de métal lourd est souvent appliqué à tort à des éléments en raison de leur toxicité. De plus, certains éléments sont déclarés métaux lourds alors qu'ils sont des métalloïdes (Se, As) ou qu'ils ne sont pas « lourds » (Be, Al). Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation « Eléments en traces Métalliques » (ETM) ou par extension « éléments traces »[4-9]

### **I.3.2 Effets de la pollution métallique sur les organismes aquatiques**

Les métaux ont des effets divers sur les organismes aquatiques en fonction du métal et de l'organisme considéré [9].

#### **I.3.2.1 Le cuivre**

Le cuivre est un oligo-élément essentiel qui fait l'objet d'une homéostasie rigoureusement contrôlée. En revanche, en concentration excessive il peut se révéler toxique.

Du point de vue du transfert dans les réseaux trophiques des écosystèmes, il a été généralement constaté que s'il existe une bioaccumulation non négligeable de ce métal chez les organismes aquatiques, il n'existe vraisemblablement pas de biosurveillance dans les chaînes alimentaires.

Les manifestations de la toxicité du cuivre diffèrent également en fonction de sa spéciation.

Les effets néfastes du cuivre sur les organismes vivants se traduisent généralement par des modifications des paramètres biochimiques et des fonctions physiologiques. Les travaux réalisés sur le sujet montrent que dans les milieux aquatiques, le phytoplancton ainsi que les invertébrés et les végétaux peuvent faire preuve d'une certaine tolérance au cuivre. Il faut alors prendre en considération les importantes variations de sensibilités spécifiques à chaque espèce, sachant que la tolérance au cuivre reste principalement liée à sa biodisponibilité dans le milieu. [4-9]

### **I.4 L'écotoxicologie**

L'écotoxicologie est des effets néfastes des toxiques sur l'homme. il prend ainsi en compte les effets des produits chimiques dans le contexte de l'écologie. On peut donc définir l'écotoxicologie comme l'étude des effets néfastes des contaminants chimiques sur les écosystèmes en intégrant les impacts aussi bien sur les individus que sur la population [12].

Cette discipline comporte plusieurs aspects ou domaines d'étude indépendants [13] :

- Le monitoring des polluants dans l'environnement par le biais d'analyses chimiques et l'usage d'espèces animales et végétales indicatrices de contamination et/ou de biomarqueurs d'exposition.



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

L'approche écotoxicologique par le biais des bioessais, biomarqueurs, bioindicateurs, les études en mésocosme, et *in situ*, se veut complémentaire à l'approche analytique qui se limite à la détermination des niveaux de contamination par tel ou tel polluant des biotopes sans prendre en considération leur effet sur la composante vivante des écosystèmes et par conséquent elle ne nous renseigne pas sur la toxicité des milieux analysés vis-à-vis des organismes vivants . Ainsi, la nécessité de détecter et de surveiller les effets des contaminants en particulier ceux présents à de très faibles teneurs a abouti au développement des marqueurs moléculaires des effets des contaminants sur les organismes vivants ou les biomarqueurs [14].

### **I.5. La surveillance des écosystèmes aquatiques**

La surveillance des écosystèmes aquatiques est exercé depuis plusieurs années afin d'éviter les conséquences parfois graves de la pollution. Les méthodes d'analyses physico-chimiques, bien que toujours plus performantes, atteignent leurs limites en tant qu'outils d'aide à la gestion environnementale.

L'analyse chimique des polluants présents dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques n'est pas toujours possible du fait de la multiplicité des molécules présentes, et ceci souvent à des concentrations inférieures aux limites de détection analytique.

Par ailleurs, une telle approche ne renseigne pas sur les risques encourus sur les populations animales ou végétales exposées aux polluants, et ne peut, à elle seule, prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants (synergies), ni quantifier simplement la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants, et également ne pas tenir compte des phénomènes de spéciation, propres aux conditions physicochimiques du milieu marin. [9]

C'est dans cette optique que l'équipe de recherche « Environnement et Pollution » du laboratoire d'Ecosystème Aquatique au centre national de recherche et de développement de la pêche et de l'aquaculture (CNRDPA), s'est inscrit pour évaluer l'état de santé de la baie de Bouismail à travers le développement d'un programme de gestion des écosystèmes aquatiques. Des travaux ont été réalisés au niveau du centre sur le développement et la maîtrise des biomarqueurs au niveau des espèces bioindicatrices de pollution afin d'être utilisés dans l'évaluation de l'état environnementale des zones côtières algériennes.[9]

## **I.6 Métabolisme des métaux chez les moules**

Les organismes vivants possèdent des mécanismes d'absorption, de transport et d'élimination des métaux.

### **I.6.1 Bioaccumulation**

La bioaccumulation est le processus par lequel un organisme vivant absorbe une substance à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il l'excrète ou la métabolise. Elle désigne donc la somme des absorptions d'un élément par voie directe et alimentaire par les espèces animales aquatiques ou terrestres.

La bioaccumulation est donc le résultat des processus par lesquels le contaminant entre dans l'organisme et des processus de décontamination, une combinaison des mécanismes d'excrétion vers l'environnement et de biotransformation endogène.

Dans le cas d'accumulateurs de métaux tel que les bivalves, l'excrétion ne compense pas leur assimilation.[10-15]

### **I.6.2 Bioconcentration**

La bioconcentration est un cas particulier de bioaccumulation, elle peut être définie comme étant l'assimilation et l'accumulation d'une substance chimique par un organisme à partir de son environnement ou de son alimentation. La biodisponibilité des métaux est le facteur clé qui détermine les concentrations tissulaires métalliques.

C'est donc l'accroissement direct de la concentration d'un contaminant lorsqu'il passe de l'eau à un organisme aquatique. Le facteur de concentration (FBC) peut être défini comme une constante issue du rapport de la concentration d'un élément dans un organisme en état d'équilibre à sa concentration dans le biotope.

Dans ce cas là, la biodisponibilité des métaux pour les organismes marins dépend de la forme chimique sous laquelle ils se trouvent ainsi que de leur richesse dans le milieu. La forme chimique des métaux est liée aux propriétés physico-chimiques du milieu. Si les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligo-éléments), nombre d'entre eux peuvent s'avérer contaminants pour diverses formes de vie, lorsque leur concentration dépasse un seuil, lui-même fonction de l'état physico-chimique (spéciation) de l'élément considéré. [10-16]

### **I.6.3 La bioamplification :**

Elle correspond au processus selon lequel la concentration d'un composé chimique dans un organisme est supérieure à celle de la proie qu'il consomme. Il s'agit dans ce cas de la possibilité pour un toxique d'être cumulé par une chaîne trophique. Si le toxique n'est pas dégradé ou éliminé, il va s'accumuler de plus en plus au niveau de chaque maillon de la chaîne alimentaire [15].

Le facteur de bioamplification (FBA) peut être défini comme une constante issue du rapport de la concentration d'une substance dans le prédateur sur la concentration dans la proie.

En général, la contamination d'une espèce résulte de l'équilibre entre l'assimilation et l'élimination d'une substance chimique. Le processus de transfert représente le flux de contaminants entre les différents compartiments abiotiques et biotiques. L'accumulation représente la quantité stockée dans chacun des compartiments. La bioaccumulation est donc le résultat des processus par lesquels le contaminant entre dans l'organisme, et les processus de décontamination ou élimination de cette substance (excrétion, biotransformation) [16]

### **I.6.4 Stockage et excrétion**

Les organismes sont, dans une certaine mesure, capables de développer une acclimatation physiologique pour faire face à une exposition continue aux métaux en étant séquestrés, Dans ce cas-là, il existe plusieurs voies possibles d'élimination des métaux par les cellules. [10-16]

### **I.7 L'idée d'utiliser les mécanismes biochimiques**

L'utilisation de biomarqueurs pour le suivi de la qualité des milieux permet de compléter les analyses chimiques en procurant une évaluation, intégrée dans le temps, de l'exposition et des effets de polluants à différents niveaux d'organisation biologique.

Cette approche biologique de l'impact d'une perturbation sur les organismes et les écosystèmes est relativement récente. [5]

La variation de certains marqueurs biologiques à l'exposition à des contaminants peut aider à la caractérisation des effets de la contamination. Un biomarqueur 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. [5]

L'idée d'utiliser les mécanismes biochimiques impliqués dans les étapes précoces de l'intoxication est assez pratique. On dispose ainsi d'une information sur l'effet biologique à travers la mise en oeuvre d'un mécanisme connu. Cet effet peut être révélateur d'effets toxiques au niveau de l'organisme entier avant même qu'ils ne soient observables. Un effet biologique peut être relativement rémanent et témoigner d'un impact toxique ancien après que la cause ait disparu. Enfin, les mécanismes biochimiques sont assez faciles d'accès avec des outils *in vitro* de faible coût de mise en oeuvre et permettent ainsi de surveiller des pollutions toxiques du milieu de façon économique. [5-15]

Cette nouvelle approche, qui repose sur l'étude de la réponse biologique des organismes en face d'un stress environnemental et utilisant des espèces sentinelles (ou bioindicateurs) ainsi que sur des mécanismes physiologiques considérés comme des indicateurs biologiques (ou biomarqueurs), fait l'objet de la biosurveillance environnementale. [5-15]

### **I.8 Utilisation des mollusques pour le suivi de la contamination chimique**

Les mollusques sont des animaux à corps mou, dépourvus de squelette interne (invertébrés) et présentant généralement une coquille calcaire externe ou interne. Les trois principales classes sont les gastéropodes, les bivalves (lamellibranches) et les céphalopodes. Surtout présents en milieu marin, il existe également des mollusques d'eau douce et des mollusques terrestres. Leur reproduction est sexuée.

Les bivalves vivent soit fixes sur un substrat dur (huitres, moules), soit enfouis ou à la surface des substrats meubles (coquille Saint-Jacques, palourde, coque, praire).

Organismes filtreurs (35 l d'eau/j pour la moule), ils se nourrissent de phytoplancton et de débris organiques présents dans l'eau. [17].

#### **I.8.2 Organismes utiles pour le suivi de la contamination**

Les mollusques bivalves sont utilisés pour la recherche et la quantification de nombreux contaminants. Ils sont simples à échantillonner, résistent à la contamination chimique, métabolisent peu les substances chimiques et en bioaccumulent au sein de leur organisme à des concentrations supérieures à celles présentes dans le milieu.

Cela permet l'analyse de substances dont les concentrations environnementales sont très faibles et dont la détection dans l'eau par les techniques d'analyse chimique usuelles est difficile.

De plus, les bivalves sont sédentaires, généralement abondants et présentent une durée de vie longue, ce qui permet de relier un organisme à son milieu. De plus, leur vaste distribution géographique autorise une comparaison sur une large échelle spatiale [17].

Les mollusques sont également employés pour suivre les effets de la contamination. Ils servent notamment de support à la mesure de biomarqueurs qui peuvent révéler l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique (à caractère polluant), par la recherche de changements structuraux ou fonctionnels, observables et/ou mesurables à divers niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale). Les biomarqueurs permettent donc d'évaluer les réponses d'organismes exposés à une contamination chimique, même pour des concentrations très faibles, et ce, bien avant que la communauté ne présente de réactions apparentes [17].

### **I.8.3 La moule dans l'écosystème**

Elle joue un rôle important en tant qu'organisme filtreur contribuant à épurer l'eau en fixant des métaux dans sa coquille, en diminuant la turbidité de l'eau, et tout en améliorant l'offre en plancton ; on a en effet montré qu'un lit de moule — bien qu'il consomme du plancton ( $37 \pm 20$  % présent dans l'eau), libère dans le milieu une telle quantité de nutriments bioassimilables (Ils sont utilisés par l'organisme pour couvrir ses besoins physiologiques, notamment de son développement et de sa croissance.)

Par ailleurs, un lit de moule est un petit bioréacteur qui peut aussi stabiliser des vaseuses (testé en mer de Wadden sur des vaseuses intertidales et enrichir l'écosystème en termes de biodiversité). En plus les mollusques marins jouent un rôle fondamental dans la protection des côtes en défendant l'érosion de littorale. Pour ces raisons les moules, comme les huîtres sont classées parmi les espèces-ingénieurs. [8]

### **I.8.4 Choix des mollusques bivalves**

Différents critères sont pris en compte pour le choix des mollusques bivalves en tant qu'espèces sentinelles, à savoir :

- Leur large distribution géographique, qui permet les comparaisons entre différents sites.
- Leur abondance, qui permet de réduire l'impact des prélèvements sur la structure et la densité de la population mais également de faciliter les prélèvements.
- Leur sédentarité, afin que l'état des individus puisse être directement corrélé avec le niveau de pollution du site [9].

## I.8.5 Présentation de la moule espèce bioindicatrice

### I.8.5.1 Systématique

- Règne: Animal
- Sous-règne: Métazoaires
- Phylum: Mollusques
- Classe: Bivalves
- Sous-classe:  
Ptériomorphes
- Ordre: Mytiloidés
- Famille: Mytilid
- Genre: Mytilus
- Espèce: *Mytilusgalloprovincialis*[18]

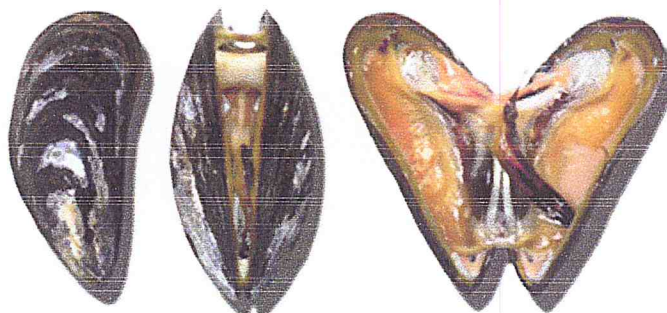


Figure 1 : la moule *Mytilusgalloprovincialis*

### I.8.5.2 Description de *Mytilusgalloprovincialis*

Le corps de la moule est protégé par une coquille formée de deux valves égales (équivalve), qui s'ouvrent lorsque l'animal meurt, le corps, entièrement mou et non segmenté, est enveloppé dans un manteau que l'on peut décoller de la coquille, le manteau qu'est formé de deux lames, délimites une cavité palléale qu'est remplie d'eau de mer. La moule est aussi constituée de pied, de byssus, muscle adducteur postérieur et antérieur qui assure le rapprochement des deux valves. La moule ne possède pas de tête distincte, mais la bouche permet de reconnaître la partie antérieure de l'animal. Le cœur visible par transparence indique la région dorsale.[18-20]

La coquille qui est de nature calcaire (carbonate de chaux) est d'une couleur noirâtre avec des reflets bleutés, elle représente des courbes régulières : les stries d'accroissement qui sont les témoins des étapes successives de la croissance. Le corps est enveloppé par deux lobes du manteau qui secrète la coquille. Les lobes sont séparés l'un de l'autre et laissant sortir le pied ainsi que le byssus, ils délimitent une cavité remplie de l'eau de mer : c'est la cavité palléale.

De cette dernière sorte le pied et la touffe de filaments du byssus eux même sortent de l'orifice de la glande du byssus.

Dans la face ventrale se trouve la masse viscérale de la moule, de part et d'autre de cette dernière se disposent quatre lames fines et striés transversalement: ce sont les branchies qui baignent dans la cavité palléale [21-23]

### I.8.5.3 Répartition géographique

L'espèce *M. galloprovincialis* se rencontre sur les côtes Atlantiques du sud de l'Irlande et la Cornouaille, sur les côtes Atlantiques de l'Europe et de l'Afrique du Nord, sur le littoral de la Méditerranée à l'exception du sud de la Méditerranée orientale et sur les côtes de l'Adriatique et de mer noire. [18]

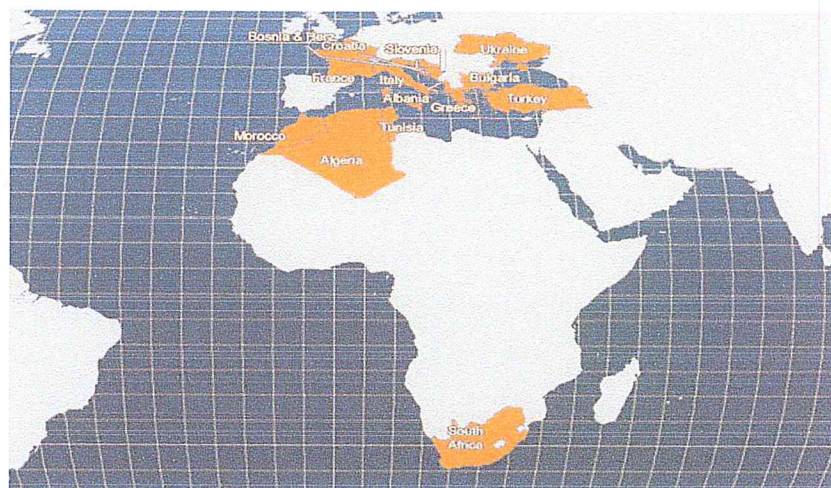


Figure 2 : Pays producteurs de *Mytilus galloprovincialis* [18]

## I.9 Les biomarqueurs

Les cellules de tout organisme vivent dans des conditions environnementales physiologiques normalement stables mais n'excluant pas des agressions aiguës ou chroniques.

Cette situation impose une faculté d'adaptation indispensable pour la survie, nécessitant la mise en œuvre de mécanismes permettant la détection du stress, quelle qu'en soit la nature, et les réponses adéquates visant à en moduler les effets [24]

En complément des analyses chimiques, la mesure de biomarqueurs permet de disposer d'informations sur la nature et le niveau de la contamination chimique mais aussi sur la santé des organismes vivants et des populations des écosystèmes aquatiques.. En cela, les biomarqueurs viennent en complément des mesures traditionnelles de bioindication sur les populations d'invertébrés in situ [25].

Les biomarqueurs sont définis comme des indicateurs de changements moléculaires, biochimiques et cellulaires provoqués par les polluants chimiques et qui sont mesurables dans des tissus biologiques.



Ces changements constituent un système d'alarme précoce de la santé des populations naturelles sous forme d'un signal intégré du stress chimique. De nombreuses activités enzymatiques sont considérées comme des biomarqueurs d'exposition, en milieu marin, chez les poissons et les mollusques, notamment celles des enzymes de phase I, dépendantes du cytochrome et des enzymes de phase II. Des activités enzymatiques moins spécifiques que les précédentes permettent d'établir que les organismes ont été soumis à un stress oxydant dû à la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Chez les mollusques marins exposés à des xénobiotiques organiques mais aussi à des métaux lourds, la pollution chimique augmente fortement les activités enzymatiques antioxydants.[26]

### I.9.1 Classification des biomarqueurs

Les biomarqueurs sont classés selon AMIARD (2008) en deux classes :

#### ❖ *Biomarqueurs de défense ou d'adaptation :*

Ils mettent en évidence la défense de l'organisme exposé à un contaminant.

Exemples : l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase et la fragilisation de la membrane lysosomale. [4]

#### ❖ *Biomarqueurs de dommage ou d'effet :*

Ils mettent en évidence la modification directe et néfaste causée par un contaminant à un organisme.

Exemples : l'activité de la catalase et l'activité de la glutathion-s-transférase.

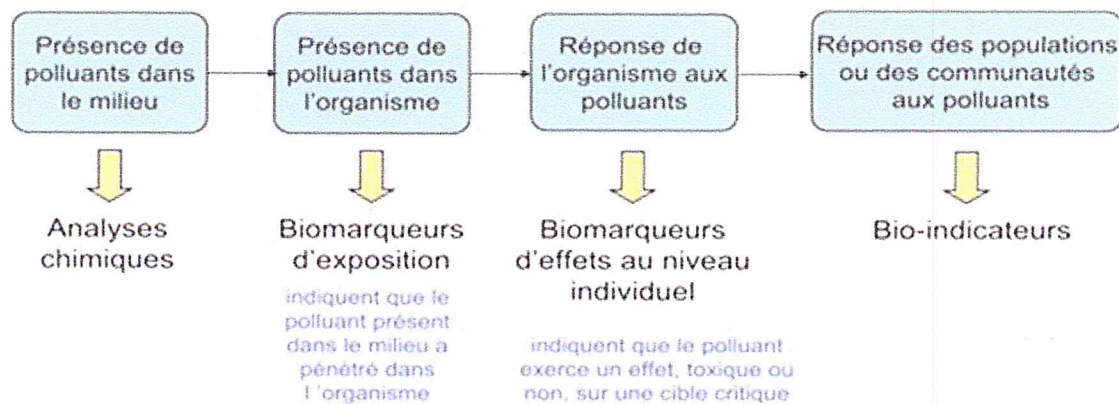
Les biomarqueurs peuvent être qualifiés selon deux critères:

- soit d'**indices de stress généraux** traduisant une réponse de l'organisme à un ensemble de polluants sans permettre de déterminer la nature même de ces polluants.
- soit d'**indices de stress spécifiques** indiquant une réponse de l'organisme à une famille de polluants. [4]

### I.9.2 Place des biomarqueurs dans l'identification des sources de contaminants

Pour identifier les sources de contamination, deux voies sont possibles :

- les marqueurs spécifiques représentent à la fois un moyen de mesure des effets au niveau infra-individuel et une méthode d'identification de la contamination, peu précise, mais relativement peu onéreuse.
- les dosages de contaminants dans des organismes aquatiques donnent une image précise des niveaux de contamination du compartiment biologique, mais nécessitent des moyens financiers et matériels beaucoup plus importants. [4]



**Figure 3:** Intégration des biomarqueurs dans la démarche d'analyse écotoxicologique[29].

### I.10 Le stress oxydant

De manière générale, le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des prooxydants et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule.

Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant en fonction de son mode de vie, de ses caractéristiques génétiques ou de l'environnement dans lequel il vit. Les bonnes habitudes alimentaires jouent aussi un rôle primordial dans le maintien d'un potentiel antioxydant optimal. [30]

Une seule méthode ne peut à elle seule rendre compte du SO. Il importe donc d'avoir à sa disposition une batterie de tests adéquats afin d'évaluer exactement la situation. La détermination du SO s'orientera autour des axes d'analyses [23]

### **I.10.1 Les superoxydesdismutases (SOD's)**

La SOD –superoxydedismutase- est une métallo enzyme produite de façon endogène dans toutes les cellules aérobies, il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène.

Cette enzyme assure l'élimination de l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène. Elle assure ainsi la première ligne de défense contre le stress oxydant. La SOD a besoin d'oligo-éléments comme le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD présente dans le cytosol) ou le manganèse (MnSOD présente dans la mitochondrie) pour fonctionner correctement. Il existe aussi une SOD extracellulaire. Des valeurs basses en SOD peuvent s'expliquer par des taux faibles en oligoéléments. Il n'existe toutefois pas de corrélation absolue entre concentrations de SOD et ceux – ci. Face au stress oxydant, la SOD se comportera de deux façons différentes.

Dans un premier temps, l'organisme réagira lors d'un stress oxydant modéré en surexprimant la SOD (exemple : l'exercice physique).

Si le stress perdure et produit de façon massive des EOA toxiques , la SOD sera détruite et sa concentration chutera. Paradoxalement, une concentration trop élevée en SOD peut s'avérer dangereuse car, dans ce cas, elle est à la base d'une surproduction de peroxyde d'hydrogène (effet paradoxal des antioxydants).[31-38]

### **I.10.2 Les glutathion peroxydases (GPx)**

Cette enzyme a besoin du glutathion et du sélénium pour fonctionner correctement. Son rôle principal est d'éliminer les peroxydes lipidiques résultant de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

Tout comme la SOD, la glutathion peroxydase séléno-dépendante se comportera de deux façons différentes face au stress oxydant :

surexpression de l'enzyme dans un premier temps puis destruction si le stress oxydant perdure de manière permanente . Une diminution de l'activité de la GPx peut également provenir d'un apport alimentaire trop faible en sélénium.

La relation entre sélénium plasmatique et GPx érythrocytaire n'est significative que lorsque la teneur en sélénium est inférieure à 60 µg/L .

Au-dessus de cette valeur, la relation montre un plateau, indiquant que les besoins de l'enzyme sont satisfaits [39].

### I.10.3 Le glutathion

Il s'agit d'un tripeptide qui joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant. Le glutathion (GSH) peut interagir directement avec les espèces oxygénées activées mais il est principalement utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydés.

Il joue également un rôle clé dans la transmission cellulaire pour des protéines pro – et anti – inflammatoires.

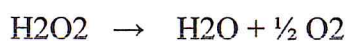
Des concentrations trop basses en GSH conduisent à une diminution de la défense immunitaire.

Lors d'un stress oxydant, le GSH est généralement consommé. Il importe donc de mesurer le glutathion oxydé (GSSG) et de calculer le rapport GSH/GSSG afin d'obtenir une idée plus précise de l'importance du stress oxydant. Le vieillissement (> 50 ans) s'accompagne d'une diminution progressive de ce rapport. Ce rapport est aussi particulièrement diminué à l'issue d'un exercice physique intense suite à une augmentation du glutathion oxydé. Ceci reflète la présence d'un stress oxydant comme précédemment décrit.[20-26]

### I.10.4 Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme présente dans tout le règne animal et se retrouve aussi chez les végétaux. C'est une enzyme hémique, se retrouvant principalement dans les peroxysomes des cellules. Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau oxygène moléculaire.

CAT



L'intérêt pour l'étude des variations d'activités d'enzymes présentes, notamment dans les peroxysomes, en tant que biomarqueurs a été suscité tout d'abord par leur implication dans la défense de l'organisme contre le stress oxydant.

Les catalases sont rapide et efficace dans l'évaluation de l'état de santé du milieu environnant et pourrait être intégré utilement dans un réseau pérenne de mesure en routine de la qualité et de la santé des écosystèmes marins et sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif au niveau des membranes cellulaires comme les HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique) [4]

### **I.10.5 Les protéases**

Les protéases (Ou enzymes protéolytiques) sont des enzymes qui coupe les liaisons peptidiques des protéines. Les fonctions biologiques des protéases sont variées : elles interviennent dans la maturation des protéines, dans la digestion des aliments, dans la coagulation sanguine, dans le remodelage des tissus au cours du développement de l'organisme et dans la cicatrisation. Certaines protéases sont des toxines, comme la toxine botulique.

Certaines protéases sont produites sous forme de précurseurs inactifs, appelés zymogènes. Ils sont en général activés par une coupure protéolytique qui libère l'enzyme fonctionnelle et déclenche ainsi l'activité. Il existe ainsi des processus de protéolyse en cascade, en particulier dans la coagulation. [40]

## **CHAPITRE II**

# **MATERIELS ET METHODES**

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

Dans le cadre du programme de gestion des écosystèmes aquatiques et de la surveillance environnementale adopté par le CNRDPA de Bou-Ismaïl, dont l'objectif principal est la contribution à la recherche de biomarqueurs comme réponse précoce et susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de santé des milieux marins, nous nous sommes intéressés à étudier la catalase et la protéase autant que réponses biologiques chez la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis* suite à une exposition aiguë en laboratoire à différentes concentrations de cuivre.

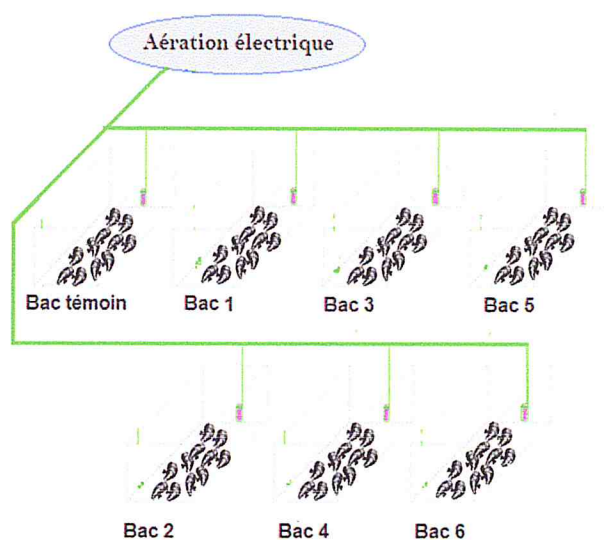
Le présent travail s'est étalé sur une durée de trois mois allant du mois de Mars au mois de Mai 2015. Les différentes expérimentations ont été conduites et réalisées au centre pilote de conchyliculture de CNRDPA-Bou-Ismaïl (voir annexe). Les dosages biochimiques de la protéase, catalase et protéines ont été réalisés au sein du Laboratoire siège d'analyse physico chimique du CNRDPA (voir annexe).

### **II.1 Stratégie, démarche et dispositif expérimental**

Dans une Stratégie basée sur l'emploi des moules comme bioindicateurs du niveau de pollution par les métaux traces, une approche utilisant des tests d'écotoxicité à courtes durées a été adoptée au niveau du laboratoire du centre conchylicole du CNRDPA dans des bacs d'élevage en polystyrène (54 x 45 x 30 cm) (voir annexe). La stratégie des tests d'écotoxicité aiguë adoptée, fait appel à la moule *Mytilus galloprovincialis* comme organisme bioindicateur et le cuivre comme agent polluant.

Une période de deux semaines d'adaptation des moules (acclimatation) dans les conditions expérimentales précède le test de contamination par les différentes concentrations du cuivre. L'ensemble des moules est maintenu dans des conditions environnementales identiques, et l'emploi des pompes à air assure l'aération de l'eau des bacs.

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



**Figure 4 : Dispositif expérimental**

L'acclimatation est une étape cruciale dans la mise en place d'une expérimentation puisqu'elle doit couvrir une période suffisante pour que les organismes s'adaptent aux conditions de laboratoire. Il est généralement admis qu'un maintien au laboratoire durant une période minimale de deux semaines après réception des organismes est nécessaire à l'adaptation de ces derniers au nouvel environnement que constitue le dispositif expérimental [41].

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

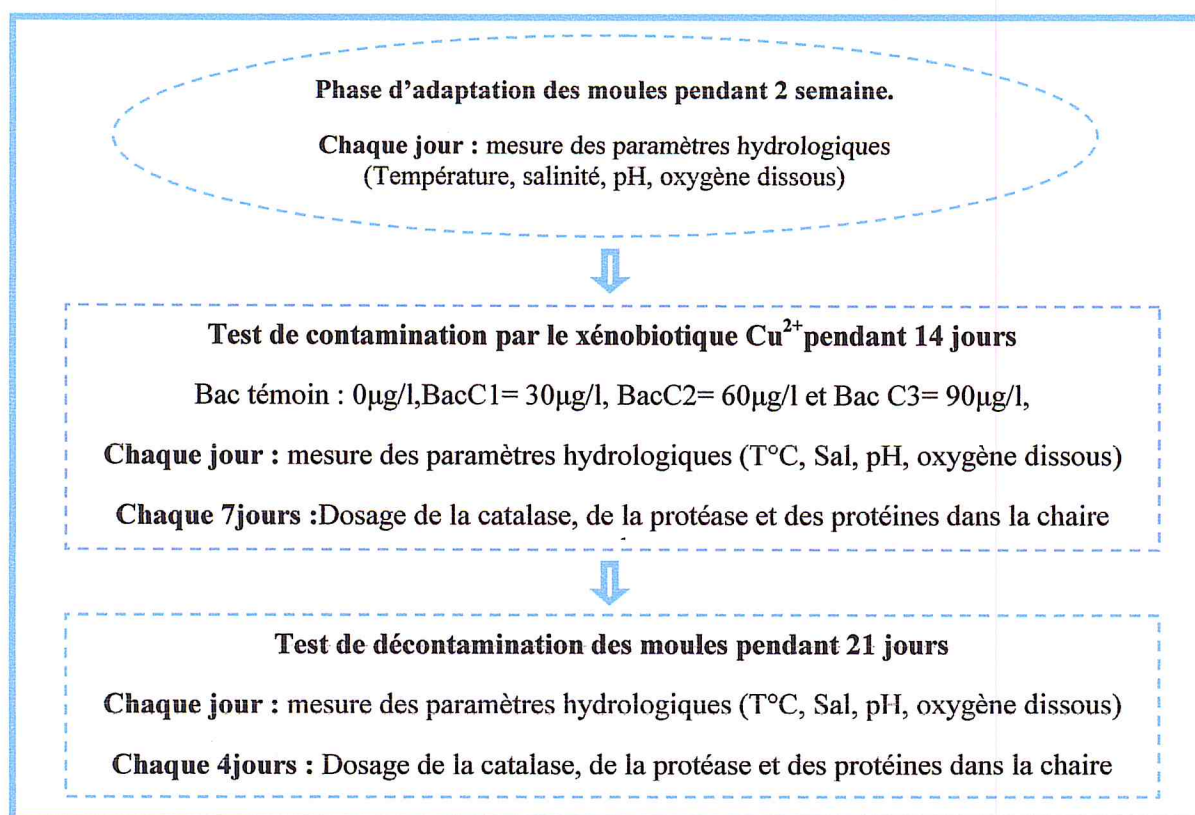


- Après la collecte des moules, ces dernières sont triées, nettoyées, débarrassées de leur épibiontes, et mesurées à l'aide d'un pied à coulisse avant leur mise en adaptation ;
- choisi des moules appartenant à une même classe de taille de [50-70mm] dans le but de limiter la variabilité des réponses liées aux différences individuelles.
- mesuré des paramètres physico-chimiques température, la salinité et le pH chaque jour durant tout le cycle expérimental avant et après le changement d'eau à l'aide d'un multiparamètre.

Les moules sont par la suite de l'étape d'acclimatation répartis en quatre groupes de tests dans des bacs rectangulaires «54x45x30cm ». L'ensemble des moules est incubé dans des conditions environnementales identiques pour une période de 14 jours comme cycle de contamination et 21 jours comme cycle de décontamination (0µg/lpolluants) (fig). Ainsi, les moules sont exposés pendant 14 jours à trois concentrations croissantes (C1= 30µg/l, C2= 60µg/l et C3= 90µg/l) en polluant métallique Cu<sup>2+</sup>. La manipulation est automatiquement comparée à un aquarium témoin (0µg/l polluant).

L'expérience est réalisée en duplicate. Les trois concentrations choisies ont été testées en vue d'établir des relations doses-réponses entre la pression chimique représentée par le xénobiotique et les réponses biologiques observées chez les moules.

Durant le cycle de contamination, les prélèvements de moules sont fait chaque 7jours d'exposition alors qu'en décontamination la récupération est faite tous les quatre jours. 4 à 5moules sont prélevées pour faire objet des dosages biochimiques des protéines, de l'enzyme antioxydante la catalase et de l'enzyme digestive la protéase.



**Figure 5 :** Planning expérimental des tests d'écotoxicité.

## II.2 Méthodes et protocoles analytiques

### II.2.1 Mesure des paramètres biométriques

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

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

Chaque individu a été pesé à l'aide d'une balance électronique de précision (0,01g près) pour déterminer les paramètres pondéraux suivants:

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

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

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

### **II.2.2 Mesure des paramètres physicochimiques**

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

### **II.2.3 Suivi de la mortalité**

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

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

### II.2.4 Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses biochimiques

Les dosages biochimiques relatifs aux suivis des biomarqueurs Catalase (enzyme de défense antioxydante) et Protéase (enzyme digestive), ainsi que le dosage des protéines nécessitent que les tissus biologiques (chaire des moules) fassent l'objet préalable d'une homogénéisation et d'un fractionnement subcellulaire (fig 6). L'ensemble de ces procédures se déroulent dans des tampons adaptés. Le tampon dans lequel on homogénéisera devra avoir les propriétés physicochimiques permettant de maintenir la stabilité des molécules ou organites qu'on désire étudier. On devra apporter une attention particulière à sa composition et à son pH surtout.



**Figure 6:** Procédures expérimentales des dosages biochimiques.

#### ❖ Homogénéisation des tissus

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

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

### II.2.5 Dosages des protéines par la méthode de Lowry [57]

#### ❖ Principe

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

La méthode développée par Lowry *et al* [57] combine une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. Cette méthode a été tellement utilisée que l'article original de Lowry est un des articles scientifiques les plus cités au monde.

#### ❖ Mode opératoire

Dans des tubes à essais, les prises d'échantillons de la fraction S9 (surnageant) sont diluées au 1/5-1/8-1/10 et complétées à 1 ml avec de l'eau distillée. Le tube de blanc contient 01ml d'eau distillée.

05ml de réactif Lowry « voir annexe » sont ajoutés à chaque tube. On homogénéise et on attend 10min.

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

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



## II.2.6 Dosages de la Catalase par mode Cinétique

### ❖ Principe

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

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

Dans notre pratique l'activité catalase est déterminée selon la méthode de Lartilot décrite par Gülüzaret *al* [58].

### ❖ Mode opératoire

Dans notre pratique, 2.5ml du substrat (100µl solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% ; 2.4ml tampon phosphate 75mM à pH7) sont placés dans une cuvette du spectrophotomètre déjà réglée sur le mode cinétique.

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

## II.2.7 Dosage de la protéase

### ❖ Principe

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

*❖ Mode opératoire*

Le dosage de l'activité protéase est déterminé selon la méthode décrite par Ranilson *et al* [59].

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

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

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

## **CHAPITRE III**

# **RESULTATS ET DISCUSSIONS**



Cette étude avait pour objectif l'étude des effets d'une exposition aiguë au cuivre sur les réponses enzymatiques de la catalase et de la protéase mesurées comme biomarqueur de stress chez la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Récemment, la volonté de développer des méthodes plus sensibles et plus rapides que les tests classiques de mortalité ou de reproduction a permis la mise en œuvre du concept de biomarqueurs comme réponse précoce de l'état de santé des espèces indicatrices. Ainsi, les objectifs de cette nouvelle approche sont souvent la recherche des concentrations qui sollicitent le déclenchement des mécanismes biologiques (ex : mécanisme de défense CAT). La mortalité n'est donc que le stade final traduisant l'inefficacité à maintenir l'homéostasie.

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

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

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 est après le renouvellement d'eau des bacs expérimentaux.

Les différents résultats des mesures de la température (T°C), Salinité (Sal %), Oxygène dissous (DO<sub>2</sub> mg/l) et le pH sont regroupés dans le tableau (1) ci-dessous.

	T (°C)	Sal (‰)	pH	$\sigma$ (ms.cm <sup>-1</sup> )	DO <sub>2</sub> (mg/l)
<b>Bac Témoin (0µg/l)</b>	15,61 ± 1,3	36,60 ± 0,35	8,36 ± 0,17	55,94 ± 0,45	7,10 ± 0,72
<b>Bac C1 (30µg/l)</b>	16,03 ± 2,03	36,77 ± 0,22	8,39 ± 0,34	56,17 ± 0,23	7,37 ± 0,33
<b>Bac C2 (60µg/l)</b>	16,08 ± 1,04	36,79 ± 0,23	8,38 ± 0,11	56,21 ± 0,25	7,78 ± 0,73
<b>Bac C3 (90µg/l)</b>	15,52 ± 2,55	36,71 ± 0,12	8,35 ± 0,07	55,96 ± 1,51	7,41 ± 0,85

**Tableau 1** : Paramètres physicochimiques de l'eau d'élevage

D'après le tableau (1) 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 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. De même, les mesures de la salinité et du pH sont presque identiques dans chaque bac ce qui n'influe pas sur les réponses biologique des moules traduite par les biomarqueurs catalase et protéase. Les valeurs relevées étaient optimales pour la croissance des moules de genre *Mytilus*.

Aussi, les valeurs journalières de l'oxygène dissout mesurées durant le cycle expérimental (moyenne de 7mg/l) répondaient aux exigences des spécimens. Au sens large, la respiration est l'ensemble des mécanismes physico-chimiques et biochimiques qui fournissent à l'être vivant l'énergie nécessaire à son métabolisme. De manière classique, on distingue la fraction de l'énergie totale allouée à la croissance somatique et au métabolisme général, de celle allouée à la croissance gonadique et à la reproduction [60]. Dans certaines conditions environnementales stressantes, l'approvisionnement maximal de tous les organes ne peut être assuré. Conséquences : mauvaise croissance, mauvais état de santé [11, 12].

Comme conclusion des paramètres physico-chimiques, les stress pouvant exercer ces derniers ne sont pas probables à exister, l'unique stress altérant les moules est bien l'agent métallique Cu<sup>2+</sup> comme xénobiotique.

### III.2 Résultats des mesures biométriques

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

Aussi, les indices corporels (indice de condition, facteur de condition selon les sources) basés sur la mesure des masses et longueurs des organismes sont utilisés pour apprécier leur état de santé générale [61-63].

Les résultats des mesures des indices de condition de la moule *Mytilus* de la présente étude sont illustrés par la figure suivante :

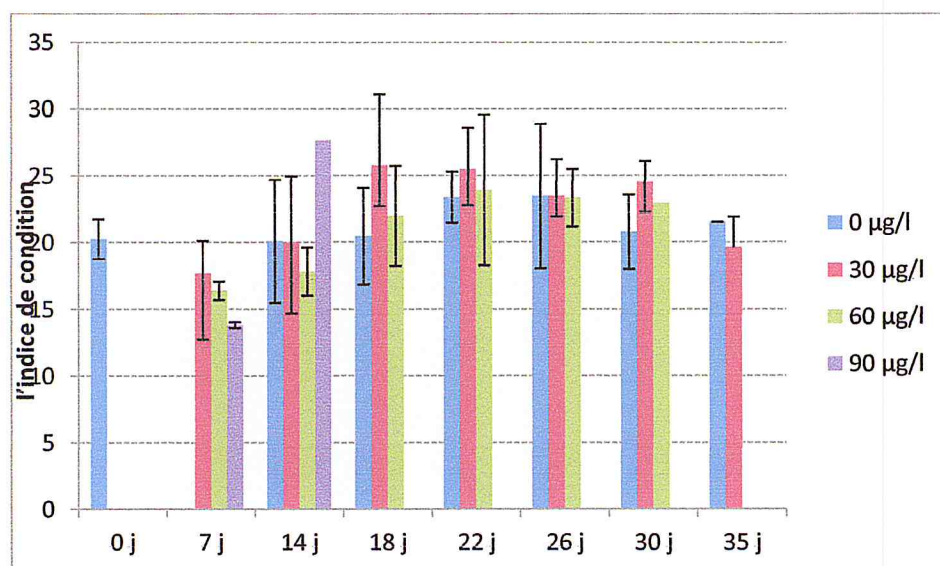


Figure 7 : Evolution de l'indice de condition IC1 en fonction de période d'étude.

D'après la figure 7, on n'observe pas une atteinte claire de la biométrie sous l'effet des différentes concentrations du cuivre examinées. La durée d'exposition au xénobiotique ne semble pas donc suffisante pour des manifestations biométriques soient observées. Par ailleurs, et dans les milieux naturels contaminés l'effet des polluants sur l'état globale des espèces vivantes aura le temps pour engendrer des modifications significatives des

activités physiologiques des organismes et donc des atteintes directes de la croissance et de la biométrie.

Les molécules toxiques entrent en interaction avec les molécules biologiques. Des lors, les organismes exposés développent divers mécanismes de défense : évitement et / ou isolement, élimination active, neutralisation par compléxation avec des protéines etc [08]. Des études du métabolisme et de la production de biomasse chez les organismes exposés aux toxiques [64] ont mis en évidence que ces mécanismes de défense sont coûteux pour l'organisme en terme énergétique. Ces coûts de défense s'ajoutent aux coûts de maintenance : il existe donc une corrélation quantitative entre la capacité de défense de l'organisme (survie) et sa capacité de production de biomasse (croissance et reproduction).

Par ailleurs, l'allocation énergétique pour la défense, la réparation et la régénération des cellules est privilégié à la croissance et à la reproduction [64].

Chez les moules la stratégie d'évitement ou l'isolement n'étant pas possible, le recours aux enzymes antioxydantes semble être la meilleure stratégie pour faire face aux xénobiotiques. L'excrétion et la séquestration des métaux dans les tissus peuvent également intervenir. Cependant il est démontré que les premières réponses à la présence des contaminants sont celles liées au système antioxydant [65-66].

### III.3 Résultats des dosages biochimiques et enzymatiques

#### III.3.1 Résultats des dosages biochimiques des protéines

L'ensemble des résultats relatifs aux dosages des protéines aux niveaux de la chaire des moules sont regroupés dans le tableau (2) ci-dessous.

		Teneur des protéines (Unité/ml)						
conc temps	0jour	7jours	14jours	18jours	22jours	26jours	30jours	35jours
Bac (0µg/l)	51,995 ±0,546	-	-	41,462 ±5,931	60,989 ±9,382	53,699 ±1,311	49,393 ±0,346	47,512 ±6,354
Bac (30µg/l)	51,995 ±0,546	59,207 ±3,727	34,524 ±6,396	34,475 ±7,408	34,403 ±8,304	±30,648 ±2,951	27,878 ±1,808	25,344 ±0,537
Bac (60µg/l)	51,995 ±0,546	38,973 ±2,635	27,363 ±8,111	35,950 ±8,554	30,894 ±4,229	30,891 ±0,062	24,701 ±5,106	34,753 ±0,417
Bac (90µg/l)	51,995 ±0,546	42,089 ±2,085	36,832 ±5,921	20,416 ±2,461	-	-	-	-

**Tableau (2) : Résultats du dosage des protéines**

D'après le tableau (2), un effet d'exposition des moules au cuivre sur les réserves énergétiques est perçu comparativement aux individus témoins. Une déplétion des teneurs en protéines est produite suite à l'exposition aux différentes concentrations.

De nombreux stress (physiques et/ou chimiques) peuvent entraîner la mobilisation des réserves énergétiques (glycogène, lipides, protéines) [08,67]. D'une manière générale, la réponse est vers une diminution des réserves énergétiques suite à l'exposition en laboratoire où *in situ* à différents types de contaminants. Cette réponse est mesurable après quelques heures ou jours d'exposition. Cependant, la mobilisation de l'un ou l'autre des constituants de réserves est fonction du type de contaminant [08].

Après le cycle de contamination et à la suite d'un séjour de 17 jours en détoxification les teneurs des réserves protéiques dans la chaire des moules étaient toujours inférieures à celles des spécimens témoins pour toutes les concentrations testées.

Selon Mosleh *et al.*, (2007) la déplétion des protéines est une réponse de défense précoce face à un stress chimique. Ainsi, la déplétion des teneurs en protéines peut être attribuée au catabolisme des protéines comme réponse à la demande énergétique. Pour surmonter la situation de stress les organismes ont besoin d'une grande énergie et cette demande peut induire le catabolisme protéique, de plus la diminution des teneurs protéiques peut être due à la formation de lipoprotéines qui seront utilisées pour la réparation des dommages au niveau des cellules, des tissus et des organes.

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

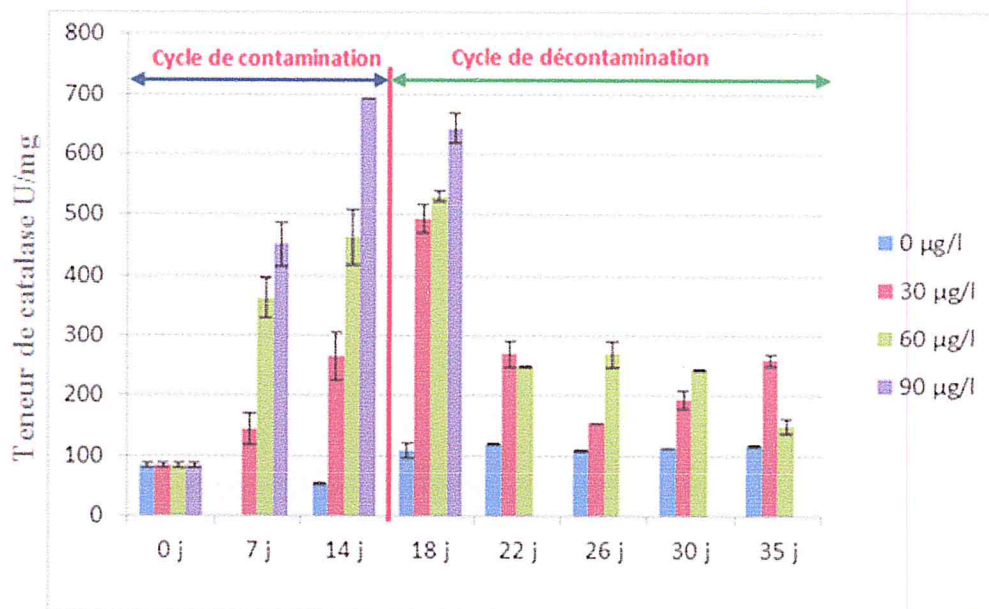
Outre les variations liées à l'exposition à des toxiques, la variabilité des concentrations en réserves énergétiques des organismes est fonction de nombreux facteurs biotiques et abiotiques [02, 08, 56]. Il n'est donc pas étonnant que l'utilisation des réserves énergétiques en tant que biomarqueur strict de pollution soit toujours discutée [08].

### III.3.2. Résultats du dosage de la catalase

Plusieurs travaux relatent l'utilisation de la catalase comme biomarqueur de défense traduisant l'état de santé des organismes indicateurs [68-69].

En effet, de nombreuses recherches réalisées (*in vivo* et *in vitro*) ou *in situ*, optent pour l'utilisation de la catalase comme réponse précoce dans l'évaluation de l'état de santé des écosystèmes aquatiques [70-71].

La figure (8) ci-dessous représente les variations des activités catalase CAT durant les deux cycles de contamination et de décontamination.



**Figure 8 :** Evolution de l'activité CAT durant la période d'étude.

- *Cycle de contamination*

D'après la figure (8), les observations suivantes peuvent être perçues:

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

Par ailleurs, et durant la période de contamination (14 jours), une relation proportionnelle est notée entre les niveaux d'induction de l'enzyme antioxydante CAT et les concentrations du cuivre testées. En effet, la plus forte activité catalase au niveau de la chaire des moules *Mytilus galloprovincialis* (918,287 U/mg de protéine) est mesurée au 14<sup>ème</sup> jour d'exposition à la plus grande concentration du xénobiotique  $\text{Cu}^{2+}$  (90 µg/l).

La moule est un bivalve filtreur accumulateur des micropolluants. Elle peut concentrer les éléments traces à des concentrations supérieures à celles rencontrées dans son environnement [66-70]. Pendant tout processus physiologique d'échange avec le milieu environnant, les molécules exogènes pénètrent à travers les barrières biologiques séparant l'environnement interne de l'organisme du milieu externe [05]. L'accumulation des substances chimiques dans les organismes est à l'origine du stress oxydant [07].

En effet, par leurs propriétés redox, de nombreux xénobiotiques tels que les hydrocarbures, les métaux, les quinones ou encore certains pesticides sont connus pour exercer leurs effets délétères par le biais de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : peroxyde d'hydrogène, des radicaux superoxydes... ) [66-68]. La réactivité des ROS peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes (oxydation des composants tels que l'ADN, les protéines, les lipides et perturbation généralisée de la balance redox) chez les invertébrés [04, 69-72]. En effet, les organismes aquatiques ont développé des systèmes antioxydants leur permettant de faire face à la production de ROS [04, 08, 66-70]. La catalase CAT (enzyme antioxydante) est une hémoprotéine présente au niveau des peroxysomes qui participent à la défense contre les dérivés de l'oxygène. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau selon ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ) [08, 70-73]. Donc l'induction de l'activité CAT est le signe de l'exposition des moules au stress oxydatif causé par le cuivre  $\text{Cu}^{2+}$ . Mesurée chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, l'activité catalase peut nous renseigner sur le niveau de contamination [66,69] et le degré d'altération de la cellule [65,66,70].

Les biomarqueurs de défense comme la catalase sont de plus en plus employés dans divers programmes de recherche et en utilisant différentes espèces indicatrices de vertébrés et d'invertébrés. Ainsi, les résultats de l'activité catalase obtenus dans ce travail semblent être en accord avec ceux reportés par de nombreux chercheurs, et c'est ainsi que Guecheva *et al.*, (2002) ont observé une induction significative de la catalase après 24h d'exposition du ver plat *Dugestia schuberti* aux concentrations 40, 80, et 160  $\mu\text{g/l}$  de cuivre. Aussi, Meknachi (2010) a observé une augmentation de l'activité catalase chez le poisson *Tilapia* exposé au  $\text{Cu}^{2+}$ , de même qu'une corrélation positive entre les concentrations du cuivre accumulées et l'activité CAT après 21 jours d'exposition.



Le même auteur a relevé une élévation de l'activité enzymatique chez les moules *Mytilus galloprovincialis* transplantées dans trois sites pollués par rapport à celle relevée dans un site de référence. L'augmentation de l'activité enzymatique était proportionnelle au niveau de pollution de chaque site, et une corrélation positive entre l'activité catalase et les concentrations du cuivre accumulées dans la chaire des moules était soulignée. Ces mêmes résultats étaient obtenus par Roméo *et al*, (2003) lors de la transplantation des moules dans la baie de Nice, et par Jebali *et al*, (2007) où les activités catalase des palourdes *Ruditapes decussatus* étaient supérieures dans les branchies et les glandes digestives en relation avec la présence de polluants.

- *Cycle de décontamination*

Après 4 jours de décontamination, les moules n'ont montré aucune réversibilité de leur homéostasie dont on relevait des augmentations continues des activités catalases à la suite du cycle de contamination.

En revanche, une baisse considérable de l'activité CAT est observées au 8<sup>ème</sup> jour de détoxification des deux groupes de moules ex-contaminée par les concentrations de () et (). A la fin du cycle expérimental, on mesurait des activités CAT (fig, 8) qui se rapprochent à celles relevées initialement (). Ainsi, les valeurs relevées traduit la curabilité de l'état de santé des moules et la réversibilité du mécanisme physiologique suite à l'action des différents processus d'excrétion et de décontamination des polluants. Selon plusieurs auteurs, les biomarqueurs de défense comme la CAT contribuent au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Cette dernière dépend de la relation dose, durée/effet [02, 74, 75-76].

Les mêmes observations ont été rapporté par Company *et al*, (2008) après un cycle de dépuration des moules (6 jours) *Bathymodiolus azoricus* suite à une exposition de 24 jours au cuivre (25µg/l). En effet, les activités de catalase branchiale relevés étaient inférieures à celles obtenues en phase de contamination. Meknachi (2010) quant à lui a signalé une diminution de la CAT suite à un séjour de décontamination chez les tilapias, de même, les moules transférées des milieux contaminés vers un site ouvert non

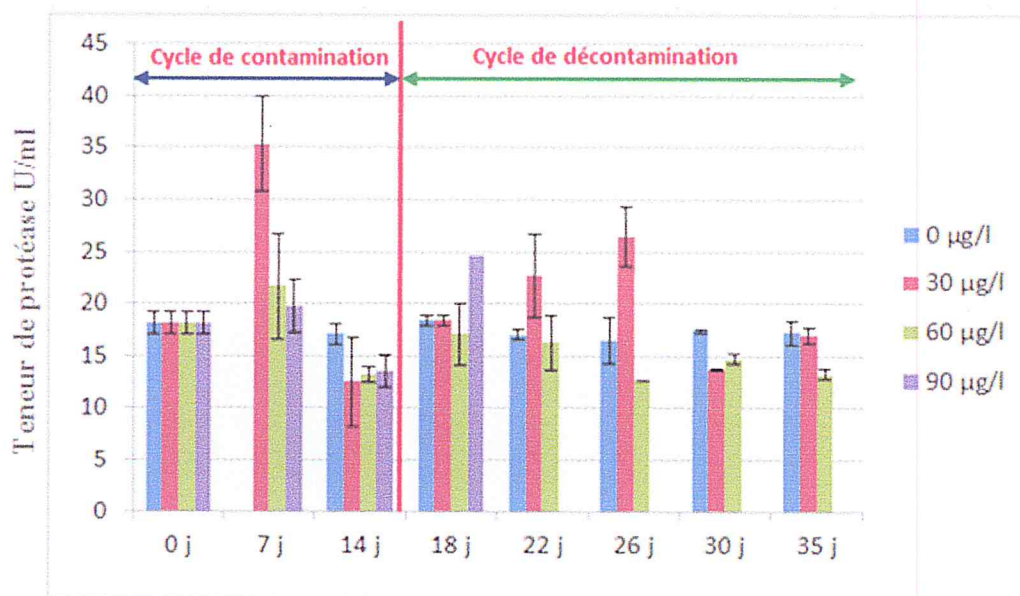
contaminé ont présenté des activités enzymatiques inférieures à celles obtenues dans les sites pollués.

Les réponses obtenues de la catalase étaient relevées sous l'effet d'un seul facteur de stress qui est le polluant métallique ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Néanmoins, il est connu que les différentes activités biologiques mesurées chez les bivalves, sont étroitement influencées par les facteurs abiotiques du milieu environnant [77-78].

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

### III.3.3 Résultats du dosage de la protéase

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :



**Figure 9** : Evolution de l'activité protéase durant la période d'étude.

D'après la figure obtenue, nous remarquons que les activités de l'enzyme digestive, la protéase, mesurées chez les témoins restent quasiment stable durant tout le cycle expérimental.

En général, une diminution de l'activité protéase est constatée à la fin du cycle de contamination chez les trois groupes moules exposés aux différentes concentrations du xénobiotique  $\text{Cu}^{2+}$ .

Sous l'effet de la concentration ( $30\mu\text{g/l}$ ), la protéase montrât une augmentation de leur activité au 7<sup>ème</sup> jour suivie par une diminution au 14<sup>ème</sup> jour fin de cycle de contamination. Durant le cycle de décontamination les activités protéases ont montré un retour vers l'activité initiale après 4jours de détoxification. Le même constat est relevé chez les spécimens exposés à la concentration de  $60\mu\text{g/l}$  et ceci durant le cycle de contamination et du même pour le cycle de décontamination.

Une baisse d'activité continue de l'enzyme digestive est mesurée chez les moules *Mytilus* exposées à la concentration de  $90\mu\text{g/l}$  et ceci jusqu'à la fin du cycle de contamination. Par ailleurs, une reprise de l'activité enzymatique a été relevé après 4jours de détoxification des moules. Cependant, la mortalité continuelle des individus de ce groupe de test a fait fin du cycle expérimental rendant l'interprétation des résultats incomplète comparativement aux deux autres groupes de test.

La moule est un bivalve filtreur accumulateur des micropolluants. Elle peut concentrer les éléments traces à des concentrations supérieures à celles rencontrées dans son environnement [69, 74, 79, 15]. L'exposition des spécimens aux substances chimiques peut être à l'origine d'atteintes des enzymes digestives.

Des effets négatifs des polluants chimiques ont été observés chez différentes espèces d'invertébrés. Les activités amylase et sucrase ont été réduites chez la moule *Perna viridis* exposée aux polluants métalliques [80]. Chez la moules (*Mytilus galloprovincialis*) prélevées le long d'un gradient de contamination, les activités d'enzymes digestives ont montré des taux plus faibles de l' $\alpha$ -amylase chez les individus présentant les teneurs en cadmium les plus élevées [81].

Dans notre étude, l'atteinte de l'enzyme digestive (protéase) est donc le résultat direct de l'effet du xénobiotique  $\text{Cu}^{2+}$  testé à différentes concentration.

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

La glande digestive des bivalves joue un rôle très important dans la digestion des aliments, en synthétisant et en sécrétant les enzymes digestives [08, 77, 82]. Cependant, cet organe est aussi la cible des contaminants chimiques qui y sont transportés pour leur détoxification. Selon Lagadic *et al* [01] ; Van der Oost *et al* [1, les variations d'activités enzymatiques sont souvent une des premières réponses au stress, elles représentent donc des points utiles dans la confirmation des effets toxiques avant que ces derniers ne soient perceptibles à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (cellulaire, tissulaire, physiologique). Différentes études ont précisé le caractère précoce de la réponse des enzymes digestives par rapport à l'apparition d'effets au niveau individuel (croissance...) ou communautaire (diversité biologique) ce qui confère une forte pertinence écologique aux enzymes digestives employées comme biomarqueurs d'exposition [08].

Ainsi, le suivi de l'impact potentiel des contaminants sur les activités des enzymes digestives est un paramètre intéressant présentant une pertinence écologique forte. Ces activités enzymatiques jouent un rôle capital sur les processus d'assimilation de la nourriture. Une diminution de la digestion pourra conduire à une diminution de la croissance et de la reproduction avec un impact possible sur la sauvegarde de l'espèce.

Dans une perspective de synthèse des résultats des mesures biochimiques des biomarqueurs catalase et protéase, on peut dire que l'augmentation des dépenses énergétiques allouées à la défense traduite par l'induction de l'enzyme antioxydante CAT

ainsi que la perturbation de l'enzyme digestive protéase ainsi discutée pourront être à l'origine de l'atteinte de la biométrie et du métabolisme bioénergétique suite à l'exposition au xénobiotique ( $\text{Cu}^{2+}$ ) pour une durée plus élevée. De fait, une forte pertinence est accordée à ces deux biomarqueurs comme un signal précoce de la dégradation de l'état de santé des organismes indicateurs ce qui donne aux gestionnaires de l'environnement une information sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer la qualité des écosystèmes, ou protéger la biodiversité et l'intégrité des milieux avant que les effets soient perceptibles à des niveaux supérieurs aboutissant en phase finale à une dégradation de la qualité écologique d'un écosystèmes dans sa totalité.

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

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

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

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

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

Dans ce sens, la présente étude a permis de mettre en évidence l'impact du cuivre sur les activités enzymatiques de la moule *Mytilus galloprovincialis* et de valider l'emploi de test éco-toxicologique et le choix d'un biomarqueur en tant qu'indicateur biologique de stress.

Ainsi, une déplétion des teneurs en protéines de la chair 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 cuivre sur le métabolisme énergétique nécessite que ces résultats soient complétés par davantage de paramètres et notamment la mesure des teneurs du glucose et des lipides.

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

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

La catalase peut être influencée par des facteurs intrinsèques ou extrinsèques indépendants de la volonté du chercheur. Ainsi, pour pallier les variations des réponses des biomarqueurs dues à ces facteurs l'approche multimarqueurs semble être une clé prometteuse pour une interprétation meilleure des résultats et ainsi une évaluation plus précise de l'état de santé du milieu aquatique. Cette approche est basée sur le dosage simultané des autres biomarqueurs de stress oxydant tel que la Glutathion -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.

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

## References Bibliographiques

- [1]: **ABADA-Boudjema Y-M. Dauvin J-C. 1995.** Recruitment and life-span of two natural mussel populations *Pernaperna*(Linnaeus) and *Mytilusgalloprovincialis*(Lamarck) from the Algerian coast.*J.Moll. Stud.*,61 : 467-481.
- [2]: **ABADA-Boudjema Y-M. 1996.** Cinétique, croissance, production et composition biochimique de deux bivalves mytilidés, *Pernaperna*(L) et *Mytilusgalloprovincialis*(Lmk) du littoral algérois. Thèse Doctorat. Muséum National Hist. nat. Paris, Fr: i-iv + 1-243
- [3]:**BEAUMONT,A. Cassier,P.2004.** Biologie animale: Des protozoaires aux Métazoairesépithéliioncuriens.Tome 1. 3èmeédition. Edt. Dunod. 459p.
- [4]: **BELHAOUARI Benkhedda 2012.**Etude écotoxicologique chez un Gastéropode marin ,*Osilinus turbinatus*(Born, 1780) dans le littoral algérien occidental Thèse de doctorat,Universited'oran
- [5]: **BENGHALI sofiane Med el Amine 2009.**biosurveillancebiomonitoringbiomarqueursbioindicateuracétylcholinesterase oursin moule patelle paracentrotuslividusmytilusgalloprovincialis.Université de Mostaganem Abdelhamid Ibn Badis.
- [6]: **BENGUEDDA-RAHAL Wacila 2012.** Contribution à l'étude de la bioaccumulation métallique dans les sédiments et différents maillons de la chaine trophique du littoral extrême ouest algérien Thèse de doctorat Université de Tlemcen.
- [7]: **INDGE DUNOD Bill, 2007.** La biologie de A à Z, 1100 entrées et des conseils pour réviser,
- [8]:**BORTHAGARAY AI, &CARRANZA A (2007).** Mussels as ecosystem engineers: their contribution to species richness in a rocky littoral community. *Acta Oecologica*,31(3), 243-250.



- [9]: **BOUDJEMA Kamel 2013.** “Étude des biomarqueurs de la bioaccumulation des métaux traces (cuivre, cadmium et plomb) chez lamoule *pernapernaborn* (1780) exposée a une toxification *aiguë* ” Thèse de Magister, Université de Blida,
- [10]: **BOUZIANI AmariaLatefa 2012.** Impact du mercure sur la stabilité de la membrane lysosomale hématocytaire de la moule, *Mytilus galloprovincialis* du port d Oran. Thèse de magister, université d’oran.
- [11]: **BOUMHRAS Mohamed 2008.** Evaluation de la toxicité des moules (*mytilus galloprovincialis*) issues de Jorf Lasfar (JL) et Oualidia (OL) sur la moelle osseuse chez le rat. Thèse de doctorat, Université Hassan 1er, Settat - DESA
- [12]: **BOUGIS, P. et al., 1979.** Océanographie biologique appliqué à l’exploitation de la vie marine”. Edt Masson. 320p.
- [13]: **CHAMPLAT, D. LARPENT, J.P. 1988.** Biologie des eaux: methods et techniques. Edt. Masson. 374p.
- [14]: **CAHEN, D. 2006.** Dossier didactique, moule nature, Muséum des Sciences naturelles.
- [15]: **CENAC A, SIMONOFF M AND DJIBO A. 1996.** Nutritional status and plasma trace elements in peripartum cardiomyopathy. A comparative study in Niger. *J Cardiovasc Risk* 3:483-487.
- [16 ]: **CHAABOUNI Rim 2009.** Utilisation et mise au point au niveau moléculaire de biomarqueurs pour étudier la répartition spatiale de la contamination au voisinage d’une source de pollution. Université de Sfax Tunisie
- [17]: **DEL CORSO L, PASTINE F, PROTTI MA, ROMANELLI AM, MORUZZO D, RUOCCO L, PENTIMONE F. 2000.** Blood zinc, copper and magnesium in aging. A study in healthy home-living elderly. *Panminerva Med.* 42:273-7.
- [18]: **FAO Fishery Statistics, 2006.** Main producer countries of *Mytilus galloprovincialis*
- [19]: **FICHER R-W. & SCHNEIDER M. & BAUCHOT M-L., 1987.** Fiches FAO d’identification des espèces pour les besoins de la pêche méditerranée et mer noire. Zone de

pêche 37 –Révision 1:Végétaux et invertébrés. Publication préparée par le FAO. (Projet. GCP/JNT/422/EEC) Rome 1987. Vol 7. p317

**[20]:GOHIL K, VIGUIE C, STANLEY W 1998.** Blood glutathione oxidation during human exercise.J ApplPhysiol 64:115-119.

**[21]:Groupement d'Interet Public Seine-Aval 2011.** Qualité de l'eau et contamination

**[22]: GUENDOUZI Yassine 2011.** Contribution à l'étude de l'impact de la pollution chimique sur l'herbier à Posidonie dans la baie d'Alger Thèse de doctorat Ecole nationale supérieure des sciences de la mer et aménagement du littoral Dely Ibrahim

**[23]:GUTTERIDGE JMC. 1992.** Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. Free Rad ResComm 19:598-620,

**[24]: GRASSE, P.P. DOUMENC, D. 1998.**Zoologie: invertébrés.6<sup>ème</sup> édition de l'Abrégé ZoologieInvertébrés. Edt. Masson et C éditeurs. 919 p.

**[25]:Groupement d'Intérêt Public Seine-Aval 2011.** Utilisation des mollusques pour le suivi de la contamination chimique dans et la baie de Seine.

**[26]:JONES DP, MODY VC, CARLSON JL 2002.** Redox analysis oh human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. Free Rad Biol Med 33:1290-1300.

**[27]:GUIRAUD Joseph-Pierre 2012.** Microbiologie alimentaire.(ISBN 2100570080)

**[28]: KHATI HADJ MOUSSA Wyllia 2009.**Etude de la qualité des eaux du golfe d'Annaba par l'utilisation d'un mollusque sentinelle, la moule (*Perna perna*L) : essai in vivo et in situ. Application à la biosurveillance de l'environnement marin, thèse de doctorat.Université Badji Mokhtar ANNABA.

**[29]: LAGADIC L. CAQUET T. AMIARD J-C., RAMADE F.1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie, Aspects fondamentaux. Edition Masson, Paris, ISBN : 2-225-83053-3 ; ISSN : 1275-0026.

- [30]: **L. LAGARIC, T. CAQUET, F. RAMADE ET J.-C. AMIARD, 1998.** Biomarqueurs en écotoxicologie. Collection Écologie, Masson.
- [31]: **LEVINE SA and KIDD PM 1996.** Antioxidant adaptation. Its role in free radical pathology. San Leandro, California. Eds A. Biocurrents division, Allergy Research Group,.
- [32]: **LUBET P. et CHAPPUIS J-G. 1966.** Nutrition des Lamellibranches. Océanis 4(1), 23-24. Paris. 158(II) : 2125-2128.
- [33]: **LUBET, P. 1959.** Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés, Rev. Trav. Inst. Pêches Marit, 23 (4). 548p.
- [34] : **DELLALIA Mohamed, ROMEOB Michèle, AISSA Patricia 2001.** Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. Laboratoire d'écobiologie animale, Faculté des sciences de Bizerte, 7021 Zarzouna, Tunisie
- [35]: **MEZZETTI A, PIERDOMENICO SD, COSTANTINI F 1998.** Copper/zinc ratio and systemic oxidant load : effect of aging and aging-related degenerative diseases. et al. Free Rad Biol Med 25:676-681.
- [36]: **MEAGHER EA, FITZGERALD GA. 2000.** Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. Free Rad Biol Med. 28:1745-50.
- [37]: **MPO (Ministère des pêches et des Océans), 2003.** Direction des politiques et des services économiques, Région du Golfe, «Profil de la moule bleue (*Mytilus edulis*)», pêche et Océans Canada., p59.
- [38]: **MENA P, MAYNAR M, GUTTIEREZ JM 1991.** Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. Int J Sports Med 12:563-566,
- [39]: **National Science Foundation 2013** Taxonomic Details for *Pernaviridis*
- [40]: **NÈVE J, VERTONGEN F, PERETZ A ET CARPENTIER YA 1989.** Valeurs usuelles du sélénium et de la glutathion peroxydase dans une population belge. Ann Biol Clin 47 :138-143,.

[41]: **Organic Products Without Intermediaries.** Mussels from Galicia. *Mytilus galloprovincialis*

[42]: **P. FLAMMARION, A. DEVAUX ET J. GARRIC 2000.** Marqueurs biochimiques de pollution Dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le Gestionnaire laboratoire des sciences de l'environnement, velin cedex, France.

[43]: **PUCHEU S, COUDRAY C, VANZETTO G, FAVIER A, MACHECOURT J AND DE LEIRIS J. TIME 1995.** course of changes in plasma levels of trace elements after thrombolysis during the acute phase of myocardial infarction in humans. *Biol Trace Elem Res* 47:171-182.

[44]: **PINCEMAIL J, DEFRAIGNE JO AND LIMET R. 1996.** Oxidative stress in clinical situations : fact or fiction .*Europ J Anaesth* 13:219-234,

[45]: **PINCEMAIL J, SIQUET J, CHAPELLE J-P, 2000.** Evaluation des concentrations plasmatiques en antioxydants, anticorps contre les LDL oxydées et homocystéine dans un échantillon de la population liégeoise. *Ann Biol Clin* 58 :178-185.

[46]: **SALONEN JT, ALFTHAN G, HUTTUNEN JK, PIKKARAINEN J AND PUSKA P 1992.** Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. *Lancet* 24:175-179.

[47]: **TURGEON, D.D. QUINN, J.F. BOGAN, A. E., COANE. V. HOCHBERG, F.G. LYON, W.G. 1998.** Noms communs et scientifiques des invertébrés aquatiques des Etats-Unis et du Canada: Mollusque, 2ème ED. Publication spéciale 26 de Société Américaine de pêche. Société Américaine de pêche. Bethesda, Le Maryland, Etats-Unis. 526, ISBN: 1-888569-01-8.

[48]: **VERON, G., 2000.** Organisation et classification du règne animale. 2ème édition. Edt. DUNOD. 144p.

- [49]: **WIRTH D, CHRISTIANS E.S.1, DRION P.V, DESSY-DOIZE C, GUSTIN P. 2003.** biomarqueur et acteur du stress cellulaire. formation continue – article de synthese Université de Liège
- [50]: **WEINBERG, S., 1999.** Découvrir la Méditerranée. Edt. Nature. 351p.
- [51]: **KHELIL,,F.Z 2007.** Evaluation de la contamination bactérienne de l'eau de mer et d'un mollusque de la moule *M. galloprovincialis* pêché du port d'Oran. p57.
- [52]: **WALKER CH, HOPKINS P, SIBLY RM, PEAKALL DB (2006).** Principles of ecotoxicology, third edition EDN. CRC Press Taylor & Francis group, Boca Raton, FL. 315P.
- [53]: **ORBEA.A. ORTIZ-ZARRAGOITIA.M., SOLÉ.M. PORTE.C. CAJARAVILLE.M.P., 2002.** Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalves molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries ( Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* 58, 75-98. Elsevier.
- [54]: **Vidal-LIÑÁN L. BELLAS J. CAMPILLO J.A. BEIRAS R. 2010.** Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 78, 265-272. Elsevier.
- [55]: **BOUTIBA, Z. 2004.** Guide de l'Environnement Marin. Edit: Dar El Gharb, 273p.
- [56]: **RIBEYRE F, BOUDOU A. 1989.** Trophic chains and experimental ecosystems: study of bioaccumulation and transfer processes. In: A. Boudou & R. Ribeyre (eds). *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies*, CRC Press, Boca Raton, FL. 1, 3-46.
- [57] : **VASCONCELOS M.T.S.D. LEAL M.F.C. 2001.** Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Marine Chemistry* 74, 65-85.
- [58] : **WILDGUST M.A. JONES M.B. 1998.** Salinity change and the toxicity of the free cadmium ion  $[Cd^{2+}_{aq}]$  to *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). *Aquatic Toxicology*, 41, 187-192.
- [59] : **FRANCOIS Le Goff. VINCENT Bonnomet. 2004.** Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM. Rapport technique. INERIS DRC-03-46822-FLg/JL-03-0693, 85p.

[60] : **MACKAY D.FRASER .A. 2000.** Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution* 110, 375-391. Elsevier.

[61] :**VELTMAN Karin. HENDRIKS Jan. HUIJBREGTS Mark. PIM Leonards. VAN DEN Heuvel-Greve Martine. VETHAAK Dick. 2005.** Accumulation of organochlorines and brominated flame retardants in estuarine and marine food chains: Field measurements and model calculations. *Marine Pollution Bulletin* 50, 1085–1102. Elsevier.

[62] :**G. de Vos Martine. A.J. Huijbregts Mark. J. van den Heuvel-Greve Martine. VethaakA. Dick., Van de Vijver Kristin I.Pim E.G. Leonards., S.P.J. van Leeuwen. P. de Voogt., A. Jan Hendriks., 2008.** Accumulation of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in the food chain of the Western Scheldt estuary: Comparing field measurements with kinetic modelling. *Chemosphere* 70, 1766–1773. Elsevier.

[63] :**KUMAR Shefali., KUMAR Mohit. THUROW Kerstin.STOLL Regina.KRAGL Udo. 2008.** Fuzzy filtering for robust bioconcentration factor modelling.*Environmental Modelling & Software* xxx, 1–10.Elsevier.

[64]:**K.M. Lai. M.D. Scrimshaw. J.N. Lester. 2002.** Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems.*The Science of the Total Environment* 289, 159-168. Elsevier.

[65] :**YUN-HUA Chou Berry. LIAO Chung-Min. LIN Ming-Chao. HSU-HUI Cheng. 2006.**Toxicokinetics/toxicodynamics of arsenic for farmed juvenile milkfish *Chanoschanos* and human consumption risk in BFD-endemic area of Taiwan. *Environment International* 32, 545–553. Elsevier.

[66] : **GOURLAY Catherine. 2004.** Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : influence de la matière organique naturelle et anthropique. Thèse de doctorat, Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts, Centre de Paris, 212p.

[67] :**WORMS I. SIMON D.F. HASSLER C.S., WILKINSON K.J. 2006.** Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms : importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie* 88, 1721–1731. Elsevier

[68] : **BENARD A. DURIF M. LAVRILLOUX P. VANDAMME L. MEUNIER L. DEFRENNE B. 2004.** Utilisation d'une technique de biosurveillance pour évaluer les retombées de métaux lourds : Cas d'un site de seconde fusion du plomb. Rapport final : INIRES-DRC-04-55891-AIR-n°0565-MDu/LVa, 66p.

[69] : **VINDIMIAN Éric. 2001.**La surveillance biologique des impacts toxiques dans l'environnement. Cellular and Molecular Biology 47, 67-79.

[70] :**SANTIAGO Sergio. BECKER VAN SLOOTEN Kristin. CHÈVRE Nathalie.PARDOR Michel.BENNINGHOFF.Christophe, DUMAS Marc.THYBAND Eric.GARRINIER Frédéric. 2002.** Guide pour l'utilisation des testesécotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement. Edition Soluval Santiago. 56p

[71] : **ALMEIDAA J.A. DINIZB Y.S. MARQUESA S.F.G. FAINEB L.A. RIBASC B.O. BURNEIKOB R.C. NOVELLIB E.L.B. 2002.**The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. Environment International 27, 673–679, Elsevier.

[72] :**LINDE-ARIAS Ana Rosa. F. INÁCIO Alan. DE ALBURQUERQUE Carla. M. FREIRE Marina. C. MOREIRA Josino. 2008.** Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromisniloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River.Science of the total environment 399, 186 – 192. Elsevier.

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

[74] : **GÜLÜZAR A. OZLEM A. SEYHAN T. MUSTAPHA C. 2006.**Response of catalase activity to  $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  in five tissues of freshwater *Oreochromisniloticus*.Comparative Biochemistry and Physiology 143, 218-224. Elsevier.

[75] : **M. MONTEIRO Sandra. M. MANCERA Juan. Antonio FontainhasFernandes. SOUSA Mario. 2005.** Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromisniloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 141, 375 – 383. Elsevier.

- [76] :**ÜNER Nevin. ÖZCAN ORUÇ Elif.,SEVGILER Yusuf. ŞAHIN Nesli.DURMAZ Hülya.USTA Demet. 2006.** Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*.*Environmental Toxicology and Pharmacology* 21, 241–245. Elsevier.
- [77] :**DURMAZ Hülya. SEVGILER Yusuf.ÜNER Nevin. 2006.**Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*.*Pesticide Biochemistry and Physiology* 84, 215–226. Elsevier.
- [78] : **DABBADIE L. 1996.** Etude de la viabilité d'une pisciculture rurale a faible niveau d'intrant dans le centre ouest de la cote d'ivoire : approche du réseau trophique. Thèse de doctorat, universite Paris 6, 214 p.
- [79] : **CHARO-KARISA Harrison. A. REZKC Mahmoud. BOVENHUISB Henk. KOMEN Hans. 2005.** Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles.*Aquaculture* 249,115-123.Elsevier.
- [80] :**R.S.V Pullin. ME CONNEL R.H Lowe. 1982.**The biology and culture of tilapias.*ICLARM Conference Proceedings*, 7 Manila, Philippines, 432p.
- [81] : **LEMARIE Gilles. BAROILLER Jean Francois. CLOTAC Frederic. LAZARD Jerome. DOSDATA Antoine. 2004.**A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron*.*Aquaculture* 240, 575–587.Elsevier.
- [82] : **HELENE J. 2006.** Manger ou Nager faut-il choisir, Influence de la demande métabolique sur la hérarchisation des fonctions chez le Bar *Dicentrarchus labrex*.UMR : 24p.



## LISTE DES ABREVIATIONS

**ETMs** : Eléments en traces Métalliques

**CNRDPA** : centre national de recherche et de développement de la pêche et de l'aquaculture

**FBC** : facteur de concentration

**FBA** : Le facteur de bioamplification

**SO** : Le stress oxydant

**SODs** : Les superoxydesdismutases

**EOA** : Eléments d'oxygène activé

**GPx** : Les glutathion peroxydases

**GSH** : Le glutathion

**GSSG** : glutathion oxydé

**CAT** : la Catalase

**HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique

**T°C** : la température

**Sal** : Salinité

**pH** : Potentiel d'hydrogène

**IC** : indices de condition

**SAB** : sérum albumine bovine

**TCA** : Acide trichloroacétique.

## ANNEXE



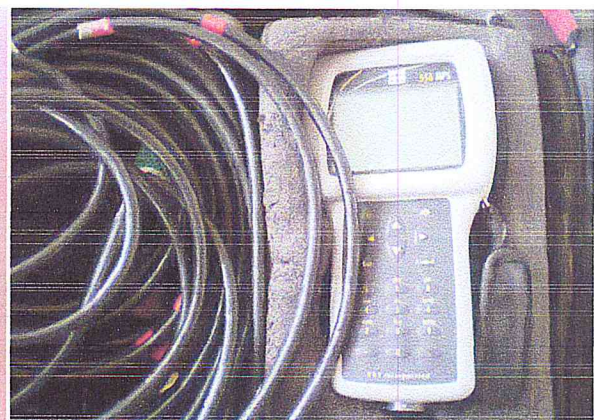
**Figure 1 :** Centre pilote conchylicole de Bou-Ismaïl



**Figure 2 :** Labo d'analyse physico chimique du Cnrpa



**Figure 3 :** GPS de type Garmin, GPS 12.



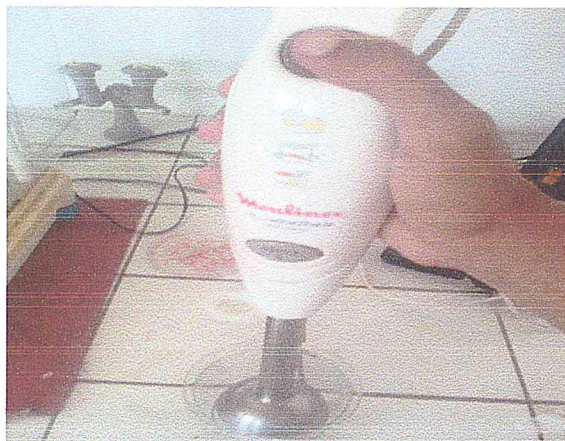
**Figure 4 :** Multiparamètres YSI 556



**Figure 5 :** Spectromètre UV- Visible



**Figure6 :** Balance de précision



**Figure 7 :** Mixeur déchiqueteur



**Figure 8 :** Réactif de Lowry A et B

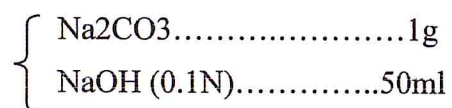
---

## Réactifs et solution chimiques

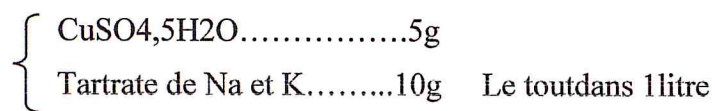
---

Dosages des protéines par la méthode de Lowry

1- Réactif de Lowry A



2- Réactif de Lowry B



3- Réactif de Lowry :

Mélanger le jour de la manipulation

