

UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA
FACULTE DES SCIENCES DE L'INGENIEUR
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE L'EAU ET DE L'ENVIRONNEMENT



MEMOIRE DE MASTER

Spécialité : GENIE DES PROCEDES

Option : EAU-ENVIRONNEMENT ET DEVELOPPEMENT
DURABLE « EEDD »

THEME

**Etude *in vitro* de l'effet des polluants métalliques (cas du plomb)
sur l'activité enzymatique (Catalase) chez la moule "*Perna
perna*" comme une réponse biologique de la pollution**

Présenté Par:

M^{elle} BOUNAKOUS Nabila

Devant le Jury composé de :

Président de Jury : **Mr BEN SAFIA. D**

Examineur : **Mr MECNECHI. A**

Promoteur : **Mr BADIS. A**

Co-promoteur: **Mr KOURDALI. S**

Maître assistant A - USDB

Doctorant et attaché de recherche -CRAPC

Maître de conférence - USDB

Doctorant et attaché de recherche -CNRDPA

Promotion 2011

Dédicace

Tous en remerciant « الله » de m'avoir donné la santé et le courage de finir ce travail est je dis « الحمد لله »

Pour cela je dédie le fruit de ce dernier :

A mes parents qui pu évoluer dans la vie, que Dieu me les garde, à Leurs patience, leurs encouragements, leurs aide continuel sur le long chemin de mes études et leurs soutien financier.

A mes chers frères : Mohamed et Naserelddine, à qui je souhaite beaucoup de bonheur et réussite dans leur vie.

A toutes mes chères collègues et amies en particulier : Lynda, Halima, Souad, Madiha, Amina, Soumia, Zhira et Kamel.

A mon cousin Ishak.

A ma chère amie Wahiba.

A tous ceux qui m'aident pour réaliser ce modeste travail et à tous ceux qui m'aiment de pré et de loin.

A

Tous qui m'ont enseigné durant tous mes études et à toute la promotion de deuxième année master de département de science de l'eau et génie des procédés.

Nabila

Remerciements

En premier lieu, nous remercierons Dieu pour sa clémence et qui nous a donné le courage, la volonté et sursaut la santé pour réaliser ce modeste travail.

A tous les membres de ma famille pour leur soutien permanent.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude aux membres du jury et de bien vouloir examiner ce travail et nous faire bénéficier de leurs critiques.

A mon encadreur Docteur BADIS, A Maître de conférences au Département de Génie des procédés, pour leur précieuse orientation et surtout à la confiance que vous m'avez portée.

A mon co-promoteur Monsieur KOURDALIS Doctorant et Attaché de recherche au CNRDPA, merci pour son attention, sa confiance, sa simplicité, sa générosité scientifique et surtout à son soutien permanent.

A tous mes collègues et mes amis de CNRDPA pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble durant le passage pratique en particulier Soumia, Zhira, et Faradji N.

A mon collègue BOUDJEMAA.K, pour leur collaboration lors de la réalisation de la partie pratique de ma thèse, à sa patience et à son encouragement.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance Nous tenons à remercier Mr Directeur du CNDPA et l'équipe du laboratoire du CNDPA (Bou Ismail).

Nous exprimons également nos remerciements à tous les enseignants de département de science de l'eau et de génie des procédés qui nous l'honneur de nous rencontrées et être parmi eux pendant mes études.

Enfin à tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire trouvent ici notre gratitude.

المخلص

هذا العمل هو مساهمة في دراسة تأثير التعرض الحاد للرصاص لمدة ثلاثة أيام على النشاط الأنزيمي (الكاتلاز) لدى بلح البحر "*Perna perna*" وهذا بهدف دراسة الاستجابة البيولوجية المبكرة نتيجة التلوث البحري. كذلك قياس نشاط الأيض (مطروح النيتروجين والفسفور , و الاحتياطات البروتينية) أقيمت بالتوازي. أظهرت النتائج اضطراب عام و ملحوظ للأبيض تحت تأثير الملوث (ارتفاع ملحوظ للفسفور بالنسبة للنيتروجين , اضطراب الاحتياط البروتيني), كذلك قياس الكاتلاز كشف توتر المحار المختبر نظرا للتطور الملحوظ لنشاط الكاتلاز الذي يرتبط ايجابيا مع تراكيز الرصاص. من جهة أخرى أجريت دراسة مقارنة لقياس درجة التسمم على العنصرين المعدنيين النحاس و الرصاص أين أظهرت النتائج اختلاف في درجة التسمم حيث كان جد مهم عند النحاس بالمقارنة مع الرصاص. سمحت لنا هذه الدراسة بتأهيل الكاتلاز كأنزيم مهم في منظومة الدفاع بفضل خصائصه (حساس, سريع, سهل القياس) و تقييمه لدرجة تلوث الوسط البيئي.

الكلمات المفتاحية:

التعريض الحاد , الرصاص, الكاتلاز, التوترا المأكسد, *Perna perna* بلح البحر, النشاطات الأيضية , الاحتياط البروتيني , النحاس .

RESUME

Le présent travail est une contribution à l'étude de l'effet d'une exposition aiguë au xénobiotique (plomb) d'une durée de trois jours sur l'activité enzymatique (catalase) chez la moule Africaine *Perna perna*. Ceci pour un objectif d'étudier la réponse biologique précoce due à une pollution marine. Ainsi, une mesure de l'activité métabolique (excrétion azotée et phosphorée, teneurs des réserves protéiques) a été évaluée en parallèle. Les résultats obtenus ont montré clairement une perturbation générale du métabolisme sous l'effet de xénobiotique (forte excrétion phosphorée par apport celle azotée, perturbation des réserves protéiques). Du même, la mesure de la catalase révèle un stress oxydant chez les moules testées vu l'évolution importante de l'activité catalase qui est corrélé positivement avec les teneurs en plomb. Par ailleurs, une mesure comparative de toxicité a été effectuée sur les deux éléments métalliques traces « cuivre et plomb » d'où les résultats ont montré une différence de toxicité du cuivre plus importante par rapport le plomb. Cette étude nous a permis de qualifier la catalase comme une importante enzyme de défense grâce à ses propriétés (sensible, rapide, facilement mesurable) et d'évaluer le degré de contamination du milieu environnant.

Mots clés : Exposition aiguë – Plomb – Catalase – Stress oxydant – Moule *Perna perna* – Activités métaboliques – Réserves protéiques – Cuivre.

Abstract

This Work is a contribution to the study of the negotiable instruments of an acute exhibition with xenobiotic (lead) three days duration on the enzymatic activity (catalase) in the mussel African. This for an objective to study the early biological answer due to a marine pollution. Thus, a measure of the metabolic activity (nitrogenized and phosphoresced excretion, contents of the protein reserves) was evaluated in parallel. The results obtained clearly showed a general disturbance of the metabolism under the negotiable instrument of xenobiotic (strong phosphoresced excretion by contribution that nitrogenized, disturbance of the protein reserves). The same one, the measure of the catalase reveals a stress oxidizing in the mussels tested considering the significant development of the catalase activity which is correlated positively with the lead contents. In addition, a comparative measure of toxicity was taken on the two metal elements traces "copper and lead" from where the results showed a difference in more significant toxicity of copper by contribution lead. This study enabled us to quantify the catalase like an importance enzyme of defense thanks to its properties (sensitive, fast, easily measurable) and to evaluate the degree of contamination of the surrounding medium.

Key words: Acute exhibition - Lead - Catalase - Stress oxidizing - *Perna perna* - Metabolic activities - Protein reserves- Copper.

Introduction générale

Les écosystèmes marins côtiers sont des milieux de plus en plus affectés par l'activité humaine. Par conséquent, l'industrialisation et le développement des villes et des sociétés humaines en zone côtière sont les principales causes de l'augmentation de la pression écologique exercée sur ces milieux [1].

Différents types de pollution (organique et/ou minérale) frappent souvent les milieux aquatiques, en particulier, celle causée par les métaux lourds [2]. Cependant, ils ont tendance à contaminer progressivement l'environnement sous la pression des activités anthropiques (minières, industrielles et agricoles) [3]. La présence des métaux lourds dans le milieu marin est particulièrement problématique en raison de leur non biodégradabilité et engendrent des pollutions persistantes [2, 3].

Les risques liés à la présence des polluants dans le milieu marin représentent aussi une menace sur les organismes vivants, 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 ayant 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.

La surveillance de la qualité d'écosystème marin est basée sur des outils d'évaluation et de suivi de ce dernier. L'utilisation des organismes vivants dans le but d'évaluer les conditions environnementales d'un milieu donné, a développé de nombreux outils (bioindicateurs, biomoniteurs, bioaccumulateurs, biomarqueurs, etc.) permettant la gestion et le maintien des écosystèmes marins côtiers [1].

Parmi les différents bioindicateurs pouvant être utilisés afin d'évaluer la qualité du milieu marin, les moules ainsi que 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 spécifiques et qualifiés par excellence en tant que bioindicateurs [1].

Le Centre national de recherche et du développement de la pêche et de l'aquaculture (CNRDPA) de Bou-Ismaïl travaille depuis quelques temps sur la biosurveillance de la côte algérienne dont le présent sujet fait partie intégrante de ce grand projet. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'effet d'un xénobiotique (plomb), par une exposition aiguë de la moule *Perna perna*, sur l'activité catalase (biomarqueur) pour une finalité d'un programme de biosurveillance de la pollution marine côtière. Ainsi, d'autres paramètres accompagnant (métabolisme et réserve protéique) ont été évalués en plus d'une expérience comparative du degré de toxicité avec le cuivre a été effectuée.

Le présent travail s'articule autour de quatre principaux chapitres :

Le premier et le deuxième chapitre est une approche bibliographique sur la pollution marine et les outils d'évaluation de la qualité des écosystèmes marins, respectivement.

Le troisième chapitre est consacré aux méthodes utilisées pour mesurer quelques paramètres physiques-chimique et les dosages biochimiques de la catalase et des protéines.

Le quatrième chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus, au cours de nos expérimentations ainsi que leurs discussions.

Enfin, une conclusion générale nous a permis de synthétiser les résultats acquis et dégagerons les perspectives de ce présent travail.

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 :	Origine de la pollution.....	04
Figure 2.1 :	Morphologie (Face externe et interne) de la coquille chez la moule.....	13
Figure 2.2 :	La moule <i>Perna perna</i> (<i>Pecta</i>) (Photo originale).....	13
Figure 2.3 :	Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques.....	15
Figure 3.1 :	Dispositif expérimental de test de toxicité aiguë.....	20
Figure 3.2:	Représentation géographique du site EAM (Élevage Aquacole Méditerranéen).....	21
Figure 3.3:	Planning expérimental de périodes d'étude (tests de toxicité aiguë).....	23
Figure 3.4:	Protocole de dosage biochimique de la catalase.....	26
Figure 4.1 :	Variation de la différence de température au cours des cycles expérimentaux	29
Figure 4.2 :	Variation de la différence de salinité au cours des cycles expérimentaux	30
Figure 4.3 :	Variation de la différence de l'oxygène dissous au cours des cycles expérimentaux	31
Figure 4.4 :	Variation de la différence de pH au cours des cycles expérimentaux.....	32
Figure 4.5 :	Étude de l'effet du plomb sur les teneurs en nitrites.	33
Figure 4.6 :	Étude de l'effet du plomb sur les teneurs en nitrates.....	33
Figure 4.7 :	Étude de l'effet du plomb sur les teneurs en azote amoniacal.....	34
Figure 4.8 :	Étude de l'effet du plomb sur les teneurs en phosphore en	35
Figure 4.9 :	Étude de l'effet du plomb sur les teneurs moyennes des excréctions phosphorées et des composés azotés.....	36
Figure 4.10 :	Étude de l'effet du plomb sur les teneurs en protéines dans la chaire des moules.....	37
Figure 4.11 :	Variation de l'activité enzymatique catalase en fonction des concentrations du plomb dans la chaire des moules.....	38
Figure 4.12 :	Variation de l'activité enzymatique catalase en fonction des concentrations du plomb 0.5 et 2 mg.L ⁻¹ au cours du cycle de contamination et de décontamination.....	41
Figure 4.13 :	Étude de l'effet du plomb sur les teneurs en protéines au cours du cycle décontamination et de décontamination par les concentrations 0.5 et 2 mg.L ⁻¹	42
Figure 4.14 :	Variation de la réponse catalase en fonction des concentrations du cuivre dans la chaire des moules.....	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1:	Les différents types de polluants chimiques selon leur nature et leur source.....	04
Tableau 1.2:	Les différents contaminants microbiologiques.....	05
Tableau 1.3:	Sources industrielles et agricoles d'où peuvent provenir les métaux présents dans l'environnement.....	06
Tableau 1.4:	Model de répartition du plomb dissous entre les différentes formes chimiques (eau de mer, salinité 35.10^{-3} , 25°C , 1 atmosphère).....	08
Tableau 2.1:	Avantages d'utilisations des différents compartiments trophiques.....	11
Tableau 3.1:	Les concentrations du plomb des trois séries utilisées au cours du cycle de contamination.....	22
Tableau 4.1:	Effet de mortalités des différentes concentrations du plomb sur les individus testés.....	29
Tableau 4.2:	Les espèces chimiques du plomb les plus probablement présent dans l'eau de mer.....	40
Tableau 4.3:	Le potentiel toxique des éléments métalliques traces « plomb et cuivre ».....	43

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	01
CHAPITRE 01 : POLLUTION MARINE	
1.1 Introduction.....	03
1.2 Sources de pollution	03
1.3 Les différents contaminants de l'eau de mer.....	04
1.3.1 Les polluants physico-chimiques.....	04
1.3.2 Les polluants microbiologiques.....	05
1.4 Les métaux lourds dans le milieu marin.....	05
1.4.1 Généralité	05
1.4.2 La spéciation et la biodisponibilité.....	06
1.4.3 Le processus physiologique de la bioaccumulation.....	07
1.5 Le métal étudié en milieu marin : Cas du plomb « Pb »	07
1.5.1 Définition.....	07
1.5.2 Propriétés fondamentales.....	08
1.5.3 Propriétés biologiques et toxicité.....	08
1.5.4 Bioaccumulation du plomb.....	09
CHAPITRE 02 : LA SURVEILLANCE DE LA QUALITE DE MILIEU MARIN	
2.1 Introduction.....	10
2.2 Bioindication et espèces indicatrices de pollution.....	10
2.2.1 Propriétés des bioindicateurs de pollution marine.....	11
2.2.2 Les espèces sentinelle	11
2.2.2.1 Généralité.....	11
2.2.2.2 Les mollusques bivalves	12
2.2.2.3 Exemple de moule « <i>Perna perna</i> »	12
2.3 Les biomarqueurs de stress environnemental.....	14
2.3.1 Classification des biomarqueurs.....	15
2.3.1.1 Les biomarqueurs de défenses.....	15
2.3.1.2 Les biomarqueurs de dommages.....	16
2.3.2 Le stress oxydant.....	16
2.3.3 Enzyme antioxydante étudié : la catalase (CAT).....	16
2.4 Les tests écotoxicologiques.....	17
2.5 Approches active et passive de biosurveillance.....	18
CHAPITRE 03 : MATERIEL ET METHODES: STRATEGIE EXPERIMENTALE, DISPOSITIFS ET METHODES ANALYTIQUES	
3.1 Démarche et dispositif expérimental.....	19
3.2 Matériel.....	21
3.2.1 Le matériel biologique :	21
3.2.2 Le matériel non biologique.....	21

3.3 Méthodes.....	21
3.3.1 Echantillonnage.....	21
3.4 Tests d'écotoxicité courtes durées.....	22
3.4.1 Tests de contamination par le plomb	22
3.4.2 Tests de décontamination de plomb.....	22
3.4.3 Tests de contamination par le cuivre.....	22
3.5 Suivi et mesure des paramètres au cours des cycles expérimentaux.....	23
3.5.1 Paramètres physiques (Eau d'élevage).....	23
3.5.2 Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée.....	23
3.5.3 Dosages biochimiques : catalase et protéine.....	24

CHAPITRE 04 : RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Résultats des analyses physico-chimiques de l'eau d'élevage.....	28
4.1.1 Résultats des paramètres physiques.....	29
4.1.2 Résultats des sels nutritifs.....	32
4.1.2.1 Etude de l'effet des polluants sur l'excrétion azotée et phosphorée.....	32
4.2 Résultats des paramètres biochimiques et enzymatiques.....	36
4.2.1 Résultats des dosages des protéines.....	37
4.2.2 Résultats de biomarqueur «CAT.....	38
4.2.3 Résultats de cycle de décontamination.....	40
4.3 Potentiel toxique « plomb et cuivre »	42

CONCLUSION GÉNÉRALE	44
---------------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE (A) : Résultats numériques

ANNEXE (B): Réactifs, dosage des sels nutritifs et solution chimiques

ANNEXE (C) : Matériels et dispositif

CHAPITRE 1 :

POLLUTION MARINE

1.1 Introduction

La pollution est un problème d'actualité; elle affecte pratiquement tous les écosystèmes y compris l'environnement marin .La pollution des eaux marines consiste en un apport d'éléments étrangers au milieu naturels qui vont le modifier d'une manière significative tant en son état physique que dans sa composition chimique et finalement biologique par voie de conséquence [4].

La définition de la pollution marine est donnée par le premier rapport du Conseil sur la Qualité de l'Environnement de la Maison Blanche (1965), étant « *une modification défavorable du milieu naturel, comme un sous-produit de l'action humain* » [5].

Ainsi ,le terme de pollution marine fait l'objet d'une définition, reconnue par l'ensemble de la communauté scientifique internationale (**GESAMP**), comme étant « *l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, de substances ou d'énergie dans le milieu marin (y compris les estuaires) occasionnant des effets néfastes tels que des nuisances envers les ressources biologiques, des risques pour la santé de l'homme, des entraves aux activités maritimes (y compris la pêche), une altération de la qualité de l'eau de mer du point de vue de son utilisation et une dégradation des valeurs d'agréments* » [6].

Pour mieux évaluer la pollution, il existe des paramètres qui permettent d'estimer l'ampleur de celle-ci en fonction de son type, ainsi la différente pollution affecte le milieu marin à des niveaux variables, et qui dépendent [6] :

- du type de pollution (instantané ou permanent).
- de la capacité d'auto-épuration du milieu récepteur.
- et du niveau de persistance et de la réactivité de la substance polluante.

1.2 Sources de pollution

Selon le mode de propagation des pollutions, ces dernières peuvent être classées en trois types: pollutions accidentelles, pollutions diffuses et pollutions anthropiques. Ces différents types de pollution ont plusieurs sources, et qui peuvent être dues aux [6] :

- Rejets d'effluents domestiques : qui sont des eaux résiduaires véhiculées en mer directement sans épuration, et sont caractérisées par de très fortes teneurs en matière organique, germes fécaux, sels minéraux, détergents...etc. Les conséquences de cette pollution organique sont catastrophiques pour presque tous les organismes constituant les peuplements des milieux néritiques [6].

- Pollution d'origine industrielle: constituent la première grande source de pollution des eaux, résultantes de différentes industries, telles que : la production d'énergie, l'industrie chimique, métallurgique, électronique, etc. et cela par l'utilisation des combustibles fossiles, des molécules minérales et organiques de synthèses [5, 6, 7].

- Pollution agricole: elle résulte de l'utilisation de divers produits phytosanitaires, issus du lessivage des terres agricoles (phénomène d'eutrophisation), des résidus des élevages intensifs des animaux et des eaux d'abattoirs qui engendrent des pollutions chroniques et diffuses [6]. La figure 1.1 résume le pourcentage et l'origine de la pollution marine.

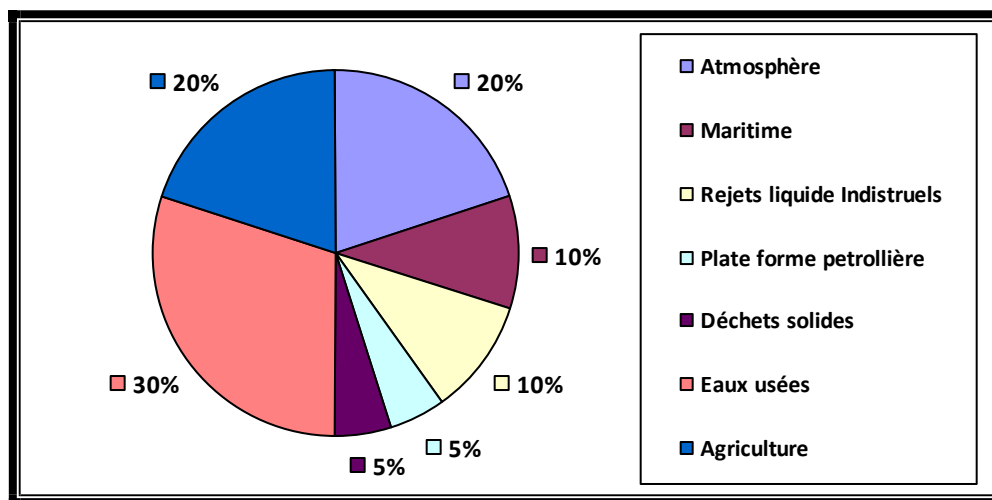


Figure 1.1 Origine de la pollution marine [8].

1.3 Les différents contaminants de l'eau de mer

1.3.1 Les polluants physico-chimiques

Les différents types de polluants physico-chimiques dans l'eau varient selon les activités humaines et selon les conditions écologiques (Tableau 1.1).

Tableau 1.1: Les différents types de polluants chimiques selon leur nature et leur source [5, 6].

Types de pollution	Nature du polluant	Source
Thermique	Rejets d'eaux chaudes	Centrales électriques
Radioactivité	Radio-isotopes	Installations nucléaires
Engrais	Nitrates et phosphates	Agriculture, lessivages
Métaux et métalloïdes	Plomb, mercure, arsenic	Industrie agriculture, pluies acides, combustion
Pesticides	Insecticides, fongicides, herbicides	Industrie, agriculture
Détergents	Agents tensio-actifs	Eaux usées domestiques
Hydrocarbures	Pétroles brut et dérivés	Industries pétrolières, transport
Composés organochlorés	BCP, solvant chlorés	Industrie

1.3.2 Les polluants microbiens

De très nombreuses recherches ont permis de dresser un bilan des microorganismes contaminant le milieu marin littoral. Nous ne citerons ici que les bactéries et les virus les plus marquants, principalement d'origine entérique ou marine, pouvant avoir un impact sur la santé humaine (Tableau 1.2).

Tableau 1.2: Les différents contaminants microbiologiques [5, 6].

Nature des contaminants microbiens		
Contaminants d'origine fécale	Contaminants de milieu marin	Contaminants viraux (entérovirus)
1- Entérocoque et Streptocoques fécaux 2- Entérobactéries - <i>E. coli</i> - <i>Salmonella</i> - <i>Schigella</i> - <i>Yersinia enterocolitica</i> 3- <i>Campylobacter jejuni</i> 4- <i>Leisteria monocytogenes</i> 5- Bactéries sporulées - <i>C. perfringens</i>	1- <i>Vibrio cholerae</i> 2- <i>V. parahaemolyticus</i> 3- <i>V. vulnificus</i> 4- <i>V. mimicus</i> 5- Autres vibrios	1-Virus de l'hépatite A (VHA) et E (VHE) 2- Virus des gastro-entérites - Norovirus (caliciviridae) - Rotavirus sérogroupes (A, B et C) - Astrovirus....

1.4 Les métaux lourds dans le milieu marin

1.4.1 Généralité

Parmi les éléments polluants qui peuvent arriver dans le milieu marin, il y a les éléments métalliques qui se trouvent généralement à des faibles concentrations, de l'ordre de ppm. Ces derniers sont susceptibles de présenter un danger potentiel pour la santé. La contamination peut se produire de façon directe, ou indirecte par les phénomènes de transfert au travers de la chaîne trophique [4].

Les métaux lourds sont des constituants naturels de tous les écosystèmes et on les trouve dans l'atmosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et la biosphère. Ce terme de métaux lourds désigne selon Elmsley [2] ; des éléments chimiques toxiques dont la densité excède 5 g.cm^{-3} . Ces micropolluants peuvent affecter la salubrité du milieu marin, puisqu'ils ne subissent pas de dégradation biologique ou chimique. Ils peuvent de ce fait s'accumuler dans les différents maillons des chaînes trophiques à des concentrations toxiques dans les organismes marins [9].

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. C'est le cas du fer (Fe), du cuivre (Cu), du zinc (Zn), du nickel (Ni), du cobalt (Co), du vanadium (V), du sélénium (Se), du molybdène (Mo), du manganèse (Mn), du chrome (Cr), de l'arsenic (As) et du titane (Ti). D'autres ne sont pas nécessaires à la vie et peuvent être même préjudiciables comme le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et l'antimoine (Sb) [2, 10].

Tableau 1.3 : Sources industrielles et agricoles d'où peuvent provenir les métaux présents dans l'environnement [11].

Utilisations	Métaux
Batteries et autres appareils électriques	- Cd, hg, Pb, Zn, Mn, Ni
Pigments et peintures	- Ti, Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Sn, Cr, Cu, Fe
Alliages et soudures	- Cd, As, Pb, Zn, Mn, Sn, Ni, Cu
Biocides	- As, Hg, Pb, Cu, Sn, Zn, Mn
Agents de catalyse	- Ni, Hg, Pb, Cu, Sn
Verre	- As, Sn, Mn
Engrais	- Cd, Hg, Pb, Al, As, Cr, Cu, Mn, Zn, Ni
Matières plastiques	- Cd, Sn, pb
Produits dentaires et cosmétiques	- Sn, hg
Textiles	- Cr, Fe, Al
Raffineries	- Ni, Pb, Fe, Mn, Zn
Carburants	- Ni, Hg, Cu, Fe, Mn, Pb, Cd

1.4.2 La spéciation et la biodisponibilité

Comme nous venons de le voir, le milieu marin, biotope particulièrement riche, est caractérisé par une remarquable stabilité de ses propriétés fondamentales et une infinie variabilité de ses micro-constituants. L'eau de mer contient en solution des combinaisons de tous les éléments chimiques engagés dans des réactions inorganiques et biochimiques contribuant aux différences de composition des eaux marines (ions majeurs, matière organique, particules en suspension, etc.) [2]. De ce fait, le métal se trouve sous des formes physico-chimiques très diverses. L'ensemble des réactions de complexation entre un produit chimique et la totalité des ligands présents dans le milieu correspond au processus de spéciation. C'est la résultante d'équilibres complexes entre tous ces éléments reflétant la complexité chimique de ces milieux [2, 12, 13].

La spéciation du métal contrôle sa toxicité et son assimilation par les organismes marins, et affecte donc sa biodisponibilité. La connaissance des différentes formes chimiques du métal est nécessaire pour comprendre le processus de bioaccumulation. En effet, celle-ci va dépendre des propriétés biochimiques du contaminant et des mécanismes d'accumulation possibles pour chaque élément [2].

Les efficacités d'absorption du contaminant dans l'organisme marin, à partir de l'eau filtrée ou de la nourriture ingérée seront donc différentes selon le métal considéré et la forme chimique [2].

Dans tout modèle de capture de contaminants, une des plus importantes variables est la concentration du contaminant qui peut être absorbée par l'organisme. Cette fraction ne représente qu'une partie seulement du total présent dans le milieu et est communément appelée fraction biodisponible. La biodisponibilité est donc la capacité à être intégrée au vivant et varie selon les formes chimiques pour un même élément. Il faut donc connaître l'abondance de chaque forme et les lois qui régissent leurs transformations en milieu naturel pour prévoir leur assimilation dans le vivant [2].

1.4.3 Le processus physiologique de la bioaccumulation

Face à la complexité et l'immensité des problèmes écotoxicologiques, il semble impératif de s'occuper séparément des mécanismes d'accumulation et du transfert des contaminants. Les termes de transfert et d'accumulation sont fortement liés. Le premier représente un changement d'état du second. Les transferts représentent le flux de contaminants entre les différents compartiments abiotiques et biotiques et l'accumulation représente la quantité stockée dans chacun des compartiments [14].

La bioaccumulation, phénomène capital au niveau de l'organisme, est exprimée par la différence entre la quantité de métaux qui pénètre au travers des barrières biologiques et celle qui est éliminée vers le milieu extérieur (processus d'excrétion). Pénétration, stockage dans les organes cibles et élimination seront sous la dépendance des facteurs abiotiques du milieu, de la nature du contaminant et des caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'organisme ou de l'espèce considéré [2].

1.5 Le métal étudié en milieu marin : Cas de plomb « Pb »

1.5.1 Définition

Le plomb est un des « métaux traces » existant dans la nature. Le plomb est issu de l'activité des fonderies et des incinérateurs d'ordures ménagères, de la combustion de l'essence où il est utilisé comme antidétonant, de certaines peintures, d'insecticides et de gaines de câbles. Le plomb est un composé non polaire qui est rapidement absorbé par les organismes marins. La toxicité des dérivés organiques du plomb est généralement supérieure à celle des formes inorganiques. Des effets sur le métabolisme respiratoire d'organismes marins ont été décrits, ainsi que des effets sur le système nerveux ou le fonctionnement des membranes biologiques [2, 15].

1.5.2 Propriétés fondamentales

La répartition des formes spécifiques du plomb en eau de mer est représentée sur le tableau 1.4 suivant les auteurs ci-dessous, les espèces dominantes dans l'eau de mer sont PbCO_3 , PbCl_2 ou PbCl^+ [2,15]. Cette répartition ne prend pas en compte la matière organique dissoute et le fait que 66% de plomb, dans l'eau de mer, se trouverait essentiellement sous forme de complexes organiques labiles [15]. Aussi, le plomb présente une forte affinité pour la matière particulaire. A peine 10% du plomb se trouve sous cette forme dans l'océan [15]. L'adsorption du plomb sur la matière particulaire est fonction du pH et augmente avec ce dernier. Lion et *al.* [15] ; ont montré que les courbes d'adsorption du plomb en fonction de pH ne sont pas réversibles ou que les cinétiques de désorption sont extrêmement lentes.

Tableau 1.4 : Model de répartition du Plomb dissous entre les différentes formes chimiques (eau de mer, salinité 35.10^{-3} , 25 °C, 1 atmosphère) [15].

	ZIRINO et YAMAOTO (1972)	DYRSSEN et WEDBORG (1975)	STUMM et BRAUNER (1975)	FLORENCE et BATLEY (1976)	LU et CHEN (1977)	WHITFIELD et TURER (1979)
Pb^{+2}	2	5	4	1	<1	2
PbCl^+	11	19	13	9	2	7
PbCl_2	3	42	8	12	1	11
PbCl_3^-	2	9	3	5	<1	5
PbCl_4^{2-}	<1	4	<1	2	<1	2
PbCl_6^{4-}	-	-	-	-	29	-
PbOH^+	1	10	30	1	<1	4
$\text{Pb(OH}_2)$	1	-	2	<1	<1	-
Pb(OH)^{3-}	-	-	-	-	-	-
PbCO_3	80	<1	40	68	65	55
$\text{Pb(CO}_3)_2^{2-}$	-	-	-	-	2	2
PbHCO_4^{3+}	<1%	1	-	<1	<1	-
PbSO	<1%	<1	-	2	<1	1
Pb(Cl,OH)^0	-	-	-	-	-	2
$\text{Pb(CO}_3,\text{OH)}^-$	-	-	-	-	-	1
$\text{Pb(CO}_3,\text{Cl)}^-$	-	9	-	-	-	10

1.5.3 Propriétés biologiques et toxicité

La toxicité des composés minéraux du plomb est en rapport avec leur plus ou moins grande hydrosolubilité. Par ordre de toxicité décroissante, donc en allant du composé le plus soluble vers le moins soluble dans l'eau, on trouve : le nitrate, le chlorure, l'acétate basique, le minium, le carbonate, le sulfure, le phosphate. Les doses létales du plomb, sous la forme de sel minéral, sont souvent supérieures à sa limite de solubilité dans l'eau de mer, c'est à dire 4 mg.L^{-1} . Le plomb inorganique peut donc être considéré comme toxique (concentration létale

de 1 à 10 mg.L⁻¹) ou modérément toxique (concentration létale de 10 à 100 mg.L⁻¹). Les teneurs létales en plomb tétralkylé sont en revanche beaucoup plus faibles : les CL₅₀ 96 heures sont en effet généralement inférieures à 1 mg.L⁻¹, c'est à dire que cette forme va de très toxique à extrêmement toxique [2]. Le seuil de qualité sanitaire réglementaire est de 1,5 mg.kg⁻¹ du règlement européen CE 221/2002.

1.5.4 Bioaccumulation du plomb

Dans les premiers temps de la cinétique de bioaccumulation, la pénétration du plomb dans les cellules est linéaire en fonction du temps et directement proportionnelle à sa concentration dans l'eau. L'excrétion du plomb est quant à elle proportionnelle à la concentration interne dans l'organisme [16]. Il est bien connu sous quelles formes (ions, complexes...), le plomb est absorbé. Cependant, il est clair que la forme dissoute du contaminant dans le milieu est primordiale et influence le taux de capture. Comme pour le cadmium, la pénétration du plomb dans les cellules est le résultat principalement du transport sous forme dissoute Pb²⁺, bien que l'endocytose dans l'épithélium branchial ait été évoquée pour ce métal. Incorporés dans l'organisme, les ions Pb²⁺ entrent en compétition avec les ions Ca²⁺ [2].

CHAPITRE 2 :**LA SURVEILLANCE DE LA QUALITE DU MILIEU MARIN****2.1 Introduction**

Le milieu marin est contaminé par de nombreux produits chimiques dont des éléments métalliques et les contaminants organiques rejetés par les industries, l'agriculture et les communautés urbaines. Les zones côtières sont les plus touchées par cette contamination dont les concentrations de la plupart des polluants sont de l'ordre de quelques nanogrammes par litre d'eau, ce qui rend les techniques de prélèvement et de mesure complexes [2].

Les risques de contamination au moment de l'échantillonnage et de l'analyse sont nombreux, rendant les mesures délicates. Ces problèmes ont été surmontés par l'utilisation de techniques ultra-propres dans l'échantillonnage. Cependant, la mesure directe des contaminants dans l'eau fait appel à des techniques analytiques sophistiquées, difficilement applicables en routine le long d'un linéaire côtier important. Par ailleurs, le suivi de ces concentrations totales dans le milieu ne renseigne pas directement sur les concentrations des espèces chimiques biodisponibles [2].

De ce fait, les dosages concernent le plus souvent la totalité des espèces chimiques et non spécifiquement les formes biodisponibles des contaminants étudiés, information indispensable quant à la protection des écosystèmes et à la compréhension des processus de contamination [2].

Le concept de biosurveillance qui repose sur l'étude de la réponse biologique des êtres vivants aux polluants, répond justement à cette lacune de la chimie conventionnelle. En effet, les effets biologiques des produits chimiques déversés dans le milieu naturel peuvent servir d'indicateurs de pollution (ou biomarqueurs) dans le règne animal et végétal et permettent la mise en évidence précoce de contamination du milieu naturel avant l'altération de la structure des organismes. En pratique, il a donc été démontré qu'un organisme, évoluant dans des eaux polluées, est sujet à un syndrome de stress qu'il est possible d'identifier et de quantifier à l'aide d'analyses biologiques de coût relativement faible [17].

2.2 Bioindication et espèces indicatrices de pollution

La bioindication désigne l'évaluation de la qualité des milieux à l'aide de bioindicateurs c'est-à-dire d'organismes vivants connus pour leurs capacités à refléter l'état des écosystèmes et à identifier les problèmes et les risques encourus. Un bioindicateur peut être un individu, une partie d'individu ou même une communauté d'individus renfermant de l'information sur la qualité du milieu. Dans ce contexte, un bioindicateur peut être défini comme une espèce qui,

par son absence, sa présence, son abondance ou sa distribution nous donne des informations de nature qualitative sur l'état d'un environnement [1].

2.2.1 Propriétés des bioindicateurs de pollution marine

Il est bien évident de choisir de façon pertinente, les organismes sur lesquels seront réalisées les mesures de concentration en micropolluants. Ces organismes doivent répondre à un certain nombre de critères afin d'être considérés comme des bioindicateurs fiables [18] :

1. Les individus doivent accumuler les contaminants sans qu'il y ait d'effet létal ;
2. Le taux de contamination des organismes doit être corrélé significativement avec la concentration moyenne en contaminants du milieu marin ;
3. L'espèce choisie doit être sédentaire et représentative de la zone où a lieu le prélèvement. Il est opportun néanmoins qu'elle ait une aire de répartition géographique large afin d'envisager une comparaison géographique de la qualité du milieu marin ;
4. Elle doit être abondante dans la zone d'étude et avoir une durée de vie longue, doit être facile à identifier et à prélever.

2.2.2 Les espèces sentinelles

2.2.2.1 Généralité

Dans une optique de surveillance du niveau de pollution de l'eau, les organismes sentinelles sont déterminants afin de détecter une pollution, au sens large du terme, le plus précocement possible. Plusieurs avantages ont été définis et employés par de nombreux chercheurs pour l'utilisation de ces espèces sentinelles (elle comprend les algues, les invertébrés et les vertébrés) (Tableau 2.1) [19].

Tableau 2.1 : Avantages d'utilisations des différents compartiments trophiques [19].

Espèce sentinelle	Avantage d'utilisation
Algues	<ul style="list-style-type: none"> - Indicateurs d'effets à court terme du cycle de vie court ; - Producteurs primaires ; - Echantillonnage très facile et peu coûteux ; - Bien adaptés pour la mesure de paramètres fonctionnels (biomasse, dosage de chlorophylle, ...) - Sensibles à certains polluants particuliers comme les herbicides

Macro-invertébrés	<ul style="list-style-type: none"> - Bon indicateur de conditions locales car peu mobiles ; - Intègre les variations à court terme : les communautés réagissent à long terme mais certains stades sensibles répondent rapidement ; - Facilité de mise en œuvre, l'utilisation de niveaux taxonomiques peu poussés est possible et donne de bonnes indications ; - Echantillonnage facile ; - Abondants dans la plupart des écosystèmes ; - Source de nourriture de nombreux poissons ;
Poissons	<ul style="list-style-type: none"> - Bon indicateurs d'effets à long terme à cause de leur durée de vie ; - Représentants de différents niveaux trophiques (omnivores, insectivores, herbivores, planctonivores et piscivores) - Situés au sommet de la chaîne trophique et consommés par l'Homme ; - Relativement faciles à échantillonner et très faciles à déterminer au niveau de l'espèce ; - Utilisation pour les usages de l'eau (catégories piscicoles) ; - De nombreux poissons sont considérés comme des espèces menacées

2.2.2.2 Les mollusques bivalves

Les mollusques comme espèces sentinelles sont utilisées en écotoxicologie et dans des plusieurs programmes internationaux de surveillance de l'environnement .Les mollusques bivalves respirent et se nourrissent en filtrant l'eau par leur branchies. Ils peuvent ainsi accumuler des métaux par contamination directe (contaminant dissous) et indirecte ou trophique (contaminants absorbées ou adsorbés sur des particules en suspension, nutritives ou non). En raison de ces caractéristiques, ils concentrent les métaux et s'avèrent des indicateurs du premier ordre pour mesurer l'exposition et évaluer les effets d'une pollution métallique à travers l'espace et le temps [1,20].

2.2.2.3 Exemple de moule « *Perna perna* »

La moule est un mollusque bivalve sessile fixé aux substrats solides dans les anfractuosités des rochers battus et éclairés de l'étage médiolittoral qui sont favorables à l'installation de moulières naturelles. Elle s'accroche en grappes et se fixe grâce à sa capacité de s'écrêter un faisceau de filaments soyeux que l'on appelle « byssus », on la trouve dans les mers du monde entier quoi qu'elle préfère les eaux froides. Elle est capable de supporter une longue immersion grâce à une réserve d'eau entre les deux valves, elle se nourrit de phytobenthos

(Diatomées) de phytoplancton et de débris organiques. La moule utilise son appareil branchial comme un filtre qui joue le rôle d'un tamis, en effet elle filtre jusqu'à 100 L eau/j [19].

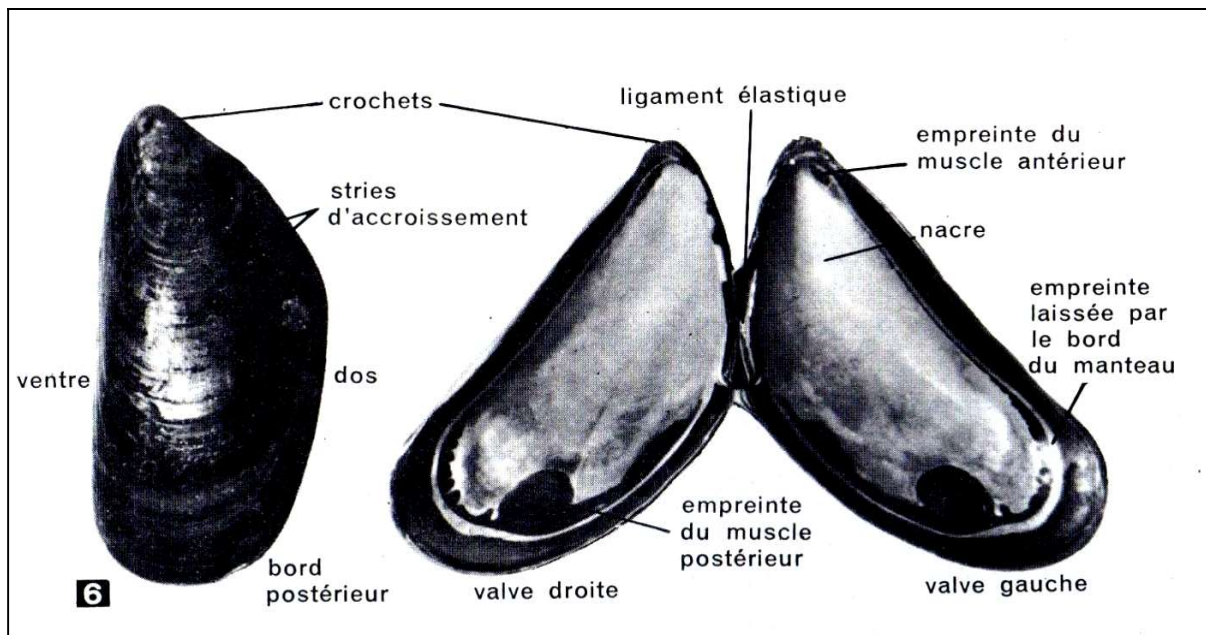


Figure 2.1: Morphologie (Face externe et interne) de la coquille chez la moule [21].

La moule « *Perna perna* » a fait l'objet d'une indication biologique marine. Cette espèce se rencontre beaucoup plus sur les côtes congolaises de l'Afrique, sur le littoral de la Méditerranée à l'exception des côtes d'Afrique du Nord (Tunisie, Maroc....) [22].



Figure 2.2: La moule *Perna perna* (*Pecta*) (Photo originale)

Systématique :

Règne :	Animal
Sous règne :	Métazoaire
Embranchement :	Mollusques
Classe :	<i>Bivalvia</i>
Sous-classe :	<i>Lamellibranchia</i>
Ordre :	<i>Mytiloidale</i>
Superfamille :	<i>Mytilacae</i>
Famille :	<i>Mytilidae</i>
Sous-famille :	<i>Mytilinae</i>
Genre :	<i>Perna</i>
Espèce :	<i>Perna Pecta</i>
Noms vernaculaires :	An : African mussel

2.3 Les biomarqueurs de stress environnemental

La notion du biomarqueur est donc relativement récente et le développement de son utilisation comme outil de surveillance et d'évaluation de l'environnement est étroitement liée à la connaissance des mécanismes moléculaires des processus toxiques chez différentes espèces animales ou végétales appartenant aux différents écosystèmes (Figure 2.3).

D'après Lagadic *et al* [23] ; un biomarqueur est 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 une ou plusieurs substances chimiques à caractère polluant. Ce changement peut alors être associé à l'exposition en elle-même, aux effets toxiques ou à la sensibilité vis-à-vis du contaminant environnemental.

Les expérimentations en conditions contrôlées ont largement démontré que les biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques et dans certains cas, les effets de ceux-ci sur les structures et fonctions vitales de l'organisme [24, 25]. Ces bases expérimentales ont permis d'envisager l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel, notamment dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement [27].

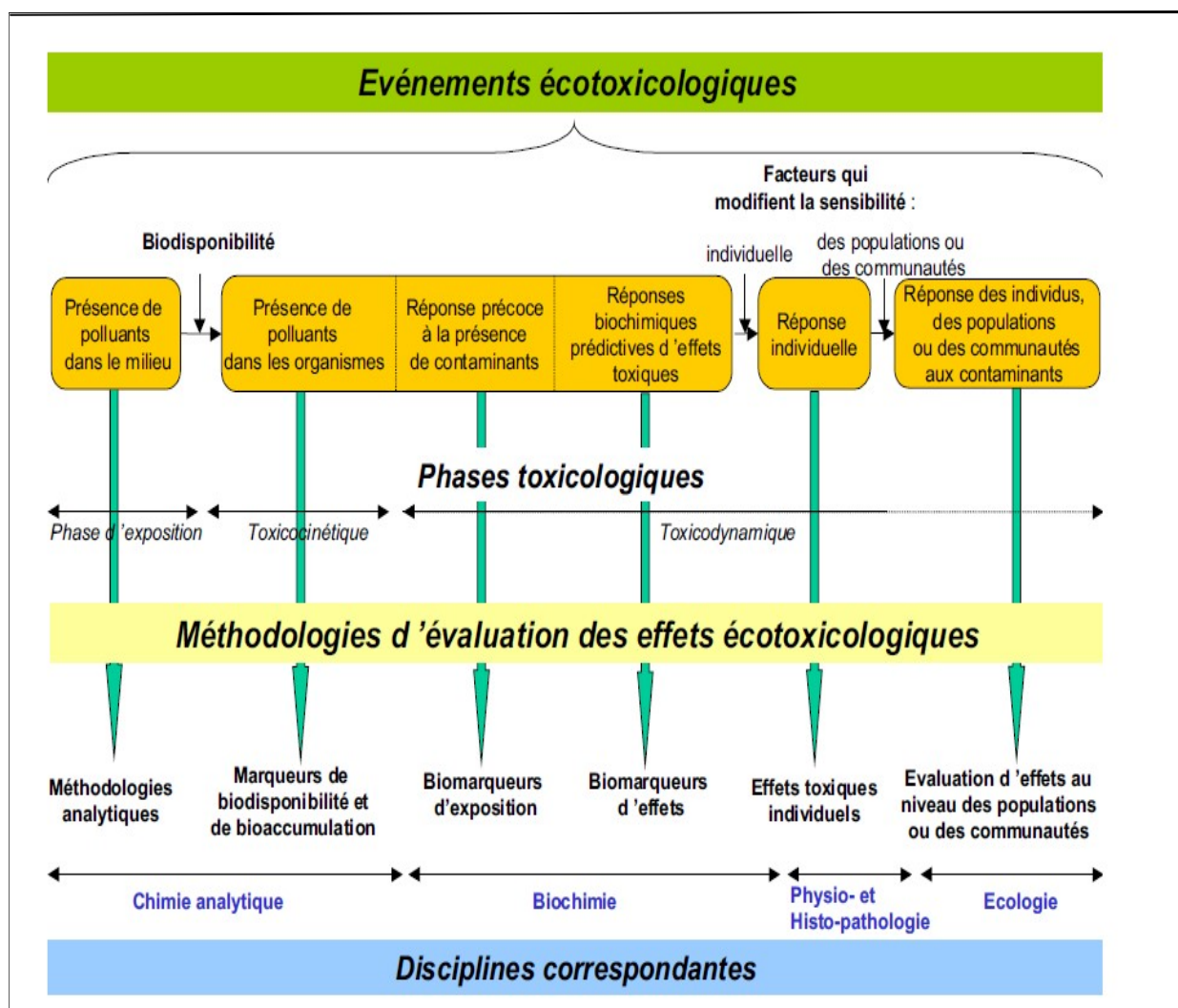


Figure 2.3: Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (modifié d'après un diagramme de Lagadic *et al.* [23]).

2.3.1 Classification des biomarqueurs

Dans la classification des biomarqueurs, il a été longtemps utilisé une division en trois classes (biomarqueurs d'exposition, d'effets et de susceptibilité). Et selon De Lafontaine *et al.* [28]; les biomarqueurs sont classés en deux catégories suivantes : les biomarqueurs de défense et les biomarqueurs de dommages. Cette dernière permet de lever l'ambiguïté du terme effet qui peut être bénéfique ou néfaste.

2.3.1.1 Les biomarqueurs de défense

Ce sont des réponses de type adaptatif, c'est le cas de la métallothionéine, les enzymes de biotransformation des HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques), les PCB (Polychlorobiphényle) et les défenses antioxydantes enzymatiques (l'activité EROD) qui sont des systèmes de détoxification ou de dégradation et dont la teneur augmente en présence de contaminants dans le milieu. Cette adaptation peut empêcher les effets au niveau de l'individu et par conséquent au niveau des populations, communautés et écosystèmes [28].

En effet, dans des zones fortement contaminées, de nombreuses espèces de plantes et d'animaux sont capables de faire face à la présence de substances chimiques potentiellement toxiques [29].

2.3.1.2 Les biomarqueurs de dommages

La réponse dans ce cas peut indiquer un effet néfaste. C'est le cas de neurotoxiques qui entraînent des effets au niveau du comportement, pouvant être évalués indirectement par la mesure de biomarqueurs caractéristiques du fonctionnement du système nerveux, par exemple de l'acétylcholinestérase (AchE) [28].

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

Les principaux biomarqueurs de dommage sont des marqueurs moléculaires (le stress oxydant, la peroxydation lipidique, les cholinestérases, les vitamines.), des marqueurs de génotoxicité (les adduits à l'ADN), des marqueurs subcellulaires et cellulaire (la stabilité de la membrane lysosomale), les atteintes cytologiques et des marqueurs physiologiques (les altérations métaboliques) [29].

2.3.2 Le stress oxydant

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la génération et la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (reactive oxygen species) (anion superoxyde, radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène, oxyde nitrique) par les mécanismes antioxydants en faveur de leur production [31].

Le contenu en ROS dans l'organisme est régulé par des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase GPxGSH-PxH-, glutathion réductase-GR- et glutathion-S-transférase-GST et non-enzymatiques (glutathion, l'acide urique, la bilirubine, les hormones sexuelles, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q) appropriés afin de protéger leurs composantes cellulaires et prévenir les dommages cellulaires causés par les ROS. Les espèces réactives de l'oxygène, lorsqu'elles sont générées en excès par rapport aux capacités des systèmes de protection et de réparation, peuvent exercer leurs dommages sur l'ensemble des constituants cellulaires (lipides, protéine, acides nucléiques et polysaccharides) [29].

2.3.3 Enzyme antioxydant étudiée : la Catalase (CAT)

La catalase est un hémoprotéine présent au niveau des peroxysomes ainsi que dans les mitochondries et le cytoplasme (pour les cellules qui ne possèdent cette organelle ex ; érythrocytes) qui ont pour fonction de décomposer le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en H₂O et O₂ [26, 29].

La réaction Fenton catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène :



Cette enzyme contribue de façon importante dans le système de défense antioxydant protégeant les organismes contre un stress oxydatif [31, 32, 33]. Elle limite ainsi la formation de radicaux OH[•]. La plupart des cellules aérobies contiennent cette enzyme dans le cytosol et dans les peroxysomes. Elle est présente à de fortes concentrations dans le foie et dans les globules rouges [34].

La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier [35, 36].

2.4 Les tests écotoxicologiques

Dans le but d'évaluer les risques des produits chimiques à l'égard des ressources vivantes, plusieurs essais ont été effectués pour quantifier de façon aussi précise que possible la relation entre la dose d'un produit toxique et l'effet exercé sur les êtres vivants, d'où la mise au point d'essais écotoxicologiques. Les méthodes biologiques proposées pour ces essais sont extrêmement nombreuses. Il s'agit de tests standardisés qui doivent être parfaitement reproductibles quel que soit l'expérimentateur, ceci afin d'avoir une valeur légale. Pour ce faire, toutes les conditions expérimentales doivent être parfaitement définies. En effet, certains facteurs physico-chimiques du milieu auront une influence majeure sur la bioaccumulation et la toxicité des polluants. Les effets biochimiques, physiologiques, reproductifs et comportementaux peuvent aussi apporter des mesures de la toxicité [17].

Les bioessais les plus utilisés sont [29, 37, 38] :

1) Essais de toxicité chronique : qui se déroulent sur une durée relativement longue par rapport au temps de génération de l'organisme. Ce sont par exemple les tests sur la reproduction. Ils sont plus longs et plus coûteux que les tests aigus, mais ils permettent de mettre en évidence des effets à long terme d'un polluant.

2) Essais de toxicité aiguë : qui se réalisent sur une durée très courte (par rapport au temps de génération de l'organisme). Leurs avantages sont leur rapidité et leur faible coût. Ces tests impliquent généralement des concentrations élevées du polluant; de ce fait, les effets à long terme des faibles concentrations ne sont pas mis en évidence.

2.5 Approches active et passive de biosurveillance

Les études environnementales portant sur les effets des contaminants sur les organismes peuvent être divisées en deux catégories distinctes : les études utilisant une approche active et celles utilisant une approche passive [39].

On parle d'une approche active (*in vitro*) lorsque des organismes élevés en laboratoire, ou récoltés dans des sites considérés comme non pollués (sites témoins), sont exposés à un milieu contaminé (en laboratoire ou en nature) pour une période de temps définie au bout de laquelle les réponses des organismes sont examinées ou mesurées [39, 40].

Dans le cas des études effectuées dans le cadre d'une approche passive (*in situ*), les observations et les mesures sont effectuées sur les organismes appartenant à l'écosystème étudié dans le but de mettre en évidence les différents effets engendrés par les contaminants présents dans le milieu [39, 40].

L'utilisation de deux approches différentes dans les programmes d'évaluation environnementale soulève une question importante : les résultats obtenus à l'aide de ces deux approches peuvent-ils être comparés entre eux? La réponse à cette question fait encore l'objet de controverses dans la communauté scientifique mais les scientifiques s'entendent en général sur un point important; lorsque des organismes élevés en laboratoire ou provenant d'un site témoin sont utilisés dans une étude, ceux-ci doivent être génétiquement comparables à ceux du site contaminé [40].

CHAPITRE 03 :

MATERIEL ET METHODES

Dans le cadre de la biosurveillance marine « *MARINE BIOMONITORING* », le suivi de l'état de santé des écosystèmes aquatiques repose sur l'étude de la réponse biologique des êtres vivants exposés aux différents polluants lors d'une série d'expérience *in vitro* et *in situ*.

Un programme de gestion d'écosystème aquatique est adopté par le CNRDPA de Bou-Ismaïl, dont l'objectif principal est la contribution à la recherche des biomarqueurs indicateurs de stress vis-à-vis des agents polluants et comme réponse précoce et susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de santé des milieux marins.

Dans notre expérimentation, le modèle biologique utilisé à savoir la moule Africaine « *Perna perna* » comme espèce marine, nous nous sommes intéressés à étudier la catalase autant que réponse biologique suite à une exposition aiguë (*in vitro*) à différentes concentrations de plomb.

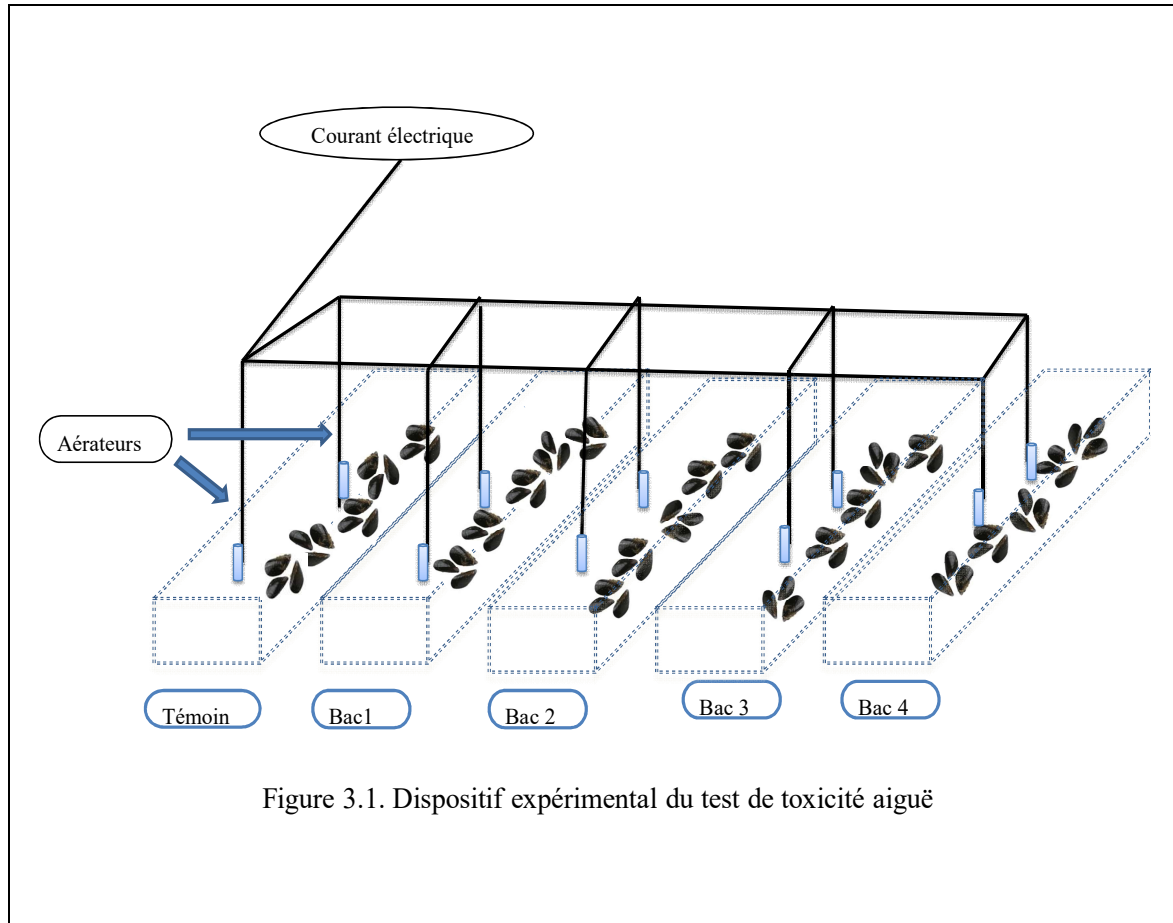
Les différentes expérimentations et les analyses physicochimiques ainsi que les analyses biochimiques ont été effectuées au laboratoire du CNRDPA de Bou-Ismaïl.

3.1 Démarche et dispositif expérimental : Figure 3.1

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

- Les moles ont été collectées à partir des moulières naturelles localisées au niveau de la zone côtière de la ville de Boumerdes.
- Le choix des moules est appartient à une même classe de taille de [45-55mm] dans le but de limiter toute variation servi à perturber les réponses biologiques liées aux différences individuelles.
- Les moules doivent couvrir à une phase d'adaptation (acclimatation) comme une période suffisante pour que les organismes s'adaptent aux conditions de laboratoire. Une période de deux semaines minimale après réception des organismes est nécessaire à l'adaptation de ces derniers à un nouvel environnement que constitue le dispositif expérimental.
- Un renouvellement quotidien de l'eau d'élevage est effectué pour assurer l'apport en nutriment pour chaque bac d'élevage.

- La mesure de la température, la salinité, le pH, l'oxygène dissous et la conductivité est assurée chaque jour durant tout le cycle expérimental avant et après les tests de contamination par le plomb.



N.B : La ferme conchylicole **EAM** (Élevage Aquacole Méditerranéen) représente le meilleur site qu'a été choisie pour le prélèvement d'eau de mer d'après leur bonne qualité physico-chimique et bactériologique et pour assurer le renouvellement quotidien de l'eau de mer pour mieux effectuer les tests de contamination. Ce site est suivi par le CNRDPA (Bou_Ismail) pour assurer la qualité physico-chimique et bactériologique de l'eau de mer pour l'élevage des moules (site de référence). Figure 3.2.

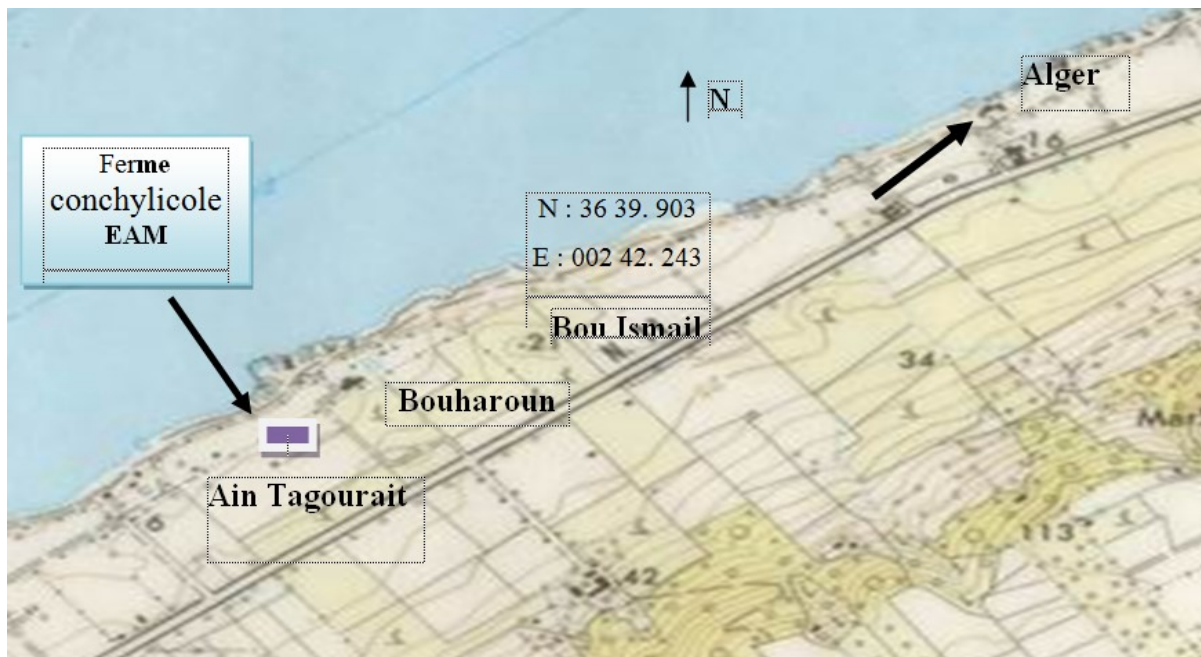


Figure 3.2. Représentation géographique du site EAM (Élevage Aquacole Méditerranéen).

3.2 Matériel

3.2.1 Le matériel biologique :

Le matériel utilisé est représenté par la moule Africaine *Perna perna* (Voir l'annexe C).

3.2.2 Le matériel non biologique :

Le matériel utilisé pour effectuer les analyses physico-chimiques et biochimiques est représenté dans l'annexe (B).

3.3 Méthodes

3.3.1 Echantillonnage

Notre étude a porté sur deux matrices :

- L'eau de mer pour l'étude physico-chimique.
- Les moules pour la mesure biochimique (catalase et protéines).

❖ Prélèvement d'eau de mer :

Les flacons utilisés pour prélever l'eau de mer sont des flacons en polyéthylène de 500 ml de volume en effectuant les analyses physico-chimiques chaque jour d'expérimentation.

❖ Prélèvement des moules :

Les prélèvements des moules ont été effectués au niveau du laboratoire de CNRDPA, où se déroule l'élevage de ces dernières à raison d'un prélèvement chaque trois jours. Un maximum de 15 individus par échantillon est soumis dans chaque bac. A partir de ce prélèvement, on prend un échantillon de 10 individus pour obtenir au moins 100g de la chair et de liquide intervalvaire.

3.4 Tests d'écotoxicité courtes durées

3.4.1 Tests de contamination par le plomb :

Les moules sont, après l'étape d'acclimatation, réparties en groupes de 15 individus pour chaque bac de test (20 litre de capacité). Quatre bacs en polystyrènes ont été utilisés pour exposer les moules à différentes concentrations de plomb pendant trois jours comme durée d'expérience. Par la suite, ces dernières sont maintenues dans des conditions environnementales identiques (Chaque concentration est testée à part). Chaque manipulation est automatiquement comparée à un bac témoin (0 mg.L⁻¹ polluant métallique). Les concentrations choisies de l'élément métallique (plomb) ont été testées en vue d'établir des relations doses-réponses entre la pression chimique représentée par le métal et les réponses biologiques observées.

Tableaux 3.1 Les concentrations de plomb des trois séries utilisées au cours du cycle de contamination.

Numéro de série	[Pb ²⁺] (µg.L ⁻¹)			
Série 01	50	100	150	200
Série 02	250	500	1000	2000
Série 03	3000	4000	6000	8000

Les moules sont recensées d'heure en heure et les mortes sont dénombrées et écartées. Ensuite les individus vivants sont prélevés pour le dosage de la catalase et les protéines dans leur chaire.

3.4.2 Tests de décontamination de plomb

Les concentrations choisies pour effectuer la série de décontamination par le plomb sont seulement 50 et 2000 µg.L⁻¹. Ces dernières sont avérées non létales pour les moules.

Par la suite d'un nouvel cycle de contamination, les moules sont prélevées et maintenues dans des bacs contenant de l'eau de mer sans polluant pendant 10 jours. Ainsi, et pendant le cycle de décontamination, les spécimens vivants sont enlevées chaque 2 à 3 jours pour la mesure de l'activité catalase au niveau de leur chaire.

3.4.3 Tests de contamination par le cuivre

Dans le but d'étudier l'effet du cuivre sur la réponse biologique (la catalase) et de le comparer avec celui du plomb, les moules sont exposées à deux concentrations : 100 et 200 µg.L⁻¹. Un bac est maintenu sans polluant et sert comme témoin.

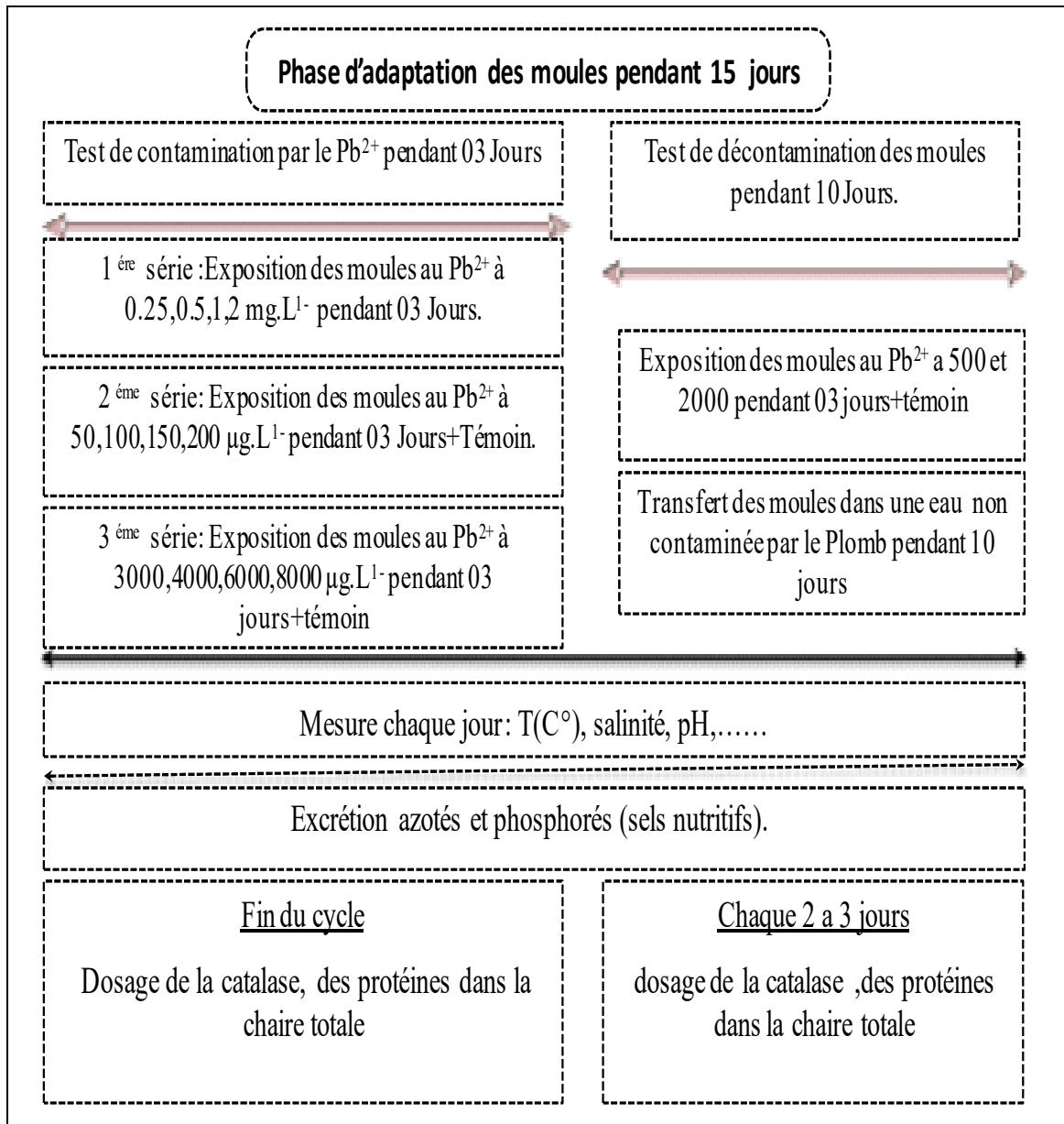


Figure 3.3: Planning expérimental de périodes d'étude (test de toxicité aiguë)

3.5 Suivi et mesure des paramètres au cours des cycles expérimentaux

3.5.1 Paramètres physicochimiques (Eau d'élevage)

La mesure quotidienne des paramètres physico-chimiques tels que la température, la salinité, le pH, l'oxygène dissous et la conductivité avant et après le changement d'eau d'élevage à été assurée à l'aide d'un multiparamètre de type YSI 556 (Annexe C).

3.5.2 Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée

Le dosage des sels nutritifs (nitrites, nitrates, azote ammoniacal et phosphore) a été effectué au laboratoire du CNRDPA selon des méthodes bien déterminées :(voire Annexe C)

- Dosage de l'azote ammoniacal (N-NH₄) : (Méthode de Koreleff, 1969)
- Dosage des nitrites (N-NO₂) : (réaction de Griess)
- Dosage des nitrates (N-NO₃) : (Méthode par réduction de cadmium)
- Dosage des phosphates (P-PO₃) : (Méthode de Murphy et Riley, (1962))

3.5.3 Dosages biochimiques : catalase et protéine

La chaire de 10 à 15 individus récupérée après dissection à servi aux dosages biochimiques. Les principales étapes de la préparation précédant ces analyses sont :

Préparation des échantillons

- les tissus de moules, obtenus après la dissection de 15 individus, sont broyés et homogénéisés dans la solution tampon tris à pH=7-8 ;
- l'homogénat obtenu est centrifugé à 10 000 tr/min pendant 25 à 30 min ;
- le surnageant récupéré est destiné pour le dosage enzymatique et le dosage des protéines ;

Analyses biochimiques

- détermination de la concentration totale des protéines dans le surnageant selon la méthode de Lowry [43].
- Détermination de l'activité catalase du surnageant par la méthode cinétique [33].

1 Dosages des protéines:

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 plus adéquate est celle de Lowry.

Mode opératoire :

- 1) Dans des tubes à essais, les prises d'échantillons (surnageant) sont diluées et complétées à 1ml avec l'eau distillée ;
- 2) 5ml de réactif Lowry sont ajoutés à chaque tube. On homogénéise et on attend 10 min ;
- 3) Par la suite, 0,5ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué extemporanément est additionné au mélange (il est important d'agiter juste après l'addition de ce dernier) ;
- 4) L'ensemble est mis au repos à l'obscurité au moins 30 min. Ainsi la lecture de l'absorbance est faite à 660 nm.

2 Dosage de la catalase (CAT): Figure 3.4.

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 (H_2O_2) disparue par unité de temps.

Mode opératoire :

- 1) 2,5ml du substrat (solution de H_2O_2 à 30% dans un tampon phosphate à pH=7) sont placés dans une cuvette du spectrophotomètre déjà réglé sur le mode cinétique ;
- 2) 50 μ l de surnageant (source d'enzyme) sont ajoutés au mélange, ainsi on d'éclanche le mode cinétique du spectrophotomètre et on suit la décomposition de peroxyde d'hydrogène dans un intervalle de temps de 60s ;
- 3) la courbe $\Delta A=f(t)$ affiche la variation de l'absorbance en fonction du temps.

D'où : ΔA : Différence des absorbances.

N.B : L'activité CAT a été calculée en mode cinétique en appuyant sur la différence de l'absorbance à 280 nm par unité de temps.

La mesure de l'activité catalase est déterminée selon l'équation représentée ci-dessous.

$$\text{Activité de CAT} = (DA/\text{min} \cdot 10^3) / (43.6 \cdot \text{mg de protéine}) : \text{en U/mg de protéine}$$

DA : Différence d'absorption de H_2O_2 .

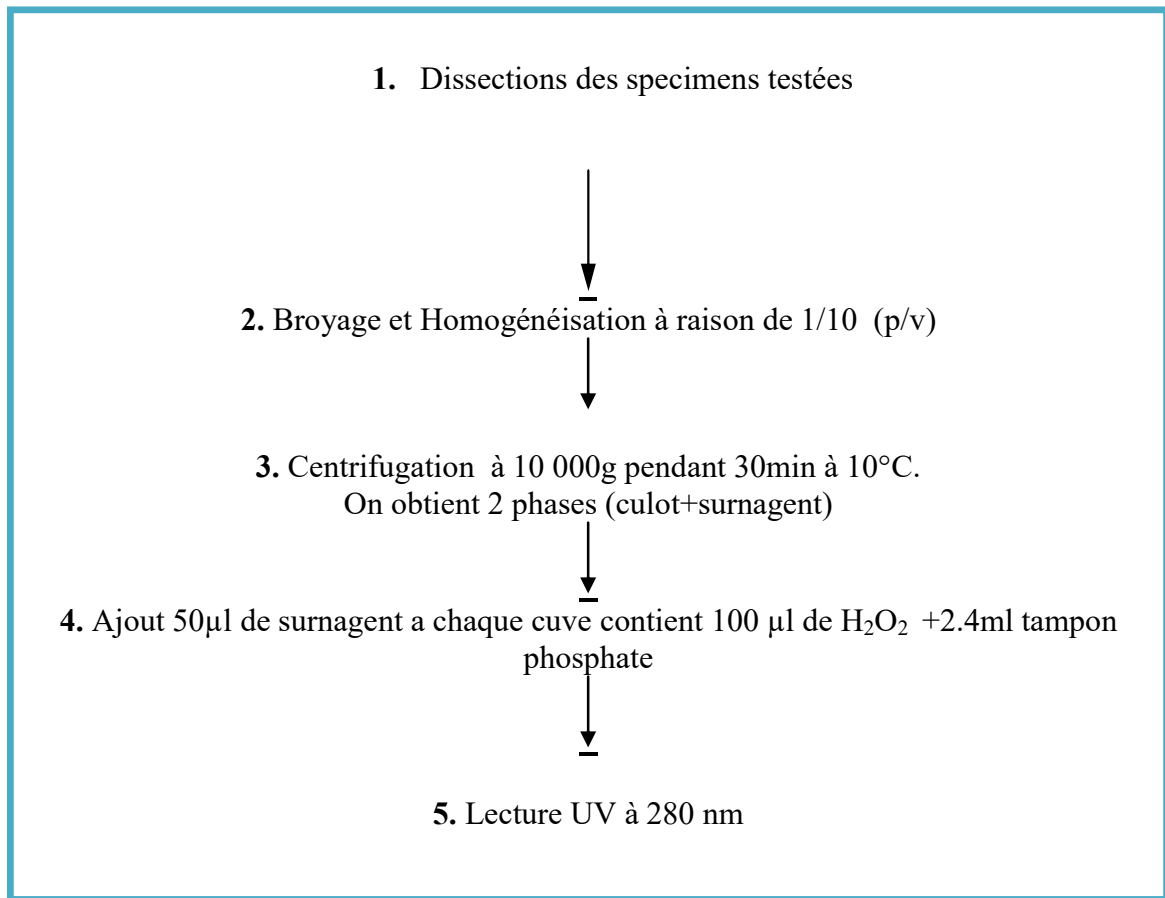


Figure 3.4: Protocole de dosage biochimique de la catalase

CHAPITRE 4 : **RESULTATS ET DISCUSSION**

La mesure de l'impact de la pollution marine causée par les métaux traces peut se faire aux moyens des analyses des biomarqueurs face aux contaminants dans les organismes indicateurs de pollution. Dans notre travail, nous avons mesuré le potentiel toxique du plomb choisie comme contaminant type qu'on le retrouve dans le milieu marin sur la moule *Perna perna*.

Les résultats obtenus, nous ont permis d'étudier la cinétique de la réponse biologique catalase face au stress oxydant provoqué par le plomb.

Ce chapitre, présente essentiellement des résultats expérimentaux des analyses biochimiques (catalase et protéine) obtenus chez la moule *Perna perna*.

Ainsi, la mesure des paramètres physico-chimiques d'eau d'élevage à pour but de suivi durant tout le cycle expérimental l'apport en sels nutritifs d'eau d'élevage afin de mesure l'excrétion azotée et phosphorées au cours des tests d'écotoxicité aiguë par le plomb.

4.1 Résultats des analyses physico-chimiques de l'eau d'élevage

Les résultats des analyses des paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage sont regroupés dans l'annexe (A).

En ce qui concerne la qualité bactériologique, il a été remarqué l'absence totale des germes témoins d'une contamination fécale au niveau de l'eau d'élevage prélevée à partir d'un site de référence (Ain-Tagourait). Ce site avait des contrôles physico-chimiques et bactériologiques mensuelle suivi par le CNRDPA (Bou-Ismaïl). Le bon état bactériologique des moules semble à éliminer tout facteur pathogénique pouvant induire un stress ou des maladies.

Les résultats obtenus sur la qualité bactériologique des moules traduisent la bonne qualité de cette dernière prise comme source d'approvisionnement dans le cas de nos tests d'écotoxicité aiguë. Comme conclusion les moules seront soumises à l'unique stress exercé par l'exposition à l'agent métallique (Pb^{2+}).

Nous avons sélectionnées des concentrations qui sont généralement réalistes par rapport à celles qui peuvent être rencontrées dans le milieu naturel pollué.

Deuze (12) concentrations ont été choisies pour effectuer les tests d'écotoxicité aiguë par le plomb, deux espèces seulement ont été enregistrés mortes sous l'effet de la concentration 8 mg.L⁻¹, ainsi aucun effet létale a été enregistré pour les autres concentrations (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 et 4 mg.L⁻¹) (Tableau 4.1).

Tableau 4.1 : Effet mortel des différentes concentrations du plomb sur les individus testés.

[Pb ²⁺] (mg.L ⁻¹)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.5	1	2	3	4	6	8
Nbr de mortalités	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

4.1.1 Résultats des paramètres physiques

Il est connu que les différentes activités biologiques (croissance, activités métabolique, bioaccumulation et détoxification des polluants chimiques, réponses enzymatiques des biomarqueurs...), mesurées chez les mollusques bivalves sont étroitement influencées par les facteurs abiotiques du milieu environnant [19, 44, 45, 46].

➤ Température :

La figure 4.1 montre la variation de la différence de température dans les trois séries de contamination par le plomb au cours des cycles expérimentaux.

A partir des résultats obtenus (Annexe A), nous remarquons que les variations des températures dans les différentes séries de contamination par le plomb sont presque identiques avec une variation maximale de l'ordre de 0.58 ± 0.04 °C, ainsi que les valeurs mesurées de la température sont dans la limite des valeurs témoins. De ce fait, ces dernières ne présentent pas un stress naturel pouvant perturber le métabolisme et l'activité physiologique des spécimens testés.

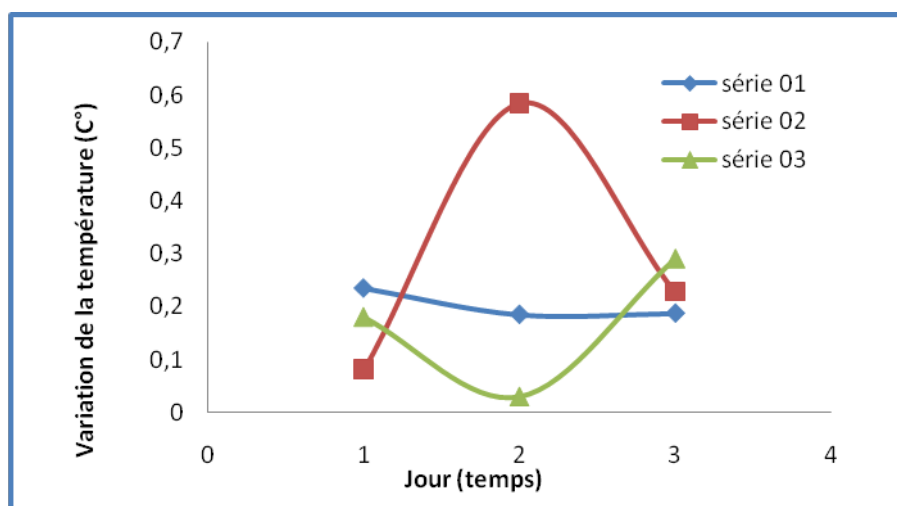


Figure 4.1 : Variation de la différence de température au cours des cycles expérimentaux.

Selon Amiard et al. [29], la variation de la température joue également un rôle important sur les activités des enzymes digestives des invertébrés. L'observation chez un copépode (*Calanus sinicus*) montre une corrélation négative entre les degrés d'activités protéase ou amylase et la température. Par ailleurs, les activités amylase des bivalves ont montré la variation en fonction de la saison.

Quel que soit le biomarqueurs considéré, il apparait clairement qu'indépendamment de tout effet de contamination, des facteurs intrinsèques comme l'âge ou l'état reproducteurs environnementaux tels que la température ou le niveau d'oxygénation influencent les réponses de ces biomarqueurs [29].

Cependant, l'excrétion des composés azotés est fortement influencées par les facteurs abiotiques plus particulièrement la température [55].

De même, Il a été démontré que les conditions de milieu modifient l'efficacité des processus biologiques responsables de la bioaccumulation, en particulier la température qui intervient directement sur la cinétique des processus biologiques [2, 47].

➤ Salinité

La figure 4.2 montre la variation de la différence de salinité dans les trois séries de contamination par le plomb.

Nous avons remarqué que la salinité était stable durant le cycle expérimental pour l'ensemble des séries. Aussi, aucune différence n'est observée chez les groupes témoins et ceux contaminés. Ainsi, les valeurs de ces derniers sont comprises entre 37.02‰ et 38.34‰.

La salinité relevée dans les séries de contamination n'a aucun effet sur les réponses biologiques des moules traduites par le biomarqueur. De plus la catalase est peu sensible à la salinité [2].

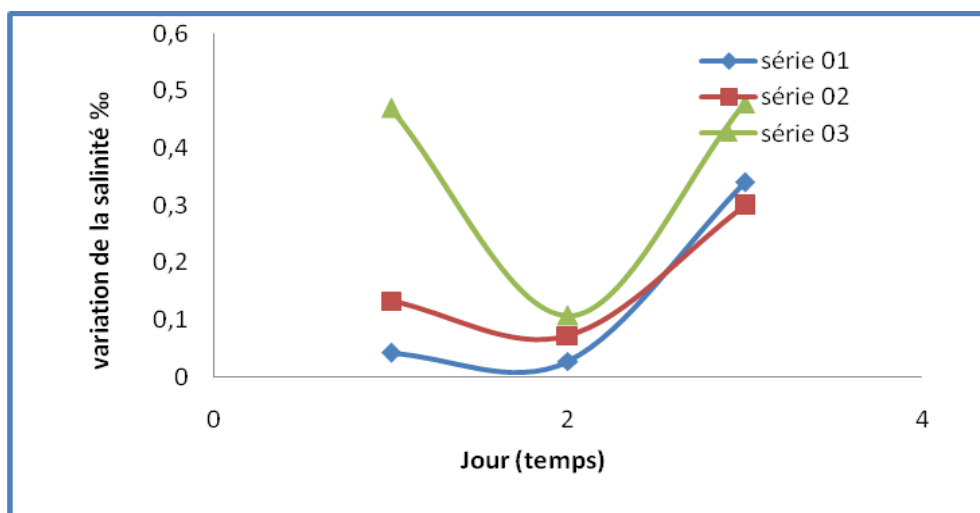


Figure 4.2 : Variation de la différence de salinité au cours des cycles expérimentaux.

De ce fait, la salinité ne peut constituer un paramètre d'interférence des activités métaboliques des espèces indicatrices. Plusieurs auteurs se concordent sur l'importance de la salinité, leurs résultats montrent son influence autant que facteur abiotique sur l'activité métabolique et surtout des réponses enzymatiques, Ainsi, Paital et Chainy [48] dans leurs travaux, ont

Observé une augmentation des teneurs d'ammonium excrétées chez le crabe *Scylla serrata* proportionnelle à l'élévation de la salinité [19, 49, 50].

➤ Oxygène dissous

La figure 4.3 montre la variation de la différence de l'oxygène dissous dans les trois séries de contamination par le plomb.

Les courbes de variations de l'oxygène dissous présentent la même allure pour les trois séries. La valeur 0.43 mg.L^{-1} est la variation maximale mesurée pendant la période d'essai.

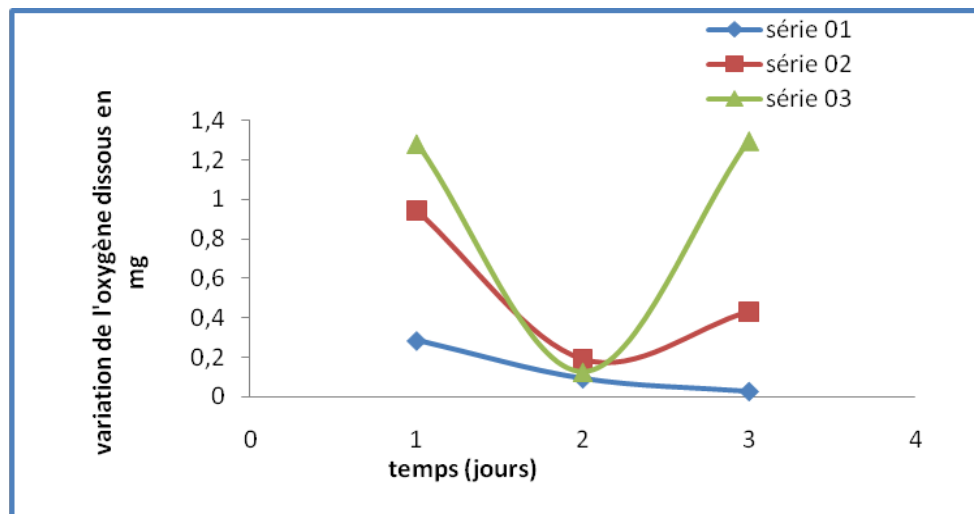


Figure 4.3 : Variation de la différence de l'oxygène dissous au cours des cycles expérimentaux.

Dellali et al [49], ont signalé qu'une diminution de la teneur en oxygène est à l'origine d'une augmentation de l'activité de la catalase chez la moule de la lagune de Bizerte (Tunisie).

➤ pH :

La figure 4.4 montre la variation de la différence de pH au niveau des trois séries de contamination par le plomb au cours des cycles expérimentaux.

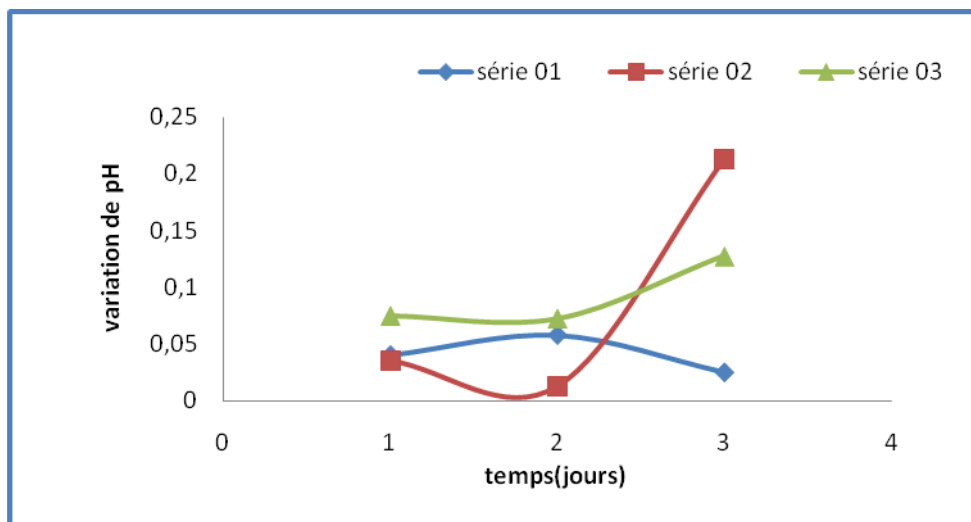


Figure 4. 4 : Variation de la différence de pH au cours des cycles expérimentaux.

La variation du pH peut constituer un indice de pollution. Cependant, aucune variation de pH n'a été obtenue pour l'ensemble des séries d'expositions. Des valeurs similaires entre 6,4 jusqu'à 7,17 peu remarquables et une variation maximale est de l'ordre 0.21 ± 0.009 .

Le pH et la température sont des paramètres qui ont une grande influence sur la toxicité des éléments métalliques en milieu aquatique [51]. En effet, le taux de digestion et la quantité d'enzymes produites dépendent en général très fortement de ces deux paramètres [52].

4.1.2 Résultats des sels nutritifs

Les résultats relatifs aux mesures des sels nutritifs (phosphore, azote ammoniacal, nitrites et nitrates) pour les trois séries de contaminations par le plomb sont illustrés par les figures (4.5 ; 4.6 ; 4.7 ; 4.8) ci-après.

4.1.2.1 Etude de l'effet du plomb sur l'excrétion Azotée et Phosphorée

De nombreuses études ont montré un lien entre la difficulté des organismes à maintenir un comportement normal en milieu pollué et différents aspects du métabolisme énergétique [29, 53].

❖ L'excrétion Azotée

De nombreux stress (physiques et/ou chimiques) peuvent entraîner la mobilisation des réserves énergétiques [29].

▪ Nitrites : Figure 4.5 :

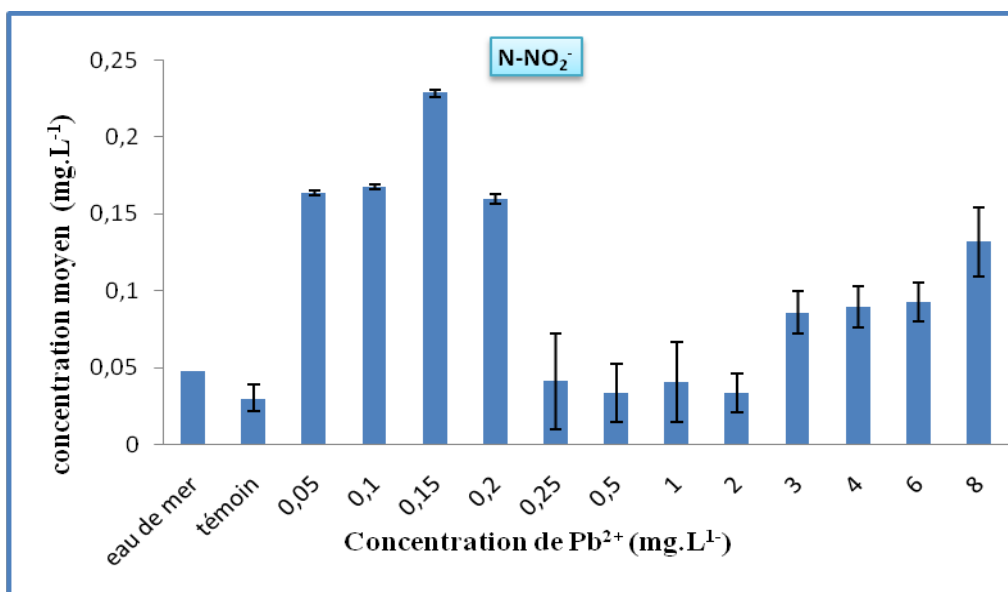


Figure 4.5: Étude de l’effet du plomb sur les teneurs en nitrites.

Les valeurs obtenues montrent qu’il y a une perturbation des teneurs en nitrites en fonction de la concentration de plomb. Un maximum de $0,22 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ est observé sous l’effet de la concentration $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$. Les concentrations $0,05$, $0,1$ et $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ induisaient une augmentation de l’activité métabolique traduites par l’augmentation des teneurs en nitrites. Cependant, une évolution quasi identique et une légère augmentation des nitrites par rapport au témoin pour les concentrations 3 , 4 , 6 , et 8 mg.L^{-1} . Par ailleurs, des négligeables variations ont été relevées pour les concentrations $0,25$, $0,5$, 1 et 2 sur les teneurs en nitrites et qui sont trouvées identiques à celle mesurée dans le bac témoin (T) (figure 4.5).

▪ Nitrates : Figure 4.6:

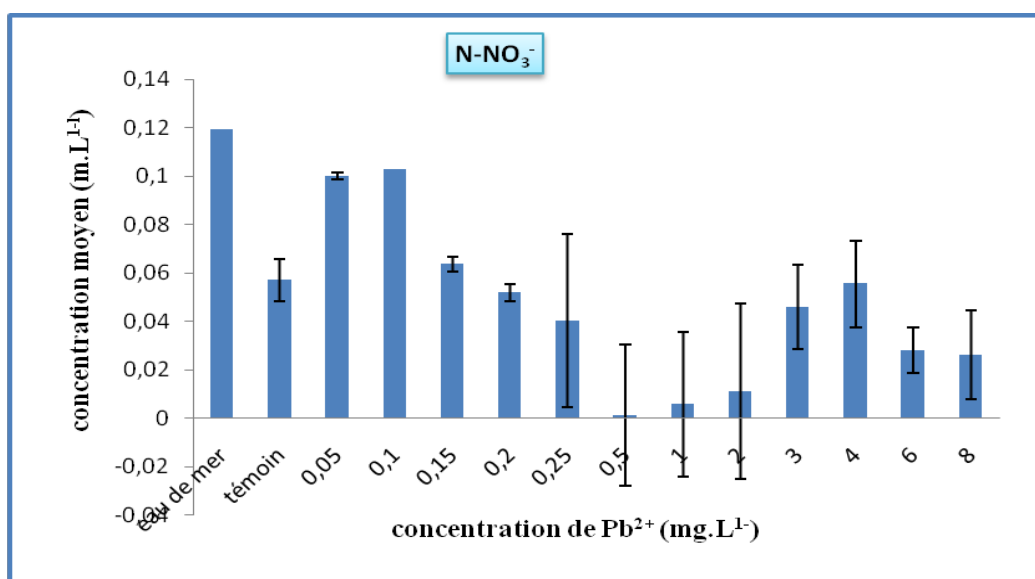


Figure 4.6: Étude de l’effet de plomb sur les teneurs en nitrates.

Les concentrations 0,05 et 0,1 mg.L⁻¹ du Pb²⁺ conduisent à des valeurs maximales des teneurs en nitrates respectivement 0,1±0,03 et 0,1±0,02 mg.L⁻¹. Alors que pour les concentrations 0,15, 0,2, 0,25, 3 et 4 mg.L⁻¹ n'ont produit aucun effet sur l'activité métabolique des moules et les teneurs mesurées en nitrates étaient très proches de celles relevées dans les bacs témoins. Ainsi, et sous l'effet des concentrations 1, 2, 6 et 8 mg.L⁻¹, les mesures relevées des teneurs inférieures au témoin avec une absence totale de ces dernières sous l'effet de la concentration 0,5 mg.L⁻¹ de plomb (figure 4.6).

▪ Azote ammoniacal : Figure 4.7:

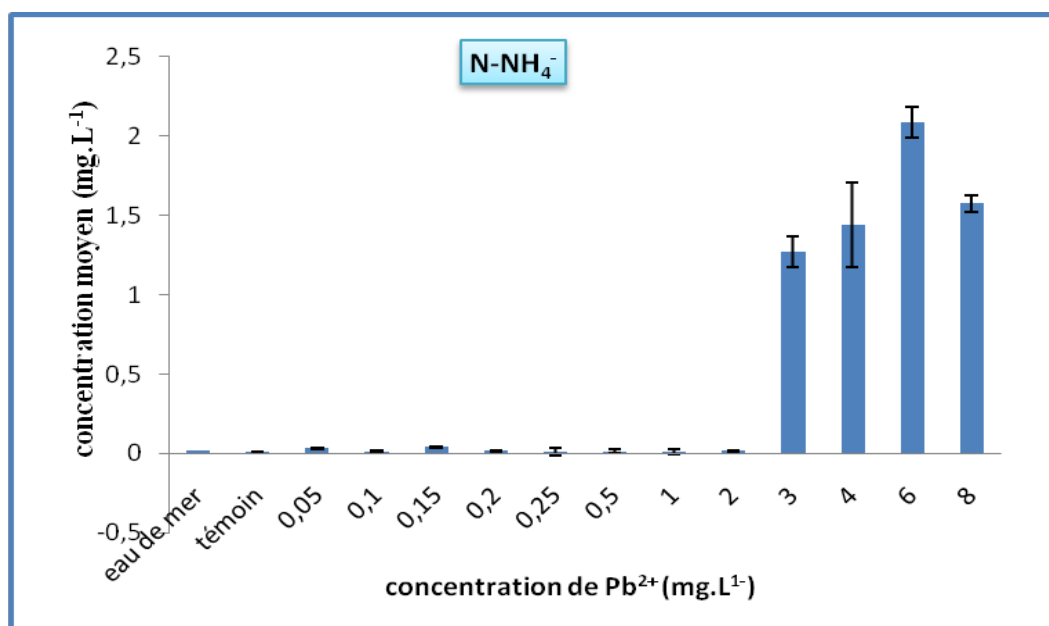


Figure 4.7: Étude de l'effet du plomb sur les teneurs en azote ammoniacal.

Une forte excrétion d'azote ammoniacal est mesurée sous l'effet des concentrations 3, 4, 6 et 8 mg.L⁻¹ du plomb (figure 4.7), la cinétique était toujours croissante en atteignant un maximum de 2,085 mg.L⁻¹ au 3^{ème} jour d'exposition par la concentration 6 mg.L⁻¹. Sous l'effet des concentrations inférieures à 3 mg.L⁻¹ (0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5, 1, 2 mg.L⁻¹) la cinétique était négligeable (identique de témoin).

L'azote ammoniacal est à l'origine de l'excrétion azotée protéique ou des acides aminés au tend que réserve énergétique protéique. Ainsi, l'interprétation des résultats du plomb comme polluant employé semble d'être difficilement discutables à cause de l'oxydation de l'ammoniac et des composés organiques azotés en nitrates par actions des bactéries telles que *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*. L'ammoniaque est oxydée et transformée en deux étapes : en nitrite (NO₂⁻) par *Nitrosomonas*, puis en nitrate (NO₃⁻) par *Nitrobacter* [54].

Comme le montre les figures (4.5, 4.6 et 4.7), l'excrétion des composés azotés présente une variation remarquable qui se traduit par une forte activité métabolique dans les bacs à *Perna perna*. De plus, l'effet de chaque concentration du plomb sur l'activité métabolique est

Difficilement distinctif. Ce changement du métabolisme est interprété comme la nécessité de trouver de l'énergie supplémentaire à partir des sources anaérobies pour faire face au stress toxique [29].

Selon Novas et al [57], ont signalé des fortes productions des composés azotés en été qu'en hiver sous l'effet d'exposition des moules *Mytilus galloprovincialis* aux composés organiques de type HAP.

Nonobstant, les teneurs obtenues lors du dosage des composés azotés dans les bacs témoins sont les résultats directs de l'activité métabolique des moules.

❖ L'excrétion phosphorée :

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 4.8.

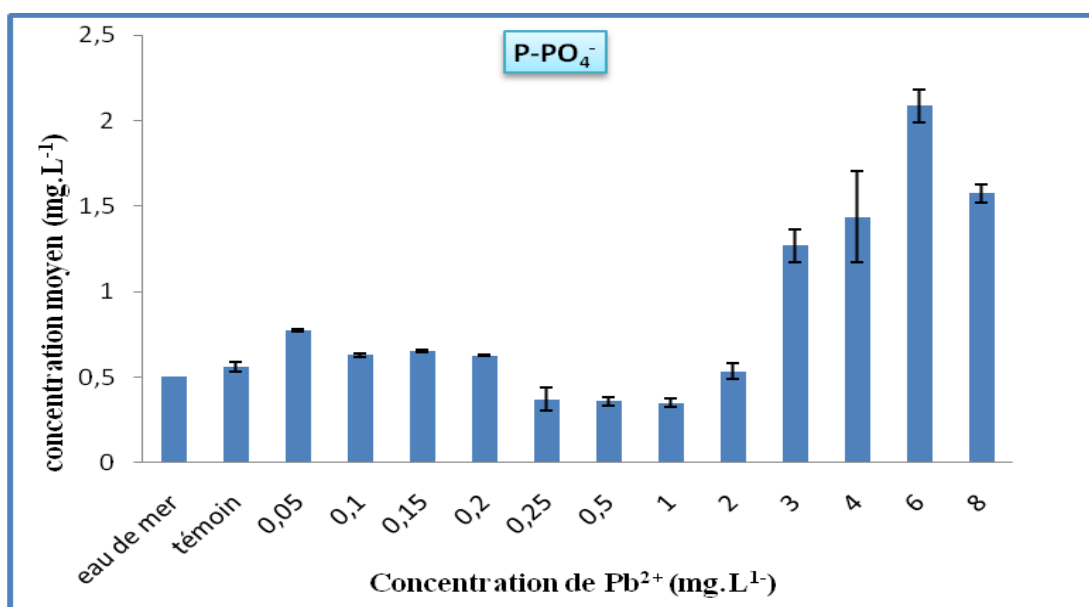


Figure 4.8 : Étude de l'effet du plomb sur les teneurs en phosphore.

Les teneurs en phosphore enregistrées dans les bacs contaminés par le plomb sont aussi proches à celles mesurées dans les bacs témoins (0,05 ,0,1 ,0,15 ,0,2 ,0,25 ,0,5 ,1 ,2 mg.L⁻¹). Les concentrations 3, 4, 6, 8 mg.L⁻¹ du plomb conduisent à des teneurs maximales de l'ordre 1,27, 1,43, 2,08, 1,57 mg.L⁻¹ respectivement après les trois jours d'exposition.

La cinétique d'excrétion phosphorée était observable qu'après le 3^{ème} jour pour dire que les individus stressés par les fortes concentrations 3, 4, 6 et 8 mg.L⁻¹ excrètent plus de phosphore que les concentrations inférieures à 3 mg.L⁻¹ par rapport aussi aux individus témoins.

Le suivi de l'excrétion phosphorée s'avère donc très intéressant, du point de vue cinétique de réponse et le manque de données sur les facteurs influençant cet élément nous empêche de le

choisir comme facteur de diagnostic dans l'approche biologique. Malgré ce manque de recherche et de connaissance sur l'excrétion phosphorée des moules, il est fort probable que les facteurs stimulants cette excrétion soient les même que ceux influençant l'excrétion azotée [57].

- Moyennes des excrétions phosphorées et des composés azotés : Figure 4.9:

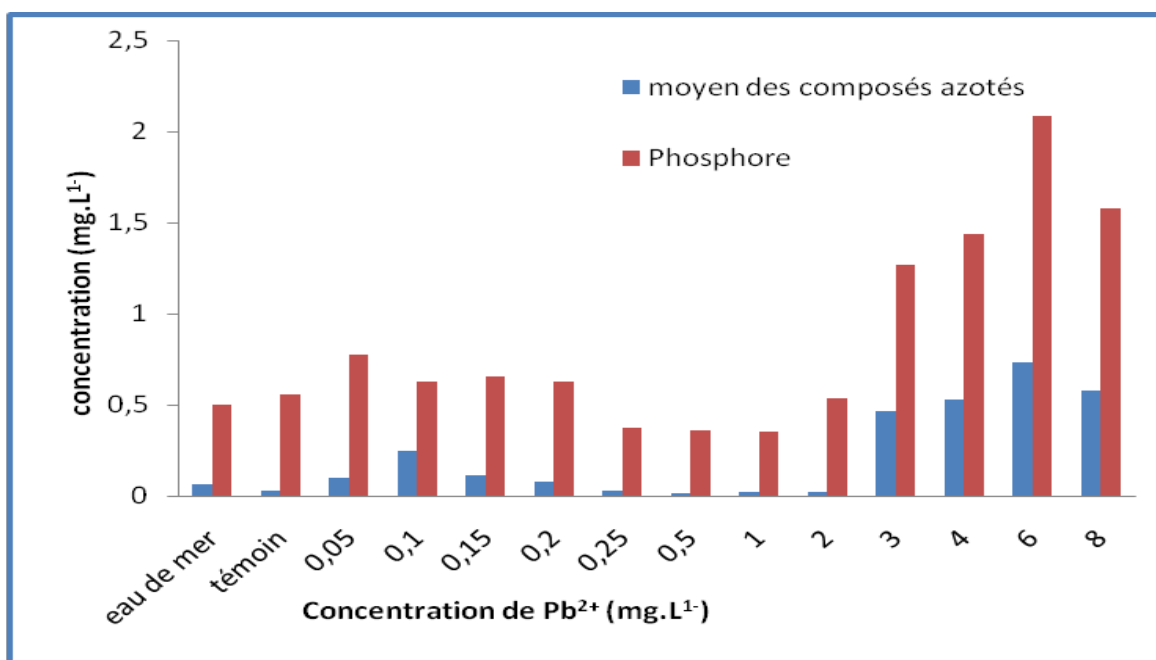


Figure 4.9 : Étude de l'effet du plomb sur les teneurs moyennes des excrétions phosphorées et des composés azotés.

Selon les résultats obtenus dans notre expérimentation (Figure 4.9), les différentes mesures effectuées dans chaque test ont montré que l'excrétion azotée est très faible par rapport à l'excrétion phosphorée. Les moyennes des composés azotés restent quasi identiques au témoin jusqu'à la concentration 3 mg.L⁻¹. Cependant, l'excrétion azotée semble être induite pour les concentrations supérieures à 3 mg.L⁻¹. De même, les teneurs en phosphore sont élevées pour les fortes concentrations (3, 4, 6, 8) mg.L⁻¹ et se rapprochent des teneurs témoins lorsque les concentrations sont inférieures à 3 mg.L⁻¹.

4.2 Résultats des paramètres biochimiques et enzymatiques

L'objectif des tests aigus était d'étudier la cinétique de la réponse biologique catalase chez la moule Africaine «*Perna perna*» exposée à différentes concentrations du plomb. De même, l'assurance des conditions expérimentales optimales (à savoir : la qualité physique et chimique d'eau d'élevage : Température, pH, oxygène dissous, les sels nutritifs...) était toujours l'étape cruciale avant d'entamer les différents tests de contamination.

4.2.1 Résultats des dosages des protéines

Il est à noter que la discussion des valeurs des réserves énergétiques est faite en tenant compte des différentes valeurs mesurées chez les groupes témoins de différents tests de contamination.

L'ensemble des résultats relatifs aux dosages des protéines aux niveaux de la chair des moules sont représentés dans la figure 4.10.

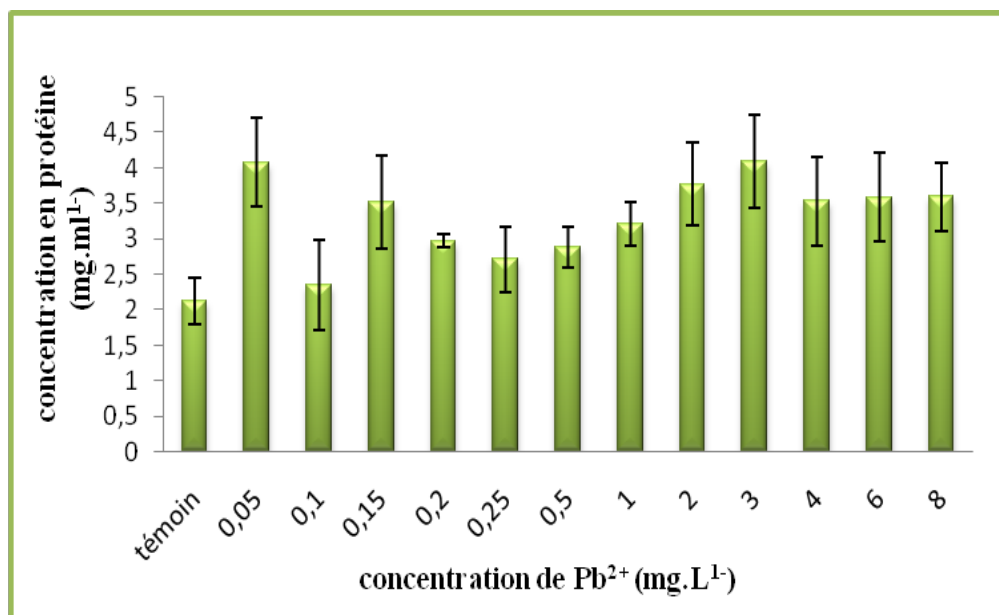


Figure 4.10 : Étude de l'effet du plomb sur les teneurs en protéines dans la chair des moules.

D'après la figure 4.10, l'effet d'exposition des moules au plomb sur les réserves énergétiques relève une augmentation des teneurs en protéines est produite suite à l'exposition aux concentrations 0,05, 0,15, 2 et 3 mg.L⁻¹. Des valeurs constantes pour des concentrations 0,2, 0,25, 0,5 et 1 mg.L⁻¹ et pour la concentration 0,1 mg.L⁻¹ n'a révélé aucun changement par rapport au témoin. Cependant, les organismes exposés aux concentrations 4, 6 et 8 mg.L⁻¹ sont stabilisées à une même valeur dans leurs teneurs en protéines qui est supérieure à celles mesurées chez les spécimens témoins.

Une réponse cellulaire à une contamination métallique peut également se traduire par une augmentation de la quantité d'une protéine donnée [20]. Les protéines ou les HSP (heat-shock proteine) ou protéines de choc thermique, sont maintenant appelées protéines de stress car on sait qu'elles sont surexprimées en réponse à un certain nombre des facteurs physiques et chimiques comme l'anoxie, le stress halin, les métaux, les xénobiotiques et le stress oxydant d'une façon générale [29].

Comme nous le verrons, à ce niveau il est extrêmement difficile de travailler sur un modèle biologique complexe, puisque le stress métallique induit plusieurs réponses complémentaires

ou opposées et il est alors impossible d'isoler l'effet d'un seul gène ou d'une seule protéine [20].

De nombreux stress physiques et/ou chimiques peuvent entraîner la mobilisation des réserves énergétiques quel que soit par un catabolisme ou anabolisme. Dans le cas de stress sévères, les protéines peuvent être mobilisées [29].

En conclusion des tests d'écotoxicité de la présente étude, les réserves protéiques étaient variées d'une façon plus au moins importante selon les concentrations testées. Cependant, pour connaître l'effet du plomb 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.

4.2.2 Résultats de biomarqueur «CAT»

Les analyses chimiques de la bioaccumulation et la mesure de biomarqueurs permettent 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 [44, 57].

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) chez le moule *Perna perna* exposée à différentes concentrations du plomb sont représentés dans la figure 4.11 ci-dessous.

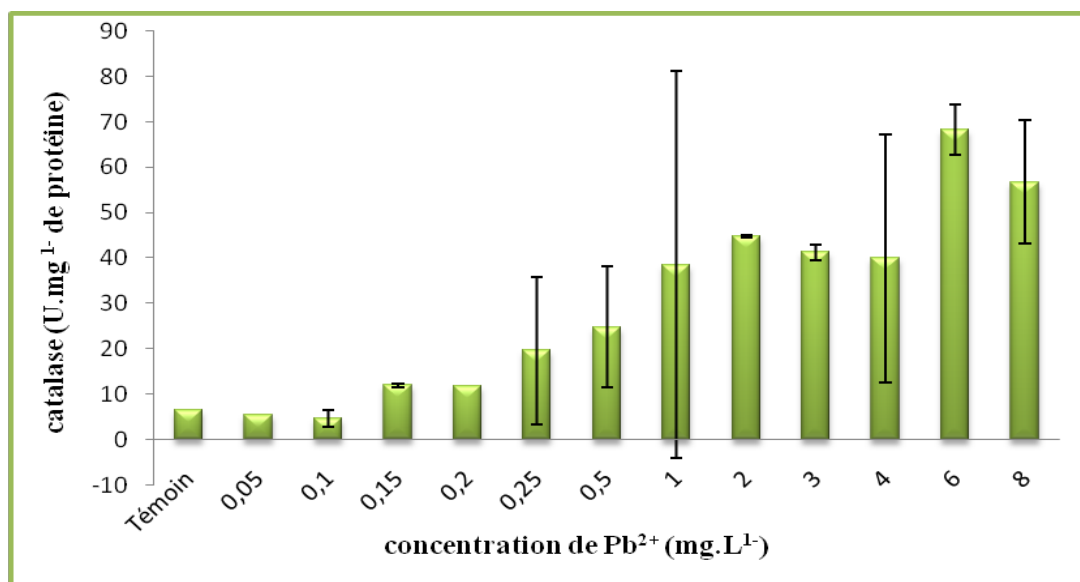


Figure 4.11 : Variation de l'activité enzymatique catalase en fonction des différentes concentrations du plomb dans la chair des moules

Les réponses enzymatiques des moules présentées dans la figure 4.11 varient en fonction de la concentration du plomb employée comme un facteur stressant. En général, une augmentation de l'activité catalase est observée chez les individus testés pour les trois séries de contamination.

Les organismes exposés aux concentrations 0.05 et 0.1 mg.L⁻¹ ont montré une activité catalase semblable à celle des organismes témoins. Il semble que ces deux concentrations n'aient pas d'effet sur l'activité enzymatique des spécimens. Cependant, sous l'effet des concentrations 0.15 et 0.2 mg.L⁻¹, une légère augmentation de la réponse enzymatique s'est produite chez les moules contaminées par rapport au témoin. À partir de la concentration 0.25 mg.L⁻¹, des réponses enzymatiques nettes étaient obtenues et elles sont clairement supérieures à celle des témoins pour toutes les concentrations testées allant de 0.5 jusqu'à 2 mg.L⁻¹. Sous l'effet des concentrations 3 et 4 mg.L⁻¹, les activités catalase sont très proches entre elles et stables. À ce stade, nous avons remarqué toujours que la plus forte activité catalase est mesurée sous l'effet des plus fortes concentrations 6 et 8 mg.L⁻¹. L'activité catalase minimale était de l'ordre de 4.72 U.mg⁻¹ protéine qui correspond à la concentration 0.1 mg.L⁻¹ et l'activité maximale était de l'ordre de 68.18 U.mg⁻¹ protéine qui correspond à la concentration 6 mg.L⁻¹.

L'étude de l'activité catalase, dans les chairs des moules, montre que cette dernière est accélérée par le xénobiotique (Pb²⁺) présent dans le milieu, et cela en fonction du temps d'exposition et de la concentration bioaccumulée du polluant [19, 59].

En milieu aquatique, de nombreuses études ont montré que les systèmes de défenses antioxydants sont des biomarqueurs capables de révéler précocement les effets des xénobiotiques exerçant leur toxicité *via* un stress oxydant [59].

Vu les caractéristiques et la sensibilité de réponse de l'enzyme catalase, une forte pertinence cinétique est donc conférée à cette dernière. Considérant la facilité du dosage de l'enzyme, plusieurs auteurs qualifient la catalase comme biomarqueur sensible, pratique et meilleur que la SOD, révélant des effets biologiques dans le statut redox des organismes marins [60].

Guluzar et al [20], dans leur étude et dans un objectif d'étudier les réponses adaptatives de bivalves soumis à une contamination métallique, ont observé une stimulation de l'activité CAT sous l'effet du cadmium (Cd²⁺) à différentes concentrations. Ainsi l'intérêt majeur de la catalase en tant que biomarqueur réside dans le caractère aspécifique de sa réponse, ce qui constitue un avantage dans le contexte de la contamination multiple des écosystèmes aquatiques [58].

Dans un cadre d'étude de niveau de pollution par les métaux traces (Cu, Pb, Ag, Cd...) *in situ* sur le poisson d'eau douce *Télapia*, une induction de l'activité catalase a relevé proportionnellement avec la concentration utilisée du plomb (Pb²⁺). Ce dernier causait le plus grand stress conduisant à une valeur maximale de 129.33 U.mg⁻¹ de Protéine [19].

Selon Amiard et al [29], les biomarqueurs de défense permettent aux organismes aquatiques de faire face à la présence de différentes classes de contaminants chimiques dans leurs milieux dans le but de permettre aux spécimens d'exercer leurs différentes activités physiologiques de base (nutrition, respiration) et de limiter la pénétration des xénobiotiques dans l'organisme en minimisant ainsi l'atteinte des organes cibles.

Un autre facteur influençant la réponse biologique est la spéciation du plomb. Cette induction de l'activité enzymatique n'était pas assez suffisante vue les fortes concentrations du plomb employées pour effectuées l'ensemble des séries de toxicité aiguë. Cependant, la complexation du métal joue également un rôle dans la détermination de la spéciation des espèces chimiques et dans ce cas le phénomène de complexation, est impliqué dans la consommation des ions métalliques libres par les complexants de l'eau de mer minéraux (HCO_3^- , CO_3^{2-} , OH^- ...) ou organique et induisant ainsi une diminution de la fraction biodisponible du métal d'où une diminution de la toxicité du xénobiotique vis-à-vis des spécimens contaminés. Sachant que les autres formes complexées sont moins toxiques et les complexes majoritaires sont : PbCO_3 , PbCl_2 , PbCl^+ (Tableau 4.2) [15].

Tableau 4.2 : Les espèces chimiques du plomb les plus probablement présent dans l'eau de mer [15].

Espèces	PbCO_3 (a)	PbCl_2 (b)	PbCl^+ (c)
%Espèces	80	42	19

(a): ZIRINO et YAMAOTO(1972) [15]

(b) et (c) DYRSSEN et WEDBORG(1975) [15]

Cependant, En conclusion, afin de mieux comprendre les facteurs influençant le fonctionnement de la catalase, il est recommandé d'étudier la spéciation des métaux dans le but de mettre en évidence la concentration biodisponible altérant les organismes contaminés, et la détermination du degré de contamination des écosystèmes. En effet, la spéciation joue un rôle fondamental dans les interactions entre les ions métalliques et les organismes vivants. De même, plusieurs recherches expérimentales ont montré que les organismes aquatiques sont essentiellement affectés par les concentrations des ions métalliques libres en solution [63].

4.2.3 Résultats de cycle de décontamination

Les résultats des teneurs en protéines et en catalase dans le cycle de décontamination étaient influencées par l'exposition au plomb par les deux concentrations 0.5 et 2 mg.L^{-1}

❖ Catalase dans la période de décontamination : Figure 4.12

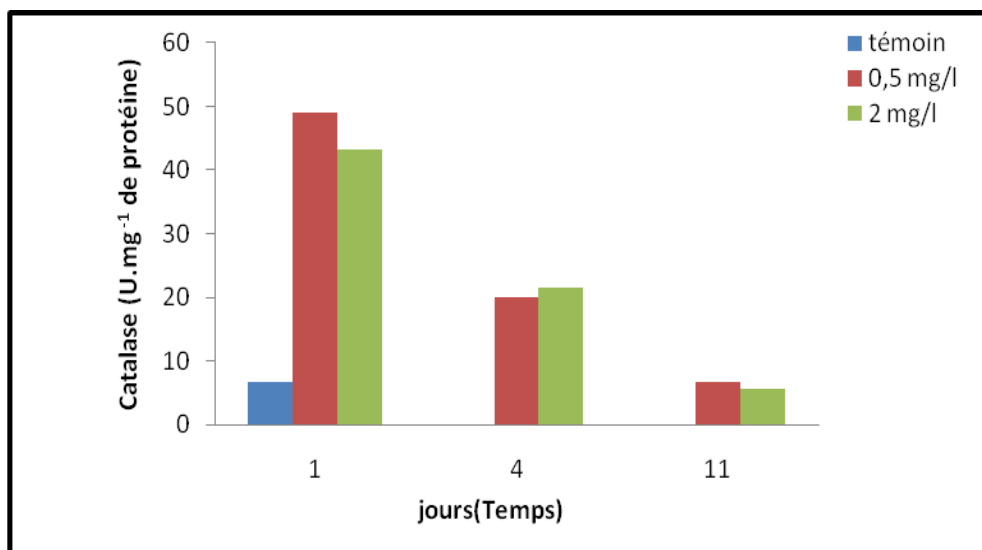


Figure 4.12: Variation de l'activité enzymatique catalase en fonction des teneurs en plomb (0.5 et 2 mg.L⁻¹) au cours du cycle de décontamination.

D'après la figure 4.12, les activités se situèrent juste après le premier jour de décontamination à des valeurs supérieures au témoin (6,60 U.mg⁻¹ protéine). Une valeur de 49.10 U.mg⁻¹ Protéine pour la concentration 0.5 mg.L⁻¹ et 43.20 U.mg⁻¹ protéine pour la concentration 2 mg.L⁻¹.

Durant le cycle de décontamination, l'activité catalase était toujours en diminution et aucune augmentation d'activité n'a été relevée chez spécimens testés à partir de quatrième jours de décontamination.

Ainsi, il existe une relation directe entre le niveau de la pollution et le degré de stimulation de l'enzyme antioxydante catalase. Par ailleurs, la baisse d'induction de l'activité catalase peut être considérée comme signe de réversibilité de l'état de santé des spécimens [44, 60].

Les mêmes observations ont été rapportées par Company et *al.* [61] après un cycle de dépuration des moules de l'espèce *Bathymodiolus azoricus* pendant 6 jours suite à une exposition de 24 jours au cuivre (25µg.L⁻¹). En effet, les activités de catalase relevés étaient inférieures à celles obtenus en phase de contamination [19].

❖ Protéine dans la période de décontamination : Figure 4.13

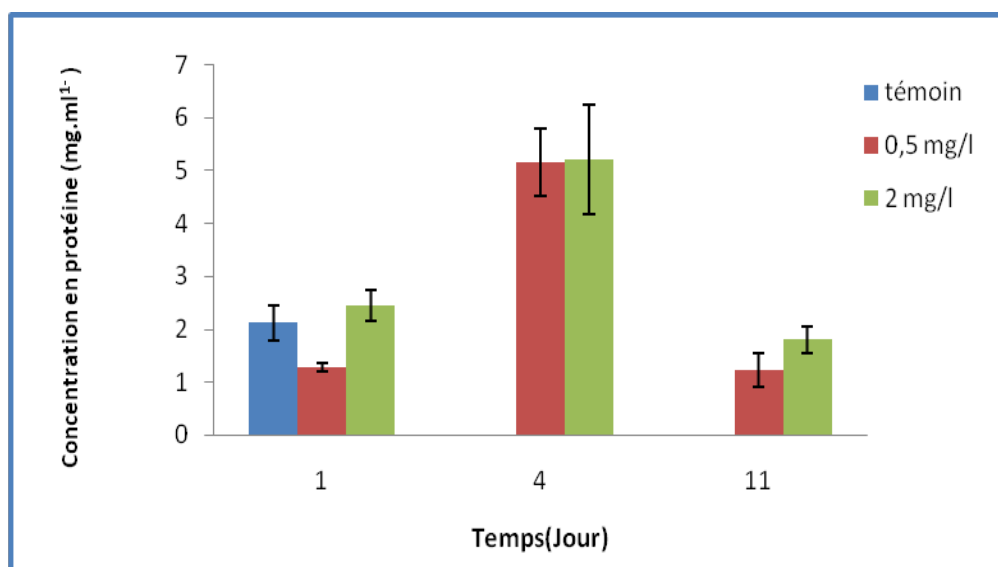


Figure 4.13 : Étude de l'effet du plomb sur les teneurs en protéines au cours du cycle de décontamination par les concentrations 0.5 et 2 mg.L⁻¹

Après le cycle de contamination et à la suite d'un séjour de 10 jours de décontamination, les teneurs des réserves protéiques dans les chairs des moules étaient en augmentation puis en diminution au cours des jours de décontamination jusqu'à obtenu des valeurs inférieures ou proches à celles des spécimens témoins pour les deux concentrations testées (0.5 mg.L⁻¹ et 2 mg.L⁻¹).

Selon Mosleh *et al.* [62], 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.

4.3 Potentiel toxique « plomb et cuivre »

Dans notre étude, nous avons exposées la moule *Perna perna* à différentes concentrations du cuivre afin de mesurer l'effet de ce dernier sur l'activité enzymatique catalase. Les résultats sont représentés sur la figure 4.14.

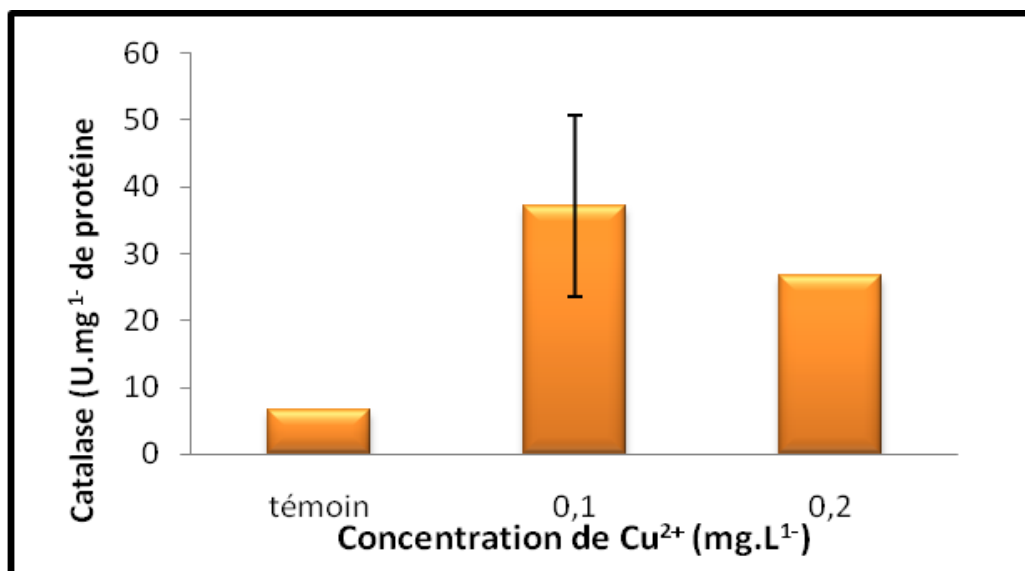


Figure 4.14 : Variation de la réponse catalase en fonction des concentrations du cuivre dans la chair des moules

D'après la figure 4.14, la réponse de notre biomarqueur catalase relevée suite à l'exposition de la moule *Perna perna* à deux concentrations du cuivre 0.1 et 0.2 mg.L⁻¹ est probablement due à une forte induction de l'activité enzymatique, qui était assez suffisante pour provoquer la mortalité des spécimens testés, plus de 50% des individus ont été enregistrés morts sous l'effets de ces concentrations. De ce fait, l'activité catalase 37.10 U.mg⁻¹ protéine est mesurée pour la concentration 0.1 mg.L⁻¹ et 26.73U.mg⁻¹ protéine pour la concentration 0.2 mg.L⁻¹. Dans le cas du plomb, les deux doses 0.1 et 0.2 mg.L⁻¹ sont considérés non létales avec des activités linéaire en fonction de la concentration.

A titre comparatif, les résultats obtenus de la toxicité de plomb et de cuivre sont regroupés dans le tableau 4.3 ci-dessous.

Tableau 4.3: le potentiel toxique des deux éléments métalliques traces plomb et cuivre

	Polluant métallique	
	<i>Pb</i> ²⁺	<i>Cu</i> ²⁺
Activité enzymatique à [0.1 mg.L ⁻¹](U.mg ⁻¹ protéine)	7.42	37.10
Activité enzymatique à [0.2 mg.L ⁻¹] U.mg ⁻¹ protéine)	11.80	26.73
Nbr de Mortalité à [0.1 mg.L ⁻¹]	0/15	17/20
Nbr de Mortalité à [0.2 mg.L ⁻¹]	0/15	18/20

On conclusion pour cette comparaison, le cuivre est plus toxique que le plomb pour la moule *Perna perna* malgré qu'il est un élément essentiel et indispensable au déroulement des

processus biologiques (oligo-éléments), par contre le plomb est un élément qui n'est pas nécessaire à la vie et peut être même préjudiciable comme le mercure (Hg), le cadmium (Cd) et l'antimoine (Sb) mais jusqu'à des fortes concentrations il reste moins toxique pour la même espèce [16].

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

[1] Bélanger, D., "Utilisation de la faune macrobenthique comme bioindicateur de la qualité de l'environnement marin côtier", Thèse de maître en écologie internationale, (2009), Université de Sherbrooke-Québec.

[2] Casas, S., " Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule *mytilus Galloprovincialis*, en milieu méditerranéen", Thèse de doctorat, (2005), Océanologie biologique, Environnement marin, Université du sud Toulon Var.

[3] Philippe, M., Marina, C., "Approches analytiques pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques". Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, (2003), Rapport Technique, Paris.

[4] Benamar, N., Bouderbala, M., Boutiba, Z., " Evaluation de la concentration en cadmium d'un poisson pélagique commun, *Sardinella aurita*, dans la baie d'Oran ,« journal Halieutiques », (2010), pp.16-20.

[5] Ramade, F., 2000. Dictionnaire encyclopédique des pollutions. *Edition: Ediscience International*, France, 690 p.p428.

[6] Belkacem, Y., "Intégration des mesures in situ et des données satellitaires dans un système d'information géographique pour caractériser les eaux côtières", Thèse de magister, (2010), Océanologie biologique, Environnement marin, Université d'Alger.

[7] Kankou, M., " Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Mauritanie – étude en laboratoire du comportement de deux pesticides", (2004), Docteur de l'Université de Limoges, France.

[8] Leroy J-B., 1999. La pollution des eaux. Edition : *le point des connaissances actuelles*, France, 126 P.

[9] Neathery M.W., Miller, W.J., 1975. Metabolism and toxicity of cadmium, mercury and lead in animals. A review. *J. Dairy*.

[10] Yoann, L., " Mise au point d'une systématique de caractérisation des interactions Matière Organique Naturelle Dissoute (MOND) –Contaminants métalliques", Thèse de Doctorat, (2008), Université du Sud Toulon.

[11] Bazouche, M., Mesbaiah, F.Z., "Contribution à l'étude de la bioaccumulation de deux métaux lourds (Cu et Pb) et les biomarqueurs enzymatiques chez la moule : *Mytilus galloprovincialis*", Thèse d'ingénieur d'état, (2008), Département de Génie des procédés, Université Saad Dahlab, (BLIDA).

[12] Bourg, A. (1979). "Spéciation chimique des métaux traces dans les systèmes aquatiques." J. Franc. Hydrologie 10 (3): 159-164.

[13] Turner, D. R. (1995). " Problems in trace metals speciation modeling. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems". A. Tessier et D. R. Turner, Wiley. 3: 150-196.

[14] Ribeyre, F. et A. Boudou (1989). Trophic chains and experimental ecosystems: study of bioaccumulation and transfer processes. Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies. A. Boudou et F. Ribeyre, CRC Press, Boca Raton, FL. 1: 3-46.

[15] Danniell Cossa., 1992, "Le plomb dans le milieu Marin, Biogéochimie et Ecotoxicologie", ISSN 1240-1153.

[16] Schulz-Baldes, M. (1974). "Lead uptake from seawater and food, and lead loss in the common mussel *Mytilus edulis*." Mar. Biol 25: 177-193.

[17] Abada, B., Saidi, A., "Biosurveillance marine ", Centre de Développement des Energies Renouvelables (CDER), (2003), Alger.

[18] Perez T., Sartoretto S., Soltan D., Capo S., FourM., Dutrieux E., Vacelet J., Harmilin J.G., Rebouillon P. (2000). "Etude bibliographique sur les bioindicateurs de l'état du milieu marin. *Système d'évaluation de la Qualité des Milieux Littoraux – Volet biologique*". Rapport Agences de l'Eau, 4 fascicules, 642 pp.

[19] Meknachi, A., " Utilisation du poisson tilapia *Oreochromis niloticus* et la moule *Mytilus galloprovincialis* comme bioindicateurs du niveau de pollution par les métaux traces modélisation de la bioaccumulation". Thèse de Magister, (2010), Département de Génie des procédés, Université Saad Dahlab, (BLIDA).

[20] Achard-Joris, M., " Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant" , Thèse de doctorat, (2005), Sciences du Vivant, Géosciences et Sciences de l'environnement , Université BORDEAUX.

[21] Oria M; 1961 .Sciences naturelles. Botanique. Zoologie. Hatier. pp 74-79.

[22] M.S. Shafée., 1999. "Pêche des bivalves sur la cote Méditerranéenne". Institut agronomique et vétérinaire, Hassan II Rabat, Maroc.63p.

[23] Lagadic Laurent., Caquet Thierry., Amiard Jean-Claude., Ramade François., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie, Aspects fondamentaux. Edition Masson, Paris, ISBN : 2-225-83053-3 ; ISSN : 1275-0026.

[24] Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM Jr. et Bergam HL (eds)(1992). Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. SETAC Special Publications Series, Lewis Publishers, Boca Raton.

[25] Lagadic L, Caquet Th, Amiard, JC et Ramade F(eds)(1997b). Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects Fondamentaux. Masson, Paris.

[26] McCarthy Jf, Shugart LR (eds)(1990). Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Boca Raton.

[27]: Peakall DB, Shugart LR (eds)(1993). Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health. NATO ASI Series, serie H: Cell Biology, VOL.68. Springer Verlag, Berlin.

[28] De Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of Water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicol*, 50:51-71.

[29] Amiard Jean-Claude., Claude Amiard-Triquet., 2008. "Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques". Edition Tec et Doc Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-1017-1.

[30] Borković S. S., Šaponjić J. S., Pavlović S. Z., Blagojević D. P., Milošević S. M., Kovačević T. B., Radojičić R. M., Spasić M. B., Žikić R. V., Saičić Z. S., 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comparative biochemistry and physiology, Part C* 141, 366-374.

[31] Genevieve Deviller., 2003. Traitement par lagunage à haut rendement algal (LHRA) des effluents piscicoles marins recyclés : évaluation chimique et écotoxicologique. Thèse de doctorat, Université Montpellier I, 172p.

[32] Papa Madièye Gueye., 2007. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur – Strasbourg I, 251p.

[33] Gülüzar A., Ozlem A., Seyhan T., Mustafa C., 2006. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 143, 218-224. Elsevier.

[34] Fournier, E., " Bioaccumulation du sélénium et effets biologiques induits chez le bivalve filtreur *Corbicula fluminea*. Prise en compte de l'activité ventilatoire, de la

spéciation du sélénium et de la voie de contamination". Thèse de doctorat, (2005), université Bordeaux.

[35] Bouldjadj, R ., " Etude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé D'Artemisia herba alba Asso chez des rats rendus diabétiques par Streptozotocin" Thèse magister , (2009), Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université Mentouri Constantine.

[36] Cantin PA (1999). Oxidant and antioxidants in lung injury. In: *Lam and Other Diseases Characterized by Smooth Muscle Proliferation*, Moss J. New York: Dekker, 519 - 531.

[37] Alain, G., " Réponses du biota à la contamination polymétallique d'un milieu estuarien, la Gironde : Exposition, imprégnation, induction d'une protéine de détoxification, la métallothionéine, impact au niveau individuel et populationnel", Thèse de doctorat, (2001), université de Nantes.

[38] Olivier, G., "Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires", Thèse de Doctorat, (2001), université de Bordeaux I.

[39] Markert, B.A., Breure, A.M. et Zechmeister, H.G. (2003). Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. *Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications*, B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors. (Oxford : Elsevier Science Limited), pp. 3-39.

[40] Bresler, V., Mokady, O., Fishelson, L., Feldstein, T. et Abelson, A. (2003). Marine molluscs in environmental monitoring : II. Experimental exposure to selected pollutants. *Helgoland marine research* 57, 206-211.

[41] Barnabé G, et Barnabé R ; 1997. Quet : « Ecologie et aménagement des eaux côtières ». Edition Tec et Doc. Paris. p9, 71, 134-136, 343, 353.

[42] Aminot ,A. et Chaussepied M., 1983. " Manuel des analyses chimiques en milieu marin". CNEXO.

[43] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr N.J., Randall R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

[44] X. N. Verlecar., K. B. Jena., G.B.N. Chai., Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76(4), 745-752.

- [45] M. Schintu., L. Durante., A. Maccioni., P. Meloni., S. Degetto., A. Contu., 2008. Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. *Marine Pollution Bulletin* 57, 832-837. Elsevier.
- [46] Raffaella Bocchetti., Claudia Virno Lamberti., Barbara Pisanelli., Erika M. Razzetti., Chiara Maggi., Barbara Catalano., Giulio Sesta., Giacomo Martuccio., Massimo Gabellini., Francesco Regoli., 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Marine Environmental Research* 66, 24–26. Elsevier.
- [47] Cossa, D., E. Bourget, D. Pouliot, J. Piuze et J. P. Chanut (1980). "Geographical and seasonal variations in the relationship between trace metal content and body weight in *Mytilus edulis*." *Mar.Biol* 58: 7-14.
- [48] Paital B., Chainy G.B.N., 2010. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151,142–151. Elsevier.
- [49] Dellali M., Roméo M., Aïssa P., 2001. Suivi de l'activité catalase des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. *Oceanol. Acta* 24, 263-271. Elsevier.
- [50] Khessiba A., Roméo M., Aïssa P., 2005. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution* 133, 257-281. Elsevier.
- [51] Brook, RR & Rumsey, D. 1974. Heavy metals in some New Zealand sea fishes. *N.Z.J. Ma rand Fresh Res.* 8 (1): 155-166.
- [52] Brock V, Kennedy VS, Brock A (1986). Temperature dependency of carbohydrase activity in the hepatopancreas of thirteen estuarine and coastal bivalve species from the north American east coast. *J Exp Mar Biol Ecol*, 103:87-101.
- [53] Fournier, E., "Bioaccumulation du sélénium et effets biologiques induits chez le bivalve filtreur *Corbicula fluminea*. Prise en compte de l'activité ventilatoire, de la spéciation du sélénium et de la voie de contamination", Thèse de doctorat, (2005), université Bordeaux 1.
- [54] Arrignon J; 2002. L'aquaculture de A à Z. Edition Tec et Doc.439p.
- [55] Zouaoui , F., "Contrôle et surveillance de la pollution marine par l'utilisation de la catalase comme biomarqueur de stress non spécifique mesurée sur la moule *Mytilus*

galloprovincialis", Thèse d'ingénieur d'état, (2010), Département de biologie. Université de Blida.

[56] Novas A., Barcia R., Ramos-Martínez J. I., 2007. Nitric Oxide production by Haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 886-891. Elsevier.

[57] Justyna Kopecka., Kari K. Lehtonen., Janina Barsiene., Katja Broeg., Pekka J. Vuorinen., Jens Gercken., Janusz Pempkowiak., 2006. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic). *Marine Pollution Bulletin* 53, 406–421. Elsevier.

[58] Lagadic, L., T. Caquet, J.-C. Amiard et F. Ramade eds. , 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, 419 pp.

[59] Ron van der Oost., Jonny Beyer., Nico P.E. Vermeulen., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149. Elsevier.

[60] Thomais Vlahogianni., Manos Dassenakis., Michael J. Scoullous., Athanasios Valavanidis., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1361–1371. Elsevier.

[61] Company R., Serafim A., Bebianno M.J., Cosson R., Shillito B., Fiala-Medioni A., 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Environmental Research* 58,377–381. Elsevier.

[62] Mosleh Y. Y., Paris-Palacios S., Ahmed M. T., Mahmoud F.M., Osman M.A., Biagianti-Risbourg S., 2007. Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). *Chemosphere* 67,167–175. Elsevier.

[63] Rollemberg M.C., Gonçalves M.S.L., 2000. Kinetics of uptake of cadmium by *Chlorella marina* in different media. *Bioelectrochemistry* 52, 57-62. Elsevier.

ANNEXE (A)

Résultats Numériques

Résultats des paramètres physico-chimiques

1/ Physiques

	Jours N° séries	1	2	3
	Température (°C)	Série 01	0.235±0.175	0.185±0.101
Série 02		0.080±0.04	0.585±0.045	0.227±0.095
Série 03		0.180±0.224	0.030±0.042	0.290±0.135

	Jours N° séries	1	2	3
	Salinité (‰)	Série 01	0.042±0.044	0.027±0.029
Série 02		0.132±0.012	0.072±0.037	0.300±0.308
Série 03		0.470±0.394	0.107±0.045	0.477±0.416

	Jours N° séries	1	2	3
	pH	Série 01	0.040±0.040	0.057±0.041
Série 02		0.035±0.020	0.0125±0.005	0.212±0.009
Série 03		0.075±0.096	0.072±0.009	0.127±0.055

	Jours N° séries	1	2	3
	Conductivité	Série 01	0.185±0.148	0.3±0.115
Série 02		0.412±0.075	0.315±0.050	0.39±0.152
Série 03		0.210±0.111	0.145±0.119	0.55±0.048

	Jours	1	2	3
	N° séries			
Oxygène dissous mg.L ⁻¹	Série 01	0.285±0.07	0.092±0.104	0.027±0.012
	Série 02	0.945±0.046	0.190±0.120	0.432±0.242
	Série 03	1.282±0.219	0.125±0.555	1.297±0.153

2/ Chimiques

Sels nutritifs [Pb ²⁺] (mg.L ⁻¹)	N-NH ₄	P-PO ₄	N-NO ₂	N-NO ₃
Eau de Mer	0.017±0.002	0.503±0.030	0.048±0.008	0.119±0.008
Témoin	0.005±0	0.559±0	0.030±0	0.056±0
0.05	0.031±0.023	0.773±0.066	0.163±0.031	0.100±0.0360
0.1	0.010±0.010	0.629±0.025	0.167±0.0189	0.102±0.029
0.15	0.042±0.014	0.653±0.014	0.228±0.025	0.063±0.030
0.2	0.014±0.006	0.627±0.044	0.159±0.012	0.051±0.036
0.25	0.009±0.006	0.372±0.006	0.041±0.001	0.040±0.001
0.5	0.013±0.010	0.360±0.010	0.033±0.001	0±0
1	0.013±0.00	0.349±0.006	0.040±0.002	0.005±0.003

2	0.013±0.003	0.535±0.005	0.032±0.003	0.011±0.003
3	1.270±0.096	1.270±0.096	0.085±0.013	0.045±0.017
4	1.437±0.266	1.437±0.266	0.089±0.013	0.055±0.017
6	2.085±0.095	0.085±0.095	0.092±0.012	0.028±0.009
8	1.575±0.053	1.575±0.053	0.131±0.022	0.026±0.018

ANNEXES (B)

Réactifs, dosage des sels nutritifs et solutions chimiques

a/-Réactifs

- Réactifs pour le dosage des sels nutritifs

Tableau. I : Réactifs nécessaires pour le dosage de l'azote ammoniacal

Solutions	Réactifs nécessaires	Préparation	Remarques
Réactif 1 (1 litre) : Solution de Phénol- Nitroprussiate	-Eau distillée -35g de Phénol -400mg de Nitroprussiate de sodium	Dissoudre les deux produits dans 1000ml d'eau et le conserver au réfrigérateur à l'abri de la lumière, et laisser stabiliser pendant quelques semaines.	Il doit être renouvelé s'il prend une teinte verdâtre.
Réactif 2 (1litre) : Solution d'alcaline d'hypochlorite	1) 280g de Citrate trisodique (NA3 C6 H5 O7) 2) 22g de soude 3) Solution d'hypochlorite de sodium correspondant à 1.4g de chlore soit 44ml d'une solution à 10° de chlore.	Dissoudre les produits 1, 2 dans 800ml d'eau distillée, ajouter un volume de solution d'hypochlorite de sodium correspondant à 1.4g de Cl ou C3-Cl2 Dichlorisocianurate de potassium.	Ce réactif se conserve au froid pendant 1 à 2 mois.

Tableau .II: Réactifs nécessaires pour le dosage des nitrites

Solutions	Réactifs nécessaires	Préparation	Remarques
Réactif 1 (500ml) : Solution de sulfanilamide	-5g de sulfanilamide -50ml d'acide chlorhydrique concentré d= 1.18	Diluer 50ml d'acide chlorhydrique concentré dans environ 300ml d'eau distillée et	Cette solution est stable indéfiniment.

		dissoudre 5g de sulfanilamide dans cette solution et compléter à 500ml.	
Réactif 2 (500ml) : Solution de N-Naphtyléthylènediamine	-0.5g de dichlorhydrate de N-Naphtyléthylènediamine	Dissoudre 0.5g dans 500ml d'eau distillée.	Conserver cette solution au froid et à l'abri de la lumière.

Tableau.III: Réactifs nécessaire pour le dosage des nitrates

Solutions	Réactifs nécessaires	Préparation	Remarques
Réactif 1	Même solution utilisée pour le dosage des nitrites		
Réactif 2	Même solution utilisée pour le dosage des nitrites		
Solution concentrée de chlorure d'ammonium	250g de chlorure d'ammonium	Préparer une solution pour 1 litre d'eau distillée	/
Solution diluée de chlorure d'ammonium	Solution concentrée	Diluer 40 fois (25ml pour 1 litre)	/
Solution de sulfate de cuivre	10g de sulfate de cuivre	Dans 500ml d'eau distillée, dissoudre 10g.	/

Tableau .V: Réactifs nécessaires pour le dosage du phosphore

Solutions	Réactifs nécessaires	Préparation	Remarques
Réactif 1 : Solution de molybdate d'ammonium	Para molybdate d'ammonium	Dissoudre 15g de Molybdate d'ammonium (NH ₄ M ₆ O ₇ O ₂₄ 4H ₂ O) de préférence en poudre fine, dans 500ml d'eau distillée ou déminéralisée.	A conserver dans les flacons en plastique et à l'abri de la lumière. Cette solution est stable indéfiniment.
Réactif 2 : 2.5 mol/l (H ₂ SO ₄) Acide sulfurique	Acide sulfurique densité= 1.84	Ajouter petit à petit, avec précaution 140ml d'acide	Conserver hermétiquement dans des bouteilles

		sulfurique dans 900ml d'eau distillée. Laisser refroidir.	en verre.
Réactif 3 : Solution d'acide ascorbique	Acide ascorbique	Dissoudre 50g d'acide ascorbique (C ₆ H ₈ O ₆) dans 500ml d'eau distillée.	Cette solution se conserve plusieurs mois au congélateur, décongeler juste avant utilisation.
Réactif 4 : Solution d'oxytatrate de potassium et d'antimoine	Oxytate de potassium et d'antimoine	Dissoudre 0.34g d'oxytate de potassium dans 250ml d'eau distillée en chauffant si nécessaire.	Cette solution se conserve plusieurs mois au réfrigérateur.

b/Dosage des sels nutritifs

o **Dosage du phosphore (P-PO₄) : [42].**

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

Mode opératoire :

- 1) Préparer le mélange réactif.
- 2) Mesurer 100 ml d'échantillon.
- 3) Ajouter 10 ml du mélange réactif et homogénéiser aussitôt .
- 4) Attendre 5 minutes et mesurer l'absorbance à 885 nm en cuve de 1cm de trajet optique, par rapport à l'eau distillée.

Préparation du mélange :

- 1) 100 ml de solution de molybdate d'ammonium.
- 2) 250 ml d'acide sulfurique 2,5 mol/l.
- 3) 100 ml de solution d'acide ascorbique.
- 4) 50 ml de solution d'oxytatrate de potassium et d'antimoine.

o **Dosage de l'azote ammoniacal (N-NH₄) : [42].**

Principe : Cette méthode mesure la totalité de l'azote ammoniacal, soit NH₃+N-NH₄, symbolisée par N-NH_{3,4}. L'ammoniac forme une monochloramine avec l'hypochlorite en milieu légèrement basique, cette dernière réagit avec le phénol pour former le bleu d'indo-phénol.

Mode opératoire :

- 1) Prendre 100 ± 5 ml d'échantillon directement dans le flacon à réaction.
- 2) Ajouter 3 ml de réactif R1, boucher et agiter pour bien homogénéiser.
- 3) Ajouter sans attendre 3 ml de réactif R2, boucher et agiter à nouveau.
- 4) Placer immédiatement à l'abri de la lumière pendant 6 à 8 heures (ou pendant une nuit à température ambiante).
- 5) Mesurer l'absorbance à 630 nm par rapport à l'eau distillée en cuve de 1cm de trajet optique.

○ **Dosage des nitrites (N-NO₂) : [42].**

Principe : Les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfinilamide en milieu acide ($\text{pH} \leq 2$), puis le diazoïque réagit avec le N-naphtyl-éthylenediamine pour former un composant Coloré.

Mode opératoire : La température d'échantillon doit être comprise entre 15 et 25°C. Les étapes sont :

- 1) Rincer une éprouvette de 50 ml avec l'eau à analyser et y introduire 50 ± 1 ml de l'échantillon.
- 2) Ajouter 1ml de R1 et mélanger.
- 3) Laisser reposer 2min.
- 4) Ajouter 1ml du R2 et mélanger.
- 5) Attendre au moins 10 minutes mais pas plus de 2heures.
- 6) Mesurer l'absorbance en cuve de 1cm à la longueur d'onde de 543 nm, en prenant l'eau distillée comme référence.

○ **Dosage des nitrates (N-NO₃) :** La méthode par réduction quantitative ($>$ à 95%) des ions NO_3^- est utilisée pour ce dosage [42].

Principe : Le dosage des ions NO_2^- après la réduction des nitrates par passage de l'échantillon sur une colonne de cadmium traité au cuivre.

Mode opératoire :

1. Analyse de la concentration totale nitrate+nitrite :

- 1) Prendre 100 ml d'échantillon.
- 2) Ajouter 2 ml de la solution concentrée de l'échantillon de chlorure d'ammonium.
- 3) Verser environ 5 ml de cette solution dans la colonne et les laisser écouler.
- 4) Rincer une éprouvette graduée de 50ml avec quelque ml de la solution sortant de la Colonne et recueillir 50 ml de l'effluent.
- 5) Ajouter 1ml de R1, mélangé, laisser reposer 2min.
- 6) Ajouter 1ml de R2, mélanger.
- 7) Attendre au moins 10 minutes mais pas plus de 2heures pour mesurer l'absorbance à 543 nm par rapport à l'eau distillée.

2) Analyse des ions nitrites : Prendre 50 ± 1 ml d'échantillon ajouter 1ml de solution concentrée de NH_4Cl et mélanger ; Pour suivre le dosage comme sur 50 ml d'effluent de la colonne.

La valeur de l'absorbance des nitrates de l'échantillon est obtenue par la différence entre les absorbances des nitrites totaux et des nitrites seuls.

c/- Solutions chimiques

➤ Solution métallique du plomb

Le plomb est préparé à l'aide de nitrate de plomb d'une pureté analytique de 99.5 [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$]. Ce dernier est très bien soluble dans l'eau. L'eau distillée est utilisée pour la préparation de la solution mère d'une concentration 1 g.L^{-1} . Les volumes sont déterminés après une dilution de la solution mère pour chaque concentration du plomb introduite dans chaque bac.

➤ Solution métallique du cuivre

Le cuivre est préparé à partir de $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, d'une pureté analytique de 97. Les dilutions ont été préparées à partir de la solution mère d'une concentration de 50 mg.L^{-1} .

ANNEXE (C)

Matériels et dispositif



Figure C.1: Bacs d'élevage des moules.



Figure C.2 : Multiparamètres YSI 556.



Figure C.3 : Spectromètres UV- Visible



Figure C.4 : Photos de la moule *Perna perna* (*Perna*) (photo originale)



Figure C.5 : La dissection des individus *Perna perna* (*Perna*)

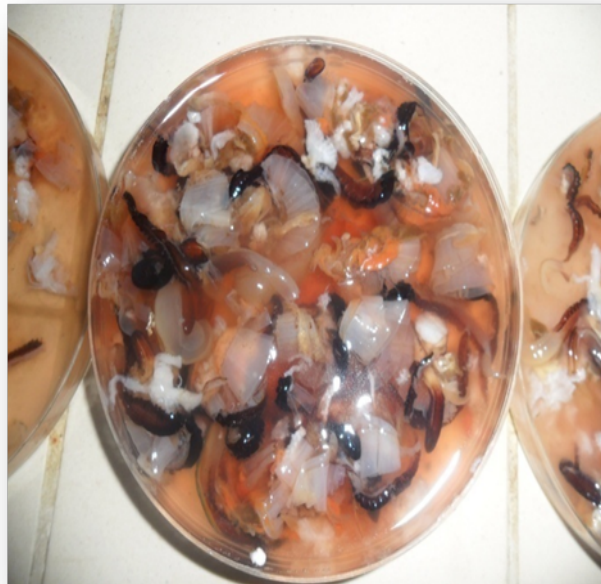


Figure C.6 : Echantillons tissulaires des individus *Perna perna* (*Perna*)

GLOSSAIRE

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

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

Anthropique : Relative à l'activité humaine.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ecosystème : Système dans lequel il existe des échanges cycliques de matières et d'énergie dus aux interactions entre les différents organismes présents (biotope) et leur environnement (biocénose).

Ecotoxicologie : Science qui étudie l'origine, l'émission et l'introduction de polluants naturels ou artificiels dans la biosphère, leur devenir et leurs actions sur les écosystèmes. Elle inclut ainsi la toxicologie de l'environnement, la toxicologie industrielle, la toxicologie alimentaire ou la toxicologie nucléaire.

Espèces réactives de l'oxygène (ERO) : Intermédiaires réactifs du métabolisme de l'oxygène, radicalaires ou non-radicalaires (par exemple le peroxyde d'hydrogène H_2O_2).

Excrétion : Rejet des résidus en sort de l'organisme.

Facteurs biotiques : ensemble des facteurs écologiques liés aux êtres vivants (Compétition, prédation, parasitisme, mutualisme,...) (Ramade, 1998).

Ligand biologique : Par définition, le « Ligand biotique » est la cible biologique préférentielle d'un contaminant. Dans la sémantique de la spéciation chimique, les espèces métalliques peuvent former, avec d'autres espèces chimique appelées ligands, des entités nommées complexes. Par assimilation, les sites de fixation des métaux sur les organismes vivants sont également désignés par le terme ligand (biotique) et on appelle complexe la formation de liens métal / organisme.

Métabolisme : Par le terme de métabolisme, on comprend toutes les réactions chimiques ayant lieu dans l'organisme, nécessaires au maintien des processus de la vie. Ces réactions concernent l'apport d'énergie, mais aussi l'introduction, la transformation, la décomposition dans les organismes ainsi que l'élimination de certains composés et le maintien ou l'augmentation de la biomasse.

Métaux essentiels : On entend par là des métaux dont l'organisme a besoin dans des concentrations bien déterminées (Chimie de l'environnement).

Métaux non essentiels : Ne sont pas nécessaires à la vie, mais ils perturbent souvent le cours normal des processus métabolique, même à l'état de traces (Chimie de l'environnement).

Métaux lourds : La notion de métaux lourds est actuellement une notion relativement floue, sans définition scientifique, technique ou juridique qui soit unanimement reconnue. Certains auteurs indiquent ainsi que "l'appellation métaux lourds est cependant une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique". Selon Ramade (1998) cette expression désigne l'ensemble des métaux toxiques de forte masse atomique (plomb, mercure, zinc, cadmium, etc.).

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

Phytoprotecteurs : les produits phytoprotecteurs sont des produits destinés aux soins des végétaux. Il peut exister une confusion avec les pesticides, qui sont des produits phytoprotecteurs, mais seulement destinés à lutter contre les organismes jugés nuisibles. Ils sont utilisés en quantités importantes, dans différents domaines d'application : en premier lieu l'agriculture, mais aussi la voirie (entretien des routes et des voies ferrées) et divers usages privés (jardinage, traitement des locaux, etc.).

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

Subléthal : une dose qui entraîne la mort.

Spéciation (chimique) : distribution d'un élément parmi des espèces chimiques déterminées (formes libres, complexes, etc.).

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

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

Voie directe : Expression relative au milieu environnant (l'eau dans le cas d'organismes aquatiques). Une contamination par voie directe consiste donc en une exposition des organismes à une substance donnée à partir du milieu environnant cet organisme.

Voie trophique : Expression relative à la chaîne alimentaire. Une contamination par voie trophique consiste donc en une exposition des organismes à une substance donnée par le biais de la chaîne alimentaire.

Xénobiotique : Substance chimique étrangère à l'organisme (xénos = étranger ; bios = vie) et se comportant comme un toxique ou un allergène vis-à-vis de l'organisme même à faible concentration.

Conclusion générale

Notre objectif avait porté sur l'étude de l'effet d'une intoxication aiguë du plomb sur l'activité enzymatique catalase chez la moule Africaine *Perna perna* exposée pendant trois jours dans des conditions du laboratoire.

Les résultats obtenus des paramètres physico-chimiques mesurés au cours de notre expérimentation indiquent qu'aucune influence de ces derniers sur la réponse biologique catalase et qu'une variation de ces facteurs abiotiques «surtout la température, l'oxygène dissous et la salinité» peut également modifier l'efficacité des processus biologiques responsables de la bioaccumulation et donc l'induction de nos biomarqueurs CAT.

Le suivi de l'excrétion azotée et phosphorée durant le cycle expérimental a montré une perturbation des réponses métaboliques. Ainsi, les apports azotés et phosphorés ont évolué en fonction de la concentration du plomb. De même, les excrétions phosphorées sont beaucoup plus importantes que celles azotées.

L'augmentation et la déplétion des réserves protéiques sous l'effet de l'exposition au plomb traduisent leur perturbation. Ces résultats montrent l'influence du plomb sur le métabolisme énergétique qui nécessitera soit des mesures complémentaires et notamment la mesure des teneurs du glucose et des lipides.

Dans la mesure de réponse enzymatique, une corrélation positive a été établie entre la concentration du métal «plomb» et le degré d'induction de l'activité CAT. De même, les tests de décontamination ont montré l'efficacité de l'enzyme catalase dont le retour à son état initial comme signe de réversibilité de l'état de santé des spécimens. En effet, la catalase peut supporter comme un biomarqueur de défense très pertinent, sensible et rapide. Ainsi, ces avantages permettent d'évaluer le degré de contamination du milieu environnant.

Par ailleurs, l'étude comparative effectuée sur la mesure de la toxicité de cuivre et de plomb a montré l'importance du potentiel toxique du cuivre par rapport au plomb, ceci montre le danger que peut présenter le cuivre même à de faibles teneurs.

De ce fait, l'approche biologique reste indispensable comme outil de recherche des biomarqueurs et de multimarqueurs et semble d'être des clés d'une meilleure interprétation des résultats dans le cadre d'un diagnostic environnemental permettant de conclure sur l'évaluation du risque écologique.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

[1] Bélanger, D., "Utilisation de la faune macrobenthique comme bioindicateur de la qualité de l'environnement marin côtier", Thèse de maître en écologie internationale, (2009), Université de Sherbrooke-Québec.

[2] Casas, S., " Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule *mytilus Galloprovincialis*, en milieu méditerranéen", Thèse de doctorat, (2005), Océanologie biologique, Environnement marin, Université du sud Toulon Var.

[3] Philippe, M., Marina, C., "Approches analytiques pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques". Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, (2003), Rapport Technique, Paris.

[4] Benamar, N., Bouderbala, M., Boutiba, Z., " Evaluation de la concentration en cadmium d'un poisson pélagique commun, *Sardinella aurita*, dans la baie d'Oran ,« journal Halieutiques », (2010), pp.16-20.

[5] Ramade, F., 2000. Dictionnaire encyclopédique des pollutions. *Edition: Ediscience International*, France, 690 p.p428.

[6] Belkacem, Y., "Intégration des mesures in situ et des données satellitaires dans un système d'information géographique pour caractériser les eaux côtières", Thèse de magister, (2010), Océanologie biologique, Environnement marin, Université d'Alger.

[7] Kankou, M., " Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Mauritanie – étude en laboratoire du comportement de deux pesticides", (2004), Docteur de l'Université de Limoges, France.

[8] Leroy J-B., 1999. La pollution des eaux. Edition : *le point des connaissances actuelles*, France, 126 P.

[9] Neathery M.W., Miller, W.J., 1975. Metabolism and toxicity of cadmium, mercury and lead in animals. A review. *J. Dairy*.

[10] Yoann, L., " Mise au point d'une systématique de caractérisation des interactions Matière Organique Naturelle Dissoute (MOND) –Contaminants métalliques", Thèse de Doctorat, (2008), Université du Sud Toulon.

[11] Bazouche, M., Mesbaiah, F.Z., "Contribution à l'étude de la bioaccumulation de deux métaux lourds (Cu et Pb) et les biomarqueurs enzymatiques chez la moule : *Mytilus galloprovincialis*", Thèse d'ingénieur d'état, (2008), Département de Génie des procédés, Université Saad Dahlab, (BLIDA).

[12] Bourg, A. (1979). "Spéciation chimique des métaux traces dans les systèmes aquatiques." J. Franc. Hydrologie 10 (3): 159-164.

[13] Turner, D. R. (1995). " Problems in trace metals speciation modeling. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems". A. Tessier et D. R. Turner, Wiley. 3: 150-196.

[14] Ribeyre, F. et A. Boudou (1989). Trophic chains and experimental ecosystems: study of bioaccumulation and transfer processes. Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies. A. Boudou et F. Ribeyre, CRC Press, Boca Raton, FL. 1: 3-46.

[15] Danniell Cossa., 1992, "Le plomb dans le milieu Marin, Biogéochimie et Ecotoxicologie", ISSN 1240-1153.

[16] Schulz-Baldes, M. (1974). "Lead uptake from seawater and food, and lead loss in the common mussel *Mytilus edulis*." Mar. Biol 25: 177-193.

[17] Abada, B., Saidi, A., "Biosurveillance marine ", Centre de Développement des Energies Renouvelables (CDER), (2003), Alger.

[18] Perez T., Sartoretto S., Soltan D., Capo S., FourM., Dutrieux E., Vacelet J., Harmilin J.G., Rebouillon P. (2000). "Etude bibliographique sur les bioindicateurs de l'état du milieu marin. *Système d'évaluation de la Qualité des Milieux Littoraux – Volet biologique*". Rapport Agences de l'Eau, 4 fascicules, 642 pp.

[19] Meknachi, A., " Utilisation du poisson tilapia *Oreochromis niloticus* et la moule *Mytilus galloprovincialis* comme bioindicateurs du niveau de pollution par les métaux traces modélisation de la bioaccumulation". Thèse de Magister, (2010), Département de Génie des procédés, Université Saad Dahlab, (BLIDA).

[20] Achard-Joris, M., " Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant" , Thèse de doctorat, (2005), Sciences du Vivant, Géosciences et Sciences de l'environnement , Université BORDEAUX.

[21] Oria M; 1961 .Sciences naturelles. Botanique. Zoologie. Hatier. pp 74-79.

[22] M.S. Shafée., 1999. "Pêche des bivalves sur la cote Méditerranéenne". Institut agronomique et vétérinaire, Hassan II Rabat, Maroc.63p.

[23] Lagadic Laurent., Caquet Thierry., Amiard Jean-Claude., Ramade François., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie, Aspects fondamentaux. Edition Masson, Paris, ISBN : 2-225-83053-3 ; ISSN : 1275-0026.

[24] Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM Jr. et Bergam HL (eds)(1992). Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. SETAC Special Publications Series, Lewis Publishers, Boca Raton.

[25] Lagadic L, Caquet Th, Amiard, JC et Ramade F(eds)(1997b). Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects Fondamentaux. Masson, Paris.

[26] McCarthy Jf, Shugart LR (eds)(1990). Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Boca Raton.

[27]: Peakall DB, Shugart LR (eds)(1993). Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health. NATO ASI Series, serie H: Cell Biology, VOL.68. Springer Verlag, Berlin.

[28] De Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of Water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicol*, 50:51-71.

[29] Amiard Jean-Claude., Claude Amiard-Triquet., 2008. "Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques". Edition Tec et Doc Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-1017-1.

[30] Borković S. S., Šaponjić J. S., Pavlović S. Z., Blagojević D. P., Milošević S. M., Kovačević T. B., Radojičić R. M., Spasić M. B., Žikić R. V., Saičić Z. S., 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comparative biochemistry and physiology, Part C* 141, 366-374.

[31] Genevieve Deviller., 2003. Traitement par lagunage à haut rendement algal (LHRA) des effluents piscicoles marins recyclés : évaluation chimique et écotoxicologique. Thèse de doctorat, Université Montpellier I, 172p.

[32] Papa Madièye Gueye., 2007. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur – Strasbourg I, 251p.

[33] 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 *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 143, 218-224. Elsevier.

[34] Fournier, E., " Bioaccumulation du sélénium et effets biologiques induits chez le bivalve filtreur *Corbicula fluminea*. Prise en compte de l'activité ventilatoire, de la

spéciation du sélénium et de la voie de contamination". Thèse de doctorat, (2005), université Bordeaux.

[35] Bouldjadj, R ., " Etude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé D'Artemisia herba alba Asso chez des rats rendus diabétiques par Streptozotocin" Thèse magister , (2009), Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université Mentouri Constantine.

[36] Cantin PA (1999). Oxidant and antioxidants in lung injury. In: *Lam and Other Diseases Characterized by Smooth Muscle Proliferation*, Moss J. New York: Dekker, 519 - 531.

[37] Alain, G., " Réponses du biota à la contamination polymétallique d'un milieu estuarien, la Gironde : Exposition, imprégnation, induction d'une protéine de détoxification, la métallothionéine, impact au niveau individuel et populationnel", Thèse de doctorat, (2001), université de Nantes.

[38] Olivier, G., "Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires", Thèse de Doctorat, (2001), université de Bordeaux I.

[39] Markert, B.A., Breure, A.M. et Zechmeister, H.G. (2003). Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. *Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications*, B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors. (Oxford : Elsevier Science Limited), pp. 3-39.

[40] Bresler, V., Mokady, O., Fishelson, L., Feldstein, T. et Abelson, A. (2003). Marine molluscs in environmental monitoring : II. Experimental exposure to selected pollutants. *Helgoland marine research* 57, 206-211.

[41] Barnabé G, et Barnabé R ; 1997. Quet : « Ecologie et aménagement des eaux côtières ». Edition Tec et Doc. Paris. p9, 71, 134-136, 343, 353.

[42] Aminot ,A. et Chaussepied M., 1983. " Manuel des analyses chimiques en milieu marin". CNEXO.

[43] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr N.J., Randall R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

[44] X. N. Verlecar., K. B. Jena., G.B.N. Chainy., Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76(4), 745-752.

- [45] M. Schintu., L. Durante., A. Maccioni., P. Meloni., S. Degetto., A. Contu., 2008. Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. *Marine Pollution Bulletin* 57, 832-837. Elsevier.
- [46] Raffaella Bocchetti., Claudia Virno Lamberti., Barbara Pisanelli., Erika M. Razzetti., Chiara Maggi., Barbara Catalano., Giulio Sesta., Giacomo Martuccio., Massimo Gabellini., Francesco Regoli., 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Marine Environmental Research* 66, 24–26. Elsevier.
- [47] Cossa, D., E. Bourget, D. Pouliot, J. Piuze et J. P. Chanut (1980). "Geographical and seasonal variations in the relationship between trace metal content and body weight in *Mytilus edulis*." *Mar.Biol* 58: 7-14.
- [48] Paital B., Chainy G.B.N., 2010. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151,142–151. Elsevier.
- [49] Dellali M., Roméo M., Aïssa P., 2001. Suivi de l'activité catalase des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. *Oceanol. Acta* 24, 263-271. Elsevier.
- [50] Khessiba A., Roméo M., Aïssa P., 2005. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution* 133, 257-281. Elsevier.
- [51] Brook, RR & Rumsey, D. 1974. Heavy metals in some New Zealand sea fishes. *N.Z.J. Ma rand Fresh Res.* 8 (1): 155-166.
- [52] Brock V, Kennedy VS, Brock A (1986). Temperature dependency of carbohydrase activity in the hepatopancreas of thirteen estuarine and coastal bivalve species from the north American east coast. *J Exp Mar Biol Ecol*, 103:87-101.
- [53] Fournier, E., "Bioaccumulation du sélénium et effets biologiques induits chez le bivalve filtreur *Corbicula fluminea*. Prise en compte de l'activité ventilatoire, de la spéciation du sélénium et de la voie de contamination", Thèse de doctorat, (2005), université Bordeaux 1.
- [54] Arrignon J; 2002. L'aquaculture de A à Z. Edition Tec et Doc.439p.
- [55] Zouaoui , F., "Contrôle et surveillance de la pollution marine par l'utilisation de la catalase comme biomarqueur de stress non spécifique mesurée sur la moule *Mytilus*

galloprovincialis", Thèse d'ingénieur d'état, (2010), Département de biologie. Université de Blida.

[56] Novas A., Barcia R., Ramos-Martínez J. I., 2007. Nitric Oxide production by Haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 886-891. Elsevier.

[57] Justyna Kopecka., Kari K. Lehtonen., Janina Barsiene., Katja Broeg., Pekka J. Vuorinen., Jens Gercken., Janusz Pempkowiak., 2006. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic). *Marine Pollution Bulletin* 53, 406–421. Elsevier.

[58] Lagadic, L., T. Caquet, J.-C. Amiard et F. Ramade eds. , 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, 419 pp.

[59] Ron van der Oost., Jonny Beyer., Nico P.E. Vermeulen., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149. Elsevier.

[60] Thomais Vlahogianni., Manos Dassenakis., Michael J. Scoullous., Athanasios Valavanidis., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1361–1371. Elsevier.

[61] Company R., Serafim A., Bebianno M.J., Cosson R., Shillito B., Fiala-Medioni A., 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Environmental Research* 58,377–381. Elsevier.

[62] Mosleh Y. Y., Paris-Palacios S., Ahmed M. T., Mahmoud F.M., Osman M.A., Biagianti-Risbourg S., 2007. Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). *Chemosphere* 67,167–175. Elsevier.

[63] Rollemberg M.C., Gonçalves M.S.L., 2000. Kinetics of uptake of cadmium by *Chlorella marina* in different media. *Bioelectrochemistry* 52, 57-62. Elsevier.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

CHAPITRE 01 : POLLUTION MARINE

CHAPITRE 02 : LA SURVEILLANCE DE LA QUALITE DU MILIEU MARIN

CHAPITRE 04 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE 03 : MATERIELS ET METHODES

CONCLUSION GÉNÉRALE

LES ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHYQUES