

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire
Département : Biologie
Filière : Sciences Biologies

Mise en évidence de biomarqueur en cytopathologie chez un bivalve marin (*Perna perna*) pour l'évaluation de la contamination marine du golfe d'Annaba.

Présenté par : BOUFAMA Yamina Mounia

Devant le jury composé de :

Président : KHALLEF M. (MCA)

Université de Guelma

Examineur : AISSAOUI R. (MCB)

Université de Guelma

Encadreur : DRIF F. (MCA)

Université de Guelma

Juin 2024

Remerciements

Mes remerciements vont en premier lieu à dieux tout puissant de m'avoir donné le courage, la santé, la volonté et l'amour du savoir pour pouvoir réaliser ce modeste travail.

J'aimerais exprimer ma joie et ma gratitude d'avoir comme membre de jury Mme KHÉLLEF M. et MR AISSAOUI R. qui m'ont honoré par leur bonne volonté de présider le jury de la soutenance de ma mémoire à l'université de Guelma. Je les remercie vivement pour leurs conseils et corrections minutieuses qu'ils vont apporter à mon travail.

Je commence sans doute par remercier mon encadreur Mme DRIFF F. qui a bien voulu suivre ce travail depuis le début pour ses conseils, ainsi que ses précieux critiques et suggestions.

Je remercie aussi tous mes professeurs de l'institut de Biologie de Guelma pour leurs soutiens moral, leurs conseils et leurs précieuses aides qui m'ont permis de continuer ce cursus de master malgré toutes les difficultés.

Je remercie également professeur BEDAR L. médecin chef du service d'anatomopathologie et Mr TayeK N. Directeur du centre hospitalier de Constantine de m'avoir ouvert les portes et pouvoir pratiquer mes recherches dans leurs enceintes, sans oublier tout le personnel du laboratoire d'anatomopathologie.

Mes remerciements vont aussi à tous ceux qui ont contribué et collaboré pour la réalisation de ce travail de loin ou de près.

Grand merci à tous

Dédicaces



Ce travail est dédié à la mémoire de mon père, symbole de courage de bonté et de persévérance, à ma mère l'actrice de tous mes succès, qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Il est dédié également à mon cher mari pour son soutien moral et matériel, et qui sans lui ce travail n'aurait pas vu le jour, sans oublier ma sœur Dr Houđa BOUFAMA pour tous ses encouragements et conseils.

A tous ceux qui me sont chère et que je n'ai pas pu tous les citer.

Yamina Mounia BOUFAMA

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
INTRODUCTION.....	1
LES MOLLUSQUES BIVALVES.....	3
I. Généralité.....	3
1. Présentation de l'espèce <i>Perna perna</i>	4
1.1. Description de la coquille	5
2. Position systématique	6
II. Biologie	6
1. Anatomie	6
2. Physiologie.....	7
3. Nutrition.....	9
4. Cycle de vie	10
III. L'intérêt de l'espèce	11
HABITAT ET POLLUTION	12
I. Origine et habitat de <i>Perna perna</i>.....	12
1. Biotope.....	13
2. Propriété physicochimique du milieu de vie de	13
3. Écologie	14
4. Pollution marine et prolifération des populations de moules.....	15
5. Bioaccumulation de polluants chez les moules	15
6. Biosurveillance.....	16
II. Pollution marine	16
1. Types de pollutions.....	16
2. Sources de pollution marine	17
3. Les polluants	18
3.1. Les micropolluants.....	18
4. Types de polluants.....	18

4.1. Métaux lourds.....	19
4.2. Les hydrocarbures.....	20
4.3. Les pesticides.....	20
4.4. Les eaux usées.....	21
4.5. Ruissellement.....	21
STRESS OXYDATIF.....	22
1. Définition.....	22
2. Les différentes espèces réactives de l’oxygène (ERO).....	22
3. Les produits du stress oxydatif dans la cellule.....	23
4. Source des espèces réactives à l’oxygène.....	23
5. Les antioxydants.....	24
5.1. Les antioxydants endogènes.....	25
5.1.1. Les antioxydants enzymatiques.....	25
5.1.2. Les antioxydants non-enzymatiques.....	25
6. Les antioxydants exogènes.....	25
6.1. Rôle physiologique des ERO.....	25
6.2. Les marqueurs du stress oxydatif.....	26
7. La détermination des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.....	26
7.1. Le dosage des oligo-éléments.....	26
7.2. La mesure des dommages oxydatifs au niveau des lipides, de l’ADN et des protéines.....	27
7.3. L’identification de sources génératrices de stress oxydant (inflammation, hyperglycémie, hyperhomocystéinémie).....	27
8. Les causes du stress oxydative.....	27
9. Le stress oxydant chez les organismes marins.....	28
10. l’immunohistochimie (IHC) technique de dépistage histologique.....	28
10.1. Méthodes de révélation en IHC.....	29
MATERIEL ET METHODES.....	30
1. Matériel.....	30
1.1. Lieu d’étude.....	30
1.2. Sites d’échantillonnages.....	30
1.2.2. Site 2 « El Hnaya ».....	31
1.3. Choix de l’espèce.....	31
1.4. Identification de l’espèce.....	32

1.5. Stratégie de l'échantillonnage	33
1.6. Prélèvement de l'organe	33
2. METHODES	33
2.1. Technique des coupes histologiques	33
2.2 Immunohistochimie (IHC) manuel	35
RESULTATS	38
1. Caractéristique physicochimique de l'eau de mer des sites prélevés	38
2. Observation des deux sites sur coloration standard HES	38
2.1. Lecture des coupes femelles des deux sites	38
2.2. Lecture des coupes mâles des deux sites	40
2.3. Comparaison entre sexes	40
3. Observation comparatives entre les deux sites sur lames IHC	41
3.1. Lecture des coupes femelles des deux sites	41
3.2. Lecture des coupes mâles des deux sites	43
3.3. Comparaison entre sexes	44
DISCUSSION	45
Conclusion	
Bibliographie	
Résumé	
Abstract	
الملخص	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Origine des espèces réactives de l'oxygène (Migdal et Serres, 2011).....	23
Tableau 2: Désignation abrégé des 4 échantillons de tissus choisi.	34
Tableau 3: Propriétés physicochimiques de l'eau de mer des sites de prélèvements.	38

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Présentation de l'espèce <i>Perna perna</i> (Linné, 1758)	4
Figure 2: Disposition des muscles rétracteurs et adducteurs <i>P. perna</i> (Linné, 1758) (Cayré, 1976).....	5
Figure 3: Caractères morphologiques et anatomiques de la moule (Deconinck, 1971).....	7
Figure 4 : Vue interne des deux sexes chez les moules.....	8
Figure 5: Emplacement de l'hépatopancréas (glande digestive).....	9
Figure 6: Cycle biologique des moules (Jahangard <i>et al.</i> , 2010).....	11
Figure 7 : Distribution mondiale de l'espèce <i>Perna perna</i> (Wood <i>et al.</i> , 2007).	13
Figure 8: Méthode polymère de révélation utilisée (Venteo et Sutter, 2011)	29
Figure 9 : Vue satellite du golfe d'Annaba (google maps).....	30
Figure 10 : Site de Sidi Salem (Drif, 2012).....	31
Figure 11: Plage d'El Hnaya (Drif, 2012).....	31
Figure 12: Présentation de la moule <i>Perna perna</i>	32
Figure 13: Disposition des inserts musculaires sur la coquille de <i>P. perna</i> (A) et <i>M. galloprovincialis</i> (B) (Marteil, 1976).	32
Figure 14: Ruban obtenu lors de la coupe MICROTOM	35
Figure 15: Lames marquées en marron et en bleu.....	37
Figure 16: Observation microscopique de la glande digestive de la moule <i>P. perna</i> traitée avec une coloration histologique standard HES (Hématoxyline-Eosine), grossissement (x 100 et x 400) respectivement : (A et B) individu femelle collectée sur le site d'El Hnaya ; (E et F) individu femelle collectée sur le site de Sidi Salem.....	39
Figure 17: Observation microscopique de la glande digestive de la moule <i>P. perna</i> traitée avec une coloration histologique standards HES (Hématoxyline-Eosine), grossissement (x 100 et x 400) respectivement : (D et C) individu femelle collectée sur le site d'El Hnaya ; (G et H) individu femelle collectée sur le site de Sidi Salem.....	41
Figure 18: Observation microscopique de la glande digestive de la moule <i>P. perna</i> traitée avec un marquage immunohistochimie (IHC), grossissement (x 100 et x 400) respectivement : (a et b) individu femelle collectée sur le site d'El Hnaya ; (h et i) individu femelle collectée sur le site de Sidi Salem.	42
Figure 19: Observation microscopique de la glande digestive de la moule <i>P. perna</i> traitée avec un marquage d'immunohistochimie (IHC), grossissement (x 100 et x 400) respectivement : (c et d) individu femelle collectée sur le site d'El Hnaya ; (g et f) individu femelle collectée sur le site de Sidi Salem.	44

LISTE DES ABREVIATIONS

C : Celsius

BAF : Rapport du facteur de bioaccumulation

POP : Polluants organiques persistants

EDC : Les perturbateurs endocriniens

BPA : Bisphénol A présent dans le plastique alimentaire

ETM : Eléments traces métalliques

Se : Sélénium

Mo : Molybdène

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

URE : Les eaux usées urbaines

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

RL : Radicaux libres

NAD(P)H : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NOX : Complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire

SOD : Superoxyde dismutase

CAT : La catalase

GPX : Glutathion peroxydase

GRX : La glutarédoxine

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

LDL : Mauvais cholestérol

CRP : La C-Réactive Protéine

SOD : Superoxydes dismutases

MDMX : Multixénobiotique

CHU : Centre hospitalo-universitaire

IHC : Immunohistochimie

TBS : Tampon Buffer solution

HEP-PAR-1 : Anticorps ICH spécifiques pour le tissu hépatique

HRP : Peroxydase de raifort

DAB : Désaminobenzoïde

DC : Débris cellulaires

RE : Rétrécissement des cellules épithéliales

NT : Nécrose tubulaire

NC : Nécrose cellulaire

FCA : Fragments du cytoplasme apical

LDT : Dilatation de la lumière tubulaire

gr2 : Granulocytes

maI : Macrophages

HES : Coloration histologique standard hématoxyline-éosine

TI : Tissu interstitiel

C1 : Conduit primaire

C2 : Conduit secondaire

t : Tubules digestifs

R : Cryptes

cs : Cellules sécrétrices

LHF : El Hnaya hépatopancréas femelle

SHF3 : Sidi Salem hépatopancréas femelle numero3

LHM : El Hnaya hépatopancréas male

SHM2 : Sidi Salem hépatopancréas femelle numero2

IVD : diagnostic in vitro

Introduction

INTRODUCTION

Les mers et océans constituent 70 % de la surface du globe terrestre, créant ainsi le plus important écosystème de la planète, dont la majorité des êtres vivants dépendent d'une façon directe ou indirecte. Il est évident, qu'environ la moitié de la population mondiale vit en dépendance directe des mers. Ce précieux milieu qui regorge de vie naturelle est aujourd'hui sous l'emprise d'une pollution marine accablante, et qui nécessite une réelle prise de conscience en matière de surveillance environnementale et de manière à cerner au maximum les effets négatifs du progrès de l'humanité sur son écosystème.

Diverses substances toxiques produites par l'activité humaine vont être rejetées constamment dans le milieu marin et côtier. Une pollution produite par des polluants variés, d'origine naturelle ou synthétique, où la plupart de nos déchets finissent dans les mers. Ces déchets comprennent à la fois des déchets macroscopiques et des polluants invisibles comme les ingrédients chimiques qui entrent dans la composition des produits cosmétiques et pharmaceutiques qui s'écoulent à travers la tuyauterie sous-terrainne urbaine vers la mer. Ces polluants se déplacent avec les courants océaniques, pouvant être ingérés et peuvent donc empoisonner, voire nuire aux espèces marines. Ainsi, les critères physico-chimiques de l'eau étaient depuis longtemps utilisés pour déceler la présence de pollution aquatique, ce qui n'était plus suffisant, faisant appel aux bioindicateurs qui constituent une technique d'estimation plus adéquate et informative, car ils permettent aux chercheurs d'évaluer l'impact de divers perturbateurs sur les organismes vivants marins (**Dreal, 2013**).

Les bioindicateurs sont des êtres vivants qui peuplent tous les écosystèmes terrestres. Utilisés par les scientifiques pour étudier l'état des écosystèmes marins et les changements biogéographiques de l'environnement. Ces organismes ont la capacité de bioaccumuler, où ils accumulent toutes substances non biodégradables dans leurs tissus, telles que les métaux lourds ainsi que des substances chimiques de toutes sortes. Cette bioaccumulation est nocive lorsqu'il s'agit de variétés se situant en bas de la chaîne alimentaire telle que la moule, autrement dit les grands prédateurs marins ainsi que l'homme vont avoir un taux considérable d'accumulation des substances chimiques dans leur tissu.

D'une autre part, ces bivalves se nourrissant de phytoplancton, ils pompent et filtrent l'eau et stockent au passage toute substance véhiculée par celle-ci, qui constituent un très bon moyen pour tester la qualité de l'eau. Cette fonction nécessite la mise au point de règles sanitaires strictes pour les spécimens destinés à la consommation. Considérées comme des organismes sentinelles de l'environnement, elles sont touchées en premier par la pollution et ont été utilisées

depuis une longue durée comme bioindicateur (**Jorgensen, 1960**) de la qualité des eaux de mers, de lacs ou de rivières où elles habitent.

L'objectif de cette étude est d'utiliser une espèce bioindicatrice pour se renseigner sur l'état d'un milieu marin, qui est le Golfe d'Annaba. Ce dernier souffre au même titre que tout le littoral algérien des mêmes problèmes environnementaux. Où se trouvent les plus grands pôles industriels au Nord-Est algérien, émanant une pollution assez importante. En outre, il est exposé aux risques des différents types de contaminations dues aux activités humaines, qui affectent la santé de l'homme et les organismes qui y vivent. Deux sites d'échantillonnage ont été choisis le long de cette côte (Sidi Salem et El-Hnaya).

Dans cette perspective, il est important d'étudier l'impact de la pollution provenant de la ville d'Annaba sur les tissus de ces bioindicateurs, spécialement notre espèce *Perna perna*. Une évaluation des dommages tissulaires concernant l'organe le plus ciblé par cette contamination (l'hépatopancréas) a été assurée par une étude histologique avec coloration standard (HES), ainsi qu'une coloration immunohistochimie (IHC).

Le travail a été reparté en trois parties. La première est destinée au « contexte bibliographique », qui comprend des généralités sur les mollusques bivalves, en particulier l'espèce *P. perna*. Une deuxième partie « matériel et méthodes » qui évoque la région de l'étude, le protocole expérimental du test appliqué. Finalement, la dernière partie est consacrée à l'interprétation des résultats et à la rédaction de la discussion.

Chapitre I
Les Mollusques
Bivalves



LES MOLLUSQUES BIVALVES

I. Généralité

Les mollusques sont des invertébrés à ceps mou, habituellement couvert d'une coquille. Ce phylum rassemble les métazoaires qui se composent entre autres de 20 000 espèces (**His et Cantin, 1996**) parmi les plus communes ranger en huit classes : Caudofoveata, Solenogastres, Monoplacophora, Scaphopoda, Polyplacophora, Cephalopoda, Gastropoda et Bivalvia. 98% de cet embranchement est constituée essentiellement de Gastropodes et de Bivalves. Ces espèces ont un corps formé d'une tête dans la majorité des cas, ainsi qu'un pied, un organe musculueux qui assure la fonction de déplacement, et un manteau qui sécrète la substance qui formera la coquille. Cette dernière est stratifiée et formées de trois couches calcifiées. De même elle est formée de façon différente chez chacune des espèces à coquille, elle peut être vêtue d'une coquille, ou bien de deux, et parfois plusieurs parties qui sont appelés valves, elles désignent respectivement les univalves, les bivalves et les multivalves. Elle est composée essentiellement de carbonate de calcium, de phosphate tricalcique, de silices, de sulfate de calcium, de carbonate et de magnésium. Les espèces de cet embranchement sont aquatiques dans la plupart des cas, et vivent en majorité dans de l'eau de mer, Regrouper par plus de 117000 espèces. D'autre envahissent les eaux douces. On peut citer les escargots, les limaces, les nudibranches, les moules les pieuvres et les calmars.

Les bivalves regroupent 12000 espèces aquatiques, essentiellement marines ou dulçaquicoles. Ils envahissent les habitats marins, depuis la partie supérieure du littoral et la plupart s'enfuient dans les sédiments des fonds marins à l'abri des prédateurs. Egalement adapté aux eaux douces telles que les étangs, les ruisseaux, les fleuves et les lacs. Ils sont caractérisés par l'existence d'une coquille constituée de deux parties distinctes et attachées, plus ou moins symétriques, pouvant s'ouvrir ou se refermer. Ce sont généralement des d'animaux fouisseurs, grâce à leur pied musculueux, organe ventral mobile en forme de hache, c'est la raison pour laquelle ces animaux sont appelées pélécy-podes, il permet la locomotion et plus précisément le fouissage, ou la fixation au substrat par des filaments appelé byssus, ils sont désignés en tant qu'organismes sessiles tel que la moules. Certains d'entre eux vivent libre comme les Donacidées, la palourde et la coquille Saint-Jacques, quelques espèces creusent le bois comme les tarets ou bien les rochers ou en cimentant une de leurs valves comme les huîtres.

Les moules sont des bivalves appartenant à l'ordre des Filibranches. Les branchies de ces animaux appelées cténidies sont constituées de filaments réfléchis et unis simplement par des touffes de cils. Parmi les filibranches figurent le modiole *Modiola barbata*, le modiole adriatique

Modiola adriatica, la moule *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus coruscus*, *Mytilus trassulus*, *Mytilus californianus*, le genre *Perna* espèce *Perna perna*.

Le mode de fixation de la moule est le moyen zootechnique utilisé en aquaculture permettant l'élevage de cet animal sous des conditions contrôlées. Le pied peut se replier sous l'action de deux muscles rétracteurs. En effet, à la base du pied se trouve une glande byssogène qui a pour rôle de sécréter les filaments protéiques du byssus permettant aux individus de se fixer fortement à leur substrat (Lubet, 1973). C'est filaments une fois sécrétés, se solidifient au contact de l'eau de mer (Sun *et al.*, 2001).

Les Bivalves ont un intérêt purement scientifique car ils présentent un excellent outil pour surveiller la qualité de l'eau et la bioaccumulation, ainsi qu'une grande importance commerciale. Ils forment, en effet, le groupe le plus important des mollusques aussi bien pour la consommation que pour la production de nacre ou de perles. La culture des moules ou "mytiliculture", industrie très ancienne est largement développée en Mer du Nord, Manche, Atlantique, Méditerranée et Adriatique (Lubet, 1973).

1. Présentation de l'espèce *Perna perna*

La moule *P. perna* a été identifiée par Linné en 1758, connue par la moule brune et africaine désignée par ces noms *Mytilus africanus* (Chenmitz, 1785), ou bien *Mytilus pictus* (Born, 1778). Elle est caractérisée morphologiquement de façon distincte par une extrémité antérieure pointue, un profil transversal et un aplatissement de la surface ventrale à l'endroit du plateau cardinal, et juste en arrière de celui-ci la bordure dorsale de la coquille est arrondie (Fig.1).



Figure 1: Présentation de l'espèce *Perna perna* (linné, 1758)

Elle est caractérisée aussi par l'absence de muscles adducteurs antérieurs, ainsi que la présence de deux dents au lieu de trois ou quatre pour le genre *Mytilus*, de même les insertions des muscles rétracteurs du pied et du byssus sont adjacentes entre elles, tandis qu'ils sont séparés de celles de l'adducteur postérieur et des rétracteurs postérieurs du byssus, qui consiste à un caractère d'identification très spécifique (**Fig.2**). Les deux espèces *Perna perna* d'Amérique du sud et *Mytilus africanus* d'Afrique appartiennent à la même espèce *P. perna* (**Linné, 1758**). D'après **Lubet (1972)**, il n'y a aucune divergence entre ces deux espèces.

L'espèce *P. perna* est largement ré pondue à travers le monde, car elle est abondante sur les côtes Atlantique est et ouest. Citons ainsi la Mauritanie, le Sénégal, le Congo, l'Angola, ainsi qu'en Amérique du sud tel que les Antilles, la Guyane, le Brésil, jusqu'au littoral Méditerranéen de l'Afrique du nord du Maroc à la Tunisie (**Cayré, 1976**).

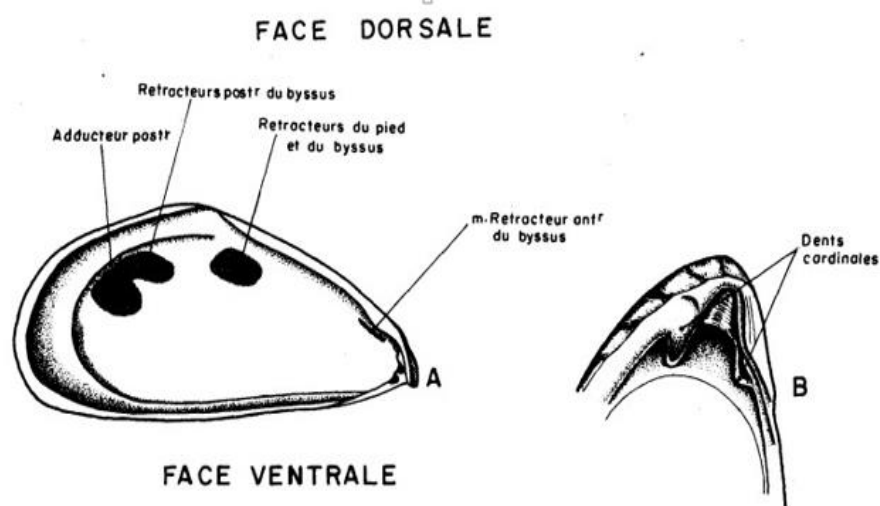


Figure 2: Disposition des muscles rétracteurs et adducteurs *P. perna* (**Linné, 1758**) (**Cayré, 1976**)

A = insertions musculaires (valve gauche) **B**= charnière de la valve gauche

1.1. Description de la coquille

Le corps de la moule est protégé par une coquille bivalve comprimé latéralement. Les deux valves sont symétriques Elle est de forme oblongue, peut atteindre 12 cm de long, pointue à l'avant et nettement élargie à l'arrière approximativement triangulaire allongé, avec un bec formant le sommet. Le bord antérieur est droit, tandis que le bord postérieur est largement arrondi. La surface externe de la valve est marquée par des lignes de croissance concentriques appeler stries de croissance, don la couleur extérieure est brun-fauve avec des reflets verdâtres dans la région postérieure (**Lubet, 1973**) don sa désignation par la moule brune.

La coquille de *Perna perna* a des bords minces et s'épaissit postérieurement. Recouverte de l'extérieur d'un épais périostracum qui est une couche externe de la coquille robuste.

Les deux valves de la coquille sont unies par un ligament (conchylien) et deux muscles adducteurs souvent inégaux, s'opposant à l'action mécanique du ligament pour assurer la fermeture de la coquille. Comme chez tous les bivalves, il est essentiellement formé de conchyoline (substance apparentée à la chitine) et il est constitué d'une partie externe qui est étirée lors de la fermeture des valves et d'une partie interne que cette fermeture comprime. Ces deux couches, par leur élasticité, tendent à provoquer l'ouverture de la coquille (Marteil, 1976). Un bouquet de filaments plus résistants et robuste chez *Perna perna*, terminés par de minuscules extrémités collantes nommé byssus, fil souple et très résistant, passe entre les deux valves et permet à la moule de se fixer solidement à un support rigide. Si elle est arrachée. L'intérieur de cette coquille est nacre blanc rosé (Lubet, 1973) avec une cicatrice musculaire distincte.

2. Position systématique

La classification des mollusques bivalves se base sur plusieurs critères à savoir, la forme de la coquille, la charnière et la structure des branchies (Bellon-humbert, 1992) :

Embranchement : Mollusques.

Classe : Bivalves.

Sous classe : Ptériomorphia

Ordre : Mytiloida

Famille : Mytilidae

Genre : *Perna*

Espèce : *Perna perna* (Linné, 1758)

II. Biologie

1. Anatomie

La coquille de l'animale protège son corps mou acéphales qui forme une masse viscérale globuleuse non segmenté (Gauroy, 1972), elle est enveloppée dans un manteau au pallium formé de deux lobes, droit et gauche. Ces derniers présentent un feuillet épithélial du côté de la cavité palléale renfermant l'ensemble des organes tels que le rein et l'hépatopancréas. Entre ces deux compartiments est ménagée une cavité où circule de l'eau de mer, appelée cavité palléale, dans laquelle pendent les branchies et débouchent les orifices excréteurs, génitaux ainsi que l'anus.

Le manteau joue un rôle non négligeable dans la circulation de l'eau au niveau des branchies, il participe à la respiration grâce à un échange directe de gaz avec l'eau environnante et accumule des réserves. Toutefois son rôle principal est d'assurer la formation de la coquille, sa calcification et la sécrétion du ligament. Les branchies qui sont des expansions tégumentaires respiratoires, flottent dans la cavité palléale reliées chacune à la masse viscérale par l'axe branchial. Ils assurent à la fois la respiration et la nutrition. Le pied est une saillie musculaire d'une grande mobilité qui contient la glande byssogène. De plus, une bouche présente une fente transversale dépourvue de radula et s'ouvre directement dans l'œsophage.

Ainsi, qu'un cœur formé d'un ventricule médian, traversé par le rectum et deux oreillettes (Nicholson, 2002). Les gonades ne constituent pas un organe anatomiquement distinct chez les Mytilidés mais sont formées de tubules envahissant la masse viscérale et le manteau (Fig. 4).

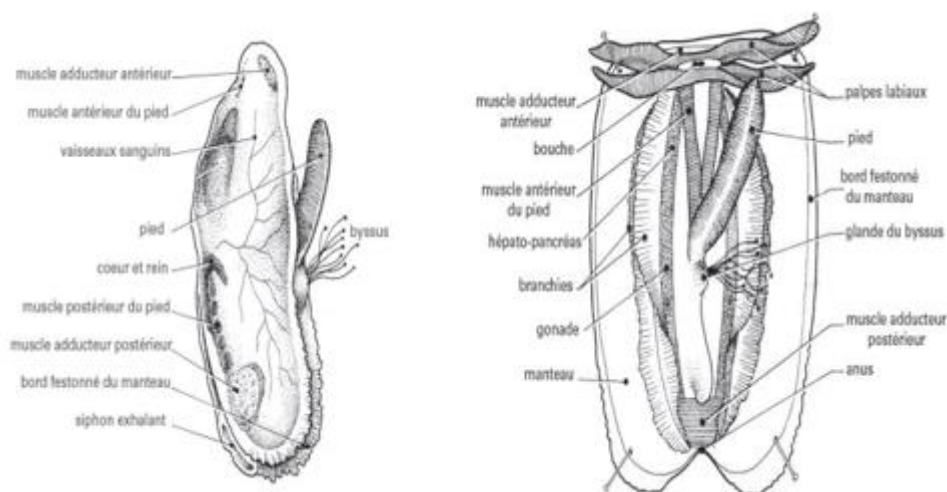


Figure 3: Caractères morphologiques et anatomiques de la moule (Deconinck, 1971).

2. Physiologie

Les moules sont des organismes très résistants, solidement fixés et bien protégés par leur coquille, ils assurent comme tous les animaux les fonctions vitales. Selon (Marteil, 1976), le corps de la moule est caractérisé par :

▪ Le système respiratoire

Chez les Mytilidés, Les branchies, sont arrangé une de chaque côté, comprennent chacune un axe longitudinal soudé au manteau (His et Cantin, 1995). Elles représentent les organes de respiration, situés à l'extrémité postérieure, trais caractéristique des lamellibranches. Constituée chacune de deux rangées de filaments vibratiles aplatés, ces feuilletts opèrent deux

séries de phénomènes, la respiration et la filtration de la nourriture à partir de l'eau. Car c'est à leur niveau que la majeure partie du sang s'oxygène, mais elles jouent aussi un rôle extrêmement important dans l'alimentation en retenant les particules en suspension (**Marteil, 1976**).

▪ Le système circulatoire

Les bivalves ont un système circulatoire ouvert et les organes, baignent dans le sang «l'hémolymphe». Le cœur, est formé de deux oreillettes et un ventricule, logé au niveau de la face dorsale du corps (**Marteil, 1976**). Envelopper d'une mince membrane transparente nommée le péricarde. Le sang, est chassé dans deux aortes, une antérieure et l'autre postérieure, passe ensuite dans des artères et des artéριοles et aboutit à des lacunes (les sinus) où il circule sans être endigué, baignant les tissus qui prennent un aspect spongieux (**Marteil, 1976**). Le sang est ensuite poussé dans les veines et ramené au cœur. Presque incolore, la présence d'hémocyanine (pigment respiratoire) lui confère une teinte légèrement bleuâtre.

▪ Le système nerveux

Le système nerveux est décentralisé car il n'y a pas de cerveau. Il comporte trois ganglions ; les ganglions cérébro-pleuraux, de chaque côté de la bouche, les ganglions pédieux, à la base du pied, et les ganglions viscéraux, près du muscle adducteur postérieur (**Marteil, 1976**). Issus des ganglions, les nerfs de commissures et des connectifs innervent les différentes parties du corps.

▪ Système reproductive

L'espèce *Mytilus africanus* est gonochorique, sans dimorphisme sexuel. De très rares cas d'hermaphrodisme ont été signalés chez les Mytilidés (**Boutan, 1900 ; Coe, 1943 ; Lubet, 1959 ; Lucas, 1965**). La gonade est constituée d'un ensemble de follicules au sein desquels vont évoluer les cellules germinales lors de la spermiogénèse ou de l'ovogénèse. Les sexes sont séparés. Elles sont envahies dans le manteau qui se colore progressivement lors de la maturité, il est gorgé de spermatozoïdes ou d'ovocytes. Un manteau rouge orangé indique une femelle tandis qu'un manteau blanc, ou jaune pâle, indique un mâle (**Fig.4**).

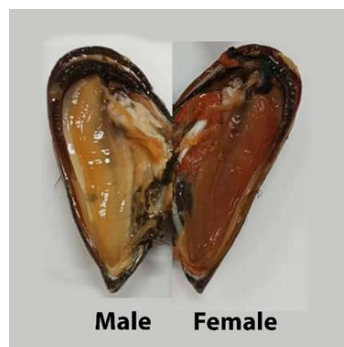


Figure 4 : Vue interne des deux sexes chez les moules.

▪ Le système digestif

L'appareil digestif est composé par la bouche située à la partie antérieure du corps, entourée de deux paires de palpes labiaux (Marteil, 1976), qui sont des dépendances de ses lèvres et dont les deux faces internes portent des ondulations plus ou moins parallèles aux filaments branchiaux. Les palpes, grâce aux cils des plis de leur face interne, servent à trier les éléments acheminés vers eux par les branchies. Former par un très court œsophage qui débouche dans l'estomac auquel partent des canaux. Ces derniers se terminent en diverticules digestifs qui forment autour de lui une masse brunâtre appelée la glande digestive ou l'hépatopancréas (organe qui présente le foie) (His et Cantin, 1995). Les muscles rétracteurs du pied recouvrent l'hépatopancréas. L'intestin est relié à l'estomac et se termine par le rectum qui traverse le ventricule du cœur. L'anus est situé près du siphon exhalant (Marteil, 1976) (Fig.5).

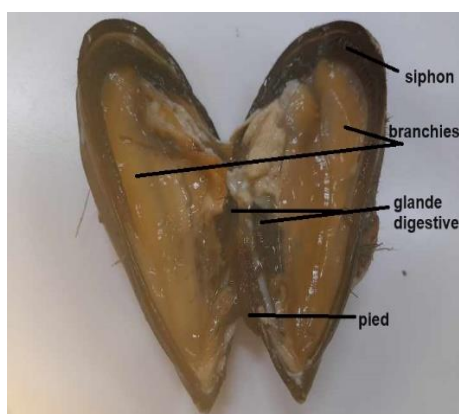


Figure 5: Emplacement de l'hépatopancréas (glande digestive).

3. Nutrition

La moule est un animal filtreur qui vit au dépend des particules en suspension dans l'eau. Ces particules sont principalement constituées de phytoplancton, bactérioplancton, détritiques organique et micro-zooplancton. Elles sont retenues grâce au mucus qui tapisse les branchies et passent sur le filtre branchial, puis elles sont guidées vers la région antérieure de l'animal et canalisées vers la bouche par les palpes labiaux (Bayne *et al.*, 1993 ; Bayne, 1998).

Ils vivent fixés sur un substrat, ce sont donc des collecteurs passifs et leur nutrition est conditionnée par la circulation d'eau qui véhicule les particules alimentaires. Le taux de pompage est très élevé chez ces mollusques de 50 à 70 litres environ par vingt-quatre heures (Desgouille, 1969).

4. Cycle de vie

Le cycle biologique des moules peut être continu chez *P. perna* alors qu'il est réparti tout au long de l'année chez *mytilus galloprovincialis* (**Lubet, 1959**). Cela pourrait être lié au facteur interne, à savoir l'horloge biologique neuroendocrinienne, ainsi qu'au conditions environnementales essentiellement la température et la nourriture, (**Gosling, 2003 ; Saraiva et al., 2012**). Il comporte plusieurs étapes : la croissance, qui conduit à la gamétogénèse, c'est une phase où les gamètes atteignent leur maturité, et sont fécondées, la ponte est enclenchée, survient alors une phase de repos sexuel, qui nécessite une restauration des réserves, et le rétablissement des gonades. Les facteurs externes agiraient alors comme synchronisateurs en allongeant ou diminuant les phases de gamétogénèse (stade II ou stade III de restauration) ou en déclenchant la période de repos sexuel (stade 0) (**Lubet, 1973**).

Lorsque les animaux sont mûrs et les conditions environnementales sont adéquate, la ponte est enclenchée et les gamètes sont relâchés dans l'eau. La présence de gamètes dans l'eau fournit un puissant stimulus chimique aux congénères matures qui n'auraient pas encore pondus. Leur vie en agglomération, facilite la fécondation. Une fécondation externe qui donne des larves microscopiques planctoniques vagiles. Survient alors une vie pélagique des larves qui va durer en moyenne une trentaine de jours (**Lubet, 1973**). Durant cette période, différents stades larvaires se succèdent (trochophore, véligère-D, pédivéligère).

Les larves se fixent alors sur un substrat, c'est la phase de fixation aussi appelée période de recrutement : la larve a perdu son vélum et ses capacités de nage, elle est munie maintenant d'un pied, elle devient ainsi compétente pour la métamorphose et se transforme en moule juvénile (**Fig. 6**).

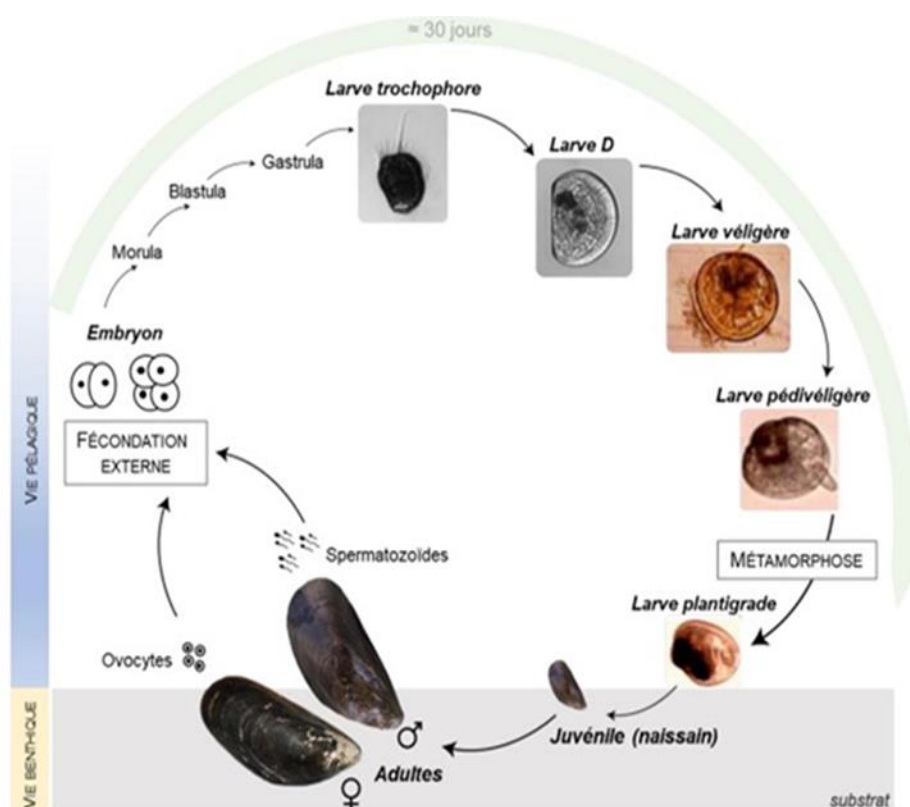


Figure 6: Cycle biologique des moules (Jahangard *et al.*, 2010)

III. L'intérêt de l'espèce

Les Mytilidés se distinguent par leur excellente fécondité, leur adaptabilité aux différents milieux et leur large distribution. D'autre part, par leur importance économique et leur comestibilité ce qui contribue à faire de la moule un excellent produit d'exploitation en aquaculture. *Perna perna* est récoltée pour l'alimentation en Afrique et en Amérique du Sud. Cette espèce peut atteindre une taille commerciale de 60 à 80 mm en seulement 6 à 7 mois, elle est caractérisée par son adaptation remarquable aux zones tropicales et subtropicales, c'est pourquoi sa culture est envisagée.

Ainsi fortement exploitée à partir des bancs naturels et plus encore par aquaculture ou mytiliculture (Fischer *et al.*, 1987). De plus cette espèce est comestible et appréciée pour sa chair d'excellente valeur nutritionnelle et peu calorique (108 Cal/100g) mais concentrées en oligoéléments (fer, iode, sélénium), aussi en omega-3 et contiennent de bonnes teneurs en vitamine du groupe B (B1, B2, B3, B9 et B12). Ce produit alimentaire est consommé frais, congelées ou en conserves ou bien alors en appât, sa présence est régulière sur les marchés (Lubet, 1973).

Chapitre II

Habitat

Et Pollution

HABITAT ET POLLUTION

I. Origine et habitat de *Perna perna*

Originnaire du continent Africain, la moule brune est aujourd'hui confrontée à l'espèce européenne localement invasive *M. galloprovincialis*. L'espèce *Perna perna* a une large répartition à travers les régions tropicales et subtropicales de l'océan Atlantique, aussi bien sur les côtes Africaine de l'ouest au Sénégal et au Congo, que du côté de la Mauritanie et le Maroc. D'autre part, elle peuple les côtes Méditerranéenne Algérienne et Tunisiennes. De même que de l'autre côté de l'atlantique elle est bien présente sur les côtes de l'Amérique du sud comme le Brésil, le Chili et le Pérou jusqu'au Caraïbe (**Lubet, 1973**). Elle peuple ainsi le littoral Malgache du côté de l'Afrique de l'est, jusqu'à celui de l'Afrique du sud (**Fig.7**). Cette espèce peut être invasive, c'est le cas du Texas où elle a été introduite accidentellement via les coques de bateaux.

Cet animal subsiste grâce aux fibres de ses byssus sur des substrats très divers dans les eaux intertidales et côtières. On le trouve généralement entre 6 et 9 m de profondeur et plus précisément entre 17 m et même 30 à 40 m de profondeur sur les rochers du littoral. Les moules résistent aux courants et à la force des vagues grâce à des fibres byssales très résistants soudés aux rochers. Elles sont donc considérées ainsi comme grégaires, sessiles et filtreuses. Elles forment de cette façon des agrégats denses. Ou les conditions hydrodynamiques vont impacter l'habitat des moules et sera très variés. Un nombre considérable d'espèces vivent dans la zone infratidale, où les vitesses des courants d'eau sont en générale inférieures à 1m/s (**Suchanek, 1986 ; Gaylord et al., 2003**). Certaines autres espèces sont adaptées aux rivages intertidaux, où elles subissent de puissants courants provenant des vagues déferlantes dont l'espèce *P. perna*. La force générée sur les moules les contraignent à maintenir une force de fixation du byssus leur permettant de résister à d'importantes forces hydrodynamiques (**Denny, 1985 ; Carrington, 2002**).

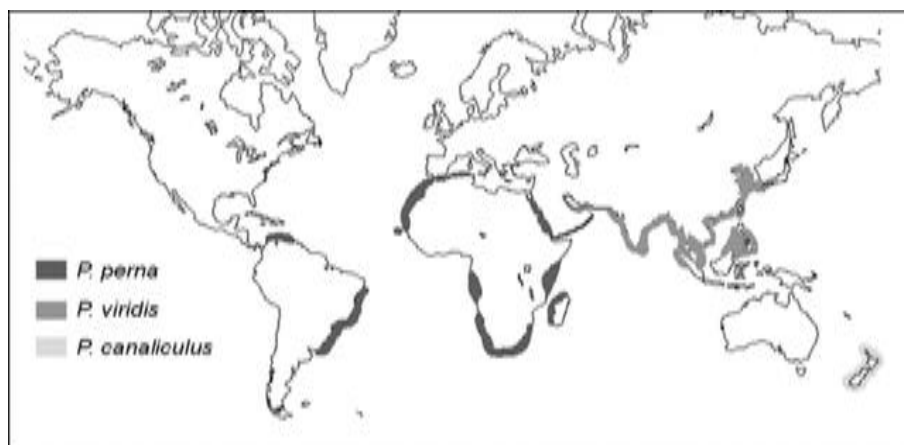


Figure 7 : Distribution mondiale de l'espèce *Perna perna* (Wood *et al.*, 2007).

1. Biotope

La moule *P. perna* est très variable dans son environnement, similaire à *M. galloprovincialis*, elles se confondent facilement. Cette dernière partage le même habitat naturel de la moule brune. Elle a une répartition écologique étudiée et très étalée, elle occupe le substrat dur du niveau infralittoral et elle prolifère entre 0 et 40 mètres de profondeur est fortement présente dans les eaux saumâtres des lagunes côtières. Son byssus est plus résistant que celui de *M. galloprovincialis* et d'autant plus chez les moules individuelles que les moules issues de bancs de moules naturels. Ceci est probablement dû au grand nombre et à l'épaisseur des fils de byssus.

Différentes répartitions des espèces sont observées selon l'âge des individus (Lubet, 1973 ; Dardignac-Corbeil, 1976). Ces mollusques se reproduisent par fécondation externe pendant la saison de frai de mai à octobre. Les larves qui émergent par fécondation et atteignent le stade véligère (environ 90 à 200 μm) s'installent dans le mésoplancton côtier entre 0 et -10 m, se transforment en larves benthiques ou en larves pédivéligères, qui se pose sur les algues dans l'infralittoraux supérieur. Au stade juvénile (environ 2 mm), il s'attache aux rochers ou aux moules existantes, généralement le byssus des moules adultes. Par conséquent, ils colonisent les niveaux infralittoraux supérieurs et médiolittoral inférieurs ou des zones spécifiques de substrats secondaires. Ces larves préfèrent les substrats rugueux, propres et sans boue. Au stade adulte, les limites de répartition des moules sont ascendantes dans la partie inférieure de la côte centrale et descendantes dans la région côtière inférieure.

2. Propriété physicochimique du milieu de vie de

Certains éléments peuvent agir sur la répartition des moules. En effet, la multiplication et la croissance des espèces sont optimales dans une stabilité thermique et saline. L'espèce *P.*

perna est connue par son adaptation aux variations des conditions du milieu : elle peut supporter ainsi des températures de 13°C en hiver et entre 27 et 28°C en été, ainsi que des taux de salinités entre 7 et 40‰ (**Lubet et Chappuis, 1966**). On les trouve alors au niveau méso-littoral et dans les zones submergées (**Lubet, 1959**). De plus, la température joue un rôle déterminant dans les schémas de croissance de cette espèce et intervient dans l'effort de sa reproduction. L'oxygène dissous a aussi une certaine influence sur la filtration. Les travaux de **Lubet** en **1973** ont noté un arrêt de la filtration à 15°C lorsque la concentration en oxygène dissous descend en dessous de 3 ml. Quant à la salinité, **Renzone (1963)**, a constaté que la filtration était très dominée, voire arrêtée, aux salinités inférieures à 15‰ et supérieures à 40‰. L'optimum se situerait entre 30 et 38‰. Il faut aussi souligner l'interaction des facteurs. **Lubet** en **1973** rapporte qu'à 15°C, il y a pompage lorsque la salinité est comprise entre 19 et 43 ‰.

3. Écologie

La moule est une espèce benthique qui peuple la zone médiolittorale. Elle se fixe aux substrats durs comme les roches. Il est désormais bien établi que les contaminants chimiques issus de l'activité humaine sont nocifs pour les espèces vivantes. Ce sont des polluants qui peuvent être retrouvés en concentrations plus élevées dans les organismes marins que dans le milieu environnant (**Goldberg, 1975 ; Andral et al., 2004**), elles se présentent en un excellent bio-indicateur de la qualité des eaux marines. Cette espèce est largement utilisée dans les études de surveillance des polluants du milieu marin. Effectivement, selon **Goldberg, 1975** pour constituer un bon « bioindicateur quantitatif », les espèces animales étudiées doivent avoir les qualités suivantes :

- ❖ Doit concentrer le contaminant, sans effet léthal, aux concentrations rencontrées dans l'environnement.
- ❖ Large répartition géographique permettant des comparaisons de niveaux de contamination entre sites distants.
- ❖ Doit être sédentaire afin d'être représentatif de la zone d'étude.
- ❖ Une abondance dans le site étudiée.
- ❖ Une durée de vie suffisamment longue pour permettre un échantillonnage de plusieurs classes d'âge.
- ❖ L'espèce est appelée bradictyque, se caractérise par la présence de sujets matures toute l'année dans les populations naturelles, ce qui facilite le prélèvement et l'obtention d'échantillons représentatifs. Il doit accumuler suffisamment de polluant pour permettre des dosages sans pré-concentration.

- ❖ Il doit y avoir une relation entre la teneur en contaminant dans l'organisme et la concentration dans l'eau environnante, la concentration dans les tissus reflétant ainsi la biodisponibilité du contaminant dans l'environnement.

4. Pollution marine et prolifération des populations de moules

Les moules se propagent abondamment dans les zones subissant une forte pollution bactériologique tel que les zones portuaires, et bouches d'égout. La recherche de germes pathogènes occupera une place fondamentale dans le choix des emplacements destinés à l'élevage de moules, à l'exploitation des gisements naturels et au contrôle des stations d'épuration (**Lubet, 1973**). Les moules ont la capacité d'accumuler certains carbonés cancérigènes (Benzopyxine). Il semblerait que certains insecticides qui restent à déterminer auraient un impact sur la formation et la fixation du byssus ; les animaux atteints se détachent du substrat. (**Lubet, 1973**).

5. Bioaccumulation de polluants chez les moules

La bioaccumulation est la faculté de certains organismes à absorber et concentrer des polluants dans l'organisme. Les substances non biodégradables seront concentrées le long des différents maillons de la chaîne alimentaire (**Casas, 2005 ; Bodin, 2005**). Les moules accumulent les polluants dans leurs organes privilégiés : les reins, les branchies, le manteau et l'hépatopancréas. La moule qui filtre en permanence l'eau de mer pour se nourrir et respirer accumulent d'énormes quantités d'oligo-éléments si l'eau est polluée (**Taleb et Boutiba, 2007**), d'autre coté, elle « libère » ces éléments si elle se retrouve dans une eau propre. Cette biologie particulière désigne cet organisme comme un témoin incomparable de la pollution marine locale au même titre que certains organismes marins planctoniques (**Meddah et Sakhara, 2021**). L'organisme a recours à ce phénomène pour concentrer une substance à une concentration supérieure à celle de l'environnement par l'intermédiaire de toutes les voies d'exposition y compris alimentaire. Ce processus résulte du rapport entre la vitesse de l'absorption de la substance par le corps moyennant, la respiration, la diffusion cutanée et l'alimentation, et la vitesse de l'expulsion par les échanges respiratoires, le métabolisme et la dilution par la croissance, ce rapport est nommé le facteur de bioaccumulation. (BAF) (**Orias, 2015**). Ce phénomène de bioaccumulation est d'une importance primordiale car si une substance polluante s'accumule dans un organisme, sa concentration augmente au cours de la vie, augmentant ainsi le risque d'effets toxiques (**Lecomte, 2021**).

6. Biosurveillance

Pour évaluer le risque environnemental lié aux polluants, des analyses chimiques sont utiles mais insuffisantes. Par conséquent, la mesure des effets de substances sur le vivant, nécessite donc l'utilisation du vivant (**Lecomte, 2021**).

Apparue à partir des années 1980, cette approche, est appelée bio surveillance. Elle désigne l'ensemble des outils fondés sur l'utilisation d'organismes ou d'ensembles d'organismes à tous les niveaux d'organisation moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique et biologique écologique pour suivre l'évolution des transformations et des altérations ou la stabilité de la qualité (**Piren-Seine, 2011**).

II. Pollution marine

L'introduction directe ou indirecte de déchets, de substances ou d'énergie, peut définir la pollution marine, également les sources sonores sous-marines d'origine humaine. Ce phénomène a des effets négatifs sur les organismes vivants et les écosystèmes marins (**Goeury, 2014**).

D'autre part, la pollution est toute changement anthropique d'un écosystème entraînant une modification de la concentration de composants chimiques naturels, ou résultant de l'introduction de molécules chimiques artificielles, autrement dit, tout bouleversement du flux d'énergie, de l'intensité des rayonnements, du flux de la matière, également toute altération d'une biocénose naturelle provoquée par l'introduction d'espèces exotiques envahissantes (**Ramade, 2007**). Avec pour résultat un épuisement de la biodiversité mène à des menaces pour la santé humaine, des obstacles aux activités maritimes, et particulièrement à la pêche, au tourisme et aux loisirs (**Goeury, 2014**).

Concrètement, la pollution de l'eau est une altération qui rend son utilisation périlleuse, ou bouleverse l'écosystème aquatique, visant ainsi les eaux de surface tel que les rivières, les plans d'eau, ou bien les eaux souterraines (**Coulet, 2005**).

1. Types de pollutions

Les masses maritimes ont généralement été estimées comme étant des zones de dilution de la pollution humaine terrestre. De nombreuses villes côtières ne sont toujours pas équipées de système de traitement des eaux usées, mais reposent plutôt sur la construction de canalisations d'évacuation de plus en plus profondes pour disperser les eaux usées urbaines et industriels au gré des courants. De la même manière, aujourd'hui encore, lors de grandes catastrophes technologiques, tel que celle de Fukushima en 2011, les autorités s'appuient sur des capacités

de dilution plutôt que de prendre en charge le stockage et le retraitement des eaux infectées (Goeury, 2014). Elle peut être :

- De nature chimique : En général, issue de l'activité industrielle par des substances minérales et chimiques.
- De nature physique : due aux rayonnements ionisants et à l'échauffement par une source de chaleur technologique, ou peut être produite par une source de bruit ou de lumière.
- De nature organique : toute substance toxique d'origine naturelle telle que les toxines des algues, ou les germes pathogènes, ou les parasites.
- De nature diverse : déchets flottant à la surface ou dans la colonne d'eau, déchets déposés dans les fonds marins, déchets rejetés sur les plages et sur le littoral.

2. Sources de pollution marine

L'océan est la destination finale d'une grande partie de nos déchets. Les déchets les plus fréquemment retrouvés sont les mégots de cigarettes, les paquets de chips et les emballages de bonbons, les cotons-tiges, les sacs et les bouteilles. Les déchets transformés se trouvent dans les habitats marins du monde entier, jusqu'au pôle Nord et Sud, en surface, en profondeur et au large. Plusieurs sources de pollution menacent les eaux maritimes :

- **Pollution urbaine** : elle provient des logements et des villes fluviales ou côtières, qui ne disposent pas des assainissements adéquates pour l'acheminement et l'épuration des eaux usées. Il se caractérise entre autres par des taux élevés de matières organiques, de sels minéraux, y compris l'azote et le phosphore, de détergents et de germes fécaux.
- **Pollution d'origine agricole** : La pollution des eaux attribuable à l'agriculture est liée, notamment, au ruissellement et au lessivage des nutriments utilisés en agriculture intensive, en particulier, les engrais chimiques et les effluents d'élevage, et aux pesticides pendant leur utilisation ou leur élimination. Cette pollution peut nuire aux milieux aquatiques et à ses écosystèmes, aux activités de pêche commerciale en eau douce ou en mer.
- **Pollution industrielle** : La pollution industrielle comprend les matières en suspension, les sels dissous, les hydrocarbures, les oligo-éléments ou micropolluants et les rejets acides ou basiques, les matières radioactives, les eaux chaudes des stations thermiques rejetées directement ou indirectement dans les sources d'eau éliminées par les installations industrielles (Chevallier, 2007). Les pluies acides qui résultent principalement de la pollution atmosphérique, elles peuvent transporter des fumées provenant de l'industrie, des transports ou des habitations (Goeury, 2014), ces rejets de déchets dangereux finissent toujours dans la mer donc risques pour l'écosystème. Il ne faut pas non plus négliger l'impact

de la pollution pétrolière liée au trafic maritime (**Albakjaji, 2011**). 20 % de cette pollution résulte des activités maritimes, et peut aussi découler des rejets illégaux de gaz des navires appelée dégazage sauvage, des lignes de navigation commerciale et touristiques et de pêche.

- **Pollution par phénomènes naturels** : Les éruptions volcaniques, les hydrocarbures sous-marins, certaines filons géologiques de métaux, les sources thermales minérales, peuvent être à l'origine de cette pollution (**Faurie et al., 2012**).

3. Les polluants

Un polluant est une matière naturelle ou artificielle que l'homme a introduite dans un environnement ou elle était absente au paravent ou bien présente, mais en différentes quantités. Toute substance ou produit chimique est donc potentiellement polluant. Qui plus est, comme le disait à juste titre Paracelse, célèbre médecin et alchimiste suisse du XV^e siècle, « rien n'est poison, tout est poison, seule la dose fait le poison » (**Lecomte, 2019**). Pourtant, il y a des substances qui sont plus toxiques que d'autres et donc plus nuisible pour l'environnement. Dans cet écosystème, les organismes vivants sont donc inévitablement exposés à ces substances et doivent pouvoir faire face à leurs propriétés potentiellement nocives qui ne peut être éliminé de l'organisme ni réactivé chimiquement avec certains constituants cellulaires (**Beaune et Loriot, 2000**).

3.1. Les micropolluants

Les micropolluants sont des substances décelables dans l'environnement à des concentrations minimales (microgramme par litre voire nanogramme par litre). L'activité humaine est en partie la première responsable de leur présence, principalement les procédés industriels, les pratiques agricoles ou bien les activités quotidiennes, et qui a des concentrations infimes, peut provoquer des effets nocifs sur la santé des êtres vivants du fait de leur toxicité et leur persistance surtout qu'ils sont non biodégradables autrement dit leur bioaccumulation en raison de leur accumulation dans les tissus de l'organisme (**Lecomte, 2021**). Cela concerne un nombre considérable de molécules aux propriétés chimiques différentes, comme les plastifiants, les détergents, les métaux, les hydrocarbures, les pesticides, les cosmétiques ainsi que les médicaments (**Plan Micropolluants, 2016-2021**).

4. Types de polluants

Les polluants marins ont des répercussions négatifs sur les mers, les océans et leur résidents naturels, ainsi que sur ceux qui vivent au dépend de leurs produits. Ils comprennent les polluants organiques persistants (POP), les perturbateurs endocriniens (EDC), le mercure et les métaux

lourds, les pesticides, les produits pharmaceutiques, le pétrole, les déchets plastiques et leurs produits chimiques associés tel que les BPA, et les phtalates, les produits de soins personnels et autres produits industriels et émissions agricoles (**Avignon et al., 2012**).

De ce fait les produits de la mer peuvent contenir des dangers transmis à l'homme par l'alimentation en particulier les fruits de mer, qui pourrait avoir à long terme un impact sur la santé du consommateur (**Lupo et Angot, 2020**). Les dangers encourus sont simultanément biologiques (virus, bactéries, parasites) et chimiques (toxines, allergènes, substances chimiques, microplastiques). Cette situation conduit à l'apparition de nombreuses maladies non zoonotiques qui affectent les fruits de mer conduisant à une mortalité massive et qui a d'importantes répercussions économiques sur les secteurs de production (**Lupo et Angot, 2020**).

4.1. Métaux lourds

Les métaux lourds sont d'importants contaminants des écosystèmes et des chaînes alimentaires. Également appelés éléments traces métalliques (ETM), sont présents naturellement dans le milieu marin, nombreux processus biologiques dépendent de certains d'entre eux, appelés dans ce cas les oligo-éléments. Néanmoins, ceux dits non essentiels et en concentrations élevées va être toxiques pour les êtres vivants marins c'est le cas de Fe, Cu, Zn, Ni, Se, Mo et Mn (**Francesconi et Duvoisin, 1998**).

Les mollusques, en particulier les moules, peuvent accumuler de grandes quantités de métaux (Zn, Cu, Cd, Hg, etc.) dans leurs tissus. Les métaux lourds sont nocifs si leur concentration augmente tel que : Al, As, Cd, Cr, Hg, Pb (**McLaughlin et al., 1999**). La contamination du milieu aquatique par des métaux d'origine localisée peut avoir des effets néfastes, c'est-à-dire des effets toxiques aigus ou chroniques, sur la vie aquatique de la zone concernée. La plupart des données publiées à ce jour concernant les effets des métaux sur les organismes marins désignent notamment que ces effets nocifs se produisent si les concentrations dépassent un seuil minimal à celui généralement trouvées dans l'environnement (**Gesamp, 1985 ; Gesamp, 1988**). Ils ne sont pas biodégradables et se retrouvent en grande quantité dans le corps des animaux situés au sommet de la chaîne alimentaire comme les cétacés, les humains et divers prédateurs. Sous l'effet de la bioaccumulation, c'est-à-dire l'absorption et la concentration de certaines substances chimiques, présentes dans un environnement, par un organisme (**Dardignac, 1996**). Ce sont de véritables poisons qui, peuvent constituer un réel danger sur l'organisme, à moyen ou à long terme. Ils peuvent affecter les fonctions du système nerveux, des reins, du foie et des voies respiratoires.

4.2. Les hydrocarbures

Les hydrocarbures, chimiquement parlant, sont des composés organiques constitués uniquement d'hydrogène et de carbone (**Feknous, 2017**), ayant la formule générale (C_x, H_y). Ils représentent la plus grande source de pollution de l'eau de mer. Le terme « hydrocarbure pétrolier » (HCP) est un terme général utilisé pour désigner les mélanges de composés organiques contenus dans des dérivés de matériaux géologiques tel que l'huile, l'asphalte et le charbon ou dérivés de ces matières (**Standards et Pancanadiens, 2008**). Les hydrocarbures constituent la plus grande partie du pétrole brut, ils représentent entre 65 à 95 % de la plupart des pétroles bruts. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre grandes familles avec des proportions variables selon l'origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltes (0 à 10 %) (**Soltani, 2004**). Les hydrocarbures liquides notamment le pétrole sont rejetés en mer, affectant l'écosystème marin. Il a été constaté que les accidents de type « marée noire » comme l'Erika ou le Prestige ne représentent que 6 % des hydrocarbures déverser dans l'océan, même s'ils sont très médiatisés. A l'opposé, on observe que la majorité de ces émissions polluantes (53%) sont d'origine urbaine domestiques, et (20%) proviennent des rejets non pétroliers opérationnelles et accidents de navire (**Lecomte, 2019**).

4.3. Les pesticides

Les pesticides sont des produits (composés chimiques) délibérément répandus dans l'environnement par les agriculteurs pour lutter contre les organismes vivants considérés comme nuisibles : animaux, plantes, micro-organismes. La première utilisation intensive d'un pesticide, (DDT), remonte à l'époque de la Seconde Guerre mondiale (**Lecomte, 2019**).

Un nombre considérable de pesticides depuis (plus de 20 000 produits pesticides contenant près de 900 substances actives) sont utilisés comme herbicides, insecticides, fongicides, rodenticides, acaricides, produits de préservation du bois, fumigants et régulateurs de croissance des plantes (**Weiss et al., 2004**). Les pesticides sont formulés sous forme liquide, solide ou gazeuse. Les formulations liquides comprennent les suspensions (suspensions concentrées), les solutions, les concentrés émulsionnables, les suspensions de microcapsules et les aérosols (**Cahen, 2006**). Les principaux pesticides actuellement utilisés appartiennent à quelques grandes familles chimiques :

- **Les organochlorés (hydrocarbures chlorés)**, comme le DDT synthétisé dans les années 1940, sont des pesticides très stables chimiquement. Le DDT était utilisé partout dans le monde

dans la lutte contre les insectes, jusqu'à ce qu'on découvre qu'il était peu dégradable et pouvait se concentrer dans les organismes situés en fin de chaîne alimentaire, par bioaccumulation, avec des risques pour la santé humaine.

- **Les organophosphates** sont des composés synthétiques qui se dégradent relativement rapidement dans l'environnement mais qui ont des effets neurotoxiques sur les vertébrés.
- **Les pyréthriinoïdes** sont des insecticides de synthèse très toxiques pour les organismes aquatiques.
- **Les carbamates**, très toxiques, sont utilisés comme insecticides et fongicides.

Les produits phytosanitaires, qui regroupent un très grand nombre de produits de la famille des triazines ou des fongicides, représentent plus de la moitié du tonnage annuel de pesticides utilisés en France. Les effets de ces substances sur les écosystèmes aquatiques sont avérés. Il peut s'agir d'effets directs dus à la toxicité chronique des molécules, ou d'effets indirects dus à l'action de pesticides qui modifient l'écosystème ; par exemple, l'altération des populations de certains prédateurs, du fait de la diminution des insectes « nuisibles » qui constituent leurs proies (Lecomte, 2019).

4.4. Les eaux usées

Les eaux usées urbaines (URE), sont des eaux provenant principalement de l'activité humaine, ces effluents résiduelles contiennent des substances polluantes de toute sorte, qui peut être solubles ou non, (Rejsek, 2002). C'est un mélange de matières polluantes répondant à des catégories divers, dispersées ou dissoute dans les eaux à usage domestiques ou industriels. (Grosclaude, 1999). Parmi elles on distingue les eaux usées domestiques (eaux usées et eaux grises), les eaux de ruissellement et les effluents industriels (eaux usées d'usines) (Baumont *et al.*, 2004).

4.5. Ruissellement

Le ruissellement est un écoulement diffus d'eau à la surface d'un sol déjà saturé en flote, se chargeant de sédiments et de matière organique avant d'atteindre un cours d'eau. Les eaux pluviales peuvent collecter des polluants atmosphériques et terrestres et les transporter vers les eaux réceptrices. À la surface d'un substrat cette eau s'écoule, entraînant une érosion et collecte notamment des matières organiques ou des substances inorganiques qui peuvent alors s'y déposer, véhiculant une biopollution, surtout lors du ruissellement urbain. Ainsi les eaux de lavage sont polluées par des matières provenant des trottoirs et des routes (fioul, bitume). Charger notamment en zinc, plomb et cuivre (Guré et Gomella, 1982).

Chapitre III

Stress Oxydatif

STRESS OXYDATIF

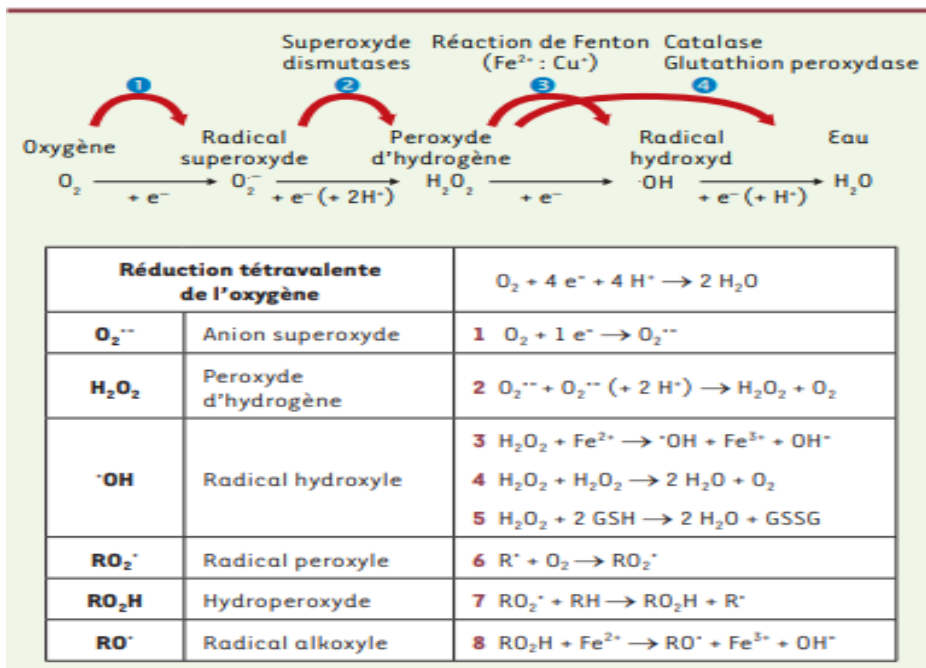
1. Définition

Le stress oxydatif, nommé également pression oxydative, désigne un processus au cours duquel une agression des constituants de la cellule est mise en place, produite par un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires, dite aussi réactives de l'oxygène (ERO) et le pouvoir antioxydant cellulaires (**Migdal et Serres, 2011**). Un radicale libre est un atome, une molécule ou espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non appariés, cela leurs procurent une forte réactivité. En **1956**, le chimiste **Denham-Harman** émis l'hypothèse selon laquelle les radicaux libres (RL) ont un rôle important dans le processus de vieillissement chez l'homme, il a dévoilé que l'accumulation de dommages cellulaires et moléculaires par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) pourrait accélérer le vieillissement.

2. Les différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Un radicale libre est une espèce chimique, neutre ou chargée, qui a la spécificité de porter un électron célibataire, autrement dit il est non apparié sur sa couche externe, cela le rendra généralement instable avec une capacité à interagir rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes. Il produit des réactions de transfert d'électrons nommé réaction d'oxydoréduction, nommé aussi réaction redox qui conduit dans la plupart des cas à la formation d'un nouveau radical, ce phénomène peut se répandre par des réactions en chaîne. Les réactions mono-électroniques successives de l'oxygène donnent naissance à différentes ERO: l'anion superoxyde (O^{2-}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Tous les processus qui utilisent l'oxygène dans les différents compartiments subcellulaires ont la capacité de libérer des ERO (**Carrière et al., 2006**) (**Tab.1**).

Tableau 1: Origine des espèces réactives de l'oxygène (Migdal et Serres, 2011)



3. Les produits du stress oxydatif dans la cellule

La réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron, produit un radical chargé négativement, il s'agit de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Ce dernier va subir des dismutations qui vont entraîner la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

L' H_2O_2 est considéré comme un radical libre en raison de sa grande réactivité et son grand pouvoir oxydant. D'autre part, sa faculté à franchir les membranes biologiques lui assure la possibilité de se retrouver à une grande distance de son lieu de production. De cette manière, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et de fer donnera la possibilité de produire le radical hydroxyle ($\bullet OH$), ce radical a une demi-vie aussi courte qu'elle se mesure en nanoseconde, est le plus instable et le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui donne la possibilité de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires présente dans leurs milieux cellulaires. Tel que les protéines, les lipides, l'ADN..., conduisant à des dommages cellulaires considérables. L' $\bullet OH$ se définit comme étant l'espèce radicalaire principale dans le processus cytotoxique des ERO (Gutteridge et Halliwell, 1993).

4. Source des espèces réactives à l'oxygène

De nombreuses sources d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) existent dans la cellule, la plus importante est la mitochondrie, sans négliger chacune d'entre elle, à cause de son

principal rôle dans la bioénergétique et du fait qu'elle soit le cite capitale de la production cellulaire d'ERO, 80% de l'union superoxyde résulte de la chaîne respiratoire (**Carrière et al., 2006**). L'énergie est fournie à l'organisme par la mitochondrie, qui transforme l'oxygène en énergie à l'échelle cellulaire. Néanmoins, libère des radicaux libres (**Breton, 2019**). Cette énergie est produite sous forme d'ATP est nommée phosphorylation oxydative elle est mise en place par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons présentes dans la membrane interne des mitochondries (**Migdal et Serres, 2011**).

- **NAD(P)H oxydases et autres sources cellulaires d'ERO**

La majorité des cellules ont la capacité de produire des radicaux superoxydes O^{2-} , simultanément à la production d'ERO par le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire, via une activité NAD(P)H oxydases membranaire (NOX). La (NOX) est une enzyme qui catalyse la réduction monoélectronique de l' O_2 en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons (**Migdal et Serres, 2011**).



Outre le système enzymatique NOX, d'autre source cytoplasmiques présentes au sein des différents organites, peuvent produire des ERO, en l'occurrence :

La xanthine oxydase, qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines, cause la formation d' O^{2-} .

Les enzymes du réticulum endoplasmique, notamment la famille des cytochromes P450, garantissent l'oxydation des acides gras insaturés et de certains xénobiotiques, réduisent l'oxygène moléculaire pour former O^{2-} et /ou H_2O_2 .

Les enzymes de la voie de l'acide arachidonique, les peroxysomes, les lysosomes qui contiennent la myéloperoxydase responsable de la formation d'acide hypochloreux, et le noyau dans lequel loge des cytochromes oxydases et une chaîne de transport d'électrons, produisent aussi du peroxyde d'oxygène O^{2-} (**Delattre et al., 2005**).

5. Les antioxydants

Dans la cellule normale on trouve les ERO à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants (**Halliwell et Gutteridge, 1989**). De cette manière, à l'état de repos, la balance antioxydants /pro-oxydants appelée aussi balance redox est en équilibre.

Les antioxydants constituent un véritable rempart naturel contre les radicaux libres, car ils interagissent avec eux et les stabilisent en les neutralisant, les rendant ainsi anodin (**Shinde *et al.*, 2012**). Dans l'organisme, il existe deux types d'antioxydants : ceux déjà existants dans le corps, nommés antioxydants endogènes, et ceux qui découle de l'environnement extérieur, désignés antioxydants exogènes. Chacun a des caractéristiques spécifiques ;

5.1. Les antioxydants endogènes

L'organisme vivant est doté de défenses naturelles grâce aux antioxydants endogènes qu'ils synthétisent. Ces antioxydants peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques.

5.1.1. Les antioxydants enzymatiques

Les plus commune sont le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutarédoxine (GRx). Ils ont un rôle primordial dans la neutralisation des radicaux libres pour les rendre anodins. Ces enzymes sont liées à des éléments comme le zinc, le sélénium, le cuivre ainsi que le magnésium, sans lesquels ces enzymes ne peuvent être actifs et efficaces (**Limón-Pacheco, 2009**). On les nomme ainsi « cofacteurs » (**Breton, 2019**).

5.1.2. Les antioxydants non-enzymatiques

Des molécules présentes dans le sang, appelés antioxydants non-enzymatiques, représentent la plus grande partie de la capacité antioxydante de l'organisme (**Breton, 2019**). Sont aussi responsable de la faculté antioxydante endogène de l'organisme (**Wu *et al.*, 2013**), et qui opèrent en désactivant les radicaux libres. On peut citer le glutathion, le coenzyme Q10, l'albumine, l'acide urique et l'acide ascorbique.

6. Les antioxydants exogènes

Des antioxydants exogènes qui passent par l'alimentation, viennent de l'extérieur pour renforcer les défenses de l'organisme contre les radicaux libres en les neutralisant. Parmi eux on retrouve la vitamine C, la vitamine E, et la vitamine A (**Limón-Pacheco, 2009**). Mais aussi du zinc, du sélénium, ou encore du cuivre. Les caroténoïdes et les polyphénols, sont des molécules présentes dans les végétaux, sont d'excellents antioxydants. Une bonne alimentation est donc primordiale pour un équilibre dans la balance redox (**Breton, 2019**).

6.1. Rôle physiologique des ERO

Les organismes vivants on développer des mécanismes leur permettant à la fois de les adaptés et coexister avec les radicaux libres ERO, et de les utiliser à leur faveur. Ces ERO

constituent un vrai paradoxe, d'une part leur potentielle toxicité pour l'organisme et leur rôle essentielle à la signalisation et à la régulation cellulaires. Une double potentialité expliquée par le fait que les réponses cellulaires varient d'une manière très sensible et différente proportionnellement à la nature chimique de l'ERO, de son seuil de production liés à l'effet dose-dépendant ou encore du site producteur (**Migdal et Serres, 2011**).

Elles sont produites en quantité minime, et jouent le rôle de messagers secondaires, outre la régulation de l'apoptose ou l'activation des facteurs de transcription. Mentionnons le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent une quantité assez importante d'ERO pour pénétrer la paroi membranaire de l'ovule (**Haleng et al., 2007**).

De cette façon, parmi les fonctions physiologiques avec des constituants radicalaires, on peut citer aussi : la régulation du tonus vasculaire, la relaxation du muscle lisse, l'adhésion plaquettaire, la régulation des fonctions contrôlées par la concentration en oxygène (**Dröge, 2002**).

6.2. Les marqueurs du stress oxydatif

Un ensemble complexe de paramètres sont impliqués dans le processus de stress oxydatif qui ne peut être mis en évidence par une seule méthode aussi élaborer soit elle (**Dalle-Donne et al., 2006 ; Pincemail et al., 1996**). Différents marqueurs réalisés en routine clinique, utilisant un traitement pré-analytique rigoureux de l'échantillon. Ces marqueurs sont repartits en quatre axes (**Haleng et al., 2007**).

7. La détermination des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques

Parmi une large liste de paramètres citons quelques un :

- Le rapport vitamine C/ α -tocophérol : ce sont deux antioxydants qui fonctionnent en synergie avec une valeur optimale qui doit impérativement dépasser 1,3. Un seuil inférieur désigne un risque prélevé de développer des maladies cardiovasculaires (**Gey, 1998**).
- Le rapport glutathion réduit (GSH)/glutathion oxydé (GSSG) constitue un excellent marqueur du stress oxydant.

7.1. Le dosage des oligo-éléments

- Le rapport CU/ZN : la formation des ERO est favorisée par la concentration élevée du cuivre qui devient pro-oxydant. Au contraire, le zinc inhibe les réactions radicalaires provoqué par le cuivre. Les données du rapport plasmatique cuivre/zinc constitue très bon

marqueur du stress oxydant. Cela est renforcé par une liaison positive très serrée entre la valeur de ce rapport et la proportion circulante des peroxydes lipidiques (Pincemail, 2007).

7.2. La mesure des dommages oxydatifs au niveau des lipides, de l'ADN et des protéines

- Les isoprostanes : ce sont des marqueurs finals stables de la peroxydation lipidique qui découle exclusivement de l'agression des radicaux libres oxygénés sur l'acide arachidonique. Ils sont stables *in vivo* et *in vitro* (Tsimikas, 2006). D'autre part, leur production *in vivo* est en proportionnelle à l'intensité du stress. Une étude, réalisée chez 2.850 jeunes adultes, a montré la présence de calcifications des artères coronaires chez 10% des malades (Gross *et al.*, 2005).
- Les LDL oxydées et les anticorps anti-LDL oxydées : une augmentation du seuil plasmatique de ces marqueurs est un indice direct de la progression de l'athérosclérose (Tsimikas *et al.*, 2005).

7.3. L'identification de sources génératrices de stress oxydant (inflammation, hyperglycémie, hyperhomocystéinémie)

- Le statut en fer de l'organisme : le fer a un rôle très important dans le transport de l'oxygène, le transfert des électrons et la catalyse enzymatique, ce qui le rend un élément indispensable à la vie. Le fer est un très fort donneur d'électrons à l'état libre, puisqu'il réagit avec l'eau oxygénée, pour donner des radicaux hydroxyles hautement réactifs, appelé réaction de fenton (Haleng *et al.*, 2007).
- La C-Réactive Protéine ou CRP : cette protéine de la phase aiguë de l'inflammation est synthétisée dans le foie et régulée par des cytokines, principalement l'IL-6 et le TNF-alpha. L'inflammation à la pathogénie des maladies chroniques tel que l'athérosclérose dès les stades les plus précoces qui pourrait induire la survenue de syndromes coronaires aigus (Haleng *et al.*, 2007).

8. Les causes du stress oxydatif

Le stress oxydant a le vieillissement comme conséquence directe, un déséquilibre se met en place avec les années ou le seuil de radicaux libres dépasse les capacités antioxydantes de l'organisme (Junqueira *et al.*, 2004), cela va créer des conditions adéquates à l'apparition du stress oxydatif. Le processus inflammatoire et le stress oxydant sont intimement liés (Biswas, 2016). Des espèces réactives et des enzymes sont libérées durant le processus inflammatoire par

la cellule. Toutes ces molécules vont provoquer des dommages sur les tissus et donner un stress oxydatif. Toutefois, le stress oxydatif engendre le déclenchement d'une cascade de message aux cellules induit par la libération de radicaux libres, cela va renforcer l'expression des gènes qui augmentent l'inflammation, et vice versa, l'inflammation peut induire un stress oxydant (Breton, 2019).

9. Le stress oxydant chez les organismes marins

Les milieux aquatiques absorbent et drainent la grande partie de la pollution chimique. Néanmoins, même si la biodiversité dans certains écosystèmes soit altérée, on remarque que les organismes qui subissent cette agression chimique dans ces milieux dégradés, survivent et réussissent même à se reproduire. On constate alors une mise en place de systèmes de défenses qui conduit à l'adaptation des êtres vivant à ces milieux (Pain et Parant, 2003). Chez les organismes marins, les principaux enzymes des systèmes antioxydants observé sont les superoxydes dismutases SOD, les glutathion peroxydases, ces biomarqueurs spécifiques du stress oxydant on était très taux utilisé pour l'évaluation de l'importance de ce dernier chez ces organismes marins (Ramade, 2007). Chez les bivalves, le mécanisme de défense multixénobiotique MDMX qui se résume en un système de pompes membranaires qui a une capacité d'expulsion des composés organiques en dehors de la cellule, c'est un système de protection contre l'action toxique d'une grande envergure de xénobiotiques organiques, en diminuant leurs accumulation cellulaire (Pain et Parant, 2003).

10. l'immunohistochimie (IHC) technique de dépistage histologique

Parmi les conséquences du stress oxydatif sur l'organisme vivant, des altérations histologiques et cellulaires au niveau des différents organes. Ces lésions tissulaires sont aujourd'hui mises en évidence en anatomopathologie par une technique de coloration qualitative. L'immunohistochimie est une technique très largement utilisée car peu coûteuse et facile à mettre en œuvre. Il s'agit de la méthode de localisation cellulaire des protéines dans une coupe de tissu incluses en paraffine, en détectant l'antigène à l'aide d'un anticorps spécifique combiné à une enzyme. Cet anticorps est reconnu par un deuxième anticorps fixé directement sur l'enzyme ou sur un polymère fixé sur cette dernière, c'est une technique d'immunohistochimie indirecte (Tiab *et al.*, 2013). Cette enzyme est la peroxydase de raifort, également connue sous le nom de HRP, ou la phosphatase alcaline, également connue sous le nom d'AP. Le couple anticorps/enzyme/antigène interagit avec le substrat pour créer une réaction colorée facile à observer au microscope. Il existe plusieurs chromogènes pour le HRP (DAB, Emerald, AEC, Permanent HRP Green, etc.). Une contre-coloration peut être effectuée

à la fin du marquage pour mieux visualiser les tissus/cellules. Dans ce contexte, plusieurs anticorps sont sur le marché ou en développement, et les pathologistes doivent faire face aux nouvelles exigences des oncologues (**Hofman et al., 2014**).

En effet, non seulement l'IHC clarifie le diagnostic, mais il met également en évidence certains éléments aussi importants pour le pronostic que pour le choix du traitement optimal ou d'une thérapie ciblée (**Gentony, 2006**). Elle est utilisée dans quatre indications essentielles en oncologie : Recherche du type histologique, recherche de la nature (primaire ou secondaire) et de l'origine des métastases, recherche de la quantité de facteurs précurseurs (prolifération des facteurs pronostiques), recherche de facteurs qui prédisent la réponse au traitement. Cette technique est réalisée dans une machine automatique.

10.1. Méthodes de révélation en IHC

Le protocole suivi dans notre étude est basé sur l'utilisation des polymères, qui est constitué d'un squelette de dextrane auquel sont attachés un anticorps secondaire et une enzyme (HRP ou AP). D'autres protocoles utilisent les micropolymères composés de petites molécules pouvant être polymérisées et attachées à des enzymes (HRP ou AP) et à des anticorps secondaires (**Venteo et Sutter, 2011**). L'utilisation de micropolymères facilite la pénétration tissulaire et la détection d'antigènes difficiles d'accès comme les protéines nucléaires. Cette méthode peut être utilisée pour amplifier considérablement le signal, augmenter la sensibilité, réduire les connexions non spécifiques et réduire le bruit de fond (**Fig.8**).

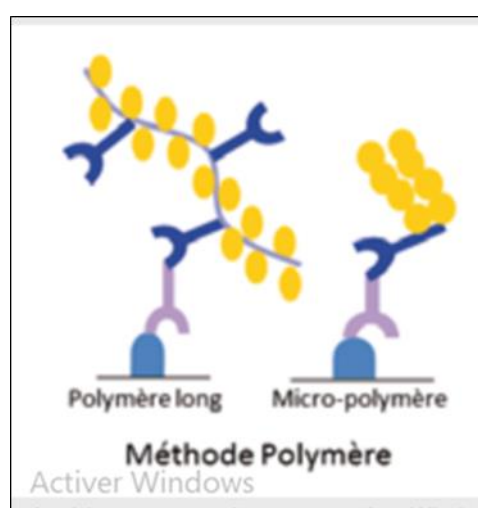


Figure 8: Méthode polymère de révélation utilisée (**Venteo et Sutter, 2011**)

Chapitre Iv
Matériel
Et Méthodes

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Lieu d'étude

La baie d'Annaba est parmi les plus grandes métropoles de l'est algérien, considérer comme un important pôle industriel dans la région. Elle est située à la pointe nord-est de la côte algérienne entre deux caps, Cap de Garde à l'Ouest ($7^{\circ}16'E - 36^{\circ}68'N$) et Cap Rosa à l'Est ($8^{\circ}15'E - 36^{\circ}38'N$), distants d'environ 40 km. Il est alimenté par différents oueds. Surtout, l'Oued Mafragh, qui attire des éléments, est riche en composés agricoles, tandis que les Oueds Seybouse et Boudjemaa véhiculent des substances minérales et organiques d'origines différentes (Drif, 2012). Cela est la principale cause d'acheminement de toute sorte de polluant. Deux sites d'études ont été choisis (Fig.9).

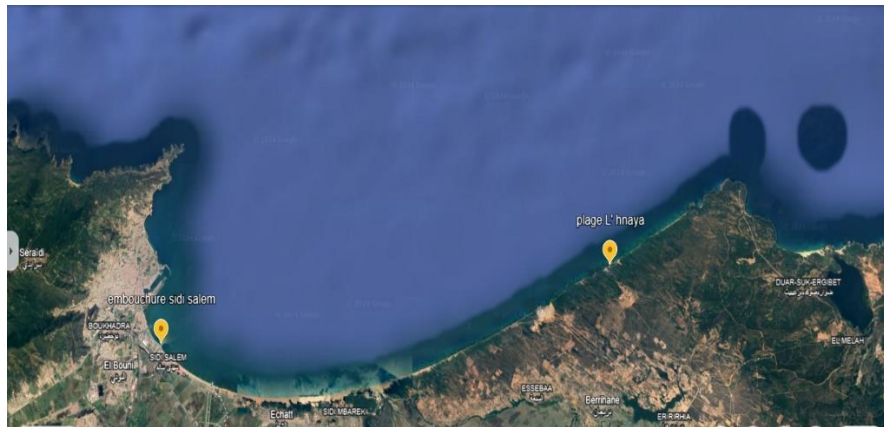


Figure 9 : Vue satellite du golfe d'Annaba (google maps)

1.2. Sites d'échantillonnages

1.2.1 Site 1 « Sidi-Salem »

Le site est situé au niveau de deux longitudes ($7^{\circ} 48' 55 44'' E$ et $36^{\circ} 50' 55 22'' N$). La zone, considérée comme l'un des espaces les plus pollués du littoral algérien. Aujourd'hui, l'embouchure de la Seybouse déverse des quantités de déchets toxiques, lesquels ont transformé la cité de Sidi Salem, où se jette l'oued, en véritable vivier de nuisance mortelle. Surtout lorsqu'on sait que ces résidus vont à la mer sans être épurés (Fig.9).



Figure 10 : Site de Sidi Salem (Drif, 2012).

1.2.2. Site 2 « El Hnaya »

Les coordonnées géographiques du site sont (8° 07' 17 22'' E et 36° 54' 26 76'' N), la plage est située à l'extrême de l'Est du golfe d'Annaba, pas loin du Cap Rosa. Elle distance l'oued Mafragh du côté de l'Ouest a peu près de 24km (Fig. 10).



Figure 11: Plage d'El Hnaya (Drif, 2012)

1.3. Choix de l'espèce

La moule *Perna perna* est largement consommée en Algérie, parmi les produits de pêche à valeur nutritive très élevée. Son goût est agréable pendant la période de reproduction. Elle est commercialisée le long de l'année.

Ce bivalve est reconnu pour être un bon modèle expérimental puisque leur réaction face à la présence d'un contaminant est relativement constante. En plus de leur accessibilité sur le terrain. Ces organismes peuvent être utilisés pour évaluer l'effet de différents polluants, que ce soit par des expositions in vivo ou in vitro. L'acquisition de connaissances sur le type et le taux de contamination ont permis d'analyser les risques qu'ils représentent aux différents niveaux physiologiques (Fig.11).



Figure 12: Présentation de la moule *Perna perna*

1.4. Identification de l'espèce

Des critères très spécifiques permettent d'identifier l'espèce *P. perna* avec précision notamment lors de la dessiccation au niveau des muscles adducteurs. Les segments antérieurs du muscle écarteur s'attachent individuellement à la coquille de la moule africaine *P. Perna*, laissant une empreinte musculaire discontinue. Cependant, le muscle adducteur antérieur est absent chez *P. Perna* (Siddall, 1980).

L'espèce *P. perna* diffère aussi, de *Mytilus galloprovincialis* par la couleur verte mélangée à du brun à l'extérieur de la valve, au lieu du brun foncé de *M. galloprovincialis* et par la couleur jaune-blanc à l'intérieur de la valve, au lieu de la couleur bleutée.

Un des moulages des trois muscles est séparé chez *P.perna* au lieu de trois muscles adjacents chez *M. galloprovincialis* (Abada-Boudjema, 1996) (Fig.12).



Figure 13: Disposition des inserts musculaires sur la coquille de *P.perna* (A) et *M. galloprovincialis* (B) (Marteil, 1976).

1.5. Stratégie de l'échantillonnage

Le prélèvement a été réalisé manuellement au couteau à 6 heures du matin en deux endroits sélectionnés, fin avril début mai 2024 sur les sites Sidi Salem et El-Hnaya. Des mesures ont été prises en utilisant un multiparamètre.

Un prélèvement aléatoire d'environ 10 individus provenant de chaque site a été transporté dans des conteneurs d'eau de mer propre jusqu'au laboratoire de l'Université de Guelma. En ce qui concerne la taille des individus, qui mesuraient 7 à 8 cm de long pour le site Sidi Salem, et plus ou moins 5cm pour les individus récoltés sur le site El Hnaya.

Profondeurs atteintes de 1,5 m, 1,90 m et 1,30 m.

1.6. Prélèvement de l'organe

La sélection de deux individus mâles et femelles de chaque site s'est basée sur un tri par sexe et taille après nettoyage de la coque externe. La longueur de la coque de chaque individu est mesurée avec un pied à coulisse. Une dissection viscérale a été réalisée à l'aide d'une lame Bistouri stérile. Des tissus frais de l'hépatopancréas (mâles et femelles) ont été disséqués et immergés dans 4 crachoirs stériles contenant une solution de formol à 10% pour la préservation des tissus pendant leur transport de Guelma vers Constantine.

2. METHODES

2.1. Technique des coupes histologiques

▪ Principe

Les techniques histologiques consistent à utiliser divers colorants chimiques pour sonder des échantillons de tissus vivants. Elle se repose sur une succession d'étapes et utilise le microscope photonique comme outil de lecture.

2.1.1. Étape macroscopique

C'est l'étape de préparation des échantillons et qui précède toute étude histologique en anatomopathologie, initié par la fixation du tissu prélevé, la déshydratation, l'inclusion en paraffine, la coupe du tissu au microtome, l'étalement sur les lames et en dernier, le séchage des lames.

C'est la première étape une fois arrivé au CHU de Constantine, qui consiste à la coupe des pièces sur une planche et avec un bistouri, qui seront mis dans des cassettes en plastique dans un bain de formol à 10% pré-préparer pendant 24h, les cassettes seront désignées par les mêmes initiales sur les crachoirs (**Tab.2**).

Tableau 2: Désignation abrégé des 4 échantillons de tissus choisi.

Organe	Echantillon Sidi Salem		Echantillon El-Hnaya	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
Hépatopancréas	SHM2	SHF3	LHM	LHF

S ou bien L : désigne le site d'échantillonnage respectivement Sidi Salem et El Hnaya.

H : désigne l'organe à étudier le foie.

M ou bien F : désigne le sexe.

▪ Étape de déshydratation

Les échantillons mis dans la cassette ont été fixé par du formol, permettant la préservation morphologique des tissus et des structures cellulaires. L'eau de l'échantillon est ensuite remplacée par de l'alcool dont la désignation de cette étape par la déshydratation, puis par du xylène et enfin par de la paraffine fondue. Cette imprégnation est automatisée dans un automate TECHNICON, composé de 10 bacs, 7 bacs éthanol, 3bacs xylènes, 2 bacs paraffines, pendant une période de 16 à 20 h. Le but de cette étape est la déshydratation optimale pour faciliter la coupe.

2.1.2. Etape de l'inclusion (enrobage)

Elle a pour objectif l'obtention de blocs de paraffine incluant les tissus à étudié à l'aide d'un appareil d'enrobage muni d'une chambre chaude dans laquelle est disposé les granules de paraffine pour fondre à 65°, qui va être coulé sur les cassettes déshydraté en utilisant les bars de Leucarts comme moulage puis les disposer sur un support à très basse température (-5°C) pour que la paraffine prenne. Obtenons ainsi des blocs paraffines incluant les tissus à colorer.

2.1.3. Etape de dégrossissement (la microtomie)

S'effectue sur microtome pour dégrossir la couche de paraffine à 50 µm, mettre à refroidir sur un support congelé et faire la coupe à 4 µm, ce qui donnera un ruban qui va être placée délicatement sur lame (**Fig. 14**).

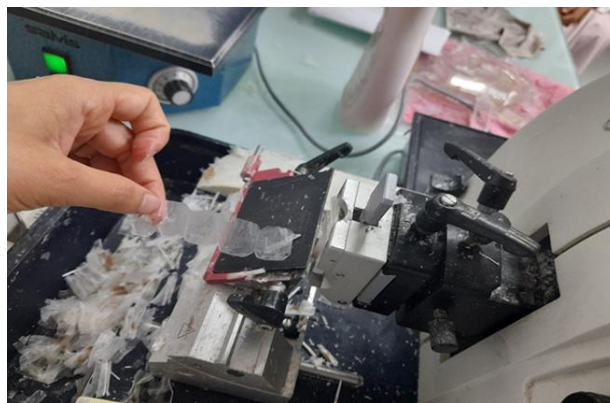


Figure 14: Ruban obtenue lors de la coupe MICROTOM

2.1.4. L'étalement

Une ou deux parties du ruban obtenu seront étalé à l'aide d'eau distillée sur les lames puis les disposer sur une plaque chauffante pour que la paraffine fonde sur la lame et adhère au verre, Les lames seront placer dans l'étuve pour 30 min à 65° jusqu'à ce qu'elles sèchent complètement.

2.1.5. La coloration

Designer par la coloration standard ou la coloration de routine (HES) Passe par 4 étapes essentielles : 2 bains de Xylène pendant 2 min chacun, sert à se débarrasser du reste de paraffine. 2 bains d'alcool l'éthanol en premier à 100% le deuxième à 96% pendant 1 min30s chacun, sert à la déshydratation, rinçage à l'eau claire 1min. Coloration Hémalin « Hematoxyline » 2 min pour colorer le noyau, rinçage à l'eau claire, puis un bain d'alcool pendant 30 min, en deuxième coloration l'éosine pour colorer le cytoplasme. Deux bains d'alcool (éthanol 100%) pendant 2min chacun pour enlever l'excès de l'éosine. Puis deux bains de xylène 2min chacun pour déshydratation. Les lamelles sont montées directement sur des lames avec du kit (colle). Laisser sécher sous une haute aspirante pour éviter l'évaporation des vapeurs de xylène toxique pour le personnel. Les lames seront examinées au microscope optique au grossissement x100 et x400.

2.2 Immunohistochimie (IHC) manuel

Le protocole pratiqué dans la méthode manuelle utiliser en cas de nombre réduit de malades, dans notre étude le Protocole DAKO a été suivie comme suite :

La deuxième étape de Marquage commence par la déparaffinisation puis réhydratation, démasquage des épitopes, blocage des sites non spécifiques et en dernier l'anticorps primaire.

- Chauffer le bain marie préalablement jusqu'à 99°, y disposer alors la solution de démasquage PH=9. La chaleur est un outil d'optimisation de la méthode IHC appelé aussi HIER ou Heat-

Induced Epitope Retrieval. Dont il existe 3 tampons principaux de démasquage : Tampon citrate à 10 mM pH 6,0

Tampon EDTA à 1 mM pH 8,0

Tampon Tris-EDTA pH 9,0

En même temps les lames sont mises dans du :

Xylène 5min → Alcool 5min → eau distillé

Pour déparaffiner et réhydrater le tissu.

- Disposé les lames dans la solution de démasquage qui a bien atteint les 99° et les remettre dans le bain mari pendant 40 min + 20 min de refroidissement complet, le refroidissement est nécessaire pour éviter le choc thermique. La solution de démasquage a pour rôle de libérer les épitopes. Le démasquage thermique peut conduire au décollement des coupes de la lame, c'est pour cela qu'on doit utiliser des lames silanisées, traiter chimiquement en recouvrant la surface des lames avec des molécules d'alcoxysilane organofonctionnelles. La silanisation de la verrerie augmente son hydrophobicité.

En effet le processus de fixation au formole rend la détection en IHC difficile. Cette fixation peut détériorer la biochimie de la protéine, masquant l'épitope d'intérêt et le rendant incapable de se lier à l'anticorps primaire. Les liaisons méthylène formées lors de la fixation déclenchent le mécanisme de réticulation de la protéine et masquent les sites antigéniques.

Les méthodes de démasquage des antigènes brisent ces ponts méthylène et exposent les sites antigéniques, permettant aux anticorps de les reconnaître et de s'y lier.

- Immerger les lames dans le tampon Buffer solution (TBS), préalablement préparer en le diluant 20X dans l'eau distillée, soit 950/50. Les étapes de lavage permettent de limiter le bruit de fond en enlevant tous les résidus perturbateurs.
- Egoutter les lames du TBS et versez dessus 200 ml de peroxydase bloking, quantité suffisante pour couvrir toute la lame. A pour rôle le blocage des sites non spécifiques pour diminuer le bruit de fond. Couvrir à l'abri de la lumière 5min, puis un lavage au TBS pendant 5min.
- Tracez les lames avec l'ecopen qui est un stylo hydrophobe pour fixer la goutte sur la lame et ne se déverse pas.
- Ajouter l'anticorps primaire directement sur la lame de façon à couvrir tout l'échantillon, c'est un anticorps spécifique, dans le cas de cette étude on a utilisé le HEP-PAR-1 bien l'étalé sur la lame et laisser incubé 30 min à l'abri de la lumière. S'ensuit alors le lavage de 5min au TBS.

CHAPITRE IV : Matériel et Méthodes

- L'anticorps secondaire HRP et incubé 30 min à l'abri de la lumière, suivie du rinçage pendant 5min au TBS.
- La solution de révélation le DAB « désaminobenzoinde » très toxique, à manipuler sous haute diluée préalablement 1000 ml pour une goutte de DAB mettre sur la lame une quantité suffisante pendant 5 à 10 min, rinçage au TBS pendant 5min puis bien égoutter. Qui va donner une coloration brune lors d'un résultat positif au niveau des sites du complexe antigène anticorps substrat.
- 2ème révélation Coloration Hémalin « Hematoxyline » coloration du reste du tissu avec du bleu pour qu'il soit visible, et facilité la lecture.
- Lecture des résultats à l'aide du microscope optique préalablement désigné (**Fig.15**).



Figure 15: Lames marquées en marron et en bleu

Résultats
Et
Discussions

RESULTATS

1. Caractéristique physicochimique de l'eau de mer des sites prélevés

Le prélèvement des spécimens sur les deux endroits sélectionnés, Sidi Salem et El Hnaya a été accompagné par une prise de mesures en utilisant un multiparamètre. Ou la température moyenne varie entre 17 °C et 20,4 °C. Les résultats obtenus sont répertoriés (**Tab.3**)

Tableau 3: Propriétés physicochimiques de l'eau de mer des sites de prélèvements.

Paramètre Site	PH	Potentiel redox (ORP)	%O ₂ dissout (%)	Concentration O ₂ Dissout (mg/LDO)	Conductivité (ms/cm)	Résidus sec (g/ITds)	Taux salinité (Psu)
Sidi Salem	7,91	75,2	46,0	3,10	47,35	23,68	30,83
El Hnaya	7,93	102,6	45,3	3,10	41,79	20,90	26,81

2. Observation des deux sites sur coloration standard HES

L'étude histologique de la glande digestive de l'espèce *Perna perna* prélevée du golfe d'Annaba à partir des deux sites El Hnaya et Sidi Salem a démontré des altérations tissulaires aux niveaux des coupes histologiques chez les deux sexes (**Fig. 16 et Fig.17**).

Il a été observé des débris cellulaires (DC) (**Fig. F, H**), ou des fragments du cytoplasme apical (FCA) (**Fig. C, H**). Ainsi que la présence de rétrécissement des cellules épithéliales au niveau des tubules (RE) (**Fig. B, C, F, H**). Quelques nécroses cellulaires (NC) (**Fig. C, F, H**) et tubulaire (NT) (**Fig. B, C, F, H**) sont aussi révélés. Une dilatation de la lumière tubulaire (LDT) (**Fig. B, C**). Des ruptures de la lame basale ont été constatées (RLB) (**Fig. C, H**).

Finalement, il a été détecté la présence de quelques types d'hémocytes, pouvant être des macrophages (maI) (**Fig. B, C, F, H**) et des granulocytes (gr2) (**Fig. B, C, F, H**).

2.1. Lecture des coupes femelles des deux sites

Chez les spécimens femelles (A et B) collectées sur le site El Hnaya, les coupes histologiques avec le grossissement (x 100) (**A**) ont démontré une abondance irrégulière des tubules, due à une dispersion et un espacement très fréquent et très marqué entre elles. Certains

Résultat et discussions

champs observés indiquent des altérations tubulaires, notamment des déchirures au niveau des contours tubulaires. Avec le grossissement (x 400) (B) des altérations et des anomalies histologiques, notamment inflammatoires (HI), nécrose cellulaire et tubulaire (NT) (NC), on constate aussi que le tissu interstitiel est très étroit. On remarque aussi une rupture de la lame basale (RLB), la fragmentation du cytoplasme apical (FCA) et une perte des cellules épithéliales dans quelques tubules. Ces observations sont d'autant plus marquées chez les femelles d'El Hnaya. Cependant, les coupes histologiques (E et F) de Sidi Salem ont démontré une architecture générale assez uniforme avec une abondance tubulaire (E) et un espacement moins fréquent et beaucoup plus étroit que chez les individus d'El Hnaya (Fig.16). De même qu'au grossissement (x 400) (F) des signes d'un syndrome inflammatoire sont présents mais de moindre intensité, tel qu'une légère dilatation de la lumière tubulaire (TDL), un tissu interstitiel étroit (TI), la présence des hématies qui pourrait être des (gr2) granulocytes ou des macrophages (maI).

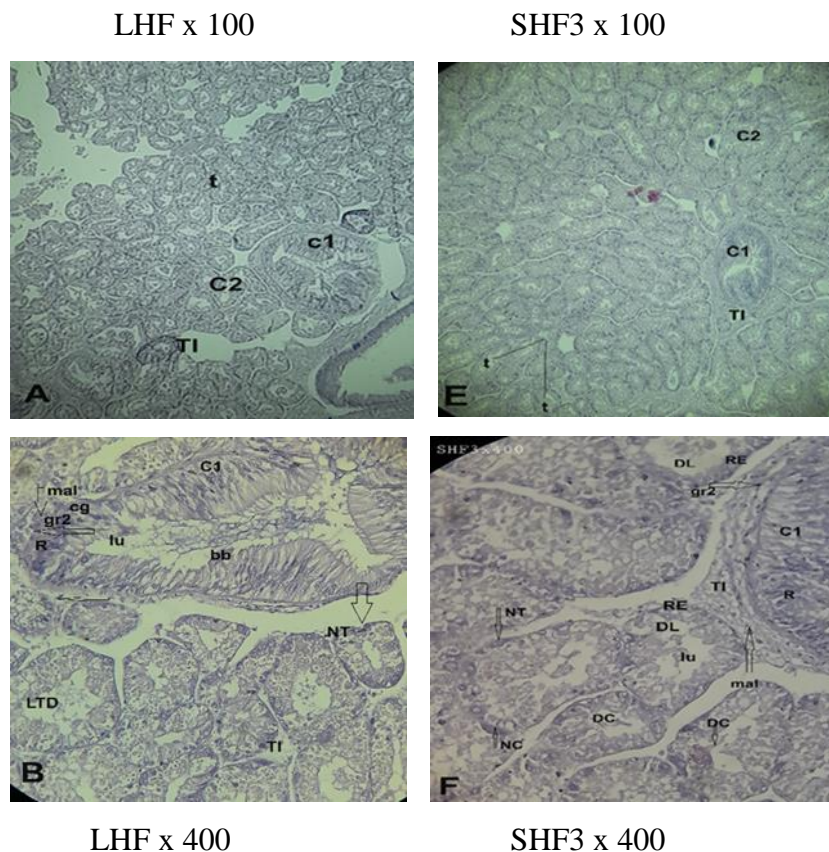


Figure 16: Observation microscopique de la glande digestive de la moule *P. perna* traitée avec une coloration histologique standard HES (Hématoxyline-Eosine), grossissement (x 100 et x 400) respectivement : (A et B) individu femelle collectée sur le site d'El Hnaya ; (E et F) individu femelle collectée sur le site de Sidi Salem.

(DC) Débris cellulaires, (FCA) Fragments du cytoplasme apical. (RE) Rétrécissement des cellules épithéliales tubulaire. (TI) Tissu interstitiel. (NC) Nécroses cellulaires. (NT) Nécrose tubulaire. (LDT)(DL) Dilatation de la lumière tubulaire. (RLB) Ruptures de la lame basale. (lu) lumière tubulaire. (DC) Débris cellulaires. (bb) bordure en brosse. (R) Criptes. (t) tubules. (C1) Conduit primaire. (C2) Conduit secondaire. (maI) macrophages. (gr2) granulocytes.

2.2. Lecture des coupes mâles des deux sites

Les lectures des lames histologiques ont révélé des différences très notables entre les individus mâles des deux sites d'échantillonnage. Pour qu'y est du site El Hnaya (D) au (Gx100), on constate une abondance des tubules, un aspect structurel irrégulier dus à une dispersion et un espacement très fréquent et très marqué entre les tubules. Certains champs observés indiquent des altérations tubulaires, notamment des déchirures et des éclatements au niveau des contours tubulaires. Tandis au (G x 400) (C) l'observation illustre des altérations et anomalies histologiques notamment inflammatoires (HI), nécrose cellulaire et tubulaire (NT) (NC), ainsi qu'une dilatation de la lumière tubulaire (DL) accompagnée d'un rétrécissement des cellules épithéliales (RE). La gravité des altérations chez les mâles a été remarquée sur la coupe (C) d'El Hnaya (Fig.17).

Alors que pour les individus collectés sur le site Sidi Salem (G et H), les coupes histologiques (Gx100) (G) montrent une architecture générale uniforme avec une abondance tubulaire et un espacement moins fréquent et beaucoup plus étroit que chez les individus d'El Hnaya. Au grossissement (Gx 400) (H), on constate aussi que le tissu interstitiel n'est pas visible chez les mâles de Sidi Salem. On remarque aussi une rupture de la lame basale (RLB), une fragmentation du cytoplasme apical (FCA), des débris cellulaires et une perte épithéliale sur quelques tubules. Ces observations sont d'autant plus marquées chez les mâles d'El Hnaya (Fig.17).

2.3. Comparaison entre sexes

Ces remarques observées sont plus marquées en général chez les mâles que chez les femelles sur les deux sites. Les aspects tissulaires et cellulaires observés pouvant être des signes d'un stress oxydatif aigu dû aux polluants ingérés.

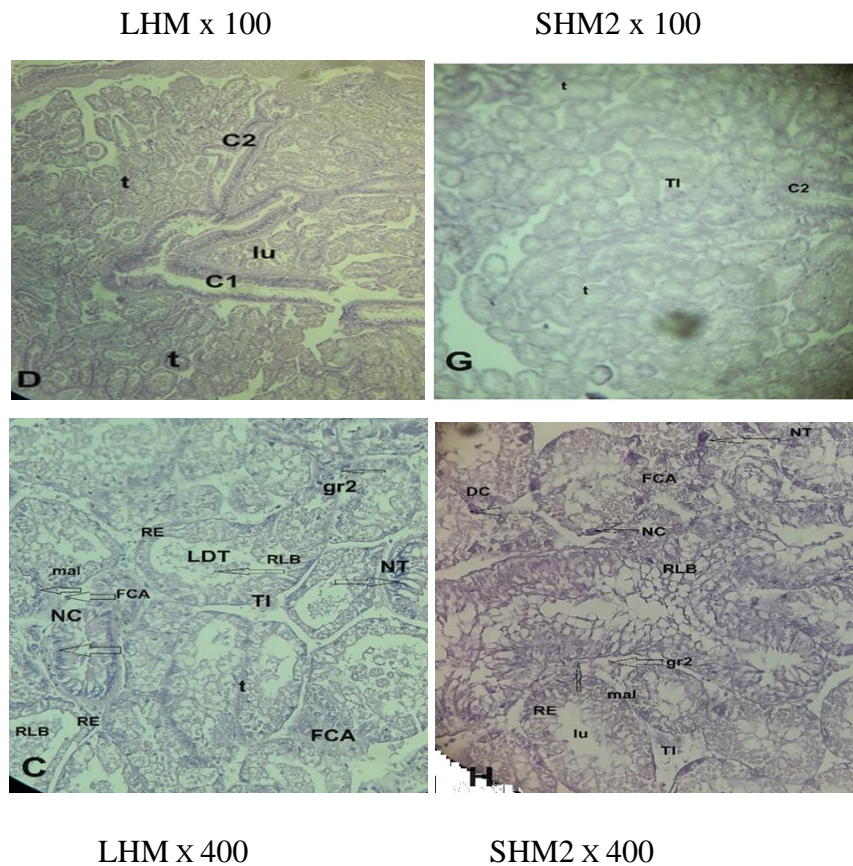


Figure 17: Observation microscopique de la glande digestive de la moule *P. perna* traitée avec une coloration histologique standards HES (Hématoxyline-Eosine), grossissement (x 100 et x 400) respectivement : (D et C) individu femelle collectée sur le site d'El Hnaya ; (G et H) individu femelle collectée sur le site de Sidi Salem.

(DC) Débris cellulaires, (FCA) Fragments du cytoplasme apical.(RE) Rétrécissement des cellules épithéliales tubulaire. (TI) Tissu interstitiel. (NC) Nécroses cellulaires. (NT) Nécrose tubulaire. (LDT)(DL) Dilatation de la lumière tubulaire. (RLB) Ruptures de la lame basale. (lu) lumière tubulaire. (DC) Débris cellulaires. (bb) bordure en brosse. (R) Criptes. (t) tubules(C1) Conduit primaire. (C2) Conduit secondaire. (mal) macrophages. (gr2) granulocytes.

3. Observation comparatives entre les deux sites sur lames IHC

3.1. Lecture des coupes femelles des deux sites

Chez les spécimens femelles de *Perna perna* collectée dans le site El Hnaya (a et b), les coupes histologiques (G x 100)(a) colorées et marquées en (IHC), démontrent un marquage positif en couleur marron clair (jaunâtre) en forme de granule en réponse à l'antigène Heppar1, plus marquer au niveau des tubules et moins visible voir absent au niveau des conduits primaire et secondaire. De même qu'au (G x 400) (b). Ce qui les différencie nettement sur le champ

Résultat et discussions

microscopique et laisse apparaître une abondance régulière des tubules parsemés de ramification en couleur bleu. Certains champs observés indiquent des altérations tubulaires notamment des déchirures au niveau des cellules épithéliales tubulaires (**a**). Une vacuolisation des tubules, qui est bien visible grâce à la contre coloration en couleur bleu.

Tandis que pour les femelles collectées sur le site Sidi Salem (**h** et **i**), les coupes histologiques au (G x 100) (**h**) démontrent aussi une architecture générale uniforme avec une abondance tubulaire, ainsi qu'un marquage positif au HepPar1, de même qu'au (G x 400) (**i**). Qui met en évidence une perte épithéliale au niveau des conduits primaires et secondaires, bien visible grâce à la contre coloration apparente en couleur bleu. Alors qu'au (G x 400) (**i**) on voit des altérations tubulaires exprimées par un non marquage du tubule. Le marquage laisse apparaître des débris cellulaires au niveau du tissu interstitiel ainsi qu'en bleu des amoebocytes et des granulocyte (**Fig.18**).

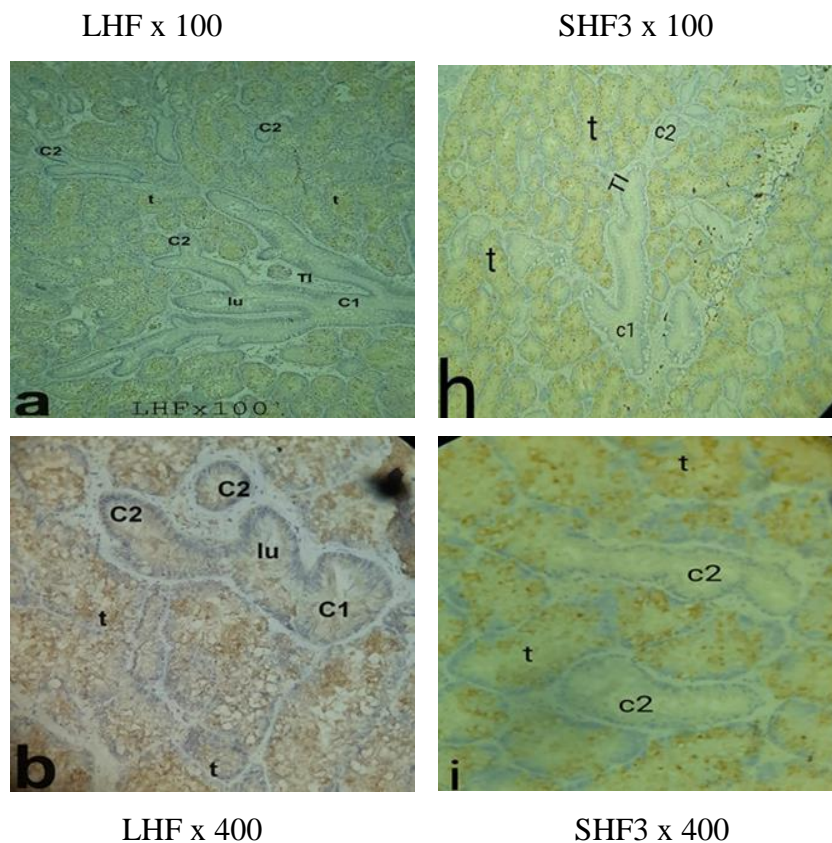


Figure 18: Observation microscopique de la glande digestive de la moule *P. perna* traitée avec un marquage immunohistochimie (IHC), grossissement (x 100 et x 400) respectivement : (a et b) individu femelle collectée sur le site d'El Hnaya ; (h et i) individu femelle collectée sur le site de Sidi Salem.

(**TI**) Tissu interstitiel (**lu**) lumière tubulaire. (**C1**) Conduit primaire. (**C2**) Conduit secondaire. (**t**) tubules.

3.2. Lecture des coupes males des deux sites

Chez les spécimens males de *Perna perna* collectée sur le site El Hnaya (**c** et **d**), les coupes histologiques (G x 100) (**c**) démontrent un marquage faiblement positif en couleur marron très clair (jaunâtre) en guise de réponse à l'antigène Heppar1, bien plus marquer chez les males de Sidi Salem (**g**) et plus uniformément marquer au niveau des tubules, moins visible voir absent au niveau des conduite primaire et secondaire. Ce qui les différences nettement sur le champ microscopique et laisse apparaitre une abondance irrégulière des tubules dans certains champs, dus à une dispersion et un espacement fréquent entre elles chez les males d'El Hnaya (**c**), des déchirures des cellules épithéliales tubulaires (G x 100) (**c**). De même qu'au (G x 400) (**d**) pour ce qui concerne l'intensité du marquage. Des altérations tubulaires exprimées par un non marquage du tubule, aussi. Ainsi qu'un espacement très visible entre tubules pour les males d'El Hnaya (**d**). Alors qu'au (G x 400) pour les males Sidi Salem (**f**), des tubules moins espacés, accompagnés d'un marquage positif au Heppar1 bien visible. Une vacuolisation des tubules, bien visible grâce à la contre coloration en couleur bleu moins apparente chez les femelles des deux sites. On observe aussi des débris cellulaires au niveau du tissu interstitiel ainsi parsemé de granules bleu, qui pourrait être des amoebocytes et des granulocytes (**d**) (**f**). Des éclatements de l'épithélium cellulaire dans les tubules et aussi visible (**d**) (**Fig.19**).

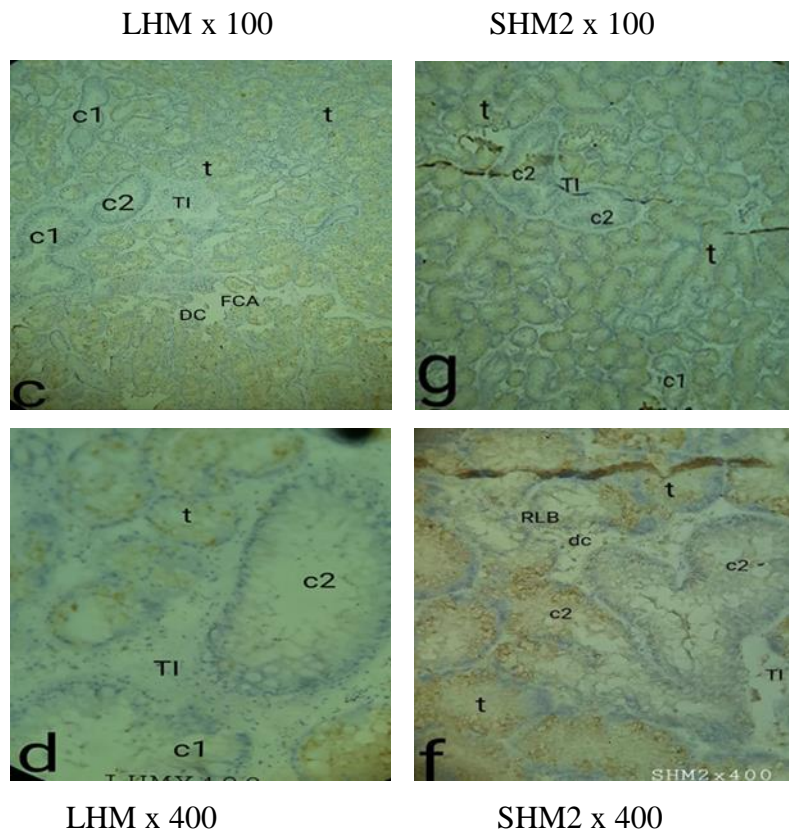


Figure 19: Observation microscopique de la glande digestive de la moule *P. perna* traitée avec un marquage d'immunohistochimie (IHC), grossissement (x 100 et x 400) respectivement : (c et d) individu femelle collectée sur le site d'El Hnaya ; (g et f) individu femelle collectée sur le site de Sidi Salem.

(TI) Tissu interstitiel (lu) lumière tubulaire. (C1) Conduit primaire. (C2) Conduit secondaire. (t) tubules.

3.3. Comparaison entre sexes

Ces remarques observées sont plus marquée en générales chez les males que les femelles sur les deux sites. Les symptômes les caractéristiques observer confirme l'installation d'une maladie ou d'un stress oxydatif aigue du au polluants ingérer.

DISCUSSION

Autant d'organismes aquatiques qui sont utilisés comme bioindicateurs pour tester les zones polluées exceptionnellement les bivalves (**Viarengo *et al.*, 1985; Moore, 1988; Low et Pipe, 1994; Unep/Ramoge,1999 ; Sheir et Handy, 2010; Topi *et al.*, 2012; Peric *et al.*, 2012; Serpe *et al.*, 2012; Milun et Zvonaric, 2008**). Parmi ces espèces *Perna perna* (**de Guterres, 2020 ; Andréa *et al.*, 2007**) qui s'adaptent progressivement jusqu'aux concentrations maximales admises.

En outre, le processus digestif est le plus concerné pour estimer cette contamination, à raison que les polluants sont acheminés avec les nutriments (nourriture particulière, microalgues du plancton) à travers le courant d'eau de mer le long du tractus digestif. En plus, ce dispositif accumule au cours de ce passage un maximum de polluants qui pourraient être responsables d'altérations histopathologiques, qui perturbent systématiquement la physiologie de certaines parties de ce système.

D'autre part, l'étude de la glande digestive, connue aussi par l'hépatopancréas, attire l'attention de plusieurs chercheurs, en raison qu'elle présente le siège des activités de synthèse et de biotransformation (dégradation des toxines, sécrétion d'enzymes, absorption des nutriments et stockage des matières nutritives sous forme de glycogène et de lipides (**Boucher-Rodoni, 1982 ; Livingstone, 1998 ; Chassard-Bouchaud, 1996 ; Marigomez *et al.*, 1990**). Cette partie du tube digestif entoure complètement l'estomac et une partie de l'intestin et son rôle est similaire au foie des mammifères.

Le rôle de cette glande est d'accomplir le processus digestif, avec l'aliment de la moule qui est le phytoplancton de taille variable, enveloppé de mucus, reçoit une première phase de tri de particules suivant leur taille, leur densité et leur digestibilité et de digestion extracellulaire.

Plus précisément, les petites et légères particules sont amenées aux orifices des conduits digestifs et vont pénétrer par un système de contre-courant dans la glande digestive par le côté « bordure en brosse » ainsi les particules sont absorbées à ce niveau. Tandis que, les particules plus grosses atteignent les tubules digestifs. Une seconde phase de digestion extracellulaire pourrait avoir lieu dans la lumière des tubules sous l'action des enzymes présentes à ce niveau (**Mathers, 1973**). Mais, la principale phase de digestion dans la glande digestive paraît être la digestion intracellulaire dans les cellules digestives (**Owen, 1970**). A la suite de cette digestion intravacuolaire, les nutriments passent de la base de la cellule au tissu conjonctif périlitubulaire sous-jacent, de même qu'au système hémolymphe, amœbocytes, conjonctif périglandulaire (**Auffret *et al.*, 2003**).

L'architecture histologique de la glande digestive appariée composée d'un réseau de conduits se ramifiant pour terminer par des tubules aveugles appelés (diverticules digestifs), Ces cellules se regroupent en acinies, s'ouvrent dans des conduits secondaires qui débouchent dans le réseau de conduits primaires aboutissant à l'estomac (**Owen, 1955**). Les tubules glandulaires sont formés de deux régions différentes, les cellules digestives, et les cryptes.

La lecture des coupes histologiques transversales a révélé l'abondance de ces tubules (**Fig. 28, 29, 30, 31,32**), et une dispersion moins marquante de conduits secondaires et primaires (**Fig. 30, 31**). D'autre part il est connu que l'architecture tissulaire des tubules est formée de cellules digestives (cd) occupent la région médiane ou centrale du tubule digestif, elles sont reconnaissables par un système vacuolaire développé. Quant aux cryptes (R), elles sont regroupées aux deux extrémités responsables de la digestion extracellulaire au niveau de la lumière tubulaire. Elles contiennent des cellules sécrétrices (cs), des cellules flagellées (cf) et des cellules souches. Les conduits primaires comprennent une région ventrale constituée d'un épithélium cilié et une région dorsale bordée d'un épithélium à bordure en brosse. Ainsi que de nombreuses cellules glandulaires de type muqueux.

Durant un cycle digestive les tubules digestifs chez la plupart des bivalves, présentent une séquence de changements cytologiques (**Morton, 1983**). A la phase de repos, l'animal est à jeun les cellules des tubules sont basses, la lumière est grande, on parle alors de tubule de type 1. A l'arrivée des nutriments, une phase d'absorption et de digestion intracellulaire est initiée, c'est les tubules de type 2, les cellules digestives deviennent hautes, remplies de vacuole digestives, la lumière est étroite et les cellules des cryptes développent des cils. A la fin de cette phase la partie apicale des cellules digestives se dilate et se fait saillir dans la lumière, puis se détache se sont les sphères de fragmentation, qui vont être évacuées vers l'estomac. Souvent des cellules toute entière vont être éliminées, c'est la phase d'élimination, les tubules sont alors de type 4 au cours de cette phase les cellules des cryptes régénèrent de nouvelles cellules digestives (**Morton, 1983**). Ces différentes phases doivent être prises en considération lors de l'interprétation des données histologiques en faveur de lésions ou altérations, surtout par rapport à la phase d'élimination (phase 4) quand on parle de lumières des tubules dilatés (LD) ou bien rétrécissement épithélial (RE). Par ailleurs ces changements ne sont pas seulement liés aux cycles digestifs quotidiens, mais aussi aux cycles reproducteurs et aux rythmes des marées.

Ce qui pourrait être pris à tort pour une transformation histologique, résultant des effets défavorables de l'environnement ou bien de la pollution (**Usheva et al., 2005**).

Dans notre étude, les lumières tubulaires été dilatées de manière aléatoire sur différents champs microscopique, ce qui relevé sans doute de l'effet environnementale pas seulement des cycles naturels digestives, parce les tubules sont accompagnées d'autres anomalies histopathologiques tel que les nécroses, les infiltrations hémocytaires, ainsi que la dégénérescence et la perte de différentes cellule existantes, et la perte de cellules épithéliales exceptionnellement.

Le développement de ces lésions tubulaires est associé à la détérioration de l'épithélium digestif, qui est une réponse au stress causé par les polluants (Usheva *et al.*, 2006 ; El-Shenawy *et al.*, 2009 ; Agwuocha *et al.*, 2010, 2011). Ces altérations histopathologiques constitue une réponse physiologique des organismes vivants marin pas seulement aux stress générer par des conditions de pollutions anthropique complexes, mais aussi a été démontrer dans des travaux récent sur la palourde, que même des conditions du milieu de vie et les conditions physiologiques extrêmes telles que l'augmentation de la salinité ou bien une famine peuvent amener des dommages à l'organe (Tuyauet Moore, 1985 ; Sunila, 1987 ; Or-Buchotet coll .,1995 ; Weinstein,1997).

Notamment, le rôle principal de la glande digestive est la digestion intracellulaire assurée par les cellules digestives (Hily, 1984). En tant qu'organe, elle joue un rôle primordial dans le stockage des réserves, ou le glycogène et les lipides sont accumulés au niveau des cellules glandulaires ou bien des cellules periglandulaire. Les pigments sont accumulés ainsi dans les cellules de stockage lui proférant une couleur foncée. L'activité digestive de l'hépatopancréas est donc exprimée par la formation de globules lipidiques évacués par exocytose et pouvant être repris par les amoebocytes. Les canaux et tubules de la glande sont entourés de tissu de réserve formé de cellules conjonctive tapissé de granules lipidiques et de glycogène (Deslous-Paoli, 1987).

De ce fait la glande digestive accumule un maximum de substances ingérées, dont les polluants, qui conduisent à des altérations histologiques, entre autres des dommages au niveau des tubules digestif, perturbant ainsi ses fonctions tel que la sécrétion, l'absorption et le stockage des matières nutritives. Ces fonctions vitales peuvent être utilisées dans le cadre d'études sur la santé des spécimens évoluant dans les environnements marins pollués.

Ainsi en récapitulant les observations des lames traitées par HES, ont démontré que les deux sites Sidi Salem et El Hnaya sont atteints de dommages. Il a été signalé des altérations plus graves au niveau d'El Hnaya. Cette plage a connu un degré de contamination inéligible ces dernières années. Probablement, à cause des produits de nettoyage véhiculés par les courants et libérés par l'usine de production d'énergie électrique connue par la centrale électrique de

Koudiet Eddraouch qui est située à proximité de la plage d'El Hnaya, à environ 5 km. Elle est fonctionnelle depuis 2013 jusqu'à aujourd'hui. Le problème, c'est que le mode de nettoyage manuel des filtres est changé en utilisant des produits chimiques, afin de déboucher ces filtres qui canalisent l'eau de mer utilisée dans le refroidissement.

De plus, des malformations plus observées sur le site El Hnaya du aux réponses aux stress environnemental, qui sont manifestées au niveau de l'architecture générale du tissu par des fragmentations de l'épithélium apical (FCA), des déchirures de la membrane tubulaire, un rétrécissement du tissu interstitiel, un espacement tubulaire créant ainsi une dispersion des tubules au niveau du tissu. Globalement une irrégularité de l'architecture générale dans les tissus des spécimens d'El Hnaya. Alors que cette architecture tissulaire et plus organiser chez les individus du site Sidi Salem.

D'autre part les travaux de (**Mehedinti, 1999**) démontrent que lorsqu'on expose les animaux à un environnement composé d'un complexe pollué induisant un stress assez important, les tissus sont spécifiquement inhibés et ils deviennent tolérants, alors que les animaux soumis à un environnement moins stressant ont une réponse plus marquée au niveau de leurs tissus. Ce qui explique les observations enregistrées du site Sidi Salem comprennent une canalisation des eaux usées urbaines et qu'il est soumis aussi à l'influence des rejets industriels de l'usine d'ASMIDAL.

Dans la suite des travaux entrepris dans notre étude, On a réalisé sur les mêmes échantillons tissulaires une technique spécifique, l'immunohistochimie (IHC), qui est une méthode qui permet de détecter les malformations tissulaires de l'hépatopancréas des moules. Dont, on a utilisé l'anticorps dirigé contre l'antigène spécifique des hépatocytes, appelé communément l'anti-HepPar1, destiné à un usage au laboratoire pour reconnaître les proliférations tissulaires bénignes et malignes hépatique tel que l'hépatoblastome, le carcinome hépatocellulaire et l'adénome hépatique. Il reconnaît aussi les tissus hépatiques normaux aussi bien fœtaux qu'adulte. On obtient une coloration cytoplasmique granulaire en guise de schéma caractéristique. Cet anticorps est nécessaire pour la distinction des carcinomes hépatocellulaires primaire (d'origine hépatique) ou de lésions métaboliques hépatiques. Par son marquage des hépatoblastomes, il permet de distinguer cette entité d'autres tumeurs à cellules rondes. Donc la positivité cytoplasmique pour l'anticorps anti-hépatocytaire HepPar1, révèle une différenciation hépatocytaire (**Mitchell et Sturgis, 2009**). Cet anticorps Mouse Monoclonal Antibody est dirigé vers un épitope spécifique pour détecter l'antigène mitochondrial dans les

hépatocytes de tissu mammifère fixé au formol et enrobés à la paraffine, colorés en immunohistochimie (IHC) qualitative, utiliser à des fins de diagnostic in vitro (IVD).

La lecture au microscope optique confirme les résultats de l'examen histologique pour nos lames traitées par immunohistochimie. Une similitude entre les deux sexes et les deux sites est définie par le taux de contamination, où les mâles sont plus affectés que les femelles par cette présence. Ainsi, le site d'El Hnnaya est plus menacé de nos jours. Dont, les lames apparaissant par un marquage bien visible chez les femelles et uniforme sur la quasi-totalité du tissu. Alors que chez les individus male le tissu observé était faiblement marqué et de manière irrégulière par la couleur brune. Ce qui veut dire que les tubules digestifs en bonne état donnent une meilleure coloration par l'anticorps anti-hépatocytaire HepPar1, puisque ce dernier met en évidence spécifiquement les hépatocytes normaux. En principe, un marquage plus fort est signalé chez les plus jeunes individus. Ce qui n'était pas le cas avec les jeunes spécimens récolté sur le site d'El Hnaya.

Ainsi cette étude confirme les résultats d'études antérieures, qui explique que l'exposition des bivalves en général à des substances toxiques tel que les algues toxiques, peut affecter le système digestif. (**Fernandez-Reiriz et al., 2008**) ont démontré que l'exposition de *Mytilus chilensis* à *Alexandrium catenella* pour obtenir une inhibition temporaire des processus digestifs, plus précisément la diminution des activités enzymatiques. À remarquer que des larves de *C.gigas* exposées à *prorocentrum rhathymum*, un amincissement de l'épithélium des tubules digestifs ainsi qu'une exfoliation des cellules de l'épithélium dans la lumière de ces même tubules (**Pearce et al., 2005**). D'après **Galimany et al., (2008)** d'importantes altérations ont été observés au niveau des conduits et tubules digestifs après neuf jours d'exposition lors de l'exposition des moules à *Alexandrium fundyense*. On sait aussi que les vacuoles des cellules digestives sont incluses dans le système d'hétérophagosomes et des lysosomes pour accomplir la digestion endocellulaire (**Owen, 1972 ; Owen, 1974**). Nombreux auteurs ont lié l'observation de vacuoles anormales dans l'hépatopancréas des mollusques a une augmentation importante de volume des lysosomes impactées par les polluants (**Low et Fossato, 2000 ; Low et al, 1981 ; Moor, 1988**). C'est le phénomène le plus commun constaté chez les bivalves exposés aux xénobiotiques organiques (**Rasmussen, 1982 ; Rasmussen, 1982**).

Conclusion

Conclusion :

L'étude réalisée a pour objectif, de mettre en évidence un biomarqueur sous forme d'un complexe moléculaire afin d'identifier des anomalies tissulaires par les techniques d'histologie et d'immunohistochimie.

La glande digestive de l'espèce *Perna perna* échantillonné de deux sites l'Hnaya et Sidi Salem de la côte d'Annaba est maintenue, afin de pouvoir évaluer le degré de contamination de cette région.

Les résultats obtenus affirment la présence des dommages tissulaires assez importants chez la moule brune. Notamment, altérations histologiques modérées voir légères au niveau du site de Sidi Salem par port à ce d'El Hnaya. Outre l'observation microscopique a enregistré les mêmes altérations chez les deux sexes à des intensités inégales, plus considérables chez les mâles.

Ces résultats doivent être renforcées et confirmé par d'autres tests, notamment, le dosage des métaux lourds au niveau des deux sites.

De ce fait, on peut déduire que les polluants accumuler dans les tissus de l'espèce examinées, et qui sont ingérer par le consommateur devrons poser un vrai problème sanitaire.

Les Références

Bibliographie

A

Abada-Boudjema Y-M., 1996. Cinétique, croissance, production et composition biochimique de deux bivalves mytilidés, *Perna perna* (L.) et *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) du littoral algérois. Thèse Doct. Muséum National Hist. nat. Paris, Fr. : i-iv + 1-243

Abada-Boudjema Y-M. et Dauvin J-C., 1995. Recruitment and life-span of two natural mussel populations *Perna perna* (Linnaeus) and *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck) from the Algerian coast. J. Mo Il. Stud., 61 : 467-481.

Agwuocha S. Kulkami B.G. et Pandey A.K., 2011. Altérations histopathologiques de l'hépatopancréas de *Gafrarium divaricatum* exposé au xylène, au benzène et à l'huile pour engrenages-WSF. Journal de biologie environnementale 32 (1) :35-8

Albakjaji M., 2011. La pollution de la mer méditerranée par les hydrocarbures liée au trafic maritime Economies et finances. Université Paris-Est, thèse de doctorat, 2010. Français.

Andral B., Stanisiere JY., Sauzade D., Damier E., Thebault H., Galgani F., et Boissery P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. Marine Pollution Bulletin 49(9-10) :704-712.

Andréa, M.M., Tomas, A.R.G., Vampré, T.M., Barreto, O.J.S. et Luchini, L.C., 2007. Bioaccumulation et rétention du 14 C-hexachlorobenzène (HCB) : I. La moule tropicale marine *Perna perna*. Bioindicateurs environnementaux, 2 (4), 219-228.
<https://doi.org/10.1080/15555270701712768>.

Avignon A., Balkau B., Bouée S., 2012. Type 2 Diabetes Treatment Intensification in General Practice in France in 2008-2009 : The DIAttitude Study. Diabetes & Metabolism, 38, S29-S35. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(12\)71532-X](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(12)71532-X).

B

Baumont S., Camard J. P., Lefranc A., et Franconie A., 2004. Réutilisation des eaux usées : risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France. Rapport ORS, 220.

Bayne BL., 1998. The physiology of suspension feeding by bivalve molluscs: an introduction to the Plymouth TROPHEE workshop. J Exp Mar Biol Ecol., 219: 1–19.

Bayne BL., Iglesias JIP., Hawkins AJS., Navarro E., Heral M. et Deslouspaoli JM., 1993. Feeding behaviour of the mussel, *Mytilus edulis* responses to variations in quantity and organic content of the seston. J. Mar. Biol. Assoc. U.K, 73: 813-829.

Beaune P.H., Lorient M.A., 2000. Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques. *Med. Sci.*, 16 (10), 1051-1056.

Breton C., Médial F., Pinatel C., Berville A., 2006. De l'olivier à L'oléastre : Origine et domestication de l'*Olea europaea* L dans le Bassin méditerranéen. *Cahiers agricultures*, 15, n°4.

Boucher-Rodoni R., 1982. Étude cytologique de la glande digestive de deux céphalopodes *Elédone cirrhosa* et *Sepia officinalis* ; *CAHIERS DE BIOLOGIE MARINE* Tome XXIII- pp. 393-413.

C

Cahen D., 2006. Dossier didactique, moule natures, Muséum des Sciences naturelles. Service éducatif ; Ed. resp. D. Cahen - rue Vautier 29 - 1000 Bruxelles ; info@sciencesnaturelles.be.

Carrière A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M.-C., Pénicaud L. et Casteilla L., 2006 -Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie, *Med Sci (Paris)*, 22, (1), p. 47 – 53, <https://doi.org/10.1051/medsci/200622147>.

Carrington E., 2002. Seasonal variation in the attachment strength of blue mussels: Causes and consequences. *Limnol. Oceanogr.*, 47: 1723-1733.

Cayré p., 1978. Etude de la moule *Perna perna* L. et des possibilités de mytiliculture en république populaire du CONGO ; *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. OcEanogr.*, XVI, (1) : 9-17

Chassard-Bouchaud C., 1996. Analytical microscopy and environment. Current developments using bioindicators of pollution by stable and radioactive elements. *Cell Mol. Biol.*, 42(3) ,361-383.

Chevallier H., 2007. L'eau un enjeu pour demain, Etat Des Lieux Et Perspectives, Editions Sang De La Terre-Médial. France. 352p.

Coe W. E. et Fox D. L., 1942 - Biology of the california sea mussel (*M. californianus*). 1. *Exp. Zool.*, 90: 1-30.

Coe W.E., 1943. Development of primary gonads and differentiation of sexuality in *Teredo navalis* and others pelecypods mollusks. - *Biol. Bull.*, 84 (2) 178-186.

Coulet M., 2005. Fleuves, sources de vie. Agence de l'eau Rhine Meuse. France.

D

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D et Milzani A., 2006 -Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem. Apr*; 52(4):601-23.

Dardignac M.J., 1996. La mytiliculture dans le Pertuis Breton. Synthèse des travaux réalisés en 1980 à 1992. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00045/15581>

Dardignac-Corbeil M.J., 1976. La moule. Revue des travaux de l'Institut des Pêches Maritimes. 40(2) : 315-345.

De Guterres V. B., da S. Guerreiro A., S. da C. Botelho S., Z. et Sandrini J., 2020. *Perna perna* Mussels Network as Pollution Biosensors of Oil Spills and Derivatives, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405896320315056>)

Deconinck W., 1971. Moule nature (dossier pédagogiques). Ed. resp. D. cahen- rue vautier 29-1000 bruxelles. p15

Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont D. et Rousselot, 2005 -Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques, p87-108.

Denny MV., 1985 -Wave forces on intertidal organisms: a case study. Limnol Oceanogr., 30: 1171–1187 .

Deslous-Paoli J.M., 1987. Alimentation et digestion chez les bivalves Laboratoire National Ecosystème Conchylicole IFREMER (FRANCE)

Drif F., 2012. Distribution des métaux traces chez les bivalves (Mollusques) dans le golfe d'Annaba (Nord-est-Algerien),Thèse de Doctorat Filière : Biologie Animale, Univ. Annaba Algérie.

Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Review, 82, 47-95.

E

El Shenawy N. S., Al Eisa R. A., El Salmy et Salah O.k., 2009. prophylactic effect of vitaminE against hepatotoxicity , nephrotoxicity ,haematological indices and histopathology induced by diazinon insecticide in mice. Current zoology 55(3) : 219-622'

F

Faurie C., Christiane F., Paul M., Jean D. et Jean-Louis H., 2012. Écologie Approche scientifique et pratique, 6ème, Edition TIC& DOC. France. p23.

Fernández-Reiriz M.J., Navarro J.M., Contreras A.M. et Labarta, U., 2008. Trophic interactions between the toxic *dinoflagellate Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: Feeding and digestive behaviour to long-term exposure. Aquat. Toxicol.30 ; 87(4), 245–251.

Fischer W., Bauchot M.L. et Schneider M., 1987. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37.vegetaux et invertébrés. FAO. Of the United Nations. 1: 760 p.

Francesconi A., Duvoisin R. M., 1998. Role of the Second and Third Intracellular Loops of Metabotropic Glutamate Receptors in Mediating Dual Signal Transduction Activation*,

Journal of Biological Chemistry, .273, (10), 5615-5624,

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818678184>)

G

Gaitán-Espitia J. D., Quintero-Galvis J. F., Mesas A. et D'Elfa G., 2016. Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (Bivalvia : Pteriomorpha) : Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. Scientific Reports, 26853.

Galimany E., Sunila I., Hégaret H., Ramón M., Wikfors G.H., 2008a. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: Histopathology, immune responses, and recovery. Harmful Algae. 7, 702-711.

Gauroy P., 1972. Le monde animal au laboratoire. Manuel de travaux pratiques de sciences naturelles. Pierron-editeur.217 p.

Gaylord B., Denny M.W. et Koehl MAR., 2003. Modulation of wave forces on kelp canopies by alongshore currents. Limnol. Oceanogr., 48: 860–871.

Gentony C. Y., 2006. L'IMMUNOHISTOCHIMIE : Son principe, ses applications et ses limites, Clinics in Mother and Child Health Vol 3, N° 1 : 477-481

Gesamp, 1985. Cadmium, lead and tin in the marine environment. UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution, Nairobi iv, 90 p.

Gesamp, 1988. Arsenic, mercury and selenium in the marine environment., UNEP. Oceans and Coastal Areas Programme Activity Centre, Nairobi, vi, 172 p.

Goeury D., 2014. "La pollution marine", in Woessner Raymond (dir.), Mers et océans, Paris : Atlante, Clefs concours.

Goldberg ED., 1975. The mussel watch - A first step in global marine monitoring. Marine Pollution Bulletin 6(7) :111-111.

Gomella C, Guerre H., 1982. Les eaux usées dans les agglomérations urbaines ou rurales. Tomes I : La collecte, Edition : Eyrolles. Paris. 512 pp.

Gosling E., 2003. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books. E. Gosling, Oxford, 443 p

Grizel H., 1997. Les maladies des mollusques bivalves : risques et prévention. Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties, 16(1), 161-171.

Grosclaude, 1999. Un point sur l'eau. Tome II usage et polluants Institut National de la recherche Agronomique, Ed. INRA. Paris.210p.

H

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.Q., Charlier C. et Chapelle J.P., 2007. les antioxydants, Rev Med Liege; 62 : (10) : 628-638.

file:///C:/Users/LENOVO/Downloads/Documents/stress_oxydant_rmlg_2007.pdf

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1993. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford.

Hily C., 1984. Variabilité de la macrofaune benthique dans les milieux hypertrophiques de la rade de Brest, volume 1. Thèse de doctorat, Université de La Bretagne Occidentale, France.

His A. et Cantin B., 1995. Biologie et physiologie des coquillages. IFREMER. Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral, IFAC-Papers OnLine, 108 p. V. 53,(2) ,16727-16732p.

J

Jorgensen C-B., 1960. Efficiency of particle retention and rate of water transport in undisturbed lamellibranchs./. Cons. Perm. Int. Expl. Mer., 29 : 96-116

K

Khaldoun L., 2009. Etude du cycle de reproduction de la moule *Perna perna* dans le littoral d'El Kala : suivi biométrique et histologique (en ligne). Mémoire de magistère ; science de la mer, Annaba : Université Badji Mokhtar 84p. <https://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2014/05/Memoire-de-magister.pdf>

L

Laubiet A., 1987. Biologie de la reproduction et l'élevage des crevettes *Penneides oceanis*.(2) :217-232.

Lecomte V., 2021. Notions essentielles d'écotoxicologie, Ecotoxicologie. [frhttps://ecotoxicologie.fr/notions-essentielles#polluants](https://ecotoxicologie.fr/notions-essentielles#polluants).

Limón-Pacheco, J., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutation research, 674(1-2), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.015>

Livingstone D. R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 120(1), 43-49

- Lowe D.M. et Fossato V.U., 2000.** L'influence de l'environnement Contaminants environnementaux sur LysosomalActivité dans leCellules digestives des moules (*Mytilus galloprovincialis*) du Venice lagon, *Aquat. Toxicol.* vol. 48,p. 75-85
- Lowe D. M., and Pipe R. K. 1994.** Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquatic Toxicology*, 30, 357–365.
- Lowe D.M., Moore M.N. et Clarke K.R., 1981.** Effets deHuile sur les cellules digestives des moules : quantitativee Modificationations dans la structure cellulaire et lysosomale, *Aquat. Toxy-col.* vol. 1, p. 213-226
- Lubet P., 1973.** Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck., 1819). *Synop. F.A.O. Pêche* 88 - 3,16 (10) : 028-08.
- Lubet P., 1959.** Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectindés. *Rev., Trav. Inst. Pêches Marit* 23(4) : 548.
- Lucas A., 1965.** Recherche sur la sexualité des Mollusques Bivales. Thèse Doctorat en science nature, Univ. Rennes
- Lupo C., Angot J.-L., 2020.** Problèmes de santé publique liés à la consommation de fruits de mer, *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, V. 204, (9),P. 1017-1033, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001407920305367>).
- ### M
- Marigomez J. A., Cajaraville M. P. and Angulo E. 1990.** Histopathology of the digestive gland-gonad complex of the marine prosobranch *Littorina litorea* exposed to cadmium. *Dis. aquat. Org.*, 9, 229-238
- Marteil L., 1976.** La conchyliculture Française. Biologie de l'huître et de la moule. *Inst. Scient. Tech. Pêches maritimes*, Nantes Cedex. France 319 p.
- Mathers N.F., 1973.** A comparative histochemical survey of enzymes associated with the process of digestion in *Ostrea edulis* and *Crassostrea angulata* (Mollusca: Bivalvia). *J. Zoo.*, Lond. 169, 169-79
- Maud C., 2019.** Etude des pathogènes, des conditions physiologiques et pathologiques impliqués dans les mortalités anormales de moules (*Mytilus sp.*). mémoire de doctorat, Biologie animale. Normandie Université, France.
- McLaughlin M.J. and Singh B.R., 1999.** Cadmium in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-9. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-4473-5>

Mehedinti R., 1999. Modificări microscopice și histochimice la nivelul branhiilor prelevate de la specia *Mytilus galloprovincialis* din Marea Neagră în urma intoxicației acute cu hidrocarburi, Analele Universității “Ovidius” Constanța, Seria Biologie-Ecologie, vol. III (sub tipar).

Migdal C. et Serres M., 2011. Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant, Med Sci (Paris), 27(4), p.405 – 412, <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>.

Milun V. and Zvonarić T. 2008. Chlorinated pesticides and PCB in the eastern Adriatic coastal waters using mussels *Mytilus galloprovincialis* as indicator Fresenius Environmental Bulletin 17 (11) 1891-1900.

Mitchell C.M. et Sturgis C.D., 2009. Lipid-rich hepatocellular carcinoma in fine-needle aspiration biopsy. Diagn Cytopathol ; 37:36-7.

Moore M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH ferrihemoprotein reductase in molluscs to environmental and experimental exposure to xenobiotics. Mar. Ecol. Prog. Ser., 46, 81-89.

Morton B.S., 1983. Feeding and digestion in Bivalvia. In : The Mollusca Wilbur K.M. & Saleuddin A.S.M. (eds).Physiologie, 5,65-147.

N

Nicholson S., 2002. Ecophysiological aspects of cardiac activity in the subtropical mussel *perna viridis* (L) (Bivalvia : Mytilidae). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 267: 22-207 p.

O

Orias F., 2015. Contribution à l’évaluation des risques écotoxicologiques des effluents hospitaliers : bioconcentration, bioaccumulation et bioamplification des résidus pharmaceutiques. Thèse préparée au Laboratoire d’Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés – ENTPE

Owen G., 1972. Lysosomes, Peroxysomes et Bivannes, Sci.Programme. Oxford , v.ouf. 60, p. 299-318

Owen G., 1974. Alimentation et digestion chez les bivalves, Adv.Comp. Physiol. Biochimie, NouveauOuiork; Londres : académiquePresse, , vol. 5, p. 1-35

P

Pain S. et Parant M., 2003. Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves, C. R. Biologies 326, (7), 659-672.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069103001562/>

Pearce I., Handlinger J.H. et Hallegraeff G.M., 2005. Histopathology in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat caused by the dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum*. *Harmful Algae* 4, 61-74

Peric L., Fafande I., Glad, M. and Bihari N. 2012. Heavy metals concentration and metallothionein content in resident and caged mussels *Mytilus galloprovincialis* from Rijeka bay, Croatian. *Fresenius Environmental Bulletin* 9, 2785-2794.

Pincemail J, Defraigne JO et Limet R., 1996. Oxidative stress in clinical situations ; fact or fiction? *European Journal of Anaesthesiology.* ; 13(3):219.

Piren-Seine, 2011. Le risque écotoxicologique dans le bassin de la Seine – Catherine Gourlay-Francé, Françoise Vincent-Hubert, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, Wilfried Sanchez, Alain Geffard, Yves Lévi, Lucie Oziol, Pierre Labadie, Jean-Marie Mouchel, Mireille Raguét, Sylvain Théry. 53p.

Plan micropolluants 2016-2021. pour préserver la qualité des eaux et la biodiversité, Mise à jour de 2020, Ministère aff.socil.& sant.,minist.l’agricult. l’agroalmt.France & foret ;67p.

R

Ramade F., 2007. Introduction à l’écotoxicologie. Fondements et applications. Éditions Tec & Doc ; Lavoisier, Paris. XV. 640 p.

Rasmussen L., 1982. Études au microscope optique de l’aiguTEffets oxiques de la N-nitrosodiméthylamine sur le milieu marinmoule *Mytilus edulis* , J. Inverseur. *Pathol.* ,vol. 39, p. 66-80.

Rasmussen LP.D., Hage E. et Karlog O., 1983. Light etÉtudes microscopiques électroniques sur les maladies aiguës et chroniquesEffets des composés N-nitroso sur la moule marine,*Mytilus edulis* (L.) I. N-Nitrosodiméthylamine, *Aquat.Toxicol.* , vol. 3, p. 285-299.

Rejsek F., 2002. Analyse des eaux : Aspects réglementaires et techniques. Scéren (CRDP AQUITAINE). Coll. Biologie technique. Sciences et techniques de l’environnement. 360p.

Renzi A., 1963. Ricerche ecologica ed idrobiologica su *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). nel golfo di Napoli.- *Ibid.* 18 (2) : 187-238.

S

Saraiva S., van der Meer J., Kooijman S.A.L.M., Witbaard R., Philippart C.J.M., Hippler D. et Parker R., 2012. Validation of a Dynamic Energy Budget (DEB) model for the blue mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 463141-158.

Seed R. et Suchanek T.H., 1992. Population and community ecology on *Mytilus*. In: the mussel *Mytilus*: Ecology, physiology, genetics and culture. Developpements in Aquaculture and fisheries Sciences, (E. Gosling Ed). Elsevier Amsterdam, pp : 87-169.

Serpe F.P., Espesito M., Gallo P., Salini M., Maglio M.P., Hauber T. et Serpe,L. 2010. Determiration of Heavy metals polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in *Mytilus galloprovincilkalis* from campania coasts, Italy Fresenius Environmental Bulletin 19, 2292-2296.

Sheir S. and Handy R., 2010. Tissue injury and cellular immune responses to cadmium chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: modulation by lipopolysaccharide. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 59,602–613.

Shinde A., Ganu J., Naik P. et Sawant A., 2012. Oxidative stress and antioxidative status in patients with alcoholic liver disease: Biomedical Research 2012; 23 (1): 105-108

Siddall S.E., 1980. A Clarification of the Genus *Perna* (Mytilidae). Bulletin of Marine Science, 30, 858-870.

Suchanek TH., 1986. Mussels and their role in structuring rocky shore communities. In: Moore PG, Seed R, editors. The Ecology of Rocky Coasts. New York, NY: Columbia University Press. p. 70–96.

Sun CJ., Vaccaro E. et Waite JH., 2001. Oxidative stress and the mechanical properties of naturally occurring chimeric collagen-containing fibers. Biophys. J., 81: 3590-3595.

T

Taleb M. Z. Boutiba Z., 2007. LA MOULE *Mytilus galloprovincialis* : BIOINDICATRICE DE POLLUTION MARINE - CAS DU PORT D'ORAN, Université d'Oran Es-Sénia, Algerie Sciences & Technologie C. N°25, pp.59-64.

Theobald N. et Gama A. 1958. Paléontologie - Doin éd.

Tiab A., Abdou M. et Fournier S., 2013. L'immunohistochimie : des lunettes pour mieux voir ? Institut Central (ICHV), Hôpital du Valais, Sion, Vol. 15, N° 5

Topi T., Bani A., Malltezi J. et Sulce S, 2012. Heavy metal in Soil, Sediments, Mussels and water from Butrinti Lagoon (ALBANIA) Fresenius Environmental Bulletin 21,3042- 3051.

U

UNEP/RAMOGÉ, 1999. Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring program. UNEP, Athens

Usheva L. N., Vaschenko M. A., and Durkina V. B., 2005. Histopathology of the Digestive Gland of the Bivalve Mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from Southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan, Institute of Marine Biology, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Russian Journal of Marine Biology, 2006, Vol. 32, No. 3, pp. 166–172

V

Venteo L. et Sutter A., 2011. Les différents systèmes d'amplification en immunohistochimie, avantages, inconvénients et optimisation, Tour. Le P. Histotechnol., 2011, 24, (1) ; 129-142.

Viarengo A., Palmero S., Zanicchi G., Capelli R., Vaissiere R. and Orunesu, M. 1985. Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* Lam. Mar. Environ. Res., 16, 23-36.

W

Weiss A., Delproposto J. et Giroux C.N., 2004. High-throughput phenotypic profiling of gene-environment interactions by quantitative growth curve analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Anal Biochem 327(1) :23-34

Wu J.Q., Kosten T.R., Zhang X.Y., 2013. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 46, 200–206.

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.015>

Résumé

Résumé

La pollution générée par les activités anthropiques est un fléau qui affecte nos systèmes, et ce sont les mers et les océans qui payent le plus pesant tribut. L'évaluation quantitative de cette contamination s'appuie sur l'utilisation des biomarqueurs pour mesurer la réaction des organismes bioindicateurs à leur échelle cellulaire et moléculaire, avant que les effets engendrés par ces substances toxiques ne soient létaux ou sub-létaux.

Pour cet effet, le mollusque bivalve *Perna perna* colonisant le golfe d'Annaba a été choisi. Un échantillonnage qui a été assuré à partir de mi-avril jusqu'au début mai 2024 sur deux sites, El-Hnaya et Sidi Salem.

Une étude histologique et immunohistochimique sont réalisées au CHU de Constantine, au sein du service d'anatomopathologie. Les tissus de la glande digestive chez les deux sexes sont examinés au microscope photonique.

L'observation microscopique a révélé l'existence d'altérations au niveau des coupes. Dont, des malformations tissulaires dues à l'aspect irrégulier de l'architecture générale du tissu, telles que les pertes cellulaires et les nécroses. Ainsi des dommages cellulaires, les fragmentations membranaires de l'épithélium apical au niveau des tubules digestifs. Une estimation apparente a été évaluée par ces altérations et observée clairement chez les individus récoltés du site d'El Hnaya, particulièrement chez les mâles.

Mots clés : Bivalve, histologie, immunohistochimie, bioindicateur, *Perna perna*.

Abstract

Pollution generated by anthropogenic activities is a scourge that affects our systems, and it is the seas and oceans that bear the heaviest burden. The quantitative assessment of this contamination is based on the use of biomarkers to measure the reaction of bioindicator organisms at their cellular and molecular scale, before the effects caused by these toxic substances are lethal or sub-lethal.

For this purpose, the bivalve mollusk *Perna perna* colonizing the Gulf of Annaba was chosen. Sampling which was carried out from mid-April until the beginning of May 2024 on two sites, El-Hnaya and Sidi Salem.

A histological and immunohistochemical study are carried out at the Constantine University Hospital, within the anatomopathology department. The digestive gland tissues in both sexes are examined under a light microscope.

Microscopic observation revealed the existence of alterations at the level of the sections. Including tissue malformations due to the irregular appearance of the general architecture of the tissue, such as cell loss and necrosis. Thus cellular damage, membrane fragmentations of the apical epithelium at the level of the digestive tubules. An apparent estimate was evaluated by these alterations and clearly observed in individuals collected from the El Hnaya site, particularly in males.

Key words: Bivalve, histology, immunohistochemistry, bioindicator, *Perna perna*.

الملخص

إن التلوث الناجم عن الأنشطة البشرية هو آفة تؤثر على أنظمتنا البيئية، حيث أن البحار والمحيطات أكثرها تأثراً. ويستند تقييم كميات هذا التلوث على استخدام المؤشرات البيولوجية لتقييم ردود الفعل الكائنات الحية على الصعيد الخلوي والجزيئي، قبل أن تؤثر هذه المواد السامة بشكل قاتل أو شبه قاتل.

لهذا الغرض، تم اختيار الرخوي ثنائي الصدفة من نوع *Perna perna* الذي يعيش في خليج عنابة، وقد جمعت العينات على امتداد فترة تطول من منتصف أبريل حتى بداية مايو 2024 على مواقعين، الحناية وسيدي سال.

تم إجراء الدراسة النسيجية والدراسة الكيميائية النسيجية المناعية في قسم العناية الطبية بقسنطينة. ثم فحص نسيج عضو الكبد لكلا الجنسين تحت المجهر الضوئي.

وقد أظهرت الملاحظة المجهرية أن هناك تشوهات على مستوى المقاطع النسيجية. بما في ذلك اختلالات شكلية غير منتظمة عموماً، مثل فقدان الخلايا والموت المبرمج للخلايا. وبالتالي، تضرر الخلايا، وتمزيق للأغشية الخلوية على مستوى الانبيبات الكبدية. تم ثم تقدير هذه التشوهات وملاحظتها بشكل واضح في موقع الحنايا وخاصة عند الذكور.

الكلمات المفتاحية: ثنائيات الصدفة، الدراسة النسيجية، الدراسة الكيميائية النسيجية المناعية، كائن بيولوجي *Perna perna*.