

Utilisation de l'approche multimarqueurs pour l'évaluation de l'état de santé du littoral de Sidi Ifni (Maroc) : Indice de la Réponse Intégrée des Biomarqueurs (IBR)

Mohamad Abbassi¹, Imane Charioui¹, Ali Banaoui^{1,2}, Maryem Nadir², Mustapha Agnaou², Mohammed Mahmoud Hamoudi Bah¹, Abdessamed Hikmat¹, Abdelhadi Laalaoui¹, Abderrazak Kaaya^{1*}

¹Equipe de BioEnvironnement, SantéetBioressources, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, BP 8106, Agadir, Maroc

²Laboratoire des Systèmes Aquatiques (AQUAMAR), Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, BP .8106, Agadir, Maroc

Email of corresponding author: a.kaaya@uiz.ac.ma

Received : 30 October 2017 Accepted : 05 January 2018

Introduction

La multiplication de l'utilisation des biomarqueurs seuls ou dans le cadre d'une approche multi-biomarqueurs a rendu nécessaire le développement de stratégies intégratives de traitement et de présentation des données. Il s'avérerait nécessaire de réduire la complexité de l'analyse des résultats (parfois générés en grand nombre) en les appréhendant de façon synthétique, et d'augmenter encore la pertinence de l'approche multi-biomarqueurs par rapport à une analyse individuelle de chaque réponse biologique étudiée. Ainsi, l'usage de certains outils tend à se généraliser, comme c'est le cas de l'indice composite intégrant la réponse des biomarqueurs (Integrated Biomarkers Response ou IBR).

Les biomarqueurs peuvent s'avérer très pertinents dans l'évaluation des effets d'une contamination multiple et permettent d'avoir un diagnostic très fiable. Cependant, de nombreux autres facteurs sont susceptibles d'influencer la physiologie d'un organisme et donc la réponse des biomarqueurs et la bioaccumulation des métaux traces. C'est ainsi que des facteurs intrinsèques, tels que l'âge, le sexe, le statut reproducteur ou les caractéristiques génétiques de l'espèce sentinelle peuvent influencer les biomarqueurs. D'autres facteurs considérés comme extrinsèques peuvent aussi exercer leurs effets sur la réponse des biomarqueurs. C'est le cas de la température, l'oxygène dissout, le pH et la salinité [1].

La ville de Sidi Ifni est l'un des pôles économiques les plus importants de la région de Guelmim-Oued Noun. Cette région, dont l'économie est basée sur la pêche et le tourisme, est tributaire de la richesse de son littoral. Cependant, ce travail vise à évaluer

l'état de santé de ces écosystèmes par le suivi des biomarqueurs de pollution mesurés chez la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Matériel et Méthodes

Présentation des sites d'étude

La zone d'étude s'étend le long du littoral de la province de Sidi Ifni, depuis la côte de Mirleft jusqu'aux côtes de la ville de Sidi Ifni.

Le choix des sites repose, d'une part, sur la qualité du site en fonction de l'éloignement et la proximité de sources de pollution et, d'autre part, sur la facilité d'accès afin de pouvoir faire l'échantillonnage dans les meilleures conditions.

Notre étude a été réalisée au niveau de quatre sites : MIR (S₁), CHIKH (S₂) : STEP (S₃) et TZR (S₄) (Figure 1).

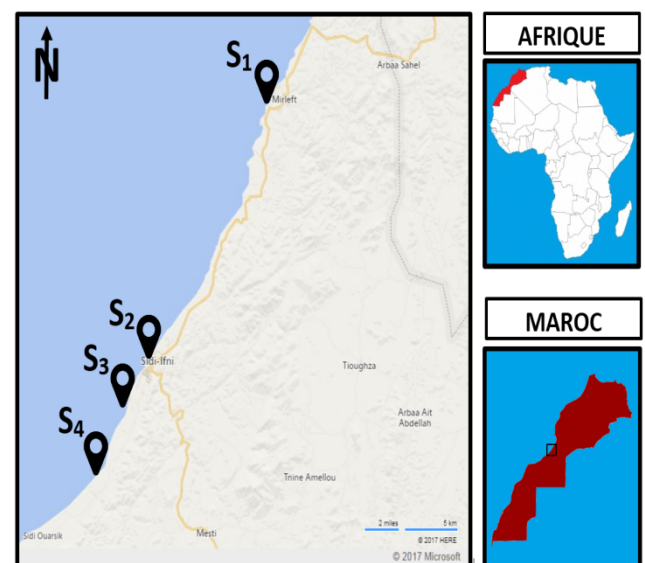


Figure 1 : Localisation des sites d'étude dans le littoral de Sidi Ifni MIR (S₁), CHIKH (S₂), STP (S₃) et TZR (S₄)

- Le site de Mirleft (S1 : 29°58'41.68''N, 10°07'40.82''W) est situé à l'entrée nord de la Commune de Mirleft. C'est une zone rocheuse loin de toute source de pollution. Il est caractérisé par son hydrodynamisme intense et son inaccessibilité, il est ainsi considéré comme station de référence, est éloigné de toute activité anthropique (industrie, activités urbaines).

- Le site Cheikh Sidi Ali Ifni ou Sidi Ifni (S2: 29°38'70.55''N, 10°17'29.54''W), est un site situé à l'entrée nord de la ville de Sidi Ifni. Il reçoit les rejets des eaux usées domestiques non traitées de la ville de Sidi Ifni.

- STEP (S3: 29°34'20.80''N, 10°20'12.13''W), ou Anou n'Ali. Ce site est situé à l'extrémité sud de la ville à 5km du point de rejet des eaux usées. C'est une côte rocheuse associée à une plage de galets et exposée à un hydrodynamisme moyen et considérée comme le site le moins pollué, est également caractérisée par la présence de l'émissaire des eaux usées épurées de la ville et du voisinage (au sud) de port de pêche.

- Tazrot (S4: 29°17'37.39''N, 10°14'11.27''W). Ce site, localisé à l'extrémité sud de la ville, est distant de 15 km du point de rejet des eaux usées brutes (S1) et de 10 Km du site S2. Il se trouve loin de toute source de pollution et considéré comme site propre.

Analyses physico-chimiques de l'eau

Quatre paramètres physico-chimiques ont été suivis: le pH, la salinité, la conductivité et la température. Les analyses physico-chimiques de l'eau ont été réalisées in situ et à l'aide des appareils portatifs multiparamétriques (ADWA, AD111, AD310).

Récolte des animaux

Notre étude a été réalisée au cours la période Juin 2013 – Mai 2014. A cet effet, des moules de taille 3 à 4 cm sont prélevés mensuellement et à marée basse. Elles sont récoltées au niveau médiolittoral puis lavées à l'eau de mer puis transportées en conditions isothermes jusqu'au laboratoire où elles sont stockées à - 40 °C jusqu'au moment des dosages.

Préparation des échantillons

Dans un premier temps, les animaux étaient décongelés et la masse molle est prélevée puis séchée sur papier absorbant afin d'éliminer l'excédent d'eau et de peser la masse tissulaire dans de bonnes conditions. Cette masse est ensuite plongée dans du tampon Tris 100 mM

à pH 7,4 à 4°C (à raison de 1/3 poids/volume) et immédiatement homogénéisée à l'aide d'unbroyeur Ultra-Turax. L'homogénat ainsi obtenu est alors centrifugé à 9000g pendant 30 minutes et à 4°C dans une centrifugeuse (Sigma 3K10). Le surnageant obtenu à 9000g constitue la fraction post-mitochondriale ou S9 qui est soit directement utilisée ou conservée à - 80°C jusqu'au moment des dosages biochimiques.

Dosages biochimiques

Dosage de l'activité de l'Acétylcholinestérase (AChE)

L'activité AChE est déterminée selon la méthode colorimétrique d'Ellman et al. [2] basée sur la réaction de la Thiocholine, provenant de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine, avec le 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoate) (DTNB). La densité optique à 412 nm est notée toutes les 15 secondes pendant 2 minutes. La lecture des essais est toujours effectuée contre le blanc. La valeur obtenue pour l'hydrolyse spontanée est soustraite des valeurs des essais.

Dosage de l'activité de Glutathion S-transférase (GST)

Le dosage de la GST est basé sur la méthode colorimétrique décrite par Habig et al. [3], qui consiste à suivre l'apparition du complexe glutathion-substrat (GSX) par spectrophotométrie à 340 nm. Le substrat utilisé est le CDNB (1-Chloro-2,4-Dinitro-Benzène). Mesure de la densité optique à 340 nm et à 25°C.

Dosage de l'activité de Catalase (CAT)

Le dosage de l'activité de catalase a été adapté d'après la méthode d'Aebi [4], basée sur la mesure des variations d'absorbance dues à la dégradation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 240 nm.

Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

Le dosage du MDA est effectué selon la méthode de Sunderman [5], qui utilise le test de l'acide thiobarbiturique (TBA). Cette mesure est basée sur les propriétés qu'ont certains composés, comme le MDA à réagir avec l'acide thiobarbiturique TBA pour régénérer un produit coloré (rose) qui absorbe à 532nm. Les concentrations du MDA sont calculées sur la base d'une gamme étalon réalisée avec le tétraméthoxypropane (TMP) dilué dans l'éthanol à 40%.

Dosage des métallothionéines

Les métallothionéines dans les échantillons sont quantifiées en évaluant le contenu en résidus -SH par une méthode spectrophotométrique utilisant le réactif d'Ellman (DTNB : 5,5dithiobis 2-acidonitro-benzoïque) [6]. Une gamme étalon est préparée au préalable en utilisant comme référence plusieurs concentrations de la forme réduite du glutathion portant un groupement thiol SH [7]. Étant donné que les métallothionéines contiennent un nombre important de cystéines (environ 20 à 30 %), la détermination des MTs est fondée sur la détection des groupements SH permettant une évaluation plus sélective de ces métalloprotéines.

Dosage des protéines

Le taux des protéines totales de la fraction S9 est déterminé par la méthode de Lowry et al. [8]. Cette technique colorimétrique combine la réaction de biuret avec du réactif mercurique de phénol (Réactif de Folin-Ciocalteu). Les mesures sont réalisées à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Varian DMS. La concentration de l'échantillon en protéines est calculée à partir de la gamme étalon réalisée avec le standard Sérum Albumine Bovine (SAB).

Traitement des résultats

Expression des résultats

Les activités spécifiques de l'ACHE, GST et CAT sont exprimés en (nmol/min/mg de protéines dans le S9) et le MDA est exprimé en nmol/mg de protéines dans l'échantillon (S9). La quantité des métallothionéines exprimée en µg/g de tissu frais.

Calcul de l'indice IBR

L'indice « Integrated Response Biomarkers » (IBR) est une méthode pour combiner toutes les réponses des biomarqueurs mesurés en un indice IBR [9]. La méthode appliquée ici est celle de Beliaeff et Burgeot [9] modifiée par Devin et al. [10]. La matrice des valeurs IBR, permet le calcul de la médiane pour chaque site d'étude permettant ainsi la comparaison inter-sites des valeurs IBR.

Analyses statistiques

Les données expérimentales ont été initialement testées pour la normalité et l'homogénéité de la variance, afin de répondre aux exigences statistiques. Les données ont été exprimées en moyenne ± écart-type (SD). L'analyse statistique des données a été effectuée en utilisant une analyse de variance (ANOVA) et par le test de la plus petite différence significative. (P.P.D.S). Le coefficient de corrélation de Pearson a également été calculé afin d'étudier les relations entre les données chimiques et biochimiques. Tous les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel Statistica 10 (StatSoft).

Résultats et discussion

Corrélation entre les paramètres physicochimiques du milieu et les biomarqueurs

La relation entre les paramètres physicochimiques et les paramètres biochimiques sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1: Coefficient de corrélation entre les paramètres physicochimiques de l'eau de mer et les biomarqueurs mesurés chez *Mytilus galloprovincialis* prélevée sur les sites Mirleft (S0), Cheikh (S1), STEP (S2) et Tazrot (S3), *Corrélation de Pearson* : (* : $p < 0.05$) ; (** : $p < 0.01$)

		ACHE	CAT	GST	MDA
S0	T	-,487**	-,312**	,467**	-0,023
	pH	,447**	,531**	-0,004	0,205
	Sal	-,346**	-,375**	,350**	0,04
S1	T	-,623**	-,790**	,470**	-0,147
	pH	,505**	,763**	-,379**	0,228
	Sal	-,441**	-,492**	,242*	-0,113
S2	T	-,572**	-,373**	0,137	0,021
	pH	,261*	0,195	-,422**	0,031
	Sal	-,398**	-,442**	0,207	0,211
S3	T	-,458**	-0,147	0,202	-,460**
	pH	-0,199	-0,197	-,317**	0,068
	Sal	-,390**	-0,105	0,047	-,461**

Aucune corrélation significative n'a été observée entre les teneurs en MDA et les différents paramètres physicochimiques de l'eau sur tous les sites, à l'exception de la station Tazrot où les niveaux en MDA sont corrélés significativement ; (** : $p < 0.01$) avec la température et la salinité de l'eau de mer.

En considérant individuellement les paramètres biochimiques mesurés chez *Mytilus galloprovincialis* sur chaque site, des corrélations linéaires apparaissent dans le site de Mirleft, Cheikh et STEP entre les activités enzymatiques des biomarqueurs (AChE, CAT et GST) et les paramètres physicochimiques de l'eau de mer avec quelques écarts (STEP : entre pH et CAT, entre T°C et GST, entre Salinité et GST ; MIR : entre pH et GST).

Les rapports enregistrés sont négatifs avec la température et la salinité pour l'AChE et CAT et positives pour la GST, alors qu'elles sont positives avec le pH pour l'AChE et CAT et négatives pour la GST.

Des corrélations significatives ont été, également, notées sur le site Cheikh avant l'arrêt des rejets.

Réponse intégrée des biomarqueurs

Afin d'évaluer l'état de santé du littoral de Sidi Ifni, l'indice de composite intégrant la réponse des biomarqueurs (IBR) a été appliquée aux biomarqueurs mesurés chez les moules prélevées sur les différents sites de Sidi Ifni. En général, les valeurs IBR montrent une large gamme de variation sur les différents sites.

La Figure 2 présente le profil de variation saisonnière de l'IBR chez la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant des sites de Sidi Ifni.

La réponse intégrée des biomarqueurs, chez les moules des sites Cheikh avant l'arrêt des rejets des eaux usées, semble être le site le plus pollué.

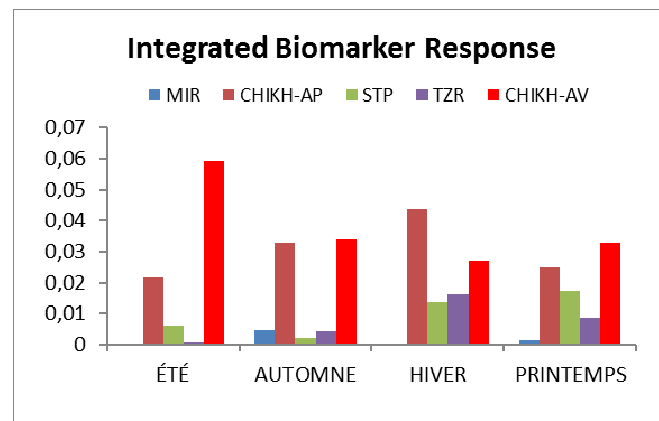


Figure 1 : Évolution saisonnière de l'indice des réponses de biomarqueur (IBR) chez *Mytilus galloprovincialis* et les sites des sites Mirleft (MIR), Cheikh avant et après l'arrêt des rejets des eaux usées (CHIKH-AV et CHIKH-AP), STEP (STP) et Tazrot (TZR)

Considérant chaque site individuellement, la majorité des biomarqueurs sont induits chez les moules de la station Cheikh, puis le site de STEP, alors que le site Tazrot reste le plus proche de site Mirleft, ce qui a été confirmé par nos résultats en tant que site équilibré et considéré initialement en tant que site de référence. (Figure 3). Ce résultat est confirmé aussi par la représentation radar des résultats relatifs aux indicateurs biochimiques mesurés selon le site (Figure 3) et selon le biomarqueur (Figure 4).

Les valeurs de l'IBR ont tendance à augmenter sur les sites contaminés comme un indicateur de stress environnemental. L'IBR est un outil pratique pour évaluer la réponse combinée des biomarqueurs. Cet indice peut être utilisé pour refléter les effets biologiques de la contamination mesurée sur différents sites, indépendamment de la variation de l'ensemble des biomarqueurs utilisés pour le calcul de cet indice [9].

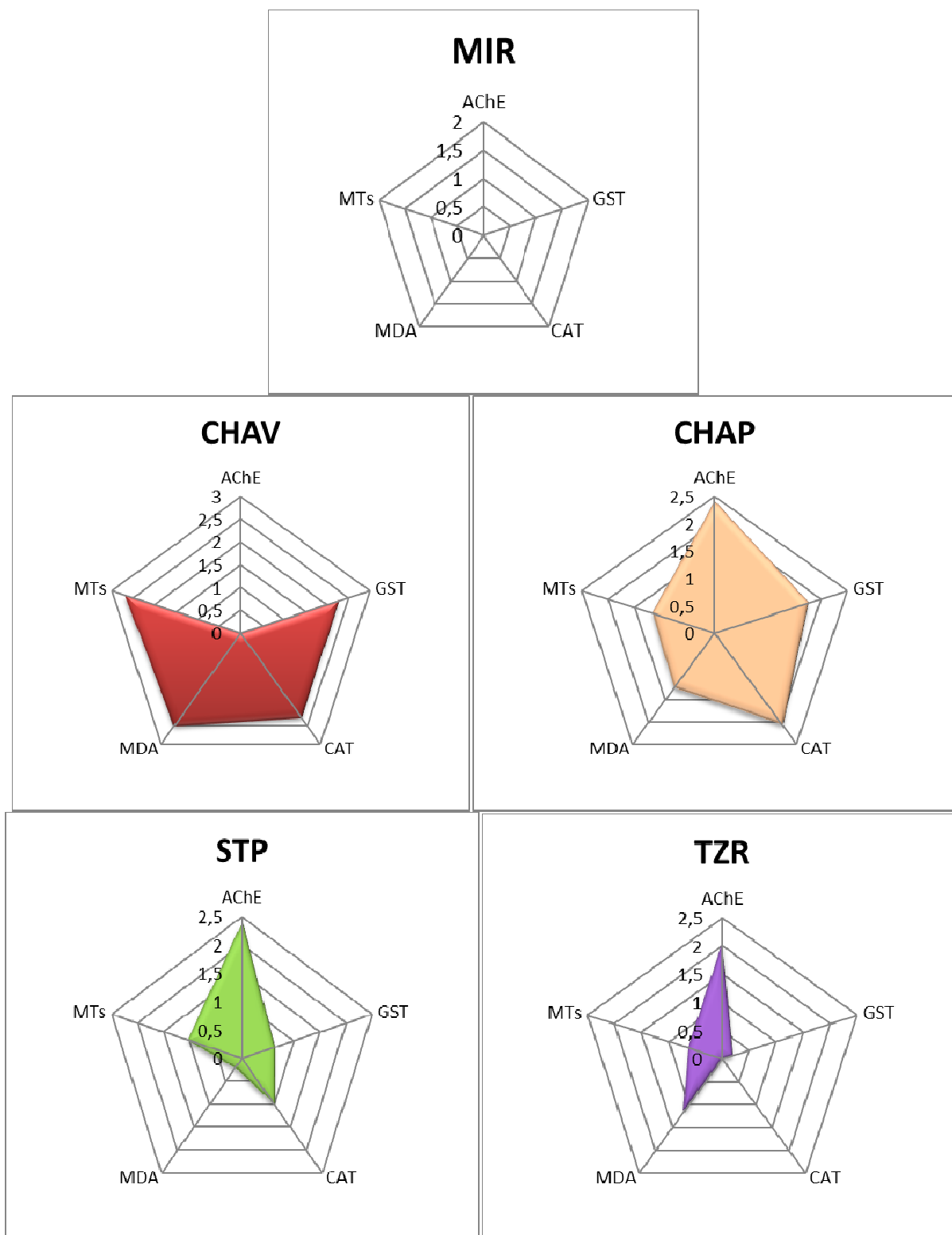


Figure 2 : Représentation en radar de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR) chez les moules prélevées dans les sites Mirleft (MIR), Cheikh avant et après l'arrêt des rejets des eaux usées (CHIKH-AV et CHIKH-AP), STEP (STP) et Tazrot (TZR)

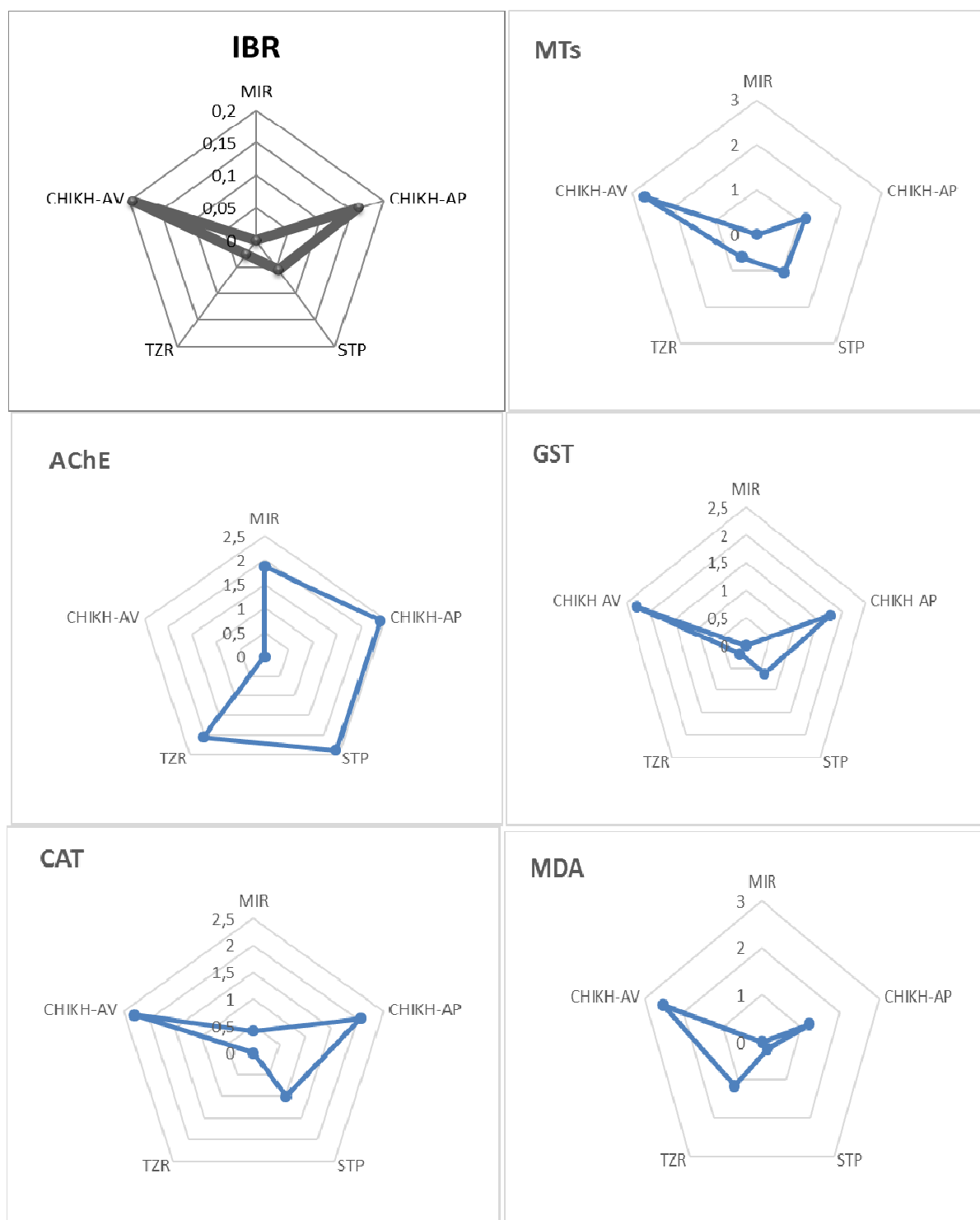


Figure 4 : Représentation en radar de la réponse intégrée des biomarqueurs chez les moules prélevées dans les sites Mirleft (MIR), Cheikh avant et après l'arrêt des rejets des eaux usées (CHIKH-AV et CHIKH-AP), STEP (STP) et Tazrot (TZR)

Discussion

L'approche multi-marqueurs utilise une palette de biomarqueurs qui permet de différencier entre les types de contaminants et de déterminer leur nature [11]. Ainsi, un ensemble de biomarqueurs biochimiques fournirait une base plus valable pour l'interprétation des enquêtes écotoxicologiques, permettant à l'information d'être résumée sous la forme d'ensembles de données multidimensionnelles [9]. Les différents biomarqueurs répondent à différents facteurs de stress ce qui permet d'évaluer l'état d'une espèce cible et la qualité de l'environnement.

Plusieurs indices intégrant la réponse d'une batterie de biomarqueurs ont été développés dans un contexte d'écotoxicologie aquatique [12], puis appliqués pour classer les sites de prélèvement et refléter les gradients de contamination. Ces indices constituent ainsi des outils décisionnels pour évaluer et préserver la santé des écosystèmes. Cette approche permet de résumer l'information, précédemment portée par plusieurs variables, en une variable unique, de la façon la plus pertinente possible. De tels indices présentent l'avantage de faciliter l'interprétation des résultats et leur communication et peuvent constituer ainsi un critère d'évaluation fiable pour des comparaisons spatiales ou une surveillance spatio-temporelle de tendances [12].

Dans notre travail, nous avons utilisé l'indice de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR : Integrated Biomarker Response), proposé par Beliaeff et Burgeot [9] et calculé selon la nouvelle méthode de Devin et al., [10]. Il a été appliqué aux données issues de l'étude mensuelle (12 mois) de cinq biomarqueurs (AChE, CAT, GST, MDA, MTs) sur quatre sites du littoral de Sidi Ifni (MIR, CHIKH, STP, TZR).

L'application de l'IBR, nous a permis d'évaluer l'état de santé des moules et par conséquent celui du littoral de Sidi Ifni et de classer ainsi les sites d'étude selon leurs niveaux de contamination.

Comme indiqué précédemment, il est important de tenir compte des corrélations et des interactions potentielles entre les contaminants et les réponses des biomarqueurs. Nos résultats ont en effet révélé que les MTs constituent le biomarqueur le plus induit au niveau des moules prélevées sur des sites les plus contaminés (Cheikh) et pendant les deux périodes d'échantillonnage (Avant et après l'arrêt de rejet), ceci est en accord avec les concentrations élevées de contamination par des métaux.

Dans le présent travail, les valeurs de l'IBR trouvées sur les quatre sites sont en accord avec les concentrations des métaux détectées dans les tissus de l'animal. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées sur les deux sites les plus stressants

pour la vie des moules (Cheikh et Step). De même, Damiens et al., [13] ont constaté que les valeurs de l'IBR calculées à partir des activités de l'AChE, la GST et la CAT et les concentrations de MDA dans les trois essais successifs étaient en accord avec les concentrations du cuivre et de PCBs dans les moules transplantées, mais pas avec les concentrations de HAPs. Boreg et Lehtonen [14] et dagnino et al. [15] considèrent que l'application des indices intégrateurs de biomarqueur est la meilleure approche disponible qui permet de contrôler les effets de pollutions dans les écosystèmes marins.

Lu et al. [16] ont utilisé l'indice de la réponse des biomarqueurs intégrés dans le but de combiner six biomarqueurs (EROD, GST, GPX, GSH, SOD, et TBARS) et de quantifier l'impact de la pollution chez des poissons transplantés (*Carassius auratus*) sur les sites pollués du lac Taihu (Chine). Les analyses de l'IBR ont permis d'avoir une bonne discrimination entre les différents sites pollués et elles sont en accord avec les PCBs et métaux dans les sédiments.

D'autres travaux, étudiant la réponse d'une batterie d'autres biomarqueurs (Stress oxydatif et indicateurs de génotoxicité) chez des poissons, ont permis, sur la base de l'utilisation de l'IBR, de mettre en avant son importance dans la détermination des niveaux de contamination dans plusieurs sites pollués dans le Golf de Saronikos en Grèce [17].

En général, nos résultats indiquent que l'indice IBR est un outil pratique qui pourrait être appliqué dans le littoral de Sidi Ifni pour évaluer le stress induit par les contaminants chimiques chez les organismes vivants dans cet écosystème.

Conclusion

L'application de l'approche de réponse intégrée des biomarqueurs (IBR) a permis d'évaluer l'état de santé de l'écosystème marin du littoral de Sidi Ifni en général et l'influence des eaux usées sur les moules, et par conséquent les ressources marines, en particulier.

L'analyse corrélative, couplant les interactions entre les facteurs abiotiques et biotiques dans l'espace et le temps, a permis d'identifier une corrélation positive entre les métaux traces et les biomarqueurs et précisément les métallothionéines. Elle a aussi contribué à réaliser une interprétation intégrée des biomarqueurs lors de contamination par les eaux usées dans le littoral de Sidi Ifni.

Cette situation nous incite, dans les conditions actuelles, à renforcer la surveillance du littoral de la ville de Sidi Ifni et des sites avoisinants et de développer des moyens efficaces de prévention

contre la pollution. Par ailleurs, il faut penser, à long terme, à traiter l'ensemble des eaux usées de la ville et assurer à suivre les performances d'épuration de la STEP installée à Sidi Ifni.

Références

- [1] Amiard J. C., Caquet T.H., Lagadic L. (1998). Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In : *Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard and Ramade F., Lavoisier Tec et Doc, Paris, 320 pages.
- [2] Ellman G. L., Courtneykd., Andresv., R. & M. Featherstone, (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmac.*, 7, pp 88-95.
- [3] Habig W.H., Pabst M.J. & Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biol. Chem.*, 249 (22), pp 7130-7139.
- [4] Aebi H. (1983). Catalase. In: *Methods in enzymatic analysis*, Bergmeyer HU (ed), Vol 3. New York, Academic Press, pp 273-286.
- [5] Sunderman F W (1985). Historical review and assessment of clinical hemoglobinometry in the United States. *An. Clin. Lab. Sc.*, 15 (1): pp 1-12.
- [6] Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Bioch. Biophys.* 82, pp 70-77.
- [7] Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., & Fabbri, R., (1997). Simple methods for metallothionein evaluation in the tissues of marine invertebrates such as Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 44, pp 69-84.
- [8] Lowry O.H., Roseborough N.J., Farrand A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, pp 265-275.
- [9] Beliaeff B & Burgeot T (2002). Integrated biomarker response (IBR): a useful graphical tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 21: pp 1316-22.
- [10] Devin S, Burgeot T, Giambérini L, Minguez L. and Pain-Devin S (2014) The Integrated Biomarker Response revisited: optimization to avoid misuse. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2014 Feb ; 21(4): pp 2448-2454.
- [11] Narbonne, J.F., Mora, P., Michel, X., Budzinski, H., Garrigues, P. (1999). Biological markers of environmental contamination in marine ecosystems: BIOMAR project. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, 18(3-4): 205-220.
- [12] Wosniok, W., Broeg, K. & Feist, S.W. (2005). Review of the health indices used for the interpretation of data obtained from biological effects monitoring activities and associated research studies using pathology and disease, 2005 WGPDMO Report, Annexe 8, 9 page
- [13] Damiens G, Gnassia-Barelli M, Loques F, Roméo M, Salbert V (2007). Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, 66: pp 574-583.
- [14] Broeg, K. & Lehtonen, K.K. (2006). Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Mar. Poll. Bull.*, 53, pp 508-522.
- [15] Dagnino, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Broeg, K., Canesi, L. & Viarengo, A. (2007). Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers*, 12, pp 155-172.
- [16] Lu G. H., Ji, Y., Zhang H. Z., Wu H., Qin J. & Wang, C. (2010). Active biomonitoring of complex pollution in Taihu Lake with *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 79(5), pp 588-594.
- [17] Tsangaris C, Vergolyas M, Fountoulaki E, Nizheradze K (2011). Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in grey mullet (*Mugil cephalus*) from a polluted environment in Saronikos gulf, Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 61: pp 482-490.