

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955- سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologique

Spécialité : Ecotoxicologie animale

Intitulé :

Etude biochimique et histopathologique de la toxicité des nanoparticules
d'oxyde de Titane (TiO_2) chez la moule *Perna perna* (Linnaeus, 1785)
bioindicatrice de la pollution marine.

Présenté Par : Boudinar sarah

Bekkouche djihane

Bouhaouala Abir

Chaalen Salima

Membre de Jury:

M ^{eme} . Gabli. Z	MCA	Président	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
M ^{eme} . Nadji. S	MCB	Promoteur	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
M ^{eme} . Bendjedid. M	MAA	Examineur	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2022/2023

Remerciement

On remercie premièrement Allah tout puissant qui ne cesse de nous protéger, et de nous aider durant notre chemin.

La présentation de ce travail nous offre l'occasion d'exprimer notre profonde gratitude à M^{eme} Nadji Safia notre encadreur de mémoire, qui a su nous diriger, et guider ce travail pendant toute la durée de l'expérimentation, nous écouter, nous conseiller et qui a toujours été présente pour répondre à notre question.

Nous tenons également à remercier les membres du jury qui ont bien voulu lire notre travail de recherche et qui sont venus nous écouter. Nos remerciements s'adressent à M^{eme} Gabli. Z de présider le jury de la soutenance et M^{eme} Bendjedid. M qui nous a fait l'honneur d'examiner le contenu du présent travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude et respectueuses reconnaissances à Monsieur Mansouri Adel directeur de chambre de la pêche et d'aquaculture de la wilaya de Skikda, qui nous a aidé à monter les aquariums utilisés dans ce travail.

Nos remerciements les plus sincères vont à M^{eme} Kaous Lynda, gérante de la ferme marine ; les Calanques de Chetaibi à Annaba et M^{eme} Maya Dechemi ingénieur aquacole de cette ferme marine et chargé de communication. Qui nous a aidées à obtenir nos espèces pour notre étude expérimentale

Nous tenons à remercier le chef de service de laboratoire chimique industriel de l'université de Skikda Mr Boucherkha. A et l'équipe de laboratoire pour leurs aides à mener l'utilisation des matériels technique et leurs conseils précieux,

Nos vifs remerciements vont à tout organisme d'accueil de service d'anapath de l'hôpital de Skikda pour nous faire les analyses histologiques de nos échantillons et sincèrement Dr. Moklli

Enfin, à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire, soit sincèrement remercier.

Dédicace



Je dédie ce mémoire

A mes chers parents, source de vie d'amour et d'affection, qui ont été toujours à mes côtés et m'ont toujours soutenu tout au long de ces longues années d'études. En signe de reconnaissance, qu'ils trouvent ici, l'expression de ma profonde gratitude pour tout ce qu'ils ont consenti d'efforts et de moyens pour me voir réussir dans mes études

A mes chers sœurs Ikram et Roumaïssa, source d'espoir et de motivation

A toute ma famille

A tous mes amis, tout particulièrement Sawsene

A Djihen, Abir et Salima, chères amies avant d'être quadrinôme

A vous chers lecteurs

Sarah



Dédicace



Je dédie ce modeste travail

A mon cher père Boukfmis, à ma chère maman Hafida

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

A mes chères sœurs : Fatima, Halima, Karima, Asma.

A mes chers frères : Yasser, Bilel, Marwane

A toute ma famille.

A mes chères quadrinôme Sarah, Abir et Djihane ; ensemble nous avons pu faire ce travail et avec qui j'ai partagé de bons moments.

A' tous mes proches et mes amis.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.



Salima

Dédicace



Je dédie ce travail

A mes chers parents Salah et Aziza, pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont sues m'inculquer. Rien au monde ne pourrait compenser tout ce que vous avez fait pour moi. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. C'est à vous que je dois cette réussite et je suis fière de vous offrir.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés et le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A toutes mes années d'étude, et qui a veillé tout au long de ma vie m'encourager.

A mes frères : Alla adin, Aboubaker, Mohamed

A ma belle sœur Ilhem et chère nièce Elena

A mon cher grand père Allï

A mes chères quadrinôme Sarah, Abir et Salima

A celui qui est tout le temps proche de moi, celui qui prend ma main et touche mon cœur

A tous ceux qui me sont chères. A tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

A tous mes proche amis Wiam et Sabrina



Djihane

Dédicace



Je dédie de travail

*A mes très chers parents qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite et m'ont éclairé le chemin par leurs conseils judicieux,
A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur mes chères sœurs : Wafa, Feten, Yassamine, Merci de m'avoir encouragé et motivé.*

A ma meilleure amie Boudjadi Yassamine, tu es l'une des rares personnes qui m'a aidé à devenir ce que je suis aujourd'hui.

Merci pour ça.

Et sans oublier toutes mes amies : Mimi, Roumisa, Youssra, Fatima, Ihesen, Asma, Hadjer, Naserine.

A mes chères amies avant d'être quadrinômes Sarah, Djihen, Salima.

Abir



Sommaire

Résumés.....	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations.....	
1. Introduction	01
2. Matériel et méthodes.....	04
2.1 Matériel biologique.....	04
2.1.1. Morphologie et anatomie.....	05
2.1.2. Reproduction de la moule	08
2.1.3. Répartition géographique de l'espèce	10
2.1.4. Présentation du site d'échantillonnage	11
2.2 Matériel chimique	12
2.2.1. Présentation de la nanoparticule	13
2.2.2. Utilisation industrielle	14
2.2.3. Toxicité pour les organismes aquatiques.....	14
2.3. Récolte et traitement des échantillons	15
2.3.1. Technique d'échantillonnage	15
2.3.2. Protocole de contamination des moules	16
2.4. Dissection et prélèvement des organes.....	17
2.5. Extraction et dosage des métabolites	18
2.5.1. Dosages des glucides totaux	19
2.5.2. Dosage des protéines totales	19

2.5.3. Dosage des lipides totaux.....	19
2.6. Analyse histologique	20
2.6.1. Fixation des organes	20
2.6.2. Inclusion.....	20
2.6.3. Coupes.....	20
2.6.4. Coloration	20
2.6.5. Montage	20
2.7. Analyse statistique	21
3. Résultats	22
3.1. Effets des nanoparticules d'oxyde de Titane (TiO ₂) sur les paramètres biochimiques au niveau des gonades.....	22
3.1.1. Effet sur le taux des protéines	22
3.1.2. Effet sur le taux des glucides.....	22
3.1.3. Effet sur le taux des lipides	23
3.2. Effets des nanoparticules d'oxyde de Titane (TiO ₂) sur les paramètres biochimiques au niveau des branchies.....	24
3.2.1. Effet sur le taux des protéines.....	24
3.2.2. Effet sur le taux des glucides.....	24
3.2.3. Effet sur le taux des lipides	25
3.3. Effets des nanoparticules d'oxyde de Titane (TiO ₂) sur les paramètres biochimiques au niveau des muscles adducteurs	26
3.3.1. Effet sur le taux des protéines.....	26
3.3.2. Effet sur le taux des glucides.....	26
3.3.3. Effet sur le taux des lipides	27
3.4. Effets des nanoparticules d'oxyde de Titane (TiO ₂) sur les paramètres biochimiques au niveau de la glande digestif	28

3.4.1. Effet sur le taux des protéines	28
3.4.2. Effet sur le taux des glucides	28
3.4.3. Effet sur le taux des lipides	28
3.5. Etude histopathologique.....	30
3.5.1. Observation des coupes histologiques de la gonade.....	30
3.5.2. Observation des coupes histologiques des branchies.....	33
4. Discussion	36
4.1. Effets des nanoparticules d'oxyde de titane sur les paramètres biochimiques des 4 tissus (gonade, muscle adducteur, branchie et glande digestive).....	36
4.2. Effets des nanoparticules d'oxyde de titane sur l'histologie des gonades et des branchies	38
5. Conclusion et perspectives.....	42
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures

N °	Intitulé	Page
01	Photos originales da la moule <i>P. perna</i>	04
02	Le pied et le byssus de la moule <i>P. perna</i> (photos originale)	06
03	Anatomie générale d'un bivalve	07
04	Cycle biologique des moules	09
05	Distribution géographique des espèces du genre <i>perna</i>	10
06	Localisation du site d'échantillonnage chetaibi par satellite	11
07	Les appareils utilisés pour le broyage des oxydes métalliques	13
08	Photos originales représente les moule reçus dans glacière	15
09	Présente les aquariums d'élevage des moules sous des conditions contrôles	16
10	Dissection et prélèvement des organes	17
11	Le pesé des organes prélevés de la moule	17
12	Principales étapes d'extraction des protéines, glucide et lipides	18
13	Les appareils utilisés dans la réalisation des coupes histologiques	21
14	Les échantillons après les analyse histologique	21
15	Taux des protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de <i>perna. Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	22
16	Taux des glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de <i>perna. Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	23
17	Taux des lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de <i>perna. Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	23
18	Taux des protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des branchies de <i>perna. Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	24
19	Taux des glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des branchies de <i>perna. Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	25
20	Taux des lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des branchies de <i>perna. Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	25
21	Taux des protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des muscles adducteur de <i>perna. Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	26

22	Taux des glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des muscles adducteur de <i>perna</i> . <i>Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	27
23	Taux des lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des muscles adducteur de <i>perna</i> . <i>Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	27
24	Taux des protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des glandes digestifs de <i>perna</i> . <i>Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	28
25	Taux des glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des glandes digestifs de <i>perna</i> . <i>Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	29
26	Taux des lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des glandes digestifs de <i>perna</i> . <i>Perna</i> après 21 jour de traitement au NPS de Tio_2	29
27	Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de la gonade mâle témoin de <i>perna perna</i>	31
28	Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de la gonade mâle dose 1 de <i>perna perna</i>	31
29	Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de la gonade mâle dose 2 de <i>perna perna</i>	31
30	Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de la gonade mâle dose 3 de <i>perna perna</i>	32
31	Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de la gonade mâle dose 4 de <i>perna perna</i>	32
32	Observation au microscope photonique d'une coupe histologique des branchies mâle témoin <i>perna perna</i>	34
33	Observation au microscope photonique d'une coupe histologique des branchies mâle dose 1 de <i>perna perna</i>	34
34	Observation au microscope photonique d'une coupe histologique des branchies mâle dose 2 de <i>perna perna</i>	34
35	Observation au microscope photonique d'une coupe histologique des branchies mâle dose 3 de <i>perna perna</i>	35
36	Observation au microscope photonique d'une coupe histologique des branchies mâle dose 4 de <i>perna perna</i>	35

Liste des tableaux

N°	Tableau	Page
01	Identification de la substance chimique utilisé dans l'étude (nanoparticules de Titane)	13

Liste des abréviations

- NPS** : Nanoparticules
TiO₂ : Oxyde de titane
O₂ : Oxygène
CO₂ : Dioxyde de carbone
NaOH : Hydroxyde de sodium
UV : Ultraviolets
D : Dose
T : Témoin
P : Seuil de signification
P7 : Broyeur planétaire de Fritsch
H.E : Hematoxyline-Hosine
T : Test de student

Résumé :

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer les effets toxiques des nanoparticules d'oxyde de titane (TiO₂) sur quelques paramètres biochimiques (contenue en protéines, glucides et lipides) au niveau des gonades, branchies, muscles adducteur et glande digestive après l'exposition d'une espèce bioindicatrice de la pollution marine la moule. *P. perna* à des concentrations croissantes de TiO₂, cette étude a été complétée par une étude histopathologique des deux organes cibles les gonades et les branchies.

L'étude biochimique de la toxicité des nanoparticules d'oxyde de titane (TiO₂) a permis de mettre en évidence une augmentation significative des protéines et une diminution significative des glucides et des lipides au niveau des quatre organes étudiés (gonades, branchies, muscles adducteur et glande digestive) d'une manière dose dépendante.

L'analyse histopathologique montre des atteintes tissulaires sans équivoque au niveau des deux organes cibles (gonade et branchie), en effet, l'épithélium gonadique et branchiale montrent des infiltrats inflammatoires, quelques débris cellulaires et des nécroses particulièrement aux fortes concentrations testées. Ces résultats témoigneraient d'une première réponse biologique aux xénobiotiques du milieu.

Mots clés : *Perna perna*, oxyde de Titane, paramètres biochimiques, histopathologie.

Abstract

The main objective of this study was to evaluate the toxic effects of titanium oxide (TiO₂) nanoparticles on a number of biochemical parameters (protein, carbohydrate and lipid content) in the gonads, gills, adductor muscles and digestive gland following exposure of a marine pollution bioindicator species, the mussel *P. perna*, to increasing concentrations of TiO₂. This study was complemented by a histopathological study of the two target organs, the gonads and gills.

The biochemical study of titanium oxide (TiO₂) nanoparticle toxicity revealed a significant increase in proteins and a significant decrease in carbohydrates and lipids in the four organs studied (gonads, gills, adductor muscles and digestive gland) in a dose-dependent manner.

Histopathological analysis showed unequivocal tissue damage in the two target organs (gonad and gill), with gonadal and gill epithelium showing inflammatory infiltrates, some cellular debris and necrosis, particularly at the high concentrations tested. These results suggest an initial biological response to environmental xenobiotics.

Key words: *Perna perna*, Titanium oxide, biochemical parameters, histopathology.

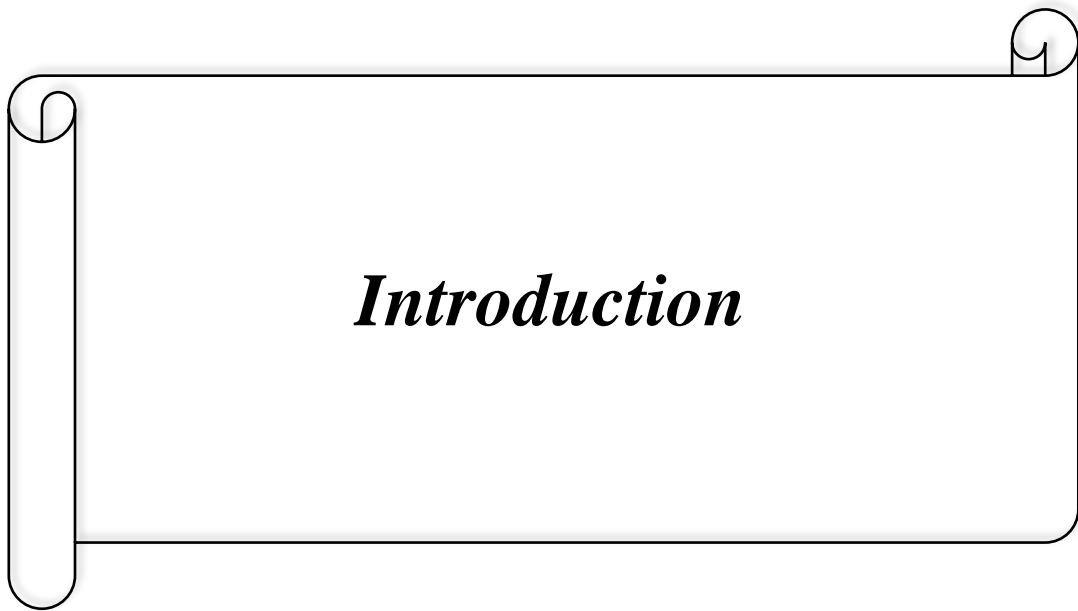
المخلص:

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو دراسة مدى تأثير الجسيمات السامة لأوكسيد التيتانيوم (TiO₂) على بعض المتغيرات البيوكيميائية على مستوى الغدد التناسلية، الخياشيم، العضلات والغدة الهضمية لنوع من بلحيات البحر *Perna perna* (بيرنا بيرنا) الذي يعرف بالمؤشر البيئي للتراكم الحيوي لمختلف الملوثات البحرية، عن طريق تعريضها لكمية تراكيز متزايدة من اكسيد التيتانيوم لمدة 21 يوم .

تم مرافقة هذه الدراسة بالتحليل النسيجية لعضوين مستهدفين، الممثلين في الخياشيم والغدة التناسلية. حيث بينت هذه الدراسة البيوكيميائية مدى تأثير جسيمات التيتانيوم في زيادة البروتينات بشكل كبير وانخفاض الكربوهيدرات والدهون على مستوى الاعضاء للأربعة المدروسة، بينما يظهر التحليل التشريحي والنسيجي وجود التهابات ارتشاحيه مرضية وتلفاً واضحاً للأنسجة على مستوى العضوين المستهدفين (الغدد التناسلية والخياشيم) كما تظهر بعض بقايا الخلايا ميتة وتمزق في الغشاء الخلوي، خاصة عند التركيزات العالية التي تم اختبارها.

وتعتبر هذه النتائج عن الاستجابة الاولية البيولوجية لهذه النماذج البيولوجية ضد الجسيمات الدخيلة للوسط .

الكلمات المفتاحية: بيرنا بيرنا، اوكسيد التيتانيوم، المتغيرات البيوكيميائية، امراض نسيجية.



Introduction

Introduction

Les zones côtières sont parmi les écosystèmes les plus précieux de la planète (**Elliott et Whitfield, 2011**) et sont pourtant parmi les plus menacés au monde. Leur position à l'interface terre-mer, la richesse et la diversité des ressources disponibles dans ces zones ont amené à une concentration des populations et des activités humaines le long des côtes et des estuaires à travers le monde (**Crossland et al., 2005**). La mer méditerranée avec ses 1622 km de côtes, ses 32 îles et 208 îlots, ses 71 aires marines et côtières d'intérêt écologique, dont « 26 aires marines à espèces remarquables, 26 aires à trottoirs à vermetes, 19 aires à Posidonie ainsi que 26 zones humides et 2 complexes de zones humides », est soumise à une très forte pression humaine, elle reçoit d'une manière chronique une charge polluante très importante provenant des eaux usées des grandes unités urbaines et industrielles et peuvent menacés la faune et la flore du littoral. Le littoral algérien est comme la majorité des zones côtières méditerranéennes, connaît de sérieux problèmes environnementaux.

L'étude des modes d'action des polluants chimiques sur la faune et la flore fait l'objet de nombreuses recherches mobilisant des disciplines variées comme l'écotoxicologie, l'écophysiologie et l'écologie aquatique. Ces travaux portent tant sur la caractérisation des relations « dose-effet », pour un polluant et un organisme donné, que sur l'analyse plus large des perturbations induites par les polluants à différents niveaux d'organisation biologique, allant de la cellule à l'écosystème.

Aujourd'hui la nanotechnologie, constitue un champ de recherche multidisciplinaire impliquant l'utilisation de nouveaux dispositifs, permettent d'étudier la matière au niveau moléculaire ou supramoléculaire. La nano biologie est une des branches importantes des sciences actuelles regroupe les chimiste les médecins et les biologistes, s'intéressent plus particulièrement à l'étude du développement des nanoparticules (dont la taille est inférieure à 100 nm NP) qui posent des défis dans la réalisation d'études de bioaccumulation chez les organismes aquatiques et dans l'interprétation réglementaire des résultats (**Chuto et Chaumet-Riffaud, 2010**).

L'homme a toujours été exposés à des particules fines et ultrafines, parfois à des concentrations importantes, les particules peuvent pénétrer dans l'organisme de trois façons : en les touchant (voie cutanée), en les ingérant (voie digestive) ou en les respirant (voie respiratoire), Leur rejet dans l'environnement engendre les impacts suivants : pollution des sols, contamination des eaux souterraines et de surface, impacts sur la santé et l'environnement, etc (**Angélique, 2008 ; Zalaghi, 2014**).

Selon (**Morad et al., 2023**) les NPs manufacturées sont considérées comme des polluants environnementaux en raison du développement de leurs applications dans de nombreux domaines de la recherche et de l'industrie, tels que l'alimentation et l'emballage alimentaire, la médecine, l'électronique, la biorestauration, les catalyseurs de carburant, les cosmétiques, les peintures, les revêtements et le traitement de l'eau. Les alliages, les métaux et les matériaux à base de carbone tels que les silicates et les produits polymères sont considérés comme des NPs artificielles. Depuis la loi Grenelle 2 votée en 2013, il est important pour les importateurs de matériaux de déclarer la présence de nanoparticules dans leur produit commercialisé car ils peuvent induire des effets négatifs sur les organismes en pénétrant leurs barrières biologiques et induisant des effets dans de nombreuses réactions enzymatiques biochimiques des espèces terrestres et aquatiques.

Plusieurs programmes de recherche et de surveillance ont été mis en œuvre permettant de détecter la présence des contaminants dans le milieu marin, ainsi que de déterminer l'influence et la réponse biologique des espèces bioindicateurs aux différents polluants organiques et inorganique (**Moore et al., 2004**). Les recherches sur les conséquences biologiques de cette pollution ont été menées sur les invertébrés et en particulier sur les bivalves tels que les moules. En raison de leur capacité de filtration et d'accumulation importante des particules et polluants du milieu, ils ont été retenus comme bioindicateur de la contamination, par excellence (**Jorgensen, 1960**). D'après de nombreuses études, il a été montré que différents crustacés, étaient capables d'ingérer des nanoparticules de (TiO₂) allant jusqu'à la dizaine de diamètre (**Rocha, 2015**).

L'inquiétude est que les concentrations croissantes de nano-TiO₂ peut conduire à une augmentation du stress oxydatif global dans l'eau de mer contaminée par TiO₂, et entraîner une diminution de la résilience des écosystèmes marins.

Le chercheur biologiste **Robert Miller, Arturo Keller et Hunter Lenihan** des professeurs à la Bren School et scientifiques principaux au Centre UC pour les implications environnementales de la nanotechnologie Bren, doctorant **Samuel Bennett**, et **Scott Pease**, un ancien étudiant de premier cycle de l'UCSB ont découvert que la forme nanoparticulaire du dioxyde de titane (TiO₂) exposé aux rayons ultraviolets (UV) peut être toxique pour les organismes marins. Autres disent, "Nous montrons que des niveaux relativement faibles de lumière ultraviolette, conformes à ceux que l'on trouve dans la nature, peut induire une toxicité du TiO₂ nanoparticules au phytoplancton marin, les producteurs primaires les plus importants sur Terre d'autre étude sur les bivalves, indique que tels polluants peuvent s'accumuler dans leur tissus (**Stewart, 1999**), et affectent la moule par altération des gonades, des organes reproducteurs et les branchies principalement aux site d'absorption d'oxygène (**Pinto et al, 2019**).

La présente étude vise à évaluer en conditions contrôlées de laboratoire les effets induits par une nanoparticule manufacturée l'oxyde de titane (TiO₂) sur un organisme bioindicateur de la pollution marine la moule *Perne perna* après une durée d'exposition de 21 jours à des concentrations croissantes en TiO₂, les effets ont été testés sur :

- La composition biochimique (en protéines, lipides et glucides) dans plusieurs tissus : les branchies et la glande digestive (en contact direct avec le polluant) ainsi que la gonade et le muscle adducteur (organes métaboliques).
- Cette étude a été complétée par une étude histopathologique au niveau de la gonade et la branchie pour vérifier l'impact tissulaire.



Chapitre I :
Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1 Matériel biologique :

a) Présentation et classification de l'espèce :

Les bivalves sont une classe de mollusques d'eau douce et d'eau de mer, nommée également *Pelecypoda* (les pélecypodes) ou *Lamellibranchia* (les lamellibranches). Dans cette optique, notre choix s'est porté sur l'espèce de moule africaine *P. perna*, collecté dans la région de Chétaibi, Elle est facile à pêcher et visible à marée basse sur les roches.

La moule africaine *P. perna* est également recensée en Afrique du nord sous le nom de *Mytilus africanus* (Chemnitz, 1785). Elle est de couleur brune à brun fauve, avec des reflets verdâtres sur la partie postérieure (Schurink et Griffiths, 1990) et blanche jaunâtre de la face interne des valves. Également utilisée dans les études car elle fait partie des indicateurs biologiques, capables de renseigner sur l'identité et la quantité biodisponible dans l'environnement et de substances polluantes (Aouameur, 1990), basé sur le fait que ces organismes marins concentrent et accumulent les contaminants dans leurs tissus (Goldberg, 1978), en particulier les métaux et les organo-métaux ou mieux encore les nanoparticules en relation avec les concentrations présentes dans le milieu. La caractéristique principale de cette espèce *P. perna* est une coquille de forme oblongue, faite de deux valves reliées par une charnière qui ne comporte que deux dents. Le corps est latéralement enveloppé dans le manteau et ne possède ni tête, ni radula. Les sexes sont différenciés (Lubet 1973 ; Siddall, 1980 ; Rouabhi, 2020). Elle est considérée comme un microphage détritivore qui se nourrit par filtration de particules présents dans l'eau. Elles filtrent jusqu'à 4 litres d'eau /heure. Elle dispose d'un système digestif, un système circulatoire ouvert, d'organe reproducteurs et d'un système nerveux élémentaire. La moule est composée de : protéines à hauteur de 13% du poids frais, les glucides sont présents en faible quantité (2 à 6% du poids frais), les lipides qui entrent dans la composition de l'hépatopancréas et les glandes génitales, et enfin les sels minéraux dont la chair est riche en calcium et en magnésium (Marteil, 1976).



Figure 1 : La moule *P.perna* (photos originale)

En méditerranée sa taille est influencée par la distribution verticale. Dans des zones intertidales, mesure généralement 90mm de long et une taille maximale pouvant atteindre jusqu'à 120 mm dans les zones sub-littorales (**Schurink et Griffiths, 1990**) avec une taille moyenne varie de 50 à 60mm (**Fisher et al, 1987**). Elle peut atteindre une longueur maximale de 18cm.

b) Position systématique de la moule *perna perna* :

Règne :	<i>Animalier</i>
Embranchement :	<i>Mollusques</i>
Classe :	<i>Bivalvia</i>
Sous-classes :	<i>Ptériomorphia</i>
Ordre :	<i>Mytiloïda</i>
Famille :	<i>Mytilidae</i>
Genre :	<i>Perna</i>
Espèce :	<i>Perna perna</i> (Linnaeus, 1785)

2.1.1 Morphologie et anatomie :

a) Morphologie de l'espèce :

Comme la plupart des bivalves, les moules sont des animaux filtreurs qui se nourrissent en retenant les éléments en suspension dans l'eau de mer. L'eau est aspirée grâce au siphon inhalant puis filtrée par les filaments des branchies qui agglomèrent dans du mucus les particules nutritives (phytoplancton, zooplancton et autres matières organiques).

➤ **La coquille :**

La moule est un bivalve lamellibranche, sa coquille est constituée à 95 % de carbonate de calcium. Sur la face ventrale, les bords des deux lobes sont libres, délimitant la cavité palléale. On trouve le vélum qui est un tissu conjonctif et musculaire capable de s'étendre et de se rétracter. Le manteau a un rôle dans la circulation de l'eau, il participe à la respiration et accumule des réserves mais son rôle principal est d'assurer la formation de la coquille.

➤ **Les muscles adducteurs :**

Les muscles adducteurs s'opposent à l'action mécanique du ligament, abducteur, et par leur contraction assurent la fermeture des valves.

➤ **Le pied :**

Le pied (organe de locomotion) est une saillie musculaire située au-dessous de la masse viscérale et comprenant la glande byssogène qui occupe sa plus grande partie où elle forme un sillon entouré, sur presque toute sa longueur.

➤ **Le byssus :**

C'est l'organe de fixation. Il est constitué de nombreux filaments terminés par un disque adhésif. Les branchies sont au nombre de deux et sont des organes de la nutrition et de la respiration.

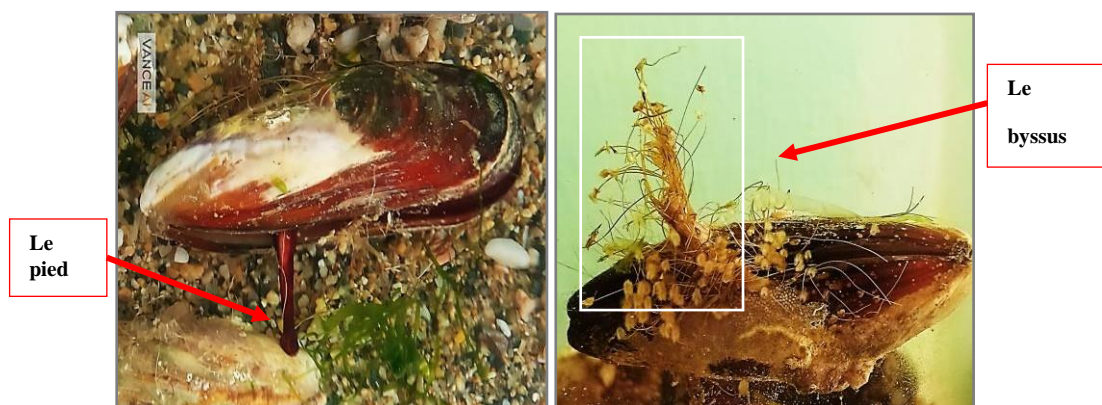


Figure 2 : Le pied et le byssus de la moule *P. perna* (photos originale).

b) Anatomie de l'espèce :

Les moules disposent d'un système digestif, d'un système circulatoire ouvert, d'organes reproducteurs et d'un système nerveux élémentaire.

➤ **Le système digestif :**

La moule est un organisme filtreur. Elle ne possède plus de radula. Elle se nourrit de fines particules en suspension dans l'eau (phytoplancton, bactéries...). Celles-ci sont retenues grâce au mucus qui tapisse les branchies. Sous l'eau, la moule s'ouvre légèrement et un courant d'eau pénètre via le siphon inhalant dans la cavité palléale. Le siphon exhalant propulse ensuite l'eau hors de la cavité palléale. Le courant d'eau est entre tenu par les nombreux cils vibratiles des branchies. Ceux-ci assurent également un courant permanent de mucus amenant la nourriture vers les palpes labiaux et ensuite vers la bouche. Seules les plus fines particules sont ingérées et digérées par le système digestif. Les plus grosses particules sont rejetées.

➤ **Le système respiratoire :**

Les échanges d'oxygène se font par l'intermédiaire des branchies. L'eau chargée en oxygène dissout pénètre dans la cavité palléale via le siphon inhalant. Elle est filtrée par les filaments des deux paires de branchies lamelleuses avant d'être évacuée par le courant exhalant. L'oxygène ainsi capté pénètre dans l'hémolymphe pour être distribué dans tout l'organisme. Lorsque la moule se retrouve à l'air libre, elle ferme sa coquille et passe à une respiration anaérobie

➤ **Le système circulatoire :**

L'appareil circulatoire est relativement simple. On y trouve un cœur dorsal (enveloppé par le péricarde) qui comprend deux oreillettes latérales et un ventricule. L'hémolymphe (mélange de sang et de lymphe), chassée dans deux aortes, est distribuée aux différentes parties du corps par un réseau de vaisseaux sanguins. Ce système artériel aboutit à des espaces libres sans parois propres : les lacunes. L'hémolymphe n'est plus, à ce moment, canalisée en un système de vaisseaux individualisés. Elle gagne en suite les reins, où elle est purifiée, avant de pénétrer dans les branchies. Dans ces organes, elle s'enrichit alors en oxygène (O_2) et se décharge en gaz carbonique (CO_2). Une fois oxygénée, l'hémolymphe rejoint les oreillettes du cœur.

➤ **Le système excréteur :**

L'excrétion est réalisée par une paire de reins (néphridies) qui acheminent les déchets de l'hémolymphe vers la cavité palléale. Ceux-ci sont ensuite rejetés dans l'environnement de l'animal par le courant d'eau exhalant.

➤ **Le système nerveux :**

Le bord du manteau est tapissé de cellules nerveuses sensibles à la température, aux substances chimiques et à la lumière. Le système nerveux est réduit à trois paires des ganglions nerveux situés sur la tête, le pied et les viscères.

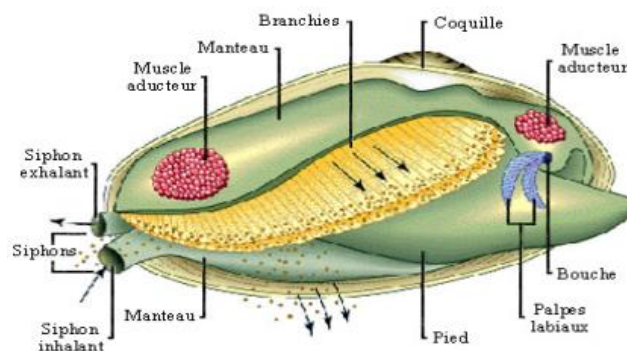


Figure 3 : Anatomie générale d'un bivalve (Encarta, 2006).

2.1.2 Reproduction de la moule :

La moule brune (*P. perna*) est gonochorique (à des sexes séparés) et les individus atteignent la maturité à l'âge d'un an ou moins à une longueur de coquille d'environ 22 mm (**Hicks et McMahon, 2002 ; Shafee, 1989**).

Les gonades des bivalves (mâles ou femelles) occupent une portion importante de la masse viscérale, situer de façon diffuse dans le manteau formant une protubérance sous le pied nommée bosse de polichinelle, elles sont constitués de tubules allongés dont les ramifications s'étend entre les autres organe ou même pénètre à l'intérieur, on les trouve dans l'épaisseur du manteau qui joue un rôle majeur comme principale support de la gamétogenèse (**Bayne, 1982 ; Mortaja, 1995 ; Atami et Bougrid, 2001 ; Lubet, 1959**), l'examen microscopique de la gonade est nécessaire pour déterminer le sexe de l'animal en période de la maturité , la gonade femelle est rose-saumon et la gonade male blanc-jaunâtre (**Lubet, 1959**). En dehors de la maturité, le sexe n'est pas reconnaissable à l'œil nu (**Atami et Bougrid, 2001**).

a) Cycle de développement de la moule :

Le cycle de développement de la vie des moules est complexe, y comporte quatre stades : Stade 1 (Glanchidies), Stade 2 (parasitaires), stade 3 (juvénile), stade 4 (adulte) (**Young et Willams, 1984 ; Bauer, 1987 ; Wächtler et al, 1993 ; Harsanyi, 1995 ; Koch, 1935**). Entre mai et septembre, les œufs, au nombre de 5 à 12 millions, y sont fécondés par les spermatozoïdes, émis par les mâles dans l'eau de mer, et amenés dans la cavité palléale de femelles par la circulation d'eau de mer. Les œufs vont subir une division méiotique à la fécondation pour réduire le nombre de chromosomes en nombre haploïde avant que les pronucléus mâle et femelle fusionnent pour former le zygote. Deux globules polaires sont ainsi formés durant la division méiotique et quand ils apparaissent, ils indiquent la réussite de la fécondation.

La division cellulaire commence et trente minutes après la fécondation, l'œuf se divise en stade de deux cellules. La fécondation est suivie d'un développement embryonnaire rapide qui aboutit à la formation des larves minuscules appelées glonchidies (sous différents stades : trochophore, larve D, véligère, pédivéligère), qui sont constituées de deux petites valves triangulaires et mesurent de 0.04 à 0.07 mm La glochidie s'y enkyste (stade parasite) pour effectuer la métamorphose complète et libère un petit bivalve jeune (nommé naissain) (stade juvénile) qui nagent en pleine eau et durant 2 à 3 semaines il se fixe sur substrat, il s'y enfonce entre 5 et 50 cm de profondeur et y continue sa croissance et une maturation sexuelle (les moules sont sexuellement matures à l'âge de 12-20 ans) (**Drif, 2012**) et se reproduire jusqu'à 100 ans.

Les larves de *P. perna* peuvent se fixer et se métamorphoser sur une grande variété de surfaces, y compris la roche, le bois et la végétation, de nombreux *P. perna* se fixant sur les algues meurent lorsque les plantes meurent (Erlandsson *et al.*, 2008).

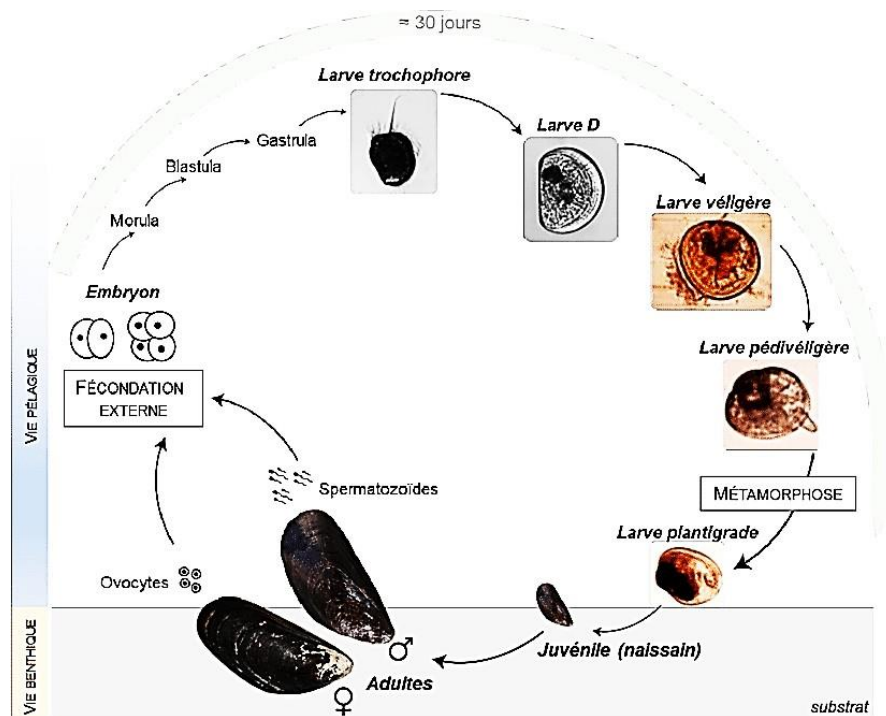


Figure 4 : Cycle biologique des moules (Jahangard *et al.*, 2010 ; modifier par Ventura *et al.*, 2016) (www.researchgate.net).

b) L'intérêt de la moule :

La moule est une espèce modèle en écotoxicologie. Elle résiste plus de 12 jours à l'émersion et elle est capable de résister à des modifications du métabolisme, à l'anoxie et l'hypercapnie. Considérant plusieurs critères biologiques et éco-toxicologiques, comme leur mode de vie sédentaire et leur mode de nutrition par filtration, les moules sont considérées comme espèces sentinelles d'écosystèmes côtiers anthropisés. En effet, elles sont utilisées comme indicateurs biologiques dans des programmes de biosurveillance, afin de mesurer le degré de pollution environnementale vue leur capacité de concentrer dans leurs tissus de fortes teneurs en polluants chimiques, métaux lourds et contaminants organiques par filtration de l'eau. De plus, leur sédentarité leur interdit toute possibilité de fuite face à une pollution chronique ou fugitive. Les principaux programmes de biosurveillance utilisant des moules sont le « Mussel Watch » (Goldberg *et al.*, 1978), (Goldberg *et al.*, 2000) et le Réseau National d'observation (RNO) (Claisse *et al.*, 1992), développés pour surveiller la qualité des eaux côtières.

2.1.3 Distribution géographique de l'espèce :

La moule brune *P. perna* est originaire des régions tropicales et subtropicales de l'océan Indien (du golfe du Bengale et de la mer Rouge à la pointe de l'Afrique du Sud) et de la côte ouest de l'Afrique au moins aussi loin au nord que le Congo (Siddall, 1980 ; Rajagopal *et al*, 1997 ; Académie des sciences naturelles de Philadelphie, 2006). Sur la côte ouest de l'Afrique du Sud, elle est présente dans des sites archéologiques vieux de plus de 10 000 ans (Souza *et al*, 2003). Elle était présente sur la côte africaine de la Méditerranée à la fin des années 1800, mais a été sporadique à Barcelone, Espagne ; Toulon, France ; et le golfe de Palerme, en Sicile au XXe siècle (Buccheri et Palisano, 1976 ; Siddall, 1980).

En Amérique, on la trouve au Chili et au Pérou et sur la côte de l'Amérique du Sud jusqu'aux Caraïbes mais sur la côte du Texas, elle a été accidentellement introduite probablement via les coques de bateaux et les ballasts des navires en provenance du Venezuela.

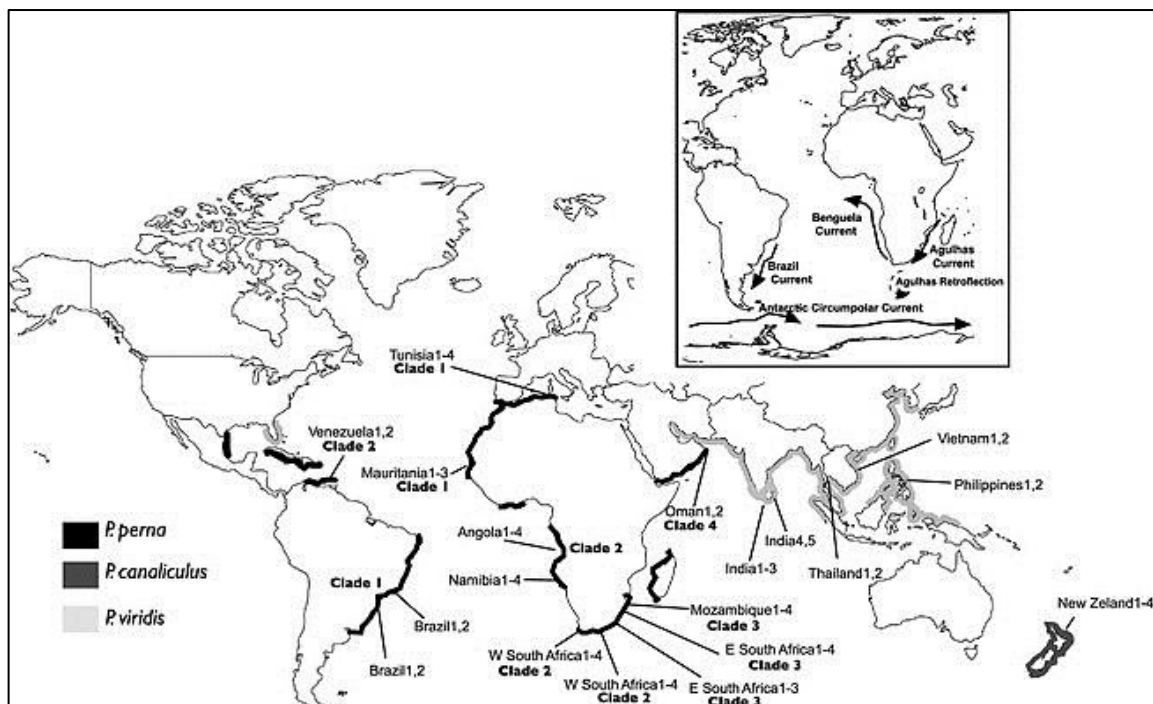


Figure 5 : Distribution géographique des espèces du genre *Perna* (*P. viridis*, *P. perna* et *P. Canaliculus*) (JohnWiley et Sons Ltd, Écologie et évolution, 2014)

2.1.4 Présentation du site d'échantillonnage :

La moule *Mytilus africanus* (Chemnitz, 1785) a toujours été signalée par les auteurs comme rare ou peu abondante sur le littoral africain des côtes de la Méditerranée occidentale. Selon Pères et Picard (1964), cette espèce ne dépasserait pas, vers l'est, la région de Skikda (Philippe ville) en Algérie (Zaouali, 1973).

Le site choisi pour la conduite de notre étude expérimentale est situé en mer ouverte dans la baie de la zone de Chetaibi (37° 04,60' N ; 07°23, 46 E) entre Skikda et Annaba, sur le côté Nord-Est du Cap Tekouche, le long de calanques. Il est également accessible par un sentier qui débouche directement sur le port du village.

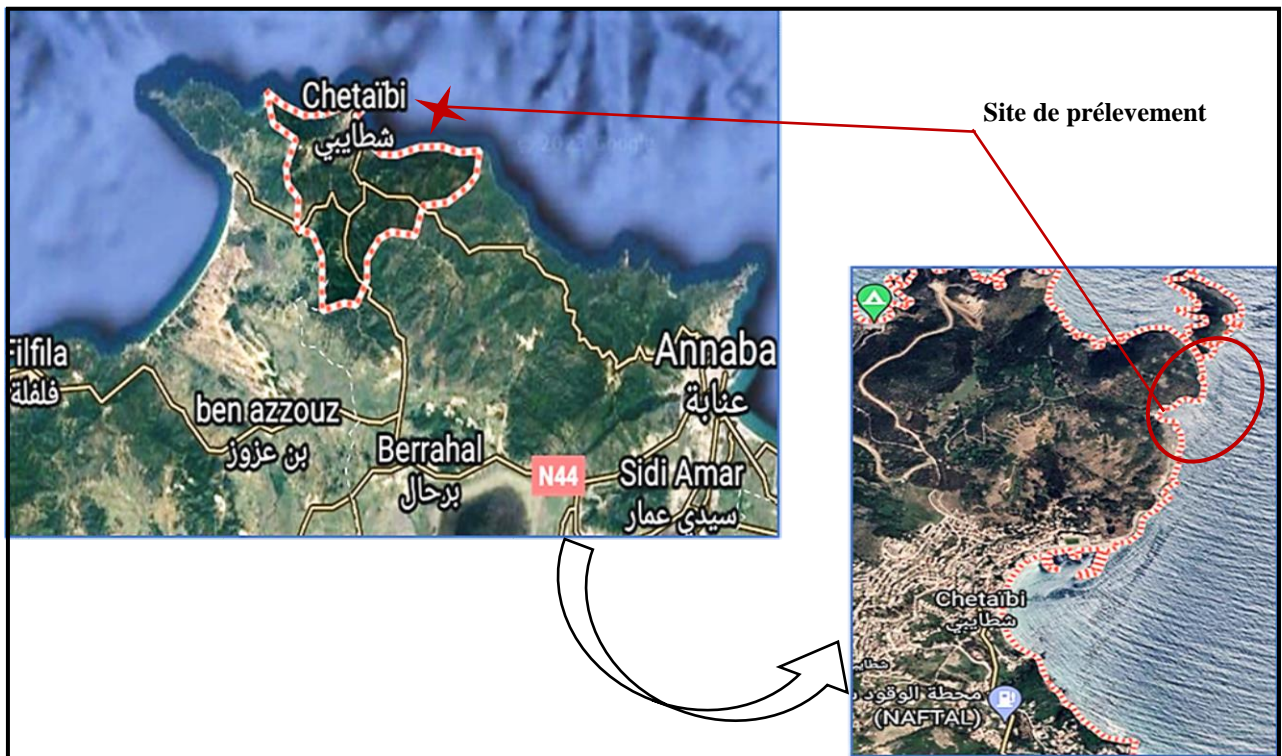


Figure 6 : Localisation du site d'échantillonnage Chetaibi par Satellite (Google Maps)

➤ **Condition de vie extrême :**

Les moules sont des organismes eurythermes, la moule africaine *Perna perna* supportent des températures de 13°C en hiver et entre 27 et 28°C en été et des salinités comprise entre 7 et 40 ‰ (Lubet et Chappuis, 1966), elle vit en mélange avec *Mytilus galloprovincialis* sur la côte Méditerranéenne (Abada-Boudjema et Dauvin, 1995).

Les modifications des facteurs abiotique dans leur milieu d'habitas peuvent entrainer un pourcentage de mortalité pour eux (la température, la salinité, la saturation de l'oxygène dans l'eau, quantité de matière organique, présence de substances toxiques).

2.2 Matériel chimiques :

L'oxyde de titane nanométriques nous a été élaboré au laboratoire de magnétisme et spectroscopie des solides (LM2S) par le Professeur **Alleg safia**, L'élaboration des nanoparticules de TiO₂ été effectuée par broyage mécanique à haute énergie, à partir de la poudre élémentaire de Titane. Le broyage a été réalisée dans un broyeur planétaire à de type Fritsch (P7), en utilisant deux jarres en acier, celui-ci se compose de : une jarre en acier inoxydable de volume 45 ml et des du même type d'acier (Fig.).

La préparation de la charge (billes + poudres) a été effectuée dans une boîte à gants sous atmosphère d'argon.

Le rapport massique billes/poudres est de 1/20 environ et la vitesse de broyage est de l'ordre de 500 tr/mn. Pour minimiser les effets relatifs à l'augmentation de la température à l'intérieur. Le broyage a été fait avec des séquences d'une demi-heure suivie de 15mn de pause et cela pendant 8h. Le broyeur planétaire (pulvérisette 7).



Figure 7 : Les appareils utilisés pour le broyage des oxydes métalliques.

2.2.1 Présentation de la nanoparticule :

Le dioxyde de titane de formule chimique (TiO_2) (CAS-N° 13463-67-7) est l'oxyde naturel du Titane (Ti), le 9ème élément chimique le plus abondant de la croûte terrestre devant l'hydrogène et derrière le magnésium.

C'est un oxyde de métal, semi-conducteur, trouvé sous formes allotropiques, brookite, anatase et rutile (André, 2017) c'est une substance inorganique solide blanche thermiquement stable, ininflammable et peu soluble dans les solutions usuelles (Philippe, 2019) existe sous différentes formes, micrométriques et nanométriques.

Il est notamment utilisé sous forme de poudre pour ses propriétés d'absorption des rayons ultraviolets. Cette poudre contenant 1% ou plus de particules d'un diamètre $\leq 10 \mu\text{m}$ (anses, 2017).

Tableau 1: identification de la substance chimique utilisé dans l'étude (nanoparticules de Titane).

Identification du produit	
Nom UICPA	DIOXYDE DE TITAN
Code du produit	OXYDE TITANE
Apparence	Poudre cristalline incolore à blanche.
N° CE	236-675-5
N° CAS	13463-67-7
Numéro d'enregistrement REACH	01-2119489379-17
Propriétés chimiques	
Formule	TiO ₂ (un composé d'oxygène et de titane)
Masse molaire	79,8658 g.mol ⁻¹ - O 40,07 %, Ti 59,93 %, ,
Propriétés physiques	
T° fusion	1 855 °C
T° ébullition	2 500 à 3 000 °C
Solubilité	Peu soluble dans <u>HF</u> , <u>HNO₃</u> concentré, <u>H₂SO₄</u> concentré. Insoluble dans l' <u>eau</u> , dans <u>HCl</u> , <u>HNO₃</u> dilué, <u>H₂SO₄</u> dilué
Masse volumique	3,9–4,3 g cm ⁻³

2.2.2 Utilisation industrielle :

Fabrication de peintures, plastiques, fibres, papier, produits en cuir, caoutchouc, émaux, produits céramiques (ex : les crèmes solaires) ainsi que dans d'autres segments industriels.

2.2.3 Toxicité pour les organismes aquatiques :

Les NPs TiO₂ induisent des effets surs de nombreuses espèces aquatiques comme les tissus végétaux de *Spirodela polyrrhi* (Zhao *et al.*, 2020), crustacée et les bivalves

a) Effets aigus :

Une étude plus récente a révélé que les effets indésirables de TiO₂ dépendent de la taille des particules, du traitement de surface, du type de milieu de dispersion (Wiensch *et al.*, 2009) à des concentrations élevées telles que 500 mg/L (Zhu *et al.*, 2008). Une autre étude a été montrée que les nanoparticules de TiO₂ (dont le traitement de surface est inconnu) ont des effets néfastes sur la survie, la croissance et la reproduction de *Daphnia magna* après une exposition de 21 jours (Bang *et al.*, 2011).

Notamment pour les études in vitro, les suspensions de nanoparticules de TiO₂ stimulent des réponses immunitaires et inflammatoires (la libération de lysozyme, l'accroissement du métabolisme oxydatif et la production d'oxyde nitrique) dans les hémocytes de la moule marine *Mytilus* (Canesi *et al.*, 2010).

b) Effets chroniques :

Les effets chroniques et à long terme de ces particules sur les organismes aquatiques restent mal définis (Rossano, 2014).

2.3 Récolte et traitement des échantillons

2.3.1 Technique d'échantillonnage :

Dans le cadre de notre étude les moules récoltés proviennent d'une ferme marine au niveau de la plage de Chétiabi, spécialisée en aquaculture (concerne l'élevage des poissons, mollusque maritime crustacés, culture des algues...). Les moules utilisées sont de taille adulte variées entre 6 à 8 cm, l'échantillonnage a été réalisé au printemps (au mois de Mars 2023), la collecte est effectuée à la main par des plongeurs de 0 à 10 mètres de profondeur à partir des substrats rocheux sur lesquels les moules sont fixées, 90 moules du genre *Perna perna* ont été transportées dans une glacière jusqu'au laboratoire de l'université.

Pour cette étude la condition pour laquelle le prélèvement des échantillons est réalisé ; que la zone choisie est non polluée et non contaminée par les métaux lourds ou d'autres substances toxiques, et les échantillons doivent être collectés de manière à minimiser les perturbations de cette espèce étudiée.



Figure 8 : Photos originales représentant les moules reçues dans une glacière

2.3.2 Protocole de contamination des moules

Les moules *P. Perna* de taille moyenne (5 et 6 cm) ont été pêchés, acclimatés dans l'eau de mer pendant 15 jours. Dans 5 aquariums (23.5 cm- 40cm -29cm³), 25 moules ont été placées dans 15L d'eau de mer à une température qui varie entre (20- 22°C). Les moules sont soumises à une photopériode de 12h /12h et une salinité de l'eau de 37 psu. L'oxygénation de l'eau est assurée par des pompes à oxygène.

Les moules ont été traitées simultanément par une solution des nanoparticules d'oxyde de titane (TiO₂) additionné dans l'eau d'élevage à des concentrations croissantes 100, 500, 1000 et 1500 µg/l durant 21 jours. Pour le traitement par le titane, l'eau de mer et les nanoparticules (TiO₂) ont été renouvelés une fois par semaine, pour assurer l'apport nutritionnel des individus. Les témoins ont été élevés dans les mêmes conditions

➤ **Suivie des moules :**

On surveille les moules pendant la période de contamination en enregistrant le nombre de mortalité ou s'il y a un changement de comportements de ces moules.

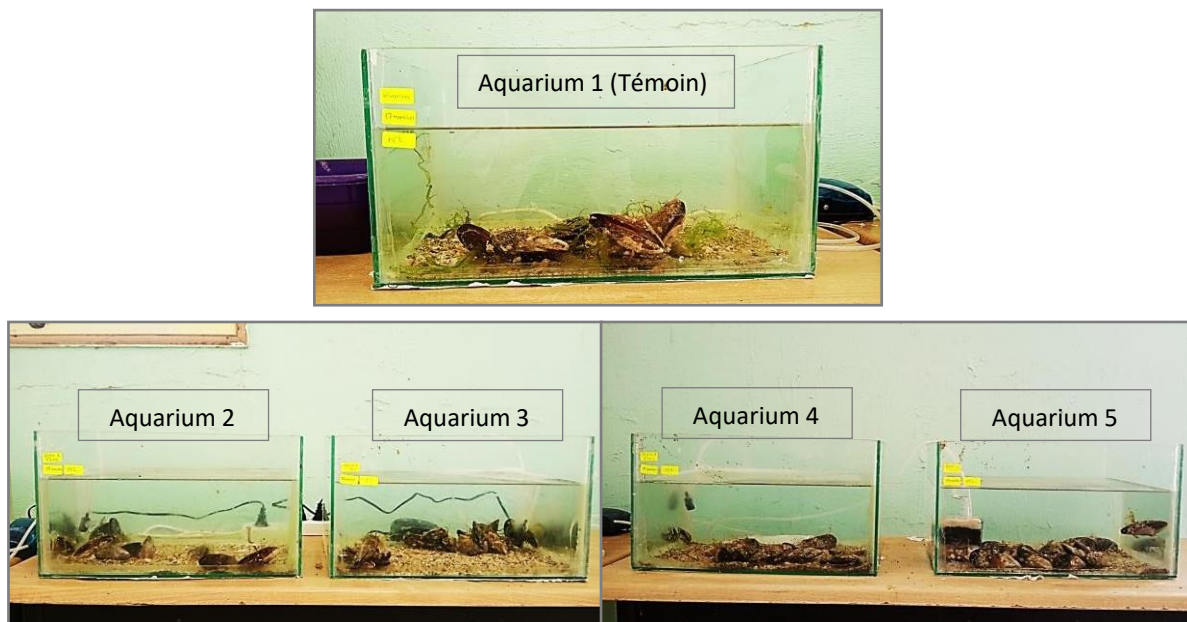


Figure 9 : Présente les aquariums d'élevage des moules sous des conditions contrôles (photos originale).

2.4 Dissection et prélèvement des organes

A l'issue de l'expérience et après la dissection deux groupes de bivalves ont été constitués : un premier groupe (n=4) destiné aux analyses biochimiques, les organes (gonade, branchie, glande digestive et muscle adducteur) ont été prélevés et vont servir aux dosages des métabolites (glucide lipides et protéines), un deuxième groupe (n=2 par organe) (branchie et gonade) servira aux analyses histologiques.

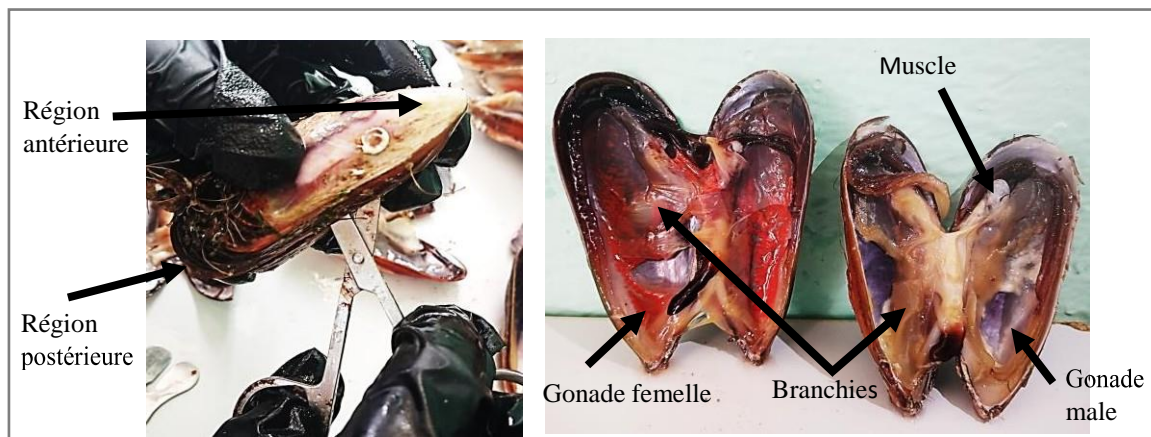


Figure 10 : Dissection et prélèvement des organes (photos originale)

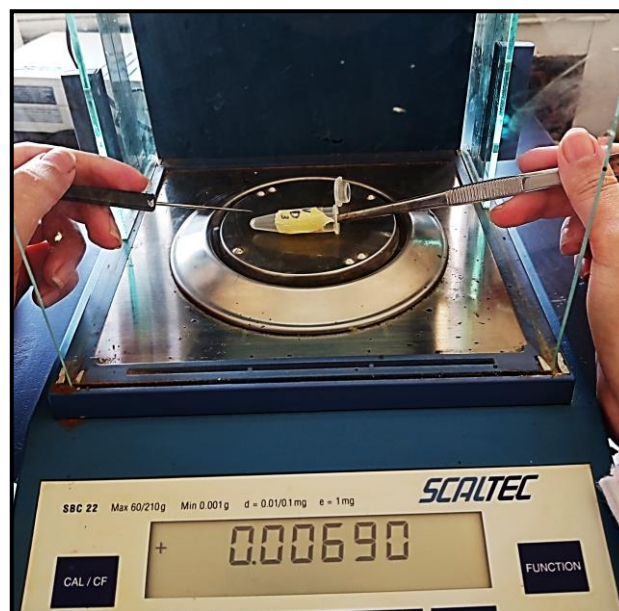


Figure 11 : Le pesé des organes prélevés de la moule.

2.5 Extraction et dosage des métabolites

L'extraction des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) des organes prélevés (gonade, branchies, muscles adducteur et glandes digestive) ont été réalisés selon le procédé de **Shibko *et al.*, (1966)**. Les échantillons sont broyés puis centrifugés à 5000 tours/min pendant 10 min. Le surnageant I servira au dosage des glucides et le culot I est additionné de 1 ml d'un mélange méthanol/chloroforme (1/1, v/v). Une deuxième centrifugation (5000 tours/min, pendant 10 min) permet de récupérer le surnageant II qui servira au dosage des lipides. Le culot II, est ensuite repris dans 1ml de NaOH (0,1N), afin de solubiliser les protéines totales, après 1 nuit à +4°C. Les différentes étapes sont résumées dans la figure

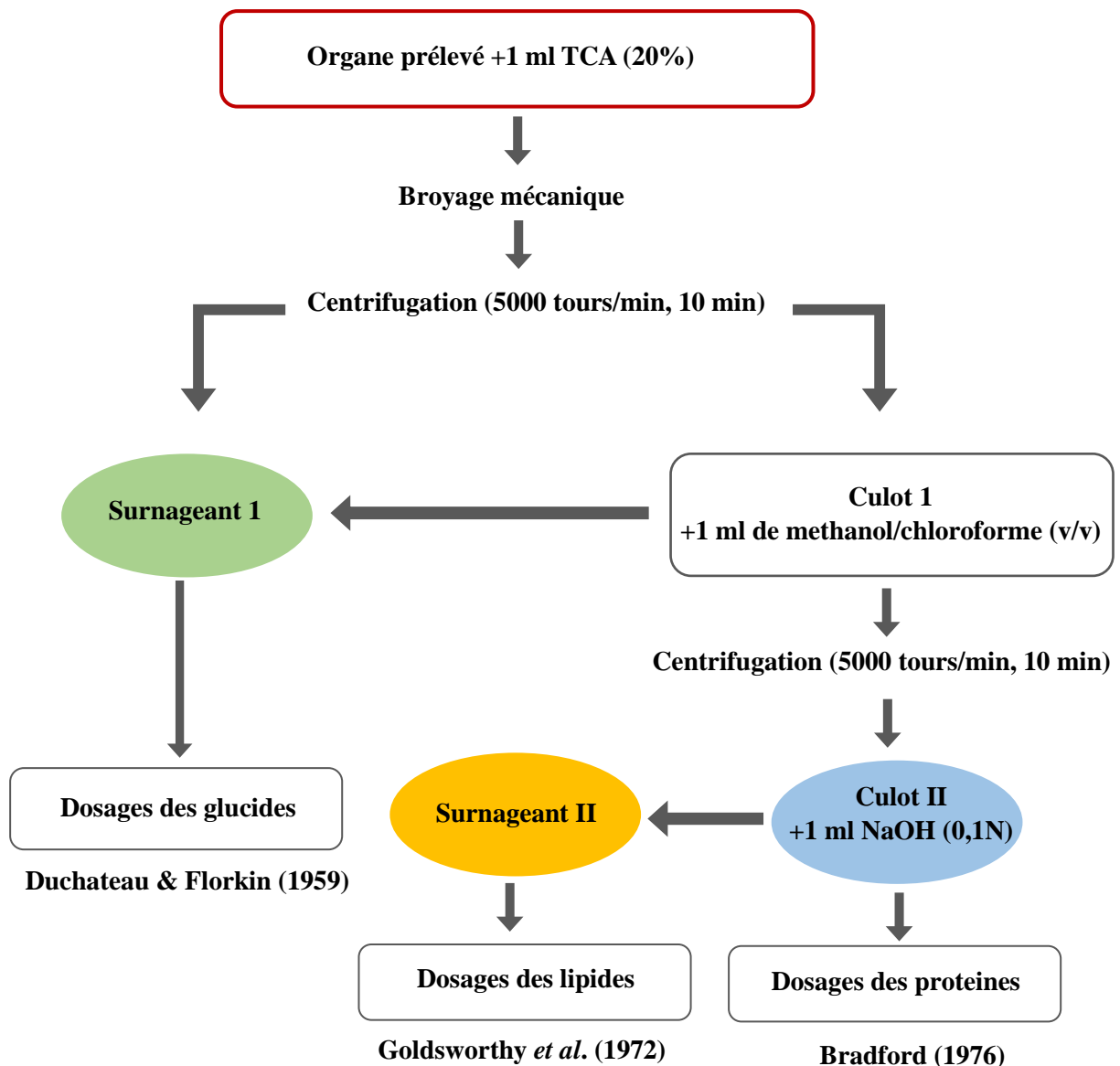


Figure 12 : Principales étapes d'extraction des protéines, glucides et lipides selon **Shibko *et al.*, (1966)**.

2.5.1 Dosages des glucides totaux :

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de **Duchateau & Florkin (1959)**. Elle consiste à additionner 100 µl d'échantillon et 4 ml du réactif d'anthrone et de chauffer le mélange à 80°C au bain marie pendant 10 min. Une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucides présents dans l'échantillon. L'absorbance est lue à 620 nm contre un blanc de gamme. La préparation du réactif d'anthrone se fait comme suit : peser 100 mg d'anthrone, ajouter 590 ml d'acide sulfurique concentré et 200 ml d'eau distillée. On obtient une solution limpide de couleur verte qui est stockée à l'obscurité. La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de glucose (0,1 mg/ml).

2.5.2 Dosage des protéines totales :

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de **Bradford (1976)**. Dans une fraction aliquote de 100 µl on ajoute 4 ml de réactif au bleu brillant de commassie (BBC ; G 250, Merck). La solution de BBC se prépare comme suit : dissoudre 100 mg de BBC dans 50 ml d'éthanol 95°. On y ajoute ensuite 100 ml d'acide ortho phosphorique à 85% et on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée. La durée de conservation du réactif est de 2 à 3 semaines à +4°C. Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. L'absorbance est lue à 595 nm contre un blanc de gamme.

La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (Sigma) titrant (1 mg/ml). Les absorbances sont lues dans un spectrophotomètre (**Shimad Zu 1240**) à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme, après 1 minute et avant 1 heure.

2.5.3 Dosage des lipides totaux :

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972) utilisant le réactif sulfophosphovanillique (0,38 g de vanilline dans 55 ml d'eau distillée et ajouter 195 ml d'acide ortho phosphorique à 85 %). La solution mère des lipides est préparée en utilisant l'huile de table selon la procédure suivante 25 mg d'huile de table sont pesés dans un tube Eppendorf, cette quantité est ensuite reprise dans 10 ml du mélange Ether/chloroforme (1/1 v/v).

Après évaporation des prises aliquotes de 100 µl de surnageant II dans un bain à sec à 40°C, on additionne 1 ml d'acide sulfurique concentré (96%), les tubes fermés sont agités et chauffés dans un bain à sec à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement pendant 5 minutes, on prend 200 µl de ce mélange auquel on ajoute 2,5 ml de réactif sulphophosphovanillique et on agite rigoureusement. Après 30 minutes à l'obscurité, le complexe se colore en rose. L'absorbance est lue dans un spectrophotomètre à 530 nm contre un blanc de gamme à une longueur d'onde de 530 nm.

2.6 Analyse histologique

Les coupes histologiques des gonades et branchies ont été réalisées au niveau de l'hôpital de Skikda des frères Saad Guermesh service d'anapathie selon les étapes suivantes :

2.6.1 Fixation des organes :

A pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur. Le liquide fixateur le plus utilisé est le formol. La durée de la fixation variée selon le volume des prélèvements (de quelques heures pour un petit fragment biopsique).

2.6.2 Inclusion :

A pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains de toluène) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide, qui infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

2.6.3 Coupes :

Du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 2 à 5 µm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

2.6.4 Coloration :

Réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée. Les colorations les plus fréquemment utilisées associent deux ou trois colorants différents : l'Hématoxyline-Eosine (H.E.) associe l'hématéine qui colore les noyaux en violet et l'éosine les cytoplasmes en rose.

2.6.5 Montage :

Après avoir subi une déshydratation (par bains d'alcool de degré croissant puis bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont

l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une préparation microscopique (simplement appelée « lame » dans le langage courant) prête à être observée au microscope.

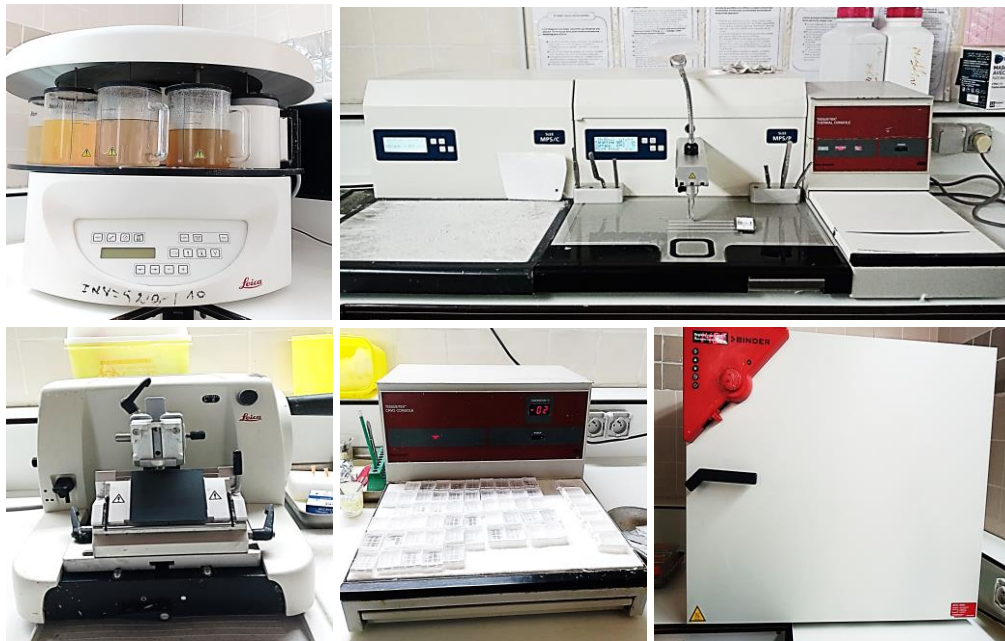


Figure 13 : Les appareils utilisés dans la réalisation des coupes histologiques

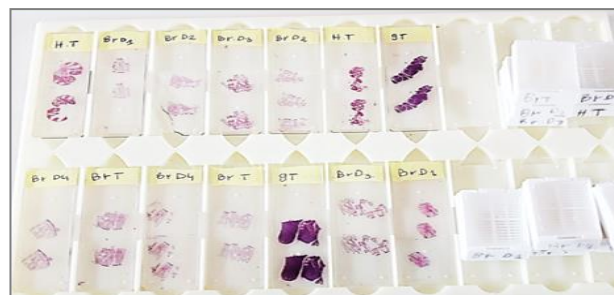


Figure 14 : Les échantillons après les analyse histologique (photos originale).

2.7 Analyse statistique

Les moyennes et les écarts type ($m \pm s$), avec un niveau significatif de $p \leq 0,05$, sont calculés pour chaque groupe d'expérience. Le test 'T' de Student permis de mettre en évidence les différences entre les groupes étudiés au cours des tests effectués sur les paramètres biochimiques.

L'analyse de la variance à un critère de classification ont permis de mettre en évidence les différences entre les groupes étudiés au cours des tests effectués sur les dosages biochimiques. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 17 (Dagnelie, 1999).



Chapitre II :
Résultats

3. Résultats

La teneur en protéines, glucides et lipides a été déterminée au niveau du manteau, muscle adducteur, branchie et glande digestive de *Perna perna* (collecté au niveau de la Baie de Chétaibi) témoin et traités à des doses croissantes (100, 500, 1000 et 1500 µg/l) de nanoparticule d'oxyde de Titane (TiO₂) pendant 21 jours.

3.1 Effets des nanoparticules d'oxyde de Titane (TiO₂) sur les paramètres biochimiques au niveau des gonades :

3.1.1 Effet sur le taux des protéines :

Les effets des nanoparticules d'oxyde de Titanium (TiO₂) sur le contenu en protéines totaux (µg/mg de tissu analysé) sont présentés dans la figure (15). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification révèlent une augmentation très significative ($p \leq 0,01$) après 21 jours d'exposition chez les traités par la concentration 2 (500 µg/L) et une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les traités par les concentrations 3 (1000 µg/L) et 4 (1500 µg/L) par rapport aux témoins.

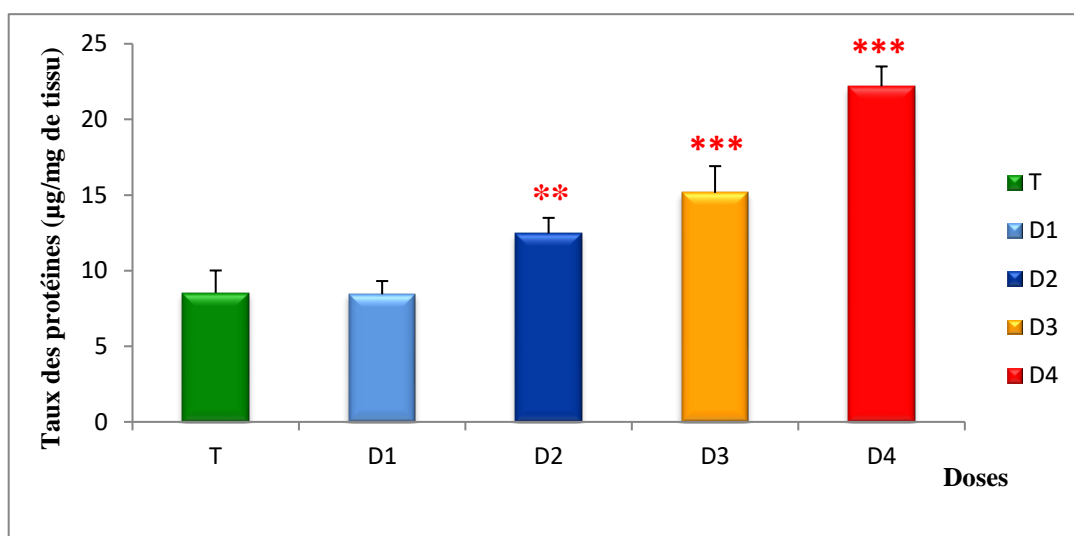


Figure 15 : Taux des protéines (µg/mg de tissu) au niveau des gonades de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO₂ ($m \pm s$, $n=4$).

3.1.2 Effet sur le taux des glucides :

Les effets des nanoparticules d'oxyde de Titanium (TiO₂) sur le contenu en glucides totaux (µg/mg de tissu analysé), sont présentés dans la figure (16). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification montrent une diminution très significative ($p \leq 0,01$) chez les traités par la dose 3 (1000 µg/L) par rapport aux témoins et une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les traités par la dose 4 (1500 µg/L).

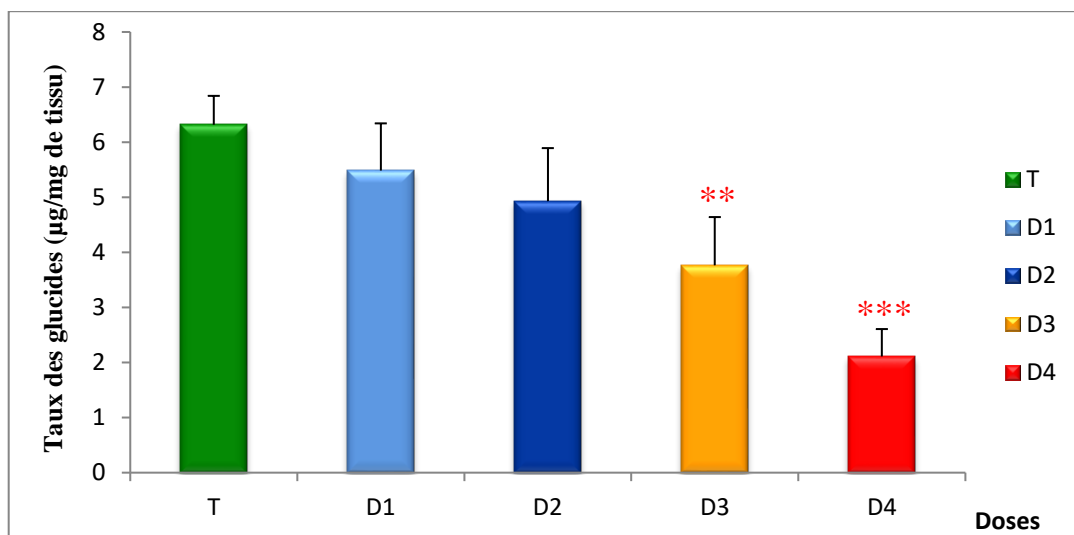


Figure 16 : Taux des glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO_2 ($m \pm s$, $n=4$).

3.1.3 Effet sur le taux des lipides :

Après 21 jours d'exposition, les effets des nanoparticules d'oxyde de Titanium (TiO_2) sur le contenu en lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé), sont présentés dans la figure (17). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification montrent une diminution très significative ($p \leq 0,01$) chez les traités par la dose 3 (**1000 $\mu\text{g}/\text{L}$**), et une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les traités par la dose 4 (**1500 $\mu\text{g}/\text{L}$**) par rapport aux témoins.

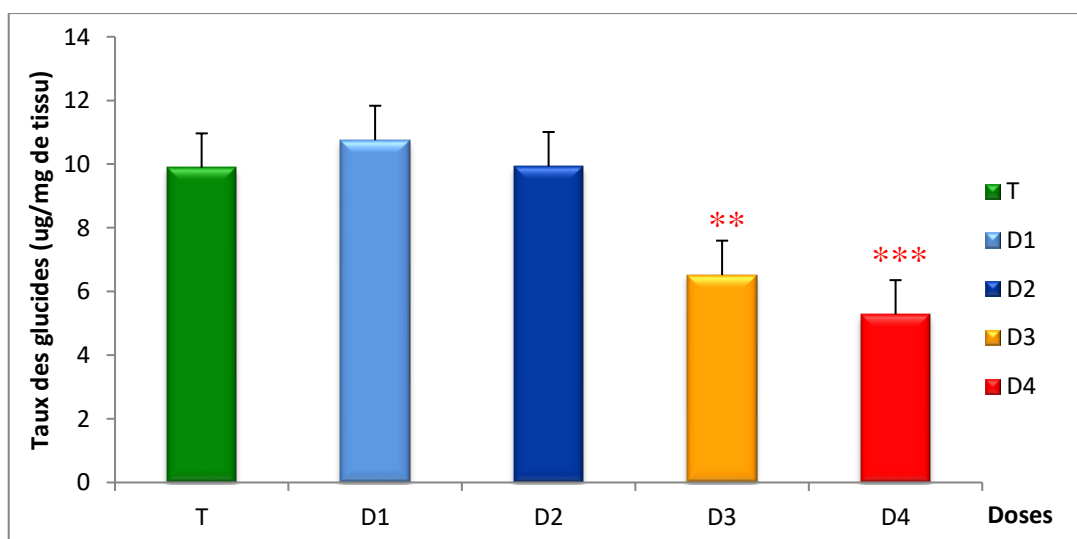


Figure 17 : Taux des lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau de la gonade de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO_2 ($m \pm s$, $n=4$).

3.2 Effets des nanoparticules d'oxyde de Titane (TiO₂) sur les paramètres biochimiques au niveau des branchies :

3.2.1 Effet sur le taux des protéines :

Les effets des nanoparticules d'oxyde de Titanium (TiO₂) sur le contenu en protéines totales (µg/mg de tissu analysé) sont présentés dans la figure (18). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification après 21 jours d'exposition, montrent une augmentation significative ($p \leq 0,05$), chez les groupes traités par la dose 3 (1000 µg/l) et une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les groupes traités par la dose 4 (1500 µg/l) par rapport au groupes témoins.

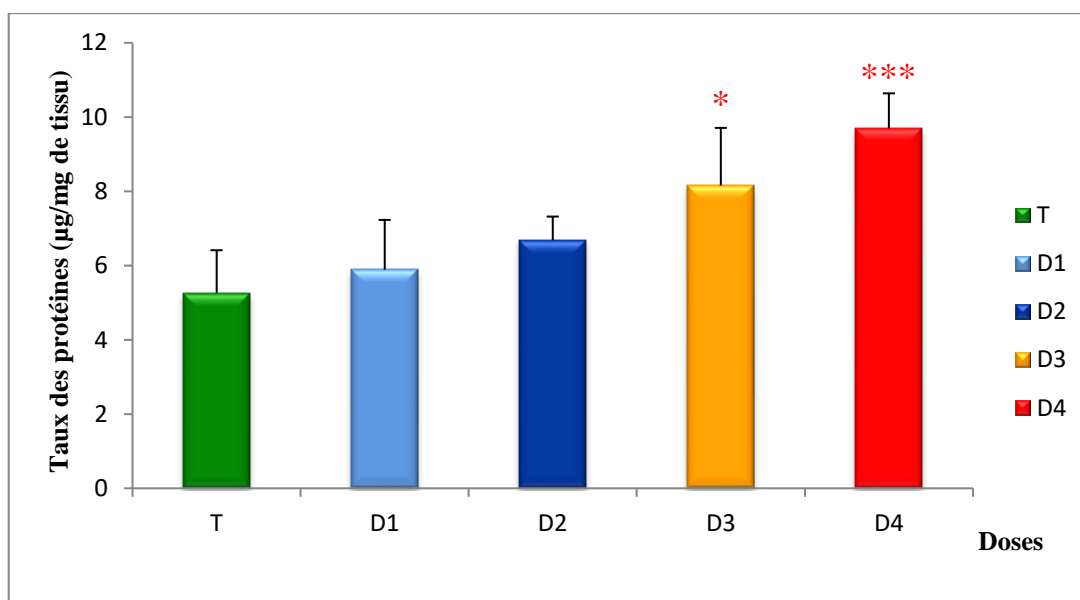


Figure 18 : Taux des protéines (µg/mg de tissu) au niveau des branchies de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO₂ ($m \pm s$, $n=4$).

3.2.2 Effet sur le taux des glucides :

Après 21 jours de traitement, les effets des Nps d'oxyde de Titanium (TiO₂) sur le contenu en glucides totaux (µg/mg de tissu analyse) sont présentés dans la figure (19). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification montrent par rapport aux témoins, une diminution très significative ($p \leq 0.01$) chez les traités par la dose 2 (500 µg/L) et une diminution hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les traites par les doses 3 et 4 (1000 et 1500 µg/L).

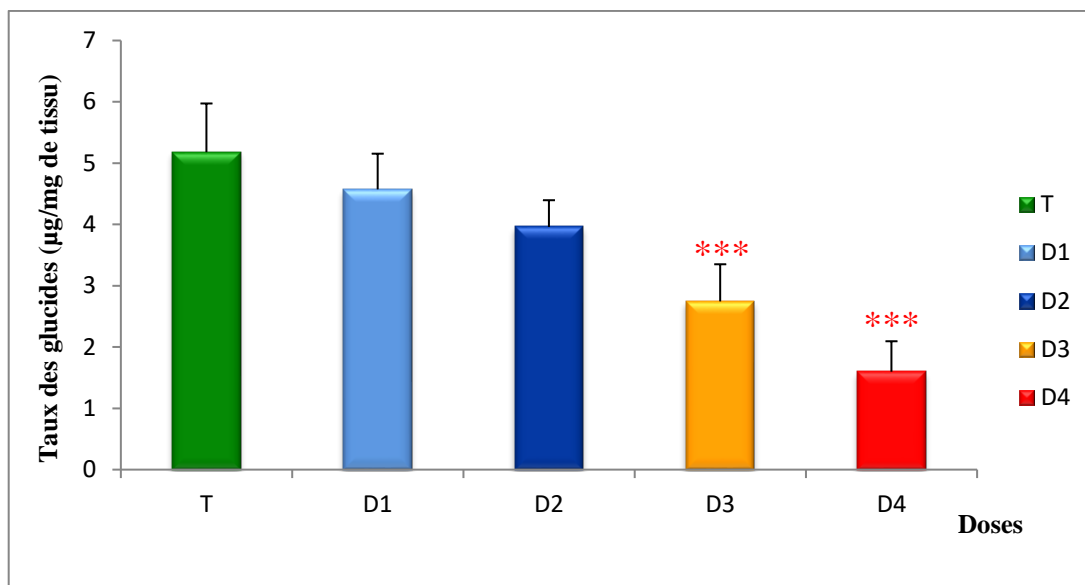


Figure 19 : Taux des glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des branchies de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO_2 ($m \pm s$, $n=4$).

3.2.3 Effet sur le taux des lipides :

Après 21 jours d'exposition, les effets des nanoparticules d'oxyde de Titanium (TiO_2) sur le contenu en lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) sont présentés dans la figure (20). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification montrent une diminution très significative ($p \leq 0,01$) dans la dose 3 et une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) dans la dose 4 par concentration ($1000 \mu\text{g}/\text{L}$) et ($1500 \mu\text{g}/\text{L}$) par rapport aux témoins.

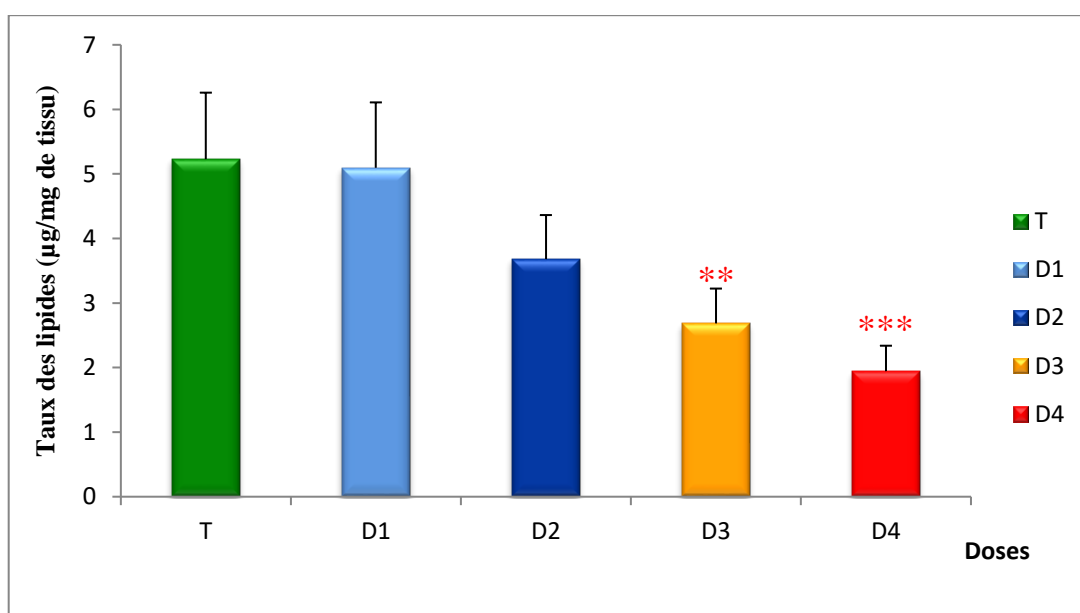


Figure 20 : Taux des lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des branchies de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO_2 ($m \pm s$, $n=4$).

3.3 Effets des nanoparticules d'oxyde de Titane (TiO₂) sur les paramètres biochimiques au niveau des muscles adducteurs :

3.3.1 Effet sur le taux des protéines :

Les effets des Nps d'oxyde de Titanium (TiO₂) sur le contenu en protéines totales (µg /mg de tissu analysé) sont présentés dans la figure (21). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification après 21 jours de traitement montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les traites par les doses 3 et 4 (1000 et 1500 µg/L) par rapport aux témoins.

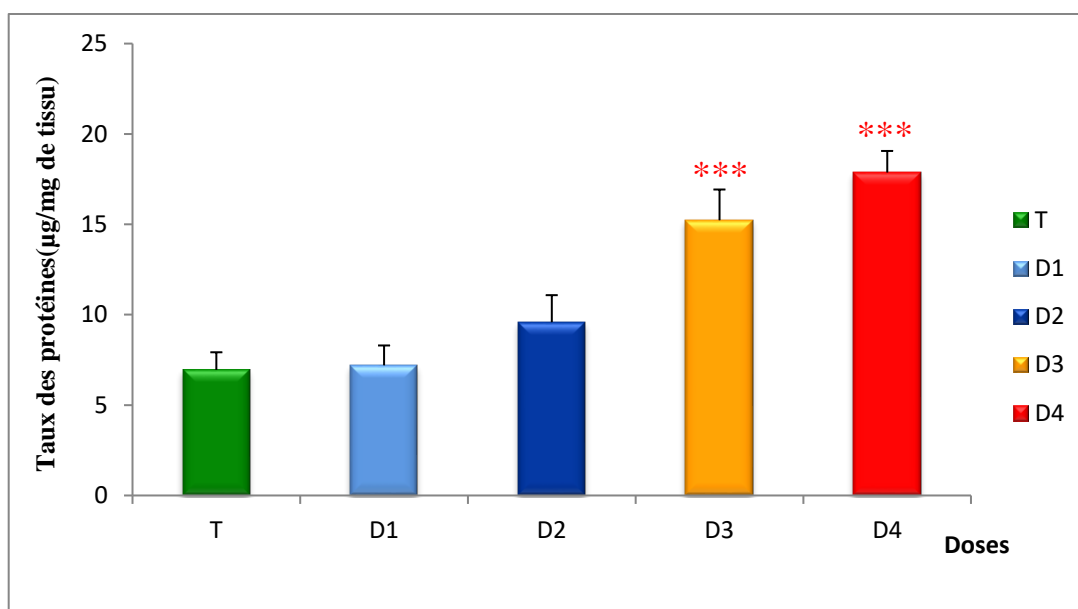


Figure 21 : Taux des protéines (µg/mg de tissu) au niveau des muscles de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO₂ ($m \pm s$, $n=4$).

3.3.2 Effet sur le taux des glucides :

Après 21 jours de traitement, les effets des Nps d'oxyde de Titanium (TiO₂) sur le contenu en glucides totaux (µg/mg de tissu analyse) sont présentés dans la figure (22). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification montrent par rapport aux témoins, une diminution très significative ($p \leq 0.01$) chez les traités par la dose 1 (100 µg/L) et une diminution hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les traites par les doses 2, 3 et 4 (500, 1000 et 1500 µg/L).

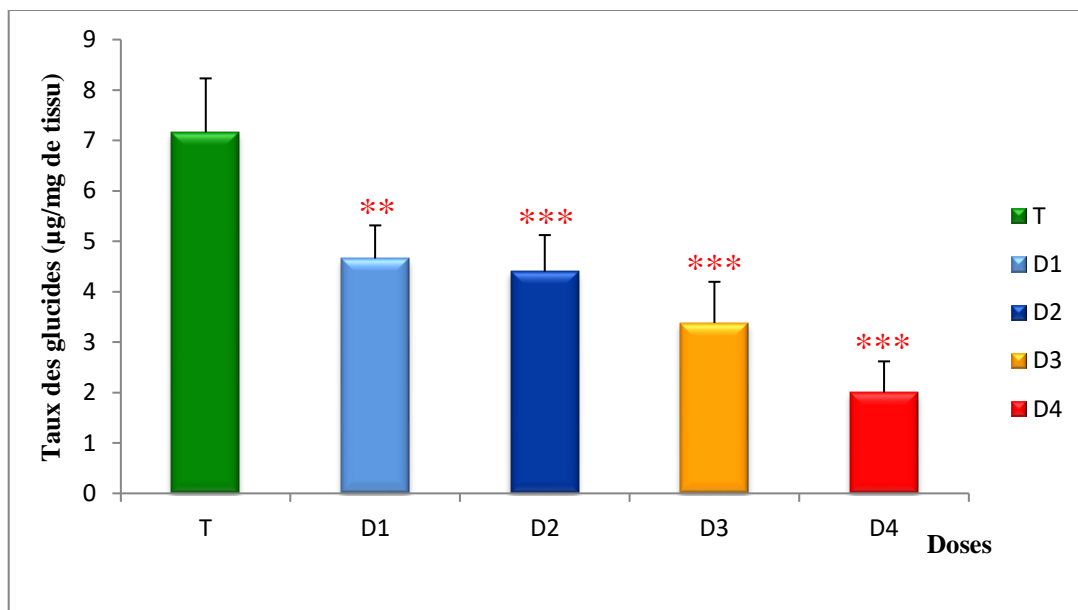


Figure 22 : Taux des glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des muscles de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO_2 ($m \pm s$, $n=4$).

3.3.3 Effet sur le taux des lipides :

Après 21 jours de traitement, les effets des nanoparticules d'oxyde de Titanium (TiO_2) sur le contenu en lipide total ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analyse) sont présentés dans la figure (23). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification montrent une diminution très significative ($p \leq 0.01$) chez les traités par la dose 3 et 4 (**1000 et 1500 $\mu\text{g}/\text{L}$**) par rapport aux témoins.

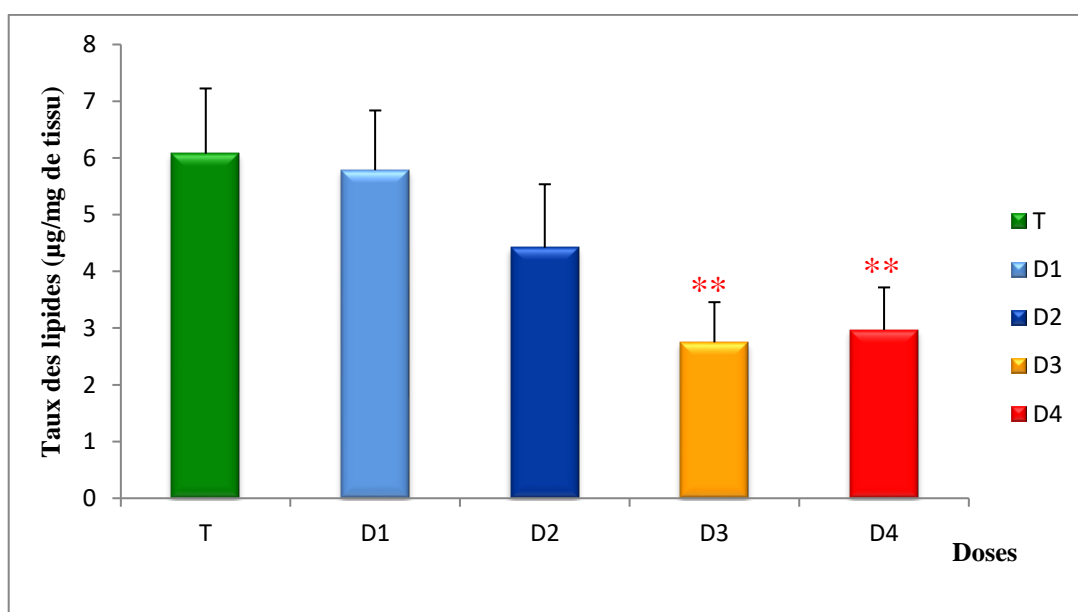


Figure 23 : Taux des lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des muscles adducteurs de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO_2 ($m \pm s$, $n=4$).

3.4 Effet des nanoparticules d'oxyde de Titane (TiO₂) sur les paramètres biochimiques au niveau de la glande digestif :

3.4.1 Effet sur le taux des protéines :

Les effets des Nps d'oxyde de Titanium (TiO₂) sur le contenu en protéine totales (µg/mg de tissu analyse) sont présentés dans la figure (24). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification après 21jour d'exposition montrent une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) chez les groupes traités par les doses 2, 3 et 4 (500, 1000 et 1500 µg/l) par rapport aux témoins.

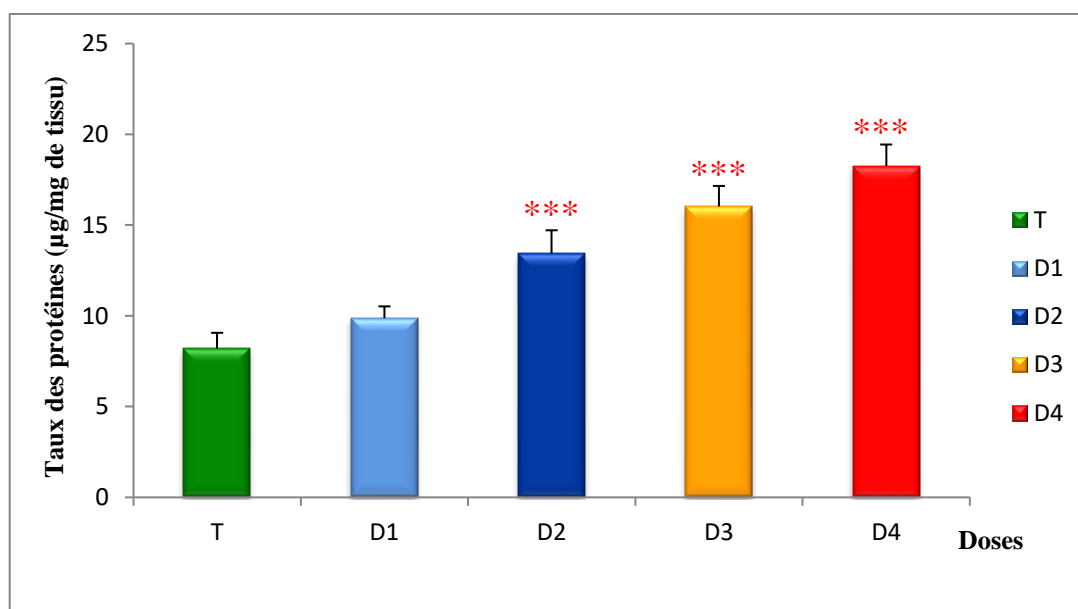


Figure 24 : Taux des protéines (µg/mg de tissu) au niveau des glandes digestifs de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO₂ ($m \pm s$, $n=4$).

3.4.2 Effet sur le taux des glucides :

Les effets des Nps d'oxyde de Titanium (TiO₂) sur le contenu en glucides totaux (µg/mg de tissu analysé), après 21 jours d'exposition sont présentés dans la figure (25), Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification montrent par rapport au témoin une diminution très significative ($p \leq 0,01$) chez les traités par la dose 2 (500 µg/L) et une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les traités par les dose 3 et 4 (1000 et 1500 µg/L).

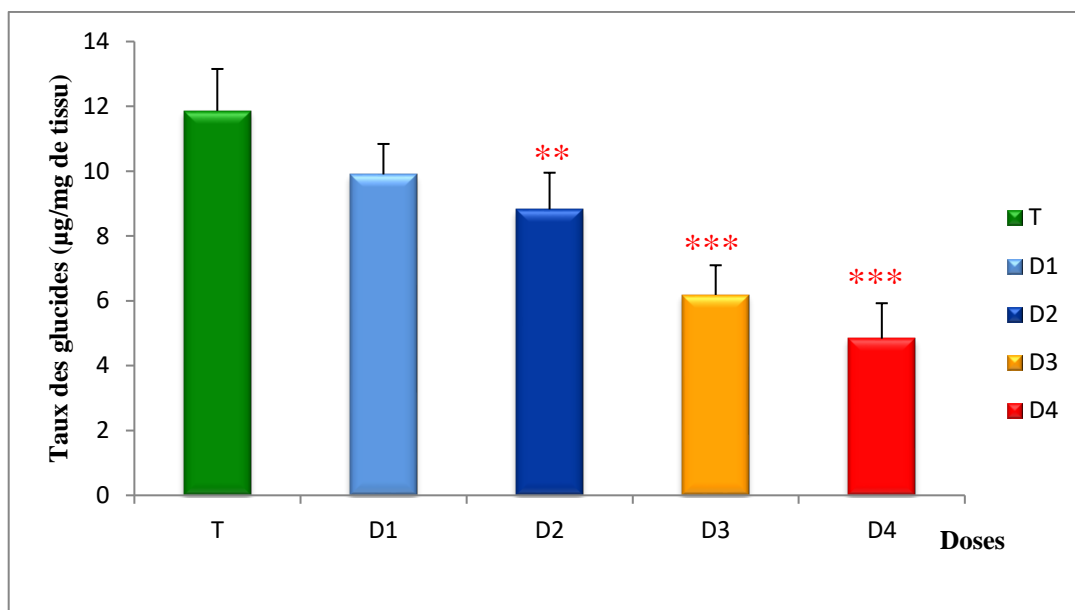


Figure 25 : Taux des glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des glandes digestives de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO_2 ($m \pm s$, $n=4$).

3.4.3 Effet sur le taux des lipides :

Les effets des nanoparticules d'oxyde de Titanium (TiO_2) sur le contenu en lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu analysé) sont présentés dans la figure (26). Les résultats relatifs à l'analyse de la variance à un critère de classification montrent par rapport aux témoins une diminution significative ($p \leq 0,05$) chez les traités par la dose 2 (500 $\mu\text{g}/\text{L}$) et une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les traités par les doses 3 et 4 (1000 et 1500 $\mu\text{g}/\text{L}$).

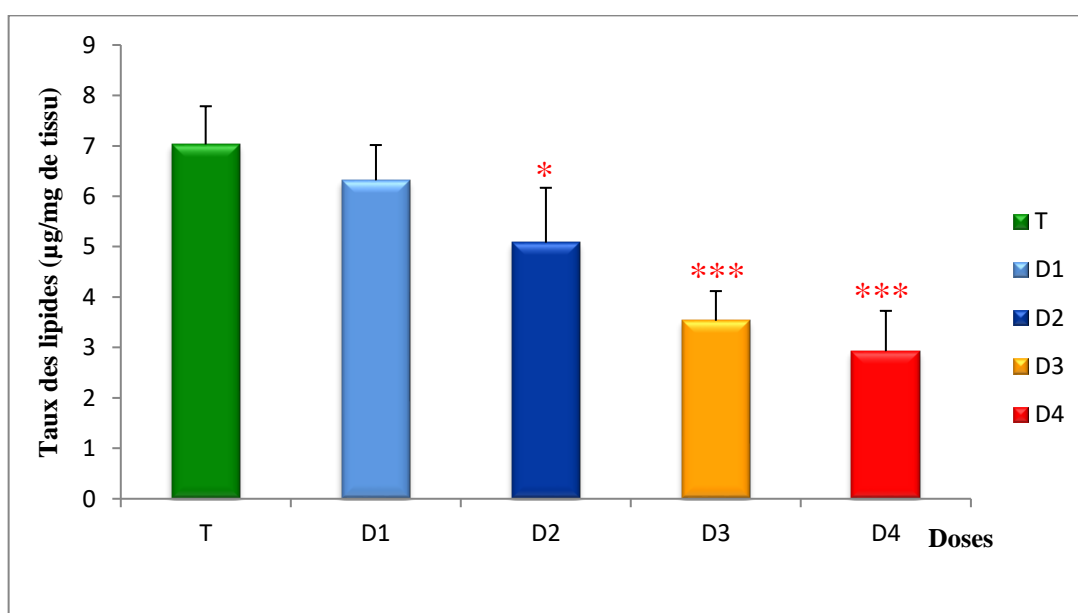


Figure 26 : Taux des lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des glandes digestives de *Perna perna* après 21 jours de traitement aux NPS de TiO_2 ($m \pm s$, $n=4$).

3.5 Etude histopathologique :

3.5.1 Observation des coupes histologiques de la gonade :

Une section histologique au niveau des gonades chez la moule *Perna perna* du groupe témoin est illustrée dans la figure (27), montre que le tissu de la gonade est constitué essentiellement de tubules séminifères organisés en fiscaux. Chaque tubule est entouré par une membrane basale et composées de deux types cellulaires : les cellules germinales ont différents stades de développement et les cellules de réserves (nourricières). Les cellules germinales se retrouvent à l'intérieur des tubules spermatiques, où se déroule la spermatogenèse caractérisée par six types cellulaires : les cellules souches, les spermatogonies, les spermatocytes primaires, les spermatides et les spermatozoïdes (Brahimi, 2011). Autour de ces cellules on trouve le tissu conjonctif qui joue un rôle important dans le soutien structurel des organes reproducteurs, il est composé de différentes cellules spécialisées ; telles que les fibroblastes qui sont responsables de la production des fibres de collagène et d'élastine, et les cellules immunitaires qui jouent un rôle dans la réponse inflammatoire et la protection des tissus.

L'examen microscopique des gonades males des moules traités par les NPS d'oxyde de Titane (TiO₂) pendant 21 jours par des doses croissantes (100, 500, 1000 et 1500 µg/L) révèle plusieurs altérations au niveau des tissus, par des degrés variables avec un effet dose dépendant. Les observations sont les suivantes :

La gonade des moules traités par la dose 1 (100 µg/L) la figure (28) présente un état normal des tissus. L'observation microscopique des tissus traités par la dose 2 (500 µg/L), la figure (29) révèle un discret œdème, observé dans les espaces interstitiels des tissus gonadiques (l'espace entre les tubules séminifères), caractérisé par une accumulation significative du volume de liquides dans les tissus ce qui entraîne un gonflement localisé, cela présente un signe d'une réponse inflammatoire légère.

A la dose 3 de (1000 µg/L), figure (30), les mêmes changements ont été observés, accompagnés par une réduction significative de la taille des cellules des gonades, par rapport aux moules témoins cela indique une légère atrophie.

A la dose 4 de (1000 µg/L), figure (31), les mêmes changements ont été observés accompagnés par une des ruptures de tissu conjonctif, et apparition de certains infiltrats qui se réfèrent par la présence des cellules inflammatoires dispersées dans les tissus, cela indique une réponse de défense immunitaire face à une infection ou lésion, accompagnés par une dégénérescence des tubules, et une diminution de la taille des gonades. Ces altérations affectent la fonction reproductrice des moules et représentent un signe indirect de l'altération de la fertilité.

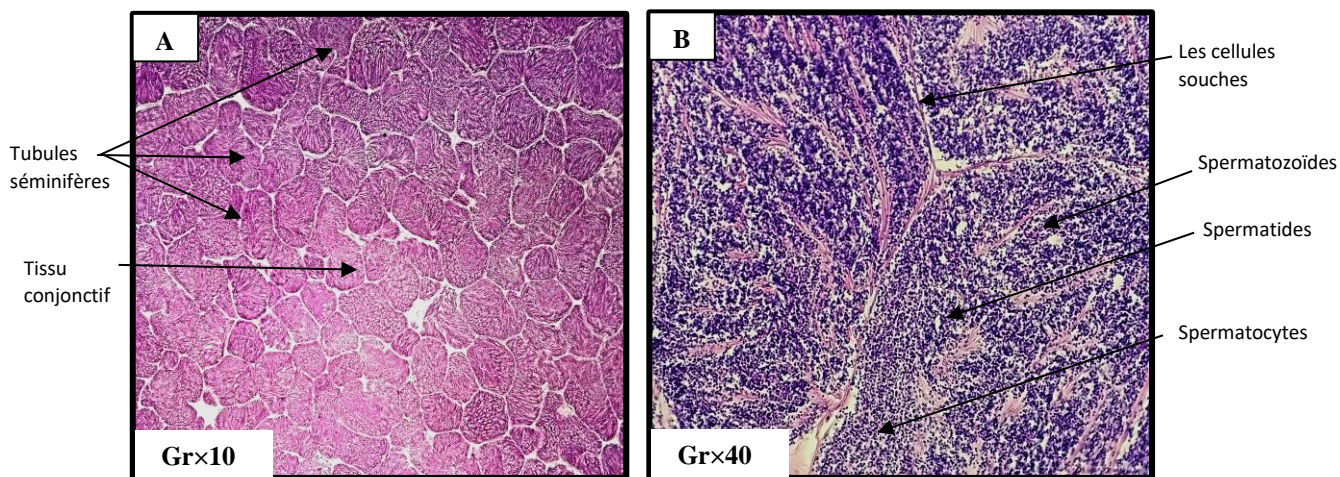


Figure 27 A et B : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de la gonade mâle témoin de *Perna perna*.

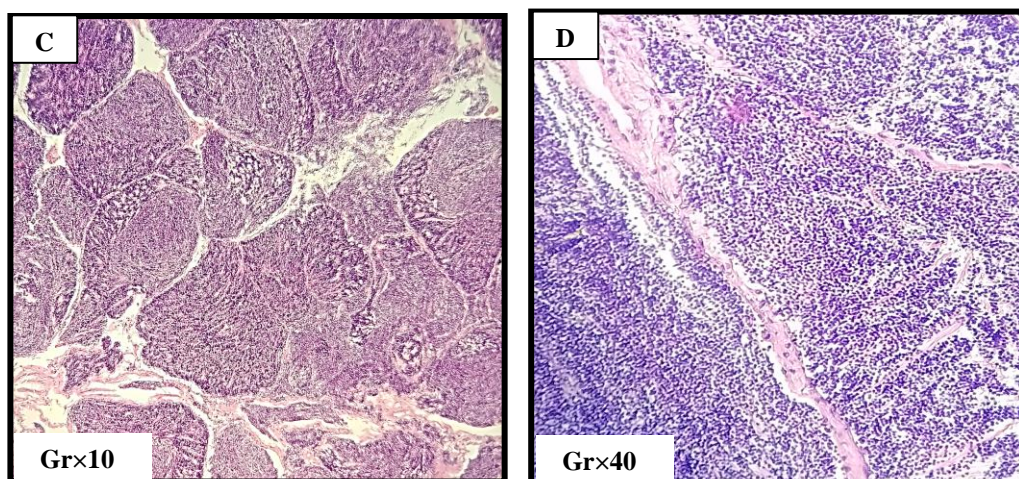


Figure 28. C et D : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de la gonade mâle dose 1 (100 µg/l) de *Perna perna*.

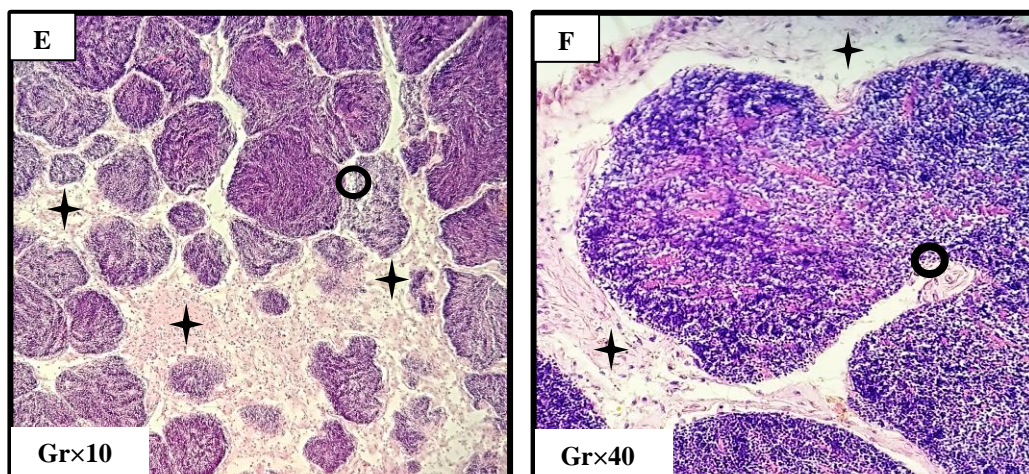


Figure 29. E et F : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de la gonade mâle dose 2 (500 µg/l) de *Perna perna*.

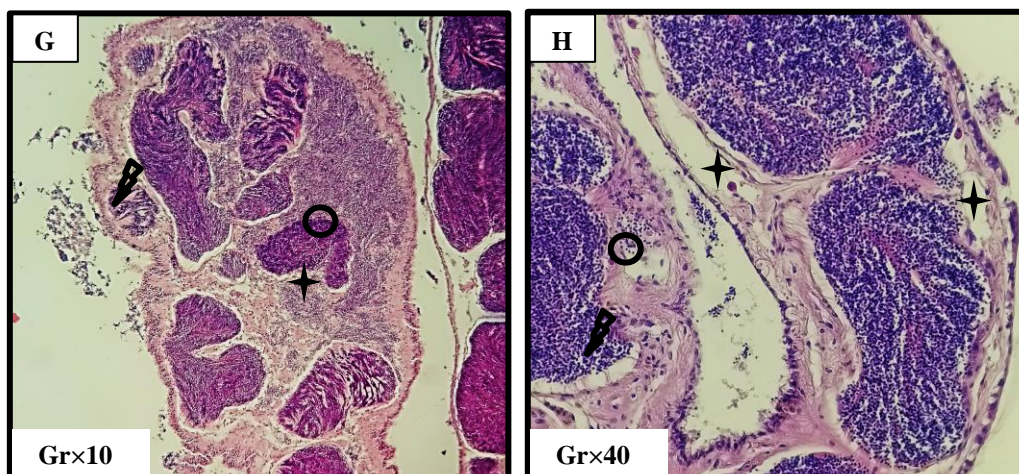


Figure 30. G et H : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de la gonade mâle dose 3 (1000 µg/l) de *Perna perna*.

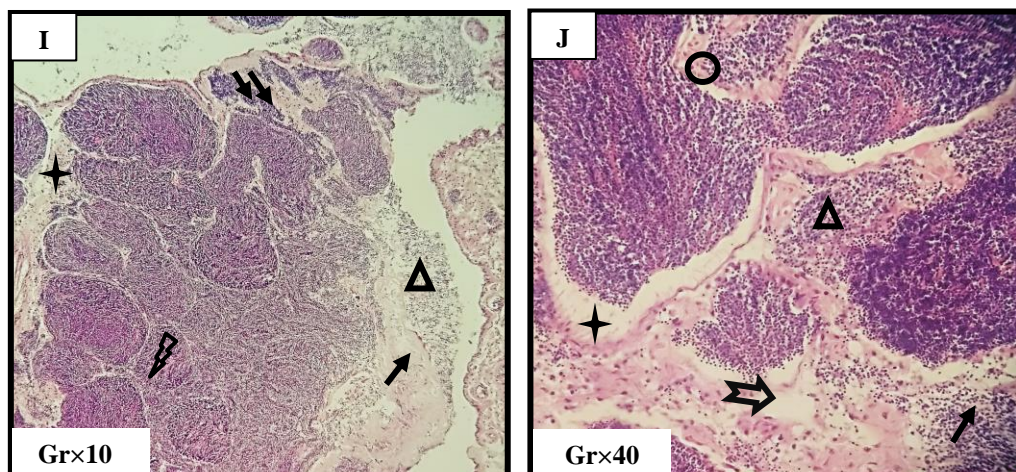


Figure 31. I et J : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de la gonade mâle dose 4 (1500 µg/l) de *Perna perna*.

La légende :

★	œdème
○	Inflammation
⚡	Atrophie
↘↘	Diminution de la taille des cellules
⇒	Rupture de tissu conjonctif
△	Infiltrat
↗	Augmentation dégénérescence

3.5.2 Observation des coupes histologiques des branchies :

La figure (32) présente des coupes histologiques effectuées au niveau des branchies témoin chez la moule *Perna perna* normale.

L'organe branchial est recouvert d'un épithélium, constitué de deux lames, externe et interne, qui figurent classiquement un W en section transversale. Ces lames sont soutenues par un tissu conjonctif et sont composées de multiples filaments repliés, Chaque filament branchial est recouvert de cils frontaux (Morad *et al.*, 2023) qui sont associés par des brosses ciliaires et forment des feuillets ; un feuillet descendant (ou interne) en regard du pied et d'un feuillet ascendant (ou externe) situé du côté du manteau (Sunila, 1988).

Les deux feuillets de chaque lame sont séparés l'un de l'autre par une étroite cavité inter foliaire qui s'étend sur la moitié environ de la hauteur des feuillets. Un septum inter foliaire occupe la région terminale. Sur le bord marginal des lames, existe une gouttière alimentaire qui parcourt toute la longueur de la branchie. A la base, un profond sillon alimentaire parcourt aussi toute la longueur des lames branchiales. Selon la figure on peut voir que tous les filaments sont disposés en séries, parallèles entre eux. Ils sont tous bâtis sur le même type.

L'examen microscopique des coupes histologiques au niveau des branchies des moules traités par les NPS d'oxyde de Titane (TiO₂) pendant 21 jours a révélé un aspect normal des tissus chez les traités par les doses 1 et 2 (100 et 500 µg/L), figures (33) et (34).

A la dose 3 (1000 µg/L), figure (35), des altérations bien marquées ont été observées, avec apparition d'infiltrat inflammatoire fait référence à une réponse des stimuler inflammatoire et des infections marquées par la présence de cellules immunitaire (les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes qui migrent vers les tissus branchiaux accompagner par la présence des plasmocytes qui permet de sécréter de grande quantité d'anticorps, c'est un signe d'une sévère info plasmocytes

A la dose 4 (1500 µg/L), figure (36) les mêmes changements ont été observés accompagne d'une dégénérescence et déformation de lamelle branchiales, associés à des infections et des inflammations tissulaires, aussi une nécroses membranaire sévère a été observé au niveau des tissus conjonctif, indiquant une mort cellulaire accompagne par la présence des débris cellulaires (les cellules mortes se désintègre et se dégradent, laissant des débris cellulaires résiduels.

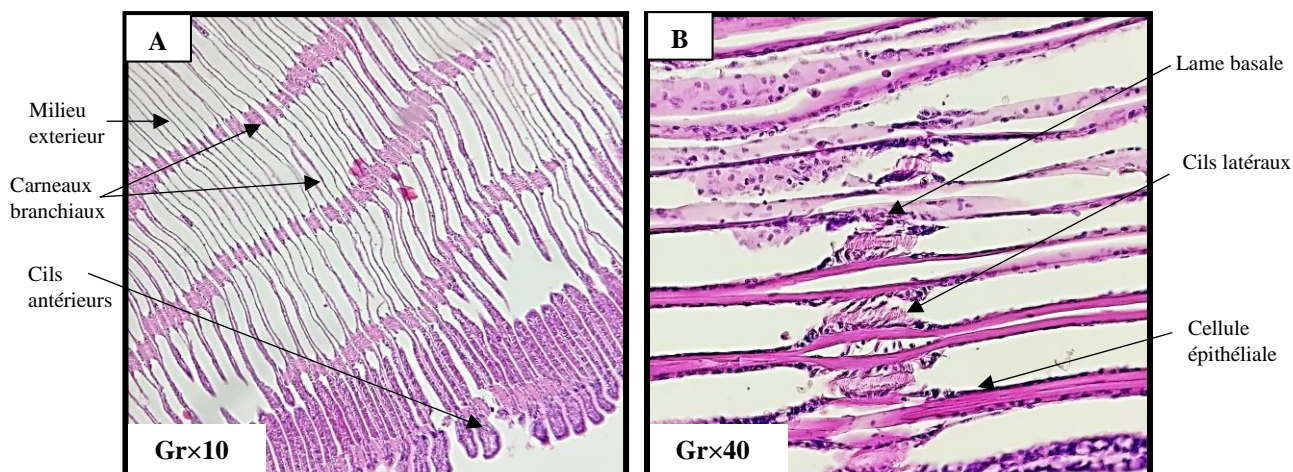


Figure 32. A et B : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique des branchies témoin de *Perna perna*.

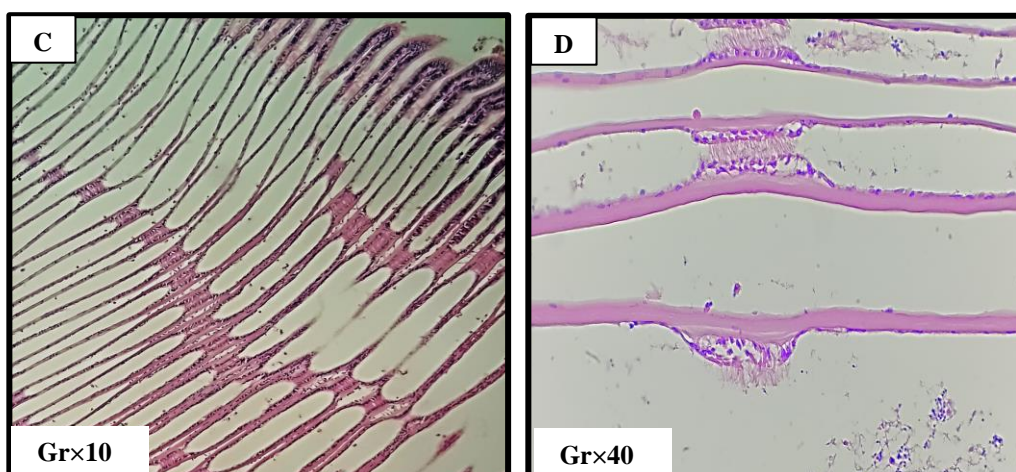


Figure 33. C et D : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique des branchies dose 1 (100 µg/l) de *Perna perna*.

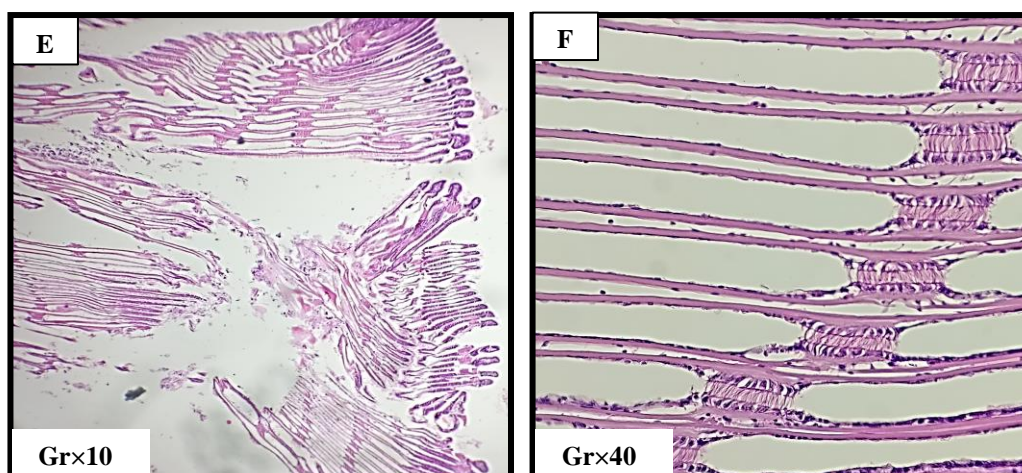


Figure 34. E et F : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique des branchies dose 2 (500 µg/l) de *Perna perna*.

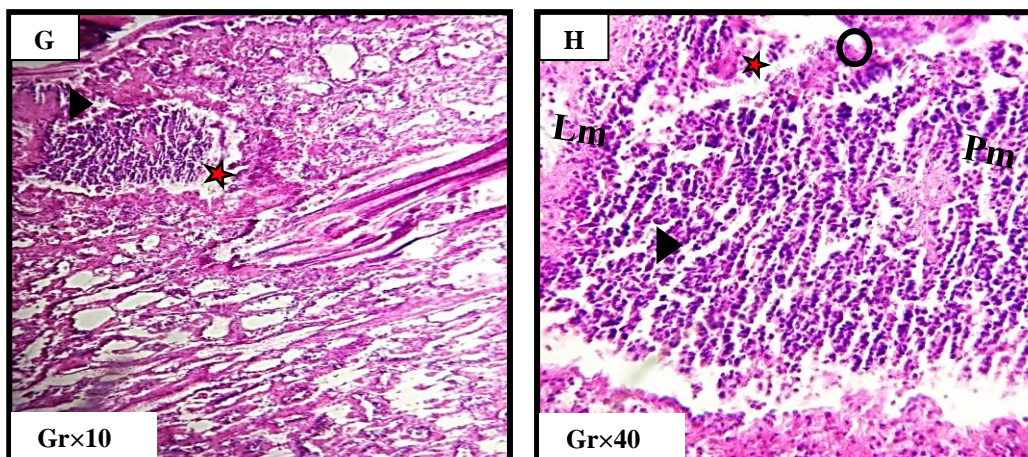


Figure 35. G et H : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique des branchies dose 3 (1000 µg/l) de *Perna perna*

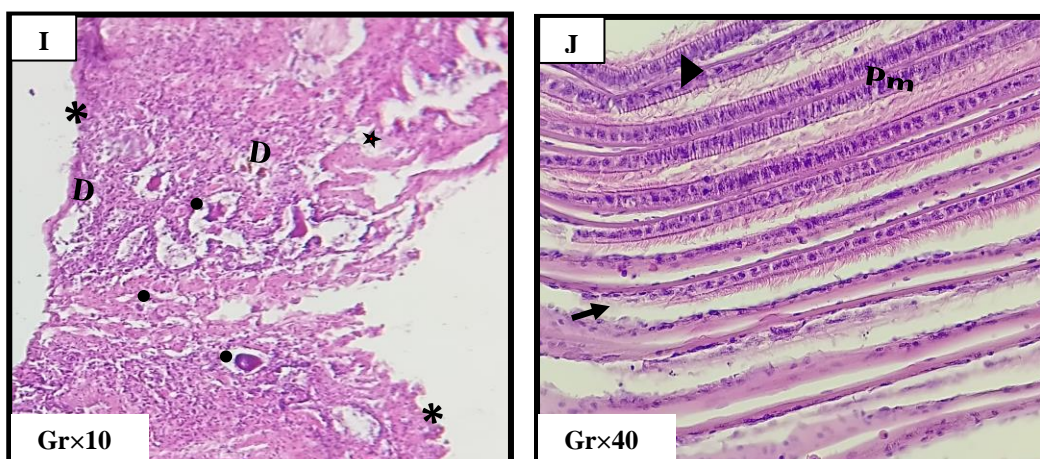


Figure 36. I et J : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique des branchies dose 4 (1500 µg/l) de *Perna perna*.

La légende :

★	Infiltrat
○	Inflammation
Lm	Lymphocyte
Pm	Plasmocyte
▶	Info plasmocyte
●	Nécrose cellulaire
*	Nécrose membranaire
➔	Dégénérescence
D	Débris cellulaire



Chapitre III :
Discussion

4. Discussion

Les nanoparticules ayant une taille de l'ordre du nanomètre 1 μm , présentent des propriétés physico-chimiques unique, en raison de leur petite taille peuvent facilement pénétrer dans les organismes et interagir avec leur tissu. Les résultats de (Mittal *et al.*, 2014) mettent en évidence les effets néfastes des nanoparticules sur les organismes aquatiques, tels que des altérations histologiques, des perturbations du système immunitaire, des effets sur la croissance et le développement, sur les mécanismes biochimiques ainsi que des changements dans le comportement et la reproduction.

4.1 Effets des nanoparticules d'oxyde de titane sur les paramètres biochimiques des 4 tissus (gonade, muscle adducteur, branchie et glande digestive) :

La moule *Perna perna* est un organisme filtreur et sédentaire reflète au mieux les conditions du milieu, vue sa capacité à accumuler dans les tissus divers contaminants organiques et inorganiques (O'Connor, 1996). Les paramètres métaboliques ont été choisis par suite de leur implication dans les réponses à un stress chimique.

Dans la présente étude, les dosages des trois métabolites ont été effectués au niveau de quatre organes de la moule. La gonade (organe de reproduction). La branchie, qui est le principal organe en contact avec le milieu extérieur, et qui assure chez les bivalves des fonctions aussi variées que la respiration, la nutrition, l'excrétion, l'absorption et la régulation osmotique. L'importante activité de filtration et de transport des particules en suspension fait de cet organe, un site privilégié pour la concentration des microorganismes et la bioaccumulation des substances toxiques (Martoja *et al.*, 1976 ; Joly, 1982). Les muscles adducteurs (ils sont au nombre de quatre) qui relie le corps de l'animal à sa coquille est assurant, par leur contraction, la fermeture des valves et la glande digestive, organe de remplissant les fonctions hépatique et digestive. C'est un site privilégié de contact avec les contaminants présents dans le milieu marin.

Les paramètres biochimiques chez les espèces exposées à des substances toxiques sont considérés comme des bons biomarqueurs et peuvent constituer un important outil de diagnostic pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (Forbes *et al.*, 1997 ; McLoughlin *et al.*, 2000). Les résultats de dosage des paramètres biochimiques montrent une augmentation du taux des protéines et une baisse de niveau des glucides et des lipides au niveau des quatre organes étudiés d'une manière dose-dépendante.

Les protéines sont les premiers biomarqueurs de perturbation métabolique. L'évolution du taux de protéines totales dans les quatre organes des moules traités a augmenté (avec des différences très significatives) et d'une manière dose-dépendante. Ce phénomène pourrait être considéré comme un biomarqueur précoce de l'exposition aux contaminants chimiques. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de (Geret *et al.*, 2002b) qui montrent que la quantité des protéines totales augmente significativement après 7 jours de traitement à la dose de 40 µg/l. (Peccini *et al.*, 1994 ; Mayasa *et al.*, 2002), ont également montré une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins). Des résultats similaires ont été observés au niveau du manteau et de la glande digestive de *Grossostrea rhizophorae* suite à une exposition à des xénobiotiques tel que le cadmium (Jocelyne, 1990).

Les protéines sont principalement impliquées dans l'architecture de la cellule ; les protéines peuvent également lier les toxines et jouer le rôle des protéines de transport (Cui *et al.*, 2010).

Concernant les glucides totaux, ceux-ci ont montré pour tous les organes étudiés et chez les différents groupes traités une diminution significative par rapport au groupe contrôle.

Cette chute est due au traitement par les NPS d'oxyde de titane une étude sur la composition biochimique du Bivalve *Spisula subtruncata* a mis en évidence des teneurs en glucides parmi les plus faibles rencontrée chez les Bivalves. La cause invoquée étant en relation avec des agents altérageux liés à la présence d'une rivière urbaine polluée. D'un autre côté la diminution dose-dépendante du taux des glucides et témoignent d'une perturbation du métabolisme glucidique sous l'effet d'un stress métallique comme l'indiquent les travaux de Nzungue, (2008). En effet, Eissa *et al.* (2002) ont rapporté que l'effet nocif de composés chimiques pourrait être attribué à l'augmentation de l'utilisation de l'énergie et/ou à l'altération des organites des cellules (des moules traités) et qu'ils peuvent interférer avec la synthèse des protéines.

Le taux des lipides diminue de manière hautement significative en présence des NPS d'oxyde de titane au niveau des quatre organes et d'une manière dose-dépendante. En effet Eissa *et al.*, (2002) ont rapporté que l'effet nocif de composés chimiques pourrait être attribué à l'augmentation de l'utilisation de l'énergie. Les lipides représentent le carburant énergétique privilégié proposé aux tissus en cas de besoins après les hydrates de carbone (Padmaja et Rao, 1994). Parallèlement à cette perturbation lipidique, les radicaux libres produits entraînent également des désordres structuraux et fonctionnels dans la cellule l'attaque radicalaire des membranes provoque des perturbations de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (Lawton et Donaldson,

1991), tous les composants peuvent être touchés : lipides, protéines et donc la membrane dans son ensemble

4.2 Effets des nanoparticules d'oxyde de Titane sur l'histologie des gonades et des branchies :

Après avoir mis en évidence la toxicité des nanoparticules d'oxyde de titane sur les quatre organes de la moule, il s'est avéré nécessaire de mettre en évidence les impacts tissulaires potentiels au niveau des gonades et des branchies.

Les branchies et les gonades des bivalves sont sensibles aux polluants environnementaux et couramment utilisées comme organes cibles dans les études éco-toxicologiques (Alazemi *et al.*, 1996 ; Canesi *et al.*, 2007 ; Gornati *et al.*, 2016).

4.2.1 Effets des nanoparticules d'oxyde de Titane sur l'histologie des gonades :

Les coupes histologiques au niveau des gonades de la moule *Perna. perna* traités par des concentrations croissantes (500, 1000 et 1500 µg/L) de nanoparticule d'oxyde de Titane, montrent un développement d'œdème dans les plus faibles concentrations, cette réponse inflammatoire se manifestent par les interactions directe entre les nanoparticules et les cellules gonadique qui peuvent causer une perturbation d'équilibre oxydant- antioxydant dans les tissus, et un déséquilibre ionique entraînant une accumulation excessive de liquides dans l'espace interstitiel ou une accumulation d'ions et d'eau à l'intérieur des cellules , ainsi peuvent interférer avec les fonctions vasculaire des gonades (Canesi *et al.*, 2016 ; Canesi *et al.*, 2018). Cette fuite de liquide des vaisseaux sanguins vers le tissu environnant généralement résulte en un gonflement des cellules et une expansion observable dans les zones touchées.

Dans une étude réalisée par Canesi *et al.* (2015), les chercheurs ont examiné les effets des NPs d'argent (Ag) sur les gonades de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* à des concentrations croissantes, les résultats disent que la présence d'œdème au niveau des tissus des gonade provoque une altération sur la maturation des gamètes, une diminution de la capacité de reproductions et les échanges de nutriments et d'oxygène.

Dans notre cadre d'étude, on a observé aussi des ruptures tissulaires, de dégénérescence accompagnée par une augmentation de lésion cellulaire, d'infiltrat inflammatoire et une atrophie. Ces résultats sont en accord avec ceux de Miller *et al.* (2012) qui ont exposé les moules bleus *Mytilus edulis* à des NPs d'oxyde de Titane pendant une période prolongé. Les observations des

atrophies au niveau des tissus, subissent une réduction de la taille, de la fonctionnalité des ovaires et des testicules chez les males. Une étude menée par **Gagné *et al.* (2009)** sur les effets des nanoparticules d'argent chez les moules d'eau douce *Lampsilis siliquoidea* montre une diminution de la taille des cellules des gonades, de poids, des lésions et des nécrose cellulaires, les mêmes résultats en été signaler dans l'étude d'**Agbohessi *et al.* (2015)** sur les testicules males chez *Tilapia guineensis* et *Clarias gariepinus* contaminer par le pesticide Tihan et lthamétrine. Selon (**Maynard *et al.*, 1953**) ces effets sur les cellules testiculaires peuvent engendrer une perturbation de la production des hormones et donner un sperme immature notamment chez les femelles, une étude sur le même pesticide marqué par (**Janz, 2000**) montre des infiltrats et des lésions cellulaires, plus une atrésie folliculaire pré- ovulatoire qui est un processus de dégénérescence par lequel l'ovocyte perd son intégrité et est éliminé avant l'ovulation, cette altération a exclusivement été identifiée chez les poissons prélevés à Batran, ce qui peut être une cause déterminante d'une diminution de la capacité de reproduction.

Aussi le suivi des nanoparticules de dioxyde de titanium chez les poissons Zébrés (**Li *et al.*, 2016**) présentait des anomalies dans la structure des tissus et une réduction significative du nombre d'œufs produits. Un nombre relatif des effets nocifs du même toxique sur la reproduction des palourdes de *Manilla* pendant une période d'exposition de 21 jours, signale une diminution de spermatozoïdes chez les mâles, diminution de la viabilité des larves et des dommages à l'ADN des cellules gonadiques (**Gao *et al.*, 2019**), les auteurs de cette étude suggère que les nanoparticules de Titanium peuvent compromettre la santé reproductive des bivalves.

On peut dire que selon les études précédentes accorder à nos résultats, les effets néfastes des nanoparticules et d'autre polluant dans les doses les plus élevé conduit à la baisse de fertilité, diminue la qualité des gamètes et la capacité de reproduction chez les organismes aquatiques avec des répercussions potentielles sur la population et l'écosystème dans son ensembles.

4.2.2 Effet des nanoparticules d'oxyde de Titane sur l'histologies des branchies :

La branchie de la moule représente à l'instar de nombreux organismes aquatiques un organe cible pour plusieurs contaminant qui s'accumulent dans leur tissu, en raison de son contact directe et permanent aux xénobiotiques vitaux présents dans l'eau. Cette sensibilité est liée à leurs multiples fonctions et à leur position anatomique. Agissant comme première barrière face aux polluants. (**Giamberini *et al.*, 1993**).

Nos résultats suggèrent que l'exposition à des doses de **(100 et 500 µg/L)** des NPs d'oxyde de Titane pendant 21 jours, n'affecte pas le tissu branchial de la moule. En revanche la dose de **(1000 µg/L)** et **(1500 µg/L)**, montrent des altérations sévères et importantes caractérisées par une infiltration hémocytaire, associées à la présence d'hémocytes atypiques, dans le tissu conjonctif des branchies. Ceci pourrait être une première réponse biologique due à la présence et la diffusion des xénobiotiques. Selon l'explication de **Fabienne Le Grand** en **(2010)**, l'infiltrat se traduit par le rassemblement des cellules immunitaires dans la zone altérée, ces cellules (macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes, plasmocytes et hémocytes) libèrent des médiateurs chimiques tels que les cytokines et les prostaglandines, qui signalent et amplifient la réponse inflammatoire, ces médiateurs chimiques provoquent une vasodilatation, conduisent à une augmentation du flux sanguin vers la zone affectée. Cela entraîne une accumulation de liquide et de cellules immunitaires dans les branchies, associée généralement par des lésions cellulaires entravant la fonction respiratoire normale de la moule.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés chez les huîtres exposées à un environnement contaminé, par des nanomatériaux métalliques tels que le plomb et le cuivre (**Li et al., 2020**), ses résultats montrent une infiltration inflammatoire au niveau des tissus branchiaux, accompagnée par des dommages cellulaires, des lésions au niveau des cellules épithéliales, des accumulations de mucus et des modifications de l'architecture des branchies. L'étude de **Asharani et al. (2011)** a comparé l'effet de deux types de nanoparticule, les AgNPs et les ZnONPs sur la moule verte *Perna Viridis*, cette recherche suggère que la toxicité des NPs varie en fonction de leur état de valence, ils ont constaté des altérations au niveau des filaments labiaux des branchies et des tissus hépatiques. Une augmentation du stress oxydatif ce qui indique un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes de défense anti-oxydants, cette perturbation de l'équilibre redox peut contribuer aux dommages cellulaires et tissulaires observés.

La mort cellulaire observée dans notre étude s'agit de l'ensemble des lésions dégénératives et de la nécrose, leur aspect est les modifications morphologiques irréversibles des cellules branchiales et des dommages sur le noyau et le cytoplasme. La nécrose n'est manifeste que plusieurs heures après la mort cellulaire, elle apparaît sous forme de réaction inflammatoire autour des cellules nécrosées (**Francois et al., 2012**). Chez les moules zébrées, des dégénérescences et des signes de mort cellulaire sur plusieurs organes ont été détectés, y compris les branchies, après l'examen des effets de nanoparticule de Zinc, publiée en **2015** dans la revue **Environmental Science and pollution research** par **Corsi et coll.** L'étude de **Sunila** en **(1988)** a montré des réactions inflammatoires plus sévères au niveau de la branchie de *Mytilus edulis* confrontée à des contaminants métalliques tels que CdCl_2 , CuCl_2 , PbO_2 , AgNO_3 . Par ailleurs chez la même espèce exposée à des composés organiques du type

PCB, l'auteur rapporte des phénomènes de dilatation, des espaces intercellulaires et la perte des cils latéraux.

Ce pendant lors de nos essais, des lésions similaires ont été observé dans l'étude de (**Mohamed et al., 2021**), ils ont évalué la bioaccumulation chez les bivalves d'eau douce, exposés à trois doses différentes de nano chitosan (CS), AgNPs, et Ag-CS NCs (12.5, 25 et 50 mg/L) pendant 6 jours consécutifs, La gravité des lésions tissulaires a été notée de 0 : absente, 1 : peu, 2 : modérée, à 3 : et sévère hyperplasie, fusion lamellaire des branchies anévrisme, néoplasme et nécrose. De plus, une étude récente en accord avec nôtres résultats menés par (**Wang et al., 2018**) sur les effets des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) au niveau branchies des moules selon des dose croissantes. Ses observations ont montré des perturbations de la structure des filaments et des cellules épithéliales endommagées.

Ces études démontrent clairement que les nanoparticules peuvent causer des lésions histologiques significatives au niveau des branchies des moules. Pour expliquer ce résultat on dit que les nano particules (NPs) peuvent franchir les membranes cellulaires des branchies. L'un des mécanismes suggérés est l'endocytose, qui est un processus par lequel la cellule englobe les nanoparticules à l'intérieur de vésicules appelées endosomes, une fois être à l'intérieur ils vont libérées dans le cytoplasme des cellules provoquant des altérations, influx sur la fonction respiratoire et réduit la capacité de filtration et la surface des échanges gazeuse. Donc l'augmentation des niveaux des altérations est dû à la diffusion des nanoparticules qui s'effectue principalement à travers les tissus des branchies, le chercheur (**Mohamed et al., 2021**) ajoutent : certaines nanoparticules collectées sont décomposées par l'action des cils après la capture, ce qui peut conduire à l'ingestion de groupes plus petits et de nanoparticules uniques.

Selon nos résultats et les études précédentes on peut confirmer que la capacité de filtration, peut être affectée en présence d'une contamination relativement élevée par les nanoparticules et que la réponse est dépendante du type et de la concentration des NPs, les résultats de **Saidani et al. (2019)** montrent une diminution de la capacité de filtration et du taux de respiration chez les palourdes exposées à des concentration élevée des NPs de TiO₂ et d'AuTiO₂. Ces auteurs ont suggéré que les NPs peuvent réduire la capacité des branchies à consommer de l'oxygène et à éliminer les particules. Les mécanismes exacts de toxicité des nanoparticules sur les tissus branchiaux ne sont pas entièrement compris, mais il est probable que cela soit lié à la capacité des nanoparticules à induire des stress oxydatifs, à perturber les membranes cellulaires et à déclencher des réponses inflammatoires.



Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'eau de mer offre un cadre unique, car elle contient des ions et de la matière organique qui pourraient interagir avec les nanoparticules (NPS) et entraver leur mode d'action. Le Titane a été choisi comme modèle de nanoparticules possédant la capacité de traverser les barrières biologiques, sa toxicité est attribuée principalement à la perturbation qu'il engendre. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'impact des nanoparticules d'oxyde de titane et leurs effets sur la moule *perna perna* considéré comme organisme bio-accumulateur et bio indicateur de pollution. Il s'agit d'une étude de toxicité subchronique (21 jours) par la voie d'absorption trophique.

La toxicité du TiO₂ est déterminée chez la moule *perna perna* grâce à un biotest réalisé en laboratoire sur des animaux exposés à des concentrations croissantes de TiO₂ (100 µg/g, 500µg/g, 1000 µg/g et 1500 µg/g). Les premiers résultats montrent que la présence des nanoparticules métalliques à base de TiO₂ provoquait une augmentation significative des protéines et une diminution significative des glucides et des lipides au niveau des quatre organes.

L'analyse histologique des gonades et des branchies montre des altérations bien marquées particulièrement à des fortes concentrations testées de TiO₂ :

- Le tissu gonadique manifeste des œdèmes, des infiltrats inflammatoires, des atrophies et des ruptures de tissu conjonctif accompagnées par une diminution de la taille des tubes séminifères.
- Le tissu branchial de la moule révèle des déformations des lamelles branchiales, des infections et des infiltrats inflammatoires. Ce qui confirme la sensibilité de l'espèce vis à vis des nanoparticules d'oxyde de titane.

Nos résultats rendent compte du seuil de sensibilité des bivalves et de la toxicité potentielle de ces produits au niveau de l'environnement aquatique, et pu confirmer les effets nocifs de nanoparticule de titanium sur l'espèce *Perna perna* choisi.

Notre travail laisse de nombreuses perspectives d'expérimentations pour une continuité de cette étude à savoir :

- Suivre les effets de polluant testé sur la réponse d'autre biomarqueurs notamment génomiques et protéomique.
- Il semble nécessaire dans la recherche de pathogènes des bivalves de suivre l'évolution des larves de cette espèce *Perna perna* pendant une exposition à long terme de ce toxique étudié.
- Étudier la variation des épaisseurs des coquilles et le poids de cette espèce sur une plus large gamme d'échantillons, et sur un cycle physiologique entier afin de confirmer leur efficacité en tant qu'indice de contamination aquatique.
- Faire des recherches complémentaires sur la répartition, l'écologie et l'évolution des populations de ces espèces dans le bassin méditerranéen pour mieux appréhender leurs réponses physiologiques aux paramètres environnementaux.

Références Bibliographiques

A

- Abada-Boudjema Y-M., Dauvin J-C., 1995.** Recrutement and life-span of two natural mussel populations *Perna perna* (Linnaeus) and *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck) from the Algerian coast. *J. Moll. Stud.*, 61 : 467-481.
- Agbohessi T.P., Imorou Toko I., Atchou V., Tonato R., Mandiki S.N.M., Kestemont P., 2015b.** Pesticides used in cotton production affect reproductive development, endocrine regulation, liver status and offspring fitness in African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 167 : 157-172.
- Alazemi, B.M., Lewis, J.W., Andrews, E.B., 1996.** Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environmental Technology* 17, 225–238.
- André, L., 2017.** « Étude de la toxicité des nanoparticules d'argent et d'oxyde de titane pour *Chlamydomonas reinhardtii* » Mémoire. Montréal (Québec, Canada), Univ : Québec à Montréal, Maîtrise en chimie, 25-90.
- Angélique S. D.,** Thèse de Doctorat, *Agro Paris Tech*, France (2008) 194.
- Asharani, P. V., Serina, N. G., & Hande, M. P., 2011.** Valence state-dependent toxicity of nanoparticles in the mussel, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4), 415-424.
- Atami Y., Bougrid D., 2001.** Reproduction et croissance de deux espèces de moules : *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck1819) et *Perna perna* (Linne1758) en milieu naturel. Mémoire d'ingénieur d'état en *Océanologie*, U,S,T,H,B.,Alger PP :67.
- Auameur R., 1990.** Contribution à l'étude de certains métaux lourds dans les sédiments superficiels de la baie d'Alger. Mémoire d'Ingénieur d'Etat, I.S.M.A.L. (Alger), 62.

B

- Bang, S.H., Le, T.-H., Lee, S.K., Kim, P., Kim, J.S. & Min, J., 2011.** Toxicity Assessment of Titanium (IV) Oxide Nanoparticles Using *Daphnia magna* (Water Flea). *Environmental Health and Toxicology*, 26.
- Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P. & Liu, J.-L., 2013.** Highly efficient targeted *mutagenesis* of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell reports*, 4(1), 220–8.

- Bauer, G., 1987a.** Reproductive strategy of the freshwater pearl mussel. *J. Anim. Ecol.*, 56, 691-704.
- Bayne, B. L., 1982.** Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* (L) *Mar. Biol. Ass.*
- Buccheri, G., and G. Palisano. 1976.** New data on the geographic distribution of *Perna (Perna) picta* (Born, 1780) and systematic considerations on the species. *Shells* 12, 143-156.

C

- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Fabbri, R., & Balbi, T., 2018.** Effects of titanium dioxide nanoparticles on Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) gonads. *Aquatic Toxicology*, 197, 143-154.
- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Fabbri, R., Balbi, T., Salis, A., Gallo, G., 2015.** Immunotoxicity of nanoparticles released from TiO₂ nanocomposites used in representative occupational settings: a comprehensive review. *Potential relevance for workers' health. Nanotoxicology*, 9(4), 451-468.
- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Balbi, T., Salis, A., Damonte, G., Monopoli, M, P., 2016.** Interactions of differently functionalized pristine and carboxylic acid-functionalized polystyrene nanoparticles with sea urchin immune cells. *Environmental research*, 146, 191-198.
- Canesi, L., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Betti, M., Gallo, G., Pojana, G., Marcomini, A., 2007.** Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities : possible modes of action on non target organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 145, 464-472.
- Canesi, L., Ciacci, C., Vallotto, D., Gallo, G., Marcomini, A., Pojana, G., 2010.** In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. *Aquatic Toxicology*, 96, 151-158.
- Carriker, M. R., 1950.** Killing and preservation of bivalve larvae in fluids. *Nautilus* 64 : 14-17.
- Chuto, G. et Chaumet-Riffaud, P., 2010.** Les nanoparticules. *Medcin Nucleaire* 34, 370-376.
- Claisse, D., Joanny, M., Quintin, J.Y., 1992.** Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin. *Analysis* 20 :19-22.
- Corsi, C et Coll, L., 2015.** Bioaccumulation des métaux lourds sur les moules *Zébrées*. *Enviremental Science and Pollution Reserach*, 52-70.
- Crossland, C., Kremer, H., Lindeboom, H., Marshall, J., Tissier, M. L., 2005.** Coastal fluxes in the Anthropocene.

Cui Y., Gong X., Duan Y., Li N., Hu R., Liu H., Hong M., Zhou M., Wang L., Wang H., Hong F., 2010. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 183 : 874-880.

D

Drif. F., 2012. Distribution des métaux trace chez les bivalves (mollusque) dans le golf d'annaba (Nord-est Algérie), thèse de doctorat., Univ : Badji mokhtar, 122-12.

E

Eissa S.H., Rizk E.T., Abou-Shafey A.E., Mona M.H., Atlum A., 2002. Toxicological effect on Euphorbia peplus water suspension on hemocytes of the fresh water snails, Biomphalaria alexandrina and Lanistes carinatus. *Proc LCBS*, 2:417-447.

Elliott, M., et Whitfield, A. K., 2011. Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 94(4), 306–314.

F

Fabianne. L. G., 2010. Etude des relations entre compositions membranaires lipidiques et fonctions cellulaires: cas des hémocytes de bivalves atteints de néoplasie disséminée. Université européenne de bretagne occidentale, spécialité chimie analytique, 20-95.

Ficher. R. W. & Schneider. M., Bauchot. M. L., 1989. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche en méditerranée et mer noire. Zone de pêche 37 –Révision 1:Végétaux et invertébrés. Publication préparée par le FAO. (Projet. GCP/JNT/422/EEC) Rome 1987. Vol 7, 317- 714.

Forbes V.A., Forbes T.L., Rivière J.L., 1997. Écotoxicologie: théorie et applications. Editions Quae, Paris. France, 424.

Francois. J.E., Emmanuelle. L., Guyétant., S., 2012. Cours de L2-L3 Médecine pathologie générale, enseignement thématique Biopathologie tissulaire, 21-30.

G

Gangé, M et Coll, L., 2009. Effets de la pollution métallique et les hydrocarbures sur les bivalves. *Environnement Science and Pollution*.

Gao, L., Wang, Z., Liu, Y., & Wang, X., 2019. Effects of titanium dioxide nanoparticles on the reproduction of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquatic Toxicology*, 211, 33-40.

Geret, F., Jouan, A., Turpin, V., Bebianno, M.J., Cosson, R.P., 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalves mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 15, 61–66.

Giamberini, L., Guerold, F., Noëlle, M. B., Claud, J. P., 1993. Histopathological study of gill of *Dreissena polymorpha pallas* exposed to a new organic molluscicide, 2, 61-70.

Goldberg E-D., Bowen V-T., Farrington J-W., Harvey G., Martin J-H., Parker P-L., Risebrought R-W., Robertson W., Schneider E., Gamble E., 1978. The mussel Watch. *Environmental Conservation* 5, 101-125.

Goldberg, E.D., Bertine, K, K., 2000. Beyond the Mussel Watch new directions for monitoring marine pollution. *The Science of the Total Environment* 247:165-174.

Gornati, R., Longo, A., Rossi, F., Maisano, M., Sabatino, G., Mauceri, A., Bernardini, G., Fasulo, S., 2016. Effects of titanium dioxide nanoparticle exposure in *Mytilus galloprovincialis* gills and digestive gland. *Nanotoxicology* 10, 807–817.

H

Harsanyi, A., 1995. The Fluperl mussel : an extinct species. Juveniles survive in waters. *Fisherman and pond keeper : Envirement pollution*, 10 : 370-372.

Hicks, D, W., McMahan, R, F., 2002. Acclimatation à la température des limites thermiques supérieures et inférieures et de la résistance au gel chez la moule brune non indigène, *Perna perna* (L.), du golfe du Mexique. *Biologie Marine*, 140 : 1167-1179.

J

Janz D.M., 2000. Endocrine system. *The Handbook of experimental animals, The laboratory fish* (eds) Gary K. Ostrander, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, 189-217.

Jocelyne, P., 1990. L'évolution des conditions physiologiques de *Crassostrea rhizophorae* en

Joly, J.P., 1982. Contribution à la biologie de la palourde *Ruditapes decussatus* Thèse de 3ème cycle. Université Pierre et Marie Curie. 113p.

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

K

Koch, W., 1935. La mulette perlière. *Bulletin français de pisciculture*, 80 : 189-198.

Kraeuter, J.N et Castagna, M.,2001. Biology of the Hard Clam. Elsevier. *Devel. Aquaculture Fish. Sci*, 51, 751.

L

Lawton, L.J., Donaldson, W.E., 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research*, 28, 83–97.

Li, X., Wang, W. X., Guo, Z., & Li, H., 2020. Bioaccumulation, depuration, and effects of metal exposure on antioxidant defense system in oysters (*Crassostrea hongkongensis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 195, 110-460.

Li, Y., Zhang, W., Niu, J., Chen, Y., & Zhang, Q., 2016. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on gonadal development and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Environmental Sciences*, 39, 74-80.

Linnaeus.,1758. Gulf States Marine Fisheries Commission. Retrieved, 12-15.

Lubet P., 1973. Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lmk., 1819). Synop. F.A.O. Pêche 88.

Lubet P., et Chappuis J-G., 1966. Nutrition des Lamellibranches. *Océanis* 4(1), 23-24.Paris.158 (II) : 2125-2128.

Lubet P.,1959. Rcherche sur le cycle sexuel et l’emission des gaméte chez *Mytilidés* et les *pectinidés* (molusque bivalve).Vol n 23 :394 -548.

M

Marteil, L., 1976. La conchyliculture française deuxième partie Biologie de l’huitre et de la moule, Institut scientifique et techniques des pêches maritimes. France, 319.

Martoja R., Martoja P.M., 1967. Initiation aux techniques de l’histologie animale..Masson et Cie, Paris VI. 345.

Masaya, M., Yoshinobu, H., Ai, Y., Maki, K., Yasuo, O., 2002. Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury. *Journal of Phycology*. 38(5), 983.

Maynard, E, A., Downs, W, L., Hodge, H, C., 1953. Oral toxicity of uranium compounds. Voegtlin C., and Hodge H. C. (eds) *Pharmacology and toxicology of uranium coumpnds: New-York, McGraw-Hill Book Co*, 1121-1369.

Mcloughlin, N. Yin, D., Maltby, L., Wood, R. M., Yu, H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19, 2085-2092.

Miller, R. J., Bennett, S., Keller, A. A., & Lenihan, H. S., 2012. TiO₂ nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton. *PloS one*, 7(1), 30-321.

Mittal, A., Tripathi, G., Chandra, H., Yadav, R. P., & Shanker, R., 2014. Toxicity assessment of nanoparticles in aquatic environment, 95-98.

Mohamed. A. S., Dajem. S. B., Al-Kahtani. M., Ali. S. B., Ibrahim. E., Morsy. K., Fahmy. S. R., 2021. silver/chitosan nanocomposites induce physiological and histological changes in freshwater bivalve. *Journal of tTrace Elements in Midcine and Biologie*, 4-10.

Moore, M. N. ; Depledge, M, H., Readman, J, W., Leonard, P, D, R., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.* 18, 247-268.

Morad, M., Taha, F, H., Hassanein, F, T., El-Khadragy, F, M., Fehaid, A., Habotta, A, O., Moneim, A, A., 2023. Biochemical and histopathological effects of copper oxide nanoparticles exposure on the bivalve *Canbardia rubens* (Lamarck, 1819). *zoology and Entomology*. University Egypt.

Mortaja., 1995. Mollusque, chapitre I : Organisation et classification, collection (synthèse) Edition collection propos, institut oceanographique. Paris, 9-11.

N

Nzengue, Y., 2008. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines. Thèse de doctorat, Université JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1, France, 53-299.

O

O’Conner, T.P., 1996. Trends in chemical concentrations in mussels and oyster collected along the US coast from 1986 to 1993. *Mar. Env. Resear.* 41: 183-200.

P

Padmaja, M, B., Rao., 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail, *Bellamya dissimillis* (Muller). *Bull.environ.contam.toxicol.*53,142-148.

- Peccini, E., Staudenmann, W., Albergoni, V., Gabriel, R. D., James P., 1994.** *European journal of Biochemistry*.226, 853-859.
- Peres, J, M & Picard, J., 1964.** Nouveau manuel de bionomie benthique de la Méditerranée. Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume, Bulletin, 31(47) : 137.
- Philippe, B., 2019.** Dioxyde de titane – Etude de l'oxydation et applications du titanium, 213-245.
- Pinto, J., Costa, M., Leite, C., Borges, C., Coppola, F., Henriques, B., Monteiro, R., Russo, T., Di Cosmo, A., Soares, A, M.V.M., Polese, G., Pereira, E., Freitas, R., 2019.** Ecotoxicological effects of lanthanum in *Mytilus galloprovincialis*.

R

- Rajagopal, S, Nair, K.V.K., VanDer-Velde, G., Jenner, H, A., 1997.** Seasonal settlement and succession of fouling communities in Kalpakkam, east coast of India., Netherlands *Journal of Aquatic Ecology* 30(4): 309-325.
- Rocha, L., 2015.** Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs : An overview, *Marine Environmental Research*, Vol.111, 75-88.
- Rouabhi, Y.L., 2020.** Étude comparative de la biologie et de la bioaccumulation des métaux traces chez deux *Mytilidae*: *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) et *Perna perna* (Linnaeus, 1758) de la côte ouest algérienne. Thèse de doctorat, Université de Mons (Belgique), 174 *P.echnique d'Océanographie et de pêche* , Salammbô, 2(4) :637-642.

S

- Saidani, W., Sellami, B., Khazri, A., Mezni, A., Dellali, M., Joubert, O., Sheehan, D., Beyrem, H., 2019.** Metal accumulation, biochemical and behavioral responses on the Mediterranean clams *Ruditapes decussatus* exposed to two photocatalyst nanocomposites (TiO₂ NPs and AuTiO₂NPs). *Aquatic toxicology* 208, 71–79.
- Schurink E., de C., et C-L., Griffiths., 1990.** Moule marines de l'Afrique Australe-leur modèle de distribution, stocks, exploitation, et culture. *Journal de la recherche de mollusques et crustacés* 9 (1): 75 –85.
- Shafee, MS., 1989.** Reproduction of *Perna picta* (Mollusca : Bivalvia) from the Atlantic coast of Morocco, *Marine Ecology Progress Series* 53 : 225-245.
- Siddall, S, E., 1980.** Une clarification du genre *Perna* (*Mytilidae*), *Bulletin of Marine Science* 30(4): 858-870

Souza. M. C., Ribeiro.A., Des. M., Gómez-Gesteira. M., deCastro.M., Dias. J. M., 2003. NW Iberian Peninsula coastal upwelling future weakening: competition between wind intensification and surface *heating*. *Sci. Total Environ*, 5-20

Stewart, A, R.,1999. Accumulation of Cd by a freshwater mussel *Pyganodon grandis* is reduced in the presence of Cu, Zn, Pb, and Ni. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56 : 467-478.

Sunila, I ., 1988, Acute histological response of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. *J. Invert. Pathology* 52 : 137-141.

W

Wächtler, K., Dreher-mansur, M, C & Richter, T. Evolution of the Freshwater mussels Larval Types and Early Postlarval Biology in Naiads (Unionoida), 94-95.

Wang, Q., Huang, S., Wang, L., Zhang, S., Gu, Y., Zhao, Y., Wang, Z., 2018. nanoparticles cause oxidative stress and histological changes in the gills of marine *mussels Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 202, 45-53.

Wiensch, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S., Landsiedel, R., 2009. Acute and chronic effects of nano-and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the *freshwater invertebrate Daphnia magna*. *Chemosphere*, 76, 1356–1365.

Y

Young, M, R & Williams, J, C., 1984. The reproductive biology of the freshwater pearl mussel in Scotland, I. *Field studies. Arch. Hydrobiol*, 99 : 405-422.

Z

Zalaghi, A., Lamchouri, F., Toufik, H., Merzouki, M., J. Mater., 2014. *Environ. Sci.* 5 (5) 1643-1652.

Zaouali J., 1973. Note sur la présence de *Perna perna* (L), *Mytilus africanus* (Chemnitz) dans la région de Bizerte (Tunisie). Etude comparative du peuplement Bulletin de l'Institut National Scientifique et Technique d'Océanographie et de pêche, Salammbô,2(4) :637-642.

Zhang, R., Liu, Y., Wang, C., Sun, L.,Zhang, Y., 2020. Histopathological alterations and endocrine disruption in the gonads of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) exposed to silver nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188, 109-891.

Zhao, L., Lu, L., Wang, A., Zhang, H., Huang, M., Wu, H., Xing, B., Wang, Z., Ji, R., 2020. Nanobiotechnology in agriculture: use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance. *Journal of agricultural and food chemistry* 68, 1935–1947

Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y., Lang, Y., 2008. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 43, 278–284.

Site Web :

www.anses.fr/Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Dioxyde de titane in 20/07/2017.

<https://forum.mikroskopia.com/>. Dominique-Encyclopaedia Mikroskopia-Magazine in : 2021, Moule anatomie histologie.

Annexes



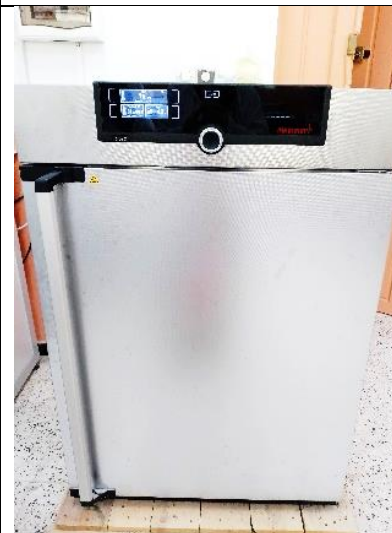
Balance électrique



Oxyde de titane



Bacs de coloration



**Appareil de stérilisation
des verreries**



Tube à essai



Appareil de Centrifugeuse



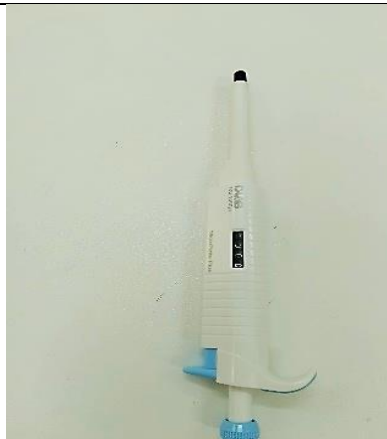
BBC



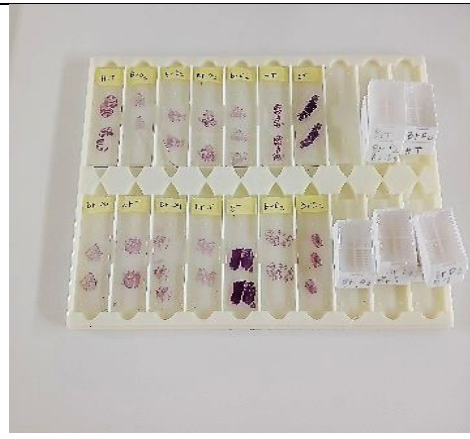
Bouteilles des réactifs utilisé



Spectrum



Micro-pipette 1000



Lames de microscope



La colle de lame



Bain marie de T° 100C°