

EFFETS DES REJETS MÉTALLIQUES DES ACIÈRIES DU COMPLEXE SIDÉRURGIQUE D'EL-HADJAR D'ANNABA SUR UN MODELE CELLULAIRE MARIN : *Tetraselmis suecica*

Reçu le 18/10/2004 – Accepté le 31/12/2004

Résumé

La pollution des écosystèmes aquatiques affecte aussi bien les pays industrialisés que ceux en voie de développement. Le déversement de substances toxiques d'origine chimique tel que les métaux lourds dans l'eau est un exemple particulièrement frappant.

Le principal objectif de notre travail est de mettre en évidence l'effet toxique des poussières rejetées par le complexe Sidérurgique d'EL-HADJAR (Annaba) sur un modèle biologique : une microalgue, verte et marine (*Tetraselmis suecica*), considéré comme un bon bioindicateur de la pollution aquatique.

L'évaluation de la toxicité des rejets métalliques est effectuée par la détermination du taux de croissance, de la forme des cellules et du dosage des protéines totales. Les résultats obtenus ont mis en évidence une inhibition significative de la croissance de *Tetraselmis suecica* par rapport aux cellules témoins à partir du 1^{er} jour, inhibition qui est maximale au 6^{ème} jour de croissance et ceci quelle que soit la concentration des poussières métalliques. Par ailleurs, le taux des protéines augmente chez les microalgues traitées par rapport aux cellules témoins.

Mots clés: Métaux lourds, pollution aquatique, *Tetraselmis suecica*, croissance, protéines totales.

Abstract

Ecosystem aquatic pollution is a world-wide problem which affected both industrial countries and under-development countries; it's due to industrial discharges of toxic chemical substances like heavy metals in the aquatic environment.

The aim of our study was to determine the deleterious effects of heavy metals due to the Siderurgic complex EL HADJAR situated in the region of Annaba (East-Algeria) on the biological pattern which is: green micro algae (*Tetraselmis suecica*) considered a valuable bio indicator for the assessment of heavy metals in aquatic environment.

Metals toxicity has been determined by the rate of the cell growth, shape of the cells and dosage of protein total. The results obtained indicated an important inhibition cell growth in relation to cells control and this from the 1st day. This inhibition is maximal at the 6th day of growth. Protein analysis showed significant increase in heavy metal treated cells.

Keywords: Heavy metals, aquatic pollution, *Tetraselmis suecica*, growth, protein total.

**S. REDOUANE-SALAH
H. BERREBBAH**

Laboratoire de Toxicologie Cellulaire
Département de Biologie
Faculté des Sciences
Université de Annaba (Algérie)

A. BOULAHROUF

Laboratoire de Génie
Microbiologique et Applications
Département de Biologie
Faculté des sciences
Université Mentouri
Constantine (Algérie)

ملخص

إن التلوث المائي يعد من أخطر المشاكل العالمية التي تصيب البيئة، فهو يصيب البلدان المتطورة، كذلك السائرة في طريق النمو. وتوجد المواد الكيميائية السامة كالمعادن الثقيلة يعد دليلا قاطعا لهذا التلوث.

بحثنا هذا يقوم على دراسة سمية المعادن الثقيلة المطروحة من مركب الحجار الكائن بولاية عنابة – الجزائر – على نموذجين بيولوجيين والمتمثلين في: طحلب خلوي، أخضر وبحري *Tetraselmis suecica* كائن خلوي من فصيلة الهد بيئات:

Paramecium sp باعتبارهما مخبرين حيويين للتلوث المائي. لإبراز التأثير السمي للمعادن الثقيلة وضعا عدة معايير مثل: النمو الخلوي، مسار ونوع الحركة، الشكل الظاهري للخلايا، معايرة كمية اليخضور، النشاط الأيضي البروتيني وفي الأخير النشاط الأيضي التنفسي. هذه المعايير أبرزت لنا أن المعادن الثقيلة قيد الدراسة تملك قدرة سمية مثبطة للنمو الخلوي لكل من النموذجين البيولوجيين، وهذا مقارنة للخلايا الشاهدة، كذلك معايرة البروتينات أوضحت ارتفاعا ملموسا لهذه الأخيرة مقارنة بالخلايا الشاهدة، إضافة إلى تثبيط النشاط الأيضي التنفسي لكل من المخبرين الحيويين.

الكلمات المفتاحية: المعادن الثقيلة، التلوث المائي، *Tetraselmis suecica*، النمو، النشاط البيضي البروتيني.

L'industrie est responsable de la quasi totalité des rejets directs ou indirects de métaux lourds dans l'environnement, particulièrement dans l'eau. Ces métaux se caractérisent par leur persistance, leur toxicité et leur pouvoir d'accumulation dans le milieu naturel [1], même à des concentrations très faibles, ce qui perturbe l'équilibre des écosystèmes aquatiques par la contamination de ses microorganismes. Ceux-ci y occupent une position privilégiée, notamment parce qu'ils constituent l'un des éléments de base des réseaux trophiques aquatiques [2].

A l'heure actuelle, en toxicologie, les modèles cellulaires sont surtout utiles pour détecter les mécanismes d'une toxicité observée *in vivo*. Ils permettent de suivre le devenir de composés d'origines exogènes (xénobiotiques) dans la cellule, de préciser les interactions entre une molécule à tester et des cibles cellulaires (organites cibles tel que : mitochondries lysosomes, etc.) et de définir les mécanismes biochimiques [3]. Les objectifs majeurs de ce travail sont la recherche et la validation des tests sur des cellules en culture, semblables aux cellules humaines, par l'établissement d'une corrélation entre une réponse toxique induite par une substance donnée et sa toxicité sur l'homme et l'animal, et la recherche des bioindicateurs sentinelles aux métaux lourds, ceci afin de pouvoir évaluer la pollution marine. De ce fait, notre choix s'est porté sur une microalgue flagellée possédant la même structure des flagelles des spermatozoïdes humains. De plus, ce protiste flagellé est facile à manipuler et à cultiver en laboratoire, leur cycle de vie étant court et parfaitement contrôlable.

MATERIEL ET METHODES

Matériel expérimental

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est une microalgue marine et flagellée de la classe des *Prasinophycées* représentée par *Tetraselmis suecica*.

Matériel chimique

Il est composé de poussières métalliques provenant d'un important pôle industriel, celui du complexe Sidérurgique d'EL-HADJAR situé à 13 Km de la ville de Annaba. L'unité source des poussières rejetées est l'aciérie électrique.

Culture de *Tetraselmis suecica*

Tetraselmis suecica est cultivée selon la méthode de Janet [4] dans un milieu défini qui est le milieu de CONWAY ajouté à l'eau de mer, filtrée et stérilisée, provenant de Ain Achir (Annaba).

Dosage des poussières métalliques rejetées par le complexe Sidérurgique

L'analyse qualitative et quantitative des poussières rejetées a été effectuée par la technique de l'absorption atomique (AA-6601F Flam Emission Spectrophotometer).

Le test de cytotoxicité

La toxicité des poussières rejetées par l'aciérie électrique du complexe sidérurgique (Annaba) a été testée sur des aliquotes de 100 ml de milieu de culture de *Tetraselmis suecica*.

Quatre concentrations ont été choisies : 0.25, 0.5, 0.75 et 1g/100ml de milieu de cultureensemencé par *Tetraselmis suecica*. Un tube témoin ne contenant pas de poussière est utilisé. Le test de cytotoxicité est suivi en fonction du temps pendant une période de 6 jours, pendant laquelle la croissance de *Tetraselmis suecica* est mesurée par dénombrement cellulaire (en utilisant une cellule de numération hématimétrique) pour chaque concentration de poussière toute les 24^h [5, 6]. Le dénombrement cellulaire est répété trois fois.

Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par colorimétrie après 6 jours de traitement par les poussières métalliques, selon la méthode de Bradford [7], c'est une méthode très sensible et rapide.

Observation microscopique

Les cellules de *Tetraselmis suecica* sont observées au microscope photonique afin d'évaluer leur morphologie.

Analyse statistique

L'analyse statistique est effectuée par le test de Student «t» et le test de corrélation en utilisant le logiciel STATISTICA 5.1.

RESULTATS

1- Composition chimique des poussières métalliques rejetées par le complexe sidérurgique

La figure 1 montre que l'analyse des poussières met en évidence la présence de 7 métaux lourds dont l'ordre sur le plan quantitatif est décroissant : Fe (3000 ppm), Mn (320

ppm), Zn (240 ppm), Pb (24 ppm), Cr (10 ppm), Cu (3.7 ppm) et Ni (1.2 ppm).

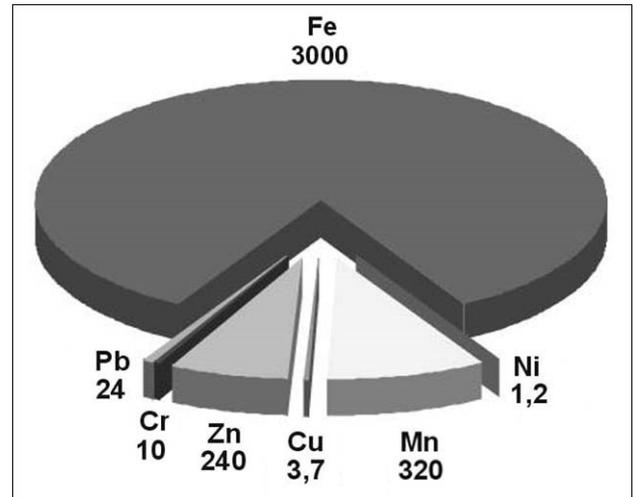


Figure 1: Composition chimique des rejets de l'aciérie électrique du complexe sidérurgique d'El Hadjar en ppm pendant l'année 2002.

2- Effets des rejets métalliques sur la croissance de *Tetraselmis suecica*

Les courbes de croissance offrent des données quantitatives permettant une analyse fiable de l'effet toxique d'une substance donnée. La figure 2 montre que les algues témoins progressent selon une croissance régulière en fonction du temps ($41,66 \times 10^3$ cellules/ml au temps T_0 jusqu'à $128,33 \times 10^3$ cellules/ml au 6^{ème} jour), alors que chez les cellules traitées aux concentrations 0.25, 0.5, 0.75 et 1g/100ml, une inhibition très significative ($p < 0.001$) de la croissance est observée au 6^{ème} jour avec des nombres de cellules respectivement de $28,33 \times 10^3$, 28×10^3 , 15×10^3 , 43×10^3 cellules/ml.

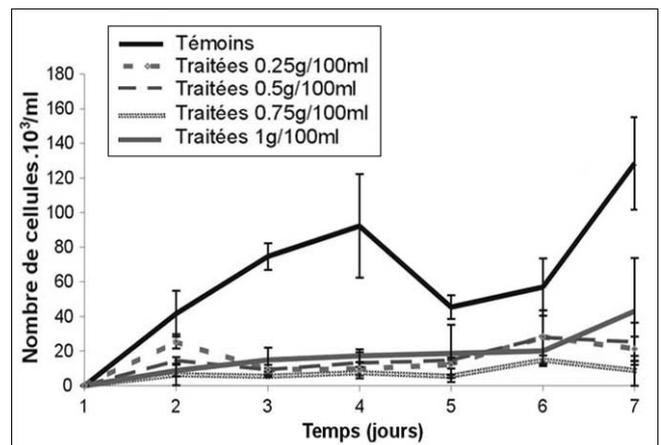


Figure 2: Cinétique de croissance de *Tetraselmis suecica* témoins et traitées avec 0.25-0.5- 0.75 et 1g/100ml par les poussières des aciéries du complexe SIDER respectivement.

3- Effet des rejets métalliques sur le taux des protéines totales chez *Tetraselmis suecica*

La figure 3 montre que *Tetraselmis suecica* traitée aux concentrations 0.25, 0.5, 0,75 et 1g/100ml présente des taux de protéines élevés respectivement de $0.049 \mu\text{g/ml}$, de

0.066 μ g/ml, de 0.084 μ g/ml et de 0.102 μ g/ml par rapport aux témoins (0.031 μ g/ml). Le taux des protéines est en effet hautement corrélé positivement ($r=0.99$, $p=0$) avec les concentrations croissantes de poussières.

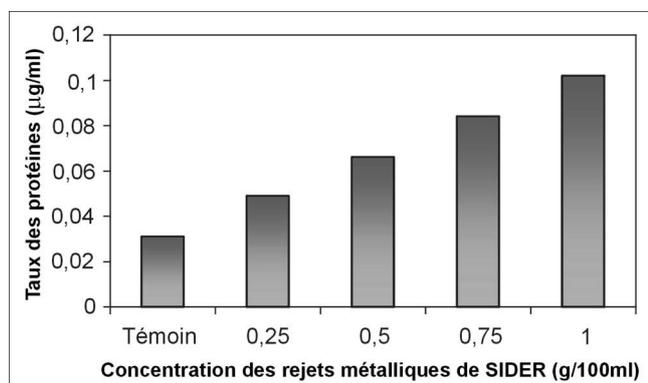


Figure 3: Effet des poussières rejetées par les aciéries du complexe SIDER sur le taux des protéines totales chez *Tetraselmis suecica*.

4- Observation microscopique

Tetraselmis suecica observée au microscope photonique révèle des altérations membranaires chez les traitées aux différentes concentrations par rapport aux cellules témoins qui ont une membrane saine et bien distincte (Fig. 4).

DISCUSSION

L'utilisation d'un modèle cellulaire marin appartenant aux protistes flagellés (*Tetraselmis suecica*) en toxicologie est maintenant admis et permet d'étudier un large éventail de molécules variées allant du médicament aux pesticides [8, 9, 10]. En effet les travaux sur l'utilisation des micro-organismes flagellés comme bioindicateurs de la pollution ont été entrepris avec des polluants divers, les travaux de Mendez et *al.*, [11] et Deveriese et *al.*, [12] ont montré que *Chlamydomonas reinhardtii* est un excellent bioindicateur d'une pollution aquatique, alors que Franklin et *al.*, (2000) à montrer que l'algue dinoflagellé *Chlorella sp* constitue un indicateur de choix d'une pollution tropicale par le Cuivre et l'Uranium.

Toutes ces recherches nous confortent dans notre choix des modèles biologiques pour des études de cytotoxicité extrapolables à l'homme à moindre coût et en un temps très court, pour des investigations *in vivo* et *in vitro*. Ainsi les résultats correspondant aux traitements de *Tetraselmis suecica* par les poussières métalliques montrent d'emblée une inhibition significative dès T_0 . Ces résultats sont en accord avec les travaux de Nassiri et *al.* [2], Wüthrich, [13], Perez-Rama et *al.* [5], Perez-Rama et *al.* [14], Melor et *al.* [15] qui ont tous montré une inhibition de la croissance de *Tetraselmis suecica* dès leur mise en contact avec les polluants. L'absence de paroi pectocellulosique chez *Tetraselmis suecica* facilite le passage des xénobiotiques à travers la membrane plasmique [16] vers l'intérieur des cellules où ils exercent leurs effets toxiques (Fig. 4).

Le dosage des protéines totales, pourrait être un moyen détourné afin d'évaluer le type de réponse cellulaire à une toxicité par les métaux lourds. En effet, différents

mécanismes de détoxifications ont été développés par les micro-organismes leur permettant de maintenir à un niveau suffisamment bas les concentrations intracellulaires de polluant. Une de ces voies de détoxification consiste à accroître la synthèse des protéines de type métalloprotéines spécialisées dans la chélation des métaux ; ces protéines sont de petite taille, possédant une grande affinité pour les métaux grâce à des groupements thiols « SH » portés par des acides aminés capables de séquestrer et bloquer les métaux lourds [17-19].

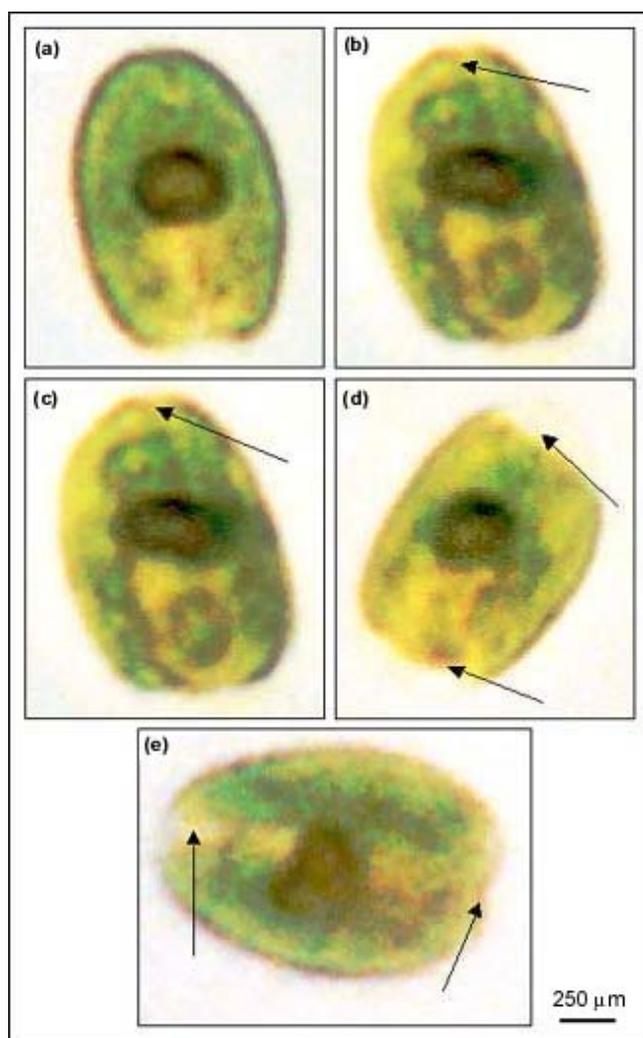


Figure 4: *Tetraselmis suecica* observées au microscope photonique.

- a: Témoins.
- b: Traitée avec 0.25g/100ml des rejets de SIDER.
- c: Traitée avec 0.5g/100ml des rejets de SIDER.
- d: Traitée avec 0.75g/100ml des rejets de SIDER.
- e: Traitée avec 1g/100ml des rejets de SIDER.

De nombreuses études ont confirmé le rôle des protéines de stress dans l'adaptation des microalgues aux conditions environnementales extrêmes [20,21]. Nos résultats sont en parfait accord avec ces travaux puisque le dosage des protéines totales a mis en évidence une augmentation chez *Tetraselmis suecica* traitées avec les différentes concentrations de rejets métalliques de SIDER par rapport aux cellules témoins.

CONCLUSION

Nos résultats nous permettent de conclure que l'algue *Tetraselmis suecica* paraît très sensible aux rejets métalliques de SIDER ce qui nous conduit de la considérer comme un bon bioindicateur d'une éventuelle pollution de l'eau par les métaux lourds.

Enfin, le dosage des protéines totales, rend compte sur la capacité des microorganismes dans la métabolisation/détoxification par la synthèse de métallothionéines capables de chélater les ions métalliques.

REFERENCES

- [1]- Popescu M., Blanchard J.M., Carre J., "Analyse et traitement physicochimique des rejets atmosphériques industriels : Emissions, fumées, odeurs et poussières", Edition Lavoisier TEC et DOC, (1998), pp. 15-666-667.
- [2]- Nassiri Y., Wery J., Mansot J.L., Cinsburger-Vogel T., "Cadmium bioaccumulation in *Tetraselmis suecica*: An Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS) study", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 33, (1997), pp.165-161.
- [3]- Guillouzo A., "Les atouts des modèles cellulaires", *Biofutur.*, Vol. 176 (1998), pp. 18-21.
- [4]- Janet R. Stein., "Handbook of physiological methods: culture methods and growth measurements", Edition Cambridge, (1973), pp. 233-267.
- [5]- Perez-Rama M., Abalde A.J., Herrero L.C., Torres E., "Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*", *Bioresource Technology*, Vol. 84, (2002), pp. 65-270.
- [6]- Wong C.K., Cheung R.Y.H., Wong M.H., "Toxicological assessment of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunaliella tertiolecta*", *Environmental pollution*, Vol. 105, (1999), pp. 175-183.
- [7]- Bradford M., "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, (1976), pp. 248-254.
- [8]- Marano Lebaron F., Izard C., "Effets de l'Acroléine sur les cellules végétales", *Soc. Bot. Fr.*, (1970), pp. 327-332.
- [9]- Marano F., Krishnaswamy S., Betrencourt C., Schoevaert D., Provost J.M., Volochine B., "Control of ciliary beat by calcium: the effect of Lindane, a potent insecticide", *Biol. Cell.*, Vol. 63 (1970), pp. 143-150.
- [10]- Marano F., "L'appareil flagellaire des algues unicellulaires : le mouvement et sa régulation", *Bull. Soc. Bot. Fr.*, Vol, 136, N°2 (1989), pp. 43-55.
- [11]- Mendez-Alvarez M., Leisinger U., Eggen R.I.L., "Adaptative responses in *Chlamydomonas reinhardtii*", *Internat. Microbiol.*, Vol. 2, (1999), pp. 15-22.
- [12]- Devriese M., Tsacaloudi V., Garbayo I., Leon R., Vilchez C., Vigarra J., "Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*", *Plant Physiol. Biochem.*, Vol. 39, (2001), pp. 443-448.
- [13]- Wüthrich S., "Effect of copper on the Glutathione metabolism in *Oocystis marssonii*", *Ecotoxicology of algal communities and populations*, (2001), pp. 6-7.
- [14]- Perez-Rama M., Abalde A.J., Herrero L.C., Torres E., "Class III metallothioneins in response to Cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (KYLIN) BUTCH", *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 20, N° 9 (2001), pp. 2061-2066.
- [15]- Melor I., Siew-Moi P., Soo-Loong T., Murray TB., "A modified toxicity testing method using tropical marine microalgae", *Environmental Monitoring and Assessment*, Vol. 75, (2002), pp. 145-154.
- [16]- Berrebbah H., "Etude du contrôle de la mobilité flagellaire et ciliaire par le calcium. Effet du Lindane, insecticide organochloré", Thèse de Doctorat de l'Université Denis Diderot, Paris VII, (1990), p.144.
- [17]- Bourrelier P.H., Berthelin J., "Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion", Académie des sciences rapport n°42. Edition TEC et DOC, (1998), pp. 83-129-155-161-236-237-351.
- [18]- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F., "Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux", Edition Masson, (1997), pp. 33-53-97.
- [19]- Ravera O., "Monitoring of the aquatic environment by species accumulator of pollutants", *J. Limnol.*, Vol. 60, N°1 (2001), pp. 63-78.
- [20]- Sayers Z., Brouillon P., Svergun D.I., Zielenkiewicz P., Koch M.H.J., "Biochemical and structural characterization of recombinant copper-metlothionein from *Saccharomyces cerevisiae*", *EUR. J. Biochem.*, Vol. 262, (1999), pp. 858-865.
- [21]- Masaya M., Yoshinobu H., Ai Y., Maki K., Yasuo O., "Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury", *Journal of Physiology*, Vol. 38, N° 5 (2002), pp. 983.