

Etude de l'effet du cadmium sur l'activité de l'estérase C₄, l' α -amylase, la valine arylamidase et la β -galactosidase chez le mollusque *Mytilus galloprovincialis* dans la région de Jorf-Lasfar (El Jadida, Maroc)

Aafaf ESSEDAOUI, Henri MASSE & Jamila SIF

Mots-clés : α -amylase, estérase C₄, β -galactosidase, valine arylamidase, cadmium, pollution, *Mytilus galloprovincialis*, Jorf Lasfar, Maroc.

عفاف السعداوي، هنري ماس و جميلة سيف

ملخص

دراسة تأثير الكاديوم على نشاط α -amylase، Valine arylamidase و β -galactosidase عند الرخوي *Mytilus galloprovincialis* في ناحية الجرف الأصفر. إن نسبة كبيرة من المعادن الثقيلة وخاصة الكاديوم ظهرت في الغدة الهضمية لـ *Mytilus galloprovincialis* عند مقربة من النفايات الصناعية لمعمل مغرب - فسفور III و IV في ناحية الجرف الأصفر، والهدف من العمل الذي قمنا به هو رصد تأثير الكاديوم على نشاط الأنزيمات التالية: α -amylase، C₄ esterase، Valine arylamidase و β -galactosidase بواسطة طريقتين: إختبار Apy-Zyn و Colorimétrie. أما النتائج المحصل عليها فهي تبين جيدا التحولات التي طرأت على نشاط هذه الأنزيمات، ففي المحطة الأكثر تلوثا هناك نقص في نشاط C₄ esterase و α -amylase و Valine arylamidase و ارتفاع في نشاط β -galactosidase.

RESUME

D'importantes concentrations de métaux lourds notamment celles du cadmium, ont été décelées au niveau de la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis*, à proximité des rejets de l'usine Maroc-Phosphore III et IV dans la région de Jorf-Lasfar. Le travail que nous avons réalisé, a pour but de détecter l'effet de ce métal sur l'activité de l' α -amylase, l'estérase C₄, la β -galactosidase et la valine arylamidase au niveau de la glande digestive par la méthode d'Api-Zym et/ou de colorimétrie. Les résultats obtenus montrent une diminution de l'activité de l' α -amylase, de l'estérase C₄ et de la valine arylamidase chez les animaux issus de la station la plus polluée. Cependant, l'activité de la β -galactosidase se trouve augmentée.

ABSTRACT

Effect of cadmium on the activity of esterase C₄, α -amylase, valine arylamidase and β -galactosidase on the Mollusc *Mytilus galloprovincialis* in the Jorf Lasfar area (El Jadida, Morocco). The important concentration of heavy metals, notably cadmium, has been detected in the digestive gland of mussels *Mytilus galloprovincialis* from stations located near the industrial outfall of Maroc-Phosphore III and IV factories. The aim of this work was to study the effect of cadmium on the activity of α -amylase, esterase C₄, β -galactosidase and valine arylamidase by Api-Zym test and colorimetry method. The activity of this enzymes showed a decrease of α -amylase, esterase C₄ and valine arylamidase in mussels collected from the polluted station. However, the activity of β -galactosidase was observed to increase.

INTRODUCTION

La pollution par les métaux lourds des eaux côtières à forte industrialisation a été depuis longtemps détectée au moyen des mollusques (PHILLIPS, 1977; GOLDBERG & al., 1978). Leur accumulation dans les tissus des bivalves peut même donner une idée sur leur concentration dans l'eau du lieu de prélèvement (FABRIS, 1994). Par ailleurs, cette accumulation dépend de plusieurs facteurs tels que la concentration, la température de l'eau où ils se trouvent, etc. Les modifications physiologiques induites par le cadmium (HIATT & HUFF, 1975) se traduisent en partie par des perturbations de l'activité enzymatique. Cependant, nous possédons peu

d'informations sur les changements de la physiologie de la digestion en fonction de la pollution.

L'objectif du présent travail est l'étude de la variation de l'activité des enzymes digestives en fonction de la pollution métallique chez *Mytilus galloprovincialis* du littoral de Jorf-Lasfar. Pour ce faire nous avons dosé l'activité de l' α -amylase et détecté celle de l'estérase C₄, la β -galactosidase et la valine arylamidase au niveau de la glande digestive de moules prélevées des stations situées à différentes distances des rejets industriels du complexe Maroc-Phosphore III et IV. Nous avons également dosé le cadmium au niveau de cette même glande.

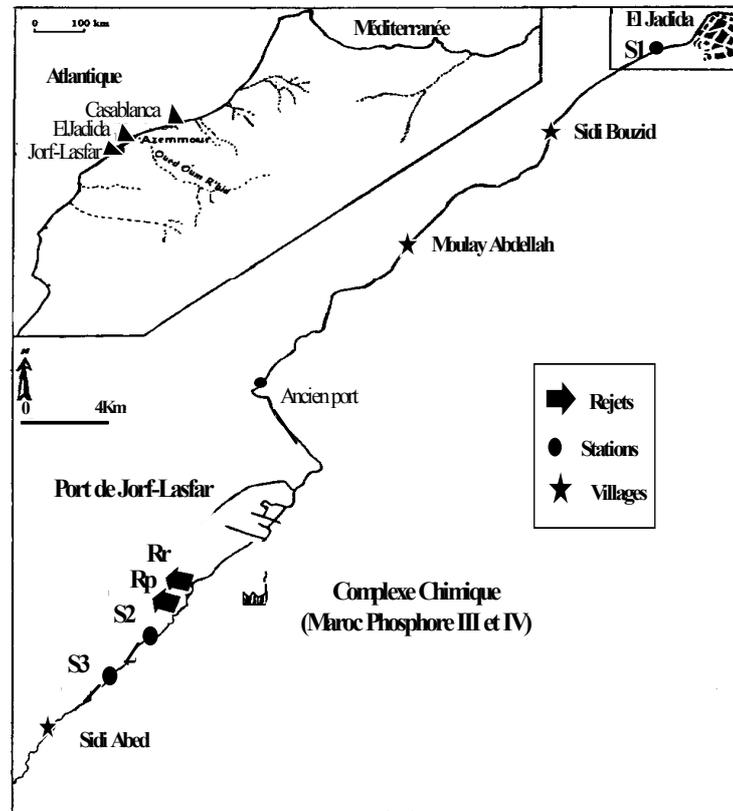


Figure 1 : Localisation des stations d'étude et des deux émissaires de Jorf-Lasfar (El Jadida).

MATERIELS ET METHODES

DESCRIPTION DU SITE D'ETUDE

Jorf-Lasfar, situé à 25 km au sud de la ville d'El Jadida, abrite le complexe chimique d'industrie Maroc-Phosphore III et IV dont les rejets sont déversés directement dans la mer par deux collecteurs : rejet de refroidissement (Rr) et rejet principal (Rp). Le choix des stations étudiées (Fig. 1) est basé sur leur emplacement par rapport au rejet principal, source de pollution métallique : la station S1, station témoin, est située à 1 km au sud de la ville d'El Jadida et à 28 km au nord du rejet principal ; la Station S2 est située à 500 m au sud du rejet principal ; la station S3 est située à 2 km au sud du rejet principal.

Les échantillons de moules *Mytilus galloprovincialis* ont été prélevés à marée basse au niveau du médiolittoral supérieur, mensuellement durant une année (de décembre 1995 jusqu'en janvier 1997). Ils

sont mis dans des flacons en plastique remplis d'eau de mer puis transportés au laboratoire dans des glacières. Les animaux sont soit immédiatement traités, soit conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

DOSAGE DE L' α -AMYLASE

Les moules de taille 30-40 mm sont disséquées et leurs glandes digestives isolées. Deux grammes de ces glandes sont ensuite homogénéisés à froid dans 4 ml de tampon phosphate salin (20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 et 10 mM NaCl , pH 6,9), puis centrifugés à 4°C pendant 10 mn à 10 000 g. Le surnageant obtenu est incubé avec 1% d'amidon dans le même tampon pendant 15 mn à 37°C . La formation du sucre réducteur, le maltose, produit de la réaction enzymatique, est quantifié colorimétriquement par addition d'une solution d'acide 3,5-dinitrosalicylique et de tartrate double de sodium et potassium (RICK & STEGBAUER, 1984). Les résultats sont exprimés en μg de maltose. $\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de poids frais.

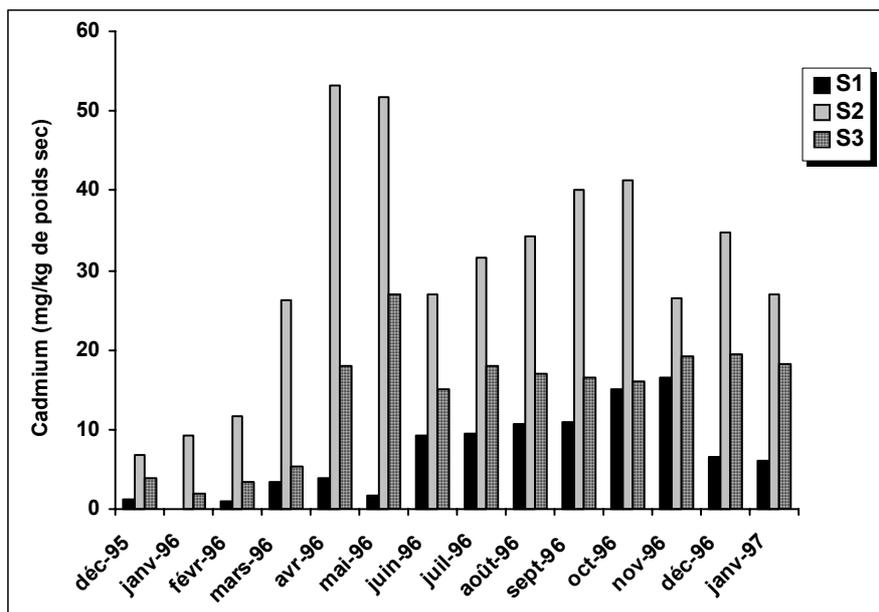


Figure 2 : Variation des concentrations du cadmium dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* du littoral de Jorf-Lasfar.

DOSAGE DES HYDROLASES

La détection de l'activité enzymatique des hydrolases est réalisée par une méthode qualitative et semi-quantitative qui est le test Api-Zym (MONGET, 1978), dont le principe consiste en une batterie de vingt microcapsules contenant une trame inerte fibreuse où sont répartis les substrats synthétiques et leurs tampons.

La préparation de l'extrait tissulaire testé consiste en un broyage de la glande digestive (moules de taille 30-40 mm) dans NaCl, puis centrifugation pendant 10 mn à 4°C. Les activités enzymatiques sont révélées par le réactif coloré Fast Blue BB.

Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de 0 à 5 (l'unité correspond à 5 nmol de substrat hydrolysé.mn⁻¹).

DOSAGE DU CADMIUM

Une période de jeûne d'environ 36 heures a été imposée aux moules prélevées sur le terrain, afin que les teneurs en métaux du contenu digestif ne viennent pas interférer avec les métaux présents dans les tissus de l'animal (AMIARD-TRIQUET & al., 1984). Quarante à soixante moules de taille 30-40 mm par station sont

disséquées et les glandes digestives sont isolées et pesées puis séchées dans l'étuve à 70°C pendant 48 h.

Des fractions de 0,5 g de glandes digestives par station sont soumises à une attaque par un mélange d'acide (HNO₃, H₂SO₄) et d'eau oxygénée (THIBAUD, 1983). Les fioles contenant les échantillons sont ensuite mises dans un bain de sable pendant 15 h à une température de 100 à 140°C.

Les minéralisats obtenus sont filtrés, dilués à l'eau bidistillée, puis stockés dans des flacons à 4°C jusqu'au moment de l'analyse du métal par spectrophotométrie d'absorption atomique à four graphite réalisée au Laboratoire d'analyses vétérinaires à Casablanca. La solution témoin (le blanc), ne contenant pas de fraction de glande digestive, est traitée de la même manière que les autres échantillons. Les résultats sont exprimés en mg.kg⁻¹ de poids sec (ppm).

RESULTATS

CADMIUM

La variation des concentrations du cadmium semble dépendre de deux facteurs : la saison et le site de prélèvement (Fig. 2). Ainsi, les teneurs les

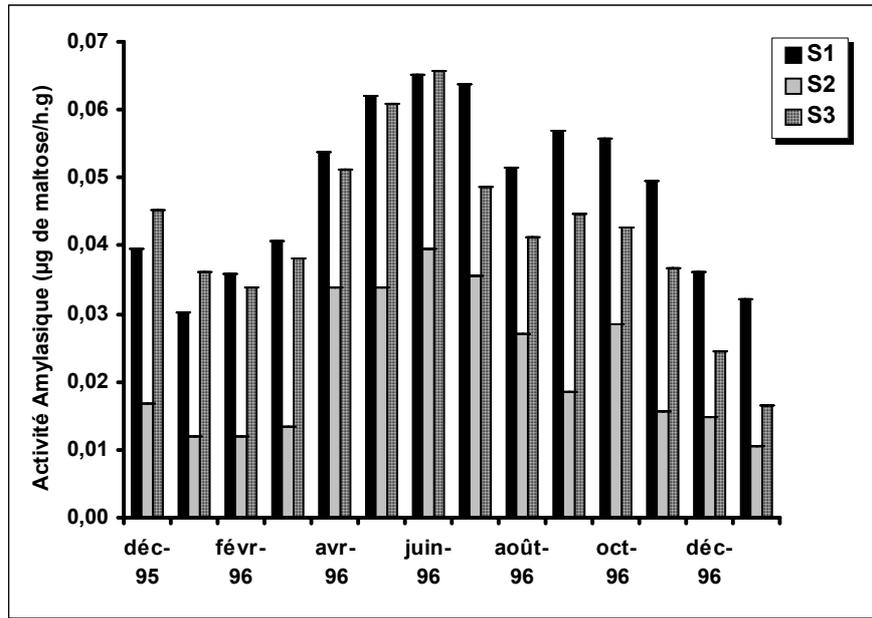


Figure 3 : Variation spatio-temporelle de l'activité de l' α -amylase au niveau de la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* du littoral de Jorf-Lasfar.

plus élevées sont enregistrées pendant le printemps (avril-mai) et l'automne (septembre-octobre) dans la station S2 (lieu le plus proche du rejet principal) par rapport à la station de référence S1. Les glandes digestives des animaux de la station S3 présentent des concentrations plus faibles, qui sont même par moments comparables à celles des animaux témoins.

ACTIVITE DE L' α -AMYLASE

L'activité amylasique présente une variation saisonnière dans les stations étudiées (Fig. 3). Cependant, si on établit la comparaison entre l'activité de l' α -amylase des moules de la station S2 par rapport à celle des animaux de S1, nous notons une différence très significative ($t = 15,049$, $P = 0,01$) qui se manifeste par une baisse pendant l'hiver et une élévation pendant les mois d'été (juin, juillet et août). Les animaux de S3 présentent cependant, une activité amylasique proche de celle des animaux de S1, la différence entre ces deux groupes n'étant pas significative.

ACTIVITE DES HYDROLASES

Les animaux de la station S2, comparés à ceux de S1, présentent une baisse d'activité de l'estérase C₄ et

de la valine arylamidase pendant tous les mois sauf juin pour l'estérase C₄ et janvier pour la valine arylamidase. Cette baisse est notée également chez les moules de la station S3 sauf en décembre pour l'estérase C₄ et en janvier pour la valine arylamidase. Cependant, l'activité de la β -galactosidase est augmentée, surtout pendant les mois d'avril et juin (Fig. 4).

DISCUSSION

D'après les résultats obtenus, une corrélation très nette peut être dégagée entre l'accumulation du cadmium dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* et les modifications de l'activité de certaines enzymes digestives. En effet, nous avons observé, notamment pendant l'hiver et le printemps, surtout dans la station la plus polluée S2, une baisse de l'activité de l' α -amylase, de l'estérase C₄ et de la valine arylamidase. La concentration du cadmium dans cette même glande et pendant la même saison, se trouve alors augmentée. L'activité de la β -galactosidase suit une évolution inverse à celle des autres enzymes.

Ces données recourent en partie ceux de GAUDY & al. (1991) qui ont utilisé la même méthode chez le

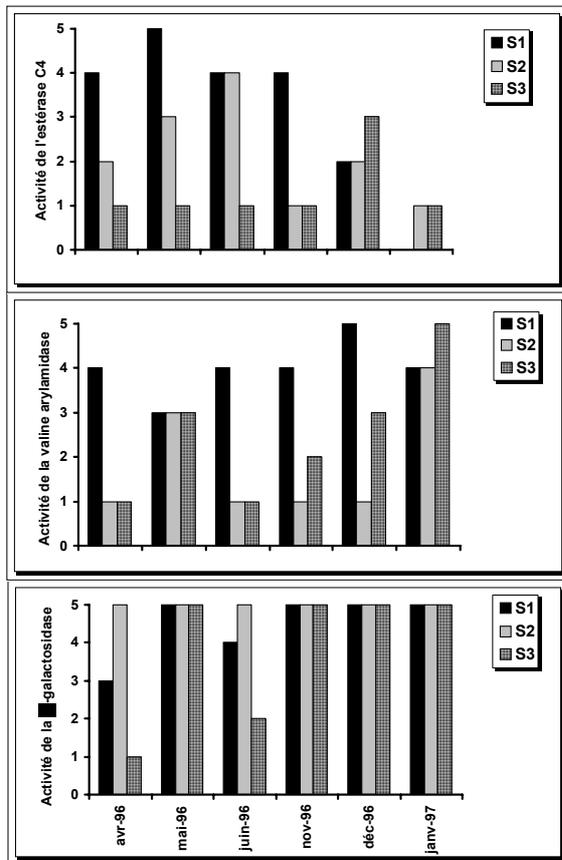


Figure 4 : Variation de l'activité de l'estérase C₄, de la valine arylamidase et de la β -galactosidase au niveau de la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* du littoral de Jorf-Lasfar.

crustacé *Leptomysis lingvura* pour étudier les variations de l'activité des hydrolases en fonction du temps d'exposition au cadmium. Ces auteurs ont montré une élévation de l'activité enzymatique à 24 h d'exposition pour 14 hydrolases, suivie par la suite soit d'une stabilisation soit d'une baisse au bout de 48 et 72 h. Aussi, la variation saisonnière de l'activité de plusieurs enzymes digestives en fonction de la pollution a été plus récemment notée par WOTTON & al. (1996) chez *Mytilus edulis* et par LIVINGSTONE & al. (1995) chez *Mytilus galloprovincialis* dans des sites à pollution industrielle accrue.

Si on considère d'autres données de la littérature, plusieurs auteurs (AMIARD & al., 1986 et REGOLI & ORLANDO, 1993) rapportent que la concentration maximale en métal chez les mollusques sentinelles se

fait en hiver et au printemps avec des valeurs minimales en été. Aussi, PHILLIPS (1980) a résumé en trois points les facteurs qui causent les variations saisonnières de l'accumulation des métaux dans les organismes indicateurs : la variation de la décharge de la source de pollution, les changements physiologiques liées au cycle de reproduction et la variation des facteurs du milieu ambiant.

Cependant, la variation saisonnière de l'activité enzymatique notée chez les animaux de la station de référence est certainement liée aux nutriments et leur disponibilité, comme cela a été montré aussi bien pour l' α -amylase (GAUDY & BOUCHER, 1987 ; KERAMBRUN & GUERIN, 1993), les estérases (GUERIN & KERAMBRUN, 1982 ; OXFORD, 1975) que pour les autres enzymes (ROMESTAND, 1971).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMIARD, J.C. ; AMIARD-TRIQUET, C. ; BERTHET, B. & MÉTAYER, C. (1986). - Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. I. Field study. *Mar. Biol.*, 90, pp. 425-431.
- AMIARD-TRIQUET, C. ; MÉTAYER, C. & AMIARD, J.C. (1984). - Technical recommendations for studying the biogeochemical cycle of trace metals. *Rev. Intern. Oceanogr. Med.*, 73-74, pp. 27-34.
- FABRIS, J.G. (1994). - Estimation of Cadmium, Lead and Mercury concentrations in estuarine waters using the mussel *Mytilus edulis planatulus*. *Environ. Toxicol. and water Quality*, 9, pp. 183-192.
- GAUDY, R. & BOUCHER, J. (1987). - Respiration, excretion et activité enzymatique digestive chez quelques espèces de copépodes de l'océan indien en relation avec leur stratégie nutritionnelle. *IFREMER Act. Coll.*, 5, pp. 45-60.
- GAUDY, R. ; GUERIN, J.P. & KERAMBRUN, P. (1991). - Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism, nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomysis lingvura* (Crustacea, Mysidacea). *Mar. Biol.*, 109, pp. 493-501.
- GOLDBERG, E.D. ; BOWEN, V.T. ; FARRINGTON, J.W. ; HARVEY, G. ; MARTIN, J.H. ; PARKER, P.L. ; RISEBROUGH, R.W. ; ROBERTSON, W. ; SCHNEIDER, E. & GAMBLE E. (1978). - The mussel watch. *Environ. Conserv.*, 5, pp. 101-124.
- GUERIN, J.P. & KERAMBRUN, P. (1982). - Effects of diet on esterases, alkaline phosphatase, malate dehydrogenase and phosphoglucomutase activity observed by polyacrylamide gel electrophoresis in *Tisbe holothuriae* (Haparticoid, Copepod). *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B, 4, pp. 761-770.

- HIATT, V. & HUFF, J.E. (1975). - The environmental impact of cadmium. An overview. *Int. J. Environ. Stud.*, 7, pp. 277-285.
- KERAMBRUN, P. & GUERIN, J.P. (1993). - Changes in amylase activity of *Leptomysis lingvura* in relation to experimental feeding conditions. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105A, 2, pp. 303-310.
- LIVINGSTONE, D.R. ; LEMAIRE, P. ; MATTEWS, A. ; PETERS, L.D. ; PORTE, C. ; FITZPATRICK, P.J. ; FOERLIN, L. ; NASCI, C. ; FOSSAATOV, V. & ANDERSSON, T. (1995). - Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy : Biochemical studies. *Mar. Environ. Res.*, 39, 1/4, pp. 235-240.
- MONGET, D. (1978). - *Mise au point d'une microméthode de détection et de mesure d'activité enzymatique (Api-Zym). Résultats obtenus dans différents domaines d'application.* Thèse Doct.-Ing., Univ. Cl. Bernard, Lyon I.
- OXFORD, G.S. (1975). - Food induced esterase phenocopies in the snail *Cepaea nemoralis*. *Heredity*, 35, pp. 361-370.
- PHILLIPS, D.J.H. (1977). - The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. A review. *Environ. Pollut.*, 13, pp. 281-317.
- PHILLIPS, D.J.H. (1980). - *Quantitative aquatic biological indicators.* Applied Science Publishers, Essex, UK.
- REGOLI, F. & ORLANDO, E. (1993). - *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of lead pollution: biological variables and cellular responses. *Sci. Total Environ.* (Suppl.), 2, pp. 1283-1292.
- RICK, W. & STEGBAUR, H.P. (1984). - α -amylase. In : BERGMAYER, H.U. (ed). *Methods of enzymatic analysis*, 2nd ed. Academic Press Inc., New York, pp. 885-889.
- ROMESTAND, B. (1971). - Variations de la protéinémie en fonction du jeûne chez l'isopode *Meinertia oestroides* (Risso) (Cymothoidae). *C.R. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris*, 173D, pp. 823-826.
- THIBAUD, Y. (1983) - Dosage de métaux (Cu, Zn, Fe, Pb, Cd) dans les organismes marins par absorption atomique. *CNEXO*, pp. 263-273.
- WOTTON, A.N. ; GOLDFORB, P.S. ; LEMAIRE, P. ; O'HARA, S.C.M. & LIVINGSTONE, D.P. (1996). - Characterization of the presence and seasonal variation of a CYP1A-like enzyme in digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, 42, 1/4, pp. 297-301.

Manuscrit déposé le 9 février 1998

Version modifiée acceptée le 28 septembre 1998

Adresses des auteurs

Aafaf ESSEDAOUI & Jamila SIF

Laboratoire de physiologie animale,
Groupe Sciences de la Mer
Faculté des Sciences,
Université Chouaib Doukkali,
B.P. 20,
24000 El Jadida-Maroc.

Henri MASSE

Centre d'océanologie de Marseille,
Station marine d'Endoume,
Rue Batterie des Lions,
F-13007 Marseille,
France