



Qualité des sols dans deux sites du Nord-Est Algérien: utilisation d'une espèce bioindicatrice de la pollution des sols (Soil quality of two sites in Northeast Algeria: use of a bioindicator species of soil pollution)

A. N. Hamdi-Ourfella, N. Soltani

Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Département de Biologie, Université Badji Mokhtar, 23000-Annaba, Algérie

Received 28 September 2014, Revised 20 October 2014, Accepted 29 October 2014

*Corresponding author E-mail: nouredline.soltani@univ-annaba.dz et algerie_amina@hotmail.com ; Tel : +213779285615

Résumé

Des travaux antérieurs ont montré que la pollution métallique est prépondérante dans la région d'Annaba. La contamination des sols résulte de l'apport des produits phytosanitaires et du lessivage des poussières métalliques générées par le complexe sidérurgique, ArcelorMittal. La présente étude s'inscrit dans un programme de biosurveillance de la qualité des écosystèmes terrestres en utilisant *Helix aperta* (Born, 1778) comme bioindicateur et vise l'évaluation de la pollution des sols dans deux sites: El Hadjar, situé à proximité de l'usine sidérurgique Arcelor Mittal, et El Kala, localisé dans un parc national loin de toutes sources de pollution. Des dosages de l'acétylcholinestérase (AChE, biomarqueur de neurotoxicité) et de la glutathion S-transférase (biomarqueur du stress oxydatif) ont été réalisés sur les animaux collectés dans les deux sites. Dans une seconde expérience, nous avons testé en conditions de laboratoire la réponse de cette espèce bioindicatrice à une formulation commerciale d'insecticide néonicotinoïde (Actara, Syngenta®), très utilisé dans la protection de diverses cultures en Algérie. L'insecticide a été administré par application topique à diverses concentrations (2000, 2500, 3000 mg m.a/L) sur des escargots juvéniles. Les résultats mettent en évidence une inhibition de l'AChE et une induction de la GST dans le site d'El Hadjar comparativement à celui d'El Kala. Les bioessais de contamination des juvéniles de cette espèce montrent que l'Actara manifeste une toxicité avec une relation dose-réponse. Les paramètres de létalité ont été déterminés. Les individus juvéniles d'El Kala sont significativement plus sensibles que ceux d'El Hadjar ($DL_{50} = 4298$ mg m.a/L chez les individus d'El Hadjar, $DL_{50} = 3565$ mg m.a/L chez les individus d'El Kala).

Mots clés : Pollution, Sols, Nord-Est Algérien, Bioindicateur, *Helix aperta*, Actara, Biomarqueurs.

Abstract

Previous work has shown that metal pollution is prominent in the region of Annaba. Soil contamination results from the contribution of pesticides and leaching generated by the steel complex, Arcelor Mittal metal dust. This study is part of a biomonitoring program on quality of terrestrial ecosystems using *Helix aperta* (Born 1778) as a bioindicator and assess the quality of soils in two sites: El Hadjar, located near the ArcelorMittal manufactory, and El Kala situated in the National Park away from all sources of pollution. An assay of Acetylcholinesterase (AChE, biomarker of neurotoxicity) and glutathione S-transferase (biomarker of oxidative stress) activities were performed on animals collected from the two studied sites. In a second series of experiment, we tested under laboratory conditions the response of this bioindicator species to a trade formulation of a neonicotinoid insecticide (Actara, Syngenta®), widely used in several crops in Algeria. The insecticide was administered topically at several concentrations (2000, 2500, 3000 mg a.i/L). The results show an inhibition in AChE activities and an induction in GST activities in the site of El Hadjar compared to El Kala site. Bioassays of contamination of juveniles of this species show that Actara exhibits toxicity with a dose-response relationship. The different parameters of lethality were determined. Thus, the juveniles from El Kala are significantly more sensitive than those of El Hadjar. ($LD_{50} = 4298$ mg a.i/L in individuals from El Hadjar, $LD_{50} = 3565$ mg a.i/L in individuals from El Kala).

Keywords : Pollution, Soil, North East Algerian, bioindicator, *Helix aperta*, Actara, biomarkers.

Introduction

Les activités agricoles et industrielles sont de principales sources de contamination des milieux naturels. La ville d'Annaba est un important pôle touristique et économique installé sur la côte Est algérienne [1]. Des

travaux antérieurs ont montré que la pollution métallique est prépondérante dans la région d'Annaba [2-4]. La contamination des eaux souterraines par les nitrates dans les zones d'agriculture intensive a été largement discuté [5]. L'utilisation des invertébrés pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes a une longue histoire dans les milieux aquatiques [6] et terrestres [7]. Les Gastéropodes Pulmonés sont des indicateurs écologiques pertinents de la pollution métallique et organique de l'écosystème terrestre [8-9]. Les biomarqueurs constituent un outil biologique naturel qui peut signaler la pollution d'un milieu ainsi que la biodisponibilité des substances toxiques [10].

La présente étude utilise une espèce bioindicatrice de la pollution des sols *Helix aperta* (Born, 1778) (Mollusca, Gasteropoda) et vise 1/ à évaluer la pollution des sols de deux sites situés dans le Nord-Est algérien et 2/ à tester sa réponse à une exposition aiguë en laboratoire à un insecticide (Actara) très utilisé par les agriculteurs et ceci par la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la glutathion S-transférase (GST). La GST est un biomarqueur du stress oxydatif, tandis que l'AChE est le site cible d'inhibition essentiellement par les organophosphorés et les carbamates [10].

2. Matériel et méthodes

2.1 Présentation des sites d'étude et collecte des échantillons

Les échantillons d'*Helix aperta* Born, 1778 (Mollusca, Gasteropoda) ont été récoltés durant l'hiver 2013 au niveau des sites retenus : El Kala (N 36,85490; E 8,33262) et El Hadjar (N 36,80350; E 7,74264). Ces sites ont été choisis par rapport à leur éloignement des principales sources de pollution.

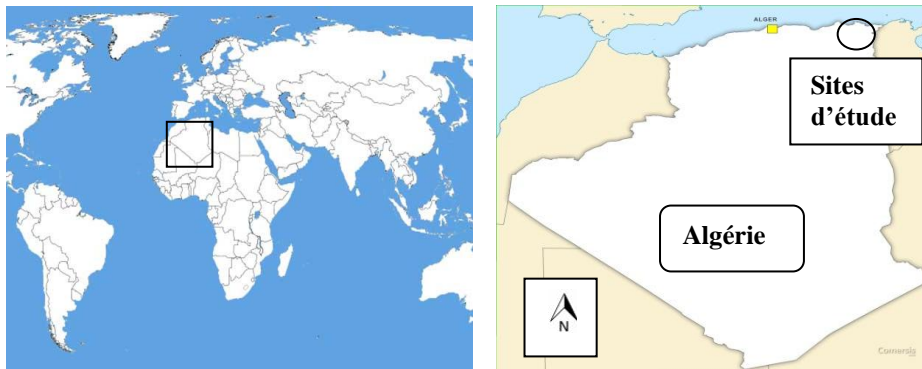


Figure 1 : Localisation géographique des sites d'étude.

2.2 Insecticide et traitement

L'Actara (Syngenta®) est utilisé sous forme granulée avec 25% de thiaméthoxame, la matière active. Cette dernière est agoniste du récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Un certain nombre de techniques standard sont disponibles pour les bioessais en laboratoire. Les techniques les plus utilisées incluent l'application par contact. La CL_{50} avec son intervalle de confiance (I.C) pour cet insecticide a pu être estimée en exposant les escargots à différentes concentrations de l'insecticide (2000, 2500 et 3000 mg m.a/L) pendant 96h. Différents bioessais ont été effectués sur des individus juvéniles (âgés d'environ 1 mois) ayant $10,432 \pm 2,644$ mm de hauteur de coquille, $13,545 \pm 4,761$ mm de diamètre de coquille et un poids moyen de $0,157 \pm 0,067$ g. Les juvéniles étant plus vulnérables à toute sorte de pollution.

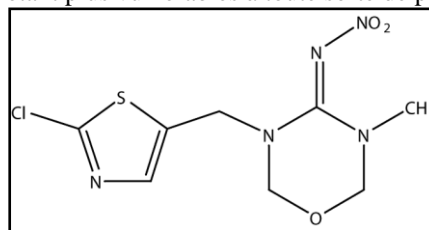


Figure 2 : Structure chimique du thiaméthoxame.

2.3 Dosage

2.3.1 Activité de l'acétylcholinestérase

Le dosage de l'AChE a été réalisé la méthode d'Ellman *et al.* [11] décrite précédemment [1]. Les fragments de tête sont homogénéisés pendant quelques secondes dans 1 ml de solution détergente [38,03 mg EGTA (acide éthylène glycol-bis, β -aminoéthyl éther NNN'N' tétra acétique), 1ml Triton X 100% 5,845 g NaCl, 80 ml tampon tris (10 mM, pH 7)] à l'aide

d'un homogénéiseur à Ultrason, puis centrifugés à 9000 tours /mn pendant 15 minutes ; le surnageant récupéré servira pour la mesure de l'activité de l'AChE. L'activité spécifique de l'acétylcholinestérase est déterminée comme suit: à une fraction aliquote de 100 µl de surnageant sont additionnées à 100 µl de DTNB (0,1 M, pH 8) et 1 ml du tampon Tris (0,1 M, pH 7) ; 3 à 5 minutes sont nécessaires pour épuiser la réaction spontanée. 100 µl du substrat (acétylthiocholine iodide: 118 mg d'acétylthiocholine dans 5 ml d'eau distillée) sont ajoutés. La lecture des densités optiques s'effectue à 412 nm toutes les 4 minutes pendant 20 mn contre un blanc où le surnageant a été remplacé par un volume équivalent de solution détergente. Les résultats obtenus ont été exprimés en µM/mn/mg de protéines.

2.3.2 Dosage de la glutathion S-transférase

La glutathion S-transférase est extraite de l'hépatopancréas et dosée selon Habig *et al.* [12] qui consiste à homogénéiser les échantillons dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6) avec saccharose à l'aide d'un broyeur à ultrasons. Le mélange est centrifugé à 14000 tours/mn pendant 30 mn. Une fraction aliquote de 200 µl du surnageant récupéré est ajoutée à 1,2 ml du mélange (CDNB 1 mM/GSH 5 mM). Contre un blanc où les 200 µl du surnageant sont remplacés par 200 µl eau distillée. La lecture des densités optiques s'effectue à 340 nm toutes les minutes pendant 5mn, et les taux sont exprimés en µM/mg de protéines.

2.3.3 Dosage des protéines

Les données relatives aux biomarqueurs étant exprimées par rapport aux protéines. La quantification des protéines a été réalisée selon la méthode de Bradford [13] avec le bleu brillant de Coomassie (G 250, Sigma) comme réactif et le sérum d'albumine de bœuf comme standard (Merck).

2.4 Analyse des statistiques

Les données sont représentées par la moyenne et l'écart type ($m \pm SD$). Elles ont fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA). Les différents tests statistiques ont été effectués à l'aide des logiciels MINITAB (Version 16, Penn State College, PA, USA) et PRISM (GraphPad software, La Jolla California, USA). La quantification des protéines est réalisée à partir d'une courbe d'étalonnage.

3. Résultats et discussion

3.1 Mesures des biomarqueurs *in situ* chez *Helix aperta* et contamination des sols

Les résultats sont mentionnés dans les figures 3 et 4. D'après les valeurs de l'acétylcholinestérase mesurées *in situ* (Fig. 3) on observe qu'il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les deux sites d'étude représentés dans le graphe par les mêmes lettres.



Figure 3 : Activité de l'acétylcholinestérase chez *Helix aperta* dans les deux sites d'étude (El Kala et El Hadjar).

Les valeurs de la GST sont mentionnées dans la figure 4. On remarque que l'activité de la GST chez les individus récoltés du site d'El Hadjar est plus élevée que chez les individus du site d'El Kala.

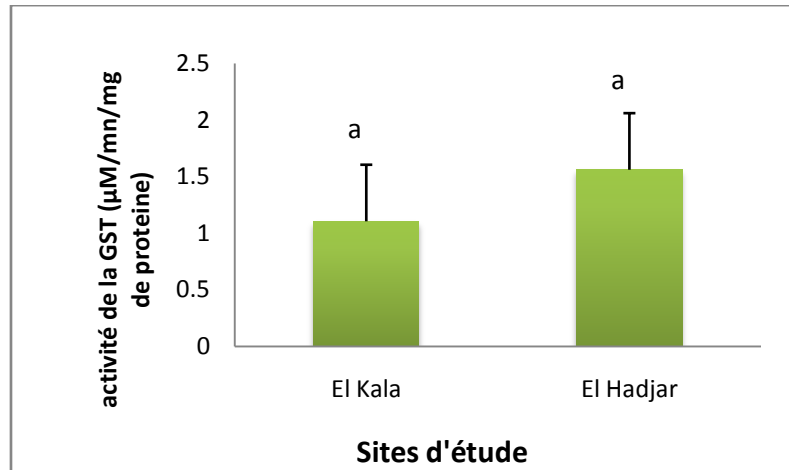


Figure 4 : Activité de la glutathion S-transférase chez *Helix aperta* dans les deux sites d'étude (El Kala et El Hadjar).

La différence dans les valeurs de la GST d'El-Hadjar peut se traduire par une pollution provenant de la zone industrielle FERTIAL, et l'usine ArcelorMittal, ces activités métallurgiques ont des apports diffus d'origine lointaine (poussières, aérosols) pouvant parcourir des centaines de kilomètres à partir de leur sources avant de se déposer [14-16] ou soit des apports ponctuels localisés d'origine proche liée aux activités industrielles de longues durées [17]. Contrairement aux valeurs de la GST des individus récoltés du site d'El-Kala; ce dernier site se trouve dans une zone protégée loin de toute pollution.

3.2 Mesures des biomarqueurs chez *Helix aperta* après exposition à l'Actara

H. aperta a été traité par contact (application topique) en laboratoire avec l'Actara avec une dose de 2500 mg matière active par litre d'eau distillée. L'Actara est un insecticide neurotoxique utilisé couramment par les agriculteurs. Les mesures de biomarqueurs montrent une inhibition de l'activité AChE par le traitement (Fig. 5) en comparaison avec les témoins. Ceci confirme son mécanisme d'action primaire sur le système nerveux, puisque la matière active, le thiaméthoxame, est un agoniste du récepteur nicotinique de l'acétylcholine. De plus, le traitement induit un stress oxydatif révélé par l'induction de la GST comparativement à la série témoin (Fig. 6).

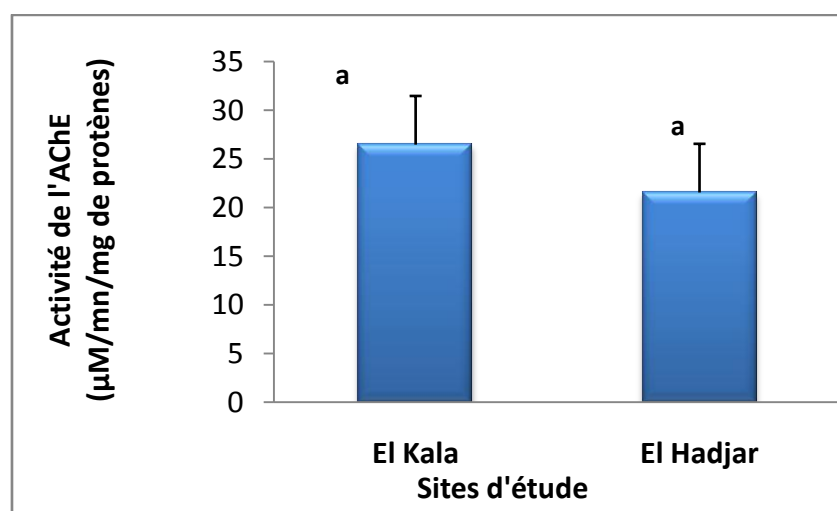


Figure 5 : Effet de l'Actara sur l'activité de l'acétylcholinestérase chez *Helix aperta* dans les deux sites d'étude (El Kala et El Hadjar).

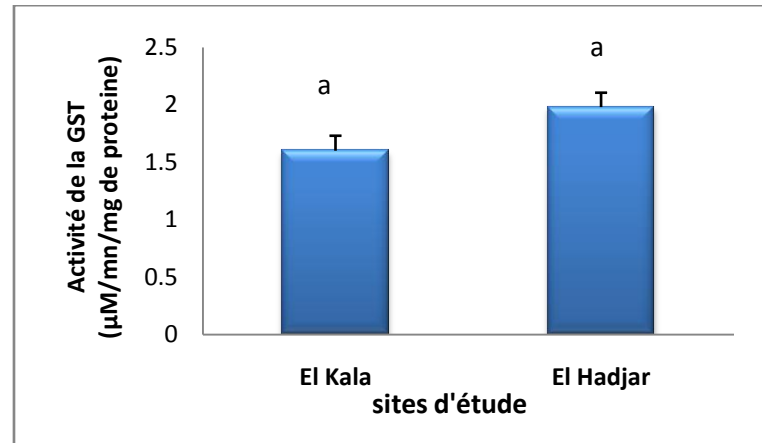


Figure 6 : Effet de l'Actara sur l'activité de la glutathion S-transférase chez *Helix aperta* dans les deux sites d'étude (El Kala et El Hadjar).

En accord avec nos résultats, une induction de la GST a été signalée chez l'escargot *Theba pisana* exposé à des pesticides à base de cuivre [18]. De plus, il a été mis en évidence une induction de l'activité GST après exposition de *Theba pisana* à un insecticide de la famille des oxime-carbamate [19] mais aussi chez l'espèce *Helix aspersa* exposé à l'insecticide imidaclopride [20].

La GST fait partie de la famille d'enzymes multifonctionnelles, elle s'est avérée être impliquée dans la détoxification des xénobiotiques, la protection contre les dommages oxydatifs et le transport intracellulaire d'hormones [21].

3.3 Paramètres de létalité

Les doses létales ont été déterminées chez les individus provenant des deux sites d'étude. Les résultats sont exprimés en mg de matière active (m.a.) par litre d'eau distillée (Tableau 1). Après 96H, on note une CL_{50} de 3565 mg m.a L^{-1} pour les individus récoltés dans la région d'El Kala, et une CL_{50} de 4289 mg m.a L^{-1} pour les individus récoltés dans la région d'El Hadjar.

Tableau 1 : Toxicité de l'Actara (mg m.a/L) des individus juvéniles d'*H. aperta* après une exposition de 96 h, analyse des probits.

Traitement Actara	Droite de régression	CL_{50} (IC)
El-Kala	$Y = - 5,43 + 2,94 X$	3565 (2444 - 5201)
El-Hadjar	$Y = - 12,2 + 4,74 X$	4298 (3641 - 5073)

L'inhibition ou l'induction *in vivo* des biomarqueurs est un bon outil environnemental pour évaluer l'exposition et les effets potentiels des xénobiotiques sur les organismes [22-23]. Si le taux des métaux lourds dépasse leurs concentrations naturelles ils deviennent dangereux pour la santé humaine et la faune, et cela en raison de leur poids moléculaire élevé [24]. Les bioessais de contamination de l'espèce bioindicatrice avec l'Actara révèlent une induction du système de détoxification mis en évidence par une augmentation de l'activité de la GST, et une inhibition de l'activité de l'ACHe en rapport avec son mode d'action (neurotoxique). Les essais de toxicité de l'Actara à l'égard des juvéniles de l'espèce retenue révèlent une CL_{50} de 3565 mg m.a/L chez les individus d'El Kala contre 4298 mg m.a/L mg chez les individus d'El Hadjar. Ceci suggère que les individus d'El Kala sont plus sensibles à l'insecticide néonicotinoïde par rapport aux individus d'El Hadjar. La CL_{50} du thiaméthoxame déterminée chez une autre espèce de Gastéropode *Macrochlamys indica* est de 5100 ppm [25]. Le thiaméthoxame est très actif contre les chrysomèles d'haricots (Coléoptères) avec une $CL_{50} = 250 \mu g / L$ [26]. [27] ont estimé la toxicité du Thiaméthoxame sur le scarabée rhinocéros *S. aloeus* (coleoptera, scarabaeidae), la CL_{50} est de $1.092 \mu l ml^{-1}$ (0.98 - 1.21). Ainsi que le temps léthal (LT_{50}) qui est de 72,01 h. La fonction locomotrice est altérée du fait du mode d'action du thiaméthoxame qui semble interférer avec les récepteurs

nicotinique de l'acétylcholine situés dans la membrane post-synaptique, ce qui perturbe la fonction nerveuse normale et la mort des individus [28-30]. L'utilisation des pesticides en agriculture est néfaste pour les espèces non ciblées. En général, les effets économiques de l'augmentation de la production agricoles ont été très positifs; cependant, leurs risques écotoxicologiques sont à prendre en considération [31].

Conclusion

Les biomarqueurs sont en train de devenir une partie intégrante de l'évaluation de la santé des écosystèmes [10-32]. Les résultats montrent une pollution des sols de la région d'El Hadjar, comparativement aux sols d'El Kala. Les bioessais de contamination de l'espèce bioindicatrice *H. aperta* avec l'Actara révèlent une induction du système de détoxification mis en évidence par une augmentation de l'activité de la GST, et une inhibition de l'activité de l'ACHé en rapport avec la neurotoxicité. L'espèce peut être retenue comme bioindicateur dans les programmes de biosurveillance de la qualité des sols. L'ACHé et la GST sont des biomarqueurs fiables du stress environnemental [33].

Remerciements Ce travail a été financé par le Fonds National de la Recherche scientifique et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Algérien (Projets CNEPRU et PNR Professeur N. Soltani).

Références

1. Sifi K., Chouahda S., Soltani N. Biosurveillance de l'environnement par la mesure de biomarqueurs chez *Donax trunculus* (L., 1758) dans le golfe d'Annaba, (Algérie). *Mésogée Bulletin du Muséum d'Histoire Naturelle de Marseille* 63 (2007) 11-18.
2. Semadi A., Deruelle S. Lead pollution monitoring by transplanted lichens in Annaba area (Algeria). *Rev. Poll. Atmos.*, 35 (140) (1993) 86-102.
3. Abdenmour C., Smith B.D., Boulakoud M.S., Samraoui B., Rainbow P.S. Trace metals in shrimps and sediments from Algerian water. *J. Catalo. Mat. Env.*, 3 (2000) 9-12.
4. Beldi H., Gimbert F., Maas S., Scheifler R., Soltani N. Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba, Algeria. *Afric. J. Agric. Res.*, 1(4) (2006) 85-90.
5. Marouane B., Dahchour A., Dousset S. El Hadjjaji S. Monitoring the Mnasra groundwater quality regarding nitrate-related pollution, Gharb region-Morocco, 2011-2012. *Mor. J. Chem.*, 2 (4) (2014) 375-382.
6. Phillips D.J.H., The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. *A review. Environmental Pollution*, 13 (1977) 281-317.
7. Eijsackers H. Soil fauna and soil microflora as possible indicators of soil pollution. *Environmental Monitoring and Assessment*, 3 (1983) 307-316.
8. Berger B., Dallinger R. Terrestrial snail as quantitative indicators of environmental pollution. *Environmental Monitoring and Assessment*, 25 (1993) 65-84.
9. Corotet J., Gomot-de Vaufleury A., Pointso-Blaguer N., Gomot L., Texier C., Cluzeau D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutants effects. *European Journal of Soil Biology*, 35 (1999) 115-134.
10. Lam P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean and Coastal Management*, 52 (2009) 348-354.
11. Ellman G.L., Courtney K.O., Andres V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol. and Physiol.*, 38 (1961) 84-90.
12. Habig W.H., Pabst M.J., & Jakoby W.B. Glutathion-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249 (1974) 7130-7139.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein -dye binding. *Anal biochem.*, 72 (1976) 248-254.
14. Godin M., Feinbert M.H., Ducauze C.J. Modeling of soil contamination by air - borne lead and cadmium around several emission sources. *Environmental Pollution*, 10 (1985) 97-114.
15. Hopkin S.P. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. *Elsevier Applied science*, NY, USA, (1989) 366 p.
16. Merian E., Anke M., Ihnat M., Stoepler M. Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance. 2nd Edition, VCH Publishers, Weinheim, New York, USA, (2004) 1806.
17. Baize D. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). *INRA*, Paris, (1997) 408 p.
18. El- Gendy K.S., Radwan M.A., Gad A.F. In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. *Chemosphere*, 77 (2009) 339-344.
19. Radwan M.A., EL-Wakil H.B., & Osman K.A. Toxicity and biochemical impact of certain oxime carbamate pesticides against terrestrial snail, *Theba pisana* (Muller). *J. Environ. Sci. Health*, 27 (6) (1992) 759-773.
20. Radwan M.A., & Mohamed M.S. Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95 (2013) 91-97.

21. Zhou, J., Wang, W.N., Wang, A.L., He, W.Y., Zhou, Q.T., Liu, Y., & Xu, J. Glutathione Stransferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150 (2) (2009) 224-230.
22. Ozmen M., Sener S., Mete A., & Kucukbay H. In vitro and in vivo acetylcholinesteraseinhibiting effect of new classes of organophosphorus compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18 (1999) 241-246.
23. Sturm A., Wogram J., Hansen P.D. & Liess M. Potential use of cholinesterase in monitoring low level in organophosphates in small streams: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18 (1999) 194-200.
24. Waheed A., Hamid F.S., Ahmad N., Aslam S., Naheed Z., Ahmad H., Abbassi F.M., Ali H., Shah A.H. Qualitative investigation of pollutants water by differnt methods at tea garden, Shinkiari. *Mor. J. Chem.*,2 (4) (2014) 330-342.
25. Bhavsar Smitha Sand Patel Nisar G. Molluscicidal activity of two pesticides against *Macrochlamys indica*. *golden research thoughts*, 1 (6) (2011) 1-3.
26. Chelsea L. Effects of Thiamethoxam Seed Treatments on Bean Leaf Beetles. Dissertations and Student Research in Entomology (2012) 19p.
27. Martínez L.C., Plata-Rueda A., Zanuncio J.C., & Serrao J.E. Comparative toxicity of six insecticides on the rhinoceros beetle (coleoptera: scarabaeidae). *Florida Entomologist*, 97 (3) (2014) 1056-1062.
28. Grewal P. S., Power K. T., & Shetlar D. J. Neonicotinoid insecticides alter diapause behavior and survival of overwintering white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Pest. Manag. Sci.* 57 (2001) 852-857.
29. Matsuda K., Buckingham S. D., Kleier D., Rauh J. J., Grauso M., & Sattelle D. B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 573-580.
30. Tan J., Salgado V.L., & Hollingworth R. M.. Neural actions of imidacloprid and their involvement in resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Environmental Monitoring and Assessment*, 64 (2008) 37-47.
31. Marouane B., Belhsain K., Jahdi M., El Hajjaji S., Dahchour A., Dousset S., Satrallah A. Impact of agricultural practices on groundwater quality : Case of Gharb region -Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (S1) (2014) 2151- 2155.
32. Boyd, R.S. Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology*, 36 (2010) 46-58.
33. Larba R., Soltani N. Use of the land snail *Helix aspersa* for monitoring heavy metal soil contamination in Northeast Algeria. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186 (2014) 4987–4995.

(2014) ; <http://www.jmaterenvironsci.com>