**Rapport de stage**

**Titre de l'étude** : Contribution à la connaissance des biomarqueurs de pollution : cas de l'histopathologie de la glande digestive chez la moule *Perna perna* (Sénégal).

**Investigateur Principal** : [Mme Fatou TABANE./., Arona DIALLO]

**Institution** : [Fondation CERES-Locustoxe]

**Date de début** : [05/03/2022]

**Date de fin** : [30/01/2023]

**Contexte de l'étude**

La pollution marine est une préoccupation croissante à l'échelle mondiale, avec des impacts considérables sur la biodiversité et les écosystèmes aquatiques. Les moules, en particulier *Perna perna*, sont des bio-indicateurs précieux en raison de leur capacité à filtrer et accumuler des polluants présents dans l'eau. L'analyse histopathologique de la glande digestive de ces moules peut fournir des informations cruciales sur les effets des polluants environnementaux. Cette étude vise à identifier et caractériser les biomarqueurs histopathologiques de pollution pour contribuer à une meilleure évaluation de la santé des écosystèmes marins.

**Objectifs**

1. **Identifier les biomarqueurs histopathologiques dans la glande digestive de *Perna perna* en réponse à l'exposition aux polluants.**
2. **Évaluer les variations histopathologiques en fonction des niveaux de pollution dans différents sites côtiers.**
3. **Établir une corrélation entre les altérations histopathologiques et les concentrations du polluant chimiques dans les tissus mous de la moule.**

**Hypothèses**

1. Les moules *Perna perna* présentent des altérations histopathologiques distinctes dans la glande digestive en réponse à l'exposition à des niveaux élevés de pollution.
2. Les niveaux de pollution plus élevés sont associés à des altérations plus sévères des tissus de la glande digestive.
3. Les biomarqueurs histopathologiques identifiés peuvent servir d'indicateurs fiables de la santé environnementale des zones côtières étudiées.

**Méthodologie**

1. **Sites d'Échantillonnage**

* Les moules seront collectées à l’île de Yoff Tonghor située à un peu moins de 0,2 mille marins, soit à moins de 300 mètres du quai de pêche artisanale du village de Yoff Tonghor, à Dakar (Sénégal).
* Sélection de deux sites côtiers avec des niveaux de pollution variables : **Site des Almadies (ALM) (site témoin à faible pollution)** et **Site du port (PAD) (forte pollution industrielle)**.

**2. Collecte des Échantillons**

* **Période** : Les échantillons seront collectés tous les 28 jours pendant une période de 2 mois et tout en tenant compte des variations saisonnières.
* **Méthode de Collecte** : Les moules seront collectées à la main à marée basse et placées dans des glacières contenant de l'eau de mer pour le transport vers le laboratoire.

1. **Préparation des Échantillons**

L’analyse histologique des échantillons de moules sera réalisée au laboratoire de parasitologie de l’Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD) en collaboration avec le Centre de Recherche en Ecotoxicologie en Sécurité Environnementale (CERES-Locustoxe) de Dakar.

* **Dissection** : Les moules seront placées dans des bassines contenants de l’eau de mer. La glande digestive sera extraite avec soin.
* **Fixation** : Les tissus seront fixés dans une solution de formaldéhyde à 10% pendant 24 heures.
* **Inclusion en Paraffine** : Après déshydratation, les échantillons seront inclus dans de la paraffine pour faciliter la coupe des sections.

**4. Analyse Histopathologique**

* **Coupe des Sections** : Utilisation d'un microtome pour obtenir des sections de 5 µm d'épaisseur.
* **Coloration** : Application de colorants standard tels que l'hématoxyline-éosine (H&E).
* **Observation Microscopique** : Les sections colorées seront observées sous un microscope optique pour identifier les altérations histopathologiques telles que l'inflammation, la nécrose, et les anomalies des tubules digestifs.

1. **Analyse Chimique de concentration en hydrocarbure aromatique polycyclique**

L’analyse de teneur des tissus en HAP sera faite au laboratoire de l’Université du Littoral Côte d’Opale (France), pour l’extraction et la purification des HAP.

* **Échantillons de tissus mous** : Des échantillons de tissus mous seront prélevés simultanément pour analyse chimique des polluants (hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP).
* **Techniques Quechers**: L’analyse de teneurs des tissus en HAP sera faite en suivant la méthode expose ci-dessous
* 5 g de chair de moules seront broyées et mises dans un tube de centrifugation de 50 ml
* Ajout de 8 ml d'acétonitrile et mélange au vortex pendant 1 minute
* Ajout de 10 ml de solution d'acide acétique à 1% dans de l'acétonitrile et mélange au vortex pendant 1 minute.
* Ajout d'un sachet de sel Bond Elut Quechers AOAC (Agilent 5982-0755), agitation vigoureuse pendant 1 minute.
* Centrifugation à 4000 rpm pendant 5 minutes.
* Transfert de 8 ml de surnageant dans un tube dSPE de 15 ml (Agilent 5892-5158) et mélange au vortex pendant 1 minute
* Centrifugation à 4000 rpm pendant 5 minutes.
* Et en fin, il sera procédé d’un transfert de 1 ml de surnageant dans un vial et dopage avec 500 ng de HAP deutérés (2.5 µl de solution mère à 200 µg/ml).
* **Techniques Analytiques** : Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et de la spectrométrie de masse (MS) pour quantifier les concentrations de polluants.

**6. Analyse Statistique**

* **Comparaison des Sites** : Utilisation de tests statistiques (ANOVA, test de Tukey) pour évaluer les différences significatives entre les sites.
* **Corrélation** : Analyse de corrélation pour établir une relation entre les altérations histopathologiques et les niveaux de pollution en HAP mesurés.

**Éthique et Déontologie**

Toutes les procédures suivront les normes éthiques en vigueur pour le traitement des animaux marins. Les moules seront traitées avec soin pour minimiser le stress. La mesure des paramètres physico-chmiques sera faite de manière à ne pas perturber l'environnement local.

**Résultats Attendus**

1. Identification de biomarqueurs histopathologiques spécifiques à la pollution dans la glande digestive de *Perna perna*.
2. Démonstration de la corrélation entre les niveaux de pollution et la sévérité des altérations tissulaires.
3. Production de données quantitatives sur les niveaux de pollution dans les zones étudiées, fournissant une base pour des politiques de gestion environnementale.

**Calendrier**

| **Étape** | **Durée** | **Date** |
| --- | --- | --- |
| Revue de littérature | 2 mois | [Date de début] |
| Collecte des échantillons | 3 mois | [,,,,,,,,,,,,,,,,,] |
| Préparation des échantillons | 2 jours | [,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,] |
| Analyse histopathologique | 1 mois | [,,,,,,,,,,,,,,,,] |
| Analyse chimique | 2 mois | [,,,,,,,,,,,] |
| Analyse statistique | 15 jours | [,,,,,,,,,,,,,,,,] |
| Rédaction du rapport final | 6 mois | [,,,,,,,,,,,,,,,] |

**Budget Prévisionnel**

| **Poste** | **Montant (Fcfa)** |
| --- | --- |
| Matériel de laboratoire | 000 |
| Produits chimiques | 000 |
| Équipement d'analyse | 000 |
| Déplacements et transport | 000 |
| **Total** | **000** |

**Conclusion**

Cette étude vise à approfondir la compréhension des effets des polluants marins sur la faune, en se concentrant sur *Perna perna* comme bio-indicateur. Les résultats obtenus contribueront à améliorer les stratégies de conservation et de gestion des environnements côtiers, tout en renforçant l'utilisation des biomarqueurs histopathologiques pour la surveillance environnementale.

Ce protocole de recherche propose une approche méthodique et rigoureuse pour étudier l'impact de la pollution sur les moules, en utilisant l'histopathologie comme outil principal d'évaluation. Les résultats attendus fourniront des informations précieuses pour la protection des écosystèmes marins.